

EVALUACION DE LA REPRODUCCION Y SOBREVIVENCIA DE BACTERIAS DEL GENERO *Rhizobium* EN SUELO DE TURBA DE LA ZONA DE MEDIO QUESO, LOS CHILES, COSTA RICA ¹/*.

Eugenia León **

Oscar Acuña **

Carlos Ramírez **

ABSTRACT

Reproduction and survival of bacteria of the genus *Rhizobium* in peat from the area of Medio Queso, Los Chiles, Costa Rica. A preliminary study was undertaken to explore the possibility of utilizing the peat (Typic Troposaprist) of a large deposit near Medio Queso, province of Alajuela, Costa Rica as a bacterial carrier. In this study, *Rhizobium japonicum* strain 587 was used. As a control peat utilized by the producer firm of inoculants, The Nitragin Co. Milwaukee, USA, was used. This study was carried out for 17 weeks; inoculants were stored at 4, 24 and 37 C. The two peats were inoculated with a broth culture of *Rhizobium japonicum* so that the resulting initial population in the inoculated peat was 6.5×10^8 bacteria/g. The bacterial population in both peats incubated at 37 C behaved similarly; no multiplication was detected in the peats and after 6 weeks of inoculation, plate counts were below the minimal standard of 1.0×10^8 bacteria/g of peat. The bacterial population continued to decline sharply so that by the 17th week of incubation the surviving population was only 0.0003% of the initial number of bacteria. Thus, exposure of inoculants to ambient conditions in the low plains of Costa Rica could be detrimental to the bacteria. In the peats incubated at 4 C and 24 C, conversely, the bacterial population after two weeks at 24 C and after 4 weeks at 4 C increased in the Costa Rica peat from 6.5×10^8 bacteria/g to 2.4×10^9 /g and 2.7×10^8 /g, respectively. Under identical conditions, the bacteria in the Nitragin peat increased to 1.2×10^9 /g and to 9.0×10^8 /g, respectively. These figures characterized the inoculants as adequate for a non-sterile peat carrier. The survivability was equally acceptable after 8 weeks of incubation; viable counts were over 1.0×10^9 /g. After 17 weeks of incubation, plate counts were above the minimal standard of 1.0×10^8 /g of peat with the exception of Nitragin peat incubated at 4 C. In planta most probable counts after 17 weeks of incubation suggested a better survival of bacteria at 4 C than at 24 C. These observations were the preliminary results of a second study in which different strains of *Rhizobium* and Costa Rican sterile and non-sterile peat was utilized. In sterile peat all strains showed viable counts higher than 1.0×10^9 bacteria/g of peat after 4 months of incubation. In non-sterile peat, counts were lower although equally satisfactory except for two strains. The scientific evidence supports the view that peat from this Costa Rican deposit is quite adequate as a bacterial carrier for the production of inoculants not only for legumes but also for other type of bacterial inoculants such as antagonists to plant pathogens, according to preliminary results.

1/ Recibido para publicación el 7 de diciembre de 1985.

* Financiado por el Proyecto de Ciencia y Tecnología CONICIT/AID y parcialmente por la FAO.

** Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica.

INTRODUCCION

La aplicación al suelo de fertilizantes nitrogenados es una práctica agrícola válida para aumentar la productividad de los cultivos, puesto que en la mayoría de los suelos cultivados del mundo este elemento es limitante (Burns y Hardy, 1975). En casi todos los países subdesarrollados este costoso insumo agrícola se importa y su uso se circunscribe a unos pocos cultivos. Por razones socioeconómicas su utilización es poca en cultivos de subsistencia lo cual contribuye a que estos países no sean autosuficientes entre otras cosas, en la producción de granos para el consumo humano y animal. Una alternativa viable para aumentar la producción y reducir la importación de fertilizantes es la promoción del cultivo de leguminosas, capaces de fijar el nitrógeno atmosférico en asociación simbiótica con bacterias del género *Rhizobium* (Hardy, 1980; Ramírez, 1983). La biomasa de leguminosa puede ser explotada directamente (granos, forraje, madera, leña, pulpa) o indirectamente por cultivos no fijadores de nitrógeno en esquemas de manejo como la rotación de cultivos o cultivo asociado (Gómez y Zandstra, 1976, Henzell y Vallis, 1979; Yoshida, 1976).

El mejoramiento de la simbiosis, sobre todo mediante la inoculación de semillas con cepas seleccionadas por su adaptabilidad y alta capacidad de fijar nitrógeno, es una estrategia adecuada para aumentar la producción de biomasa aprovechable de leguminosas (Roughley, 1970; National Academy of Sciences, 1979).

Para la utilización de la inoculación es necesario disponer de un material que sirva de acarreador de las bacterias. El suelo de turba ha sido uno de los materiales usados con más éxito en la producción de inoculantes porque, además de no ser tóxico para *Rhizobium*, permite la reproducción y prolonga su sobrevivencia, aumentando así la viabilidad del producto, no solo en la turba misma sino también en las semillas, lo cual es crucial para obtener una buena respuesta a la inoculación (Burton, 1981; Roughley y Vincent, 1967; Thompson, 1980). Otras ventajas de este material es su bajo costo y su fácil aplicación y adherencia a las semillas.

Las condiciones de almacenamiento de un inoculante, por otro lado, determinan su vida útil. Así un inoculante de alta calidad se puede deteriorar rápidamente por la muerte de las bacterias si se expone, por ejemplo, a las altas temperaturas (Wilson y Trang, 1980).

Dado que en Costa Rica existen varios depósitos de turba, el presente estudio tuvo por objetivo principal evaluar la multiplicación y sobrevivencia de diversas cepas de *Rhizobium* en este material, fácilmente accesible para su muestreo, del enorme depósito situado en la localidad de Medio Queso, Los Chiles, Costa Rica. Además se evaluó el efecto de tres temperaturas de almacenamiento, comunes de obtener bajo condiciones normales de manejo de inoculantes en Costa Rica, sobre la sobrevivencia de las bacterias.

Esta información preliminar era necesaria para establecer las posibilidades de una mayor utilización de inoculantes para leguminosas en Costa Rica.

MATERIALES Y METODOS

Origen de las cepas de *Rhizobium*

En una primera fase del trabajo se utilizó la cepa No. 587 de *Rhizobium japonicum* (CR 508) procedente del Mircen, Porto Alegre, Brasil. En la segunda fase se empleó 11 cepas cuya sinonimia, procedencia y hospedero se detallan en el Cuadro 1.

Condiciones de crecimiento

Las bacterias se crecieron en agar, extracto de levadura manitol, AELM (Vincent, 1970). Para la preparación de inoculantes se inoculó el mismo medio líquido (50 ml) y se incubó por 5 días a temperatura ambiente (21 ± 3) en erlenmeyers de 250 ml los cuales se airearon bajo agitación en un agitador orbital (Eberbach Corporation, Ann Arbor, Michigan) ajustado a 180 rpm.

Preparación de la turba y del inoculante

El suelo de turba (Typic Troposaprist) se obtuvo de un vasto depósito de la zona de Medio Queso, Los Chiles, Costa Rica. La muestra procedió de los 50 cm superficiales, una vez que se eliminó una capa de aproximadamente 10 cm rica en raíces. El material se mostró altamente degradado con excepción de unas pocas raíces provenientes de la vegetación que crece en la superficie del depósito. Se tomaron muestras de tres sitios cercanos las cuales fueron posteriormente mezcladas. Las muestras se secaron al sol y en un horno a 65 C.

Cuadro 1. Cepas de *Rhizobium* utilizadas en la evaluación de suelo de turba de la zona de Medio Queso, Los Chiles, Upala, Costa Rica.

Clave	Sinonimia	Procedencia	Hospedero
CR 101	U 45	Uruguay	<i>Medicago sativa</i>
CR 200	Tal 634	Niftal, Hawaii	<i>Lathyrus hirsutus</i>
CR 201	Tal 640	Niftal, Hawaii	<i>Lenus culinaris</i>
CR 202		ICARDA	<i>Lenus</i>
CR 203		ICARDA	<i>Lenus</i>
CR 405	CIAT 57	CIAT, Colombia	<i>Phaseolus vulgaris</i>
CR 406	CIAT 75	CIAT, Colombia	<i>P. vulgaris</i>
CR 407	CIAT 127	CIAT, Colombia	<i>P. vulgaris</i>
CR 503	CIAT 51	CIAT, Colombia	<i>Glycine max</i>
CR 508	587	Mircen, Porto Alegre	<i>G. max</i>
CR 514	5019	Mircen, Porto Alegre	<i>G. max</i>
CR 700	Tal 169	Niftal, Hawaii	<i>Vigna unguiculata</i> <i>Arachis hypogaea</i>

Seguidamente se pasaron por un molino de martillos con criba 200 mesh, lo que permitió obtener un material fino apto para la preparación de inoculantes para semillas.

Con el objeto de tener un acarreador de comparación se utilizó la turba que es empleada por la Compañía Nitragin, firma productora de inoculantes (3101 West Custer Avenue, Wisconsin 53209 EUA). Ambas turbas no estériles se colocaron en bolsas (10 x 6,5 cm) de polietileno de 0,0038 cm de grosor y se sellaron por calor. Con anterioridad este material se había tratado con carbonato de calcio puro finamente molido a razón de 70 g/kg para subir el pH a 6,5.

Las características químicas de ambas turbas se detallan en el Cuadro 2. En la segunda fase se evaluó, además de las turbas no estériles, las turbas tratadas con vapor a 100 C por una hora cada vez, por tres días consecutivos para su esterilización. Esta turba estéril se pesó y se puso en bolsas de plástico tratadas con alcohol de 70 grados como desinfectante. Estas bolsas fueron lavadas con agua destilada estéril para eliminar el alcohol. Las bacterias crecidas en el medio AELM por seis días se inocularon cuando estaban en fase de crecimiento logarítmico tardío a razón de 5,5 ml por 10 g de

turba, mediante inyección de la suspensión bacteriana con jeringa estéril. A las bolsas así preparadas se les hizo masaje manual repetido para asegurar una buena mezcla de las bacterias con la turba. A los cultivos bacterianos empleados en la preparación de estos inoculantes se les hizo las siguientes pruebas (Vincent, 1970) para asegurar su pureza: tinción de Gram, rayado en placas de Petri con agar glucosa peptona (AGP) y en AELM más rojo congo, además de la inoculación de tubos inclinados de AGP adicionados de púrpura de bromocresol. Los inoculantes preparados durante la primera fase de la evaluación se almacenaron a temperatura ambiente, en refrigeración (4 C) y a 37 C.

Recuento viable de *Rhizobium*

Durante la evaluación inicial se tomó una bolsa con 10 g de cada inoculante a intervalos de dos semanas durante 17 semanas y se hizo diluciones decimales en solución salina estéril (0,85 %).

La primera dilución 1:10 se hizo en un frasco erlenmeyer, con perlas de vidrio para ayudar a la dispersión de las partículas de turba, y se agitó en el agitador orbital, ya descrito, durante 15 minutos a 180 rpm para resuspender las bacterias

Cuadro 2. Características químicas de dos turbas utilizadas como acarreadores de inoculantes bacterianos.

Tipo de turba	Materia orgánica	pH		P mg/kg	Ca	Mg K Al			Fe	Cu	Zn	Mn
		KCl	H ₂ O			cmol (+)/kg						
Nacional	49,2	3,4	4,5	9	2,88	1,24	0,07	1,63	13	17	5	16
Nitragin	63,0	3,7	4,6	8	4,84	3,05	0,26	2,08	13	T	4	6

T = trazas.

(Weaver, 1979). De las diluciones apropiadas se tomaron muestras que se inocularon en ALM utilizando el método de la gota (Hoben y Somasegaran, 1982); con el fin de retardar y/o inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes se añadió al medio de cultivo 5 mg/kg de verde brillante y 100 mg/kg de cicloheximida (ambos de la sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA).

Los medios se incubaron durante seis días a temperatura ambiente; paralelamente, se determinó el porcentaje de humedad de los inoculantes.

A las 17 semanas se llevó a cabo un ensayo de infección en planta (Weaver y Frederick, 1972) utilizando bolsas de crecimiento estériles (Seed-Pack Growth Pouch, Scientific Products, Division of American Hospital Supply Corp. 1210 Leon Place, Evanston, Illinois, EUA), con 80 ml de solución libre de nitrógeno (Vincent, 1970). En cada bolsa se sembró dos semillas de soja (*Glycine max* var. Siatsa) pregerminada en agar agua y con una radícula de 1 cm de longitud a las cuales se les adicionó 7 días después de la siembra 1 ml de cada dilución decimal a razón de 4 bolsas por dilución. Por cada 4 bolsas inoculadas se incluyó un control no inoculado. Después de 23 días a temperatura constante de 26 C con un fotoperíodo de 12 horas y 86% de humedad relativa, las bolsas de crecimiento con al menos una planta con un nódulo radical se les consideró como inoculación positiva y con la ayuda de tablas del número más probable (NMP) (Vincent, 1970), se determinó el número de células de *Rhizobium* por gramo de inoculante capaces de infectar.

En la segunda fase del estudio solo se utilizó turba nacional.

RESULTADOS Y DISCUSION

El Cuadro 3 muestra el comportamiento de *Rhizobium japonicum* cepa 587 en los inoculantes preparados en suelo de turba no estéril de la zona

de Medio Queso, Los Chiles, Costa Rica y la empleada por la Compañía Nitragin e incubados a 4 C, 24 C y 37 C. En ambas turbas se nota un incremento en el número de bacterias de $6,5 \times 10^8$ /g a $2,4 \times 10^9$ /g en turba nacional y a $1,2 \times 10^9$ /g en turba Nitragin, después de un período de 2 semanas de incubación a 24 C. No ocurrió lo mismo cuando se almacenaron los inoculantes a 4 C y 37 C, temperaturas a las que se obtuvo recuentos cercanos al inóculo inicial. Recuentos en turba no estéril arriba de 1×10^9 bacterias/g son un buen augurio para un buen inoculante. Las bacterias en turba nacional alcanzaron niveles muy aceptables ($> 1 \times 10^9$ /g) después de 4 semanas cuando se incubó los inoculantes a 4 C, no siendo ese el caso en la turba Nitragin en la que aparentemente no hubo reproducción de las bacterias cuando se incubó los inoculantes a esta temperatura. Los inoculantes incubados a 37 C, mostraron un pobre comportamiento, pues no solo no hubo reproducción aparente de las bacterias a las 2 semanas, sino que la sobrevivencia tampoco fue buena, pues a las 4 semanas en el caso de la turba nacional, y a las 6 semanas en el caso de la turba Nitragin el recuento de las bacterias estaba ya por debajo del estándar mínimo para un inoculante, de 1×10^8 bacterias/g de turba; después de 8 semanas sobrevivió en ambas turbas, apenas cerca del 0,3% de las bacterias inicialmente inoculadas y a las 17 semanas esta cifra se había reducido aún más, a solo un 0,0003%. Obviamente la exposición del inoculante a estas altas temperaturas y/o a la desecación del inoculante resultado de esta exposición (Cuadro 4) fue perjudicial y sugiere que el almacenamiento a temperatura ambiente en zonas bajas del país, en donde estas pueden llegar hasta 39 C a la sombra no sería recomendable.

Como ya se ha mencionado, una característica crucial de un acarreador de inoculantes es permitir la sobrevivencia de las bacterias en números satisfactorios por períodos relativamente largos, lo cual permita obtener inoculantes con un período

de viabilidad (y utilidad) adecuado. En este aspecto la turba nacional permitió la multiplicación y sobrevivencia a las 8 semanas tanto a 4 C como a 24 C de poblaciones bacteriales cercanas a 1×10^9 /g de turba, lo cual califica a los inoculantes como adecuados (Vincent, 1970).

En la turba Nitragin se obtuvieron resultados similares aunque un poco inferiores $0,6 \times 10^9$ /g a 4

C y $0,94 \times 10^9$ /g de turba a 24 C. La sobrevivencia de *Rhizobium japonicum* 587 fue adecuada en ambas turbas, tanto a 4 C como a 24 C, con la excepción de la turba Nitragin a 4 C, pues a las 17 semanas de incubación todavía mostró recuentos iguales al estándar mínimo para un inoculante de 1×10^8 bacterias/g de turba (Vincent, 1970).

Cuadro 3. Efecto del tiempo y temperatura de incubación sobre la sobrevivencia de *Rhizobium japonicum* 587 en dos suelos de turba.

Turba	Incubación (semanas)	Temperatura de incubación		
		4 C	24 C	37 C
		(número de bacterias $\times 10^7$ /g)		
	0*	—	—	—
	2	100	240	50,00
	4	270	340	9,10
Medio Queso	6	180	240	1,40
Los Chiles	8	110	140	0,31
	10	32	96	0,10
	12	65	15	0,10
	17	9	13	0,05
	0	—	—	—
	2	50	120	40,00
	4	97	200	40,00
Nitragin	6	71	130	3,00
	8	61	94	0,59
	10	25	51	0,57
	12	24	13	0,15
	17	4	12	0,02

* El número inicial de bacterias/g de turba, se calculó en $6,5 \times 10^8$, con base en el recuento viable del cultivo líquido empleado en la preparación de los inoculantes.

Cuadro 4. Efecto del tiempo de incubación y la temperatura de almacenamiento sobre el contenido de humedad de los inoculantes.

Turba	Tiempo de almacenamiento (semanas)	Temperatura de incubación		
		4 C	24 C	37 C
		(% de humedad)		
	0	36	36	36,0
	2	36	34	23,0
Medio Queso	4	36	33	21,0
Los Chiles	8	36	31	8,2
	17	36	31	1,0
	0	36	36	36
	2	36	36	28
	4	36	35	25
Nitragin	8	36	30	2
	17	35	22	2

De esta evaluación preliminar se puede concluir que la turba nacional proveniente de la zona de Medio Queso de Los Chiles, Costa Rica es tan adecuada como la turba utilizada por la Compañía Nitragin. Además se puede concluir que los inoculantes pueden también almacenarse adecuadamente bajo refrigeración o a temperatura ambiente, bajo las condiciones de San José ($21\text{ C} \pm 3$). Sin embargo, los datos del recuento *in planta* (Cuadro 5) sugieren una ventaja de los inoculantes almacenados en refrigeración sobre los almacenados a temperatura de 24 C . Esta técnica es más estricta que el recuento viable en plato, ya que evalúa justamente la capacidad infectiva de *Rhizobium* (Vincent y Scott, 1982).

Cuadro 5. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la sobrevivencia de *Rhizobium japonicum* cepa 587 en inoculantes a base de suelo de turba incubado por 17 semanas.

Turba	Temperatura de incubación		
	4 C	24 C	37 C
	(número de bacterias $\times 10^5/\text{g}$) ¹		
Nacional ²	59	3,1	0,0031
Nitragin ³	59	3,1	0,001

1. Recuento hecho "in planta" en bolsas de crecimiento de acuerdo a la técnica del número más probable (Weaver y Frederick, 1972).
2. Turba nacional proveniente de la localidad de Medio Queso, Los Chiles, Alajuela, Costa Rica.
3. Turba Nitragin, proveniente de Milwaukee, Wisconsin, EUA.

De acuerdo a Wilson y Trang (1980) la exposición a altas temperaturas, la desecación y la prolongada incubación puede disminuir la capacidad infectiva de los rhizobia por incapacidad de las bacterias para reproducirse en la solución nutritiva utilizada en las bolsas de crecimiento para plantas.

Alternativamente esto podría ocurrir, aparte de la pérdida del vigor celular, por la pérdida de genes dispensables *ex planta* posiblemente ligados a plasmidios portadores de genes simbióticos (Denarie *et al.*, 1981).

Con el objeto de evaluar exhaustivamente las cualidades de acarreador de inoculantes bacterianos de la turba nacional se realizaron recuentos bacterianos utilizando otras cepas de *Rhizobium* tanto en turba estéril como no estéril.

Los resultados de tal estudio se presentan en los Cuadros 6 y 7, respectivamente. En la turba estéril la reproducción y la sobrevivencia de las cepas empleadas fue uniformemente excelente, pues aún después de 4 meses de incubación mostró recuentos superiores a 1×10^8 bacterias/g de turba. En algunos casos, por ejemplo las cepas CR 201, CR 202, CR 407, se obtuvo recuentos iguales o ligeramente superiores a 1×10^8 bacterias/g de turba después de un período de maduración de 1 a 5 semanas, lo cual es extraordinario. Así se puede concluir que, aunque hubo diferencias entre cepas, más que todo en cuanto a reproducción y sobrevivencia, el número de bacterias obtenido en el caso de las cepas utilizadas, califica los inoculantes como excelentes. Esta observación confirma los resultados preliminares. La reproducción y sobrevivencia de las cepas de *Rhizobium* en la turba no estéril, con excepción de las cepas CR 405 y CR 503 confirman igualmente la buena calidad del acarreador. En este material la reproducción de las bacterias aunque fue en general menor que en la turba estéril, fue ampliamente satisfactoria pues a las 12 semanas, con las excepciones arriba apuntadas, todas las cepas superaban el estándar mínimo para un inoculante de 1×10^8 bacterias/g de turba. Estos resultados sugieren la utilización preferencial de turba estéril cuando se requiera un inoculante de excepcional calidad, aunque la turba no estéril daría resultados satisfactorios si se utiliza dentro de 3 meses a partir de su producción. Estos hallazgos confirman la bondad de la turba nacional como acarreador de inoculantes bacterianos, lo cual es de mucha importancia, pues se abre la posibilidad del desarrollo futuro de una industria nacional productora de inoculantes para leguminosas y otros tipos de inoculantes, por ejemplo bacterias antagonistas de uso potencial en el control biológico de enfermedades en plantas, por parte del laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Agronómicas.

RESUMEN

Con el fin de explorar su posible utilización como acarreador de inoculantes bacterianos, se realizó un estudio preliminar de la reproducción y sobrevivencia de *Rhizobium japonicum* cepa 587 en el suelo de turba (Typic Troposaprist) proveniente de la localidad de Medio Queso, Alajuela, Costa Rica. Para efectos comparativos se utilizó la turba empleada en la producción de inoculantes

Cuadro 6. Reproducción y sobrevivencia de diversas cepas de *Rhizobium* en suelo de turba estéril de la zona de Medio Queso, Los Chiles, Costa Rica.

Cepa	Semanas de incubación						
	0	1	3	5	9	12	15
	(número de bacterias x 10 ⁸ /g de turba) ¹						
CR 101	10	150	200	18	20	32	N.D.
CR 200	12	550	53	53	40	54	50
CR 201	5,1	20	320	400	510	31	N.D.
CR 202	5,2	24	480	620	71	31	N.D.
CR 203	2,8	380	400	320	30	41	N.D.
CR 405	1,3	540	31	15	11	11	10
CR 406	11	80	150	85	52	65	14
CR 407	2,3	57	150	100	130	18	11
CR 503	2,1	40	20	560	200	100	160
CR 514	9,3	63	21	67	20	48	390
CR 700	20	48	92	100	50	40	10

1. Recuento en plato en agar extracto levadura manitol.

N.D. = No determinado.

Cuadro 7. Reproducción y sobrevivencia de diversas cepas de *Rhizobium* en suelo de turba no estéril de la zona de Medio Queso, Los Chiles, Costa Rica.

Cepa	Semanas de incubación						
	0	1	3	5	9	12	15
	(número de bacterias x 10 ⁸ /g de turba) ¹						
CR 101	10	28	31	20	32	10	N.D.
CR 200	10	33	140	150	7,8	3	4
CR 201	5,1	31	48	40	31	20	N.D.
CR 202	5,2	67	31	32	21	15	N.D.
CR 203	2,8	30	27	56	46	25	N.D.
CR 405	1,3	21	17	9	1,2	4	0,2
CR 406	19	490	310	53	13	8	7,2
CR 407	2,3	100	150	53	68	11	1
CR 503	2,1	8,3	3,8	2,8	6,7	0,9	0,2
CR 514	9,3	60	10	42	20	17	10
CR 700	20	86	410	100	170	200	12

1. Recuento en plato de agar extracto levadura manitol.

N.D. = No determinado.

comerciales por la compañía Nitragin de Milwaukee, EUA. El estudio se realizó por un período de 17 semanas y bajo tres temperaturas de incubación, 4, 24 y 37 C. Ambas turbas se inocularon con un cultivo líquido que resultó en una población inicial de $6,5 \times 10^8$ bacterias/g. A 37 C, la población bacteriana en ambas turbas se comportó de manera semejante, pues no hubo reproducción, más aún, al cabo de 6 semanas de incubación, los recuentos en plato arrojaron resultados subóptimos para un inoculante comercial, por debajo del estándar mínimo, de 1×10^8 bacterias/g de turba. Las poblaciones siguieron decayendo en ambas turbas y para la semana 17 apenas había una sobrevivencia de 0,0003 % del inóculo inicial. Así, la exposición del inoculante a altas temperaturas ambientales, fácilmente obtenibles bajo condiciones de campo en las zonas bajas de Costa Rica, podría ser perjudicial para los inoculantes. En las turbas incubadas a 4 C y 24 C, por el contrario, hubo reproducción satisfactoria al cabo de 2 semanas a 24 C y a las 4 semanas a 4 C la población subió, en la turba nacional de $6,5 \times 10^8$ bacterias/g a $2,4 \times 10^9$ /g y $2,7 \times 10^9$ /g, respectivamente. En la turba Nitragin, para idénticas circunstancias, la población subió a $1,2 \times 10^9$ /g y a 9×10^8 /g.

Estas poblaciones califican a los acarreadores no estériles como adecuados para un inoculante. La sobrevivencia fue igualmente aceptable, pues al cabo de 8 semanas los recuentos se mantenían arriba de 1×10^9 /g, y aún, al cabo de 17 semanas de incubación los recuentos arrojaron, con la excepción de la turba Nitragin incubada a 4 C, recuentos similares al mínimo de 1×10^8 /g de turba. El recuento mediante la técnica del número más probable *in planta* sugirió una mejor sobrevivencia a 4 C que a 24 C. Estos resultados preliminares fueron confirmados al evaluar la reproducción y sobrevivencia de diferentes cepas de *Rhizobium* en turba nacional estéril y no estéril.

Los resultados fueron mejores en turba estéril en donde los recuentos de todas las cepas fueron uniformemente superiores a 1×10^9 /g de turba al cabo de 4 meses de incubación.

En la turba no estéril los recuentos, aunque en general más bajos que en la turba estéril, fueron satisfactorios, con la excepción de 2 cepas. La evidencia científica permite afirmar que la turba nacional de la localidad de Medio Queso es apta para la fabricación de inoculantes bacterianos para leguminosas y potencialmente, de acuerdo a resultados preliminares, para otro tipo de inoculantes con bacterias antagonistas de patógenos de plantas.

LITERATURA CITADA

- BURNS, R.; HARDY, R.H. 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. New York, Springer-Verlag. 189 p.
- BURTON, J.C. 1981. *Rhizobium* inoculants for developing countries. Tropical Agriculture (Trinidad) 58(4): 291-295.
- DENARIE, J. *et al.* 1981. Plasmid control of symbiotic properties in *Rhizobium meliloti*. In Current perspectives in nitrogen fixation. Ed. by H. Gibson and W. Newton. Camberra, Australian Academy of Science. p. 137-141.
- GOMEZ, A.; ZANDSTRA, H. 1976. An analysis of the role of legumes in multiple cropping systems. In Exploiting the legume *Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. Ed. by J. Vincent, A. Whitney and A. Bose. University of Hawaii, College of Tropical Agriculture. Miscellaneous publication no.145. p.81-95.
- HARDY, R.W. 1980. The global carbon and nitrogen economy. In Nitrogen fixation. Ed. by W. Newton and W. Ohrme. Free living systems and chemical models. Baltimore, University Park Press. v. 1., p. 3-5.
- HENZELL, E.; VALLIS, I. 1970. Transfer to nitrogen between legumes and other crops. In Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics. Ed. by A. Ayanaba and P. Dart. New York, Wiley. p. 73-78.
- HOBEN, H.; SOMASEGARAN, P. 1982. Comparison of the pour, spread and drop-plate methods for enumeration of *Rhizobium* sp in inoculants made from presterilized peat. Appl. Environ. Microbiol. 44: 1246-1247.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. 1979. Microbiological processes, promising technologies for developing countries. Washington, National Academy of Sciences. 198 p.
- RAMIREZ, C. 1983. La posible contribución de la fijación biológica de los cultivos. In El reciclaje de materias orgánicas en la agricultura de América Latina. Ed. por P. Arens. Roma, FAO. p. 56-59.
- ROUGHLEY, R. 1970. The preparation and use of legume seed inoculants. Plant and Soil 32: 675-701.
- ROUGHLEY, R.; VINCENT, J. 1967. Growth and survival of *Rhizobium* sp, in peat culture. Journal Appl. Bact. 30: 362-376.
- THOMPSON, J. 1980. Production and quality control of legume inoculants. In Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Ed. by F. Bergensen. New York, Wiley. p. 489-533.

- VINCENT, J. M. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Oxford, England. IBP Handbook 15. 164 p.
- VINCENT, J.; SCOTT, M. 1982. Evaluation of inoculant viability on commercially inoculated legume seed. *Agronomy* 74: 921-923.
- WEAVER, R. W. 1979. Adsorption of rhizobia to peat. *Soil Biol. Biochem.* 11: 545-546.
- WEAVER, R.; FREDERICK, L. 1972. A new technique for most probable number counts of rhizobia. *Plant and Soil* 36: 219-222.
- WILSON, D.; TRANG, R. 1980. Effects of storage temperature and enumeration method of *Rhizobium* sp. number in peat inoculants. *Trop. Agric. (Trinidad)* 57(3): 233-238.
- YOSHIDA, T. 1976. Fuente biológica del nitrógeno en los sistemas ecológicos naturales y producción agrícola. Roma, FAO. Boletín sobre suelos no.27. p. 45-52.