

Producción de un inoculante líquido de *Bradyrhizobium japonicum* con alto impacto en la siembra mecanizada de la soya en Cuba

✉ Carmen Menéndez¹, Luis E Trujillo¹, Ricardo Ramírez¹, Dianeys González-Peña², Davel Espinosa³, Gil A Enriquez¹, Lázaro Hernández¹

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 11600, La Habana, Cuba

² Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, INCA
Carretera a Tapaste, Km 3½, San José de las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba

³ Unión Agropecuaria Militar Cubasoy
Carretera Venezuela, Km 12, Coralina, Ciego de Ávila, Cuba
✉ carmen.menendez@cigb.edu.cu

RESUMEN

La fijación simbiótica del nitrógeno es un proceso clave en la obtención de altos rendimientos en el cultivo de la soya (*Glycine max* L. Merrill) con protección del medio ambiente. Se describe una metodología para la producción masiva de una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* de alta eficiencia simbiótica, en una zaranda orbital de plataformas múltiples, y el empleo del cultivo bacteriano como bioinoculante para variedades de soya bajo condiciones de siembra mecanizada en Cuba. La optimización del medio de crecimiento y el establecimiento de un sistema de inoculaciones seriadas y escaladas permitieron mantener el cultivo en continua fase logarítmica e incrementar su volumen 100 veces en 7 días. El cultivo final con viabilidad promedio de 5×10^{10} u.f.c./mL y alto contenido de exopolisacáridos no requiere aditivos y se mantiene estable en conservación a 4 °C durante al menos 8 meses. La aplicación del inoculante a las semillas fue a dosis equivalente de 150 mL/ha durante las campañas de 2010-2013 en la empresa Cubasoy, de la provincia Ciego de Ávila. Las plantas de campo inoculadas mostraron nodulación abundante en la zona del cuello de la raíz y mantuvieron un estado nutricional adecuado durante todo el ciclo vegetal. La bacteria reaislada de nódulos de raíces en plantaciones al azar mostró el mismo fenotipo de la cepa inoculada, lo que confirma la efectividad de la inoculación. El inoculante líquido obtenido es técnicamente compatible con el empleo de las máquinas sembradoras, favorece la supervivencia de la bacteria en el suelo y su simbiosis eficiente con la planta hospedera.

Palabras clave: *Bradyrhizobium japonicum*, soya, *Glycine max* L. Merrill, fijación de nitrógeno, inoculante

Biotecnología Aplicada 2014;31:111-115

ABSTRACT

Production of a liquid *Bradyrhizobium japonicum* inoculant with high impact on the mechanized sowing of soybean in Cuba. Symbiotic nitrogen fixation is critical for high soybean (*Glycine max* L. Merrill) yields with protection to the environment. This paper describes a procedure for massive production of *Bradyrhizobium japonicum* in an orbital multi-platform shaker and the use of the bacterial culture for seed inoculation in soybean areas under mechanized sowing. The B. japonicum strain was selected based on its highly efficient symbiotic interaction with major soybean varieties cropped in Cuba. Optimization of the growth medium and the use of serial and scaled inoculations allowed maintaining the cultures in continuous logarithmic phase while increasing its volume 100-fold in 7 days. The final culture having average cell viability of 5×10^{10} f.u.c./mL and high exopolysaccharides content does not require additives and can be stably stored for at least 8 months at 4 °C. Soybean seeds were sprayed with the inoculant at equivalent dose of 150 mL/ha and sowed mechanically in production fields of Ciego de Avila province during the campaigns 2010-2013. The plants showed abundant nodulation and a proper nutritional state during the whole cycle. The bacterium strain was reisolated from root nodules of inoculated plants and its identity was confirmed by phenotype characterization. The high-cell density liquid inoculant rich in polysaccharides produced in this work is compatible with mechanized seed sowing, favors the bacterium survival in soil, and promotes the establishment of an efficient symbiotic interaction with the host plant.

Keywords: *Bradyrhizobium japonicum*, soybean, *Glycine max* L. Merrill, nitrogen fixation, inoculant

Introducción

La soya (*Glycine max* L. Merrill) es una legumbre altamente nutritiva, cuyos granos contienen alrededor de 35 % de proteínas. Posee todos los aminoácidos esenciales menos la metionina, que se logra con la combinación de soya con cereales, como sugieren los procedimientos dietéticos clásicos [1]. El grano de soya se utiliza ampliamente como componente proteico en el pienso para alimentación animal. En los últimos años, la producción mundial de soya ha

superado las 250 millones de toneladas, repartidas principalmente entre Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, India, Paraguay y Canadá [2]. La producción de soya en Cuba es una prioridad de la política económica actual de sustitución de importaciones de granos. Por lo que en los últimos cinco años ha habido un incremento notable de las áreas para la producción de soya y de la tecnificación del cultivo en el país.

1. Producción de determinados productos básicos agrícolas, Grupo I (2004). In: FAO. Anuario estadístico de la FAO. 2005-2006. Roma: FAO; 2004. p. 79-82.

2. Clive J. ISAAA Brief 42. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. New York: International Service for de Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA); 2010.

Para producir una tonelada de granos de soja, se estima que la planta necesita absorber 80 kg de nitrógeno, lo que equivale a una demanda aproximada de 240 kg/ha. La planta puede obtenerlo del suelo en forma del nitrato o amonio provenientes de la mineralización de nitrógeno orgánico o de la fertilización química; o de la atmósfera, mediante la fijación biológica de nitrógeno. Este es un proceso esencial en la biosfera, por el cual los microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en amonio. Ello no ocasiona contaminación ambiental y contribuye a evitar el empobrecimiento de los suelos [3]. Una alta disponibilidad de nitrato o amonio en el suelo inhibe la fijación biológica de nitrógeno. Las bacterias denominadas rizobios, que establecen interacciones simbióticas específicas con especies de plantas leguminosas, median una forma especializada de ese proceso, que es la fijación simbiótica del nitrógeno. Esta es la forma más eficiente de fijar biológicamente que existe en la naturaleza y su contribución oscila entre el 60 y el 80 % del total de nitrógeno fijado. La interacción rizobio-planta hospedera resulta en la formación de nódulos, estructuras especializadas que ocurren generalmente en las raíces y donde la bacteria dispone de un ambiente idóneo para reducir el nitrógeno gaseoso hasta amonio. En esta simbiosis, la planta aporta la fuente de carbono y recibe el nitrógeno fijado.

Bradyrhizobium japonicum es una bacteria gram-negativa en forma de bacilos pequeños, que habita en el suelo y establece FSN con su hospedero específico: la soja [4]. Produce abundantes exopolisacáridos con funciones específicas en las etapas iniciales de interacción con la planta, que constituyen fuentes de carbono de reserva y barreras de protección, que alargan la supervivencia de la planta en el suelo bajo condiciones adversas. Otras dos especies del género *Bradyrhizobium*: *B. elkanii* y *B. liaoningense*, también logran nodulación en soja [5]. *B. japonicum* tiene un crecimiento lento en medio de cultivo y se ha empleado ampliamente en la producción de inoculantes líquidos y sólidos que se aplican a las semillas antes de la siembra [6]. Los inoculantes sólidos utilizan turba irradiada u otro soporte al que se le añade el caldo de cultivo. La turba que cubre la semilla inoculada favorece la supervivencia de la bacteria en el suelo. Por tanto, el peletizado de las semillas con productos sólidos es el método de inoculación que se prefiere en la siembra manual. Sin embargo, cuando la siembra es mecanizada, las semillas se deben tratar con inoculantes líquidos de alta densidad celular que incorporen elevados niveles de bacteria al suelo y no provoquen problemas técnicos en las máquinas sembradoras.

Para la producción extensiva de soja en Cuba se escogieron los suelos llanos de la provincia de Ciego de Ávila, con el empleo de máquinas sembradoras. Este trabajo describe un método de producción masiva de cultivos puros de *B. japonicum* de alta densidad celular en condiciones optimizadas de crecimiento en zaranda. El inoculante líquido contiene un elevado contenido de exopolisacáridos naturales, se mantiene estable en conservación a 4 °C, durante al menos 8 meses y se aplicó con eficacia en cuatro campañas productivas mediante la siembra mecanizada.

Materiales y métodos

Cepas de *B. japonicum* y variedades de soja

Las cepas Semia 5079 y Semia 5080 de *Bradyrhizobium japonicum* y la cepa ICA 8001 de *B. elkanii* [5] se emplearon en el experimento comparativo de eficiencia de la interacción simbiótica con las variedades de soja IncaSoy-36 [7], Conquista [8] y CubaSoy-23 [9] en condiciones de invernadero. La cepa Semia 5080 se empleó para la producción del inoculante.

Medios de cultivo

A partir de variaciones del medio comercial YM (manitol 10 g/L, extracto de levadura 1 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.2 g/L, NaCl 0.1 g/L) [10], se diseñaron cinco medios de cultivo, cuya composición se muestra en la tabla 1. El pH inicial de los medios se ajustó a 6.8 y se mantuvo libre durante el crecimiento de la bacteria. El medio que propició mayor rendimiento de biomasa se denominó YMG y se empleó en la producción del inoculante.

Aislamiento de bacteroides a partir de nódulos

Las raíces de plantas inoculadas y crecidas en invernadero o campo se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. El aislamiento de bacteroides se realizó a partir de nódulos activos (coloración interna roja) del cuello de la raíz de las plantas en estadio de floración. Los nódulos se desprendieron de forma manual, se sumergieron en etanol al 70 % durante 5 min para su descontaminación superficial, y se cortaron de forma transversal con un bisturí estéril en una cabina de flujo laminar vertical. Los bacteroides de la parte central del nódulo se tomaron con una asa y se sembraron en placas de Petri con medio YM sólido, suplementado o no con carbenicilina (100 mg/L) y el colorante indicador rojo congo (0.25 %, p/v). Las colonias de *Bradyrhizobium* mostraron una coloración blanquecina y apariencia mucosa después de 10 días de crecimiento a 28 °C.

Selección de la cepa de *Bradyrhizobium* y confección del banco de células primario

La eficiencia de la interacción simbiótica entre las tres cepas de *Bradyrhizobium* y las tres variedades de soja en estudio, se evaluó en un experimento de invernadero sobre soporte de zeolita y sin aplicación de nitrógeno. Una semana después de la germinación de las semillas, las plántulas se inocularon con 1 mL del

3. Singh MS. Effect of *Bradyrhizobium* inoculation on growth, nodulation and yield attributes of soybean - A Review. *Agric Rev.* 2005;26(4):305-8.

4. Appelbaum, E. The *Rhizobium/Bradyrhizobium*-legume symbiosis. In: Gresshoff PM, editor. The molecular biology of symbiotic nitrogen fixation. Boca Raton: CRC Press; 1989. p. 131-58.

5. Hollis AB, Kloos WE, Elkan GE. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. *J Gen Microbiol.* 1981;123(2):215-22.

6. Alberton O, Kaschuk G, Hungria M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biol Biochem.* 2006;38(6):1298-307.

7. Soto N, Ferreira A, Delgado C, Enriquez GA. Regeneración *in vitro* de plantas de soja de la variedad cubana IncaSoy-36. *Biotechnol Apl.* 2013;30(1):29-33.

8. Romero-Arias A, Peña-Molina L, González-Cruz M, González M. Evaluación de cultivares de soja (*Glycine max*) en las condiciones edafoclimáticas del municipio Majibacoa, Las Tunas. *Innov Tecnol.* 2013;19:1-9.

9. Díaz MF, Padilla C, Torres V, González A, Curbelo F. Caracterización bromofológica de variedades de soja (*Glycine max*) en producción de forrajes, forrajes integrales y granos de siembras de verano. *Rev Cubana Cienc Agric.* 2003;37(3):311-7.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo estudiados para el crecimiento de *Bradyrhizobium japonicum**

Reactivos	Medios de cultivo					
	YM	1	2	3	4	5
Manitol (g/L)	10.0	-	2.0	2.0	2.0	2.0
Glicerol (% v/v)	-	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Extracto de levadura (g/L)	1.0	1.0	1.0	2.0	4.0	4.0
K ₂ HPO ₄ (g/L)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (g/L)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
NaCl (g/L)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
FeCl ₃ (% p/v)	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
KNO ₃ (g/L)	-	-	-	-	-	0.8
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (g/L)	-	-	-	-	-	0.3

* Cantidades necesarias para obtener un litro del medio de cultivo.

cultivo bacteriano diluido a razón de 2×10^6 células viables/maceta. Las plantas se colectaron en el momento de la floración. Los indicadores de la eficiencia simbiótica se cuantificaron (Tabla 2).

El banco de células primario (BCP) de la cepa Semia 5080 se confeccionó partir de una colonia proveniente de un bacterioide aislado de un nódulo activo de la raíz de una planta de soja, variedad CubaSoy-23, previamente inoculada con un cultivo puro de la bacteria y crecida en invernadero hasta el comienzo de la floración. Se inoculó un tubo de ensayo que contenía 5 mL de medio líquido YM a partir de una colonia. Se incubó a 28 °C durante 3 días en girador circular. A partir de este inóculo comenzó el crecimiento de la bacteria hasta la fase logarítmica en 300 mL de medio YM a 28 °C en zaranda. El cultivo mostró una pureza homogénea en el análisis por tinción de Gram. Las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron con medio YMG estéril, se resuspendieron en medio YMG frío suplementado con glicerol al 30 % (v/v), se dispensaron en viales de crioconservación colocados en hielo, y se almacenaron a -70 °C. El BCP mostró una viabilidad superior a 10^7 u.f.c./mL y la ausencia de contaminantes microbianos en la certificación emitida por la Dirección de Control de la Calidad, del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), de La Habana, Cuba.

Producción del inoculante, control de la calidad y estabilidad en conservación

Para la obtención de colonias aisladas, se sembraron diluciones 10^6 y 10^7 de una alícuota del BCP de la cepa Semia 5080 en placas de Petri con medio YMG suplementado con carbenicilina (100 mg/L) y rojo congo (0.25 %, p/v). Después de 10 días de incubación de las placas a 28 °C, las colonias de *B. japonicum* se mostraron blanquecinas, por la no absorción del colorante, y con una apariencia mucosa, debido a la presencia de exopolisacáridos. Para la producción del inóculo primario, se inocularon tubos de ensayos con 5 mL de medio líquido YM y una colonia de la bacteria. Se crecieron a 28 °C durante 3 días en un girador circular. Para la producción del inóculo secundario, se inoculó erlenmeyers con 150 mL de medio YMG y 15 mL del inóculo primario. Se crecieron a 28 °C durante 3 días en una zaranda orbital de 3 plataformas, con agitación a 150 rpm. Para la producción del cultivo final, se inoculó erlenmeyers que contenían 3 L de medio YMG con 300 mL de inóculo secundario. Se crecieron a 28 °C durante 4 días en la misma zaranda, con agitación a 150 rpm. A cada erlenmeyer con inóculo secundario o cultivo final se le hizo un análisis expedito de pureza mediante el método de tinción de Gram y se visualizó a través del microscopio óptico. Los cultivos finales con crecimiento homogéneo de bacilos pequeños gramnegativos característicos de *B. japonicum* se mezclaron en lotes de 5 L, se envasaron en bidones plásticos estériles y se conservaron a 4 °C hasta su comercialización. La confirmación de la ausencia de contaminantes microbianos en cada lote de cultivo final (bidón de 5 L) se logró mediante el método de estriado por agotamiento en placas con medio YM rojo congo sin antibióticos. La viabilidad de los lotes se determinó mediante el método de diluciones seriadas [11] y el conteo de colonias en placas de Petri con medio YM

Tabla 2. Selección de la cepa élite de *Bradyrhizobium japonicum* de alta eficiencia simbiótica con variedades comerciales de soja (*Glycine max* L.)*

Variedad de soja	Cepa de <i>B. japonicum</i>	Número nódulos/planta	PF nódulos (g)/planta	PF foliar (g)/planta	PS foliar (g)/planta
Conquista	Semia 5079	110 ± 19	1.9 ± 2	22.1 ± 10	10.7 ± 2
	Semia 5080	121 ± 15	2.11 ± 1	24.3 ± 12	11.5 ± 3
	ICA 8001	135 ± 13	2.26 ± 1	18.8 ± 10	7.2 ± 1
CubaSoy-23	Semia 5079	109 ± 16	1.88 ± 1	21.3 ± 11	9.2 ± 1
	Semia 5080	111 ± 12	1.95 ± 2	22.9 ± 11	10.9 ± 2
	ICA 8001	122 ± 15	2.14 ± 1	17.4 ± 10	6.8 ± 1
IncaSoy-36	Semia 5079	64 ± 9	1.51 ± 1	15.3 ± 10	3.9 ± 3
	Semia 5080	75 ± 13	1.60 ± 1	16.8 ± 13	4.3 ± 4
	ICA 8001	114 ± 12	2 ± 1	10.2 ± 5	2.5 ± 1

* Se inocularon 15 plantas de cada variedad de soja. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

PF: peso fresco.

PS: peso seco.

suplementado con rojo congo (0.25 %, p/v) y el antibiótico carbenicilina (100 mg/L), que no inhibe el crecimiento de la cepa Semia 5080. La prueba de eficacia de los lotes del inoculante líquido se realizó en semillas asperjadas, a dosis de campo de soja y sembradas en macetas con zeolita. Las plantas se crecieron durante 30 días en invernadero sin aplicación de nitrógeno y se corroboró la nodulación de las raíces.

La estabilidad del inoculante se evaluó en lotes almacenados a temperaturas de 4, 28 y 37 °C durante 8 meses. En cada tratamiento se emplearon 6 lotes y se determinó la viabilidad y pureza de muestras de 1 mL colectadas mensualmente.

Inoculación de las semillas en campos con siembra mecanizada

Las semillas certificadas de cada variedad de soja se asperjaron con el inoculante a dosis equivalente de 150 mL/ha, previo a la siembra mecanizada en áreas de suelo ferralítico rojo de la Empresa Cubasoy, de la provincia de Ciego de Ávila, Cuba, durante las campañas 2010, 2011, 2012 y 2013. Estas áreas no se habían utilizado antes para el cultivo de la soja y por tanto, nunca se había aplicado un inoculante a base de *Bradyrhizobium*. Previo a la siembra, se efectuó una fertilización química de fondo, a dosis de 50, 60 y 45 kg/ha de los macronutrientes nitrógenos, fósforo y potasio, respectivamente. Durante la etapa de cultivo vegetal, no se aplicó urea. La efectividad de la inoculación se determinó sobre la base de los datos de la nodulación (distribución, número, tamaño y coloración interna de los nódulos en la raíz) y la ausencia de síntomas de deficiencia nutricional en las plantas.

Resultados y discusión

Selección de una cepa de *B. japonicum* de elevada eficiencia simbiótica con las principales variedades de soja (*Glycine max* L.) cultivadas en Cuba

Se evaluó la eficiencia de la simbiosis de tres cepas comerciales de *Bradyrhizobium* con las variedades de soja IncaSoy-36, Conquista y CubaSoy-23, en condiciones de invernadero, con soporte de zeolita sin aplicación de nitrógeno. Todos los tratamientos provocaron abundante nodulación, aunque con diferente contribución a la masa foliar de las plantas (Tabla 2).

La inoculación con la cepa ICA 8001 *B. elkanii* indujo la mayor cantidad de nódulos en las tres variedades de soja; pero esto no conllevó a diferencias marcadas en el peso fresco promedio de los nódulos. La inoculación con la cepa Semia 5080 de *B. japonicum* produjo los mejores resultados en producción de materia seca foliar y, por tanto, se seleccionó para la producción del inoculante. En todos los casos, los nódulos se distribuyeron ampliamente en la región del cuello de la raíz (Figuras 1A y 1B) y mostraron coloración roja interna (Figura 1C) por la presencia de la proteína leg-hemoglobina, indicador indirecto de la ocurrencia del proceso de fijación del nitrógeno gaseoso. Las plantas inoculadas mantuvieron un color verde intenso durante el experimento.

Establecimiento de un medio cultivo rentable para el crecimiento de *B. japonicum* con elevada densidad celular

El medio comercial YM es de amplio uso en el crecimiento de especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* a escala de laboratorio; pero el empleo de manitol como única fuente resulta una opción extremadamente cara para la producción masiva de inoculante. En la tabla 3 se compara el crecimiento de la cepa Semia 5080 de *B. japonicum* en el medio YM y otros cinco medios de composición definida. El reemplazo de manitol por glicerol como fuente de carbono en el medio 1 redujo notablemente la producción de polisacáridos en el cultivo. Ello pudiera repercutir negativamente en la eficiencia de la inoculación en condiciones de campo. Los exopolisacáridos son componentes primarios de la biopelícula que protege a la bacteria de la desecación en el suelo, constituyen una fuente energética de reserva y son esenciales en la interacción de los rizobios con la planta hospedera [11]. A su vez, el aumento de la viscosidad del cultivo por la producción de exopolisacáridos favorece la adhesión de *B. japonicum* a la semilla en el momento de la inoculación [12, 13]. La combinación de manitol (2 g/L) y glicerol (1.2 %) abarata los medios 2, 3, 4 y 5, sin que disminuya notablemente la producción de exopolisacáridos con respecto al medio control YM. El aumento del contenido de extracto de levadura en los medios 4 y 5, cuyo consumo lleva a la producción de amoníaco, mantuvo neutro el pH del medio, y propició el crecimiento de la bacteria en condiciones de pH óptimo [10]. La adición de sales nitrogenadas en el medio 5 contribuyó al aumento de la densidad celular hasta 17.2 g de biomasa húmeda por litro de cultivo, con conteo de viables superior a 5×10^9 u.f.c./mL. Por estos resultados y el bajo costo de sus insumos (0.67 USD/L), se seleccionó el medio 5 (YMG) para producir el inoculante.

Producción en zaranda de cultivos puros de *B. japonicum* de alta densidad celular

B. japonicum, a diferencia de las especies del género *Rhizobium*, presenta un crecimiento lento en medios de cultivo [4] lo que impone un reto mayor a la producción masiva del inoculante para soja en condiciones de zaranda. El establecimiento de un sistema de dos inoculaciones seriadas con diluciones 1/10 permitió mantener el crecimiento de la bacteria en constante fase logarítmica en el medio de producción YMG y lograr una alta viabilidad promedio (5×10^{10} u.f.c./mL)

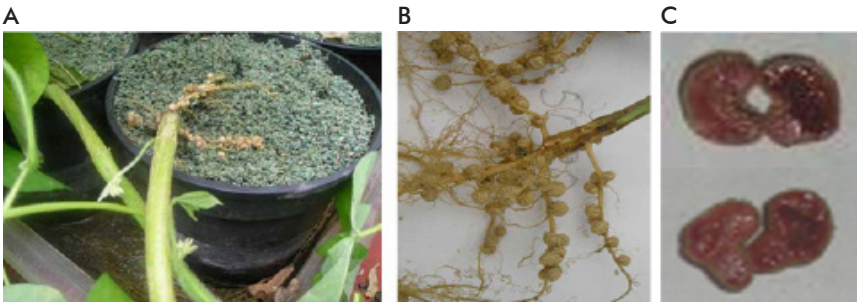


Figura 1. Selección de la cepa élite de *Bradyrhizobium japonicum* de alta eficiencia simbiótica con variedades comerciales de soja. A) Plántula de soja inoculada con *B. japonicum*, 7 días después de la germinada y evaluada 30 días después de la inoculación. B) Presencia de nódulos en las raíces de una de las plántulas inoculadas. C) Masa nodular con coloración roja interna, que indicó la producción de leghemoglobina, necesaria para la fijación de nitrógeno atmosférico.

en el cultivo final. El tiempo que medió entre la inoculación de los precultivos a partir de colonias aisladas y la cosecha del cultivo final fue 10 días. Sin embargo, el tiempo total de crecimiento en zaranda se limitó a 7 días, en los que se incremento 100 veces el volumen del cultivo inicial. La superposición en tiempo de las etapas de crecimiento del inóculo secundario y del cultivo final en la zaranda orbital multiplataforma permitió dos producciones del inoculante cada semana.

El requisito de calidad establecido para la comercialización del inoculante fue la ausencia de contaminantes microbianos y la obtención de una densidad celular mayor o igual a 5×10^9 u.f.c./mL. Este valor permite aportar 1.6×10^6 bacterias viables por semilla, según la dosis de aplicación en campo de 150 mL/ha. Por tinción de Gram, en cada etapa de crecimiento en zaranda se observaron al microscopio poblaciones homogéneas de pequeños bacilos gramnegativos característicos de rizobios, excepto cuando había contaminantes microbianos. La siembra de los lotes del inoculante en el medio sólido YM en presencia de rojo congo y sin antibióticos, se utilizó como criterio de confirmación de pureza. En este medio, *B. japonicum* forma colonias mucosas de color blanquecino que no absorben el colorante indicador. La determinación de la pureza en los erlenmeyers con inóculo secundario por el método expedito de tinción de Gram y la visualización al microscopio óptico, permitió que el índice de rechazo de los cultivos finales por contaminaciones microbianas fuera inferior al 2 %. En la figura 2 se muestra el resultado del ensayo de eficacia de tres lotes del inoculante evaluados en condiciones de invernadero. A diferencia del control no tratado, las plantas inoculadas tenían un follaje vigoroso, de color verde intenso (Figura 2A) y abundante formación de nódulos en el cuello de la raíz (Figura 2B).

Tabla 3. Comparación del rendimiento productivo de los medios de cultivo estudiados para la obtención de bioinoculante de *Bradyrhizobium japonicum*

Parámetros	YM	1	Medios de cultivo			
			2	3	4	5 (YMG)
pH inicial	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8
pH final	5.8	5.4	5.4	5.9	7.0	6.9
Exopolisacáridos	++	-	++	++	+	+
Biomasa (g/L)	6.3	4.5	4.8	4.6	15.3	17.2

++, +, - Criterios de medida de densidad del exopolisacárido según el aspecto de las colonias (muy mucoso, levemente mucoso, y sin mucosidad, respectivamente).

10. Somasegaran P, Hoben HJ. Handbook for rhizobia. Methods in legume-Rhizobium technology. New York: Springer-Verlag New York, Inc.; 1994.

11. Louch HA, Miller KJ. Synthesis of a low-molecular-weight form of exopolysaccharide by *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(2):1011-4.

12. Maurice S, Beauclair P, Giraud J, Sommer G, Hartmann A. Survival and change in physiological state of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L. Merrill) liquid inoculants after longterm storage. World J Microbiol Biotech. 2001; 17(6):635-43.

13. Subba Rao NS. Soil microorganisms and plant growth. New Delhi: Oxford and IBH Publishing Co.; 1977.

Conservación del inoculante líquido

La estabilidad del inoculante se evaluó en seis lotes almacenados a temperaturas de 4, 28 y 37 °C durante 8 meses (Figura 3). La conservación refrigerada no provocó la disminución notable del inoculante durante el estudio. En cambio, los tratamientos a 28 y 37 °C mostraron valores de viables inferiores al límite de calidad establecido (5×10^9 u.f.c./mL) a partir de los meses 1 y 2, respectivamente.

Eficiencia de la aplicación del inoculante en campos de soja con siembra mecanizada

La siembra de soja en la empresa Cubasoy, de la provincia de Ciego de Ávila, se realiza de forma mecanizada, lo que imposibilita el empleo del inoculante tradicional sólido a base de turba. La aplicación del inoculante líquido a las semillas se realizó a dosis equivalente de 150 mL/ha, con un consumo anual de 800, 570, 900 y 1030 L durante las campañas 2010-2013, respectivamente. Los muestreos de plantas en fase de floración, realizados anualmente en campos inoculados, evidenciaron abundantes nódulos con actividad nifrofixadora (coloración interna roja), distribuidos principalmente en la región del cuello de la raíz (Figura 4A). Las plantaciones mostraron un estado nutricional excelente con un follaje vigoroso y de color verde intenso. Los ensayos de caracterización fenotípica de la bacteria reislada del interior de los nódulos provenientes de campos seleccionados al azar, corroboraron la identidad de la cepa de *Bradyrhizobium* inoculada. Los criterios de identidad empleados fueron resistencia a los antibióticos carbenicilina (100 mg/L) y rifampicina (100 mg/L), producción de colonias mucosas blanquecinas en medio YM suplementado con el colorante rojo congo (Figura 4B) y la no acidificación del medio YM suplementado con indicador de pH bromotimol azul (Figura 4C).

La aplicación del inoculante líquido de alta densidad celular y rico en polisacáridos resultó técnicamente compatible con el empleo de las máquinas sembradoras, permitió la supervivencia de la bacteria en el suelo y promovió el establecimiento de una interacción simbiótica eficiente con las diferentes variedades de soja cultivadas en Cuba. En las áreas de campo inoculadas se realizó una fertilización química de fondo con baja dosis de nitrógeno y no se aplicó urea durante el cultivo. En presencia de niveles no inhibitorios de nitrógeno en el suelo, la fijación simbiótica de nitrógeno gaseoso permitió la nutrición adecuada de la planta, contribuyó a la eficiencia del proceso fotosíntesis y la obtención de altos rendimientos del grano. Los residuos foliares de soja aportaron parte del nitrógeno fijado al suelo con beneficios colaterales a la nutrición del cultivo de rotación, principalmente maíz.

En resumen, se estableció el proceso de producción en zaranda de un inoculante líquido de *B. japonicum*, con alta viabilidad celular y rico en exopolisacáridos, que se mantiene estable durante al menos 8 meses en conservación refrigerada a 4 °C. El escalado de la tecnología es sencillo y no requiere grandes instalaciones ni equipos costosos. La inoculación de las semillas en



Figura 2. Evaluación de la eficacia del inoculante en ensayo de invernadero. A) Plantas de soja de la variedad IncaSoy-36 provenientes de semillas tratadas con el inoculante o no. B) Presencia de nódulos en el cuello de la raíz de una planta inoculada.

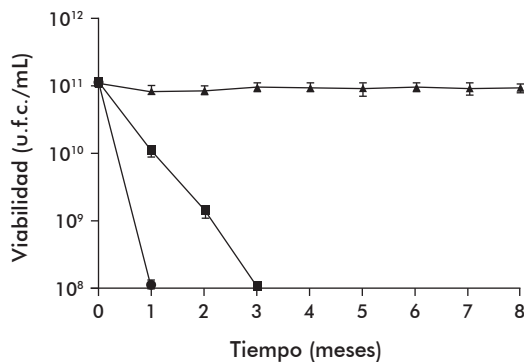


Figura 3. Estabilidad del inoculante durante su conservación a diferentes temperaturas. Los tratamientos fueron a 4 °C (triángulo), 28 °C (cuadrado) y 37 °C (círculo). Los valores corresponden a la media de seis lotes independientes.

campo fue compatible con el uso de máquinas sembradoras, produjo abundante nodulación y las plantas mantuvieron un buen estado nutricional durante el ciclo de cultivo. El empleo del inoculante en sustitución de la fertilización química nitrogenada, reduce el costo de la producción nacional de soja y contribuye a la protección del medio ambiente.

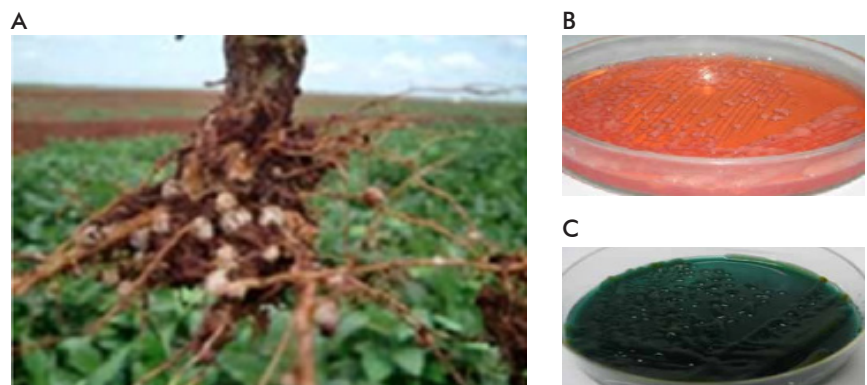


Figura 4. Comprobación de la eficacia de la inoculación en campo por presencia de nódulos en la raíz y buen estado nutricional de las plantas. A) Planta escogida al azar de un campo inoculado, posee abundantes nódulos en el cuello de la raíz y buen estado nutricional. B y C) Fenotipo de la bacteria aislada de nódulos de la planta de campo y crecida en el medio YM suplementado con rojo congo al 0.25 % (B) o bromotimol azul al 0.025 % (C).

Recibido en diciembre de 2013.

Aprobado en marzo de 2014.

Production of a liquid *Bradyrhizobium japonicum* inoculant with high impact on the mechanized sowing of soybean in Cuba

✉ Carmen Menéndez¹, Luis E Trujillo¹, Ricardo Ramírez¹, Dianeys González-Peña², Davel Espinosa³, Gil A Enriquez¹, Lázaro Hernández¹

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 11600, La Habana, Cuba

² Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, INCA
Carretera a Tapaste, Km 3½, San José de las Lajas, CP 32700, Mayabeque, Cuba

³ Unión Agropecuaria Militar Cubasoy
Carretera Venezuela, Km 12, Coralina, Ciego de Ávila, Cuba
✉ carmen.menendez@cigb.edu.cu

ABSTRACT

Symbiotic nitrogen fixation is critical for high soybean (*Glycine max* L. Merrill) yields with protection to the environment. This paper describes a procedure for massive production of *Bradyrhizobium japonicum* in an orbital multi-platform shaker and the use of the bacterial culture for seed inoculation in soybean areas under mechanized sowing. The *B. japonicum* strain was selected based on its highly efficient symbiotic interaction with major soybean varieties cropped in Cuba. Optimization of the growth medium and the use of serial and scaled inoculations allowed maintaining the cultures in continuous logarithmic phase while increasing its volume 100-fold in 7 days. The final culture having average cell viability of 5×10^{10} c.f.u./mL and high exopolysaccharides content does not require additives and can be stably stored for at least 8 months at 4 °C. Soybean seeds were sprayed with the inoculant at equivalent dose of 150 mL/ha and sowed mechanically in production fields of Ciego de Ávila province during the campaigns 2010-2013. The plants showed abundant nodulation and a proper nutritional state during the whole cycle. The bacterium strain was reisolated from root nodules of inoculated plants and its identity was confirmed by phenotype characterization. The high-cell density liquid inoculant rich in polysaccharides produced in this work is compatible with mechanized seed sowing, favors the bacterium survival in soil, and promotes the establishment of an efficient symbiotic interaction with the host plant.

Keywords: *Bradyrhizobium japonicum*, soybean, *Glycine max* L., nitrogen fixation, inoculant

Biotecnología Aplicada 2014;31:116-120

RESUMEN

Producción de un inoculante líquido de *Bradyrhizobium japonicum* con alto impacto en la siembra mecanizada de la soya en Cuba. La fijación simbiótica del nitrógeno es un proceso clave en la obtención de altos rendimientos en el cultivo de la soya (*Glycine max* L. Merrill) con protección del medio ambiente. Se describe una metodología para la producción masiva de una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* de alta eficiencia simbiótica, en una zaranda orbital de plataformas múltiples, y el empleo del cultivo bacteriano como bioinoculante para variedades de soya bajo condiciones de siembra mecanizada en Cuba. La optimización del medio de crecimiento y el establecimiento de un sistema de inoculaciones seriadas y escaladas permitieron mantener el cultivo en continua fase logarítmica e incrementar su volumen 100 veces en 7 días. El cultivo final con viabilidad promedio de 5×10^{10} u.f.c./mL y alto contenido de exopolisacáridos no requiere aditivos y se mantiene estable en conservación a 4 °C durante al menos 8 meses. La aplicación del inoculante a las semillas fue a dosis equivalente de 150 mL/ha durante las campañas de 2010-2013 en la empresa Cubasoy, de la provincia Ciego de Ávila. Las plantas de campo inoculadas mostraron nodulación abundante en la zona del cuello de la raíz y mantuvieron un estado nutricional adecuado durante todo el ciclo vegetal. La bacteria reaislada de nódulos de raíces en plantaciones al azar mostró el mismo fenotipo de la cepa inoculada, lo que confirma la efectividad de la inoculación. El inoculante líquido obtenido es técnicamente compatible con el empleo de las máquinas sembradoras, favorece la supervivencia de la bacteria en el suelo y su simbiosis eficiente con la planta hospedera.

Palabras clave: *Bradyrhizobium japonicum*, soya, *Glycine max* L., fijación de nitrógeno, inoculante

Introduction

Soybean (*Glycine max* L. Merrill) is a high nutritional value legume, its beans containing up to 30 % of proteins. They provide all the essential amino acids but not methionine. This deficiency can be compensated by diet combinations with cereals as recommended in classical dietary procedures [1]. Soybean is also used as protein supplement for animal feed. In the last years, the world soybean production surpassed 250 million tons, led by US, Brazil, Argentina, China, India, Paraguay and Canada [2]. In Cuba, soybean production

recently arose as an economical policy priority, in order to substitute grain import, with a remarkable raise in the number of areas destined to soybean crops and the introduction of mechanized sowing.

It has been estimated that the soybean plant requires up to 80 kg of assimilable nitrogen to produce a ton of grain, accounting for 240 kg/ha in average. Nitrate or ammonium becomes available in soil by organic nitrogen mineralization, chemical fertilization, and biological nitrogen fixation. The latter process is

1. Producción de determinados productos básicos agrícolas, Grupo I (2004). In: FAO. Anuario estadístico de la FAO. 2005-2006. Roma: FAO; 2004. p. 79-82.

2. Clive J. ISAAA Brief 42. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. New York: International Service for de Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA); 2010.

essential for nitrogen incorporation to the biosphere. The conversion of atmospheric nitrogen into ammonium conducted by microorganisms bearing the enzyme nitrogenase is an intrinsic non-contaminating process that prevents soil impoverishment [3]. At the same time, high concentrations of nitrate or ammonium in soil inhibit the nitrogen biological fixation.

The specific interaction between rhizobia and legume plants results in the most efficient form of biological nitrogen fixation, known as symbiotic nitrogen fixation, accounting for 60-80 % of total fixed nitrogen in nature. The rhizobium-host plant interaction leads to the formation of nodules, specialized structures generally found in roots, providing an ideal microenvironment to reduce gaseous nitrogen to ammonium. In this symbiotic interaction, the plant provides the carbon source for bacterial growth in exchange of the fixed nitrogen.

The soil bacterium *Bradyrhizobium japonicum* establishes symbiotic nitrogen fixation specifically with soybean [4]. This bacillus-shaped Gram-negative species produces abundant exopolysaccharides which display specific functions as carbon source and protective barriers at the initial colonization steps during the bacterium-host plant interactions, increasing bacterial survival in the soil under adverse conditions. Two other *Bradyrhizobium* species, *B. elkanii* and *B. liaoningense* are capable to nodulate soybean [5]. *B. japonicum* shows a slow growth in culture and has been extensively used to produce liquid and solid bioinoculants for application in seeds before sowing [6]. Solid inoculants are composed of irradiated peat or other support that contains the culture broth and, once applied to seeds, favors bacterial survival in soil. That is why seeds pelleting with solid products is the inoculation method of choice for manual sowing. However, the use of solid inoculants tend to cause mechanical failures in sowing machines. Instead, seeds are recommended to be treated with liquid inoculants that guarantee high bacteria levels in soil.

For that purpose, we describe a method for large scale production of high cell-density cultures of *B. japonicum* under optimized shaking conditions. The liquid inoculant enriched of natural exopolysaccharides and free of microbial contaminants was stable at 4 °C for at least 8 months. It was effectively used for extensive mechanized sowing of soybean in four production campaigns from 2010 to 2013, in production fields of Ciego de Ávila province, Cuba.

Materials and methods

Bradyrhizobium strains and soybean cultivars

Bradyrhizobium japonicum strains Semia 5079 and Semia 5080 and *B. elkanii* strain ICA 8001 [5] were used for comparisons on the efficiency of symbiotic interaction with soybean cultivars IncaSoy-36 [7], Conquista [8] and CubaSoy-23 [9], under greenhouse conditions. The strain Semia 5080 was used for massive production of the inoculant.

Culture media

Five culture medium variants were generated from the commercial broth YM (10 g/L mannitol, 1 g/L yeast extract, 0.5 g/L K_2HPO_4 , 0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0.1 g/L

NaCl) (Table 1) [10]. The starting pH was adjusted to 6.8 and kept unbuffered during bacterial growth. The medium generating the highest biomass yield was named YMG and further used for massive inoculant production.

Bacteroid isolation from nodules

Plant roots inoculated and grown under greenhouse or field conditions were washed with distilled water and air-dried at room temperature. Bacteroids were isolated from active nodules (inner red pigmentation) at the root crown from flowering plants. Nodules were manually collected, submerged in 70 % ethanol for 5 min for superficial decontamination and transversally sliced with a sterile scalpel under a vertical flow air cabinet. Bacteroids were collected from the central area of the nodules with a sterile loop and seeded in Petri dishes containing solid YM medium, supplemented or not with 100 mg/L carbenicillin and the colorant Congo red (0.25 %, w/v). Whitish mucoid colonies characteristics of *Bradyrhizobium* appeared after culturing for 10 days at 28 °C.

Selection of *Bradyrhizobium* strain and establishing the primary cell bank

Experiments evaluating the efficiency of the symbiotic interaction between three *Bradyrhizobium* strains and three soybean cultivars were run on zeolite substrate without nitrogen fertilization under greenhouse conditions. One week after seed germination, plantlets were inoculated with 1 mL of bacterial culture diluted at 2×10^6 viable cells/pot. Plants were collected at flowering and symbiosis efficiency indicators were quantified (Table 2).

For preparation of the primary cell bank (PCB), *B. japonicum* strain Semia 5080 was recovered from a root nodule of a previously inoculated soybean plant cv. CubaSoy-23 grown until flowering stage under greenhouse conditions. A single colony was obtained from a bacteroid isolated from a root nodule of a CubaSoy-23 soybean flowering plant previously inoculated with a pure bacterial culture and grown under greenhouse conditions. The colony was inoculated to a preculture containing 5 mL of liquid YM medium, and further incubated at 28 °C for 3 d under roller shaking. This culture was used as inoculum for 300-mL YM medium cultures and incubated at 28 °C under shaking until reaching logarithmic growth. The homogeneously pure culture, as evidenced by Gram-staining, was centrifuged and cells collected,

3. Singh MS. Effect of *Bradyrhizobium* inoculation on growth, nodulation and yield attributes of soybean - A Review. *Agric Rev.* 2005;26(4):305-8.

4. Appelbaum, E. The *Rhizobium/Bradyrhizobium*-legume symbiosis. In: Gresshoff PM, editor. The molecular biology of symbiotic nitrogen fixation. Boca Raton: CRC Press; 1989. p. 131-58.

5. Hollis AB, Kloos WE, Elkan GE. DNA: DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related *Rhizobiaceae*. *J Gen Microbiol.* 1981;123(2):215-22.

6. Alberton O, Kaschuk G, Hungria M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. *Soil Biol Biochem.* 2006;38(6):1298-307.

7. Soto N, Ferreira A, Delgado C, Enriquez GA. Regeneración *in vitro* de plantas de soja de la variedad cubana IncaSoy-36. *Biotecnol Apl.* 2013;30(1):29-33.

8. Romero-Arias A, Peña-Molina L, González-Cruz M, González M. Evaluación de cultivares de soja (*Glycine max*) en las condiciones edafoclimáticas del municipio Majibacoa, Las Tunas. *Innov Tecnol.* 2013;19:1-9.

9. Díaz MF, Padilla C, Torres V, González A, Curbelo F. Caracterización bromofológica de variedades de soja (*Glycine max*) en producción de forrajes, forrajes integrales y granos de siembras de verano. *Rev Cubana Cienc Agric.* 2003;37(3):311-7.

10. Somasegaran P, Hoben HJ. Handbook for rhizobia. Methods in legume-Rhizobium technology. New York: Springer-Verlag New York, Inc.; 1994.

Table 1. Composition of *Bradyrhizobium japonicum* culture media used in this study*

Reagent	Culture media					
	YM	1	2	3	4	5
Mannitol (g/L)	10.0	-	2.0	2.0	2.0	2.0
Glycerol (% v/v)	-	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Yeast extract (g/L)	1.0	1.0	1.0	2.0	4.0	4.0
K_2HPO_4 (g/L)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (g/L)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
NaCl (g/L)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
$FeCl_3$ (% p/v)	-	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
KNO_3 (g/L)	-	-	-	-	-	0.8
$(NH_4)_2HPO_4$ (g/L)	-	-	-	-	-	0.3

* Amount required for preparing 1 L of culture medium.

washed with sterile YMG medium and further re-suspended in cold YMG medium supplemented with 30 % glycerol (v/v), dispersed in cryopreservation vials on ice and stored at -70°C until use. The PCB showed a cell viability of 10^7 c.f.u./mL and was free of microbial contaminants, receiving the approval certification by the Quality Control Unit of the Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB), in Habana, Cuba.

Inoculant production, quality control and stability under preservation

Single colonies were obtained from $1/10^6$ and $1/10^7$ dilutions from a PCB aliquot of the *B. japonicum* strain Semia 5080, plated on YMG medium supplemented with 100 mg/L carbenicillin and the colorant Congo red (0.25 %, w/v). After 10-d incubation at 28°C , the colonies were not red stained and showed the mucoid phenotype indicative of exopolysaccharides production. The primary inoculums were prepared in 5 mL YM cultures from single bacterial colonies, grown at 28°C for 3 d under roller shaking. These cultures were subsequently used to prepare the secondary inoculums, by inoculating 15 mL to Erlenmeyer flasks containing 150 mL of YMG medium, and cultures were further incubated at 28°C for 3 d in an orbital shaker. The final large scale culture was established by inoculating 300 mL of the secondary inoculums into Erlenmeyers containing 3 L of YMG medium, which were incubated at 28°C for 4 d and under 150 rpm agitation. Each final culture was tested for microbial purity by Gram-staining and optical microscopy. The final homogeneous cultures showing the characteristic appearance of homogeneous *B. japonicum* Gram-negative bacilli were pooled in 5-L batches, stored in plastic barrels and preserved at 4°C until commercialization. Batches were tested for purity by the streak plate method in plates containing culture medium stained with Congo red and devoid of antibiotics. Viability was determined by the serial dilution method [10] and colonies were counted in Petri dishes filled with YM medium supplemented with 100 mg/L carbenicillin (not inhibiting *B. japonicum* Semia 5080) and Congo red staining (0.25 %, w/v). Batches of the liquid inoculant were efficacy tested by spraying it to seeds at soybean field doses, which were subsequently sowed in zeolite-containing pots. Plants were grown for 30 days under greenhouse conditions without nitrogen fertilization, and nodulation was corroborated in roots at that time.

The inoculant stability was assessed during storage at 4 , 28 y 37°C for 8 months. Six batches were evaluated for viability and purity for each temperature, in 1 mL monthly-collected samples.

Seed inoculation under field conditions by mechanized sowing

Certified seeds of the soybean cultivars tested were sprayed with the inoculant at the equivalent dose of 150 mL/ha, before mechanized sowing in ferralitic soils at the areas of the Cubasoy Enterprise, in Ciego de Ávila province, in Cuba, in the production campaigns 2010-2013. Prior to seed sowing, the soil was fertilized with the macronutrients nitrogen, phosphorous and potassium at respective doses of 50, 60 and

Table 2. Selection of the optimal *Bradyrhizobium japonicum* strain of high symbiotic efficiency for the interaction with commercial varieties of soybean (*Glycine max* L.)*

Soybean cultivar	<i>B. japonicum</i> strain	Number of nodules/plant	Nodule fresh weight (g/plant)	Folliage fresh weight (g/plant)	Folliage dry weight (g/plant)
Conquista	Semia 5079	110 ± 19	1.9 ± 2	22.1 ± 10	10.7 ± 2
	Semia 5080	121 ± 15	2.11 ± 1	24.3 ± 12	11.5 ± 3
	ICA 8001	135 ± 13	2.26 ± 1	18.8 ± 10	7.2 ± 1
CubaSoy-23	Semia 5079	109 ± 16	1.88 ± 1	21.3 ± 11	9.2 ± 1
	Semia 5080	111 ± 12	1.95 ± 2	22.9 ± 11	10.9 ± 2
	ICA 8001	122 ± 15	2.14 ± 1	17.4 ± 10	6.8 ± 1
IncaSoy-36	Semia 5079	64 ± 9	1.51 ± 1	15.3 ± 10	3.9 ± 3
	Semia 5080	75 ± 13	1.60 ± 1	16.8 ± 13	4.3 ± 4
	ICA 8001	114 ± 12	2 ± 1	10.2 ± 5	2.5 ± 1

* Fifteen plants were tested from inoculated seeds of each soybean variety. Results obtained from two independent experiments.

45 kg/ha. No urea was applied during plant cultivation. The effectiveness of the inoculation was determined by evaluating nodulation (root nodule distribution, number, size and internal color) and the absence of symptoms revealing plant nutritional deficiency.

Results and discussion

Selection of a *B. japonicum* strain of high symbiotic efficiency with major soybean (*Glycine max* L.) cultivars in Cuba

The symbiotic efficiency of three commercial strains of *Bradyrhizobium* was tested in interaction with three soybean cultivars (IncaSoy-36, Conquista, CubaSoy-23) grown in zeolite substrate without nitrogen fertilization under greenhouse conditions. All the treatments induced abundant nodulation regardless the differences in plant foliar mass (Table 2). The inoculation of strain ICA 8001 *B. elkanii* induced the highest number of nodules for the three soybean cultivars, with no significant differences in the average fresh weight of the nodules. The highest foliar mass was detected for strain Semia 5080, this strain being selected for bioinoculant production. In all the cases, nodules were widely distributed at the root crown area (Figures 1A and 1B) and showed the internal red color (Figure 1C) characteristic of the protein leghemoglobin, whose presence indicates the efficient occurrence of the nitrogen fixation process. Plants inoculated kept intense green during the experiment.

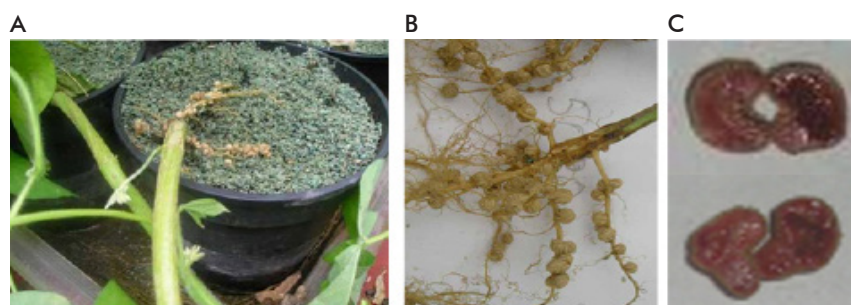


Figure 1. Selection of the optimal *Bradyrhizobium japonicum* strain of high symbiotic efficiency for the interaction with commercial varieties of soybean. A) Soybean plantelet inoculated with *B. japonicum*, seven days after germination and evaluated 30 days after inoculation. B) Nodules in the roots of an inoculated plantelet. C) Nodule mass with red color inside, indicating the presence of leghemoglobin, required for fixation of gaseous nitrogen.

Establishing a cost-affordable growth medium for culturing *B. japonicum* at high cellular densities

The YM commercial broth is widely used to culture *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species at laboratory scale. Nevertheless, the use of mannitol as the sole carbon source makes extremely expensive the large scale production of inoculants. The growth of the *B. japonicum* Semia 5080 strain in YM medium was compared to that in other five culture media (Table 3). The replacement of mannitol by glycerol as carbon source in medium 1 notably reduced polysaccharide production in culture. Exopolysaccharides are primary components of the biofilm that protects bacteria from desiccation in soil, functions as reserve energy source, and mediates rhizobial interaction with the host plant [11]. An efficient exopolysaccharide production is also important to increase the culture viscosity which favors the adhesion of *B. japonicum* to seeds upon inoculation [12, 13]. The combination of 2 g/L mannitol with 1.2 % glycerol in culture media 2 to 5 reduced their costs without compromising exopolysaccharide production, as compared to the YM control medium. The further increase of the yeast extract content in media 4 and 5, whose consumption generates ammonia, allowed the bacterium growth to occur at optimal neutral pH values [10]. The ultimate addition of nitrogen salts in medium 5 further contributed to increase the cellular density up to 17.2 g of wet biomass per liter of culture, achieving viable counts above 5×10^9 c.f.u./mL. These results and the low cost of raw materials (0.67 USD/L) led us to select medium five, named YMG, for the inoculant production.

Batch production of high cell density cultures of *B. japonicum* in an orbital multi-platform shaker

Opposed to species of the genus *Rhizobium* species, *B. japonicum* displays a slow growth in culture [4] that makes challenging its large scale production at batch scale. A system was established comprising two 1/10 serial dilutions, which allowed to maintain bacterial growth steadily at logarithmic phase in YMG medium and to achieve a high average viability (5×10^{10} c.f.u./mL) in the final culture. The entire culturing process from colony inoculation to the harvest of the final bacterial culture lasted 10 days. Nevertheless, the batch culture in the shaker took only 7 days the culture volume was increased 100-fold in comparison to initial precultures. We overlapped in time the growth phases of the secondary inoculums and the final culture in the multiplatform orbital shaker allowing the production of two inoculant batches in a week.

The quality standards established for the inoculants commercialization were the absence of microbial contaminants and the achievement of cellular densities of at least 5×10^9 c.f.u./mL. This cell viability allows to administer 6×10^6 viable bacteria per seed, according to the field application dose of 150 mL/ha. Homogeneous Gram-negative bacilli populations were observed under the microscope consistent with *Bradyrhizobium* morphology in all the growth phases in batch cultures. The lack of microbial contaminants was then confirmed by plating inoculants batch samples on solid YM medium supplemented with Congo

Table 3. Production yields of the culture media studied to obtain a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant

Parameters	YM	1	2	Culture media 3	4	5 (YMG)
Initial pH	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8
Final pH	5.8	5.4	5.4	5.9	7.0	6.9
Exopolysaccharides	++	-	++	++	+	+
Biomass (g/L)	6.3	4.5	4.8	4.6	15.3	17.2

++, +, - Exopolysaccharides density measure criteria, attending to colony appearance (highly mucous, mildly mucous, or non-mucous, respectively).

red and devoid of antibiotics. In that medium, *B. japonicum* forms whitish mucous colonies that do not absorb the colorant. The use of the fast Gram-staining method followed by microscopic observations of secondary inoculums allowed minimizing the rejection rate of final cultures to less than 2 % due to bacterial contamination. The results of efficacy testing of three batches of the inoculant evaluated under greenhouse conditions are shown in figure 2.

Inoculated plants developed intense green vigorous foliage during the experiment, compared to the untreated controls (Figure 2A), as well as abundant nodules in the root crown (Figure 2B).

Preservation of the liquid inoculant

The stability of the inoculant during storage at 4, 28 and 37 °C for 8 months is shown in figure 3. The refrigerated preservation did not decrease significantly the viability of the inoculant. Otherwise, viable counts were lower than the specified standard limit (5×10^9 c.f.u./mL) when stored at 28 and 37 °C for one and two months, respectively.

Efficiency of inoculant application in soybean fields under mechanized sowing conditions

Soybean is mechanically sowed in the Ciego de Ávila province, in Cuba, which makes impossible the use of peat-based traditional solid inoculants. For this reason, liquid inoculant batches produced as described in this work were used for seeds treatment at dose of 150 mL/ha in the production campaigns 2010-2013, resulting in a yearly average consumption of 800, 570, 900 and 1030 L. Soybean plants at flowering phase were sampled each campaign and evidenced abundant nodules with nitrogen-fixing activity (internal red color), mainly located at the root crown (Figure 4A). Plantations showed an excellent nutritional state with vigorous and intense

11. Subba Rao NS. Soil microorganisms and plant growth. New Delhi: Oxford and IBH Publishing Co.; 1977.

12. Louch HA, Miller KJ. Synthesis of a low-molecular-weight form of exopolysaccharide by *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(2):1011-4.

13. Maurice S, Beauclair P, Giraud J, Sommer G, Hartmann A. Survival and change in physiological state of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L. Merrill) liquid inoculants after longterm storage. World J Microbiol Biotech. 2001; 17(6):635-43.

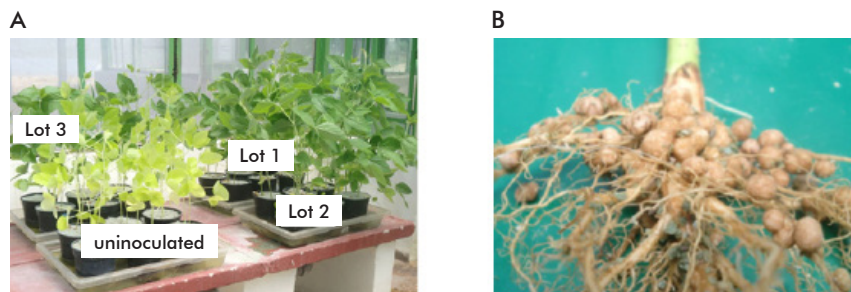


Figure 2. Efficacy evaluation of a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant under greenhouse conditions for soybean cultivation. A) Soybean plants cultivar IncaSoy-36 grown from seeds treated either from the inoculant or not. B) Nodules developed at the root crown in an inoculated plant.

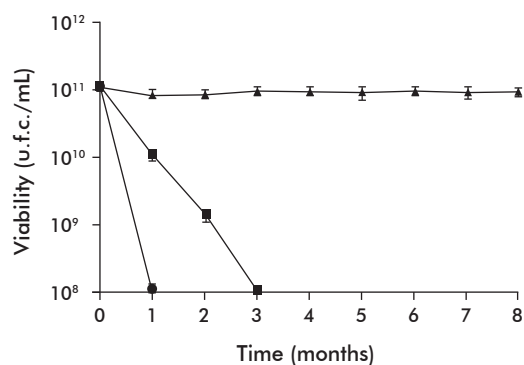


Figure 3. Inoculant stability upon storage at different temperatures (4 °C, triangles; 28 °C, squares; 37 °C, circles). Values represent the means of six independent batches.

green foliage. Phenotype characterization studies of the bacterium isolated from nodules of randomly selected plants corroborated the identity of the inoculated *Bradyrhizobium* strain. The identity criteria used were: resistance to 100 mg/L carbenicillin and rifampicin 100 mg/L, production of whitish mucous colonies on solid YM medium supplemented with Congo red (Figure 4B) and no acidification of YM medium supplemented with the pH indicator bromotimol blue (Figure 4C).

The high cellular density liquid inoculants rich in polysaccharides was technically compatible with the use of sowing machines, allowed the survival of bacteria in soil and promoted the establishment of an efficient symbiotic interaction with three major soybean varieties cropped in Cuba. Under the non-inhibitory concentrations of chemical nitrogen in soil, the symbiotic process provided enough amounts of fixed nitrogen for the proper plant development, contributing to the photosynthesis and aiding to reach high yields of

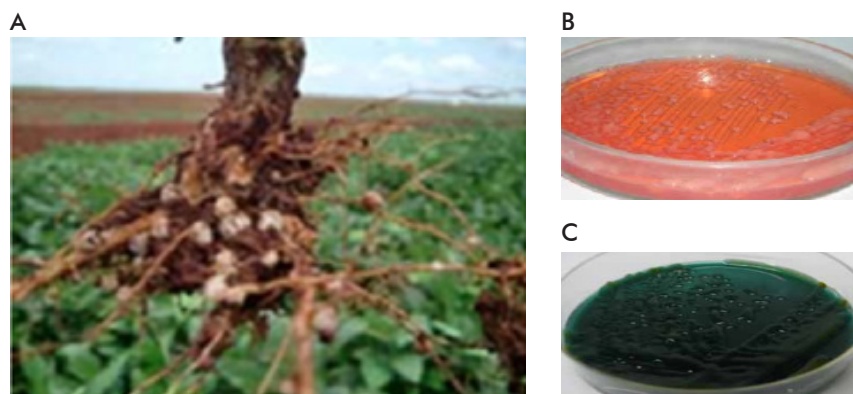


Figure 4. Efficacy testing of field inoculation of a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant in soybean plants by the presence of root nodules and the plants nutritional state. A) Plant randomly selected from an inoculated field, showing abundant nodules at the root crown and good nutritional state. B and C) Phenotype of bacteria isolated from field plant nodules after growing it in YM medium supplemented with 0.25 % Congo red (B) or 0.025 % bromotimol blue (C).

grains. The foliar residues of soybean crops returned part of the fixed nitrogen to the soil, with collateral benefits for the gramineous rotation crops, mainly maize.

In summary, a batch production system was established to obtain a liquid inoculant of *B. japonicum*, of high cellular density and rich in exopolysaccharides. The inoculant was stable for at least 8 months under refrigerated storage at 4 °C. The technological scale up is simple and requires neither large facilities nor expensive equipment. Seed inoculation in the field was compatible with the use of sowing machines, promoted abundant nodulation in plants and they developed and a proper nutritional state during the whole cultivation cycle. The substitution of chemical nitrogen fertilizers by the inoculant reduces the costs of the national soybean production and also contributes to protect the environment.

Received in December, 2013.

Accepted in March, 2014.