“COMPOSICIONES DE FERTILIZANTE LÍQUIDO QUE INCLUYEN NÍQUEL, COBALTO Y MOLIBDATO DE MONOETANOLAMINA”.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Campo de la invención

La presente invención se dirige, en términos generales, a composiciones de fertilizante líquido particularmente adecuados para la aplicación a semillas antes de la germinación.

Descripción de la técnica previa

Los cultivos agrícolas generalmente tienen una demanda nutricional alta por nitrógeno, que se considera un macronutriente primario. La soja es un cultivo que presenta una relación simbiótica entre la planta y la bacteria *Bradyrhizobium*, un microorganismo que fija nitrógeno (N_2) del aire absorbido por plantas por medio del complejo enzimático nitrogenasa, convirtiendo el nitrógeno atmosférico anterior en nitrógeno asimilable. En aras de un mejor desarrollo vegetativo, se han desarrollado fertilizantes específicos para la aplicación en semillas, potenciando la capacidad de convertir nitrógeno atmosférico en nitrógeno asimilable. Sin embargo, solamente algunos nutrientes son importantes en esta fase de crecimiento vegetal, tal como níquel, cobalto y molibdeno. Estos elementos tienen funciones bastante específicas en el desarrollo vegetativo. El cobalto tiene un impacto en la absorción de nitrógeno a través de su acción en simbiontes bacterianos, aumentando la actividad de las bacterias al potenciar su capacidad de fijar biológicamente el nitrógeno en el suelo. El níquel es un catalizador enzimático que promueve la fijación de nitrógeno. El molibdeno es utilizado por bacterias para producir nitrogenasa, que también es el catalizador para la conversión de nitrógeno atmosférico en nitrógeno asimilable.

Entre las preguntas más frecuentemente realizadas por los agricultores es la compatibilidad de agroquímicos con inoculantes en el momento de la siembra. Incluso surgen más preguntas cuando se hace referencia a semillas inoculadas previamente. Esto es porque uno de los factores principales que limitan el éxito de la fijación de nitrógeno biológico (BNF) radica en la muerte rápida de *Bradyrhizobium* por fungicidas, insecticidas, micronutrientes y otros agroquímicos utilizados en el tratamiento de semillas. En un ejemplo, en el caso de fungicidas, se han encontrado altas tasas de mortalidad *Bradyrhizobium*, que alcanzan el 62 % luego de solamente dos horas y 95 % luego de

24 horas de tratamiento con pesticidas. Por consiguiente, la compatibilidad de agroquímicos con inoculantes es esencial para el éxito de la BNF.

El desarrollo de fertilizantes para el tratamiento de semillas ha sido siempre un desafío debido a la dificultad para lograr formulaciones con un alto contenido de níquel, cobalto y molibdeno sin la necesidad de un gran volumen de producto aplicado. Adicionalmente, ha resultado difícil producir dicho fertilizante con un pH de entre 6.0 y 7.5 y no afectar el desarrollo de bacterias beneficiosas. Por ejemplo, se ha desarrollado un fertilizante de la técnica previa con un contenido de 10 % de molibdeno y 1 % de cobalto y era extremadamente ácido con un pH de alrededor de 1.5 a 2.5. Esta formulación contenía ácido fosfórico y sulfato de cobalto, siendo el elemento anterior responsable de formar un complejo con el molibdeno, reduciendo así el pH debido a la alta cantidad de ácido. El último elemento aumentó la salinidad del fertilizante, que, tras el contacto con las bacterias, promovió la desnaturalización y aumentó la tasa de mortalidad de rhizobia. Un fertilizante de la técnica previa de segunda generación era capaz de aumentar los contenidos de molibdeno y cobalto al 15 % y 1.5 % respectivamente, pero aún experimentaba los mismos problemas. Un fertilizante de la técnica previa de tercera generación mantuvo altos los contenidos de molibdeno y cobalto, pero sustituyó la fuente de cobalto con un complejo de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Mientras esta fuente de cobalto no aumentó la salinidad del fertilizante, el problema de acidez y de la salinidad que surge de las fuentes tradicionales de molibdeno aún persistió, lo cual también aumentó la mortalidad de las bacterias beneficiosas.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En una modalidad de la presente invención, se proporciona una composición de fertilizante líquido que comprende una fuente de níquel, una fuente de cobalto y molibdato de monoetanolamina. Métodos para fertilizar semillas (pre germinación) comprenden aplicar la composición de fertilizante líquido a la superficie de las semillas.

En otra modalidad, se proporciona un método para formar un fertilizante líquido. El método comprende agregar una solución que contiene molibdeno a agua y agitar para formar una mezcla homogénea. El método comprende además agregar un compuesto de cobalto quelado y un compuesto de níquel quelado a la mezcla homogénea y agitar al menos hasta que el compuesto de cobalto quelado y el compuesto de níquel quelado estén sustancialmente disueltos en la mezcla homogénea, formando así una solución de concentrado líquido. Luego se agrega alga marina a la solución de concentrado líquido para formar un fertilizante líquido.

En aun otra modalidad, se proporciona un método para fertilizar semillas que comprende aplicar la composición de fertilizante líquido a la superficie de las semillas. El fertilizante líquido comprende molibdato de monoetanolamina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura (Fig. 1) es una gráfica que muestra las condiciones climáticas durante el desarrollo del cultivo de soja durante el período de experimentación;

La Figura 2 es una gráfica que muestra el equilibrio hídrico secuencial durante el desarrollo del cultivo de soja durante el período de experimentación; y

La Figura 3 es una gráfica que muestra la producción (bolsas 60 kg/10000 m^2) en el cultivo de soja en dosis de tratamiento de semillas diferentes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA MODALIDAD PREFERIDA

Las modalidades de la presente invención se dirigen a composiciones de fertilizante líquido y métodos para formar y utilizar los mismos. Las composiciones de fertilizante líquido comprenden fuentes de micronutrientes clave para potenciar la fijación de nitrógeno biológico y pueden comprender además componentes adicionales que contienen moléculas naturales con un efecto estimulante sobre la germinación de semillas y sobre la regulación del crecimiento vegetativo. De forma ventajosa, las composiciones de fertilizante líquido pueden utilizarse con inoculantes de semillas conocidos sin impedir significativamente el efecto de los inoculantes. Los fertilizantes líquidos proporcionados en la presente suministran una alta concentración de nutrientes con una baja dosis de aplicación en comparación con fertilizantes de la técnica previa.

En una o más modalidades, las composiciones de fertilizante líquido comprenden una fuente de níquel, una fuente de cobalto y una fuente de molibdeno. La fuente de níquel se proporciona por lo general en la composición como una sal de níquel o compuesto de níquel quelado. Por ejemplo, en determinadas modalidades, la composición comprende níquel quelado con un agente quelante que se selecciona del grupo que consiste en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido etilendiamino-N,N'-bis(2-hidroxifenilacético) (EDDHA), aminoácidos y mezclas de estos. También se pueden utilizar otros agentes quelantes. En

determinadas modalidades preferidas, el agente quelante es EDTA. En determinadas modalidades preferidas, la fuente de níquel es EDTA níquel disódico. Las composiciones de fertilizante líquido de acuerdo con modalidades de la presente invención generalmente comprenden una fuente de níquel suficiente para proporcionar un contenido de níquel en las composiciones de alrededor de 0.05 % a alrededor de 5.0 % en peso, preferentemente alrededor de 0.5 % a alrededor de 1.5 % en peso y más preferentemente alrededor de 0.8 % a alrededor de 1.0 % en peso, con el peso total de la composición de fertilizante líquido tomado como 100 % en peso.

La fuente de cobalto se proporciona por lo general en la composición como una sal de cobalto o quelato de cobalto. De manera similar a la fuente de níquel, la fuente de cobalto puede comprender un compuesto de cobalto quelado. Por ejemplo, en determinadas modalidades, la composición comprende cobalto quelado con un agente quelante que se selecciona del grupo que consiste en EDTA, DTPA, EDDHA, aminoácidos y mezclas de estos. También se pueden utilizar otros agentes quelantes. En determinadas modalidades preferidas, el agente quelante es EDTA. En determinadas modalidades preferidas, la fuente de cobalto es EDTA cobalto disódico. Las composiciones de fertilizante líquido de acuerdo con modalidades de la presente invención generalmente comprenden una fuente de cobalto suficiente para proporcionar un contenido de cobalto en las composiciones de alrededor de 0.02 % a alrededor de 2.0 % en peso, preferentemente alrededor de 0.2 % a alrededor de 0.8 % en peso y más preferentemente alrededor de 0.4 % a alrededor de 0.5 % en peso, con el peso total de la composición de fertilizante líquido tomado como 100 % en peso.

La fuente de molibdeno se proporciona por lo general en la composición como un quelato de molibdeno. Una variedad de agentes quelantes puede utilizarse para hacer del molibdeno un complejo en modalidades que comprenden un quelato de molibdeno. En determinadas modalidades preferidas, la composición comprende molibdeno quelado con monoetanolamina (MEA). El quelato de molibdato de MEA puede prepararse a partir de la mezcla de ácido molíbdico y MEA en solución. Mientras el molibdato de MEA ha sido utilizado como un líquido de frenos en automóviles y utilizado en otras aplicaciones industriales, se ha descubierto recientemente que este compuesto puede utilizarse en formulaciones de fertilizante líquido como una fuente de molibdeno para el tratamiento de semillas. Adicionalmente, se ha descubierto que las composiciones de fertilizante líquido estables pueden formularse con molibdato de MEA y fuentes adicionales de nutrientes, tales como níquel y cobalto, mediante el uso de los métodos que se describen en la presente. Tal como se usa en la presente, el término “estable” se refiere a composiciones líquidas que permanecen sustancialmente mezcladas de forma homogénea sin formar precipitados durante al menos 3 años luego de la

preparación. Antes de la presente invención, dichas formulaciones estables con niveles deseables de níquel, cobalto y molibdeno han sido difíciles, sino imposible, de lograr. Las composiciones de fertilizante líquido de acuerdo con modalidades de la presente invención generalmente comprenden una fuente de molibdeno suficiente para proporcionar un contenido de molibdeno en las composiciones de alrededor de 1 % a alrededor de 20 % en peso, preferentemente alrededor de 5 % a alrededor de 16 % en peso y más preferentemente alrededor de 8 % a alrededor de 10 % en peso, con el peso total de la composición de fertilizante líquido tomado como 100 % en peso.

En determinadas modalidades, la composición de fertilizante comprende un componente ácido. El componente ácido es preferentemente un ácido orgánico, aunque sales inorgánicas (minerales) también pueden utilizarse en algunas modalidades. En determinadas modalidades, el componente ácido es un ácido orgánico que se selecciona del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido acético, ácido oxálico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido láctico, ácido málico, ácido benzoico, ácido carbónico y mezclas de estos. En determinadas modalidades preferidas, el ácido orgánico es ácido cítrico. Cuando están presentes, las modalidades de la composición de fertilizante líquido generalmente comprenden de alrededor de 1 % a alrededor de 10 % en peso, preferentemente de alrededor de 2 % a alrededor de 8 % en peso, y más preferentemente de alrededor de 3 % a alrededor de 5 % en peso del componente ácido, con el peso total de la composición de fertilizante líquido tomado como 100 % en peso. La cantidad de ácido utilizado en la composición debe seleccionarse de manera de evitar formulaciones altamente ácidas que afectan de forma negativa las bacterias del suelo beneficiosas. Por lo tanto, independientemente de la cantidad de ácido presente, el pH de solución de la composición de fertilizante líquido debe ser por lo general de alrededor de 6.0 a alrededor de 8.0 y preferentemente de alrededor de 6.5 a alrededor de 7.5.

En una o más modalidades, la composición de fertilizante comprende además alga marina. Tal como se utiliza en la presente, el término “alga marina” se refiere a cualquiera de varias especies de algas marinas macroscópicas, multicelulares. En determinadas modalidades, el alga marina es una especie que se selecciona del grupo que consiste en *Ascophyllum nodosum*, *Corralina mediterranea*, *Jania rubens*, *Pterocladia pinnata*, *Cladophora dalmatica*, *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva lactuca, Ecklonia maxima*, y *Saragassum spp*. El alga marina también puede proporcionarse como una mezcla de más de una especie de alga marina. En modalidades particularmente preferidas, el alga marina es *Ascophyllum nodosum*. El alga marina se proporciona por lo general como una suspensión de concentrado líquido. Por ejemplo, el alga marina puede proporcionarse a una

concentración de alrededor de 40 % a alrededor de 60 % en solución acuosa. El alga marina también puede proporcionarse como una suspensión diluida. Independientemente de la modalidad, la composición de fertilizante líquido generalmente comprende de alrededor de 5 % a alrededor de 55 % en peso, preferentemente de alrededor de 20 % a alrededor de 45 % en peso, y más preferentemente de alrededor de 30 % a alrededor de 40 % en peso del alga marina, con el peso total de la composición de fertilizante líquido tomado como 100 % en peso.

En una o más modalidades, la composición de fertilizante comprende además un aditivo de aminoácido. En determinadas modalidades, la composición comprende un aminoácido que se selecciona del grupo que consiste en triptófano, glutamina, glicina, prolina, lisina y mezclas de estos. También se pueden utilizar otros aminoácidos. En modalidades particularmente preferidas, el aminoácido es triptófano (por ejemplo, L-triptófano). Las modalidades de la composición de fertilizante líquido generalmente comprenden de alrededor de 0.01 % a alrededor de 1 % en peso, preferentemente de alrededor de 0.02 % a alrededor de 0.08 % en peso, y más preferentemente de alrededor de 0.03 % a alrededor de 0.05 % en peso de un aminoácido, con el peso total de la composición de fertilizante líquido tomado como 100 % en peso.

Micronutrientes, macronutrientes adicionales y/u otros aditivos también pueden estar presentes en las composiciones de fertilizante. Por ejemplo, en determinadas modalidades, las composiciones comprenden una cantidad de tensioactivo, agente antiespumante (antiespumante), agentes colorantes, agentes dispersantes y/o agentes estabilizadores. En determinadas modalidades preferidas, la composición comprende un tensioactivo no iónico. Cuando está presente, el tensioactivo está normalmente presente en la composición a un nivel de alrededor de 0.1 % a alrededor de 10 % en peso, preferentemente de alrededor de 0.5 % a alrededor de 5 % en peso, y más preferentemente de alrededor de 1 % a alrededor de 3 % en peso, con el peso total de la composición de fertilizante líquido tomado como 100 % en peso. En determinadas modalidades, las composiciones comprenden además un aditivo protector inoculante, particularmente cuando no se pretende que las semillas sean sembradas rápidamente luego del tratamiento e inoculación. De todas formas, cualquier micronutriente, macronutriente u otros aditivos adicionales no deberían aumentar de forma significativa la salinidad de la composición de fertilizante. Como se comprendería en la técnica, la salinidad de una composición de fertilizante líquido puede presentarse como conductividad eléctrica. Por lo tanto, en determinadas modalidades, la composición de fertilizante líquido de la presente invención, en solución acuosa al 10 %, tiene una conductividad eléctrica entre alrededor de 10 y alrededor de 100 $mS \cdot cm^{-1}$, preferentemente entre alrededor de 20 y alrededor de

80 mS·cm^{-1}, y más preferentemente entre alrededor de 30 y alrededor de 50 mS·cm^{-1}. La composición de fertilizante líquido tendrá generalmente una densidad de alrededor de 1.25 g/mL a alrededor de 1.50 g/mL, preferentemente alrededor de 1.3 g/mL a alrededor de 1.45 g/mL y más preferentemente alrededor de 1.35 g/mL a alrededor de 1.40 g/mL. La composición tendrá generalmente una viscosidad de alrededor de 200 cps a alrededor de 1000 cps, preferentemente alrededor de 300 a alrededor de 800 cps y más preferentemente alrededor de 400 a alrededor de 600 cps.

También se proporcionan en la presente métodos para preparar composiciones de fertilizante líquido estables que comprenden una fuente de níquel, una fuente de cobalto y una fuente de molibdeno. En una o más modalidades, los métodos comprenden agregar una solución que contiene molibdeno a agua y agitar para formar una mezcla homogénea. En determinadas modalidades, la solución que contiene molibdeno es una solución salina de molibdato. En determinadas modalidades preferidas, la solución que contiene molibdeno es una solución de molibdato de MEA (quelato). La solución de molibdato de MEA puede prepararse, por ejemplo, al agregar una cantidad de ácido molíbdico a agua calentada (por ejemplo, agua calentada a alrededor de 60 ºC) y posteriormente agregar MEA. El MEA debe agregarse a una tasa suficientemente lenta para permitir que la MEA quele el átomo de molibdeno. Una vez suficientemente mezclada la solución que contiene molibdeno, cantidades de un ácido orgánico y/o un aminoácido pueden agregarse a la mezcla homogénea y agitarse hasta que se disuelva. Tras la disolución completa y mezclado de cualquier componente adicional, se agrega una fuente de cobalto y una fuente de níquel a la mezcla homogénea y se agita hasta que se disuelva sustancialmente para formar una solución de concentrado líquido homogénea. En modalidades preferidas, los componentes mencionados anteriormente se agregan bajo calor constante. En esta etapa, cualquier aditivo adicional (tensioactivos, agentes antiespumantes, etc.) puede agregarse a la solución de concentración líquida como se desee. Luego se prepara una solución independiente que comprende alga marina, por ejemplo, al diluir un concentrado de extracto y calentamiento y se agrega a la solución de concentrado líquido para formar la composición de fertilizante líquido.

En determinadas modalidades preferidas, las composiciones de fertilizante líquido se proporcionan como composiciones de fertilizante listas para uso. Tal como se utiliza en la presente, “listo para uso” significa que las composiciones de fertilizante líquido no deben diluirse, por ejemplo, con agua o mezclarse con otros ingredientes antes de la aplicación. Sin embargo, está dentro del alcance de la presente invención que las composiciones de fertilizante líquido se proporcionan como

concentrado o formulaciones de múltiples partes, que requieren dilución y/o mezclado con componentes adicionales antes de la aplicación. Independientemente de la modalidad, la composición de fertilizante líquido generalmente comprende un contenido de agua total (es decir, que incluye el agua en las diversas soluciones del componente y el agua a la cual las soluciones de componente se agregan) de alrededor de 10 % a alrededor de 75 % en peso, preferentemente de alrededor de 20 % a alrededor de 60 % en peso, y más preferentemente de alrededor de 25 % a alrededor de 50 % en peso, con el peso total de la composición de fertilizante líquido tomado como 100 % en peso.

Las composiciones de fertilizante líquido de acuerdo con las modalidades de la presente invención son particularmente adecuadas para el tratamiento de semillas antes de la germinación. Por lo tanto, también se proporcionan en la presente métodos para fertilizar semillas que comprenden aplicar la composición de fertilizante líquido a la superficie de las semillas. Una variedad de tipos de semilla puede tratarse con la composición de fertilizante líquido de acuerdo con modalidades de la presente invención. Un tipo de semilla particularmente preferido son semillas de soja. Sin embargo, otros tipos de semilla también pueden descubrir las ventajas de la presente invención que incluyen, por ejemplo, guisantes, frijoles y otras legumbres. El fertilizante líquido puede aplicarse a las semillas mediante el uso de una variedad de diferentes métodos de aplicación. Por ejemplo, el fertilizante líquido puede rociarse sobre las superficies de las semillas o las semillas y el fertilizante líquido pueden combinarse en un recipiente y mezclarse para permitir que el fertilizante haga contacto con las superficies de las semillas. El fertilizante líquido puede aplicarse, por ejemplo, en el momento de la siembra o pre-inoculación. De forma ventajosa, las composiciones de fertilizante líquido son compatibles con una variedad de bacterias de suelo beneficiosas e inoculantes. Tal como se utiliza en la presente, el término “compatible” significa que la aplicación de una composición a semillas no da como resultado una reducción estadísticamente significativa en los niveles celulares de bacterias o inoculantes 2 horas luego de la inoculación, en comparación con semillas que no son tratadas con la composición.

Se entenderá que la cantidad de fertilizante líquido aplicado a las semillas dependerá de una cantidad de factores, que incluyen el tipo de semilla y la cantidad de micronutrientes y/o aditivos presentes en la composición. Sin embargo, en determinadas modalidades preferidas, la composición de fertilizante líquido se aplica a las semillas en una cantidad de alrededor de 0.1 a alrededor de 10 mL de fertilizante por kg de semillas, preferentemente alrededor de 0.5 a alrededor de 8 mL de fertilizante por kg de semillas, y más preferentemente alrededor de 1 a alrededor de 4 mL de fertilizante por kg de semillas. De forma similar, en determinadas modalidades, por ejemplo, cuando

el fertilizante líquido se aplica a las semillas de cultivo, el fertilizante se aplica a las semillas en una cantidad de alrededor de 10 a alrededor de 1000 mL de fertilizante por 10000 m^2, preferentemente alrededor de 40 a alrededor de 400 mL de fertilizante por 10000 m^2, y más preferentemente alrededor de 100 a alrededor de 200 mL de fertilizante por 10000 m^2.

Las ventajas adicionales de varias modalidades de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica después de revisar la presente descripción y los ejemplos de trabajo que siguen. Se apreciará que las varias modalidades descritas en la presente no son necesariamente mutualmente exclusivas a menos que se indique lo contrario en la presente. Por ejemplo, una característica descrita o ilustrada en una modalidad también puede estar incluida en otras modalidades, pero no está necesariamente incluida. Por lo tanto, la presente invención comprende una variedad de combinaciones y/o integraciones de las modalidades específicas descritas en la presente.

Tal como se utiliza en la presente, la frase "y/o", cuando se utiliza en una lista de dos o más elementos, significa que cualquiera de los elementos enumerados se puede utilizar por sí mismo, o se puede utilizar cualquier combinación de dos o más de los elementos enumerados. Por ejemplo, si se describe que una composición contiene o excluye los componentes A, B y/o C, la composición puede contener o excluir solamente A; solamente B; solamente C; una combinación de A y B; una combinación de A y C; una combinación de B y C; o una combinación de A, B y C.

La presente descripción también usa intervalos numéricos para cuantificar determinados parámetros relacionados con varias modalidades de la invención. Debería entenderse que cuando se proporcionan intervalos numéricos, tales intervalos se deben interpretar como que proporcionan un respaldo literal para las limitaciones de las reivindicaciones que solo indican el valor inferior del intervalo y también las limitaciones de las reivindicaciones que solo indican el valor superior del intervalo. Por ejemplo, un intervalo numérico descrito de alrededor de 10 a alrededor de 100 proporciona un respaldo literal para una reivindicación que indica "mayor que alrededor de 10" (sin límites superiores) y una reivindicación que indica "menos que alrededor de 100" (sin límites inferiores).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos establecen métodos para producir formulaciones de acuerdo con modalidades de la presente invención y ensayos de eficacia mediante el uso de estas formulaciones. Debe entenderse, sin embargo, que estos ejemplos se proporcionan solo a modo de ejemplo y nada de esto será tomado como una limitación al alcance global de la invención.

EJEMPLO I

Se preparó una primera formulación de acuerdo con una modalidad de la presente invención (Formulación A). Alga marina (Brandon XT48) es una solución de extracción que tiene alrededor de 480 g/L de sólidos y se agregó a un reactor (reactor A). En otro reactor (reactor B), se agregó el resto del agua (99.08 kg) y se activó el calentamiento. El ácido molíbdico (Produquímica, 50 % de contenido de Mo, más preferentemente mínimo de 25 % de contenido de Mo) se agregó al reactor B, manteniendo el calentamiento a 60°C y agitación hasta la homogeneización. Se agregó MEA (Oxiteno, Brasil, 99.2 % de contenido mínimo de MEA) al reactor B mediante dosificación lenta. En este momento, hubo liberación de calor (proceso exotérmico). La agitación continuó y se mantuvo el calentamiento a 60°C hasta que la solución se volvió nítida. Posteriormente, se agregó triptófano (ADT 30T) y ácido cítrico anhidro (Cargill, 99.5 % de contenido de ácido cítrico mínimo), agitando hasta la disolución completa. A continuación, se agregó quelato de níquel (Níquel Quelatado-EDTA, 13.6 % Ni, Produquímica) y cobalto (Cobalto Quelatado-EDTA, 13.6 % Co, Produquímica) lentamente para evitar la formación de grumos, mientras se agitó y se calentó continuamente hasta la disolución completa. Desde esta etapa, se puede apagar el calentamiento. Luego se agregó agente antiespumante (SAG 1572) y tensioactivo (Atlox 2575), el Atlox 2575 es un tensioactivo que ayuda a la estabilidad de la formulación y su compatibilidad cuando se mezcla con otros productos durante el proceso de aplicación del producto. Este tensioactivo es una solución basada en un compuesto llamado alquilglucósido, agitando hasta la homogeneización completa. La masa total se ajustó con agua debido a la reducción mediante evaporación, finalizando así la mezcla B. La mezcla del reactor B se agregó al alga marina de extracción desde el reactor A lentamente para evitar el desbordamiento ya que ahí dentro puede estar la formación de dióxido de carbono provocando que suceda el avance de gas. La composición final de la Formulación A se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Formulación A. (Base de cálculo: 1000L)

Materiales en bruto	Contenido para el cálculo (% en peso)	Elemento contenido	Cantidad (kg)
Agua	--	--	320.3
Ácido molíbdico	50.0	Mo	241.2
MEA	--	--	114.6
Triptófano	--	--	0.55
Ácido cítrico anhidro	--	--	53.6
Quelato de Níquel Seco EDTA	13.7	Ni	88.0
Quelato de Cobalto Seco EDTA	13.7	Co	44.0
Antiespumante SAG 1572	--	--	0.70
Atlox AL2575 (tensioactivo)	--	--	26.8
Extracto de alga marina	--	--	450.25

Nota: La mezcla del reactor B debería ser mezclada normalmente con la mezcla del reactor A dentro de 2 días de su preparación ya que la mezcla del reactor B no tiene alta estabilidad.

EJEMPLO II

En este experimento, la Formulación A (descrita en el Ejemplo I) se analizó para compatibilidad con inoculantes microbianos favorables para la fijación biológica de N_2 (NBF) en semillas.

1. Introducción

Este informe se refiere a una evaluación de un fertilizante químico, Formulación A, con inoculantes que contienen cepas de *Bradyrhizobium* para el cultivo de soja, para sembrar en el día o en la presiembra.

2. Equipos y Métodos

2.1. Metodología para analizar la recuperación de células de rhizobacteria en semillas de soja

Las metodologías utilizadas se basaron en instrucciones normativas de la MAPA [Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento]. Para evaluar la concentración y pureza de inoculantes, se utilizó la IN [instrucciones normativas] N.º 30 de 12/11/2010 (MAP 2010). Para evaluar la recuperación de células en semillas de soja, se utilizó el método 2 de IN N.º 30 12/11/2010 (MAP 2010).

2.2. Tratamientos

2.2.1. Formulaciones

Se evaluó la Formulación A (descrita anteriormente).

2.2.2. Inoculantes

Se utilizaron dos inoculantes disponibles a nivel comercial en este experimento.

Ensayo 1: Inoculante RIZO-FORTE de Rizobacter (Inoculante I). Inoculante turboso líquido que tiene un inoculante líquido con un determinado porcentaje de turba. Inoculante con alta concentración de células, excelente calidad y buen rendimiento para aplicación en el momento de la siembra. El inoculante está compuesto por cepas de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079) y *Bradyrhizobium diazoefficiens* (SEMIA 5080), con una garantía de 5 x 10^9 células/g. El inoculante se aplicó a una dosis de 100 mL/50 kg de semillas, es decir, 2 mL/kg de semilla.

Ensayo 2: Inoculante LASTRO de Total Biotechnology, LASTRO (Inoculante II). Inoculante en turba con aditivo LASTRO, con excelente calidad y rendimiento para aplicación en el momento de la siembra y también para la pre-inoculación. El inoculante está compuesto por cepas de *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) y (SEMIA 5019), con una garantía de 5.5 x 10^9 células/g. Se preparó una mezcla de 300 mL de aditivo LASTRO + 200 g de inoculante LASTRO, se aplicó 9 mL/kg de semilla.

2.2.3. Tratamientos

Se llevaron a cabo dos ensayos. Los tratamientos implicaron evaluar las dos formulaciones en dos ensayos. El primer ensayo fue con un inoculante con propiedades adecuadas para uso en el momento de la siembra y, por lo tanto, con la evaluación en el tiempo cero y en el tiempo 24 h luego del tratamiento de las semillas (Ensayo 1). El segundo ensayo fue con un inoculante con

propiedades adecuadas para la pre-inoculación acompañada por un aditivo protector y evaluación en el tiempo cero, 24 h y 360 h luego del tratamiento de semillas (Ensayo 2).

Ensayo 1

1) Control: Inoculante I (RIZO-FORTE)
2) Inoculante I + Formulación A
   - Con dos períodos de análisis [tiempo cero (2 h luego del tratamiento) y 24 h]

Ensayo 2

1) Control: Inoculante II (LASTRO)
2) Inoculante II + Formulación A
   - Con 3 períodos de análisis [tiempo cero (2 h luego del tratamiento) y 360 h]

2.3. Preparación de muestras y condiciones de ensayo

Las semillas fueron tratadas en el laboratorio, se secaron durante 15 minutos y luego se aplicó el inoculante. Las semillas se almacenaron en condiciones controladas, con control de humedad relativa a 60 % (se recomienda que no se encuentre por debajo de 45 %) y temperatura de 25°C ± 2°C (se recomienda que la temperatura se encuentre entre 20°C y 30°C).

2.4. Preparación de diluciones y colocación en placas

Para cada tratamiento, se extrajeron tres submuestras, A, B y C, cada una contiene 100 semillas y representa una repetición. Se realizó una dilución en serie de cada repetición y cada dilución se colocó en placas en tres repeticiones.

Las semillas se transfirieron a recipientes del tipo de matraz estéril, con una capacidad de 250 mL, que contienen 100 mL de solución salina de NaCl al 0.85 %, con tres gotas de solución Tween 80 (polioxietilen sorbitan monolaurato) (solución preparada a 2.5 % p/v, se agrega 5.0 g de Tween 80 en 200 mL de agua destilada) y se agita en un agitador orbital a 150 rpm durante 15 minutos. Esto representa la dilución 10^0, es decir, 1.

Luego de la agitación, se transfirió 1 mL de dilución 10^0 desde cada serie a un matraz estéril con 9 mL de solución salina estéril (NaCl al 0.85 %), lo que resulta en la dilución 10^{-1}. Las operaciones se repitieron hasta la dilución deseada, dependiendo de la concentración esperada de células. De cada dilución, se sembró 0.1 mL con la ayuda de una espátula Drigalski en placas de Petri que contienen

medio YMA (Levadura-Manitol-Agar, modificado por Vincent, 1970, también conocido como un medio 79) más colorante rojo Congo (CRYMA - YMA Congo rojo), cuya composición se especifica en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición del medio YMA utilizado en la siembra de *Bradyrhizobium.*

Componente	Cantidad
Manitol	5 g
K_2HPO_4	0.5 g
$MgS0_4.7H_20$	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de levadura	0.4 g
Agua destilada	1,000 mL
Solución rojo Congo (0.25 g en 100 mL de agua destilada)	10 mL
Agar	10-15 g
pH ajustado a	6.8-7.0

Dado que las semillas de soja transportan microorganismos contaminantes, los antimicrobianos vancomicina y actidiona se agregaron al medio YMA. La solución madre de vancomicina se preparó mediante la adición de 0.009 g de vancomicina en 3 mL de agua destilada, seguido por filtración a través de membrana estéril de 0.2 µm. Para la preparación de las soluciones madre de actidiona, se agregaron 25 mg de cicloheximida en 300 pL de alcohol etílico, también seguido por filtración a través de membrana estéril de 0.2 µm. A cada 300 mL de medio YMA con rojo Congo, esterilizado y mantenido a una temperatura de aproximadamente 45-50°C, se agregaron 100 pL de vancomicina y 200 pL de actidiona.

2.5. Recuento de unidades formadoras de colonias

Luego de la siembra, se incubaron las placas a 28°C ± 2°C durante siete días, cuando se contaron las unidades formadoras de colonias (CFU), considerando diluciones que permiten un recuento de 30 a 300 CFU. En el caso de que ninguna de las diluciones sucesivas mostrara un recuento medio de 30 a 300 CFU, se calculó el recuento medio de las dos diluciones cercanas al intervalo sugerido. Las CFU se calcularon mediante la fórmula:

Cantidad de células de semilla $^{-1}$ = f x N, donde:

f= factor de dilución (dado por la recíproca de la dilución en la placa, multiplicado por diez, dado que se utilizó 0.1 mL para la siembra en la placa); y

N= número medio de colonias en las replicaciones de las placas en la dilución seleccionada.

2.6. Análisis estadístico de resultados

Para el análisis de recuperación de células en las semillas, se aleatorizó completamente el diseño experimental con tres repeticiones. Los resultados se sometieron a análisis de varianza (ANOVA). A continuación, los datos se analizaron mediante la prueba de Dunnett (bilateral), para evaluar las diferencias entre las categorías, tomando como comparación el inoculante de cada ensayo sin la adición de la formulación en el tiempo cero (2 h) y utilizando un intervalo de confianza del 95 %. Los tratamientos también se compararon con los controles respectivos en el tiempo 24 h en el Ensayo 1 y 360 h en el Ensayo 2. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software Statistica versión 7.

3. Resultados

3.1. Análisis de inoculantes

La concentración y pureza de los inoculantes se evaluó de acuerdo con el método de siembra (MAP, 2010), y se encontró que los inoculantes eran al menos 1 x 10^9 células g^{-1} o mL^{-1} y sin la presencia de contaminantes en la dilución 10^{-5}. El inoculante RIZO-FORTE tuvo una concentración ligeramente menor que la garantía (5 x 10^9 células/mL). Aun así, la concentración fue suficiente para asegurar el éxito del ensayo. Lo mismo se observó en relación con el inoculante LASTRO, que fue menor que lo que se especificó en la garantía (5.5 x 10^9 células/g). Sin embargo, también para LASTRO, la concentración fue suficiente para asegurar el éxito del ensayo. Las concentraciones del inoculante se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Unidades formadoras de colonias (CFU) de *Bradyrhizobium* en los inoculantes utilizados en el experimento y la presencia o ausencia de contaminantes en la dilución 10^0.

Inoculante	CFU/mL o g	Contaminante
Inoculante RIZO-FORTE	4.39 x 10^9	cero
Inoculante LASTRO	3.53 x 10^9	cero

3.2. Recuperación de células viables en semillas

Al evaluar los tratamientos en este ensayo, se siguió el protocolo oficial para la recuperación de células en las semillas (MAP, 2010), y en todos los otros tiempos de evaluación se compararon todos los tratamientos en relación con el tratamiento utilizado como un control, que en el Ensayo 1 fue representado por el inoculante RIZO-FORTE en el tiempo 2 h y en el Ensayo 2 por el inoculante LASTRO en el tiempo 2 h. Se realizó un análisis estadístico adicional, comparando el inoculante RIZO-FORTE con los tratamientos de la formulación en el tiempo 24 h y el inoculante LASTRO con los tratamientos de la formulación en el tiempo 360 h.

3.2.1. Ensayo 1

En el Ensayo 1, realizado para verificar la compatibilidad de las formulaciones con inoculante que se pretende usar en el tiempo de siembra, se encontró que la Formulación A no afectó la recuperación de células en las semillas en el tiempo cero, es decir, 2 h luego del tratamiento (Tabla 5). Debe hacerse énfasis en que la recuperación de células en la semilla fue buena. Por ejemplo, 316,228 células por semilla con la Formulación A representa 26 % del cálculo teórico aplicado a las semillas, 1.2 millones de células por semilla.

Sin embargo, 24 h luego del tratamiento de las semillas, hubo una reducción en la cantidad de células recuperadas en las semillas en todos los tratamientos cuando se compara con el control con el inoculante en el tiempo cero (2h) (Tabla 5). Esto muestra que incluso el inoculante sin agregar una formulación no fue capaz de mantener la cantidad de células durante 24 h. Sin embargo, cuando se analiza la Formulación A en relación con el tratamiento solamente con el inoculante, todo en el tiempo 24 h, se observó que la Formulación A redujo la cantidad de células. Por lo tanto, fue dañino para la supervivencia de *Bradyrhizobium* a las 24 h (Tabla 5).

Tabla 5. Recuperación de células de *Bradyrhizobium* en semillas de soja (expresadas en $\log_{10}$ de unidades formadoras de colonias, UFC semilla $^{-1}$), tratadas con inoculante RIZO-FORTE. En las primeras dos columnas, los resultados se compararon con el control en el tiempo cero. En la tercera columna, los resultados se compararon con el control en el tiempo 24 horas.

	Tiempo luego de inoculación		
Tratamientos	cero (2 h)	24 h	24 h
Inoculante RIZO-FORTE	5.2 [1]	4.5 ***	4.5 [2]
RIZO-FORTE + Formulación A	5.5 [ns]	2.9 ***	2.9 ***

[1] Los valores representan las medias de tres repeticiones, expresadas en logaritmo de base 10 (por ejemplo, 6 indica 10^6 o 1,000,000 células semilla^{-1}). Las medias seguidas por *** indican valores significativamente más bajos que el inoculante estándar en 2 h mediante la prueba de Dunnett (bilateral), con $P \leq 0.001$; ns = n significativo ($P > 0.05$).

[2] Las medias seguidas por *** indican valores significativamente más bajos que los valores significativamente más bajos que el inoculante estándar analizado luego de 24 h mediante la prueba de Dunnett (bilateral), con $P \leq 0.001$.

3.2.2. Ensayo 2

En el Ensayo 2, realizado para verificar la compatibilidad de las formulaciones con inoculante aplicado con un aditivo protector de bacterias, que debería asegurar su supervivencia durante un tiempo más prolongado en las semillas, hubo una muy buena recuperación de células en las semillas, que alcanzó 630,957 células por semilla en el tratamiento con LASTRO (Tabla 6). No hubo diferencia estadística para el tratamiento con la Formulación A, tanto en tiempo cero (2 h de tratamiento) o luego de 24 h (Tabla 6), lo que indica que la combinación de inoculante y aditivo confirió, de hecho, mayor protección a las bacterias en comparación con el inoculante utilizado en el Ensayo 1 (Tabla 5). En el tiempo 360 h, sin embargo, todos los tratamientos significativamente difirieron del control en el tiempo cero. Además, la Formulación A difirió del control en el tiempo 360 h, mostrando un efecto dañino sobre la supervivencia de *Bradyrhizobium* en comparación con el control en 360 h (Tabla 6).

Tabla 6. Recuperación de células de *Bradyrhizobium* en semillas de soja (expresadas en $\log_{10}$ de unidades formadoras de colonias, UFC semilla $^{-1}$), tratadas con inoculante LASTRO. En las primeras tres columnas, los resultados se compararon con el control en el tiempo cero. En la cuarta columna, los resultados se compararon con el control en el tiempo 360 h.

Tratamientos	Tiempo luego de inoculación			
	Cero (2 h)	24 h	360 h	360 h
Inoculante LASTRO	5.81 [1]	5.5 [ns]	4.0 ***	4.2 [2]
LASTRO + Formulación A	5.7 [ns]	5.4 [ns]	3.3 ***	3.3 ***

[1] Los valores representan las medias de tres repeticiones, expresadas en logaritmo de base 10 (por ejemplo, 6 indica 10^6 o 1,000,000 células semilla^{-1}). Las medias seguidas por *** indican valores significativamente más bajos que el inoculante estándar en 2 h mediante la prueba de Dunnett (bilateral), con $P \leq 0.001$; ns = n significativo ($P > 0.05$).

[2] Las medias seguidas por *** indican valores significativamente más bajos que los valores significativamente más bajos que el inoculante estándar analizado luego de 350 h mediante la prueba de Dunnett (bilateral), con $P \leq 0.001$.

4. Conclusiones

Considerando los resultados de analizar la recuperación de células de *Bradyrhizobium* en semillas de soja, se pueden sacar determinadas conclusiones. En primer lugar, la Formulación A no afectó la recuperación de células para cualquiera de los inoculantes en las semillas en el tiempo cero (2 horas) luego del tratamiento. En segundo lugar, parece ser que con el inoculante que se pretende utilizar en la siembra, la Formulación A fue inferior al control luego de 24 h. Sin embargo, con el inoculante aplicado con un aditivo protector de bacterias, la Formulación A no difirió del control en 24 h, pero mostró una reducción estadísticamente significativa luego de 360 h. Cabe destacar que, cuando la Formulación A se utiliza en la práctica de la agricultura típica, la formulación se aplica en las semillas y las semillas se plantan inmediatamente después. Por lo tanto, los resultados alrededor de 2 horas luego de la inoculación son los más útiles. Si se necesitan tiempos más largos para preservar las cepas del inoculante, puede utilizarse un aditivo protector.

EJEMPLO III

En este experimento, la Formulación A se analizó de forma similar el Ejemplo II para compatibilidad con dos otros inoculantes, *Bacillus subtilis* (RIZOS por Laboratório Farroupilha) y *Trichoderma asperellum* (QUALITY por Laboratório Farroupilha). El inoculante de *Bacillus subtilis* se aplicó a las semillas a una dosis de 2mL/kg de semillas. El inoculante de *Trichoderma asperellum* se aplicó a las semillas a una dosis de 2 g/kg de semillas. Luego se trataron a las semillas con la Formulación A a una dosis de 0.15 kg por 120 kg de semillas. Los resultados mostraron que 2 horas luego de los tratamientos de inoculación con la Formulación A, fueron compatibles cuando se utilizaron con inoculantes de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma asperellum.* Es decir, la Formulación A no provocó una reducción significativa en células de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma asperellum* presentes en las semillas en las 2 horas luego del tratamiento.

EJEMPLO IV

Este experimento evaluó la nodulación y desarrollo de la planta y producción del cultivo de soja mediante el uso de la Formulación A.

Metodología

El experimento se llevó a cabo en un clima subtropical húmedo de acuerdo con el sistema de clasificación Köppen (clima tropical de altitud con lluvia en verano y seco en invierno). El suelo se clasificó como Latosol Rojo distrófico típico. La Tabla 7 debajo muestra los resultados analíticos antes de montar el experimento.

Tabla 7. Análisis físico y químico del suelo, antes de las correcciones y montaje de los experimentos de soja.

Profundidad (cm)	pH	M.O.	P	S	Ca	Mg	K	Al	H+Al	Total	CTC	%	Sat Al%
	$CaCl_2$	g dm^{-3}	mg dm^{-3}		$mmol_c$ dm^{-3-}							%	% m
0-10	5.7	27	31	11	45	9	2.1	1	25	55.9	80.8	69	2
10-20	4.6	22	13	42	30	6	1.0	1	50	37.5	87.8	43	1
20-40	4.3	19	9	89	17	5	0.7	8	62	22.0	84.1	26	27

Profundidad (cm)	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Arcilla	Sedimento	Arena
	---------- mg dm^{-3} ----------					---------- ----------		
0-10	0.36	3.6	20	2.8	2.2	50	21	29
10-20	0.37	1.6	17	1.4	0.7	50	22	28
20-40	0.40	0.9	15	1.7	0.4	52	20	27

Las Figuras 1 y 2 muestran, respectivamente, las condiciones climáticas y el equilibrio hídrico durante el desarrollo del cultivo de soja durante el período de análisis. Las Tablas 8 y 9 debajo muestran, respectivamente, las características de la plantación del cultivo de soja y una descripción de los tratamientos utilizados para la caracterización de la Formulación A. Luego se analizó la Formulación A contra un producto seco que comprende 1.2 % en peso de cobalto, 2.4 % en peso de níquel y 26 % en peso de molibdeno. El producto seco comparativo se mezcló con producto mejorador (por Produquímica) que contiene 93 % en peso de extracto de alga marina.

Tabla 8. Características del cultivar utilizado y plantación del cultivo de soja.

ÍTEM	DESCRIPCIÓN
Cultivo	SEMILLAS DE SOJA

CULTIVAR	MONSOY 6410 IPRO
POBLACIÓN FINAL	400,000 plantas/10000 m^2
DISTANCIA	0.50 m
PLANTACIÓN	Día 0
GERMINACIÓN	Día 5
COSECHA	Día 120
CICLO MEDIO	120 días
CONTROL GENERAL	TS: 100 mL $100kg^{-1}$ Standak Top 200 ml Cruiser 100 ml Maxin XL
	Base de nitrógeno - 200 kg/10000 m^2 Potenza P 10-49-00
	Fertilización previa a la plantación - 200 kg/10000 m^2 KCl

Tabla 9. Descripción de los tratamientos.

Tratamiento	Variedad	PMS Configuración	Consumo kg/10000 m^2	Dosis (mL/kg)	Dosis (mL/10000 m^2)	Tiempo	Producto
1	M 6410 IPRO	94	46	0.0	0	TS	Formulación A
2	M 6410 IPRO	94	46	1.0	45	TS	Formulación A
3	M 6410 IPRO	94	46	2.0	90	TS	Formulación A
4	M 6410 IPRO	94	46	3.0	135	TS	Formulación A
5	M 6410 IPRO	94	46	4.0	180	TS	Formulación A
6	M 6410 IPRO	94	46	2.22 + 2.66 (g/kg)	100 + 120 (g/10000 m^2)	TS	Producto seco + Mejorador

7	M 6410 IPRO	149	73	0.0	0	TS	Formulación A
8	M 6410 IPRO	149	73	1.0	60	TS	Formulación A
9	M 6410 IPRO	149	73	2.0	120	TS	Formulación A
10	M 6410 IPRO	149	73	3.0	180	TS	Formulación A
11	M 6410 IPRO	149	73	4.0	240	TS	Formulación A
12	M 6410 IPRO	149	73	1,66 + 2,0 (g/kg)	100 + 120 (g/10000 m^2)	TS	Producto seco + Mejorador

Las variables analizadas fueron:

Posición de plantas y porcentaje de germinación: 10 días luego de la germinación, se contaron las plantas en 2 filas x 10 m de longitud, con cuatro replicaciones. Se estimó la germinación de acuerdo con la cantidad de semillas depositadas dependiendo de la plantación.

Cantidad y masa seca de nódulos: en el estadio R1 fenológico, se recogieron 10 plantas consecutivas en cada terreno de experimentación, se envolvieron en baldes de plástico y sus raíces se lavaron en agua corriente. Se contó allí la cantidad de nódulos y luego se colocaron los nódulos en un horno durante 75 h a 60°C para determinar el peso.

Biometría de plantas: En el estadio fenológico R6, se recogieron 10 plantas consecutivas en cada terreno de experimentación. Se contó allí la cantidad de nodos por planta, cantidad de ramas/plantas, cantidad de vainas por planta y cantidad de granos por planta.

Producción y peso de 100 granos: luego de recolectarlas manualmente, las plantas se sometieron a trilla, el contenido de humedad del grano se establece a 14 % para determinar la producción en bolsas de 60 kg.(10000 $m^2)^{-1}$ y masa en gramos de 100 granos.

Cada tratamiento estaba compuesto por 12 filas x 42 m de longitud con 4 replicaciones por tratamiento. El terreno útil estaba compuesto por 2 filas x 5 m de longitud. Los tratamientos de semilla se llevaron a cabo en el día de la plantación, con las semillas y los productos insertados en una bolsa plástica y luego sacudidas durante 30 segundos para asegurar que los productos puedan adherirse a las semillas. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y cuando hubo diferencias significativas entre los medios (prueba F de Fisher), estos se compararon mediante la prueba Scott-Knott, en el nivel de 10 % de probabilidad.

Resultados

Las tablas y figuras debajo presentan los resultados para el porcentaje de germinación, cantidad y peso de nódulos por planta, cantidad de vainas, semillas, nodos y ramas por planta, peso de 100 semillas (g) y producción en bolsas de 60 kg/10000 m^2. En la Tabla 10, puede observarse un mejor efecto en la germinación, debido al tamaño aumentado de la semilla en dosis más grandes de la Formulación A. Sin embargo, en el tamiz 5, la Formulación A redujo la germinación en la dosis más grande.

Tabla 10. Porcentaje (%) de germinación en plantas en el cultivo de soja bajo diferentes tratamientos de semilla.

Producto	Tamiz				Media	
	5		6			
Control	79.6	Ac	80.6	Ac	80.1	c
Formulación A 1ml/kg	79.6	Ac	88.4	Aa	84.0	b
Formulación A 2ml/kg	82.6	Bb	88.6	Aa	85.6	b
Formulación A 3ml/kg	86.3	Ba	91.0	Aa	88.7	a
Formulación A 4ml/kg	75.2	Bd	84.5	Ab	79.9	c
Nicomo Dry+Mejorador	82.7	Ab	85.9	Ab	84.3	b
Media	81.3	B	87.7	A		
CV(%)	3.39					

Las medias seguidas por la misma letra mayúscula en la línea y letra minúscula en la columna no difieren por la prueba de Scott-Knott en 10 % de probabilidad.

El uso de la Formulación A en semillas de soja no afectó la cantidad de nódulos variables en la soja, como puede observarse en la Tabla 11.

Tabla 11. Cantidad de nódulos por planta en soja bajo diferentes tratamientos de semilla.

Producto	Tamiz				Media	
	5		6			
Control	501	Aa	551	Aa	526	a
Formulación A 1ml/kg	623	Aa	530	Aa	576	a
Formulación A 2ml/kg	629	Aa	526	Aa	578	a
Formulación A 3ml/kg	589	Aa	445	Aa	517	a
Formulación A 4ml/kg	541	Aa	459	Aa	500	a
Nicomo Dry+Mejorador	505	Aa	448	Aa	476	a
Media	577	A	482	B		
CV(%)	22.03					

Las medias seguidas por la misma letra mayúscula en la línea y letra minúscula en la columna no difieren por la prueba de Scott-Knott en 10 % de probabilidad.

El peso de los nódulos mostró una tendencia a disminuir con un aumento en el tamaño de las semillas de soja y solamente influyó positivamente en la dosis más pequeña de la Formulación A (Tabla 12).

Tabla 12. Peso (g) de nódulos por planta en soja bajo diferentes tratamientos de semilla.

Producto	Tamiz				Media	
	5		6			
Control	1.93	Ab	1.82	Ab	1.87	b
Formulación A 1ml/kg	2.36	Aa	2.17	Aa	2.27	a
Formulación A 2ml/kg	2.03	Ab	1.63	Bb	1.83	b
Formulación A 3ml/kg	2.12	Ab	1.76	Bb	1.94	b
Formulación A 4ml/kg	2.11	Ab	1.90	Ab	2.01	b
Nicomo Dry+Mejorador	1.93	Ab	1.94	Ab	1.93	b
Media	2.11	A	1.88	B		
CV(%)	10.52					

Las medias seguidas por la misma letra mayúscula en la línea y letra minúscula en la columna no difieren por la prueba de Scott-Knott en 10 % de probabilidad.

La cantidad de vainas mostraron una diferencia significativa entre los tamices, mostrando el tamiz 6 los valores más bajos. La dosis más grande de la Formulación A afectó sustancialmente la cantidad de vainas, independientemente del tamiz estudiado (Tabla 13).

Tabla 13. Cantidad de vainas por planta en soja bajo diferentes tratamientos de semilla.

Producto	Tamiz				Media	
	5		6			
Control	48.1	Aa	33.7	Ba	40.9	a
Formulación A 1ml/kg	45.0	Aa	35.8	Ba	40.4	a
Formulación A 2ml/kg	52.3	Aa	34.9	Ba	43.6	a
Formulación A 3ml/kg	52.0	Aa	34.3	Ba	43.1	a
Formulación A 4ml/kg	29.6	Ab	30.9	Aa	30.2	b
Nicomo Dry+Mejorador	49.5	Aa	35.7	Ba	42.6	a
Media	45.7	A	34.3	B		
CV(%)	14.50					

Las medias seguidas por la misma letra mayúscula en la línea y letra minúscula en la columna no difieren por la prueba de Scott-Knott en 10 % de probabilidad.

En la Tabla 14, puede observarse una conducta similar entre la cantidad de vainas y semillas en plantas de soja.

Tabla 14. Cantidad de semillas por planta en soja bajo diferentes tratamientos de semilla.

Producto	Tamiz				Media	
	5		6			
Control	129.2	Aa	91.9	Ba	110.5	a
Formulación A 1ml/kg	103.7	Ab	89.3	Aa	96.5	a
Formulación A 2ml/kg	130.9	Aa	81.4	Ba	106.1	a
Formulación A 3ml/kg	135.2	Aa	87.1	Ba	111.1	a
Formulación A 4ml/kg	73.5	Ac	77.9	Aa	75.7	b
Nicomo Dry+Mejorador	129.3	Aa	90.7	Ba	110.0	a
Media	114.5	A	85.3	B		
CV(%)	14.68					

Las medias seguidas por la misma letra mayúscula en la línea y letra minúscula en la columna no difieren por la prueba de Scott-Knott en 10 % de probabilidad.

Para la cantidad de nodos variable, el tratamiento que menos se destacó fue la dosis más grande de Fórmula A aplicado al tamaño de la semilla más pequeño (Tabla 15).

Tabla 15. Cantidad de nodos por planta en soja bajo diferentes tratamientos de semilla.

Producto	Tamiz				Media	
	5		6			
Control	18.3	Aa	16.4	Ba	17.3	a
Formulación A 1ml/kg	17.5	Aa	16.6	Aa	17.0	a
Formulación A 2ml/kg	18.7	Aa	16.3	Ba	17.5	a
Formulación A 3ml/kg	18.1	Aa	16.5	Ba	17.3	a
Formulación A 4ml/kg	15.5	Ab	16.3	Aa	15.9	b
Nicomo Dry+Mejorador	18.0	Aa	16.3	Ba	17.1	a
Media	17.5	A	16.4	B		
CV(%)	4.62					

Las medias seguidas por la misma letra mayúscula en la línea y letra minúscula en la columna no difieren por la prueba de Scott-Knott en 10 % de probabilidad.

La cantidad de ramas mostraron una correlación positiva entre la aplicación de la Formulación A y semillas de tamaño más pequeño, salvo para la dosis más grande (Tabla 16).

Tabla 16. Cantidad de ramas por planta en soja bajo diferentes tratamientos de semilla.

Producto	Tamiz				Media	
	5		6			
Control	1.7	Ab	1.8	Ab	1.7	b
Formulación A 1ml/kg	3.1	Aa	1.8	Bb	2.4	a
Formulación A 2ml/kg	3.1	Aa	2.1	Ba	2.6	a
Formulación A 3ml/kg	3.3	Aa	2.4	Ba	2.8	a
Formulación A 4ml/kg	1.7	Ab	1.8	Ab	1.8	b
Nicomo Dry+Mejorador	2.8	Aa	2.6	Aa	2.7	a
Media	2.8	A	2.1	B		
CV(%)	18.92					

Las medias seguidas por la misma letra mayúscula en la línea y letra minúscula en la columna no difieren por la prueba de Scott-Knott en 10 % de probabilidad.

Independientemente de la formulación utilizada en el tratamiento de semilla, fue posible observar un impacto positivo con un aumento en el peso de las semillas (Tabla 17).

Tabla 17. Peso de 100 semillas (g) en el cultivo de soja bajo diferentes tratamientos de semilla.

Producto	Tamiz				Media	
	5		6			
Control	12.6	Bc	15.4	Ac	14.0	c
Formulación A 1ml/kg	15.8	Ba	16.9	Aa	16.3	a
Formulación A 2ml/kg	15.3	Bb	16.4	Ab	15.8	b
Formulación A 3ml/kg	15.7	Ba	16.5	Ab	16.1	a
Formulación A 4ml/kg	15.6	Ba	16.3	Ab	15.9	b
Nicomo Dry+Mejorador	15.8	Aa	15.4	Bc	15.6	b
Media	15.6	B	16.3	A		
CV(%)	2.06					

Las medias seguidas por la misma letra mayúscula en la línea y letra minúscula en la columna no difieren por la prueba de Scott-Knott en 10 % de probabilidad.

Con los resultados que se muestran en la Tabla 18, incluso sin diferencias significativas, hubo un aumento de la producción en el cultivo de soja en el orden de 4 a 14 % con el uso de la Formulación A. La combinación de la Formulación A y tamaños más grandes de semillas proporcionó las mejores producciones para semillas de soja.

Tabla 18. Producción (bolsas de 60 kg/10000 m^2) en el cultivo de soja bajo diferentes tratamientos de semilla.

Producto	Tamiz				Media	
	5		6			
Control	72.1	Aa	75.9	Aa	74.0	a
Formulación A 1ml/kg	75.3	Aa	86.9	Aa	81.1	a
Formulación A 2ml/kg	76.9	Aa	82.1	Aa	79.5	a
Formulación A 3ml/kg	80.6	Aa	82.0	Aa	81.3	a
Formulación A 4ml/kg	78.6	Aa	76.4	Aa	77.5	a
Nicomo Dry+Mejorador	89.7	Aa	82.4	Aa	86.1	a
Media	80.2	A	82.0	A		

CV(%)	12.78

Las medias seguidas por la misma letra mayúscula en la línea y letra minúscula en la columna no difieren por la prueba de Scott-Knott en 10 % de probabilidad.

Conclusión

Pueden deducirse determinadas conclusiones en condiciones de desarrollo del experimento. Por ejemplo, parece que la dosis de la Formulación A recomendada para un cultivo de soja debería ajustarse a alrededor de 150 ml/10000 m^2 (Ver, Figura 3). Adicionalmente, la Formulación A no parece interferir en el proceso de establecer simbiosis entre plantas de soja y bacterias de nitrógeno. Finalmente, parece que el uso de la Formulación A contribuye a un aumento en el peso del grano.

RESUMEN

Se proporcionan en la presente composiciones de fertilizante de líquido estables que comprenden níquel, cobalto y molibdeno. Las composiciones fertilizantes son capaces de suministrar altos niveles de micronutrientes a semillas a dosis bajas de las composiciones. Las composiciones generalmente tienen baja salinidad y un pH de alrededor de 6.0 a alrededor de 8.0, evitando así las tasas de alta mortalidad de bacterias del suelo beneficiosas que ha sido un gran problema con fertilizantes de semillas anteriores. También se proporcionan en la presente métodos para formar y utilizar las composiciones fertilizantes. Cabe destacar que se ha descubierto que soluciones de molibdato de monoetanolamina pueden utilizarse para proporcionar altos niveles de molibdeno a superficies de semillas en una formulación líquida estable.