

Evaluación de dos inoculantes comerciales para arveja y lenteja. I. Pruebas de laboratorio

Leticia Barrientos D.
Microbióloga M. Sc.

Enrique Peñaloza H.
Ing. Agr. M. S.

Los inoculantes corresponden a un cultivo artificial de bacterias suspendidas en un material inerte que les permite mantenerse activas e infectar las raíces de sus hospederos, inducir la formación de nódulos, e iniciar el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno.

Para arvejas y lentejas, los inoculantes contienen bacterias de la especie *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*, de reconocida capacidad fijadora de nitrógeno. Estos inoculantes pueden comercializarse en medio líquido, liofilizados (desechados), o en algún otro soporte como la turba, siendo esta última presentación la más común en el país.

Para que cumplan su función, los inoculantes deben garantizar un número mínimo de rizobios vivos al momento de ser utilizados. Esto requiere de evaluaciones periódicas de sobrevivencia durante su preparación, así como en la distribución y comercialización, es decir, de un programa de control de calidad que permita asegurar al agricultor la adquisición de productos que cumplan ciertos estándares.

Los estándares por los cuales se evalúan los inoculantes se basan en el número de rizobios viables por gramo de inoculante, y/o como número por semilla necesarios para iniciar una rápida y efectiva nodulación. Con esto se persigue optimizar el número de rizobios presentes en los puntos de infección de la raíz de la leguminosa, de modo de contrarrestar los factores negativos que operan en contra de su sobrevivencia, como suelos con altas poblaciones de rizobios inefectivos, organismos antagónicos al rizobio, factores tóxicos derivados de la aplicación de pesticidas, acidez del suelo, etc.

El número mínimo de rizobios viables por gramo de inoculante aceptado hasta la fecha de expiración del producto (generalmente seis meses) varía según el país, presentándose en el Cuadro 1 los estándares exigidos en algunos que poseen control de calidad de sus inoculantes. Con el propósito de cuantificar estos estándares en dos inoculantes comercializados en Chile para arveja y lenteja, previo a su evaluación en ensayos de campo (parte II del presente artículo), ambos productos se sometieron a pruebas convencionales de control de calidad. Este estudio se realizó en los laboratorios e invernaderos de INIA-Carillanca, sobre muestras de inoculantes disponibles en el mercado para las temporadas 1991/92 y 1992/93.

Metodología

La calidad de los inoculantes se evaluó determinando el número de rizobios viables presentes en cada muestra. Con este propósito se emplearon dos métodos que correspondieron a la dilución del inoculante en placas usando un medio indicador, y a pruebas de infección de plantas con una serie de diluciones del inóculo, de acuerdo a la técnica conocida como Número Más Probable (NMP).

Cuadro 1. Número mínimo de rizobios vivos aceptados en inoculantes en base a turba no estéril.

País	Bact / g inoculante
Australia	300.000.000
Brasil	10.000.000
Canadá	1.000.000
India	10.000.000
Rusia	100.000.000
Uruguay	500.000.000
Usa	300.000.000

Fuente: FAO. 1991. Expert Consultation on Legume Inoculant Production and Quality Control. Report.

a) Recuento de rizobios viables en placas

Con este método se determina el número de rizobios viables presentes en el inoculante, mediante el empleo de medios de cultivo específicos para el crecimiento de los rizobios. Cuando se utiliza esta metodología, la evaluación de la calidad de inoculante en soporte no estéril posee sólo carácter orientativo, realizándose, consecuentemente, en forma paralela a la técnica del NMP.

b) Recuento de rizobios viables en plantas

El recuento por infección de plantas, con el empleo de la técnica del NMP, se aplica cuando en el inoculante existe una alta proporción de microorganismos contaminantes que hacen difícil el reconocimiento de las colonias de rizobios.

Este método se basa en la capacidad de un rizobio específico de producir nódulos en una especie determinada de leguminosa, y presupone que una sola célula de rizobio agregada a la planta huésped induce en los alrededores de la raíz una población suficiente para causar la nodulación.

Resultados

La determinación del número de rizobios por el método de diluciones en placas presentó varios problemas, debido a la presencia de un alto número de microorganismos contaminantes, lo que indica la utilización de soporte no estéril en la fabricación de los dos inoculantes evaluados. Estos contaminantes compiten con los rizobios, inhibiendo su crecimiento, expresado como número de bacterias vivas por gramo de inoculante, al momento de su utilización.

Lo anterior dificultó el reconocimiento y recuento de las colonias de rizobios. Además, cuando los contaminantes son más numerosos que los rizobios, pueden enmascararlos, disminuyendo su número. Debido a las limitaciones impuestas por la presencia de contaminantes, el recuento en placa no permitió obtener resultados confiables sobre el número de rizobios viables.

La técnica de infección de plantas representa la alternativa inequívoca sobre el número de rizobios presentes en el inoculante, cuando en éste existen contaminantes que dificultan la determinación de su calidad. De acuerdo con los resultados (Cuadro 2), los inoculantes evaluados presentaron recuentos significativamente inferiores a los estándares utilizados en países que regulan la calidad de estos productos.

Conclusiones

Los dos inoculantes evaluados presentaron recuentos significativamente inferiores a los estándares de países que disponen de control de calidad. En términos prácticos, esto se tradu-

cirá muchas veces en una insuficiente nodulación, o que la infección de raíces ocurra por bacterias presentes en los suelos.

Si en el suelo se dispone de suficiente cantidad de rizobios nativos de buena capacidad infecciosa y competitiva, la infección y nodulación ocurrirá con estas bacterias, haciéndose innecesaria la inoculación, enmascarándose una eventual inadecuada calidad de los inoculantes, en términos de su capacidad para inducir nodulación.

Comentarios

Esta primera aproximación al problema de calidad de los inoculantes es una señal de alerta tanto para fabricantes, distribuidores y usuarios de estos productos. Un inoculante de buena calidad puede perder sus atributos si no se toman las medidas necesarias para mantener viables las bacterias durante la distribución y comercialización, o si no son utilizados adecuadamente por el agricultor. Ciertamente, condiciones ideales de almacenamiento, o de uso, no se traducirán en resultados exitosos si se trata de un inoculante que no se ajuste a estándares mínimos de calidad durante su fabricación.

En el país no existe una ley u organismo que regule la calidad de los inoculantes disponibles en el mercado, tanto nacionales como importados, ni que norme sobre las medidas necesarias para asegurar su máxima duración. En ese sentido, investigaciones relativas a la calidad de inoculantes, abren una instancia de reflexión acerca de la necesidad de legislar sobre la fabricación, distribución y comercialización de estos productos en el país.

Cuadro 2. Número de Rizobios por gramo de inoculante determinados con la técnica del Número Más Probable.

Especie	Temporada de evaluación	Inoculante A	Inoculante B
Arveja	1991/92	2100	3500
	1992/93	290	150
Lenteja	1991/92	3500	300
	1992/93	850	1500

Evaluación de dos inoculantes comerciales para arveja y lenteja.

II. Ensayos de campo

Enrique Peñaloza H.
Ing. Agron. M. S.

Leticia Barrientos D.
Microbióloga M. Sc.

Amelia Peyrelongue C.
Ing. Agron. M. Sc.

Las bacterias asociadas a la fijación simbiótica de nitrógeno en arveja y lenteja se encuentran normalmente presentes en la mayoría de los suelos donde se cultivan estas especies, sobreviviendo como saprófitos, o en hospederos alternativos. Esta situación ofrece la posibilidad de evaluar la calidad de inoculantes comerciales, al enfrentarlos a la competencia con las bacterias nativas, adaptadas en su ambiente.

En el país existen alrededor de tres o cuatro marcas comerciales de inoculantes para lenteja y arveja, los que se utilizan con relativa frecuencia en estas especies, como una manera de asegurar la nodulación de raíces. Con el propósito de cuantificar la importancia práctica de la inoculación, en la presente investigación se evaluaron dos inoculantes comerciales, comparándolos con aplicaciones iniciales de nitrógeno, como alternativa de suministro de este

elemento. El estudio se realizó en ambientes representativos de los cultivos de arveja y lenteja en la IX Región, correspondientes al secano costero (Carahue), secano interior (Traiguén) y valle central (Carillanca), durante las temporadas 1991/92 y 1992/93.

Respuesta a dos inoculantes comerciales

Las dos muestras de inoculantes evaluados en este estudio se adquirieron en el comercio días antes del inicio de las experiencias, manteniéndose almacenados a 4°C hasta su utilización. En cada temporada, ambos inoculantes se sometieron a pruebas de control de calidad en laboratorio, cuyos resultados se presentaron en la primera parte de este artículo (pag. 3). La inoculación de la semilla se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, inmediatamente antes de la siembra.

Como era esperable, en los tres sitios de ensayos, y en ambas temporadas, se detectó la presencia de nódulos en plantas no inoculadas de arveja y lenteja (Cuadro 1), cuyo número no difirió de aquellos que se contabilizaron en plantas inoculadas. Esta observación permitió comprobar la presencia de bacterias nativas como habitantes comunes de estos suelos, y demostrar que la cantidad de rizobios viables presentes en los inoculantes, fueron insuficientes para superar el número de nódulos de plantas no inoculadas, incluso en situaciones de inadecuada nodulación natural.

Tanto en lenteja como en arveja, la inoculación no afectó el rendimiento en los tres sitios de ensayo, comparado con los tratamientos sin inocular (Cuadros 2 y 3). Estos resultados demuestran la escasa utilidad de los inoculantes evaluados en estas especies, cuando en el suelo existen poblaciones de rizobios nativos capaces de suministrar

el nitrógeno requerido por la planta, en adición al aportado por el suelo mediante el proceso de mineralización de la materia orgánica.

No obstante los resultados de los análisis de laboratorio presentados en la primera parte del presente artículo, y la incapacidad de los inoculantes para mejorar la nodulación en terreno, la ausencia de efectos sobre el rendimiento no se podría directamente atribuir a la inadecuada calidad de los inoculantes, puesto que, como se mencionará en la siguiente sección, las aplicaciones de nitrógeno tampoco provocaron efectos importantes y consistentes sobre los rendimientos.

Respuesta a tres niveles de nitrógeno

Se ha mencionado que las leguminosas responden a aplicaciones iniciales de nitrógeno mientras se activa la fijación biológica. Con el propósito de cuantificar la importancia de

esta práctica, y compararla con la utilización de inoculantes, se evaluaron tres dosis de nitrógeno aplicados junto con la siembra, correspondientes a 0, 20 y 40 kg de N/ha.

En general, las aplicaciones de nitrógeno no afectaron el rendimiento en lenteja y arveja (Cuadros 2 y 3), para las condiciones de suelo en que se realizaron estos estudios (Cuadro 1). Lo observado en estas experiencias es una respuesta esperable en la mayoría de los suelos dedicados al cultivo de estas leguminosas, y se ha encontrado asociado a la presencia de bacterias nativas, suficientemente efectivas como para, en adición al aporte del suelo, suplir los requerimientos de nitrógeno de ambos cultivos.

Cuadro 1. Nodulación natural en arveja y lenteja, y contenidos de nitrógeno inicial y materia orgánica en los suelos donde se realizaron las experiencias.

	Secano costero		Secano interior		Valle central	
	1991/92	1992/93	1991/92	1992/93	1991/92	1992/93
Nodulación natural ¹						
Arveja	37	43	95	25	95	122
Lenteja	26	16	21	12	25	35
N inicial (ppm)	16	11	22	14	25	15
Mat. Organ. (%)	5	5	14	5	17	10

¹ Número promedio de nódulos/planta hasta 15 cm de profundidad, en el tratamiento sin nitrógeno y sin inoculante, evaluado a inicios de floración.

Las leguminosas podrían beneficiarse de las aplicaciones de nitrógeno sólo cuando las bacterias no están presentes en cantidad adecuada en el suelo, y el nitrógeno disponible no es suficiente para suplir sus necesidades. En estas circunstancias, las plantas pueden manifestar deficiencias de nitrógeno posterior a la emergencia, debiendo recurrirse a prácticas de corrección mediante la aplicación de nitrógeno en cobertura, con el compromiso de inocular el próximo cultivo de leguminosas a establecerse en el mismo potrero. Si aún persisten los problemas, posterior a la utilización de un inoculante que cumpla ciertos estándares mínimos de calidad, lo más probable es que ese suelo no sea apto para el establecimiento de las bacterias debido a problemas de acidez, o a altos contenidos de elementos tóxicos para el rizobio.

Alternativamente, sería posible esperar respuesta a aplicaciones de nitrógeno en una situación donde los requerimientos de este elemento por el cultivo superen los aportes del suelo y de la fijación, y el fertilizante no sea lixiviado con las aguas lluvias. En términos prácticos, esta situación se puede dar en condiciones donde los rendimientos de una leguminosa superen los 45 a 50 qqm/ha, como la tendencia observada en arvejas durante las dos temporadas en el valle central.

Inoculantes comerciales vs. nitrógeno

De acuerdo con los resultados obtenidos para arveja y lenteja, ninguna de las dos alternativas de suministro de nitrógeno evaluadas fueron superiores a los aportes de la nodulación natural. Esto pone en evidencia la habilidad de los rizobios nativos para asociarse a las raíces de ambas leguminosas y contribuir a sus necesidades de nitrógeno, incluso en suelos caracterizados por escasa nodulación natural, y bajos contenidos de este elemento. Del mismo modo, esta habilidad tiende a enmascarar la inadecuada calidad de algún inoculante, detectada sólo mediante pruebas de laboratorio.

Aún cuando de escasa magnitud, la excepción lo constituyó la tendencia de los rendimientos observada en arvejas en el valle central, en respuesta a aplicaciones de nitrógeno. Aumentos de rendimiento provocan incrementos proporcionales en la demanda de nitrógeno, pudiendo constituirse este elemento en una limitante del cultivo, cuando los rendimientos superan ciertos niveles. Es precisamente en estas situaciones donde se requiere de inoculantes suficientemente efectivos, que permitan suplir las necesidades de nitrógeno de leguminosas con elevados potenciales de rendimiento, cuando existen factores que restringen el aporte de este elemento desde el suelo.