

## INOCULANTES E INOCULACION

Denis Castillo B.  
Ingeniero Agrónomo  
Estación Experimental DIPEX

### GENERALIDADES

La inoculación de semillas de leguminosas tiene como objetivo la fertilización nitrogenada de estas plantas. Consiste básicamente en la aplicación de un cultivo de cepas seleccionadas y específicas de bacterias del género Rhizobium a las semillas. Este cultivo recibe el nombre común de "Inoculante de leguminosas".

Los Rhizobium poseen la habilidad de infectar las raíces y pelos radiculares, movilizarse a través de los espacios intercelulares y provocar una reacción inmunológica, cuya consecuencia es la formación de nódulos. En éstos las bacterias se multiplican y transforman, para realizar posteriormente la fijación de nitrógeno atmosférico. Estas bacterias establecen en los nódulos un mutualismo con la planta, a la que extraen hidratos de carbono y a su vez le entregan nitrógeno en forma de aminas.

Este aporte de los Rhizobium constituye la base de la llamada "Economía de nitrógeno", que consiste en la introducción de leguminosas en la rotación de cultivos, para que los Rhizobium asociados a ellas fijen nitrógeno suficiente para el desarrollo del cultivo y dejen además, un remanente importante de este elemento para que sea utilizado por un cultivo posterior (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cantidades estimadas de nitrógeno fijado por diferentes leguminosas en condiciones de campo.

Leguminosas de grano		Nitrógeno fijado kg N/ha/año.
Haba	<u>Vicia faba</u>	45 - 552
Garbanzo	<u>Cicer arietinum</u>	103
Lenteja	<u>Lens culinaris</u>	88 - 114
Arveja	<u>Pisum sativum</u>	52 - 77
Poroto	<u>Phaseolus vulgaris</u>	40 - 70
<u>Leguminosas forrajeras</u>		
Alfalfa	<u>Medicago sativa</u>	229 - 290
Trébol subterráneo	<u>Trifolium subterraneum</u>	207
Trébol ladino	<u>Trifolium repens</u> var. <u>gigantea</u>	165 - 189
Trébol blanco	<u>Trifolium repens</u>	128
Trébol rosado	<u>Trifolium pratense</u>	132
Vicia	<u>Vicia villosa</u>	110

Fuente: FAO, 1985

Antecedentes históricos establecen que la relación simbiótica legumino-  
sa/Rhizobium fue descubierta por Hellridgel en 1866 (Date, 1965) y que  
desde 1886 hay uso del sistema de inoculación (Erdman, 1968).

Estadísticas de Estados Unidos indican un uso de inoculantes en el 40%  
de las siembras de leguminosas y un aumento de rendimiento de sobre un  
15% en promedio.

Se ha determinado numerosas veces, que el beneficio de la inoculación de las leguminosas se refiere principalmente a disminución de costos, por cuanto una buena fertilización química ha entregado normalmente rendimientos superiores en grano o forraje, pero a un valor notoriamente mayor que una inoculación.

Una comparación sobre la base que una hectárea de lupino, por ejemplo, es capaz de fijar en un año 150 unidades de nitrógeno, nos entrega una equivalencia igual a 940 kilos de salitre sódico. A los valores actuales, la inoculación de una hectárea tiene un precio similar solamente a 80 kg de este fertilizante, situación que nos otorga un ahorro equivalente en dinero a 860 kilos de salitre por hectárea al año.

Aumentos de rendimiento se han comprobado, respecto a plantas sin inocular y que tampoco recibieron fertilización nitrogenada, en niveles de 10 a 30% de la producción. En Estados Unidos el promedio de incremento de rendimiento en poroto soya en un estudio hecho en 1965 por Erdman, fue de 230 kg/ha, con una variación de hasta 670 kilos sobre los testigos. En Brasil se han hecho estimaciones de aumento de rendimiento en poroto soya y maní, con rangos de 15 a 25%.

Experiencias locales en lupino, establecieron hasta un 20% de aumento de contenido proteico en verde y hasta un 30% en rendimiento en grano.

Surge siempre la inquietud que explique esta enorme diferencia entre plantas inoculadas y las no tratadas.

Sin embargo, si analizamos los valores entregados por un trabajo efectuado por Erdman en Wisconsin (USA) en 1965, quien aisló cepas de Rhizobium en 100 sembradíos de poroto soya no inoculados, el 25% de los Rhizobium nativos eran relativamente eficientes en la fijación de nitrógeno, un 50% eran de poca eficiencia y un 25% eran inefectivas y parásitas.

Las plantas deben tener la mejor probabilidad de infectarse con cepas eficientes; ésta es una de las funciones de un inoculante.

### CLASES DE INOCULANTES

Existen diversas clasificaciones de los inoculantes para leguminosas. Una de ellas se refiere a la presentación física de ellos, y según ésta tendríamos:

- a. Cultivos líquidos
- b. Formulaciones liofilizadas
- c. Caldos concentrados (calugas)
- d. Granulados - en turba
  - en yeso poroso
  - en poliacrilamida (PER)
  - en alginatos (AER)
  - en xantinos (XER)
- e. Inoculantes en turba.

Los **inoculantes líquidos** son cultivos bacteriológicos que se comercializan en los frascos originales de multiplicación. Se caracterizan por su alta concentración de Rhizobium por mililitro y poseen, como consecuencia de su formulación, una vida más limitada que la mayoría de los otros tipos. Deben utilizarse muy prontamente luego de su elaboración, y su conservación es frágil. Se prestan para aplicaciones al suelo con equipos asperjadores. También se adaptan para ser utilizados en mezcla con algunos fertilizantes apropiados e inocuos para estas bacterias, como pueden ser directamente empleados junto a la semilla o peletizados junto a ella.

Los **cultivos liofilizados** de Rhizobium son aquellos en que los gérmenes son deshidratados a bajas temperaturas y se envasan en ampollas de vidrio. Tienen la ventaja de su larga duración, pero por el contrario poseen una elevada mortalidad de gérmenes. Estos cultivos se hidratan y pueden ser utilizados con las semillas. Constituye una forma de transporte de cultivos puros, a la vez que un método de conservación de cepas. Su utilización comercial no es común.

Los **caldos concentrados**, son una forma modificada de los inoculantes líquidos, en que se elimina una gran parte del agua del cultivo hasta lograr formar bloques sólidos. Se utilizan en tratamientos a la semilla y son de corta vida útil.

Los **inoculantes granulados**, en sus diferentes medios inertes, se prestan a aplicaciones al suelo o para mezclas con fertilizantes apropiados. Su vida es prolongada en términos generales, variando según cada material constituyente. Presentan un costo más alto que otros inoculantes, y por su volumen, muchas veces son incómodos de manejar en condiciones favorables para quienes los comercializan.

Se producen en turba, yeso poroso, en poliacrilamida (PER), alginatos (AER) o en xantínatos (XER).

Los **inoculantes en turba**, son los más conocidos y difundidos, prácticos por su apropiada vida útil y fácil conservación y manejo. Sus bondades se deben entre otras cosas a que son un medio de cultivo muy favorable para el desarrollo de los Rhizobium, como además en excelente medio de conservación para estas bacterias (Figura 1).

Otra forma de clasificar a los inoculantes se refiere a su forma de aplicación, así tenemos inoculantes aplicados a la semilla, al suelo o a los fertilizantes.

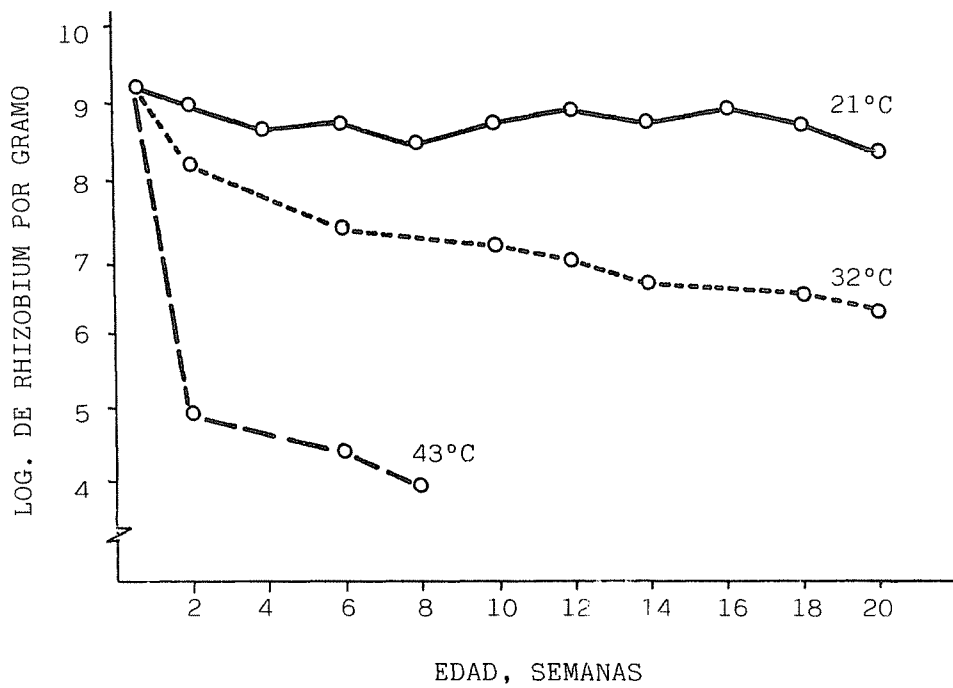


Figura 1. Supervivencia de *Rhizobium japonicum* en turba a diferentes temperaturas. (FAO, 1985 a).

#### PROPIEDADES PARA UN BUEN INOCULANTE

- a. Debe contener en primer término una o varias cepas de alta eficiencia, tanto en la fijación de nitrógeno como en la infección de raíces y pelos radicales.
- b. Tiene además que disponer de un elevado número de Rhizobium por gramo, que aseguren una alta cantidad de bacterias viables por semilla; por lo menos de 10.000 a un millón por cada una de ellas según corresponda.
- c. Debe contener Rhizobium específicos para cada especie de leguminosa.
- d. Tiene que estar libre de otras bacterias, hongos u otros contaminantes que puedan ser perjudiciales al Rhizobium o a la planta.
- e. Debe poseer una base apropiada que proteja al Rhizobium, tanto en su envase de comercialización como sobre la semilla.
- f. El envase de venta tiene que ser capaz de conservar en condiciones convenientes al Rhizobium hasta que sea usado por el agricultor. Los paquetes deben permitir un buen intercambio de gases, retener la humedad y en general, favorecer las condiciones de conservación y manipuleo.
- g. Las cajas o envases debe proveer claramente las instrucciones de uso e indicar su especificidad y fecha de fabricación y/o vencimiento.
- h. Deben contener un buen adherente, que en lo posible incluya elementos nutritivos esenciales para las bacterias.
- i. El nombre y dirección del fabricante deben estar impresos.

## **ESTANDARES DE CALIDAD**

Los Rhizobium se expresan en términos de unidades formadoras de colonias por gramo de inoculante. También pueden expresarse en número de gérmenes capaces de formar colonias por semilla. Esta última forma, siendo la más apropiada, es poco práctica para los controles de calidad de los fabricantes.

En términos generales, se considera que los inoculantes deben poseer un mínimo de  $1 \times 10^9$  Rhizobium viables por gramo en fábrica, y  $1 \times 10^8$  por gramo hasta el término de su vida útil.

Algunos países utilizan otros estándares, y es así como en Francia se exige 1.000 gérmenes viables por semilla pequeña como los tréboles, 10.000 gérmenes por semilla mediana y 100.000 para semilla grande. Si se considera una conservación a 20°C, se puede esperar para los inoculantes en turba, una vida útil de seis meses. Para ello los fabricantes deben producir los inoculantes con a lo menos  $1 \times 10^8$  gérmenes por gramo.

## **ALMACENAMIENTO Y VIGENCIA**

Cada tipo de inoculante posee sus condiciones de conservación. Por ejemplo, los inoculantes líquidos deben refrigerarse para mantener su corta vida útil; temperaturas de ambiente favorecen su senectud, ya que las bacterias mantienen su metabolismo y multiplicación. Los inoculantes en turba, por el contrario, pueden conservarse aproximadamente seis meses a temperaturas de 20°C. Para mayor duración debe recurrirse a temperaturas de 4°C; sobre 30°C baja su viabilidad y a 40°C la sobrevivencia es casi nula.

#### EFECTO DE UN BUEN INOCULANTE

- a. Aumento de rendimiento, ya sea en materia verde o en grano
- b. Incremento proteico
- c. Elevación de la fertilidad del suelo ya sea por enriquecimiento de nitrógeno como por incremento de humus y por proporcionar mejores condiciones físicas, químicas y biológicas al suelo.
- d. Ahorro de dinero frente a una fertilización química nitrogenada.

#### FACTORES QUE INFLUYEN EN EL RESULTADO DE UNA INOCULACION

- a. Buena semilla
- b. Uso de desinfectantes apropiados
- c. Adecuada cama de semilla
- d. Humedad del suelo al establecimiento del cultivo
- e. Cepas apropiadas de Rhizobium
- f. Inoculación bien hecha
- g. Tipo de fertilizante utilizado
- h. Acción bactericida o bacteriostática de los insecticidas empleados.

Elementos necesarios para el desarrollo del bacterio son calcio, molibdeno, semineutralidad o ligera acidéz del suelo y temperaturas de 15-25°C.

Como factores adversos se consideran acidez alta, temperaturas bajas, sequía, niveles freáticos altos, mal drenaje, cepas ineficientes, inoculación cruzada.

## LOS RHIZOBIUM Y LAS PLANTAS

La penetración de los Rhizobium en las plantas se efectúa directamente por la corteza como también por los pelos radicales.

Las etapas en el establecimiento de esta asociación Rhizobium/leguminosa son en términos generales:

- a. Contacto célula infectiva de Rhizobium/planta
- b. Multiplicación/colonización superficie radicular
- c. Penetración/multiplicación
- d. Infección de otras células radiculares
- e. Inducción y formación del nódulo
- f. Fijación del nitrógeno

Sin embargo, este fenómeno puede no ser completo, y así producirse, por ejemplo, la invasión de un Rhizobium y no efectuarse la nodulación, como también formarse la nodulación sin fijación de nitrógeno; de ahí la conveniencia del uso de inoculantes con cepas de alta eficiencia, tanto en su agresividad frente a la planta como en la eficiente fijación de nitrógeno atmosférico.

Los nódulos varían ampliamente en cuanto a su tamaño, forma, color y ubicación, como asimismo varían en su eficiencia en la fijación simbiótica. La forma y ubicación de los nódulos es determinada principalmente por la planta huésped. El tamaño, color y distribución de los nódulos refleja la eficiencia de la asociación Rhizobium-planta. Nódulos blandos y rosados son generalmente eficientes y por el contrario aquellos duros y blancos son de tipo parasitario. Normalmente los nódulos de mayor calidad se encuentran en la raíz principal de la leguminosa, luego le siguen en eficiencia los de las raíces laterales. Los nódulos ubicados en raicillas generalmente están colonizados por cepas nativas, a excepción de los cultivos establecidos en suelo con pie de arado u otro factor limitante en el desarrollo de la raíz de la leguminosa.

El tiempo requerido para la formación de la nodulación en una planta varía según cada leguminosa y según el tamaño de la semilla. En condiciones de campo favorables los nódulos son visibles entre 20 y 30 días de emergida la planta. La observación de la eficiencia de la nodulación se debe hacer algún tiempo después y ésta dependerá de diversos factores, entre los cuales debe considerarse las condiciones climáticas, humedad del suelo, nivel de nitrógeno asimilable, etc.

La efectividad de la asociación Rhizobium-leguminosa puede ser observada durante el inicio de floración de las plantas. Los nódulos efectivos son grandes y tienen internamente un color rosado intenso, producto de la leghemoglobina, sustancia que controla el oxígeno necesario para activar la nitrogenasa que es la enzima fijadora de nitrógeno. Esta leghemoglobina ocasionalmente puede tomar colores oscuros en algunas plantas en que se combina con melamina. Igualmente su fuerte color rojo se torna paulatinamente verde, a medida que los nódulos envejecen. Los nódulos inefectivos son internamente blancos o verde pálido, no cambiando de color con la edad.

Cuando las leguminosas se siembran en suelos ricos en nitrógeno, o se fertilizan con este elemento, los nódulos producidos por cepas efectivas permanecen pequeños y muestran las mismas características que los producidos por los Rhizobium infectivos. También debe tenerse presente, que los nódulos deficientes en molibdeno son internamente verdes y de apariencia senescente.

## FACTORES QUE AFECTAN LA FIJACION DE NITROGENO

### Factores genéticos

Tanto el aspecto genético de la planta como de la cepa de Rhizobium son importantes. Por ejemplo, una planta no inoculada tiende a aumentar las raíces laterales, en desmedro de la principal. La planta determina el volumen del tejido activo del nódulo, la cepa del Rhizobium determina la virulencia o agresividad de infección y además la eficiencia en la fijación de nitrógeno. Esto realza la importancia de un buen inoculante elaborado con cepas de alta efectividad.

### Acidez del suelo

Es importante desde el punto de vista de la planta, ya que se sabe el pH que normalmente es el mejor para cada especie de leguminosa, y al mismo tiempo se conoce que los Rhizobium se comportan también de diferentes maneras frente al nivel del pH del suelo. Así tenemos que:

Rhizobium phaseoli se desarrolla hasta pH 3.5

Rhizobium meliloti requiere un mínimo de pH 5.5

Rhizobium trifolii se comporta bien entre pH 3.5 y 5.5, soportando hasta pH 8.9.

Una forma efectiva de superar la acidéz, por ejemplo en el establecimiento de alfalfa en la zona sur, ha sido la peletización de la semilla con carbonato de calcio. En este sentido, se ha comprobado un efecto similar entre el peletizado y una enmienda de 8 toneladas de cal por hectárea.

### Factores nutritivos

En una planta cuyos requerimientos nutricionales están satisfechos hay buena nodulación, y como consecuencia se produce una mejor fijación de nitrógeno. Por otro lado, una cepa de Rhizobium debe tener completas sus necesidades de molibdeno y calcio, además de algunos elementos menores y factores de crecimiento. Por esto toman muchas veces importancia los aditivos que puedan ser agregados a los adherentes de los inoculantes.

### Nivel de nitrógeno del suelo

La nodulación y el volumen de su tejido son inversos a la cantidad de nitrógeno del suelo. Los nitratos inhiben en mayor grado la fijación de nitrógeno que las sales amoniacales.

### Relación carbono/nitrógeno

Mientras más amplia sea la relación carbono/nitrógeno mejor es la fijación de este último elemento. Es decir a mayor cantidad de carbono, por ejemplo restos de cultivos, mejor es la actividad de las cepas eficientes de Rhizobium.

### Factores físicos

Principalmente influyen en el desarrollo de la nodulación y fijación la temperatura y la humedad. La temperatura adecuada para la formación de los nódulos es de a lo menos 10 a 15°C y para la fijación simbiótica el óptimo es de 25 a 30°C. La humedad debe ser la suficiente para una buena colonización de las raíces por los Rhizobium y posteriormente tiene que ser aquella conveniente para el normal desarrollo de la planta. Condiciones extremas, sequías, por ejemplo, pueden no solamente

afectar al desarrollo de la planta, sino también impedir la infección de las raíces; igualmente, excesos son perjudiciales a ambos simbioses.

### **Factores biológicos**

En este aspecto se considera tanto la competencia de la cepa seleccionada con cepas nativas, como la actividad antagónica de organismos productores de antibióticos como los Actinomycetes, etc.

Finalmente cabe destacar la importancia de la selección de cepas regionales. En la mayoría de los trabajos realizados por el autor en la selección de cepas, las regionales eficientes han sido superiores a las extranjeras, haciendo solamente excepción las cepas para alfalfa, ya que en la zona sur no se ha determinado aún cepas de alta efectividad.

#### BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- DATE, R. 1956. Inoculación de leguminosas. Primer curso latinoamericano de biología del suelo. UNESCO-Universidad de Chile, Santiago.
- ERDMAN, L. 1968. Inocule sus leguminosas. Agricultura de las Américas 17 (6): 45-48.
- FAO, 1985. Inoculantes para leguminosas y su uso. Roma, Italia.
- FAO, 1985 a. Manual técnico de la fijación simbiótica de nitrógeno leguminosa/Rhizobium, Roma, Italia.
- LABANDERA, C. y ORIVE, R. 1980. Producción experimental de inoculantes para soya con turba esterilizada con radiaciones gamma. An. INIA (España) Serv. Prod. Veg. 12: 287-291.
- RUIZ, T.; SANTA MARIA, J.; LABANDERA, C. y ORIVE, R. 1979. Crecimiento y sobrevivencia de Rhizobium japonicum (CB-1809) y R. trifolii (WU-196) en turbas españolas de diferentes orígenes. An. INIA (España) Serv. Prod. Veg. 11: 127-137.
- SOMASEGARAN, P. 1985. Inoculant production with diluted liquid cultures of Rhizobium spp. and autoclave peat: Evaluation of diluents, Rhizobium spp., peats, sterility requirements, storage, and plant effectiveness. Applied and Environmental Microbiology 50 (2): 398-405.
- SOMASEGARAN, P. y HOBEN, H. J. 1985. Methods in legume-Rhizobium technology. NIFTAL Project and MIRCEN. University of Hawaii, U.S.A.
- VINCENT, J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook N° 15 Blackwell Scientific Publications, Oxford.