

EVALUACION DE LA CALIDAD DE TRES INOCULANTES COMERCIALES PARA LUPINO

"QUALITY CONTROL OF THREE COMMERCIAL INOCULANTS FOR LUPINS"

LETICIA BARRIENTOS D., ENRIQUE PEÑALOZA H. y EDITH MENDEZ A.
INIA, Centro Regional de Investigación Carillanca. Casilla 58-D, Temuco

RESUMEN

Con el objetivo de analizar la calidad y determinar la capacidad infectiva de los inoculantes comerciales disponibles para lupino en la IX Región, se realizaron recuentos del número de rizobios vivos en placas, y pruebas de infección de plantas según el método del Número Mas Probable. El estudio se realizó en laboratorios y cámaras de crecimiento del CRI Carillanca, sobre tres inoculantes (Probiol, Dipex y Nitrofix) disponibles para lupino las temporadas 1992/93, 1993/94 y 1994/95. Las muestras se adquirieron y analizaron inmediatamente antes de ser utilizados para las siembras correspondientes a cada temporada agrícola. Consistentemente en los tres períodos de evaluación, uno de los inoculantes presentó los mayores recuentos de rizobios vivos e infectivos; otro presentó un alto número de contaminantes y bajo recuento de rizobios vivos e infectivos, en tanto que un tercero mostró un comportamiento intermedio. Sólo el que presentó alto recuento de rizobios vivos e infectivos tuvo recuentos similares a los que se exigen en países que controlan la calidad de sus inoculantes. Los resultados sugieren la necesidad de establecer un sistema de control de la calidad de los inoculantes producidos y comercializados en el país.

INTRODUCCION

Los inoculantes para leguminosas corresponden a un cultivo artificial de bacterias (*Rhizobium* o *Bradyrhizobium*) suspendidas en un material inerte que les permite mantenerse activas, infectar las raíces de sus hospederos, inducir la formación de nódulos e iniciar el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno. Para que cumplan su función, los inoculantes deben garantizar un número mínimo de rizobios vivos al momento de ser utilizados, lo que requiere de evaluaciones periódicas de sobrevivencia durante su preparación, así como en la distribución y comercialización.

La inoculación es una práctica recomendada en la producción de lupinos, desconociéndose la calidad biológica de los productos comercializados para este propósito en el país. Con el objetivo de analizar la calidad y determinar la capacidad infectiva de los inoculantes comerciales disponibles para lupino en la IX Región, se realizaron recuentos en placa del número de rizobios vivos y pruebas de infección de plantas, según el método del Número Más Probable.

MATERIALES Y METODOS

Durante las temporadas 1992/93, 1993/94 y 1994/95 se evaluaron tres inoculantes correspondientes a las marcas comerciales Probical, Dipex y Nitrofox, identificados aleatoriamente como inoculantes A, B y C. Los estudios se realizaron en laboratorios y cámaras bioclimáticas del Centro Regional de Investigación Carillanca. A cada uno de los inoculantes comerciales se le evaluó su calidad mediante diluciones seriadas utilizando recuentos en placa y cantidad de microorganismos infectivos mediante el empleo de la técnica del Número Más Probable (NMP).

Para evaluar calidad, se agregaron 10 g del contenido de cada bolsa de inoculante, en matraces con 90 ml de agua peptonada al 0,1%, se agitaron vigorosamente por cinco minutos, y se hicieron diluciones seriadas desde 10^{-4} a 10^{-8} . Luego se sembró en triplicado, en placas de Agar Rojo Congo Manitol, 0,1 ml de las diluciones de cada uno de los inoculantes. Las placas se incubaron en estufa de cultivo a 25° C durante cinco días. Los recuentos de las colonias de *Bradyrhizobium spp.* se realizaron en aquellas placas que presentaron desarrollo entre 30 a 300 colonias típicas (rosado claro, mucosas).

Para el recuento del NMP, se inocularon plántulas de lupino con 1 ml de cada dilución, en Jarras de Leonard, con arena y solución nutritiva sin nitrógeno, estériles. Las jarras se incubaron en cámara bioclimática, con 16 hrs luz, 18° C y 70% humedad relativa. Cinco semanas después de la inoculación se hizo la observación final, registrando la presencia (+) o ausencia (-) de nódulos. El NMP se calculó utilizando las tablas de Fisher y Yates.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de los recuentos de rizobios vivos en los inoculantes, ya sea mediante el recuento en placas o con la técnica del Número Más Probable (NMP), se presentan en los Cuadros 1 y 2, respectivamente. Consistentemente en los tres periodos de evaluación, uno de los inoculantes presentó los mayores recuentos de rizobios vivos e infectivos, otro presentó un alto número de contaminantes y bajo recuento de rizobios vivos e infectivos, en tanto que un tercero mostró un comportamiento intermedio (Cuadros 1 y 2).

En estos recuentos, realizados con tres repeticiones (sólo se presenta el promedio), es posible apreciar las diferencias entre los inoculantes, en términos de su calidad. La generalidad de los inoculantes comercializados en el país son preparados en base a turba no estéril, por lo que es fácil que la flora bacteriana acompañante, generalmente *Actinomyces*, inhiba el desarrollo, la infección y consecuentemente la formación de nódulos en las leguminosas.

En la temporada 1992/93 se aprecia claramente una disminución del número de rizobios vivos en el recuento realizado durante el mes de agosto, con respecto al mes de mayo, no obstante haberse mantenido refrigerados los inoculantes analizados. Olsen *et al.* (1994), reportan al menos seis potenciales efectos negativos relacionados con la presencia de microorganismos contaminantes en los inoculantes: (1) patogenicidad para humanos o animales, (2) patogenicidad para plantas, (3) antagonismo hacia el rizobio; (4) inhibición del proceso de nodulación, (5) disminución de la vida media de los inoculantes y (6) mayor dificultad en los procesos de control de calidad. Roughley y Vincent (1967) y Date y Roughley (1977), señalan mejor sobrevivencia de *Rhizobium* en turba estéril que en turba no estéril. Un inoculante americano de reconocido prestigio, confeccionado con turba no estéril, tuvo disminución de los recuentos más rápido que uno confeccionado con soporte estéril (Day, 1991). También se han reportado faltas de respuesta a la inoculación en las siembras con inoculantes en base a soporte no estéril y respuestas satisfactorias a los inoculantes con productos en turba estéril (Day, 1991). Vincent (1975), sugiere que

algunos bajos recuentos en la determinación del NMP pueden deberse a inhibición de la nodulación por los contaminantes.

Cuadro 1 Recuento en placas de nódulos viables en inoculantes comerciales

Inoculante	1992/93		1993/94	1994/95
	Mayo	Agosto		
A	$3,6 \times 10^8$	$8,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^5$
B	$2,8 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
C	$1,0 \times 10^7$	$1,4 \times 10^5$	$4,0 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$

Cuadro 2 Recuento de nódulos infectivos en inoculantes comerciales, según el método del Número Más Probable

Inoculante	1992/93	1993/94	1994/95
A	0,0	0,0	$3,1 \times 10^3$
B	$8,5 \times 10^1$	$1,7 \times 10^2$	$3,1 \times 10^3$
C	$>3,5 \times 10^8$	$3,1 \times 10^1$	$>7,0 \times 10^3$

Varios países (por ej. Australia, Brasil, Francia, Ruanda) han establecido políticas que controlan los niveles de contaminantes en los inoculantes, y algunas compañías imponen estándares privados para controlar el nivel de contaminación (por ej. Agricultural Genetics Co., Inglaterra) (Olsen *et al.*, 1994). El riesgo que los contaminantes de los inoculantes pueden incluir patógenos humanos, animales o vegetales, particularmente en relación a intercambios comerciales entre los países, ha resultado en regulaciones francesas que señalan que no pueden haber contaminantes en los inoculantes vendidos en el país (Catroux y Amarger, 1992).

Finalmente, los resultados de esta investigación y la experiencia de otros países, sugieren la necesidad de crear conciencia, a nivel de los agricultores y autoridades gubernamentales, sobre la conveniencia de establecer un sistema de control de calidad de los inoculantes producidos y comercializados en el país.

CONCLUSIONES

- Solo uno de los tres inoculantes evaluados presentó un recuento adecuado de rizobios vivos e infectivos y bajo recuento de contaminantes, en las tres temporadas de evaluación.
- Durante la temporada 1992/93, se observó una baja en los recuentos de rizobios después de mantener el inoculante refrigerado durante tres meses.
- Sólo el inoculante que presentó alto recuento de rizobios viables e infectivos, durante la temporada 1992/93, presentó recuentos similares a los que se exigen en países que controlan la calidad de sus inoculantes.
- Es necesario insistir sobre la conveniencia de establecer un sistema de control de calidad de los inoculantes producidos y comercializados en el país.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue parcialmente financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Regional (FNDR, IX Región), Proyecto BIP 20033167.

LITERATURA CITADA

- CATROUX G and AMARGER N. 1992. Rhizobia and soil inoculants in agriculture. In: Release of genetically engineered and other micro-organisms. J.C. Fry and M.J. Day (Eds) pp. 1-13 Cambridge University Press, Cambridge
- DATE R.A. and ROUGHLEY R.J. 1977. Preparation of legume inoculants. In: Treatise of dinitrogen fixation. R.W.F. Hardy and A.H. Gibson (Eds), pp. 243-276. Wiley, Chichester
- DAY J.M. 1991. Inoculant production in the UK. In: Report of the expert consultation on legume inoculant production and quality control. J.A. Thomson (Ed), pp. 75-85. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- OLSEN P.E., RICE W.A. and COLLINS M.M. 1994. Biological contaminants in north american legume inoculants. *Soil Biology and Biochemistry* 27 (4/5) 699-701
- ROUGHLEY R.J. and VINCENT J.M. 1967. Growth and survival of *Rhizobium* spp. in peat culture. *Journal of Applied Bacteriology* 30 362-376
- VINCENT J.M. 1975. *Manual Práctico de Rizobiología*. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires