

EVALUACION DE ALGUNOS MATERIALES DE SOPORTE PARA INOCULANTES BACTERIANOS¹ /

N. MORA DE GONZALEZ*, A. DE AYUNDA*, M. GOMEZ**, R. GONZALEZ**

Summary

Survival rates of Rhizobium trifolii (CIAT 062) and R. leguminosarum (DQ 1-2) in mixtures of coal and cotton husks, rice and sesame husks, and rice and cotton husks with soil were examined. Viable cell counts were performed by the method of plant infection using peat inoculant as control. Storage temperature was held at 19°C.

Non-sterile coal from the Yerbabuena mine (Zipaquirá, Cundinamarca), like peat, was shown to be an adequate medium for growth and survival of one strain of R. trifolii and of R. leguminosarum up to 145 days showing a viable cell count of more than 10⁶ cells/g. Non-sterile cotton husks produced a significantly higher survival rate for R. trifolii than did peat, while with R. leguminosarum the survival rate was similar to that of peat, more than 10⁶ cells/g for up to 145 days.

Sterile cotton husks inhibited the growth of the R. trifolii strain. Mixtures of 10 and 20% soil with cotton husks did not show better survival results for R. trifolii than those obtained in husks alone, although rhizobial populations were more than 10⁶ cells/g for up to 100 days.

Rice husks cannot be used as a growth medium without previous sterilization. Both sterile and non-sterile sesame husks failed to support the R. trifolii strain.

Introducción

Uno de los problemas para la elaboración de inoculantes es la escasa disponibilidad de materiales aptos para ser usados como soportes para rizobios. El material más recomendado como soporte ha sido la turba.

En Colombia son pocas las turberas existentes y no todas ellas nos brindan turbas de buena calidad; por esta razón se hace necesario buscar otros materiales

que puedan servir como soportes para inoculantes, con mayor razón si se considera que Colombia es un país netamente agrícola que dispone de subproductos de abundante producción y poco uso, como las cascarillas vegetales, pulpas, etc. Los pocos trabajos realizados en Colombia, en este campo, incluyen turbas de Nariño y Antioquia con buenos resultados como soportes. Así mismo, carbones minerales procedentes de las minas de Fragua, La Merced y La Bohemia, cercanas a Cali (6). El bagazo de caña, subproducto de la industria azucarera, fue ensayado por Munévar y Graham (7) y no demostró buenos resultados como soporte.

Aunque en el país no se producen actualmente los inoculantes en escala comercial, su necesidad para cultivos de leguminosas forrajeras en regiones de muy baja fertilidad, tales como los Llanos Orientales, ha sido ya establecida por Silvester-Bradley (10).

En otras regiones de fertilidad moderada se ensayan los inoculantes como una alternativa para sustituir parcialmente la fertilización nitrogenada (1).

¹ Recibido para publicación el 24 de setiembre de 1985. Los autores agradecen al Proyecto Multinacional de Química de la Organización de Estados Americanos del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, por la ayuda financiera.

* Profesor Titular y Profesor Asistente, respectivamente Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia Bogotá - Colombia.

** Tesistas de pregrado de Química Departamento de Química Universidad Nacional de Colombia Bogotá - Colombia.

En este trabajo se evaluó la sobrevivencia de dos cepas de rizobio en inoculantes con base de turba, que se tomará como patrón de comparación con carbón mineral y tres cascarillas vegetales de arroz, de algodón y de ajonjolí. También se evaluaron mezclas de cascarillas de arroz y de algodón con suelo.

Materiales y métodos

La turba empleada como patrón en este trabajo fue suministrada por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) como soporte ya condicionado para los inoculantes que allí se preparan en escala de laboratorio. Proviene de la Estación del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) en La Selva (Rionegro, Antioquia). Otros materiales utilizados y sus características se presentan en el Cuadro 1.

Carbón mineral. Proveniente de la mina Yerbabuena, manto 2, ubicada en Zipaquirá, km 16 vía a Pacho, vereda Páramo Guerrero (Cundinamarca).

El porcentaje de retención de agua fue inferior a los observados en los otros materiales. Su pH de 6.2 es ventajoso sobre el de otros soportes y sólo requirió de 0.5% de carbonato de calcio para llevarlo a 6.8. El porcentaje de carbono orgánico con un valor de 87.32 es el más alto encontrado entre todos los materiales ensayados y muy similar al de turbas (3). El porcentaje de nitrógeno es óptimo y similar al presentado por las turbas (3). Las cenizas son más bajas que las presentadas por las turbas y los resultados de las determinaciones hechas en ellas revelan que no hay concentraciones de elementos en valores que representen toxicidad para el rizobio. Todas las características demostradas hacen de este un material apto para ser usado como portador.

Cascarilla de ajonjolí. Este material presenta problemas en su molienda debido al residuo graso que hace que se empaste en el molino y dificulte la incorporación del cultivo líquido. Además, presenta una acidez que no es fácil de adecuar, pues adiciones de 15% de carbonato de calcio, sólo lograron subirlo a 5.8.

Cascarilla de algodón. Este material es muy duro y viene mezclado con restos de fibra de algodón lo que dificulta la molienda pero se retira fácilmente por tamizado, luego de haberla pasado por el molino. El pH, la retención de agua, el porcentaje de carbono orgánico y la composición de las cenizas son valores concordantes con los exigidos para los soportes (4, 5, 7, 8). Sin embargo, 0.81% de nitrógeno es un valor más bajo de los señalados para turbas, aunque no fue factor limitante para la supervivencia del rizobio.

Cascarilla de arroz. Su molienda y tamizado son fáciles; el pH ácido puede elevarse fácilmente por la adición de 10% de carbonato de calcio. El porcentaje de carbono orgánico junto con el porcentaje de Nitrógeno fueron los valores más bajos encontrados entre los materiales ensayados, pero no fueron limitantes de la supervivencia de los rizobios.

El carbón mineral se ensayó sin previa esterilización; las cascarillas de arroz y ajonjolí se esterilizaron en autoclave a 121°C durante dos horas por tres veces, con intervalos de 24 horas. En el caso de la cascarilla de algodón se ensayaron dos lotes: uno esterilizado como se mencionó y otro sin esterilizar.

La cascarilla de algodón se ensayó también mezclada con 10 y 20% de suelo. Se preparó, además, un ino-

Cuadro 1. Características químicas y físicas de los materiales ensayados como soportes para inoculantes bacterianos.

Material de soporte	Retención		Humedad	Nitrógeno	Carbono orgánico	Ceniza cruda	Na	K	Fe	Al	Ca
	H ₂ O	pH									
	%		%	%	%	%	%	%	%	%	%
Carbón mineral (Malla 200)	73.40	6.20	2.50	1.10	87.30	5.90	0.03	0.02	0.04	0.05	0.05
Cascarilla de ajonjolí (Malla 100)	229.20	5.00	14.16	1.80	70.40	15.80	0.05	0.06	N.D.	N.D.	0.04
Cascarilla de algodón (Malla 60)	215.80	6.30	15.80	0.80	62.80	5.50	0.04	0.11	N.D.	N.D.	0.01
Cascarilla de arroz (Malla 100)	184.60	5.80	8.50	0.60	31.50	18.60	—	0.80	N.D.	N.D.	0.70
Turba (Malla 100)	117.80	7.30	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Promedio de 2 repeticiones
N.D.: No demostrable

culante esteril a base de cascarilla de arroz y 20% de suelo.

El suelo utilizado para la elaboración de estas mezclas pertenece a la serie Gachancipá y se clasificó como *Typic Hapludalf* (1) con las siguientes características:

Textura (Bouyoucos) Franco; pH (pasta naturada) 5.9; Carbono orgánico (Walkley y Black) 4.90%; Materia orgánica 8.5%; Nitrógeno total (Kjeldahl) 0.5%; Relación C/N 10.4; Capacidad catiónica de cambio (Peech) (meg/100 g) 23.6. Este suelo presentó un buen recuento rizobial (10^7 rizobios/g) (1).

Se trabajó con dos cepas; una de *Rhizobium trifolii* (CIAT 062) y otra de *Rhizobium leguminosarum* (DQ 1-2) previamente seleccionadas como efectivas. Ambas fueron propagadas en medio de cultivo líquido BYMA, en un agitador de vaivén a 100 oscilaciones por minuto y mantenidas a 28°C durante el tiempo necesario para obtener una población de 10^8 – 10^9 células viables por mm.

Elaboración del inoculante En todos los casos fue necesario adicionar carbonato de calcio para ajustar el pH a valores cercanos a la neutralidad (6, 6, –7.0) a excepción de la turba que ya viene acondicionada.

Una vez adecuado el pH de los soportes y teniendo listo el cultivo rizobial, éste se mezcló con cada uno en una proporción de 0.5 ml/g para obtener así una humedad final del 50%.

La turba, las cascarillas de arroz y algodón, las mezclas de cascarilla de algodón con 10 y 20% de suelo y la cascarilla de arroz con 20% de suelo, no presentaron dificultad en la impregnación con el caldo rizobial. El carbón mineral, por el contrario, mostró dificultad en humedecerse y se debió agitar continuamente por un período largo de tiempo hasta lograr la homogenización del inoculante. La cascarilla de ajonjolí, debido a su contenido graso, fue también difícil de impregnar y formó grumos difíciles de romper.

Preparado el inoculante, los recipientes fueron cubiertos con una membrana de PVA para evitar pérdida excesiva de humedad y contaminación, pero permitiendo buena aireación (9). Los recipientes fueron luego incubados a 28°C por un tiempo de 72 horas, para lograr la propagación de la población bacteriana en el soporte.

Durante la incubación (maduración) se observó desarrollo de hongos sobre la superficie de los inoculantes con cascarilla de arroz y ajonjolí sin esterilizar, por lo que se desecharon. Los materiales esterilizados

sí fueron adecuados para el ensayo. La cascarilla de ajonjolí esterilizada no permitió el crecimiento rizobial.

Al final del período de maduración se realizó el primer conteo de población rizobial en cada inoculante ($t = 0$).

Empaque. Después del período de maduración, los inoculantes se empacaron en dos bolsas, cada una con 20 g. Las bolsas utilizadas son de polietileno de 0.046 mm de espesor.

Los inoculantes hechos a base de soportes estériles se conservaron en Erlenmeyers, con tapones de algodón. Todos los inoculantes se almacenaron a temperatura ambiente de 19°C.

Control de sobrevivencia. Se ensayó la sobrevivencia de la cepa de *R. trifolii* (tubo cerrado con agar) en carbón mineral, cascarilla de algodón sin esterilización, cascarilla de ajonjolí y de arroz esterilizadas, mezcla de cascarilla de algodón con 10% y 20% de suelo y cascarilla de arroz esterilizada con 20% de suelo. Se ensayó también la sobrevivencia de *R. leguminosarum* (jarras de Leonard), en carbón mineral y en cascarilla de algodón. La sobrevivencia de las dos cepas se estimó por el método de infección en plantas (2) y fue comparada con la encontrada en la turba suministrada por el CIAT que se usó como testigo.

Resultados y discusión

Inoculantes con *R. trifolii* con base en turba, carbón mineral y cascarilla de algodón como soporte. Sobre la sobrevivencia de *R. trifolii* (Cuadro 2), en los soportes sin mezclas, se observó que los tres permitieron una población rizobial por encima de los límites exigidos en otros países (3, 5, 9) para inoculantes comerciales, aún hasta los 145 días. Sin embargo, la turba presentó a 0 días poblaciones significativamente más bajas ($\alpha = 0.05$) que la cascarilla de algodón y en el carbón mineral. A 60 días hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.01$) entre la población hallada en la cascarilla de algodón que fue superior a la hallada en la turba y no hubo diferencia significativa entre la población encontrada en la turba y en el carbón mineral. Entre la población rizobial de la cascarilla de algodón y el carbón mineral no se encontraron diferencias significativas. A 20, 86, 100 y 145 días no hubo diferencias significativas entre las poblaciones rizobial encontradas en los inoculantes con base en turba, cascarilla de algodón y carbón mineral.

En conclusión, para las dos cepas ensayadas, el carbón mineral es tan buen soporte como la turba;

la cascarilla de algodón es mejor que la turba, como se puede observar en las determinaciones a 0 y 60 días

El ensayo de adherencia de los inoculantes a la semilla de trebol blanco mostró que el carbón mineral se adhiere mejor a éstas que la turba y la cascarilla de algodón, siendo esta última la de menor adherencia, lo que puede deberse a su mayor tamaño de partícula (malla 60).

Inoculantes con *R. trifolii* con base en cascarilla de algodón con 10 y 20% de suelo. En las mezclas de cascarilla de algodón con 10 y 20% de suelo (Cuadro 3), se observa que no hubo diferencias significativas debidas a los soportes, aunque en el inoculante con 10% de suelo la población rizobial descendió significativamente hasta los 54 días. Luego se mantuvo sin variación significativa hasta los 100 días. En el soporte con 20% de suelo, la población rizobial disminuyó significativamente ($\alpha = 0.05$) hasta los 54 días y luego se mantuvo sin variación significativa hasta los 100 días. En conclusión, la adición de suelo a la cascarilla de algodón no produjo una mayor sobrevivencia

en estos inoculantes y no obstante que la población disminuyó a partir de los 0 días, siempre fue superior al requerimiento mínimo (10^6 células viables/g de inoculante).

La mezcla de cascarilla de algodón más suelo facilita la adherencia del inoculante a la semilla, en forma similar en ambas preparaciones.

Inoculantes con base en cascarilla de arroz esteril como soporte. En el Cuadro 4 se observan los valores de las poblaciones rizobiales obtenidas en cascarilla de arroz sola y en mezcla con 20% de suelo; ambas preparaciones fueron esterilizadas

La cascarilla sola mantiene una población alta y constante hasta los 132 días, pero la mezcla con 20% de suelo produce un aumento notable y constante hasta los 100 días. Estos resultados califican el material como un buen portador a pesar de que requiere de esterilización, lo que necesariamente encarecería los costos de producción. Estos inoculantes también presentan una buena adherencia a la semilla que puede compararse con la de la turba.

Cuadro 2. Sobrevivencia de *Rhizobium trifolii* (Cepa CIAT 62) en turba, cascarilla de algodón y carbón mineral.

Tiempo (días)	Log. del número de Rhizobios/g de inoculante*					
	0	20	60	86	100	145
Soporte turba	7.71 a	8.71 a	6.95 a	7.95 a	7.36 a	7.36 a
Cascarilla de algodón	9.13 b	8.78 ab	9.02 b ^{xx}	7.93 ab	8.25 ab	8.25 ab
Carbón mineral	9.36 bc	9.13 ac	8.25 bc	8.03 ac	7.93 ac	7.71 ac

Límites de confianza al 95% ± 0.67

* Valor promedio de dos determinaciones.

Promedio con la misma letra no difieren significativamente ($\alpha = 0.05$).

xx Diferencia altamente significativa ($\alpha = 0.01$).

Cuadro 3. Sobrevivencia de *Rhizobium trifolii* (Cepa CIAT 62) en cascarilla de algodón más 10 y 20% de suelo.

Tiempo (Días)	Log. del número de Rizobios/g de inoculante*				
	0	201	54	80	100
Soporte					
Cascarilla de algodón más 10% de suelo	9.36 d	9.02 a	8.12 a	8.12 a	8.62 abc
Cascarilla de algodón más 20% de suelo	9.22 d	8.62 acd	8.25 a	8.48 a	8.48 ab

Límites de confianza al 95% ± 0.67 .

* Valor promedio de dos determinaciones.

Promedios con la misma letra no difieren significativamente ($\alpha = 0.05$).

Inoculantes de *R. leguminosarum* con base en turba, carbón mineral y cascarilla de algodón como soportes. Los resultados de control de sobrevivencia se presentan en el Cuadro 5. No se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones rizobiales debidas a los soportes, ni debidas al tiempo. Las poblaciones bacteriales halladas en la turba son prácticamente constantes, lo que demuestra su bondad como material de soporte.

En el inoculante a base de carbón mineral, la población descendió progresivamente, a partir del conteo a los 0 días y en el inoculante a base de cascarilla de algodón, la población rizobial se incrementó ligeramente hasta los 76 días y luego descendió hasta los 145 días aunque no significativamente

En todos los soportes la población encontrada a los 145 días fue superior a los límites exigidos en otros países para inoculantes comerciales (3, 5).

La adhesividad a la semilla de arveja de los inoculantes para la cepa de *R. leguminosarum* fue similar a la presentada en los inoculantes para la cepa CIAT-62, siendo mejor la adherencia en el carbón mineral, luego en la turba y finalmente en la cascarilla de algodón.

Resumen

Se ensayó la sobrevivencia de dos cepas de rizobio *Rhizobium trifolii* (CIAT-062) y *R. leguminosarum* (DQ 1-2) en carbón mineral y cascarillas de algodón,

Cuadro 4. Sobrevivencia de *Rhizobium trifolii* (Cepa CIAT 62) en inoculantes a base de cascarilla de arroz.

Tiempo (Días)	Log. del número de Rhizobios/g de inoculante*					
	20	42	56	80	103	132
Soporte						
Cascarilla de arroz esteril	7.23	7.23	7.49	7.77	8.02	7.42

Límites de confianza al 95% ± 0.58

* Valores promedio de las determinaciones

Tiempo (Días)	Log. del número de Rhizobios/g de inoculante*				
	0	20	54	80	100
Soporte					
Cascarilla de arroz más 20% suelo (esterilizada)	9.36	9.36	9.36	9.36	9.36

Límites de confianza al 95% ± 0.67.

* Valores promedio de las determinaciones

Cuadro 5. Sobrevivencia de *Rhizobium leguminosarum* (Cepa D Q 1-2), en turba, cascarilla de algodón y carbón mineral.

Tiempo (Días)	Log. número de Rizobios/g de inoculante*		
	0	76	145
Soporte turba	6.92 a	7.32 a	7.24 a
Cascarilla de algodón	8.25 a	8.40 a	7.44 a
Carbón mineral	7.58 a	6.78 a	6.57 a

Límites de confianza al 95% ± 0.67.

* Valores promedio de dos determinaciones

Promedios con la misma letra no difieren significativamente ($\alpha = 0.05$).

arroz y ajonjolí, además de mezclas de cascarillas de algodón y de arroz con suelo. La supervivencia de las dos cepas se estimó por el método de infección en plantas y fue comparada con un testigo preparado con turba. Los inoculantes fueron almacenados a 19°C.

El carbón mineral, proveniente de la mina Yerba Buena de Zipaquirá (Cundinamarca), demostró ser un soporte adecuado que permite la sobrevivencia de *R. trifolii* (Cepa CIAT 62) y *R. leguminosarum* (Cepa-DQ 1-2) en forma similar a la turba, hasta los 145 días y superior a 10^6 rizobios/g de inoculante. La cascarilla de algodón, sin esterilización, permitió una sobrevivencia de *R. trifolii* significativamente superior a la permitida por la turba. Con *R. leguminosarum* el comportamiento es similar al de la turba y permite la sobrevivencia de una población mayor de 10^6 rizobios/g hasta los 145 días. La cascarilla de algodón esterilizada no permitió el crecimiento de la cepa CIAT 62 de *R. trifolii*.

Las mezclas con 10 y 20% de suelo no produjeron una mayor sobrevivencia de *R. trifolii* cepa CIAT 62, que en la cascarilla sola, aunque mantuvieron poblaciones rizobiales superiores a 10^6 rizobios/g hasta los 145 días. La cascarilla de algodón esterilizada no permitió el crecimiento de la cepa CIAT 62 de *R. trifolii*.

Las mezclas con 10 y 20% de suelo no produjeron una mayor sobrevivencia de *R. trifolii* cepa CIAT 62, que en la cascarilla sola, aunque mantuvieron poblaciones rizobiales superiores a 10^6 rizobios/g hasta los 100 días. La cascarilla de arroz sólo puede ser usada como soporte previa esterilización. La cascarilla de ajonjolí con y sin esterilización no permitió la sobrevivencia de la cepa CIAT-62 de *R. trifolii*.

Las mezclas con 10 y 20% de suelo no produjeron una mayor sobrevivencia de *R. trifolii* cepa CIAT 62, que en la cascarilla sola, aunque mantuvieron poblaciones rizobiales superiores a 10^6 rizobios/g hasta los 145 días. La cascarilla de algodón esterilizada no permitió el crecimiento de la cepa CIAT 62 de *R. trifolii*.

Las mezclas con 10 y 20% de suelo no produjeron una mayor sobrevivencia de *R. trifolii* cepa CIAT 62, que en la cascarilla sola, aunque mantuvieron poblaciones rizobiales superiores a 10^6 rizobios/g hasta los 100 días. La cascarilla de arroz sólo puede ser usada como soporte previa esterilización. La cascarilla de ajonjolí con y sin esterilización no permitió la sobrevivencia de la cepa CIAT 62 de *R. trifolii*.

Literatura citada

1. BECERRA B. de, VEGA, A. 1984. Efecto de la inoculación en cultivo de trebol blanco en mezcla con rye grass en un suelo disturbado y sin disturbar de la sabana de Bogotá. Tesis de grado. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. p. 123.
2. BROCKWELL, J. 1982. Plant-infection counts of Rhizobia in soils. In Nitrogen fixation in legumes. Ed. by J.M. Vincent. Academic Press, Sidney Australia. p. 41-58.
3. BURTON, J.C. 1967. Rhizobium culture and use. In Microbial technology. Ed. by H.J. Pepler. Van Nostrand Reinhold, New York. p. 1-33.
4. BURTON, J.C. 1981. Rhizobium inoculants for developing countries. Tropical Agriculture (Trinidad). 58:291-295.
5. DATE, R.A.; ROUGHLEY, R.J. 1977. Preparation of legume seed inoculant. In A treatise on nitrogen fixation. Ed. by R.W.F. Hardy and A.H. Gibson. Section: IV Agronomy and Ecology. John Wiley, New York. p. 243-275.
6. HALLIDAY, J., GRAHAM, P.H. 1978. Coal compared to peat as a carrier of rhizobia. Turrialba 28(4):348-349.
7. MUNEVAR, F., GRAHAM, P.H. 1977. Supervivencia de *Rhizobium trifolii* en tres portadores. Revista ICA Colombia 12(3):225-230.
8. ROUGHLEY, R.J. 1981. The storage quality control and use of legume seed inoculants. In Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. CIAT, Cali, Colombia. p. 115-125.
9. ROUGHLEY, R.J.; PULSFORD, D.J. 1982. Production and control of legume inoculants. In Nitrogen fixation in legumes. Ed. by J.M. Vincent. Sidney Australia. p. 193-209.
10. SILVESTER-BRADLEY, R. 1983. Perspectivas en la investigación en fijación de nitrógeno en suelos tropicales. Suelos Ecuatoriales. 13(2):45-30.
11. VINCENT, J.M. 1975. Manual práctico de rizobiología. Buenos Aires Ed. Hemisferio Sur. p. 200.