

INIAP

Nº 3
MAYO 1994

REVISTA INFORMATIVA DEL INSTITUTO NACIONAL AUTONOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS



35

AÑOS

1959 - 1994



ECUADOR

NUEVO METODO PARA CONTROLAR LA CALIDAD DE LOS INOCULANTES

Gustavo Bernal y Consuelo Estévez.
Departamento de Fitopatología.
Estación Experimental Santa Catalina, INIAP.



La simbiosis soya -*Bradyrhizobium japonicum* (bacteria fijadora de N₂) es uno de los procesos más importantes en la agricultura. La habilidad para enumerar *B. japonicum* directamente de suelos y otros sustratos no estériles es útil para: 1) predecir la respuesta a la inoculación de soya; 2) estudiar la ecología de *B. japonicum* y 3) establecer la calidad de inoculantes de soya en portadores no estériles.

Los métodos actuales para determinar la población de rizobios incluyen la técnica cuantitativa de inmunofluorescencia, la técnica del número más probable (NMP) mediante infección de plantas y el método directo utilizando medios de cultivo con antibióticos. Mientras estas técnicas proveen estimativos del número de rizobios, a la vez son limitadas a la cuantificación de cepas específicas dentro de una especie de bacteria que está nodulando una determinada leguminosa.

Además, algunos agentes selectivos (antibióticos, colorantes o inhibidores metabólicos) han sido usados con frecuencia para recuperar ya sea *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* del suelo o de inoculantes, pero no han mostrado ser la solución. El uso de antibióticos, por ejemplo, no ha sido efectivo por cuanto cepas dentro de una misma especie pueden tener diversa resistencia a muchos diferentes antibióticos.

El INIAP es uno de los 23 colaboradores de una red internacional que se encuentra evaluando un nuevo medio de cultivo selectivo para el aislamiento y cuantifi-

cación de *Bradyrhizobium japonicum* en inoculantes y suelos.

El nuevo medio selectivo denominado BJSM (*Bradyrhizobium japonicum* selective medium) fue formulado por el Departamento de Suelos y Microbiología de la Universidad de Minnesota conjuntamente con el NifTAL (Nitrogen Fixation by Tropical Agricultural Legumes) de la Universidad de Hawaii. El BJSM es único ya que no contiene antibióticos. Sus propiedades selectivas se basan en la tolerancia de *B. japonicum* a niveles altos (mayor de 40 ug/ml) de zinc y cobalto. Las investigaciones preliminares han demostrado que el BJSM permite el crecimiento de la mayoría de cepas de *B. japonicum* de serogrupos encontrados en suelos de los Estados Unidos.

MATERIALES Y METODOS

En el INIAP se llevó a cabo un experimento de laboratorio con el objetivo de evaluar la eficiencia del medio BJSM en cajas petri, como método para controlar la calidad de los inoculantes de soya. Se utilizaron 4 tratamientos básicos: 1) Un inoculante proveniente del NifTAL a base de turba esterilizada con rayos gamma y conteniendo 1 x 10⁹ rizobios/g de turba de la cepa TAL 102 (USDA 110). Este tratamiento fue utilizado como control positivo.

2) Una mezcla de una suspensión de un suelo de Pichilingue (Quevedo) donde se cultiva soya y de la cepa TAL 102. Este tratamiento se empleó para demostrar la propiedad selectiva del BJSM de permitir el crecimiento y enumeración del TAL 102 en presencia de otros microorganismos del suelo.

3) El mismo suelo del tratamiento anterior conteniendo *B. japonicum* nativo o introducido, para probar la efectividad del BJSM en enumerar cepas nativas o introducidas presentes en el suelo.

4) El inoculante comercial Legumit para soya (elaborado en México, con fecha de expiración octubre 1994 y con una concentración de 10⁸ células/g).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el cuadro 1 se observa el número de colonias en medio de cultivo BJSM en comparación con el medio CRYMA (Levadura-manitol-agar con rojo congo) generalmente usado para aislar *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

El número de colonias presentes en la turba estéril en la dilución 10⁻⁴ en el medio BSJM fue de fácil determinación e imposible de efectuarlo con el medio CRYMA debido a la poca selectividad de este medio.

El tratamiento correspondiente al suelo proveniente de Pichilingue más la cepa TAL 102, presentó un alto número de contaminantes en el medio CRYMA, no así en el medio BJSM donde la selectividad del medio para diferenciar colonias de *Bradyrhizobium japonicum* fue excelente, demostrando la propiedad selectiva del medio BSJM al permitir el crecimiento y enumeración de la cepa TAL 102 en presencia de otros microorganismos del suelo y, posiblemente, de otras cepas de *B. japonicum*.

Los resultados obtenidos con el tratamiento 3 evidencian la efectividad del medio BSJM al observar contaminantes desarrollados en el medio CRYMA.

En el tratamiento correspondiente al inoculante procedente del mercado local se determinó contaminantes en el medio CRYMA en las tres diluciones estudiadas (cuadro 1).

El mismo cuadro muestra que el método pudo detectar claramente (sin presencia de contaminantes) que mientras el inoculante elaborado con la cepa TAL 102 formó colonias de *B. japonicum* en las tres diluciones del estudio, el inoculante comercial presentó reducido número de colonias apenas en la dilución 10^{-4} dando una población menor a 10^4 rizobios/g, cuando la cantidad mínima de rizobios requerida para obtener una nodulación adecuada es de 10^7 rizobios/g de inoculante ó 300 rizobios/semilla. De esta manera, se demostró la ineficiencia del inoculante comercial del mercado nacional que según la fecha de expiración del inoculante, este puede ser utilizado hasta el mes de octubre de 1994. Sin embargo, el control de calidad demostró que el inoculante utilizado en este experimento no se lo puede utilizar a la presente fecha.

CONCLUSIONES

Los resultados del experimento demostraron que el BSJM es potencialmente una herramienta útil para investigación y para control de calidad de los inoculantes de soya. Por otro lado, es imprescindible contar con una producción nacional de inoculantes para proveer al agricultor sojero con inoculantes de calidad. Los trabajos continuarán para determinar la inefectividad de *B. japonicum* en plantas de soya para complementar con la información obtenida en este estudio.

Cuadro 1.: Número de colonias de Rhizobia presentes en los medios de cultivo BJSJ y CRYMA.

Número de colonias de rhizobia													
TRATAMIENTO	DILUCION	10-2		10-3		10-4		10-5		10-6		CONTEO	
		BJSJ	CRYMA	BJSJ	CRYMA	BJSJ	CRYMA	BJSJ	CRYMA	BJSJ	CRYMA	BJSJ	CRYMA
1. TAL 102	PLATE 1	ND	ND	ND	ND	148	TN	9	TN	1	103	10^6	$5,1 \times 10^7$
	PLATE 2	ND	ND	ND	DN	136	TN	17	TN	0	91	1×10^5	$4,5 \times 10^7$
2. TAL 102 + soil	PLATE 1	ND	ND	ND	ND	185	C	25	TNC	7	142	$3,5 \times 10^6$	$7,1 \times 10^7$
	PLATE 2	ND	ND	ND	ND	209	C	16	TNC	4	167	2×10^6	$8,3 \times 10^7$
3. Site soil	PLATE 1	53	C	8	C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4×10^3	—
	PLATE 2	69	C	16	C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8×10^3	—
4. Local inoculant	PLATE 1	ND	ND	ND	ND	0	C	0	C	0	C	0	—
	PLATE 2	ND	ND	ND	DN	2	C	0	C	0	C	10^4	—

TN: colonias muy numerosas para efectuar el conteo.

C: los platos petri estuvieron muy contaminados para efectuar el conteo.

NC: no hubo crecimiento.

ND: no se determinó.