

## El género *Rhizobium* como inoculante para leguminosas

Yusmary Espinoza y Lesly Malpica  
CENIAP/INIA. Maracay, Venezuela  
[yespinoza@inia.gob.ve](mailto:yespinoza@inia.gob.ve)

Revisores: José Luís Gil ([jgil@inia.gob.ve](mailto:jgil@inia.gob.ve))  
Nestor Obispo ([nobispo@inia.gob.ve](mailto:nobispo@inia.gob.ve))

### Sumario:

Introducción

Criterios a utilizar para la selección de cepas de *Rhizobium* en la preparación de inoculantes

¿Cuándo se debería inocular el cultivo?

¿Cómo introducir el inoculo en el suelo?

¿Donde se pueden obtener?

Nutrición mineral de la simbiosis

Los rhizobios y la acidez de los suelos

Conclusiones

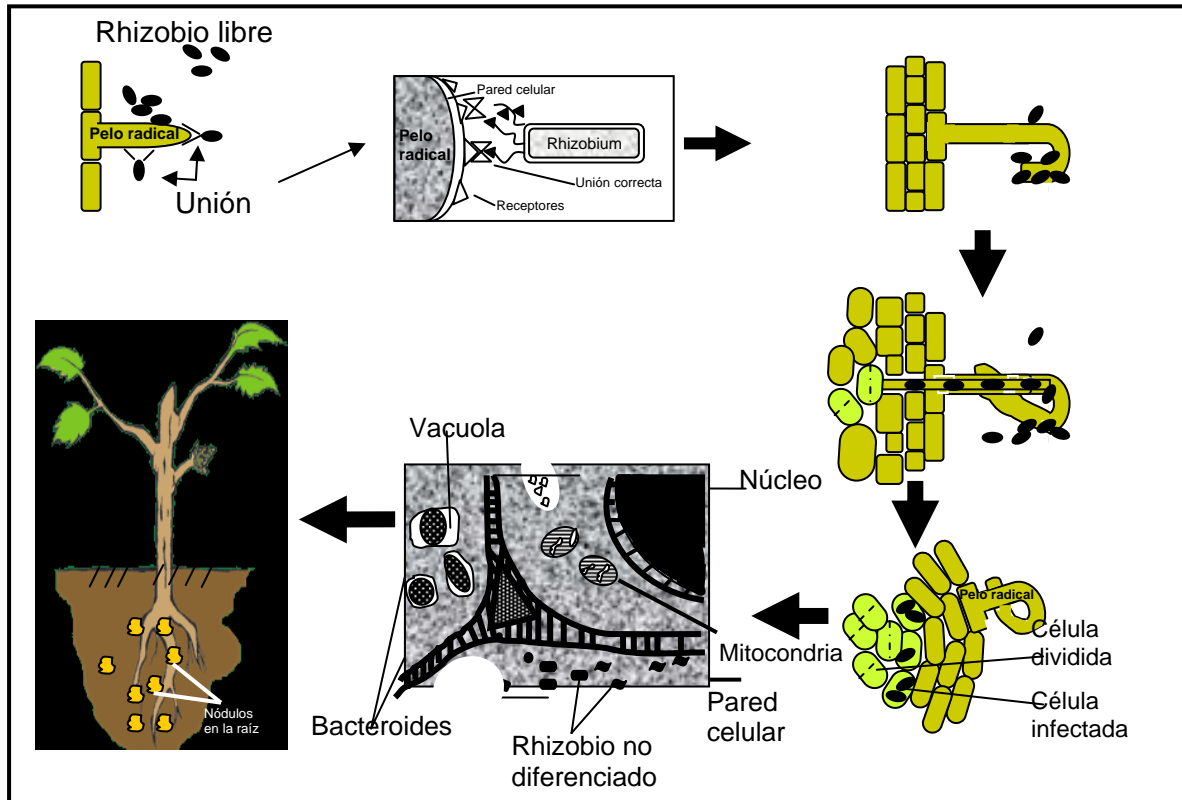
Bibliografía

### Introducción

El *Rhizobium* es un género de bacteria de suelo que infecta las raíces de las leguminosas que pueden fijar nitrógeno atmosférico. El *rhizobium* entra a la raíz de la planta y se establece entre ellos una relación simbiótica, donde la leguminosa suministra a la bacteria carbono como fuente de energía y la bacteria proporciona nitrógeno inorgánico fácilmente utilizable por la planta. Posteriormente, se establece una transferencia (de sustancias y elementos) bidireccional, de la bacteria a la planta y de la planta a la bacteria y comienza el proceso simbiótico (Figura 1).

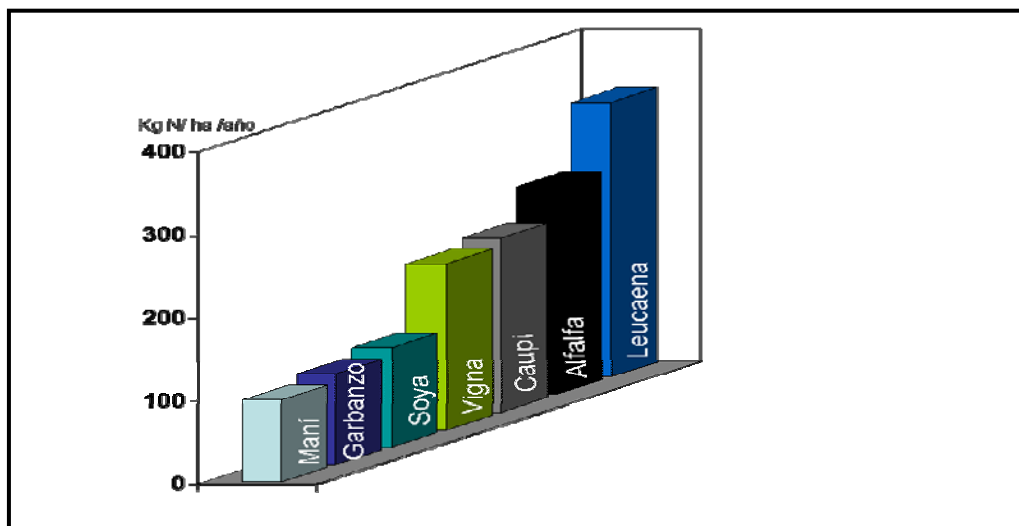
Los *Rhizobium* son bacterias selectivas con las leguminosas y se agrupan de acuerdo con la especie de leguminosa que colonizan; sin embargo, existen

especies de leguminosas que pueden ser colonizadas por cualquier rhizobio. Estas especies de leguminosa son llamadas "promiscuas". La efectividad de la fijación biológica de nitrógeno varía entre los rhizobios, es decir, existe diferencia en su capacidad de fijación biológica de N (FBN). También, existen cepas de rhizobios que no tienen capacidad de FBN, las que se califican como inefectivas.



**Figura 1.** Estados de infección de las raíces de leguminosa por *Rhizobium*.

Por otra parte, la respuesta de las leguminosas a la inoculación con *Rhizobium* no siempre es igual. La soya y la leucaena son las leguminosas que mejor responden a la inoculación, debido a que ellas pueden ser infectadas por individuos específicos para ellas, por lo tanto, mientras mas especificidad haya entre la planta y la bacteria más efectiva es la asociación simbiótica (Figura 2).



**Figura 2.** Cantidad media de nitrógeno fijado por varias leguminosas (kgN/ha/año).

### **Criterios a utilizar para la selección de cepas de *Rhizobium* en la preparación de inoculantes**

Para la selección de una determinada cepa de *Rhizobium* se deben considerar los siguientes criterios: alta especificidad con la leguminosa, buena infectividad, adecuado grado de competitividad con otras cepas, alta efectividad de infección con la leguminosa, estabilidad genética, resistencia a la acción de factores adversos (ácidos, sequedad, humedad, salinidad). Una vez escogida la cepa se crece en medio de cultivo para obtener el número de células deseable. Para el caso de inoculantes sólidos deberían contener  $1 \times 10^{12}$  unidades formadoras de rhizobio/g y para líquidos de  $10^9$  a  $10^{10}$  rhizobio/mL. Generalmente, 100 g de inoculante sólido es suficiente para tratar 454 g de semillas de leucaena.

Para el caso de soya, se requiere 286 g de inoculante para sembrar 1 ha. La calidad del inoculante puede bajar rápidamente con una inadecuada manipulación, por lo tanto, el inoculante debería ser protegido del calor, luz, desecación y ser usado tan pronto como sea posible para evitar la muerte de los *Rhizobium*.

Si el productor no cuenta con refrigeradores para almacenar los inoculantes, entonces se recomienda que introduzca el inóculo en un pote tapado y luego lo entierre en un área con sombra, esto ayudará a mantener el inoculante con alto número de rhizobio.

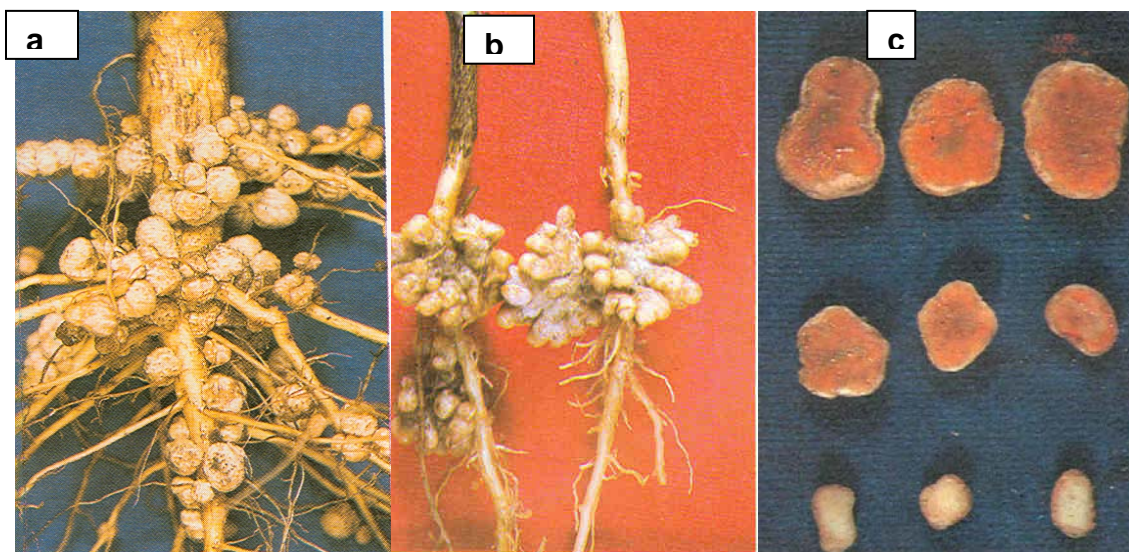
Generalmente, los materiales sólidos inertes pueden mantener la viabilidad de las bacterias por un tiempo suficientemente largo. Dentro de estos materiales la turba neutra o neutro-alcalina es la de uso más generalizado.

### ¿Cuándo se debería inocular el cultivo?

Se deben inocular los cultivos cuando no exista rhizobio en el suelo. Es fácil conocer su existencia. Los *Rhizobium* pueden ser vistos fácilmente ya que viven en nódulos sobre las raíces de las plantas (Figura 2a y b). Para conocer si estos nódulos son efectivos, es decir que las bacterias que están alojadas allí están fijando nitrógeno, se deben remover algunos nódulos cuidadosamente de las raíces, córtalos a la mitad y observar el color que presentan (Figura 2c).

Generalmente los nódulos rojos o rosados en su interior son nódulos efectivos. En el caso que los nódulos sean blanquecinos se debería inocular el cultivo, porque esto es indicativo que los rhizobios no están fijando nitrógeno atmosférico.

En el caso que se disponga de plantas de la misma especie que están saludables y contienen nódulos efectivos, se puede asumir que hay suficientes rhizobium en el suelo, entonces no es necesario introducir otro rhizobio. Sólo se debe adicionar aproximadamente 5 g de suelo infectado en cada hoyo donde se va a plantar la semilla de la leguminosa.



**Figura 3** (a, b). Nódulos de diferentes leguminosas. (c) Corte transversal de nódulos.  
Tomado de: FAO (1985).

Después que se ha cosechado la leguminosa que ha crecido sólo con N proveniente de la FBN, siempre queda en el suelo algo de inóculo que puede ser usado en la próxima siembra. La resiembra de la misma especie de leguminosa en este suelo ocasiona un incremento de los inoculantes. Crozat *et al.* (1982) han encontrado que cepas de *Bradyrhizobium japonicum* introducidas en suelos franceses sobrevivieron a altas tasas ( $10^4$  bacterias/g suelo) después de 5 años. Similarmente, Brunel *et al.* (1988) encontraron

que la misma cepa sobrevivió 8 a 13 años después de su liberación en el suelo. Sin embargo, se ha demostrado que esta práctica incrementa también la incidencia de enfermedades.

### **¿Cómo se introduce el inóculo en el suelo?**

La forma más común de introducción del inóculo al suelo es al momento de sembrar. Generalmente, las semillas de leguminosas deben ser cubiertas con el inoculante apropiado justo antes de la siembra. La proporción inóculo/semilla viene determinada por las condiciones del cultivo.

En el caso de inoculantes sólidos se recomienda utilizar alguna solución pegajosa, como goma arábiga para obligar al inoculante a adherirse a la semilla. Algunos autores recomiendan el uso de azúcar como solución pegajosa; sin embargo, se ha observado que el azúcar atrae insectos como hormigas, por lo que tiende a ser un problema en lugar de una solución. Si el inoculante es líquido se recomienda aplicar 1 mL de la suspensión bacteriana al suelo (Marcano *et al.* 2002). Como norma,  $10^3$ - $10^4$  células por semilla es una cifra adecuada; sin embargo, conviene incrementarla cuando se dan factores que puedan limitar el desarrollo bacteriano y la infección de las raíces o existe rizobio natural de baja efectividad que haya que desplazar.

El principal problema que se presenta cuando un agricultor decide utilizar inoculante en su siembra de leguminosa son los inóculos, ya que en Venezuela no existen compañías dedicadas comercialmente a la producción de inoculantes.

### **¿Dónde se pueden obtener?**

En Latinoamérica, los centros internacionales de investigación agrícola, como CIAT (Colombia), CATIE (Costa Rica) son fabricantes de inoculantes y han comercializado su venta. Es recomendable que antes de utilizar el inoculante se le realice un conteo de *Rhizobium* para conocer el estado del inoculante. En diversas unidades ejecutoras del INIA es posible obtener inoculantes, y actualmente se construye en el INIA una planta de Producción de Bioinsumos, que entrará en producción en 2008.

### **Nutrición mineral de la simbiosis**

Una leguminosa bien nodulada tiene su propio suministro de nitrógeno, pero el óptimo crecimiento y fijación de nitrógeno depende del suministro de fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, hierro, manganeso, boro, zinc, cobre, cobalto, molibdeno y cloro. Las leguminosas como familia han sido consideradas erróneamente exigentes en nutrición y altamente intolerantes a suelos ácidos, con excepción de la alfalfa, *Medicago sativa*, que requiere calcio y valores de pH de 5,5 a 6,0 después de la inoculación para que

ocurra la infección (FAO, 1985).

La deficiencia de fósforo, azufre y potasio se manifiesta principalmente en la reducción del crecimiento de la leguminosa, lo que ocasiona una reducción en la fijación de nitrógeno, aunque también puede afectar la formación de nódulos. En suelos tropicales ácidos, el fósforo parece ser de mayor importancia en la formación de los nódulos en comparación al potasio, debido al alto contenido de aluminio en estos suelos.

Con respecto a los micronutrientes, el molibdeno y hierro son importantes para la composición de la enzima nitrogenasa (enzima fijadora de nitrógeno). El hierro es un constituyente de la leghemoglobina del nódulo que protege a la nitrogenasa de la inactivación por oxígeno. El boro participa en la actividad meristemática, tanto del nódulo como de la planta huésped. El zinc, cobalto, hierro y cloro se requieren para el crecimiento del huésped, pero no para la nodulación. El cobre es necesario para el desarrollo del nódulo, su deficiencia causa nódulos pequeños, similares a nódulos inefectivos, la función específica del cobre en la simbiosis no es clara.

### **Los rhizobios y la acidez de los suelos**

La acidez de los suelos afecta tanto a la leguminosa como al rhizobio y su asociación simbiótica, aunque la leguminosa es menos sensitiva. Generalmente las leguminosas crecen bien a pH mayores de 4; sin embargo, la infección de las raíces de la planta por la bacteria simbiote son limitadas a pH mayores de 5.

Esta sensibilidad de pH es importante para las zonas agrícolas establecidas sobre suelos ácidos, ya que la sostenibilidad de la asociación simbiótica es menor, debido a la baja probabilidad de sobrevivencia del inoculo a estos pH bajos. Sin embargo, existen poblaciones indígenas de *Rhizobium trifolii* que pueden sobrevivir en suelos extremadamente ácidos refugiándose en micrositios del suelo que son menos ácidos (Richardsson y Simpson, 1988). También se han aislado cepas de rhizobio tolerantes a la acidez que luego han sido construidas genéticamente (Chen *et al.* 1991). Estas cepas están siendo utilizadas en zonas agrícolas con problemas de acidez extremo.

### **En síntesis**

- ❖ Los inoculantes de *Rhizobium* deben ser tratados dependiendo de la leguminosa que se quiere sembrar, para lograr una mayor eficiencia en la fijación biológica de N.
- ❖ Si el productor puede disponer del inoculante antes de la siembra esto le ocasionará una disminución en los costos de producción.

- ❖ Si esta sembrando por primera vez debería hacer un esfuerzo por aplicar el inoculante apropiado para esa especie de leguminosa.
- ❖ Las leguminosas que crecen sin *Rhizobium*, requerirán tanto nitrógeno como cualquier cultivo. Es importante recordar, que aún cuando la leguminosa crezca con inoculación, se debe aplicar fertilizante fosfatado, ya que este no es aportado por la FBN.
- ❖ Es importante aplicar fertilizante nitrogenado después de la germinación, ya que la fijación de nitrógeno por los rizobios toma alrededor de 20 días.

### **Bibliografía**

- Brunel, B., J. C. Cleyet-Marel, P. Normand y R. Bardin. 1988. Stability of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after introduction into soil. Appl. Environ. Microbiol., 54: 2636-2642.
- Crozat, Y., C. Cleyet-Marel, J.J. Giraud y M. Obaton. 1982. Survival rates of *Rhizobium japonicum* populations introduced into different soils. Soil Biol. Biochem., 14: 401-405.
- Chen, H., A.E. Richardson, E. E. Gatner, M. A. Djordjevic, R. J. Roughley y B.G. Rolfe. 1991. Construcción de un acid-tolerant *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* strain with enhanced capacity for nitrogen fixation. Appl. Environ. Microbiol., 38: 584-587.
- FAO, 1985. Inoculantes para leguminosas y su uso. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. p. 61.
- Marcano L., M. González, A. Leal y V. Michelena. 2001. Fijación biológica de N<sub>2</sub> por *Pachecoa venezuelensis* en dos suelos de sabana del Oriente Venezolano. Revista científica UDO Agrícola, 1(1); 64-69.
- Richardsson A.E. y R.J. Simpson. 1988. Enumeration and distribution of *Rhizobium trifolii* under subterranean clover-based pastures growing in an acid soil. Soil Biol. Biochem., 20: 431-438.

### **Otras fuentes bibliograficas**

Rhizobia bacteria. [www.ecochem.com/t\\_rhizobia.htm](http://www.ecochem.com/t_rhizobia.htm)

Criterios para la selección de razas de rhizobium en la preparación de inoculantes. [mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmaceuticas/lachicam01/parte05/02-8.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/lachicam01/parte05/02-8.html) - 7k