

ARTICULO DE REVISIÓN

TÉCNICAS DE AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN, SELECCIÓN DE CEPAS DE *Rhizobium*, *Azospirillum* Y PRODUCCION DE INOCULANTES

Cayo García-Blasquez Morote, Marilú Sato Palomino

Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Ayacucho-Perú
Universidad Federal de Rio Grande del Sur-Porto Alegre Brasil-UFRGS
E-mail: Cayogbm@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones en las últimas décadas consiguieron grandes avances que contribuyeron en el mejor conocimiento y aprovechamiento de los procesos biológicos, que permiten incrementar la producción agrícola sustentable, ejemplos de suceso es la utilización de los inoculantes de leguminosas y gramíneas en gran escala, uso de micorrizas en árboles forestales, frutícola, etc. ,la utilización de la capacidad de los microorganismos de modificar y destruir los pesticidas agrícolas, uso de asociaciones de plantas y microorganismos del suelo para recuperar áreas degradadas.

Con el avance de las técnicas de biología molecular, permitió el uso de técnicas genéticas en el estudio de la composición y propiedades de las comunidades de microorganismos del suelo, con esto fue posible estudiar aspectos con más profundidad sobre la relación de la leguminosas y sus simbiontes fijadores de nitrógeno, interacción entre patógenos del suelo y sus hospederos ; manipulación genética de acuerdo a los intereses del hombre, como simbiontes de plantas, agentes de control biológico de plagas y enfermedades o como acondicionadores del suelo para el cultivo agrícola.

El presente trabajo desarrolla las principales técnicas y métodos utilizados en los trabajos de investigación y producción de inoculantes así como: aislamiento y caracterización de dos principales bacterias diazotroficas aerobias: aislamiento de *Rhizobium* a partir de nódulos y suelo, y *Azospirillum* a partir del suelo , raíces, hojas y tallos de la planta hospedera; también se desarrolla la selección de la efectividad de las cepas de *Rhizobium* y *Azospirillum*, métodos para su conservación de cepas de fijadores de nitrógeno con leguminosas (*Rhizobium*) y bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Azospirillum*), su caracterización micro y macroscópica, identificación y conservación y finalmente la producción de inoculantes y los métodos de inoculación y las recomendaciones para su correcto uso en la producción agrícola.

Esperamos que este trabajo sirva como estímulo para estudiantes, técnicos, profesionales e investigadores que trabajan en el área de Fijación Biológica de Nitrógeno y bacterias Promotoras del crecimiento vegetal (FBN y PGPR), que será un aporte importante para el desarrollo de una agricultura sustentable para el futuro.

La Fijación biológica de nitrógeno atmosférico es la principal fuente en el ciclo de este elemento siendo más del 70% por la fijación de microorganismos, es el elemento que las plantas necesitan en mayores cantidades, es el nutriente

esencial para la vida de todos los seres vivos, base de aminoácidos que forman las proteínas. La única forma de reducir los efectos indeseables del uso fertilizantes químicos nitrogenados es :incrementar el uso eficiente de la FBN(*Rhizobium*) y de las bacterias Promotoras del crecimiento vegetal PGPR (*Azospirillum*), valorar la fijación de nitrógeno como una tecnología sustentable que permita la producción de alimentos y mantener la salud del medio ambiente ,adopción de programas de producción de leguminosas y gramíneas con el uso de inoculantes microbianos es una de las prácticas agrícolas más eficientes para la sustentabilidad de la agricultura y conservación del medio ambiente.

inoculantes y la otra razón es para hacer estudios ecológicos o de investigación, para establecer el destino de una bacteria colocada en el suelo o a las semillas mediante la inoculación.

El modo más eficiente de obtener una cepa de *Rhizobium* / *Azospirillum*, es aislarlo, en el caso de *Rhizobium* a partir de los nódulos extraídos de la raíz de la leguminosa en estudio o de muestras de suelo donde crece la leguminosa; para el caso de *Azospirillum* aislarla a partir de muestras de suelos y/o de las raíces del hospedero, que se colectan en el campo donde

crece la planta. Para el aislamiento de los *Rhizobium*, se debe escoger una planta vigorosa, fuerte, sana, hojas con coloración verde normal o verde oscuro intenso; una vez escogido la planta, se hace un círculo de aproximadamente de 15cm. alrededor de la planta, donde se cava en ese perímetro hasta una profundidad de 20 cm. o más, se extrae cuidadosamente la planta con raíces y nódulos. Para el caso del aislamiento de *Azospirillum* se extrae plantas con raíces completas.



Figura 2. Nódulos (*Rhizobium*) en raíces de leguminosas y raíces de gramíneas para aislar azospirillum

2. Aislamiento de cepas de rizobios a partir de nódulos de leguminosas y muestras de suelos

El material de nódulos y raíces son acondicionadas en el laboratorio, donde se retira toda la tierra adherida a las raíces, se lavan con agua corriente (limpia), se separan las raíces de los tallos (buena nodulación, grandes nódulos, de preferencia localizados en la raíz principal, con coloración roja intensa, que indica que los nódulos están activos, fijando nitrógeno y corresponden a cepas eficientes). Si el aislamiento no va a ser realizado inmediatamente, es posible conservar los nódulos en tubos con pellets de cloruro de calcio como desecante y conservados a baja temperatura. En el caso de raíces de gramíneas pueden conservarse a baja temperatura al igual

que los nódulos. Cuando el aislamiento es realizado inmediatamente después de la colección, los nódulos lavados con agua, son secados con papel absorbente. Estos nódulos y raíces según su origen, edad, etc., contienen en su superficie microorganismos contaminantes, por lo que hay que limpiarlos y esterilizarlos superficialmente para eliminar los microorganismos, para después proceder al aislamiento de las cepas.

Para el aislamiento utilizar nódulos sanos, recién separados de las raíces o conservados a baja temperatura, si se usan nódulos viejos o desecados, hay que tener precauciones para recuperar *Rhizobios* de entre los contaminantes como los hongos que pueden suprimirse selectivamente mediante el uso de actidione (Cicloheximida) en el medio de cultivo.



Figura 3. Colecta de nódulos de frejol canario, Ocobamba - Apurímac 2019.

Los nódulos separados de las raíces, lavados y secados con papel absorbente estéril, son colocados en tubos conteniendo etanol al 95% por 5 a 10 segundos, luego se transfieren a tubos con solución desinfectante (agua sanitaria 2% o bicloruro de mercurio al 0,1% HgCl₂ u otro desinfectante), donde son dejados entre 1 a 5 minutos para después ser transferidos a recipientes con agua destilada estéril, este es el primer lavado, que debe ser repetido 5 veces más. Últimamente se está utilizando el hipoclorito de sodio en lugar del bicloruro, que es muy tóxica, sin embargo, la experiencia muestra que el bicloruro es más eficiente para desinfectar los nódulos. Después del lavado y desinfección, utilizar un nódulo seleccionado que se transfiere a un tubo de ensayo conteniendo solución salina estéril al 0,85% (o medio de cultivo líquido), donde se macera el nódulo usando una varilla de vidrio esterilizada, el líquido espeso producto de la maceración del nódulo, se siembra con la ayuda de una pipeta de Pasteur o una asa de kolle a una placa Petri conteniendo el medio de cultivo específico (Levadura-manitol-agar - LMA), donde es estriada (riscado), los nódulos medianos y

grandes pueden manejarse con la ayuda de pinzas para disección o aplastar el nódulo en el medio y estriarlos. Las placas son incubadas entre 25°C a 30°C durante 4 a 8 días, el tiempo de incubación dependerá de la especie de *Rhizobium* que está siendo aislado, en el caso de la cepa de *Bradyrhizobium* (soya, tarwi, maní, etc.) el periodo de incubación es de 8 días, pues es una bacteria de crecimiento lento; En caso de *Rhizobium* bacteria de crecimiento rápido (frejol, arveja, haba, lenteja, alfalfa, tréboles, etc.) su periodo de crecimiento es de 4 días. Al final de la incubación y si el trabajo ha sido bien realizado, es posible obtener y observar crecimiento de colonias típicas a lo largo de las estrías como las mostradas en la figura N° 2 y 3 que se presenta. Después, de cada colonia aislada es sembrada nuevamente por el método de agotamiento en otras placas conteniendo medio LMA. En seguida se escogen colonias típicas, aisladas y puras que se siembran en tubos de ensayo o placas con medio para conservarlas hasta el momento de su uso, las pruebas de identificación y selección.

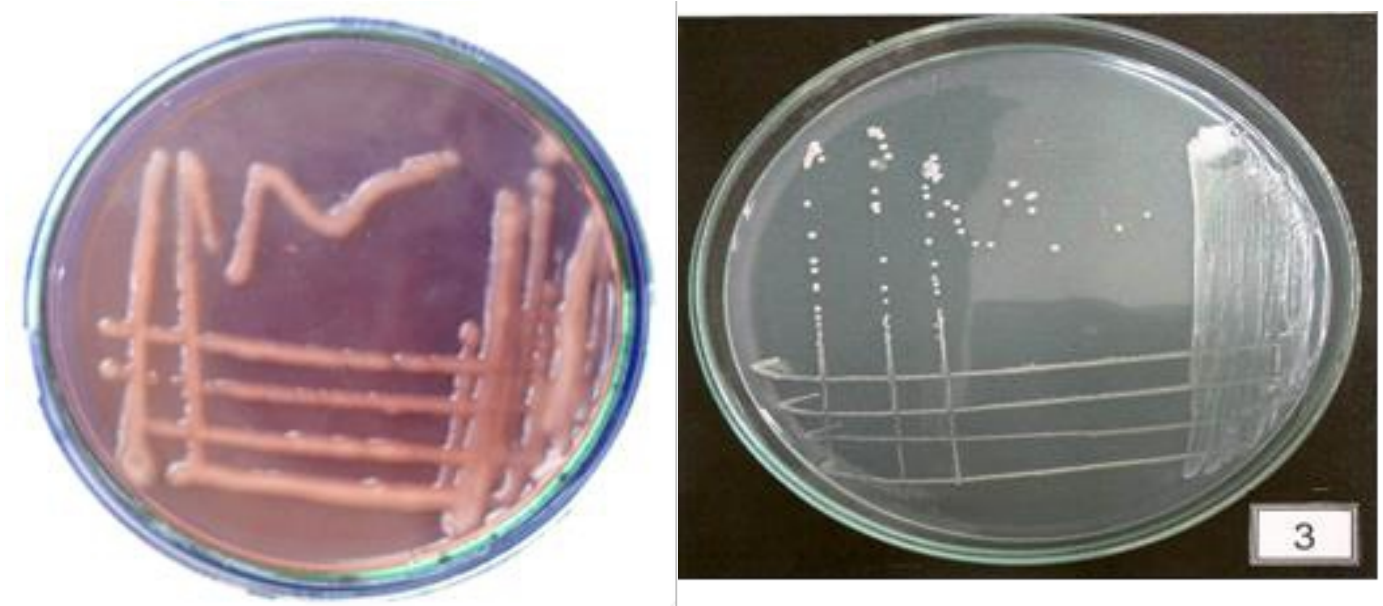


Figura 4. Colonias de *Bradyrhizobium* y *Rhizobium Leguminosarum* biovar *phasioli*.

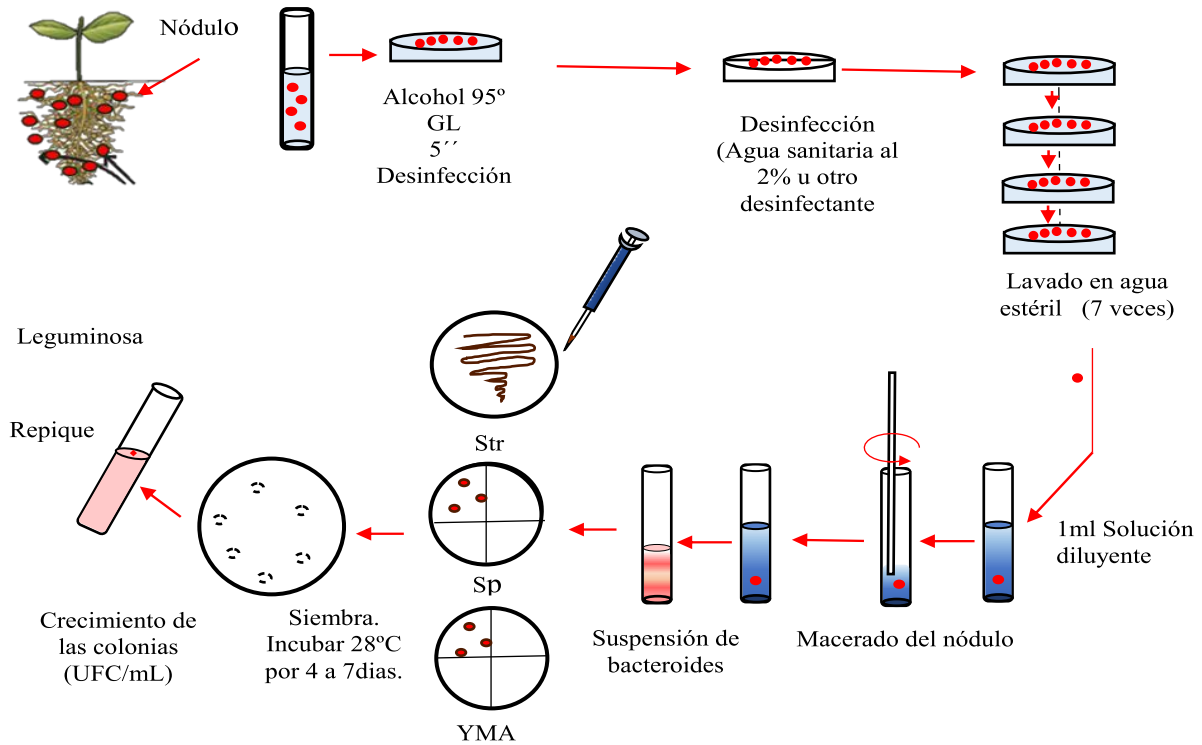
2.1. Procedimiento de aislamiento de *Rhizobium/Bradyrhizobium* a partir de nódulos de las leguminosas

- Usar nódulos seleccionados o al azar, según el propósito del trabajo y lavarlos nódulos enérgicamente con agua para eliminar la tierra y contaminantes.
- Sumergir los nódulos en etanol 95% por algunos segundos (5 – 10 segundos)
- Luego sumergir los nódulos en una solución al 0.1% de bicloruro de mercurio acidificada, durante 1 a 3 minutos, según el tamaño de los nódulos, podemos usar H₂O₂ al 3-5% (en este caso no hacer lavado) y/o agua sanitaria al 2%.
- Lavar los nódulos desinfectados por lo menos 6 veces, en agua destilada- estéril.
- Aplastar el nódulo con una pinza estéril sobre la superficie

del medio de cultivo, (Levadura-manitol-agar (LMA) conteniendo 0,002% de actidione); se puede cortar el nódulo asépticamente y extender el jugo nodular sobre el medio.

- Incubar las placas a 25-30°C, durante 4 a 8 días, seleccionar las colonias aisladas a lo largo de las estrías de la siembra, colonias típicas de *Rhizobium* (gomosas, acuosas, translúcidas, enteras, blanquecinas o ligeramente rosadas de acuerdo a la especie).
- Repicar de una colonia típica aislada directamente para el medio LMA, medio inclinado en tubos y/o placas, de ser necesario repetir la siembra por estrías para obtener colonias aisladas.
- Colocar un rótulo y registrar el aislamiento, relacionando número de cultivo, (origen, lugar, hospedero, fecha, nombre técnico del cultivo, etc.).

Esquema 1: Aislamiento de rhizobium a partir de nódulos



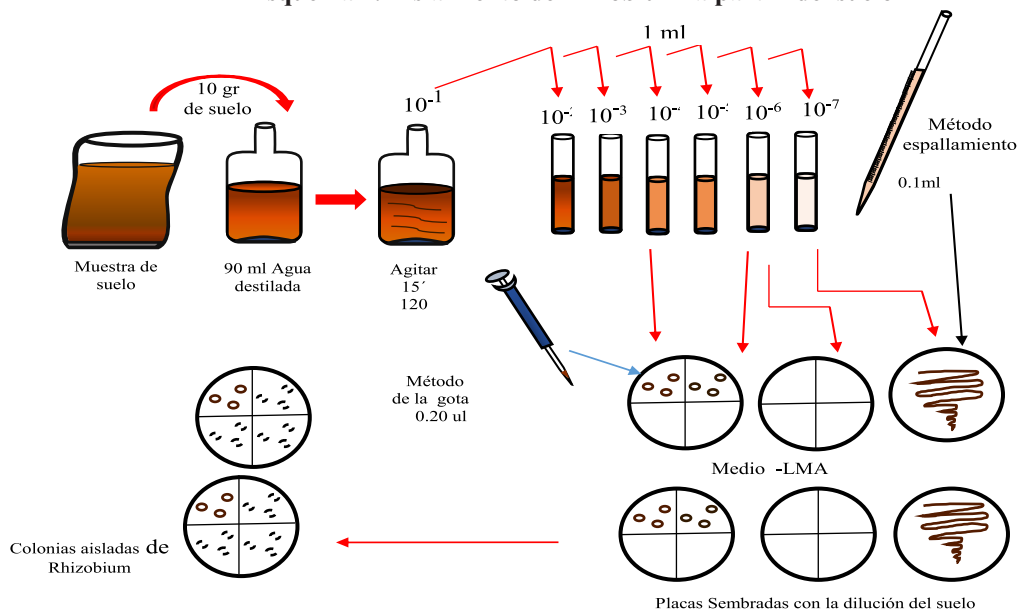
2.2. Procedimiento de aislamiento de cepas de Rhizobium/Bradyrhizobium a partir del suelo

Método por el cual se puede aislar cepas de Rhizobium de suelos donde crece la leguminosa en estudio, son utilizados en casos excepcionales, donde es necesario usar el suelo para aislar la cepa. Para esto el método práctico es sembrar en este suelo semillas esterilizadas superficialmente de la leguminosa que se quiere aislar la cepa (de ser necesario corregir el pH y fertilizar el suelo); cuando las plantas de leguminosas sembradas se encuentran en inicio de floración, se evaluarán la presencia de nódulos que nos indicarán que en el suelo existen bacterias de Rhizobios específico para la leguminosa; de estos nódulos hacer el aislamiento de los Rhizobium (método indicado anteriormente), es un método

indirecto de aislamiento.

Otra variante de este método es tomar una muestra del suelo en estudio y realizar las diluciones seriadas e inocular alícuotas de la dilución realizadas en plántulas o semillas desinfectadas de la leguminosa en estudio, creciendo en un medio con soporte estéril, (vasos con arena estéril, vermiculita, etc. y solución nutritiva), evaluar la nodulación y obtener nódulos para el aislamiento del Rhizobium. Otra forma de aislar cepas de Rhizobios a partir del suelo es hacer las diluciones del suelo e inocular semillas o plantas que están creciendo en un medio estéril y después del crecimiento e inicio de floración, observar la presencia de nódulos en las raíces y aislarlas de igual forma que el método anterior.

Esquema 2. Aislamiento de rhizobium a partir del suelo



3. Purificación de las Cepas de *Rhizobium*/ *Bradyrhizobium*

La purificación de las cepas aisladas (conservadas) son repicadas en medios LMA específicos para *Rhizobium* y/o *Bradyrhizobium* contenido en tubos y/o placas; a partir de cepas jóvenes se hacen suspensiones bacterianas en 1 mL en agua destilada, de estas suspensiones se siembran por agotamiento o esparcimiento para conseguir colonias aisladas y se incuban a 28°C por 48 horas; a las colonias típicas se les hace la coloración Gram, para verificar si son bacilos Gram (-), que es característica del género, una vez verificada se les transfiere a los tubos con medio LMA Inclinado, constatado nuevamente sus características de crecimiento y reacción a la coloración Gram.

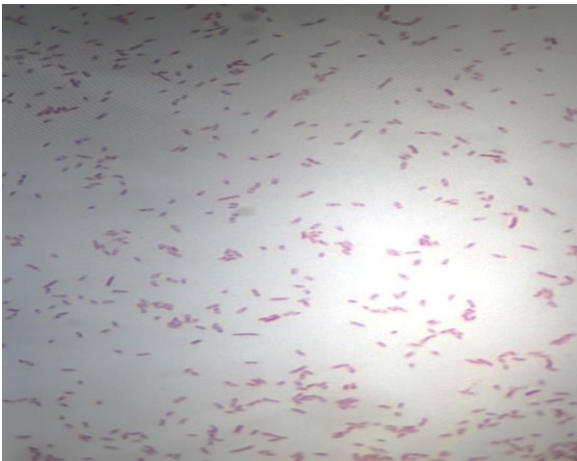


Figura 5. Observación microscópica bacilos Gram (-) de cepas de *Rhizobium*.

3.1. Procedimiento Para La Purificación De Las Cepas Aisladas De *Rhizobium*/ *Bradyrhizobium*

- Tomar una azada de la cepa a purificar y homogenizar en 1 mL de solución salina 0.85% u otra solución diluyente (agua destilada, solución sales minerales, etc.)
- Se toma una azada de dicha suspensión y se siembra en placas con medio LMA (Sólido), por el método de agotamiento e incuban a 28°C por 48 horas.
- Proceder al estudio de los diferentes tipos de colonias desarrolladas, realizando el Gram de todas ellas, se puede mejorar el trabajo, seleccionando las colonias que interesa por las características de la especie de *Rhizobios* (Colonias incoloras, blanquecinas, transparentes y fluidas), al microscopio se observará bacilos Gram (-) y de 1 a 3 micras de tamaño.
- Una vez definida la colonia característica, se toma una pequeña porción y se replica para tubos con aza de kolle, incuban el medio sembrado de 3 a 5 días hasta que aparezca colonias.
- Nuevamente hacer la coloración Gram, para verificar el resultado anterior, si es *Rhizobios* guardar definitivamente en el cerapio.
- Probar las cepas purificadas en condiciones de Solárium e invernadero frente a plantas leguminosas hospederas susceptibles a la nodulación, para probar la efectividad; comprobando la formación de nódulo como prueba definitiva de que la cepa aislada y purificada es el *Rhizobium* y/o *Bradyrhizobium*.

4. Identificación de las Cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*

Lo primero que hay que hacer para la identificación de *Rhizobium* / *Bradyrhizobium*, será confirmar si la cepa aislada es realmente un bacilo gran negativo, se deberá hacer la coloración de Gram, técnica que continua siendo la mejor y más útil para la identificación de las bacterias.

El primer paso es la tinción de Gram, se realizara un frotis de la suspensión bacteriana, secada al calor, añadiendo el colorante Cristal de Violeta por un minuto, se lavará suavemente con agua corriente y luego se añadirá el lugol para fijar, después de decolorar con alcohol, se volverá a lavar con agua. El paso final será añadir la safranina, dejando actuar por un minuto, secando la lámina para después observar en el microscopio. A pesar de ser una técnica muy sencilla es muy importante seguir los pasos, siendo lo más crítico la preparación del frotis y la decoloración. Los *Rhizobium* son bacilos Gram negativos (-) y se observará de forma redonda, casi cocos de color rojiza.

Otra prueba para distinguir *Rhizobios* de otras bacterias como *Agrobacterium* es la prueba de la ketolactasa, porque solamente los *Rhizobium* y el *Agrobacterium* serán capaces de formar “deformaciones” en las raíces de las leguminosas, en el caso de *Agrobacterium* formará “tumores” que pueden ser confundidos con nódulos. La prueba consiste en sembrar las bacterias en placas con medio de cultivo (Levaduractasa-Agar-LLA) esto será incubada a 28°C por 24 horas, al final del periodo de incubación, las placas se cubrirán con reactivo Benedict a temperatura ambiente durante 10 minutos; la presencia de 3-ketolactasa formará un anillo amarillo alrededor de las colonias bacterianas, que confirma que se trata de *Agrobacterium*.

Las dos pruebas ayudan para la autenticación de *Rhizobium*, sin embargo el único criterio definitivo para autenticar los *Rhizobium* es su habilidad de formar nódulos en la leguminosa hospedera (Infectividad).

La prueba de infectividad será realizada mediante la inoculación de las semillas de la planta homóloga (hospedera), creciendo en medio estéril, para ello se prepara una suspensión del aislado que se quiere autenticar y esa suspensión se inoculará a las plantas.

El sistema de crecimiento que se va usar para la infectividad va depender del tamaño de las plantas utilizadas para las pruebas de identificación, esta prueba puede ser hecha en tubos de ensayo, semillas pequeñas, bolsas de polietileno con solución nutritiva (Solárium), cuando se trabaja con plantas de semillas grandes las pruebas de infectividad serán realizadas en macetas o jarras de Leonard, jarras especiales, bolsas de polietileno de alta densidad o puede utilizarse baldes de plástico limpios y desinfectados, el sustrato estéril está constituida de (Arena, carbón, montmorillonita, vermiculita, etc.) en condiciones de invernadero, donde se siembra las semillas y se inocula con la suspensión del aislado que se quiere autenticar. Después de la inoculación de las semillas, será necesario evaluar el crecimiento de las plantas, principalmente la presencia o ausencia de nódulos, si hay formación de nódulos se confirma que es un *Rhizobium*, esta prueba también ya nos da una idea de la eficiencia del aislado, siempre debe colocarse un testigo no inoculado como control y descartar cualquier contaminación con *Rhizobium* de otras fuentes.



Figura 6. Formación de nódulos de *Rhizobium* en tubos con leguminosas en condiciones de solárium y en macetas con área y solución nutritiva en invernadero.

Técnicas de caracterización de los *Rhizobium* y/o *Bradyrhizobium*

Actualmente existen muchas técnicas para caracterizar los *Rhizobium*, que van desde las características morfológicas, microscópicas, fisiológicas y bioquímicas hasta el análisis del ADN. Aquí vamos a centrarnos en aquellos que son útiles para la Producción de inoculantes.

Una de las características muy importantes en el trabajo de Laboratorio con *Rhizobium* es la forma como las colonias crecen en el medio de cultivo, debido a que el tamaño, forma y aspecto de las colonias suelen ser bastante constante para cada género y especie bacteriana, el crecimiento colonial se usa como característica diferencial, para ello se debe considerar los siguientes aspectos: tamaño, forma, elevación y bordes de las colonias, otras características que debe ser observada son: superficie, consistencia, transparencia y coloración de las colonias.

Otra característica importante, es la producción de alcalinidad o acidez del *Rhizobium*, para determinar esta característica, los *Rhizobium* son sembrados en medio LMA con indicador azul de bromotimol.

Las cepas de *Rhizobium* de soya y frejol presentan diferentes tasas de crecimiento, es así que las cepas de frejol, después de 2 días de incubación ya presentan colonias visibles, mientras, mientras que las cepas de soja recién después de 7 días presentan colonias observables.

Las placas con *Rhizobium* están completamente crecidas a los 3 a 5 días (llenas), mientras que las de *Bradyrhizobium*, recién a los 10 días están con buen crecimiento colonial.

Las diferencias en la tasa de crecimiento se dan no solo a

nivel de género sino hay diferencias dentro de la misma especie e incluso entre cepas de la misma especie.

4.1. Caracterización microscópica de los *Rhizobium* y/o *Bradyrhizobium*

Los *Rhizobium* vistos al microscopio son bacilos Gram negativos, tamaños variables de 0.5 -0.9 micras x 1.2 -3.0 micras, inicialmente a las 24 horas de crecimiento son bacilos largos y delgados, después de 48 horas son medianos a cortos y a las 72 horas son de forma casi cocoide, cortos y redondos.

4.1.1. Caracterización macroscópica de los *Rhizoium* y/o *Bradyrhizobium*

Los *Rhizobium* forman colonias redondas, convexas y de tamaño variable, desde 1 mm. en estirpes de crecimiento lento (*Bradyrhizobium*) y de 4 – 5 mm. Cepas de crecimiento rápido (*Rhizobium*). La coloración de las colonias varía de blanco claro, lechoso, gomosos, translucidos, textura grumosa, velocidad de crecimiento de 3 a 5 días para crecimiento rápido y de 5 a 10 días (crecimiento lento), en medio LMA con indicador rojo Congo, las colonias se presentan ligeramente rosadas, en medio con azul de bromotimol las estirpes de crecimiento rápido cambian el color del medio, de verde claro para amarillo (ácido productor) y las cepas de crecimiento lento, cambian el color del medio para azul (álcali productor) alcalinizan el medio, pH mayor de 7.0.

En medio de cultivo Glucosa-peptona - Agar más indicador purpura de bromocresol, los *Rhizobium* de crecimiento rápido tienen poco crecimiento y no hay cambios en el pH del medio y los *Bradyrhizobium* de crecimiento lento no presentan crecimiento en este medio, si se observa abundante crecimiento, posiblemente se trate de un contaminante.

5. Aislamiento de Cepas de *Azospirillum* a partir de Raíces de Plantas Hospederas (gramíneas y otras) y/o Muestras de Suelo

5.1. Distribución ecológica y características de las cepas de *Azospirillum*

Las cepas de *Azospirillum*, se encuentran en abundancia en las regiones tropicales asociadas principalmente a gramíneas (maíz, trigo, arroz, sorgo, etc.), concentraciones de 10^6 células/gr de raíz y/o suelo, valores similares fueron encontradas en plantas de clima templado, frías y desérticas pues esta bacteria *Azospirillum*, muestra una amplia distribución geográfica, donde el pH del suelo juega un papel importante en la presencia de las especies de *A. brasilense* y *A. lipoferum*, encontrándose en mayor abundancia en suelos con valores de pH cercanos a la neutralidad y no lográndose aislar en suelos con pH menor a 4.5; el porcentaje de arcilla, contenido materia orgánica, la capacidad de retención de agua y el contenido de nitrógeno afectan positivamente la sobrevivencia del *Azospirillum*; el tamaño de partículas de arena, la alta concentración de carbonato de calcio afectan negativamente la sobrevivencia de esta especie en ausencia de plantas. (Dobereiner, et al, 1995, Caballero-Mellado, et al. 2000).

Las bacterias de *Azospirillum*, han sido aisladas de la superficie de la raíz de una amplia variedad de plantas y de su rizosfera incluyendo cereales como maíz, trigo, arroz, sorgo, avena, pastos forrajeros (*Cynodon dactylon*, *Poa pratense*, *Festuca arundinacea*), especies de *Pennisetum spp.*, *Panicum spp.*, henequén (Cabuya), *Agave fourcroydes*, plantas cactáceas *Opuntia ficus indica* (tuna), *Stenocereus spp.* (Pitahaya) y otros. (Caballero-Mellado, et al, 2000).

Los *Azospirillum*, difieren en su capacidad de utilizar diferentes compuestos como fuente de Carbono y Nitrógeno, estas bacterias usan para su crecimiento unos pocos monosacáridos y disacáridos, así como alcoholes polihidroxilados y diversos ácidos orgánicos como ácido málico, succínico y algunos aminoácidos, el uso de diferentes fuentes de carbono, tanto *A. brasilense* y *A. lipoferum* tienen todas las enzimas de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y la vía Emtner-Doudorof, así como todas las enzimas del Ciclo los Ácidos Tricarboxílicos.

La bacteria de *Azospirillum* tiene la capacidad de crecer autotróficamente con H_2 y CO_2 , proceso en el que participa la Ribulosa-1-5 difosfato carboxilasa. Algunas cepas de *Azospirillum* tienen la capacidad de producir bacteriocinas, ventaja competitiva, producir sideroforos (Agente quelante del hierro) durante la colonización de la rizosfera y superficie de la raíz.

El envejecimiento celular en presencia de metales pesados provocan que las células de *Azospirillum* cambien de morfología, para formas "C" son quistes, agregados de células formando grumos de gran tamaño, residuos de arabinosa presentes en el exopolisacarido y polisacárido capsular, el PHB (*Polihidroxibutirato* reserva de carbono y energía), que mejora la sobrevivencia, confiere mayor resistencia a la falta de humedad, a la luz ultravioleta y al choque osmótico.

Para el aislamiento de las cepas de *Azospirillum* se utiliza básicamente la misma metodología que es usada para el *Rhizobium/Bradyrhizobium*, con algunas modificaciones.

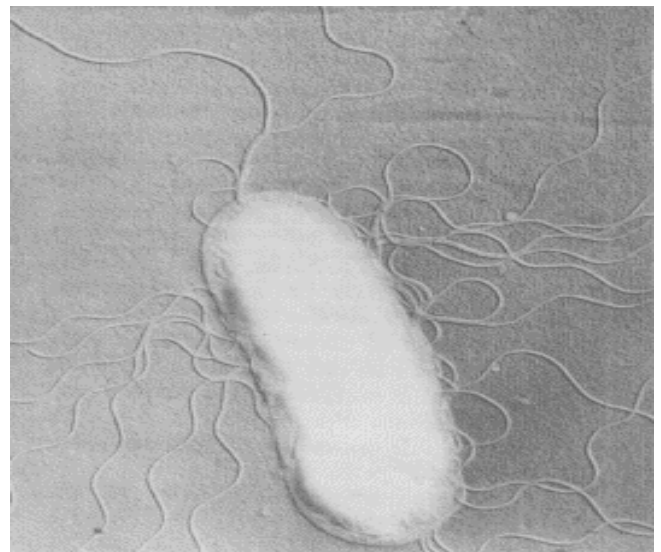


Figura 7. Microscopia electrónica del *Azospirillum spp.*

5.2. Aislamiento de cepas de *Azospirillum* a partir de raíces de la planta hospedera



Figura 8. Raíces de plantas de maíz para aislamiento de *Azospirillum spp.*

5.2.1. Proceso de aislamiento de cepas de *Azospirillum* a partir de suelo y raíces de la planta hospedera

Para el aislamiento de *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*, podemos utilizar la metodología propuesta por Dobereiner et al., 1995. Con algunas modificaciones en el tiempo de desinfección, número de enjuagues, dilución y siembra, etc.

Los procesos de aislamiento a partir de suelo y raíces, son:

- Las raíces de plantas colectadas en el campo, serán lavadas en agua corriente para retirar los residuos de tierra, luego serán cortadas en pedazos de 10 cm.
- Este material será secado con papel absorbente, luego pesar 10 gr de raíz, la que servirá para realizar la dilución decimal seriada de las muestras.
- Los 10 gr de raíz serán esterilizadas, sumergiéndolas en una solución de Cloro (Cloramina-T) a 1% ($C_7H_7ClNaO_2S_3 H_2O$) ó $Hg Cl_2$ al 0.01%. El tiempo de esterilización será de acuerdo a la edad, estado fenológico y tipo de planta, por ejemplo: las raíces de maíz y sorgo en fase de floración se esterilizará por 30 a 60 minutos, en caso del arroz y trigo será entre 5 a 15 minutos.
- Las raíces retiradas de la solución de cloro son colocadas en frascos conteniendo agua destilada, para eliminar el desinfectante las que serán sumergidos por 10 minutos.
- Pasado el tiempo se transferirán a una solución tampón de fosfato 0.05 M (pH 7.0) y posteriormente serán lavadas con agua destilada estéril. Estas dos etapas tendrán el mismo tiempo de esterilización.
- Se recomienda utilizar un control para verificar si el proceso de esterilización de las raíces fue realizada correctamente, que consiste en dejar las raíces en agua destilada-estéril el mismo tiempo que la esterilización

utilizada para las raíces.

- Las porciones de raíces de 10 cm serán cortadas entre 1 a 2 cm, para luego ser trituradas o maceradas en 90 mL de solución salina estéril (0.85% de NaCl), de esta solución (dilución cero), se tomará un 1 mL para realizar diluciones seriadas sucesivas.
- Se inocularán los medios de cultivo NFB semi-sólido, con 0.1 mL (suspensión de raíces) en tubos o frascos (viales), con 3 ó 5 repeticiones, que serán incubadas durante 4 a 7 días a 35°C.
- Después de este tiempo será posible observar la formación de una película sub-superficial (sombriilla o velo), como indicador de un crecimiento positivo.
- Cuando la película llega a la superficie del medio semi-sólido NFB, una pequeña cantidad de esta película (cultivo bacteriano), será transferido para un tubo conteniendo nuevo medio NFB semi-sólido, que se incubará a la misma temperatura hasta que otra película sea formada.
- De la película formada, se tomará una nueva muestra y será sembrada en placas con medio NFB sólido (15gr agar/litro), enriquecido con 20 mg de extracto de levadura, después del periodo de incubación de 3 a 5 días es posible observar colonias de *Azospirillum* de estas dos especies, que son pequeñas, secas y blancas.
- Para el aislamiento de *Azospirillum* a partir de suelo, el procedimiento es similar a los descrito para raíces, siendo la diferencia que en este caso se utilizará 10gr de suelo rizosférico, realizando las diluciones seriadas decimales e inoculación en los medios respectivos; sin la necesidad de realizar las desinfecciones o esterilizaciones. Sin embargo una vez formada el velo que indica crecimiento positivo, será necesario realizar las resiembras constantes igual que el aislamiento a partir de raíces y obtener las colonias de *Azospirillum*.

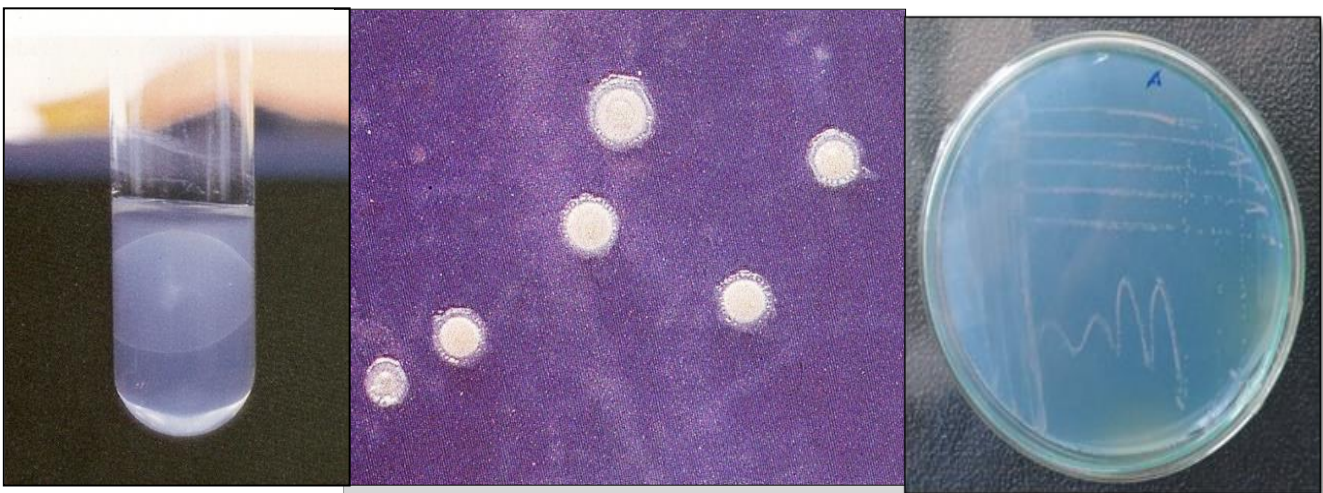
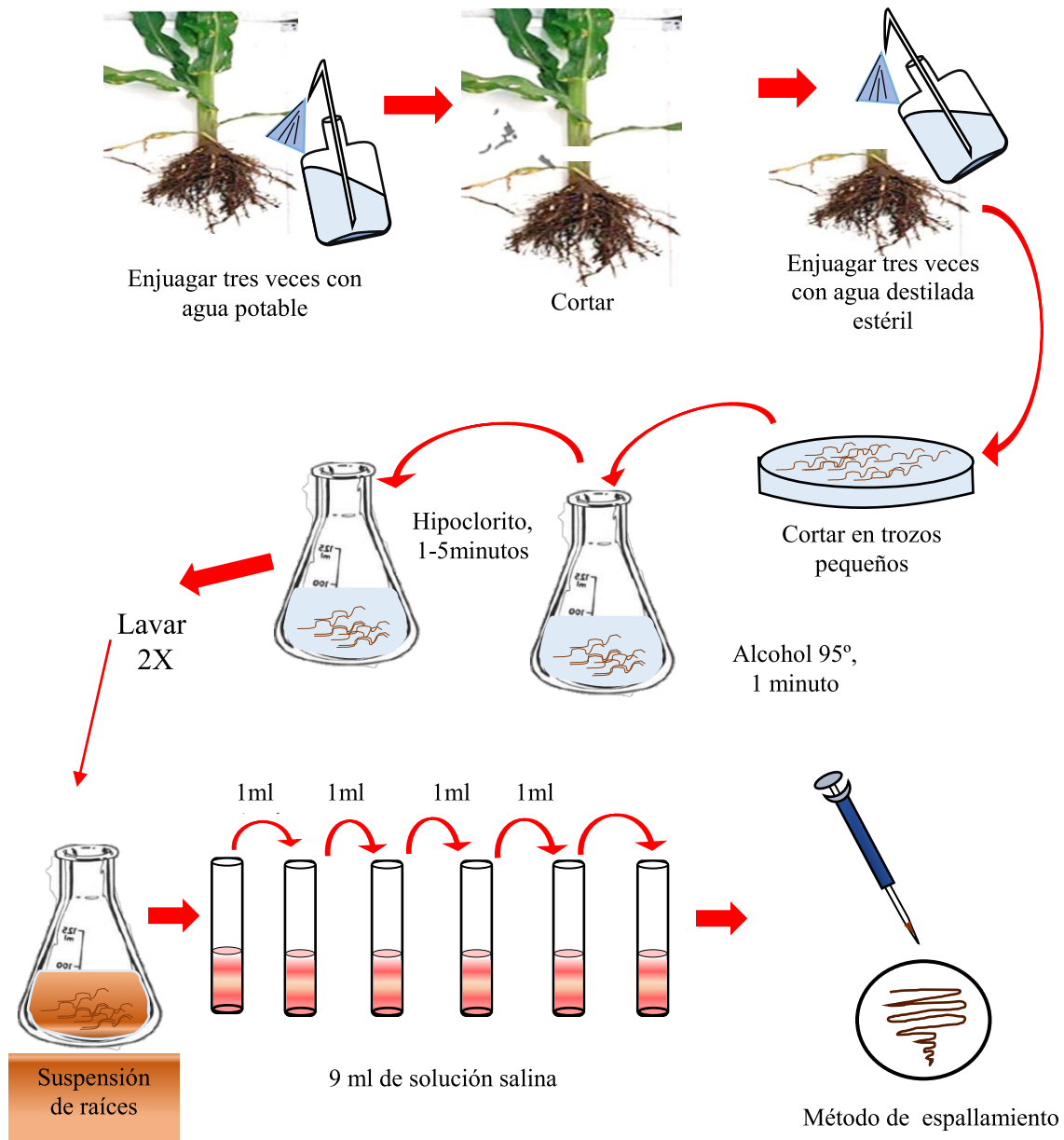


Figura 9. Crecimiento de *Azospirillum* spp. en medio líquido (velo) y colonias en medio sólido.

Esquema N°3: Aislamiento de *Azospirillum* a partir de raíces**5.2.2. Proceso de aislamiento de *Azospirillum* a partir de las hojas y tallos**

Las hojas y tallos colectados para el aislamiento de *Azospirillum*, serán lavadas con agua corriente, secadas con papel absorbente, luego esterilizadas superficialmente con algodón embebido con alcohol 70% (limpiar la hojas y el tallo con bastante cuidado).

Se recomienda utilizar el medio semi-sólido NfB sin nitrógeno, incubada a temperatura de 35°C, donde se observará el crecimiento en forma de una película (velo o nata); en las diluciones 10^2 a 10^5 , después de 3 a 5 días se podrán observar colonias de *Azospirillum*, pequeñas, secas y blancas. Para purificar estas colonias serán transferidas para nuevos medios de cultivo NfB semi-sólido, se deberá

considerar solo las colonias que forman películas, las que serán repicadas en medio sólido conteniendo solución de papa; de las colonias crecidas (sombrija o velo), serán repicadas en medio NfB semi-sólido y después de formada la película, repicar para medio selectivo NfB glucosa que nos indicará si son *Azospirillum lipoferum* o *Azospirillum brasilense*.

Estas cepas aisladas deben ser almacenadas y conservadas hasta el momento de su uso, así como para realizar pruebas bioquímicas y fisiológicas para su identificación, padrones de proteína celular, polisacáridos, técnicas inmunológicas, aglutinación, precipitación, inmuno-electroforesis, inmuno-influorescencia, inmunodifusión, técnicas de Elisa e identificación de genotipos, sondas de secuencia de gens, reacción de cadena PCR de los gens 15S y DNA.

5.2.3. Proceso de aislamiento de cepas diferentes de especies de *Azospirillum*

El descubrimiento de las nuevas especies de *Azospirillum* se debe al uso de medios semi-sólidos sin nitrógeno. Donde esta bacteria por sus características de aerotaxia, se mueven para la zona donde la difusión de oxígeno está en equilibrio con la tasa de multiplicación celular, en esta zona se forma una película en forma de velo, 5.0 -10.0 mm debajo de la superficie del medio, moviéndose en dirección a la superficie para liberar el oxígeno en exceso que se acumula activando la nitrogenasa. (Dobereiner, J, Baldani, 1995). Para el aislamiento de cepas de *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum* se utilizará el medio NFb semi-sólido, que es inoculado con 0.1 mL de suspensión de suelo o raíces lavadas y esterilizadas de plantas en estudio, incubadas a 35°C de temperatura por 4 a 7 días; cuando la película fina aparezca en la superficie se transferirá con una alza de platina una cantidad al nuevo medio NFb semi-sólido y se incubará a la misma temperatura hasta que una nueva película (velo) se haya formado. En esta fase los cultivos son sembrados (estriados) en placas conteniendo medio NFb Sólido (15g Agar/litro), adicionada de 20 mg de extracto de levadura. Después de la Incubación por 3 a 5 días, aparecerán colonias pequeñas, secas y blancas. Para la purificación final de estas colonias, serán transferidas para nuevos medios NFb semi-sólido y después de la formación de la película (velo), serán sembradas en placas medio de solución de papa. Las colonias formadas en este medio serán blancas-amarillentas, tornándose rosaseas, pequeñas y estructuradas, después de una semana de incubación a 35°C una colonia de cada placa es repicada para medio NFb semi-sólido, con la finalidad de caracterizar la especie y su conservación. El *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* pueden crecer en medio NFb líquido con NH_4Cl (1 g/litro).

El *Azospirillum irakense*, será aislado utilizando el mismo método anterior, siendo la temperatura de incubación a 33°C en vez de 35°C, las colonias se observarán transparentes, convexas, borde regular y tamaño de 1 mm. El *Azospirillum Halopraeferans* también puede ser aislado con el procedimiento anterior, con la diferencia que el medio contendrá 1.5% de NaCl y la temperatura de incubación será 41°C.

El *Azospirillum amazonense*, será aislada en medio de cultivo LGI semi-sólido (Dobereiner et al ,1995), inoculados con diluciones seriadas de raíces de gramíneas ó suelo rizosférico), donde se formarán películas finas en la superficie del medio LGI semi-sólido, incubados por 5 a 7 días a 32°C, estas serán repicadas para nuevos medios LGI semi-sólido, después del crecimiento serán sembradas en placas con el mismo medio LGI, añadiéndose 20mg de

extracto de levadura y 20gr de Agar/litro, las colonias formadas en este medio después de 5 días, tendrán la característica de ser pequeñas, blancas y estructuradas, las que serán transferidas para nuevo medio LGI semi-sólido y después de la formación de la película serán sembradas por estrías en placas con medio papa, donde esta especie formarán colonias grandes de hasta 5 mm, bien distintas, de coloración blanca achatadas y borde elevado. Dependiendo de la fuente de Carbono y Nitrógeno, la forma de las colonias puede ser alterada. Una colonia de cada placa será nuevamente repicada en medio LGI semi-sólido, para confirmación de la especie y posterior conservación. El *Azospirillum amazonense*, crece muy bien en medio LGI conteniendo KNO_3 (1g/litro).

6. Purificación de las Cepas de Bacterias de *Azospirillum* (*Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*) a Partir de las Colonias Aisladas

De las colonias aisladas serán transferidas a los nuevos medios de cultivo NFb semi sólido y después de la formación de nuevo velo serán sembradas en placas con medios con papa (papa-azúcar-acido málico), las colonias formadas serán inicialmente blanco amarillas, cambiando para color rosa, pequeña y estructurada después de una semana de incubación a 35°C, finalmente una colonia de cada placa es repicada para medios NFb semi sólido para la caracterización de la especie y conservación.

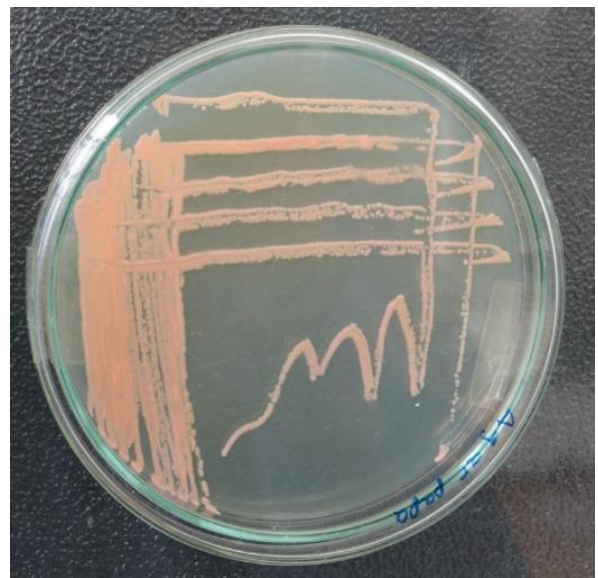


Figura 10. Placas con crecimiento de *Azospirillum* en medio agar-papa.

7. Identificación y Técnicas de Caracterización de las Cepas de *Azospirillum*

El género *Azospirillum* pertenece a la subclase alfa de las proteo bacterias, siendo la especie más estudiada el *Azospirillum lipoferum*.

La caracterización microscópica del *Azospirillum* presentan formas vibriode, pleomorfa y movilidad en espiral, estas células contienen grandes cantidades de poli-B-hidroxibutirato (PHB) hasta un 50% del peso celular; las células jóvenes, con abundantes gránulos refringentes, en cultivos semi-sólidos y sólidos con más de 24 horas de incubación, presentan forma ovoide y paredes gruesas similares a quistes. Diversas pruebas bioquímicas y fisiológicas son utilizadas rutinariamente para el reconocimiento de las especies de *Azospirillum*.

Diferenciación de especies del género se logra evaluándose la capacidad de usar diversos aminoácidos y su efecto sobre la capacidad de fijación de nitrógeno. Proteínas de membrana, así como patrones de proteínas celulares por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato (SDS-PAGE), permite una clara diferenciación de las especies de *Azospirillum lipoferum*; *A. brasilense*; *A. amazonense*; *A. halopraeferens*; etc., (Caballero-Mellado, 2002).

Para la caracterización de los *Azospirillum*, las pruebas van a depender de la especie que se está trabajando.

La primera especie de *Azospirillum* fue aislada en 1925 por Beijerinck, a partir de suelos arenosos pobres en nitrógeno y originalmente se les llamo *Spirillum lipoferum*, a partir de allí, bacterias fueron aisladas de un sin número de plantas, Pero solo en 1975, la investigadora brasileña Johana Dobereiner y el investigador inglés, J, M, Day, reportaron la habilidad de fijar nitrógeno del género *Spirillum*, por lo que en 1978 fue cambiado el nombre para *Azospirillum*. Ese mismo año Terrand y col.1978, propusieron dos especies: *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*. En 1996, investigadores de la Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA) Soya-Brasil, en conjunto con investigadores de la Universidad Federal de Paraná (UFPR), comenzaron a hacer trabajos de laboratorio y ensayos de eficiencia Agronómica en el campo.

La empresa “Stoller do Brasil”, en la que fui responsable del Laboratorio y de la Producción de inoculantes para gramíneas (maíz, trigo y arroz) y leguminosas, fue la primera empresa brasilera que inicio la producción y comercialización de inoculantes a base de *Azospirillum*, en Junio de 2009, siendo la producción de 870.000 dosis de inoculante líquido, la producción del año 2010 fue de 1.200,000 dosis, para el año 2011, la producción aumento para 1.800,000 dosis, actualmente la producción se encuentra entre los 3 millones a 3.500,000 millones de dosis. Las cepas utilizadas para la producción de inoculantes con *Azospirillum* para maíz, trigo y arroz, son las cepas Ab-V5 y Ab-V6 proporcionadas por la Universidad de Paraná (UFPR), encargada de suministrar las cepas de *Azospirillum*

para las empresas productoras de inoculantes.

8. Caracterización de las Cepas de *Azospirillum* Aisladas

Los cepas puras de *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense*, deben ser repicadas para medio NFb semi-sólido e incubadas por 48 horas a 35°C. Las células de *Azospirillum Brasilense* pueden identificarse como bacilus curvos, móviles, con 1,3 a 5 um, mismo después que el medio alcalinizo.

Las células jóvenes de *Azospirillum lipoferum* son idénticas, más cuando el medio se alcaliniza, las células quedan grandes, pleomorfas e inmóviles (10 micras de largo y de 3 a 5 micras de espesura).

Las dos especies también pueden ser identificadas por el crecimiento en medio con glucosa, donde solo la especie de *Azospirillum lipoferum* es capaz de usar glucosa como fuente única de carbono.

La especie de *Azospirillum irakense* es caracterizada por el crecimiento en medio NFb semi-sólido con 0.3% de NaCl y pH alcalino (7 a 8,5), estas células en medio nutritivas (caldo), pueden alcanzar el tamaño de 20 micras.

La especie *Azospirillum halopraeferans* es identificada por el crecimiento en temperatura de 41°C y tolerancia a condiciones salinas. Las células pueden alcanzar el tamaño de 12 micras x 0,7 a 1.4 micras de espesura cuando el medio se alcaliniza.

El *Azospirillum amazonense* es caracterizada por la habilidad de usar sacarosa como única fuente de carbono (*Azospirillum lipoferum* también crece en presencia de sacarosa). Las células de estas especies poseen tamaño de 0.9x 3 a 4 micras en medio LGI, las especies de *Azospirillum* también pueden ser separadas por el uso de sondas oligonucleótidos desarrolladas para esta especie.

8.1. Caracterización molecular de las cepas de *Azospirillum*

Para la caracterización molecular (Kirchof, G.; and A. Hartman, 1992), extrajeron ADN de la bacteria y realizaron el PCR y el RAPD, para la amplificación del ADN, utilizando los primers Rep., Eric y Cr17. La identificación genotípica específica a nivel del género y especie de *Azospirillum* se lograron en forma reproducible mediante el uso de sondas basadas en la secuenciación de genes 23S, rRNA con los oligonucleotideos reportados se lograrían tanto la identificación del genero *Azospirillum* como de las especies de *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans* y *A. irakense*, mediante experimentos tipo “dot blot”, estas sondas también pueden ser usadas para la detección in situ de la especie de *Azospirillum*.

9. Conservación de las Cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y/o *Azospirillum*

Los cultivos bacterianos (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* y otros), son fuertemente vulnerables y pueden contaminarse fácilmente, mutar o morir y perderse la cepa. Por estas razones la conservación de los cultivos de las cepas por métodos adecuados son muy importantes; existen muchos métodos que son usados para la conservación de cepas y se mencionan solo los más utilizados.



Figura 11. Forma de conservar cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azospirillum* sp.

- b. Otra forma de aumentar la sobrevivencia de la bacteria en el tiempo es por el almacenamiento de la cepa, restringiendo el aire en los cultivos, esto se consigue usando tubos con tapa rosca envueltos en papel parafilm, se puede aumentar la conservación restringiendo el oxígeno en el tubo adicionando 2 a 3 mL de aceite mineral o glicerina líquida estéril.
- c. Método de perlas de porcelana, consiste en repicar las cepas en medio líquido, cuando el cultivo haya crecido y se observará una suspensión densa (fase de crecimiento logarítmico), se agregará las perlas de porcelana que han sido previamente esterilizadas. Se retirarán las perlas, se dejarán drenar el exceso de la suspensión bacteriana y después serán transferidas para un recipiente estéril que contiene un desecante y encima una capa de algodón estéril, los cultivos son conservados en refrigeración y pueden ser almacenados por periodos de más de 1 año.
- d. El método de congelamiento, que consiste en hacer una suspensión bacteriana que ha crecido previamente en medio sólido, adicionando un agente crio- protector (glicerol, leche desnatada, etc.) y congelarlo a temperatura debajo de cero, en nitrógeno líquido o en congeladores. Cuando es hecho en congeladores, lo más recomendable es hacerlo a -70°C , en armarios

a. Método más simple de conservación consiste en la transferencia periódica de sub cultivos de la cepa, en tubos o placas, que consisten en resembrar la bacteria cada cierto tiempo, repicándolo en un medio nuevo, este método debe ser usado para la conservación por periodos cortos (2 meses o más), si los cultivos, son mantenidos a temperatura ambiente conservados en refrigeración a $4-7^{\circ}\text{C}$, este periodo puede extenderse hasta 6 meses.

- e. La liofilización es el método más usado para conservación de las colecciones internacionales y consiste en congelar rápidamente una suspensión de microorganismos después de eliminar el agua como vapor de agua directamente del hielo, para este proceso se emplean los equipos denominados liofilizadores, de los que hay muchos modelos en el mercado. Las cepas liofilizadas se conservan en ampollas de vidrio, los cultivos liofilizados se conservan, entre 0 y 5°C de temperatura durante muchos años (20 a 50 años de conservados).



Figura 12. Ampollas liofilizadas de cepas de *Rhizobium*.

Actualmente existen colecciones de cultivos de microorganismos (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* y otros), en varias partes del mundo y su

objetivo es mantener las cepas en estado viable sin cambios morfológicos, fisiológicos o genéticos. Una de las colecciones más importantes se encuentra en la ciudad de Beltsville en EE.UU. que es parte del Departamento de Agricultura e investigación de USDA y que tiene más de 7,000 cepas de microorganismos (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, etc.).

En el Brasil, el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Fundación de Investigación Agropecuaria del Rio Grande del Sur, posee una colección de 1,000 cepas de *Rhizobium* y *Azospirillum* es la institución encargada de proporcionar las cepas para la producción de inoculantes y trabajos de investigación en el Brasil.

10. Pruebas de Efectividad de las Cepas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azospirillum*

Las pruebas de efectividad que se realizan para evaluar la habilidad que tengan las cepas que fijar nitrógeno con la leguminosa hospedera (*Rhizobium*) o la habilidad de Promover el crecimiento vegetal (*Azospirillum*), en condiciones adecuadas. Esto puede ser hecho en Solárium en tubos con medio de cultivo (con luz artificial, humedad y temperatura controladas), las pruebas de efectividad pueden ser realizadas también en condiciones de invernadero (usando Jarras de Leonard, macetas, vasos de plástico, bolsas, etc.).



Figura 13. Prueba de efectividad de cepas de *Rhizobium* en vivero para lenteja y en campo para cultivo de frejol.

Una forma de evaluar la efectividad del *Rhizobium*, es la nodulación, para esto se cuenta el número de nódulos de cada planta, peso de nódulos y se evalúan las características de nodulación de las cepas en los ensayos de invernadero y campo.

Resultados del experimento de campo con soya en UFRGS-Rio Grande del Sur-Porto Alegre, Brasil, fueron estudiados

tres tratamientos: un control (testigo) y dos tratamientos inoculados con *Bradyrhizobium* (cepas USDA-123 y NC-2005), los resultados muestran que todos los tratamientos inoculados fueron significativamente superior en rendimiento de granos, mayor porcentaje de nitrógeno y mayor cantidad de nitrógeno fijado en el suelo, en relación al tratamiento sin inocular la soya Kg/ha.



García-Blásquez, C

Figura 14. Rendimiento de granos de soya, tratamientos inoculados y sin inocular. Porto Alegre-Brasil.

1.1. Producción de Inoculantes Agrícolas para Leguminosas y Gramíneas

Actualmente en el mundo se producen inoculantes para todas las leguminosas y últimamente para gramíneas en algunos países, siendo la mayor cantidad producida para el cultivo de soya y frejol; y en gramíneas para maíz.

En el Perú la producción de inoculantes en pequeña escala es hecha principalmente por algunas universidades y pequeñas empresas, para leguminosas de interés, no teniendo una cobertura regional y nacional. En cuanto a los inoculantes para gramíneas con *Azospirillum* no hay producción disponible en el mercado.

En la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por los años 70-90 fue pionera en la producción de inoculantes principalmente para leguminosas forrajeras, por problemas sociales esta actividad disminuyó notablemente. Es así que a partir del año 2017 a la fecha a través del proyecto estratégico institucional se viene investigando (pregrado y post grado), seleccionando cepas y produciendo pequeños lotes de inoculante experimental para uso de pequeños, medianos productores, etc. de la zona de influencia de la universidad; usados en leguminosas y gramíneas forrajeras y alimenticias.

11.1. Producción de inoculantes sólido en soporte a base de turba

La producción de inoculantes a base de turba son las más producidas y utilizadas en mayor cantidad por los

agricultores por que el inoculante a base de turba es un soporte que protege a la bacteria del inoculante de algunos factores adversos como pH, temperatura alta, falta de humedad, efecto toxico de fertilizantes (micronutrientes) sobre las bacterias. Aunque esta tendencia últimamente está cambiando por el uso de inoculante líquido, principalmente por su facilidad de uso.

En la producción de inoculantes sólidos a base de turba para impregnar las bacterias, hay la necesidad de acondicionar y neutralizar el soporte previo a su preparación.

La turba es colectada en el campo (turberas) y secada al medio ambiente, luego el material es desmenuzado (partido), pulverizado en un molino de martillos o de bolas y cernido en un tamiz con agujeros de 250 μm de diámetro. Generalmente el pH de la turba esta entre 3.5 a 4.0 bastante ácida, por eso hay que neutralizarla adicionando un correctivo, que generalmente se utiliza el carbonato de calcio (CaCO_3), calcítico o Dolomítico, puede usarse calcáreo finamente molido o también hidróxido de calcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$]. La turba molida y neutralizada es colocada en bolsas de polipropileno o Polietileno de alta densidad y resistentes a esterilización.

La esterilización en Brasil utilizando autoclave era muy trabajoso y requería de embalajes especiales, resistentes a la esterilización y autoclaves grandes, actualmente la esterilización que está siendo usada por la mayoría de empresas productoras de inoculantes de otros es la

esterilización por irradiación por rayos gama, que es hecha por la Empresa Brasileira de Esterilização (CBR), cuya fuente de energía de radiación gama es el Cobalto 60, de uso restringido y controlado por el Estado Brasileño. El tratamiento con energía ionizante consiste en exponer los productos a ondas electromagnéticas cortas, de alto poder de penetración, que rompen las cadenas de ADN de las bacterias y microorganismos, el uso de la radiación gama del Cobalto 60 utilizada para la esterilización del soporte a base de turba, permite que los productos sean procesados a temperatura de ambiente y directamente en su embalaje final, normalmente los sacos de turba son irradiados con 60 kilo greys (6 Megarrats). Cuando las bolsas con el soporte ya están esterilizados es transportado a la empresa productora de inoculantes y en el laboratorio en condiciones asépticas dentro de la cámara de flujo laminar se procede a la inyección del caldo de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y/o *Azospirillum* en el soporte, (producción de inoculante a base de turba), en cada bolsa de 500 gramos de turba estéril son inyectados aproximadamente 425mL de caldo de bacterias. La cantidad de caldo va a variar de acuerdo al tipo de turba utilizada, la capacidad de absorción de la turba, la humedad inicial del soporte, una vez finalizada la inyección del caldo, los agujeros de la inyección son sellados con una cinta adhesiva estéril y las bolsas con el inoculante son masajeados individualmente para distribuir homogéneamente el caldo en la turba, o puede ser utilizado un agitador mecánico para esta operación de homogenización.

Después de terminada esta operación, las bolsas de inoculantes son acondicionadas en cajas de isopor y sometidas a maduración del inoculante a temperatura de ambiente (25 a 30°C) durante 2 a 3 semanas, que es el periodo de tiempo en que las bacterias se impregnan, adaptan al nuevo medio y se multiplican hasta llegar altas concentraciones y se estabilizan, al final de este tiempo se realiza el control de calidad del producto, que sirve para definir el tiempo de vencimiento del producto, concentración inicial del inoculante, pureza y si esta apta para su comercialización.

11.2. Producción de inoculante líquido para leguminosas y gramíneas

El proceso de producción de inoculantes líquidos y sólidos (turbas) es semejante hasta la producción de caldo concentrado de bacterias y sin contaminantes en el reactor, a partir de este caldo se formulara el inoculante líquido o sólido, la diferencia esta, que una vez que el caldo de bacterias está listo en el fermentador de mayor volumen, y después de haberse realizado el control de calidad, se adiciona la “solución aditiva”, que es una mezcla de sustancias protectoras de las bacterias, que van a ayudar a su sobrevivencia y estabilidad en el caldo, se deja en agitación por unos 30 minutos para obtener una buena

homogenización, después de este tiempo el inoculante es distribuido (envasado) en bolsas de polietileno y/o polipropileno esterilizados por radiación gama (60 kilo grey de dosis) u otro método de esterilización (autoclave, etc.), estos inoculantes envasados son almacenados en cajas de papelón o tecno por hasta su evaluación (control de calidad) antes de su comercialización.

12. Control de Calidad de los Inoculantes para Leguminosas y Gramíneas

En toda empresa el éxito de la producción va depender de la calidad, en el caso de los inoculantes los resultados del producto son vistos en el campo, en la buena instalación y producción de las leguminosas y gramíneas inoculadas.

En Brasil, el control de la calidad de los inoculantes es realizado por las fábricas que producen inoculantes y por el Ministerio de Agricultura (órgano oficial de control). En la industria se controla la calidad durante todo el proceso de producción del inoculante hasta su distribución y comercialización al cliente o productor y el Ministerio de Agricultura controla la calidad del producto final (inoculante) en la fábrica de producción o en los puntos de venta y/o entrega al cliente. El Ministerio de Agricultura del Brasil (MAPA), hace una fiscalización periódica, colecta las muestras de los inoculantes y los envía a los laboratorios oficiales credenciados para el análisis de la calidad, siendo el laboratorio de Microbiología de FEPAGRO que realiza la mayoría de los análisis.

En algunas fábricas, el control de calidad de los inoculantes es realizado en cada etapa de la producción, cuando la cepa llega a la industria, es realizada la siembra en medios de cultivo selectivos y es evaluada su pureza, características macro y microscópicas, se realiza la coloración Gram, características de su crecimiento en medios líquidos. Para evaluar la pureza de las cepas se utiliza medios selectivos con indicadores, como el medio Peptona – glucosa con purpura de bromocresol, Levadura -manitol –agar con rojo Congo, Levadura-manitol-Agar azul bromotimol, ayudan a evaluar las cepas, el medio Agar-papa-Dextrosa para ver si hay presencia de hongos. La presencia de contaminantes en los medios de cultivo son fáciles de detectar y evaluar, la Legislación del Ministerio de Agricultura de Brasil exige que los inoculantes a base de turba no presenten contaminantes hasta la dilución 10^{-5} . El control de pureza del cultivo es realizado en cada etapa de la producción, simultáneamente a este control se determina el número de células de rizobios viables presentes, esto se realiza por el método de dilución seriada sucesivas, el principio es que cada célula va a producir una colonia, para este fin, 1 mL de inóculo es colocado en un tubo con 9 mL de solución salina (0.85%),

después se toma 1 mL de este tubo y se inocula en tubos conteniendo 9 mL y esto se repite sucesivamente hasta la dilución 10^{-8} . Después se toman alícuotas de las diluciones deseadas y se siembran en placas con medio LMA, utilizando el método de la “gota” para lo cual se utiliza una micro pipeta, (pipeta automática) de 20 o 25 μ l (micro litros). Otros laboratorios utilizan el método de siembra por agotamiento, usando 1 mL de muestra por cada placa, siendo necesario utilizar muchas placas; en el método de la “gota”, la placa Petri se marca en 4 partes y con una micro pipeta y punteras estériles se siembra en cada una de las partes, 3 gotas por cada dilución, eso nos permite sembrar 4 diluciones en una misma placa, usando 3 placas por repetición. Las placas sembradas se colocan para incubar por 3 a 7 días de acuerdo a la especie de bacteria, después del crecimiento, las colonias se cuentan en un contador y los resultados son reportados como número de unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL). La concentración de células vivas presentes en los tubos, Erlenmeyers, frascos de 20 litros y fermentadores siempre están siendo evaluados y controlados. En el fermentador final después de 2 días de crecimiento y multiplicación de las bacterias, se realiza el control de pureza y concentración bacteriana. La forma de determinar el número total de bacterias presentes varía entre las empresas fabricantes de inoculantes, algunas usan un espectrofotómetro que mide la cantidad de luz que atraviesa una suspensión de microorganismo en comparación con un blanco, que es el medio estéril y sin inocular. Cuanto mayor es el número de células en suspensión, tanto menor es el porcentaje de luz que atraviesa el medio. Para relacionar la transmitancia, con la densidad bacteriana es necesario hacer curva padrón de densidad conocida, sin embargo algunas bacterias con más goma pueden interferir en la determinación, por lo que es importante tener en cuenta para hacer las correcciones necesarias. La mayoría de las industrias productoras de inoculante en Brasil hace el conteo microscópico directo, que consiste en contar con un microscopio la cantidad de células presentes en un volumen determinado, para estos recuentos se utilizan generalmente cámaras de recuento, en este caso es usada la cámara de Petroff Hausser. Simultáneamente al conteo directo se realiza la siembra en placas por el método de diluciones sucesivas. En Brasil, el Ministerio de Agricultura exige que los inoculantes líquidos y turbosos tengan una concentración mínima de 10^9 células de *Rhizobios* por mililitro o gramo en el momento de la producción, por lo que el fabricante tiene que garantizar está concentración celular de sus inoculantes, por otra parte esta concentración debe mantenerse hasta la fecha de vencimiento del producto que es de 6 meses. El Ministerio de Agricultura de Brasil, también realiza el conteo de bacterias por semillas pre inoculadas, para esto usa el método de Burton modificada. Este método consiste en colocar la

semilla que ha sido pre-inoculada para crecer en tubos de ensayo, plantas de semillas pequeñas, en macetas con arena o vermiculita para plantas de semillas grandes. Son utilizadas 50 tubos o macetas por muestra y se incluyen además 6 controles negativos (-) y 6 controles positivos (+). Después de 25 a 30 días, debe haber por lo menos 30 plantas bien establecidas, noduladas y sanas para hacer la evaluación. En la evaluación se consideran positivas (+), las plantas que presentan en lo mínimo 3 nódulos en el cilindro imaginario de 2,5 cm. que se mide desde la parte superior de la raíz. Los resultados son reportados en porcentaje y se consideran satisfactorio el análisis que presente por lo menos 80% de las plantas noduladas.

La Legislación Brasileira exige que los inoculantes sean producidos con las cepas recomendadas por la RELARE. (SEMIA 587, SE-5019, SEMIA 5079 y SEMIA 5080), que pueden ser usadas individualmente o con 2 cepas mezcladas en cualquier combinación.

13. Métodos y Técnicas de Inoculación para Leguminosas y Gramíneas

La aplicación de los inoculantes a las semillas o en el suelo es llamada “**inoculación**”, existen varias técnicas de aplicar inoculante:

- a. **Inoculación en seco**, consiste en mezclar las semillas con el inoculante y homogeneizarlas para que el inoculante se adhiera a las semillas, luego estas semillas inoculadas son colocadas en el depósito de la sembradora y durante la siembra ambos productos (semilla e inoculante) van cayendo en el surco de siembra del suelo.
- b. **Inoculación en forma húmeda o simple**, para esta técnica, se debe tener un lugar fresco a la sombra, colocar las semillas sobre una superficie limpia como una tina, lona, plástico, etc. distribuir las semillas homogéneamente, a continuación se adiciona una solución adherente (goma arábiga 20-40%, cellofax (CMC) 5%, solución de harina de trigo o yuca al 10%, que pueden ser aplicadas manualmente o con una pala, la solución adherente tiene que estar en cantidad suficiente para mojar las semillas pero sin que estas queden demasiada húmedas, después se coloca el inoculante solido a base de turba, se homogenizar bien, se deja orear a la sombra y la semilla estarán inoculadas y listas para sembrar.



Figura 15. Inoculación simple de semillas arveja, localidad de Quinua-Ayacucho.

Tabla 1. Cantidad de Inoculante en turba, semilla y diluyente para “inoculación simple”.

Tamaño Semillas	Inoculante (120Gr)	Cantidad De Semillas (kg)	Solución Diluyente (Agua) MI
Grandes (Frejol)	2 bolsita	35	700
Medianos (Alfalfa,)	2bolsita	20	800
Pequeños(T.blanco)	2bolsita	15	1200

c. Inoculación utilizando inoculante líquido, consiste en mezclar el inoculante con las semillas en un recipiente limpio, siguiendo las recomendaciones de las cantidades de

semillas e inoculante, homogenizarlas bien, dejarlas orear y sembrar bien de mañana o en la tarde, en horas de temperatura amena.



Figura 16. Inoculación simple de semillas de avena, localidad de Minascucho-Ayacucho.

Tabla 2. Cantidad de Inoculante líquido y semillas de leguminosas para “inoculación simple”.

Tamaño Semillas	Inoculante MI	Cantidad de Semillas (Kg)
Grandes (Frejol)	350	35
Medianos (Alfalfa,)	350	20
Pequeños(T.blanco,)	350	15

Tabla 3. Cantidad de Inoculante líquido y semillas de gramíneas para “inoculación simple”.

Tamaño Semillas	Inoculante MI	Cantidad de Semillas (Kg)
Grandes (Maíz, etc.)	350	20
Medianas (trigo, cebada, arroz, avena y otros.)	350	10
Pequeñas (ray gras, etc.)	350	15

d. La inoculación en forma de “pellet” o pelletización, es otro método usado más en semillas pequeñas de leguminosas forrajeras (alfalfa, tréboles, vicias, etc.), puede ser realizada manualmente o en máquina de tratar semillas, cilindro, consiste , en tratar las semillas con el inoculante y un adhesivo adecuado como la goma arábica (40%), el cellofax (5%), CMC (5%) y un polvo de recubrimiento que puede ser el carbonato de calcio (CaCO_3) o cal dolomítico (55% de CaCO_3 y 35% de MgCO_3), cuando se usa una mezcladora para hacer los pellets las semillas son colocadas en una mezcladora, la máquina gira y revuelve las semillas durante un tiempo, el operador pulveriza agua hasta que las semilla

queden húmedas, en este momento se esparce el polvo de recubrimiento (Carbonato, cal, roca fosfórica, etc.), finamente molida, el polvo se va pegando a las semillas, al final del proceso las semillas tienen la apariencia de píldoras o pellets, de allí el nombre de esta técnica. Este método es más usada en alfalfa y tréboles, pues las bacterias (*Rhizobios*), sobreviven bien en los pellets (hasta 15 días en la sombra y lugar fresco), (García Blásquez, C et al. 1986). Sin embargo una vez inoculada la semilla, la bacteria presenta una alta tasa de mortalidad por lo que debe ser sembrado lo más rápido posible.



Figura 17. Inoculación en pellet de semillas alfalfa, localidad de Llachoccmayo-Ayacucho.

Tabla 4. Cantidad de Inoculante, semilla, calcáreo, goma arábica y agua inoculación en pellet.

Tamaño Semillas	Inoculante 120 Gr	Goma Arábica 40%	Agua Mililitros	Cantidad de Semillas Kg	Calcáreo (Kg)
Grandes(Frejol)	2bolsita	450	1.100	35	18
Medianos(Alfalfa)	2 bolsita	400	1.000	20	12.0
Pequeños(T.blanco, T. rojo)	2 bolsita	350	850	15	10.5



Figura 18. Semillas de trébol inoculadas en forma de “pellet”.

*Caso de realizar la inoculación en forma de pellet con inoculante líquido, tener en cuenta la cantidad del diluyente, reducir la cantidad de solución.

e. Técnica de inoculación es sobre parcela establecida, el inoculante puede ser colocado directamente en el suelo, “inoculante granular” hecho a base de turba. Se utiliza cuando las semillas están tratadas con productos químicos (fungicidas, herbicidas, etc.), los inoculantes son aplicadas debajo de la semilla en el surco de siembra, el inoculante también puede ser colocado en el suelo en forma líquida, en campos de leguminosas ya establecidas, el inoculante se disuelve en agua si es a base de turba, o se diluye en agua de riego y se aplica en la base de los tallos de la leguminosa, se utiliza 6 a 10 dosis de inoculante por hectárea, y se debe emplear volúmenes de agua de 350 a 500 litros /ha., esta inoculación es usada cuando hay fallas en la inoculación; aplicar en caso de plantas de leguminosa hasta el estado vegetativo V5, siempre y cuando se efectúe en óptimas condiciones edáficas y baja insolación.

f. Inoculación con inoculante líquido por pulverización foliar con *Azospirillum*, Es una técnica de inoculación que últimamente están siendo usados en los trabajos investigación de algunas instituciones y Universidades de Brasil, con resultados “promisorios”, sin embargo todavía no ha sido recomendado por los órganos oficiales como EMBRAPA, RELARE y el MAPA, como una práctica recomendada para ser utilizada.

14. Recomendaciones para la Inoculación de las Leguminosas con *Rhizobium* y *Azospirillum*

Algunas recomendaciones que debemos considerar necesarias para que la inoculación sea eficiente, tenemos siempre que recordar que el inoculante es un producto biológico y que estamos trabajando con microorganismos vivos, por lo que la primera recomendación es:

- a. Realizar la inoculación en lugar fresco y en la sombra, porque los rayos solares y el calor son letales para las bacterias del inoculante; realizar la inoculación y siembra muy temprano o al final de la tarde.
- b. Almacenar y conservar los inoculantes en lugar fresco y a la sombra. (Seguir todas las recomendaciones indicadas por el fabricante).
- c. Usar la dosis recomendada, una sobredosis no es desventajosa, pero una dosis baja aporta una cantidad menor de bacterias a las necesarias para promover una buena nodulación y FBN.
- d. La fecha de vencimiento de los inoculantes está registrada en los envases de los inoculantes.
- e. También se recomienda que se calcule bien la cantidad de inoculante para la siembra del día, la que debe ser sembrada en la brevedad posible luego de la inoculación.
- f. Cuando se abre una bolsa (envase) de inoculante lo recomendable es que debe ser utilizado inmediatamente y en caso de suspender la siembra por más de 24 horas, se recomienda hacer la re-inoculación de las semillas.
- g. No debemos mezclar el inoculante con sustancias tóxicas

como herbicidas, fungicidas, fertilizantes (micronutrientes), que pueden matar el *Rhizobium* o *Azospirillum*. Sin embargo en caso de utilizar fungicidas, insecticidas y/o micronutrientes, la inoculación debe ser el último antes de la siembra y en mayor concentración.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo de la Oficina General de Investigaciones e Innovación de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga-Ayacucho-Perú, que hizo posible su publicación, a través de su personal liderado por Zacarías Ismael Pérez Calderón, señores Pedro Arce De La Cruz, Nory Parodi Sulca y Delia María Falconi Valdivia, a quienes agradezco sinceramente por el apoyo brindado. También mis sinceros agradecimientos a la Ing. Susan Milagros Alarcón Romani por su apoyo en la redacción y corrección del trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bashan, Y.; Holguin, G. *Azospirillum*- plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996), Canadian Journal of Microbiology, v.43, p.103-121, 1997.
- Bashan, Y.; Holguin, G; De-Bashan, L.E. *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural and environmental advances (19970-1996), Canadian Journal of Microbiology, v.43, p.103-121, (1997-2003). Canadian Journal of Microbiology, v.50, p.521-577, 2004.
- Caballero-Mellado, J.; Von Scheveren E, Cardoso. G.; Gonzales Cu, Aguirre JT. *Azospirillum* inoculation and agronomic application in México. Fourth European Conference, la Nitrogen Fixation, Sevilla, Spain.2000.p.45
- Cassán, F.D.; García De Salamone, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. 268p.
- Chen, .E. & Thorton, H.G. 1940. The structure of ineffective nodules and its influence on nitrogen fixation. Proc .Roy. Soc. 129-208.Microbiologi.
- Díaz-Zorita, M.; Fernández Canigia, M.V. Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República de Argentina. In: Cassan, F.D.; García De Salamone, I. (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008.p.155-166.
- Dobereiner J. Baldani Vld, Baldani J.I. 1995, Cómo isolar e identificar bacterias diazotroficas de plantas nao leguminosas. Itaguaí: EMBRAPA-CNPAP, 60 pg.
- Dobereiner J. Day, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON W.E.; NYMAN, C.T. (Ed) INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON Nitrogen Fixation, vol. 2. Proceedings... Pullman, USA: Washington State University Press, 1976. P.518-538.
- Dobereiner, J.; Marriel, I.; Nery, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Canadian Journal of Microbiology, v.22, p.1464-1473, 1976.
- Dobereiner J.; Pedrosa FO. 1987. Nitrogen fixing bacteria in non leguminous crop plants. Madison: Springer-verlag.155p.
- FAO, 1995. Manual Técnico de Fijación de Nitrógeno. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.
- Freire JRJ. 1997, Inoculation of soybeans in: Vincent JM.; Whitney, A.S.; Bose J. Exploting the legumes-rhizobium Symbiosis in tropical Agriculture NIFTAL, p 335.379.
- García-Blásquez MC.; .1978. Efecto de la inoculación de cepas de *Rhizobium trifolii* en trébol blanco (*Trifolium repens* L. Var. Ladino) en condiciones de invernadero y campo. Tesis de graduación .Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga-Ayacucho.
- García-Blásquez MC.; 1989.Fixacao de Nitrogenio pela soja en condicoes limitantes de temperatura e umidade do solo. Tesis de Maestría. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Porto Alegre-Brasil.
- García-Blásquez MC.; 1994. Adicao de Monmorillonita e Polivinilpirrolpirrilidone em substrato turfoso para la producao de inoculantes para leguminosas .Dissertacao de doutorado. Universidade Federal de Rio Grande do Sul-Porto Alegre.Brasil.
- García De Salomone, IE. 2010. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Universidad de Buenos Aires. Catedra Agrícola Facultad de Agronomía. Argentina
- García, F. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. Y su efecto en el desarrollo de *Oriza sativa* L. arroz en Lambayeque (En línea): Scientia Agropecuaria.Vol.1-No.2 (2010)(consulta: 11 de abr. De 2014). [http:// revista.unitru.edu.pe/index.php/scientia_agrop/articule/view/19](http://revista.unitru.edu.pe/index.php/scientia_agrop/articule/view/19) (Consulta: 11 de abr. de 2014).
- Giller, Ke, Cadish G., 1995. Future Benefits from Biological Nitrogen fixation. Am Ecological Approach to Agriculture Plant and Soil? V.174, n.01.p255-270.
- Hungria, Ma. Vargas, At. Suchett, Ar. Peres JRR. 1994. Fixation Biological do Nitrogen en soja. In: Araujo, RS. Hungria, MA. Eds. Microorganismos de importancia Agrícola, EMBRAPA, Brasilia, p.9-90.
- Hungria, MA., Inoculacao con *Azospirillum* brasilense en rendimento a baixo custo. Boletín informativo da EMBRAPA Soja. Ministerio de Agricultura, Pecuaria y & Abastecimiento. (Boletín on line). 2011. Documento 325. Disponible en: <http://www.cnpsa.embrapa.br/Down>

load/doc325.pdf.

Hungría, MA.; Campos RJ. Souza.E.M., Pedrosa FO, 2010. Inoculation with select strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brasil. Plant and Soil. V.331.n. 1-2, p.413-425.

Lhonis, F.; Hansen R. 1992. Nodule bacteria of leguminous Plants Journal Agriculture Research. Washington. V.20. p.543-558.

Manual De Somesagaran : [HTTP://www.ctahr.hawaii.edu/bnf/inoc.production resources.asp](http://www.ctahr.hawaii.edu/bnf/inoc.production.resources.asp)

Moreira, FMS. Et al .2010. Bacterias diazotroficas asociativas. Diversidad, Ecología e Potencial de aplicaciones. Universidade Federal de Lavras. Brasil. Communicat Scientiae1 (2).74-99.

Olivares, E.; Bedner, E.J. and Sanjuan J. 20 13. Biological Nitrogen Fixation in the Context of Global Change. MPMI Vol.26, No.3, pg.486-494. Granada. España.

Okon, Y.; Labandera-Gonzalez, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation Soil Biology & Biochemistry, v.26, p.1591-1601, 1994.

Somesagaram P.; Hoben H. 1985. Methods in Legume-Rhizobium Tecnology NIFTAL. Proyect and MIRCEN. University of Hawaii. USA.

Vincent JM.; 1958. Survival of the Nodule Bacteria in: Halla Worth EG. (ed). Nutrition of the legumes. London. Butterworths. P.108-123.

Thompson JA., 1980. Production and Quality Control of Legume inoculant. In: BERGENSEN, FS. Ed. Methods for evaluating biological nitrogen fixation Chichester, VR. Wiley.p.489-533.

Sharma. A; A.Pathak, M, Sahgal, J.M. Meyer, V .W B.N. JOHRI, 2007. Molecular characterization of plant growth promoting *rhizobios* that enhances peroxidase and phenylalanine ammonia lyase activities in Chile (*Capsicum annum* L.) and tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) Arch. Microbiol. 188:483-494.