

OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN DE SOPORTES BASADOS EN SUELO Y COMPOST EN LA PRODUCCIÓN DE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS

OPTIMIZATION OF STERILIZATION TIME FOR CARRIERS COMPOST-SOIL BASED FOR PRODUCTION OF LEGUME INOCULANTS

E. Ormeño-Orrillo y D. Zúñiga-Dávila*

RESUMEN

Se elaboraron tres soportes consistentes en una mezcla de suelo y compost, y se sometieron a tres tratamientos de esterilización fraccionada en autoclave en dos días consecutivos. La eficiencia de los tratamientos de esterilización se evaluó monitoreando la disminución en las poblaciones de hongos y bacterias mediante recuentos estándar en placa. La esterilización de todos los soportes se logró mediante un tratamiento por 45 minutos el primer día y 30 minutos el segundo día.

Palabras Clave: Inoculante, leguminosas, esterilización.

ABSTRACT

Three soil-compost based carriers were elaborated and autoclaved by three different treatments of fractionated sterilization in two consecutive days. The efficiency of the sterilization treatments was evaluated monitoring the reduction in bacterial and fungi populations by standard plate count methods. Sterilization of all carriers was possible by the treatment of 45 minutes the first day and 30 minutes the second day.

Key words: Inoculants, legume, sterilization.

INTRODUCCIÓN

Los inoculantes para leguminosas constituyen una alternativa económica y no contaminante frente a los fertilizantes nitrogenados, ya que permiten utilizar racionalmente la simbiosis que se establece entre esas plantas y las bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, comúnmente conocidas como rizobios (Hamdi, 1985).

Actualmente los inoculantes más utilizados consisten en cultivos de rizobios incorporados en un material de soporte sólido que mantiene vivas a las bacterias durante su almacenamiento y distribución, y facilita su aplicación sobre las semillas o el suelo (Williams 1984;

Smith, 1992). La esterilización de estos soportes es importante, pues permite eliminar la competencia y/o antagonismo de hongos y otras bacterias y así mantener altos números de rizobios por mayor tiempo (Smith, 1992). Así mismo, la utilización de soportes estériles elimina el peligro potencial de diseminar semillas de malezas y patógenos de plantas o del hombre (Olsen *et al.*, 1994).

La esterilización en autoclave es un método común y efectivo que permite elaborar cultivos absolutamente puros de rizobios (Strijdom y Jansen van Rensburg, 1981; Williams, 1984). Sin embargo, como cualquier metodología, puede presentar desventajas. Por una parte aumentaría los costos de producción debido al consumo de electricidad o gas, y, por otro, un calentamiento excesivo del soporte podría provocar a la formación de compuestos tóxicos para los rizobios (Roughley, 1970; Strijdom y Jansen van Rensburg, 1981).

* Laboratorio de Microbiología «Marino Tabusso», Universidad Nacional Agraria La Molina, Apartado Postal 456, Lima 1, Perú. Email: dzuniga@lamolina.edu.pe.

En un intento por minimizar las desventajas descritas, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el tiempo mínimo necesario para esterilizar soportes basados en mezclas de suelo y compost.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de los soportes

Se utilizaron tres compost adquiridos en diferentes viveros de la ciudad de Lima y una muestra de suelo recolectado en el campus de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Los materiales fueron secados a 60 °C por 24 h, tamizados a través de una malla de 0,25 mm y su humedad se ajustó a 5% (Roughley, 1970; Williams, 1984) con agua destilada estéril. Las muestras de compost fueron mezclados por separado con el suelo en la proporción de 2:3 (p:p) (Matos, 1994) y los soportes resultantes fueron empaquetados en bolsas de polietileno de alta densidad (50 g). La abertura se cerró mediante un doble asegurado con tres clips de metal (Abd El Maksoud *et al.*, 1988).

Esterilización y evaluaciones

Se evaluaron tres tratamientos de esterilización en autoclave a 121 °C y 15 libras/pulgada² en dos días consecutivos (minutos, minutos): 30-30, 45-30 y 45-45. Los soportes se incubaron a 30 °C entre ambas esterilizacio-

nes (Alder y Simpson, 1982; Stroetmann *et al.*, 1994). La población microbiana se cuantificó por el método de dilución decimal y recuento en placa. Para bacterias se utilizó Agar Estandarizado de Thornton's incubado a 30 °C por 5 días (UNSCH, 1980) y para hongos Agar Extracto de Malta suplementado con 100 mg/L de oxitetraciclina e incubado a 22 °C por 5 días (Merck, 1994). Los datos de población bacteriana se expresan como Log₁₀ UFC/g (Sokal y Rohlf, 1979).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha demostrado que los soportes basados en suelo y/o compost constituyen una alternativa razonable para elaborar inoculantes para leguminosas en lugares donde la turba, el material de soporte ideal, no está disponible (Chao y Alexander, 1984; Abd El Maksoud *et al.*, 1988; Matos, 1994; Ormeño y Zúñiga, 1999). Sin embargo, los materiales mencionados contienen una flora bacteriana que incluye bacterias esporuladas termorresistentes y por lo tanto se requiere de mayor tiempo de exposición al calor para esterilizarlos (Pflug y Holcomb, 1977; Molin, 1982). Las tres muestras de compost utilizadas en este estudio presentaron una humedad y recuentos iniciales de bacterias y hongos mayores que la muestra de suelo (Tabla 1). Luego de secar estos materiales la humedad disminuyó a menos de

Tabla 1. Humedad y población microbiana inicial de los materiales utilizados para elaborar los soportes que se van a utilizar como inoculantes para leguminosas.

Material	Humedad Inicial (%)	Población inicial (Log UFC/g)	
		Bacterias	Hongos
Suelo	15,1	5,6	3,6
Compost 1	90,6	7,1	5,2
Compost 2	84,7	7,3	5,9
Compost 3	95,5	8,2	5,3

5% y la carga microbiana en aproximadamente 3 unidades logarítmicas (datos no mostrados). Si bien este primer tratamiento térmico disminuyó la carga bacteriana, aún se detectaron bacilos esporulados mediante observación microscópica entre los microorganismos sobrevivientes.

En las Figuras 1 y 2 se muestra el efecto de los tratamientos de esterilización en la población de bacterias y hongos, respectivamente. El primer tratamiento (30', 30') sólo logró

esterilizar el soporte 2 y eliminar la población de hongos del soporte 3, mientras que con el segundo (45', 30') y tercer (45', 45') tratamientos se lograron esterilizar los tres soportes. Pramakik e Iswaran (1973), Chao y Alexander (1984) y Beck *et al.* (1993) reportan 3 horas de exposición para esterilizar soportes basados en suelo, suelo-turba, suelo-carbón o suelo-compost. El menor tiempo requerido aquí para esterilizar tres soportes basados en suelo y compost demuestra que no

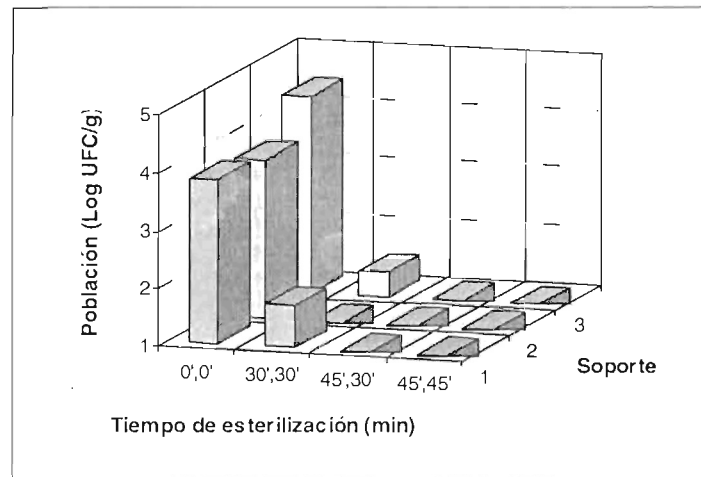


Figura 1. Efecto de los tratamientos de esterilización en autoclave en la población bacteriana de los soportes que se van a utilizar como inoculantes para leguminosas.

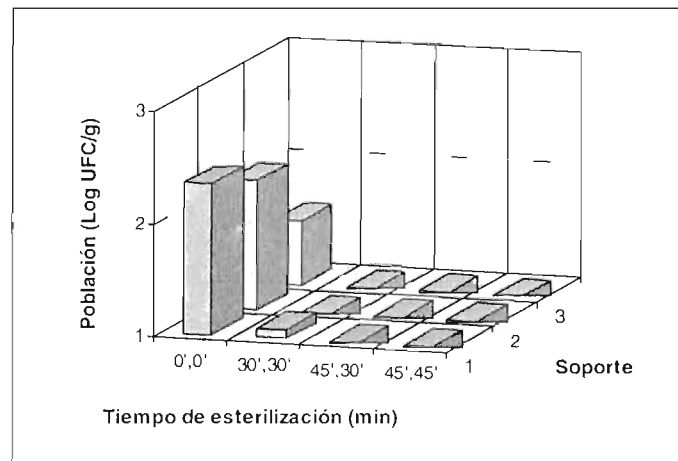


Figura 2. Efecto de los tratamientos de esterilización en autoclave en la población de hongos de los soportes a ser utilizados como inoculantes para leguminosas.

se requiere de un tratamiento prolongado (varias horas). El ajuste de humedad de los soportes a 5% y el libre acceso del vapor a las bolsas pueden haber aumentado la eficiencia del tratamiento térmico, ya que la esterilización en autoclave se basa en la exposición a vapor saturado. A este respecto, Beck *et al.* (1993) recomiendan humedecer los soportes antes de la esterilización y Abd El Maksoud *et al.* (1988) reportan que bastaron 45 minutos de exposición para esterilizar compost en condiciones de libre acceso del vapor al material. Otro factor importante pudo haber sido la esterilización fraccionada. Stroetmann *et al.* (1994) señalan que el calentamiento fraccionado produce una reducción significativa en la carga microbiana de suelos. Alder y Simpson (1982) explican este fenómeno indicando que el primer calentamiento mata las formas vegetativas y cualquier espora sobreviviente germinará produciendo nuevas formas vegetativas, que morirán en los calentamientos sucesivos.

CONCLUSIÓN

Se concluye que la esterilización fraccionada en autoclave a 121 °C y 15 libras/pulgada² en dos días consecutivos, por 45 y 30 minutos, es suficiente para esterilizar mezclas de suelo y compost. Estas pueden ser así utilizadas como soporte en la producción de inoculantes para leguminosas de alta calidad y bajo costo.

LITERATURA CITADA

- Abd El Maksoud, H.K., M.S.M. Saber y P. Somasegaran. 1988. "Evaluation of the composting sheath of peanut pods as a local carrier for *Rhizobium* inoculants production". Egypt. J. Microbiol. 23: 473-483.
- Alder, V.G. y R.A. Simpson. 1982. "Sterilization and disinfection by heat methods". pp. 433-453. En: Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. A. D. Russell, W. B. Hugo y G. A. J. Ayliffe (Eds.). Oxford. Blackwell Scientific Publications.
- Beck, D. P., L. A. Materon y F. Afandi. 1993. Practical *Rhizobium*-Legume Technology Manual. Technical Manual N°. 19. Alepo. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA).
- Chao, W. L. y M. Alexander. 1984. "Mineral soils as carriers for *Rhizobium* inoculants". Appl. Environ. Microbiol. 47: 94-97.
- Hamdi, Y.A. 1985. La fijación del nitrógeno en la explotación de los suelos. Boletín de suelos de la FAO N° 49. Roma. FAO.
- Matos, G. 1994. Aislamiento de *Rhizobium* de diferentes variedades de pallar (*Phaseolus lunatus*) y estudio de su eficiencia en la productividad de la leguminosa. Tesis para optar el título de Biólogo. UNALM. Lima.
- Merck. 1994. Manual de Medios de Cultivo. Merck. Darmstad.
- Molin, G. 1982. "Destruction of bacterial spores by thermal methods". pp. 454-468. En: Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. A. D. Russell, W.B. Hugo y G. A. J. Ayliffe (Eds.). Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Olsen, P. E., W. A. Rice y M. M. Collins. 1994. "Biological contaminants in North American legume inoculants". Soil Biol. Biochem. 27: 699-701.
- Ormeño, E. y D. Zúñiga. 1999. "Supervivencia y características simbióticas de *Bradyrhizobium* sp. inoculado en una mezcla de suelo y compost". Biota. 17(99): 41-49.
- Pflug, I. J. y R. G. Holcomb. 1977. "Principles of thermal destruction of microorganisms". pp. 933-994. En: Disinfection, Sterilization and Preservation. S.S. Block (Ed.). Lea y Febiger. Filadelfia.
- Pramanik, M. y V. Iswaran. 1973. "Survival of *Rhizobium japonicum* in various carriers". Zbl. Bakt. Abt. II. 128: 232-239.
- Roughley, R. J. 1970. "The preparation and use of legume seed inoculants". Plant Soil. 32: 675-701.
- Smith, R. S. 1992. "Legume inoculant formulation and application". Can. J. Microbiol. 38: 485-492.
- Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1979. "Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica". H. Blume Ediciones. Madrid
- Strijdom, B. W. y H. Jansen van Rensburg. 1981. "Effect of steam sterilization and gamma irradiation of peat on quality of *Rhizobium* inoculants". Appl. Environ. Microbiol. 41: 1344-1347.
- Stroetmann, I., P. Kämpfer y W. Dott. 1994. "The efficiency of sterilization methods for different soils". Zentralbl. Hyg. Umweltmed. 195: 111-120.
- UNSCH (Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga). 1980. Manual de Microbiología de Suelos. UNSCH. Huamanga.
- Williams, P. M. 1984. "Current use of legume inoculant technology". pp. 173-200. En: Biological Nitrogen Fixation: Ecology, Technology and Physiology. Alexander M. (Ed.). Plenum Press Corporation. New York.