

ACTIVIDADES EN FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA DE SUELOS SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS

Labandera, C.¹

RESUMEN

El Programa de Fijación Biológica del Nitrógeno del Departamento de Microbiología de Suelos se inició en 1960 a partir de una consultoría australiana, con el objetivo de estudiar la importancia de la inoculación con rizobios en el establecimiento, productividad y persistencia de las leguminosas forrajeras en el país. En el presente trabajo se describen los antecedentes, visión institucional, objetivos, actividades, logros y perspectivas del Programa. Se destaca la importancia de la articulación funcional entre el Departamento, la industria de Inoculantes y los productores, en la adopción de la tecnología y en la difusión del impacto de la fijación biológica de nitrógeno en condiciones de producción y en la sostenibilidad de los recursos naturales.

PALABRAS CLAVE: nitrógeno, leguminosa, *Rhizobium*, simbiosis, inoculantes, sostenibilidad.

SUMMARY

BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION ACTIVITIES DEPARTMENT OF SOIL MICROBIOLOGY PRESENT SITUATION AND PERSPECTIVES

The Biological Nitrogen Fixation Programme of the Department of Soil Microbiology was created in 1960 from an Australian Consultancy, with the aim of studying the importance of rhizobia inoculation in the establishment, productivity and persistence of forage legumes in the country. The present document describes the background, institutional vision, objectives, activities, outcomes and perspectives of the Programme. It emphasizes the importance of the functional relationship between the Department, the Inoculants Industry and the Farmers in the adoption of this technology and the spreading of the impact of the biological nitrogen fixation in the field and in the sustainability of natural resources.

KEY WORDS: nitrogen, legume, *Rhizobium*, symbiosis, inoculants, sustainability

INTRODUCCIÓN

Este trabajo refiere a antecedentes, visión institucional, objetivos, actividades, logros y perspectivas del Programa de Fijación Biológica de Nitrógeno y Control de Calidad de Inoculantes para Leguminosas del Departamento de Microbiología de Suelos-Dirección General de Recursos Naturales Renovables Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de Uruguay. El Departamento se creó en 1960 en el Plan Agropecuario, a partir de una consultoría

australiana, con el objetivo de estudiar el rol de la inoculación con rizobios en el establecimiento, productividad y persistencia de las leguminosas forrajeras en el país.

Entre 1960 y 1970 se realizó un amplio programa de selección de cepas de rizobios para leguminosas forrajeras y de soportes (turba) para la fabricación de inoculantes. Producto de este primer esfuerzo se estableció la Industria Nacional de Inoculantes y el marco legal para garantizar la calidad del producto. De esta manera se generó un estrecho vínculo funcional entre del Departamento, la Industria

¹Departamento de Microbiología de Suelos, Dirección General de Recursos Naturales Renovables (RENARE), Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), Burgues 3208. Montevideo, Uruguay.
E-mail: clabandera@mgap.gub.uy www.mgap.gub.uy/renare

de Inoculantes y los Productores Agropecuarios. Se destaca el rol que cumplió el Plan Agropecuario en la difusión y aplicación de esta tecnología en los predios y en la identificación de los factores limitantes de la simbiosis en condiciones de producción, lo que permitió definir un programa de investigación en repuesta a las demandas del sector productivo.

Entre 1970 y 1980 los proyectos se extendieron a otras leguminosas, especialmente soja como respuesta al interés del país por el cultivo.

En el período 1980-1990 se generalizó el uso de turba estéril como soporte en la formulación de los inoculantes y se ampliaron los niveles de exigencia a 2 y 1×10^{-9} rizobios vivos por gramo de producto para la comercialización y al vencimiento respectivamente, lo que permitió una mejora sustantiva en la calidad de los inoculantes en el país y en el establecimiento de las leguminosas. En el mismo período el Departamento es nominado por la comunidad científica latinoamericana Sede de la Secretaria Ejecutiva Permanente de la Asociación Latinoamericana de Rizobiología (ALAR) para coordinar y promover las actividades en Fijación Biológica de Nitrógeno en los países de América Latina y del Caribe y coordinar la realización de las RELAR. (10^o RELAR – Maracay, Venezuela, 1980). Esta actividad se ha desarrollado con apoyo de FAO.

A partir de 1990 se estableció una importante relación interdisciplinaria e interinstitucional a través de proyectos de investigación con financiamiento externo y de tesis de grado con estudiantes Universitarios, lo que permitió extender las actividades al estudio del potencial agronómico de otros microorganismos promotores del crecimiento de las plantas con énfasis en gramíneas.

Desde el 2000 se desarrolla un amplio rango de actividades y proyectos con énfasis en fijación biológica de nitrógeno por la simbiosis Rhizobium-leguminosas pero manteniendo esfuerzos crecientes en otros sistemas principalmente bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en arroz y bacterias rizosféricas principalmente *Azospirillum* en maíz. Se enfatiza en la definición de una política de investigación basada en proyectos de colaboración de nivel interno e internacional. Paralelamente se desarrollan y validan con el apoyo de la industria nuevas formulaciones de inoculantes (inoculantes líquidos) y tecnologías de inoculación, fundamentalmente en respuesta al auge creciente del cultivo de la soja en el país.

SITUACIÓN ACTUAL

El enfoque del Departamento refiere a la importancia de conocer y manejar las interacciones plantas-microorganismos para mejorar la rentabilidad de las em-

presas agropecuarias y la sostenibilidad de los recursos naturales. Para efectivizarlo es necesario consolidar el programa multidisciplinario e interinstitucional de investigación, garantizar altos niveles de calidad en los inoculantes comerciales y una adecuada difusión de las ventajas de la inoculación.

A continuación se describen las principales áreas de actividad:

Fijación Biológica de Nitrógeno y selección de cepas en leguminosas forrajeras de uso actual y potencial.

Fijación Biológica de Nitrógeno y selección de cepas en soja.

Promoción de crecimiento en gramíneas, microorganismos rizosféricos en maíz y endófitos en arroz.

Desarrollos tecnológicos de nuevos inoculantes y tecnologías de inoculación.

Mantenimiento y caracterización de la Colección Nacional de Cepas de *Rhizobium*.

Control de calidad de inoculantes para leguminosas.

Actualización del marco legal para el comercio de inoculantes.

Comunicación/difusión de avances.

Las actividades en leguminosas forrajeras profundizan el conocimiento sobre eficiencia de cepas, interacciones cepa-huésped, rol de las poblaciones nativas y efecto de la concentración de rizobios en la semilla inoculada en el establecimiento y productividad de *Lotus corniculatus*, *L. subbiflorus*, *L. uliginosus*, *Medicago sativa*, *Trifolium repens* y *T. pratense*. A su vez, se desarrollan proyectos conjuntos con INIA para evaluar en simbiosis más de 300 nuevas especies de leguminosas forrajeras templadas y subtropicales para áreas de ganadería extensiva, con énfasis en suelos superficiales de basalto. (FPTA 97 y 157) Recientemente se inició con apoyo de FAO una línea de actividad en leguminosas nativas herbáceas y sus rizobios asociados, disponiendo de una colección caracterizada de aislamientos de rizobios que posibilitará la evaluación de especies promisorias en simbiosis (Jaurena y col., 2005).

El cultivo de soja presenta actualmente en el país un incremento muy significativo en el área sembrada que se acompaña de un cambio en actores y tecnologías. Las líneas actuales de investigación enfatizan los estudios de selección de cepas, respuesta a la inoculación en campos con y sin historia previa, y el efecto agronómico integrado del rol de los fungicidas utilizados como cura semillas. Paralelamente se validan nuevas formulaciones de inoculantes y técnicas de inoculación.

Las actividades en arroz pretenden aislar y caracterizar bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en cultivos comerciales con el objetivo de conocer su potencial agronómico y su rol en la sostenibilidad del cultivo. Los aisla-

mientos obtenidos pertenecen a los géneros: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Paenibacillus* y bacterias aeróbicas. Ensayos realizados en condiciones controladas mostraron una respuesta significativa a la inoculación. Las líneas actuales de investigación enfatizan estudios de respuesta a la inoculación en campo y de manejo del potencial endófito nativo del cultivo a través de la política de fertilización (especialmente nitrógeno) y de los planes de mejoramiento del cultivo (Punschke y col., 2003).

Las actividades en maíz pretenden el ajuste de las tecnologías de fabricación y uso de inoculantes en base a bacterias del género *Azospirillum*, el seguimiento de la bacteria inoculada a nivel de rizósfera y como microorganismo endófito, y el análisis de las respuestas agronómicas a la inoculación.

Los criterios que utiliza el Programa Nacional de Selección de Cepas de rizobios para inoculantes de leguminosas son los siguientes: eficiencia para fijar nitrógeno; competencia saprofítica; compatibilidad interespecífica; estabilidad genética; comportamiento industrial; sobrevivencia en semillas y tolerancia a factores bióticos y abióticos. Las actividades de selección se implementan en el Laboratorio en cámaras de crecimiento en condiciones controladas; en invernáculo y en campo en diferentes años y localidades. Las recomendaciones de cepas a la industria de inoculantes se realizan integrando criterios de selección y resultados de ensayos (Labandera y col., 1970).

El Departamento es responsable del mantenimiento y caracterización de la Colección Nacional de Cepas de *Rhizobium* integrada actualmente por 666 cepas. Se mantiene en glicerol a -80° C con un duplicado en tubos roscados con agar levadura manitol en refrigeración. Las cepas recomendadas a la industria también se conservan en ampollas liofilizadas. Adicionalmente existen 257 microorganismos aislados de plantas de arroz que se mantienen en glicerol a -80° C. Existe un control de mantenimiento de las características simbióticas originales de las cepas recomendadas que se implementa antes de su liberación a la industria (Labandera & Vincent, 1972; 1975).

Las actividades de control de calidad de inoculantes para leguminosas están reguladas por los Decretos 546/81 del 28 de octubre de 1981 y 7/99 del 8 de enero de 1999. Este control se implementa en fábrica sobre todos los lotes producidos antes de su liberación al mercado y en los centros de venta. El Departamento define las fechas de vencimiento y tiene potestad para introducir cambios en el marco legal y mediar en eventuales problemas relacionados al establecimiento y funcionamiento de la simbiosis a nivel de campo. Es la Institución de Referencia uruguaya en el MERCOSUR y como tal participa en la definición de los aspectos técnicos, administrativos y legales que hacen al comercio regional de los

inoculantes. Los parámetros de calidad que se utilizan refieren a: concentración (número de microorganismos vivos por unidad de producto), pureza (ausencia de microorganismos no declarados) e identidad (presencia del organismo suministrado por el Departamento) determinada por perfil electroforético de enzimas multilocus (MLEE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Particularidades simbióticas de las principales leguminosas forrajeras sembradas en Uruguay

Las especies de tréboles más utilizadas en el país (*Trifolium repens* - trébol blanco, *T. pratense* - trébol rojo) pueden tener dificultades para lograr una nodulación exitosa debido a la presencia en los suelos, de cepas que nodulan *Trifolium polymorphum* - trébol de campo o polimorfo, pero que son parásitas en dichos tréboles. Este problema se manifiesta con máxima intensidad en siembras en potreros de campo natural (Labandera & Vincent, 1975).

Trébol blanco es la especie que presenta los mayores problemas debido al tamaño pequeño de la semilla que limita el número de rizobios (la presencia de rizobios específicos en número suficiente sobre la semilla es imprescindible para una rápida y eficiente nodulación) (Dutto y col., 1998). Trébol rojo tiene un comportamiento simbiótico similar al trébol blanco. Sin embargo, los problemas de nodulación en trébol rojo suelen ser menores, debido al mayor tamaño de semilla. Los inoculantes para trébol blanco y rojo se fabrican con la misma cepa de rizobio.

Para *Medicago sativa* - alfalfa existen cepas nativas efectivas, pero la inoculación mejora la implantación y la persistencia productiva del cultivo (Proyecto FONTAGRO, 2000).

Las distintas especies de *Lotus* que se utilizan en el país presentan relaciones que van desde alta eficiencia hasta el parasitismo. *Lotus uliginosus* y *L. subbiflorus* son del mismo grupo simbiótico y presentan inoculantes específicos. Los efectos productivos de la inoculación de estas especies son muy altos debido a que no existen rizobios nativos específicos de estas especies en nuestros suelos o que su presencia es tan escasa que no puede ser detectada por los métodos de cuantificación disponibles. Por su parte, *L. tenuis* y *L. corniculatus* pertenecen a otro grupo simbiótico, se inoculan con la misma cepa y presentan respuestas a la inoculación aún en suelos con poblaciones nativas efectivas de rizobios. Los rizobios del inoculante son más eficientes que las cepas nativas, están estratégicamente ubicados sobre la semilla con la concen-

tracción necesaria (consecuencia de la inoculación), como para inducir una rápida y eficiente formación de nódulos. Si se siembran en forma consecutiva especies de *Lotus* de diferentes grupos simbióticos, como por ejemplo *L. subbiflorus* y/o *L. uliginosus* en un campo con historia de *L. corniculatus* o viceversa, es muy importante extremar los cuidados de la inoculación para evitar fracasos en la implantación (Pérez y col., 1998).

Impacto de la Fijación Biológica de Nitrógeno

En las leguminosas forrajeras existe una relación muy estrecha entre la producción de materia seca y la cantidad total de nitrógeno fijado. En nuestro país, por cada tonelada de materia seca producida por la leguminosa, se fijan aproximadamente 30 kilos de nitrógeno. En el caso de una pastura de segundo año, con una producción de 12 toneladas de materia seca por hectárea, donde las leguminosas representan el 60%, se fijarían 216 kilos de nitrógeno por hectárea, que equivalen a 470 kilos de urea. En consecuencia, la principal limitante de la cantidad total de nitrógeno fijado en una pastura se relaciona con el porcentaje de leguminosas en la mezcla y su productividad (Labandera y col., 1988; Danso y col., 1991; García y col., 1995).

En las rotaciones de cultivos y pasturas de los sistemas agrícola-ganaderos, el impacto del nitrógeno fijado durante la fase de pastura fue demostrado a partir de los ensayos de rotaciones iniciados en 1963 por el CIAAB (hoy INIA). Aquellas rotaciones con 50% del tiempo bajo pasturas con leguminosas y 50% bajo cultivos lograron un balance final con escasas pérdidas de nitrógeno en el suelo, mientras que en los sistemas con agricultura continua hubo pérdidas aproximadas a los 50 kilos de nitrógeno por hectárea y por año. Por su parte, en los sistemas con leguminosas en la rotación, el suelo perdió 8 veces menos materia orgánica por erosión que en los casos de agricultura continua. Las rotaciones con pasturas presentaron una mayor producción acumulada de grano para todo el período analizado (1963-1989), con rendimientos promedio mayores y más estables, todo lo cual redundó en mayor margen bruto y menor riesgo por la diversificación de rubros. La productividad del cultivo posterior presentó una correlación altamente significativa con la producción de materia seca de la pastura en el año previo, pues como ya se dijo, este parámetro está directamente relacionado con la cantidad de nitrógeno fijado. Así, diferencias por

hectárea de 10 toneladas de materia seca de forraje significaron 250 kilos/ha de nitrógeno fijado y 1000 kilos/ha de incremento en el rendimiento del cultivo de trigo posterior. Se demostró también que los rendimientos de grano de los sistemas con pasturas son superiores y no se pueden equiparar mediante el agregado de fertilizantes; esto implica que existe un efecto de las pasturas que no sólo está dado por la fijación del nitrógeno atmosférico (ahorro de fertilizante nitrogenado) sino también, por una acción beneficiosa sobre las propiedades físicas del suelo, que entre otras cosas, permite mayor desarrollo radicular y mejor aprovechamiento del agua y de los nutrientes (Díaz, 1980).

En nuestros suelos no existen cepas nativas capaces de producir nódulos en el cultivo de soja, lo que determina una respuesta del orden de 800 a 1000 kilos/há en chacras sin historia previa. Estos aumentos en el rendimiento se acompañan con mayor peso de los granos y mayores porcentajes de proteína en la hoja y en el grano. Sin embargo, cuando se siembra soja en suelos con historia, la respuesta es menor porque la cepa del inoculante persiste en el suelo. La semilla de soja normalmente se comercializa "curada" con fungicidas, algunos de los cuales resultan muy perjudiciales para la nodulación. En estos casos se debe tener en cuenta el principio activo, la dosis, los excipientes y el tiempo entre el curado y la inoculación.

Finalmente, se destaca la importancia de la articulación funcional entre el Departamento, la Industria de Inoculantes y los Productores, en la adopción de la tecnología y en la difusión del impacto de la fijación biológica de nitrógeno en condiciones de producción y en la sostenibilidad de los recursos naturales. Esta situación representa para el sector agropecuario y para el país, un ahorro anual de unos 150 millones de dólares por sustitución parcial de fertilizantes nitrogenados, que hubiera sido necesario importar para intentar alcanzar los niveles de productividad de las pasturas y de los cultivos. Aún así, estos sistemas no hubieran sido sustentables en el tiempo, puesto que el mecanismo de la fijación biológica es ecológicamente más estable y hace uso de un recurso natural renovable.

AGRADECIMIENTOS

Al personal técnico y de apoyo del Departamento por su activa participación en la implementación de las actividades mencionadas.

BIBLIOGRAFÍA

- DANSO, S.K.A.; CURBELO S.; LABANDERA, C. & PASTORINI D. 1991. Herbage Yield and Nitrogen Fixation in a Triple-species mixed Sward of White Clover, Lotus and Fescue. *Soil Biol. Biochem* 23:65-70.
- DÍAZ, R. 1980. Rotaciones. Miscelánea No 24 CIAAB.
- DUTTO, P.; LABANDERA, C.; MILIÁN, A.; RISSO, D. & FORMOSO, F. 1988. Efecto del número de rizobios por semilla en la producción de materia seca del trébol blanco. Actas de la XIX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología.
- JAURENA, M.; MAYANS, M.; PUNSCHKE, K.; REYNO, R.; MILLOT, J. & LABANDERA, C. 2005. Diversidad simbiótica en leguminosas forrajeras nativas: aportes para el mejoramiento sustentable del campo natural. INIA Treinta y Tres, Serie Técnica N° 151.
- GARCÍA, J.A.; LABANDERA, C.; PASTORINI, D. & CURBELO, S. 1995. Seasonal variation in nitrogen fixation of temperate forage legumes. Agronomic applications of biological nitrogen fixation. Compendio de actividades Proyecto SAREC Fundación Campomar. Buenos Aires, Argentina.
- LABANDERA C. & VINCENT J.M. 1972. Importancia del mantenimiento, control periódico y selección cuantitativa de las cepas de rizobios usadas en los inoculantes comerciales. VI Reunión Latinoamericana sobre *Rhizobium*.
- LABANDERA, C. & VINCENT, J.M. 1975. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil* 42:327-347.
- LABANDERA, C. & VINCENT, J.M. 1975. Loss of symbiotic capacity in commercially useful strains of *Rhizobium trifolii*. *Appl. Bact.* 39:209-211.
- LABANDERA, C.; DANSO, S.K.A.; PASTORINI, D.; CURBELO, S. & MARTIN, V. 1988. Nitrogen Fixation in a white clover-fescue pasture using three methods of Nitrogen-15 application and residual Nitrogen-15 uptake. *Agronomy Journal* 80:265-268.
- PÉREZ, E. & LABANDERA, C. 1998. Especificidad simbiótica dentro del género Lotus. Actas de la XIX Reunión Latinoamericana de Rhizobiología.
- PROYECTO FONTAGRO Desde 2000. Contribución a una producción sustentable de alfalfa mediante el manejo de microorganismos rizosféricos en Argentina, Chile y Uruguay.
- PUNSCHKE, K.; CARLOMAGNO, M. & LABANDERA, C. 2003. Potencial agronómico de bacterias endófitas diazotróficas en arroz. 2003. 3° Conferencia Internacional de arroz de clima templado. Actas, Punta del Este, Uruguay.