



www.suelosvivos.es



Regenerando vida en suelos de viñedos gaditanos

Grupo Operativo Regional Suelos Vivos

Regenerando vida en suelos de viñedos gaditanos



Colaboran



Manual para la elaboración de inoculantes microbianos complejos para regenerar los suelos de los cultivos

FECHA: Julio 2024



UNIÓN EUROPEA  
Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural



Junta de Andalucía

Inversión subvencionada con fondos Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER) por la Junta de Andalucía

## AUTORES

**Raúl Ochoa-Hueso<sup>1</sup>**

**Isabel M. Liberal<sup>1</sup>**

**Juan F. Aguiar<sup>1</sup>**

**Emma Cantos-Villar<sup>2</sup>**

**Belén Puertas<sup>2</sup>**

**Ramón Casimiro-Soriguer<sup>1</sup>**

1 Departamento de Biología, Área de Botánica, IVAGRO, Universidad de Cádiz, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3), Puerto Real, Cádiz.

2 IFAPA, Rancho de la Merced, Consejería de Agricultura, Pesca, Agua y Desarrollo Rural, Junta de Andalucía, Jerez de la Frontera.

# Manual para la elaboración de inoculantes microbianos complejos para regenerar los suelos de los cultivos

El conjunto de la microbiota del suelo y sus funciones, también conocido como microbioma del suelo, es particularmente importante para la reconversión de los sistemas productivos a través de su control sobre la nutrición e inmunidad vegetal. Estos organismos de reducido tamaño, entre los cuales se incluyen microorganismos como bacterias, hongos, arqueas, algas y protozoos, así como pequeños invertebrados tales como nemátodos, viven en estrecha asociación con diferentes partes de la planta, incluyendo raíz, tallo, hoja, flores y frutos. A estos organismos los podemos encontrar viviendo tanto en la superficie de los órganos vegetales (epífitos) como en el interior de los tejidos (endófitos), donde contribuyen a regular los ciclos de nutrientes, a la síntesis de compuestos útiles para las plantas (por ejemplo, factores de crecimiento, vitaminas o fitohormonas) y a la eliminación de patógenos y plagas. Estos organismos son especialmente abundantes en la rizosfera, la delgada capa de suelo alrededor de las raíces.

Ejemplos paradigmáticos de asociaciones beneficiosas entre organismos del suelo y los cultivos incluyen tanto los hongos micorrícicos, como las bacterias solubilizadoras de fósforo o las bacterias promotoras del crecimiento. Además de su importancia para la nutrición y la defensa contra las plagas y enfermedades, estas asociaciones son fundamentales para promover la tolerancia al estrés ambiental (por ejemplo, sequías y olas de calor) por parte de las plantas, así como para la productividad de los cultivos.

La inoculación de los cultivos con comunidades microbianas beneficiosas se ha implantado en los últimos años como una herramienta esencial para acelerar la regeneración de los suelos y dirigir la rápida transición hacia el estado de salud deseado de las tierras agrícolas. La inoculación con microorganismos puede involucrar el uso de productos comerciales que contengan una o varias cepas microbianas con funciones conocidas (por ejemplo, solubilización de fósforo, fijación de nitrógeno, etc.) o la aplicación de biopreparados, o sus extractos, que contengan multitud de especies

como, por ejemplo, el compost, el bokashi o el humus de lombriz. Otra estrategia cada vez más popular, sobre todo en los ámbitos más ligados a la agricultura regenerativa, es utilizar microorganismos indígenas (IMO, por sus siglas en inglés) procedentes de ecosistemas forestales dominados por hongos para la preparación de diversos inóculos a través de un proceso de fermentación en varias fases.

También se ha sugerido la posibilidad de usar alícuotas de suelo procedentes de sistemas especialmente sanos como inóculo para regenerar el funcionamiento de los ecosistemas. La eficacia de este enfoque se ha demostrado durante la sucesión natural en campos agrícolas abandonados. Al restaurar hábitats seminaturales, la introducción de pequeñas cantidades de tierra vegetal (es decir, la inoculación con comunidades enteras del suelo) procedentes de los sitios de referencia (por ejemplo, pastos o brezales) puede acelerar el desarrollo de la comunidad del suelo, lo que ayuda al establecimiento de la vegetación natural deseada.

Sin embargo, la evidencia empírica que respalda el potencial de la inoculación con comunidades enteras del suelo en la transición de un sistema de cultivo convencional a uno más basado en la naturaleza es más escasa. Además, una limitación de este enfoque es la cantidad de suelo necesaria y la perturbación que se crearía en el agroecosistema donante, lo que necesariamente limita la aplicabilidad de esta solución a operaciones a muy pequeña escala.

Una forma de superar esta limitación es mediante la preparación de grandes volúmenes de inóculos en condiciones controladas a partir de pequeñas alícuotas de suelo. Una alternativa para producir cantidades suficientes de este tipo de inóculos es la fermentación de materias primas vegetales esterilizadas, junto con suelos de rizosfera seleccionados por su elevado contenido de vida microbiana beneficiosa. Este último enfoque también podría utilizarse para proporcionar un valor añadido a los subproductos de la agricultura, lo que enlaza con el concepto de economía circular, que también está siendo altamente promovido por las instituciones europeas, nacionales, y regionales y que, además, supone una alternativa viable para la gestión de los residuos por parte de los agricultores.

Este manual aporta un procedimiento para la elaboración de inoculantes microbianos que contengan multitud de especies a partir de suelos de rizosfera previamente seleccionados y la fermentación en fase sólida de subproductos agrícolas, empleando la vid como caso de estudio, aunque se trata de una tecnología ampliamente transferible a cualquier otro tipo de cultivo, herbáceo o leñoso.

Un aspecto importante para considerar es que, dado que la elaboración de los inóculos que proponemos está basada en la degradación de restos vegetales, el tipo de comunidades que se van

a multiplicar estará necesariamente sobrerrepresentada en términos de organismos descomponedores. Para la multiplicación de otros organismos igualmente importantes para un cultivo sano tales como los simbiontes del tipo de micorrizas, hongos endófitos, etc., existen otras estrategias para la elaboración de inóculos que no recogemos en este documento.

En la siguiente figura se muestra un resumen de los pasos llevados a cabo para la elaboración de inóculos microbianos basados en la fermentación en fase sólida y la multiplicación de organismos procedentes de suelos de rizosfera.



## Elaboración de inoculantes

IMPORTANTE: Es conveniente realizar un ensayo previo en macetas y o en un pequeño sector del cultivo



- 1

Recolección de suelo del alrededor de las raíces más finas de, al menos, 5 plantas con las características deseadas (mayor producción, resistencia a estrés, aromas, etc.), cuando la planta esté en crecimiento o iniciando la producción





- 2

Preparar el sustrato para la fermentación a partir de residuos agrícolas disponibles (restos de poda, raspones y orujos) -relación carbono: nitrógeno 30:1- y añadir un activador del crecimiento microbiano (lías): acopio, secado, mezcla, triturado y esterilización





- 3

Preparar una mezcla del sustrato estéril con una cantidad del suelo recogido (inóculo): 1 g de suelo en 200 g de sustrato húmedo y dejar fermentar durante dos meses, en lugar oscuro, vigilando el proceso. Secado del inóculo a temperatura menor a 30° y trituración para su uso





- 4

Aplicación (foliar, diluido en sistema de riego, seco, etc.) a una dosis de 0,4 kg/ha, 2-3 veces durante el ciclo de cultivo para optimizar el efecto de nuestro inocularante








Más información

www.suelosvivos.es




## ETAPAS PARA LA ELABORACIÓN Y APLICACIÓN DE INÓCULOS

### 1. Selección de la planta donante del inóculo y recogida de muestras de suelo

Este es un aspecto fundamental del protocolo. Para obtener una representación de los principales organismos (bacterias, hongos, algas, protozoos, etc.) que podrían asociarse de forma beneficiosa con las plantas, debemos obtener suelo procedente de la rizosfera de plantas compatibles con nuestro cultivo y, preferiblemente, del mismo tipo de cultivo (por ejemplo, rizosfera de la vid para inocular viñedos). Seleccionaremos las plantas por su estado de salud general, basándonos en observaciones previas, por su rendimiento, o por cualquier otra característica agronómica que sea de nuestro interés y que hayamos identificado en la planta/s donante/s. En el caso de la viña, podemos seleccionar plantas que hayan tenido un elevado rendimiento, o cuyas características enológicas sean especialmente favorables para la elaboración de vinos de calidad (por ejemplo, ciertos perfiles organolépticos, de acidez, polifenoles, etc.).

Recogeremos muestras de suelo de rizosfera de al menos cinco plantas diferentes con el fin de maximizar la diversidad del inóculo. Es muy importante tener en cuenta el momento de muestreo para la elaboración de nuestro inóculo, dado que las comunidades microbianas del suelo son muy dinámicas y varían con la estación, la etapa fenológica del cultivo, así como la fase del ciclo de vida en que se encuentre la planta, desde su plantación hasta la fase productiva. A ser posible, seleccionaremos para el muestreo una época en la que la planta esté en una fase activa de crecimiento o en una fase reproductiva temprana (por ejemplo, floración o fase de engorde), evitando tomar muestras tras la maduración, así como procedentes de plantas senescentes.

En el caso de la viña, procederemos a cavar un agujero, de al menos 40 cm de profundidad en la base del portainjerto, en el que buscaremos raíces finas (<2 mm de diámetro). Una vez identificadas dichas raíces finas, procederemos a separar la porción de suelo adherido a ellas, que frecuentemente encontramos en forma de agregados. Estos suelos los iremos guardando en bolsas de plástico herméticas. De vuelta en nuestro lugar de operaciones (por ejemplo, el laboratorio), conservaremos los suelos a 4°C hasta su uso en un plazo máximo de 10-15 días. Si no se van a usar de forma inmediata para la elaboración de los inóculos, las muestras de suelo se pueden congelar a -20°C hasta su uso, lo que incluso podría tener efectos positivos adicionales, aunque esto es un aspecto poco estudiado.

## 2. Selección y preparación del medio de cultivo

Para la preparación del material que usa restos como medio de cultivo para la fermentación en fase sólida, es ideal emplear residuos que provengan de nuestra propia explotación, o de alguna explotación cercana. En el caso de la vitivinicultura, estos restos pueden incluir restos de poda, raspones, orujos y lías.

Estos restos, que corresponden a los residuos generados de forma más común durante la elaboración del vino deben proceder, siempre que sea posible, de viñedos con certificación ecológica o manejados de acuerdo con los principios de la agricultura regenerativa o biodinámica para evitar problemas relacionados con el crecimiento y desarrollo adecuado de las comunidades microbianas por la presencia de residuos tóxicos. En el caso de otros cultivos, el tipo de restos a emplear podría variar.

Tras la primera fase de acopio de material, procederemos a su secado, mezclado en unas determinadas proporciones, triturado, y a su posterior esterilización. Para secar podemos emplear un horno o una estufa a 60°C (48-72 horas). Para el triturado de ramas y raspones, podemos emplear una biotrituradora, mientras que para el micronizado de los orujos podemos emplear un molino.

El mezclado para el medio de cultivo debe estar basado en tres criterios fundamentales:

- ☺ la proporción carbono:nitrógeno de la mezcla final,
- ☺ la diversidad de compuestos a degradar, y
- ☺ la presencia de una fuente de energía rápida que funcione a modo de activador de la actividad microbiana.

En términos generales, y en el caso concreto de la viticultura, recomendamos mezclas con una proporción carbono:nitrógeno de 30:1 procedente de una diversidad alta de restos que aumente la complejidad molecular y estructural de la mezcla (restos de poda, raspones y orujos), así como la presencia de una fuente con un elevado contenido de energía fácilmente utilizable por los microorganismos (lías). Un sustrato de este estilo puede lograrse con una mezcla que contenga un 88,5% de restos de poda, un 4% de raspones, un 6,5% orujo y un 1% de lías. Dicha proporción de carbono:nitrógeno, así como el pH ácido de la mezcla (alrededor de 4,5) debería favorecer el desarrollo de una comunidad microbiana con una dominancia de hongos filamentosos diversos (descomponedores).

Una vez que tengamos la mezcla hecha en las proporciones indicadas en base a su peso seco, procederemos a humedecer la mezcla a capacidad de campo. Para ello emplearemos agua desionizada si es posible, y sino una fuente de agua lo menos dura posible.

Posteriormente, procederemos a su esterilización. El objetivo de la esterilización es doble. Por un lado, se pretende que los organismos que inoculemos no compitan con los organismos ya presentes en los residuos y, por otro lado, deshacernos de posibles enfermedades que estén presentes en dichos residuos. Allí donde tengamos acceso a un laboratorio de microbiología o similar, por ejemplo, en un departamento de una universidad o centro de investigación, podemos emplear un autoclave para dicha tarea (120°C durante 20 minutos). En el caso de que no dispongamos de autoclave, podemos emplear una olla a presión.

### 3. Fermentación en fase sólida

Introduciremos la mezcla estéril y ya enfriada en los recipientes donde vayamos a llevar a cabo la fermentación. Dichas fermentaciones pueden llevarse a cabo en frascos de vidrio de 2-3 l de volumen, a los que añadiremos un peso conocido de sustrato. El sustrato debe llenar aproximadamente 2/3 del recipiente. Tras esto, es el momento de añadir el inóculo procedente de la rizosfera. Recomendamos añadir el inóculo en una proporción no superior a 1:200, es decir, 1 gramo de suelo de rizosfera por cada 200 gramos de sustrato húmedo. Una vez introducido el inóculo, que puede ir diluido a su vez en agua desionizada en una proporción 1:10, procederemos a sellar la boca del recipiente con Parafilm, de forma que el aire pueda circular libremente, pero no haya pérdidas de agua.

A partir de este momento, dejaremos nuestros fermentos desarrollarse a temperatura ambiente (entre 20-25°C) y en condiciones de oscuridad por un periodo de alrededor de dos meses. Durante este periodo, debemos revisar de forma frecuente el estado de desarrollo de nuestro inóculo para asegurarnos de que la fermentación progresa de forma adecuada. La presencia de manchas blancas filamentosas indica un desarrollo adecuado de la comunidad. Además, es importante no detectar olores desagradables.

Tras dos meses de fermentación, nuestro inóculo basado en comunidades complejas estará listo para ser utilizado. Para ello, debemos proceder primero a su secado a 30°C. Es importante no secar los inóculos a más de 30°C para no matar a los hongos, que son muy sensibles a las altas temperaturas. Tras el secado, procederemos a micronizar el inóculo en partículas lo más finas posibles. Para ello, emplearemos una mascarilla para evitar respirar las esporas de los hongos y, a ser posible, realizaremos esta tarea en una campana extractora o en una habitación adecuadamente ventilada. La finalidad de micronizar el inóculo es poder aplicarlo diluido y no obstruir los difusores



de los equipos empleados a tal efecto. También es posible tamizar el inóculo final con el fin de quedarnos sólo con las partículas más finas.

El rendimiento de este proceso llevado a cabo en un recipiente de 2-3 l es de aproximadamente 200-300 g de inóculo seco, sin embargo, este proceso se puede escalar para producir mayor cantidad de inóculo. Para esto último, recomendamos emplear recipientes de mayor tamaño (hasta un cierto volumen que no implique el aumento de las temperaturas como en el caso del compostaje) respetando las proporciones o, mejor aún, preparar varios recipientes de forma paralela que, al final del proceso, se podrán unir. Por otro lado, para elaborar sucesivos lotes de inóculo tras la primera elaboración, usando como fuente de inóculo el suelo de rizosfera, podemos emplear directamente una pequeña fracción de inóculo ya preparado como fuente de microorganismos. Este fermento seco podría ser considerado a modo de masa madre iniciadora del proceso fermentativo.

## 4. Aplicación y dosis

Tras este proceso, el inóculo está listo para ser empleado directamente en solución acuosa, de forma sólida, o en forma de extracto (té) tras un periodo de incubación con agua y potenciadores del crecimiento de hongos y bacterias tales como algas marinas y melaza. Además, el modo de aplicación puede variar, desde aplicaciones foliares disueltas en agua hasta aplicaciones directas al suelo, secas o, de nuevo, diluidas en agua.

En el marco de los ensayos que hemos llevado a cabo, hemos aplicado los inóculos en forma mayoritariamente foliar con resultados muy positivos, ya que al aplicarlo en las hojas nos aseguramos de que los microorganismos aportados son capaces de acceder a todos los órganos de la planta, desde las hojas, flores y frutos, hasta la raíz y el suelo circundante, dado que una parte del producto añadido terminará goteando y cayendo por gravedad, cosa que no ocurriría si lo añadimos al suelo. Además, dado que lo que queremos es distribuir los microorganismos de la forma más amplia posible, no empleamos coadyuvantes, aunque es posible emplearlos si queremos restringir el área de aplicación de los microorganismos a la parte aérea de la planta (hojas, sobre todo).

En cuanto a la dosificación, basándonos en ensayos de campo y de jardín común con vides, recomendamos aplicaciones equivalentes a 0,1 g de inóculo seco por planta que, en caso de estar diluido en agua, se deberá añadir en una relación peso volumen de 1:500. En un viñedo, con una densidad de plantas de alrededor de 4.000 plantas por hectárea, esto se traduce en 0,4 kilogramos de inóculo seco en 200 l de agua. Por tanto, recomendamos una dosificación aproximada de 400 g/

ha. Esta dosificación podría variar para otros cultivos. Sin embargo, dado que estos rangos son equivalentes a los de inoculantes comerciales, los valores que aportamos sugieren un rango seguro para la aplicación.

El número de veces que se pueden aplicar los inóculos es otro aspecto importante. En nuestros ensayos, hemos aplicado inoculantes entre una y dos veces durante la estación de crecimiento (cuajado y envero), con resultados favorables, aunque seguramente se pueden aplicar más veces, con resultados aún por determinar. La baja dosificación, junto con el número relativamente bajo de aplicaciones, para lograr resultados significativos hace que este sea un proceso útil y razonablemente asequible que está disponible para el agricultor y que puede suponer un apoyo excepcional, y particularmente económico, para fomentar la salud de los suelos y las plantas en cultivos como la viña.

## CONSIDERACIONES FINALES Y RECOMENDACIONES PRÁCTICAS

Durante el proceso de elaboración de los inóculos, hemos detectado un aumento muy significativo de la producción de enzimas microbianas extracelulares cuyo papel es fundamental en la descomposición de la materia orgánica. Esto es compatible con la idea de que lo que estamos promoviendo es el desarrollo de microorganismos descomponedores. Además, hemos corroborado, empleando técnicas de secuenciación de ADN, que los inóculos preparados de esta manera contienen cientos de especies distintas de bacterias y hongos y que la presencia de hongos patógenos es anecdótica o bien están completamente ausentes. Esto lo hemos validado en múltiples ensayos en campo y jardín común, donde no hemos detectado en ningún caso infección relacionada con la adición de este tipo de inoculantes.

Por otro lado, y como se ha comentado previamente, la validación de este tipo de aproximación a la elaboración de inoculantes microbianos la hemos llevado a cabo en experimentos en campo y de jardín común, usando la vid como planta modelo. En estos casos, hemos ensayado diferentes tipos de inóculos elaborados a partir de muestras donantes distintas, aunque siempre seleccionados en base al elevado potencial metabólico de las muestras de suelo de rizosfera recolectadas. Aunque los diferentes inóculos sugieren funcionalidades distintas, hemos podido detectar efectos comunes relacionados con la adición de dichos inoculantes.

En cualquier caso, recomendamos que, si se van a elaborar inoculantes por primera vez, estos han de ser previamente ensayados en pequeñas parcelas dedicadas a tal efecto, y se ha de hacer un seguimiento cercano del desarrollo de dichas parcelas. También se pueden llevar a cabo ensayos en macetas. En el caso en que los resultados sean los esperados, lo ideal sería repetir el ensayo en un área un poco mayor y comprobar la replicabilidad del efecto y la ausencia de posibles efectos adversos (que, en nuestra experiencia, son altamente improbables) antes de aplicar los inoculantes a nivel de finca o explotación.

En este trabajo, hemos descrito un proceso de elaboración de inoculantes microbianos que podría ser de gran utilidad para agricultores que busquen regenerar el funcionamiento de sus explotaciones a través de promover la diversidad microbiológica y los procesos asociados a ella, sobre todo con relación al procesamiento de la materia orgánica. Esta aproximación puede ser especialmente útil para pequeños y medianos agricultores (unas pocas hectáreas), aunque por las dosificaciones tan bajas de aplicación, también es aplicable a fincas de mayor tamaño.

Aspectos adicionales para tener en cuenta que deben ser validados a través de futuros ensayos son tanto la replicabilidad de los inóculos en sí tras sucesivas rondas de elaboración, como la replicabilidad de los resultados. Respecto a la de los inóculos, ésta puede estar basada en la composición taxonómica (más difícil de alcanzar probablemente debido a los procesos estocásticos que gobiernan el ensamblaje de las comunidades microbianas) o en el perfil funcional de las comunidades, por ejemplo, los niveles de actividad enzimática (probablemente más fácil de alcanzar).

Un aspecto especialmente interesante de este tipo de inóculos es la posibilidad de compartir inóculos de utilidad contrastada entre agricultores, así como la experiencia en su uso, lo cual contribuiría a crear redes locales de agricultores conectados por su deseo de contribuir a un mejor cuidado de la tierra a través de la regeneración de sus suelos.

Otro aspecto relevante para considerar es cómo interaccionan los inóculos basados en comunidades complejas, que acabamos de describir, cuando se utilizan en conjunto con otras herramientas de manejo orientadas a potenciar el funcionamiento de las tierras de cultivo como, por ejemplo, las cubiertas vegetales, el ganado, o la fertilización de precisión con macro y micronutrientes. De hecho, nuestras investigaciones sugieren un elevado potencial del uso de inoculantes microbianos en presencia de otras estrategias de manejo sostenible.

## Agradecimientos

Agradecemos al Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER) a través de las “Ayudas a Grupos operativos de la Asociación Europea de Innovación (AEI) en materia de productividad y sostenibilidad agrícolas”, Referencia: GOPC-CA-20-0001.