



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SUPER-
VIVENCIA DE Rhizobium phaseoli
EN COMPOSTAS Y TURBA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MARTHA RAMIREZ RAMIREZ

México D. F.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO.

- 1.- Introducción.
- 2.- Objetivo.
- 3.- Generalidades.
 - 3.1 Antecedentes.
 - 3.2 Características del género Rhizobium.
 - 3.3 Conservación y control de calidad de las cepas de Rhizobium para la producción de inoculantes.
 - 3.4 Inoculantes.
 - 3.5 Generalidades sobre la turba.
 - 3.6 Generalidades sobre la composta.
 - 3.7 Sustitutos de la turba.
 - 3.8 Tratamiento y preparación de los soportes.
- 4.- Materiales y métodos.
 - 4.1 Análisis de las propiedades físicas y químicas de los soportes.
 - 4.2 Identificación y características de cultivo de Rhizobium phaseoli.
 - 4.2.1 Mantenimiento de los cultivos.
 - 4.2.2 Caracterización de los organismos.

- 4.2.2.1 Tinción y morfología.
- 4.2.2.2 Características de las colonias.
- 4.2.2.3 Características del desarrollo.
- 4.2.2.4 Pruebas bioquímicas.
- 4.2.2.5 Utilización de carbohidratos.
- 4.2.2.6 Propiedades de infectividad.
- 4.3 Producción de cultivos.
 - 4.3.1 Preparación del inóculo.
 - 4.3.2 Control de calidad del inóculo.
 - 4.3.2.1 Control cualitativo.
 - 4.3.2.2 Control cuantitativo.
 - 4.3.3 Preparación de los soportes.
 - 4.3.4 Preparación de los inoculantes.
 - 4.3.5 Curvas de supervivencia de Rhizobium phaseoli
 - 4.3.5.1 Recuento en caja de los rhizobia viables.
 - 4.3.6 Inoculación de las semillas.
 - 4.3.6.1 Preparación de las semillas.
 - 4.3.6.2 Recubrimiento de las semillas.
 - 4.3.7 Siembra de las semillas recubiertas.
 - 4.3.8 Determinación del nitrógeno contenido en las plantas huésped.

- 5.- Resultados.
- 6.- Discusión.
- 7.- Conclusiones.
- 8.- Resumen.
- 9.- Apéndice.
- 10.- Bibliografía.

1.- INTRODUCCION.

1.- Introducción.

El crecimiento de la población y cambios en los hábitos alimentarios, acompañado del crecimiento económico han ocasionado que la demanda de cosechas agronómicas sea más del doble durante este cuarto de siglo.

La reciente escasez de fertilizantes nitrogenados y los altos requerimientos de energía para su manufactura, han ocasionado un incremento en su precio de venta y causado un interés creciente en la búsqueda de alternativas en las tecnologías que provean a las cosechas del nitrógeno que requieren para obtener elevados rendimientos.

Por lo tanto, la capacidad de las leguminosas de fijar el nitrógeno atmosférico, cuando se encuentran en simbiosis con microorganismos del género Rhizobium, no puede ser ignorada en la búsqueda de soluciones para incrementar la producción de alimentos a bajo costo, con un ahorro considerable en fertilizantes nitrogenados (Judson, 1975; contenido en cita 22).

El Rhizobium se proporciona a las leguminosas en forma de inoculantes y para su preparación es necesario utilizar un soporte que mantenga viable al microorganismo. La turba es el vehículo más usado para la producción de inoculantes

comerciales de este tipo, pero tiene la desventaja de que su calidad es variable dependiendo de la fuente de procedencia y sus depósitos no son abundantes en el mundo (Fred, Baldwin & McCoy, 1932; contenido en cita 9).

En México existen yacimientos de turba que aún no han sido estudiados y caracterizados con propiedad. La turba cuyo comportamiento se estudió en este experimento, se extrajo de un depósito descubierto recientemente en la Cuenca del Lerma, por lo cual se desconocen sus propiedades como soporte para la elaboración de inoculantes.

En base a este hecho se hacen estudios e intentos de encontrar sustitutos locales que tengan el poder de protección que da la turba, para la conservación de la viabilidad de estos microorganismos.

Los materiales que se han estudiado como posibles sustitutos son muy variados, y el denominador común que los rige es su alta cantidad de materia orgánica y su capacidad de retención de humedad.

Siendo las compostas un producto resultante de la degradación inducida de la materia animal o vegetal de desecho, se espera de esta un comportamiento similar al de la turba, debi-

do a que esta última es un producto generado por la acumulación de materia orgánica en depósitos naturales.

La elaboración de las compostas es sencilla y su costo muy bajo, si el proceso de elaboración es adecuado, el producto que se obtiene es rico en materia orgánica y posee un alto índice de retención de humedad. Por estas razones se considera su potencialidad como soporte para la elaboración de inoculantes de leguminosas en lugar de la turba.

2.- O B J E T I V O.

2.- Objetivo.

Estudiar el posible uso de las compostas como soportes - en la producción de inoculantes de leguminosas, en sustitución de la turba. Se utilizaron para este estudio comparativo de la supervivencia de tres cepas de Rhizobium phaseoli ; dos compostas y una turba, observando su comportamiento e interacciones con las cepas de estos microorganismos.

Comparar los beneficios que reporta la esterilización de los soportes con rayos gamma. Este tipo de esterilización es con el objeto de eliminar a los microorganismos existentes - en estos materiales y que pudieran alterar la viabilidad del Rhizobium durante el período de almacenamiento, para lo cual se ideó separar las muestras en dos lotes; un lote irradiado - con rayos gamma y otro lote sin recibir ningún tratamiento de esterilización previo a la inoculación de estos con Rhizobium phaseoli.

Finalmente de acuerdo a los resultados obtenidos, se plantearía un modelo de trabajo con las condiciones óptimas para la utilización de las compostas como soporte en la elaboración de inoculantes y así poder utilizarlas como un sustituto local de la turba, eliminar los costos de importación que esta

ocasiona en los lugares donde no existen yacimientos y propiciar en parte el aprovechamiento de los desechos agrícolas y desperdicios orgánicos que se generan por el acumulamiento de basuras en las metrópolis.

3.- GENERALIDADES.

3.- Generalidades.

3.1 Antecedentes.

Los seres humanos requieren de aminoácidos esenciales para sintetizar sus proteínas, estos aminoácidos son proporcionados por los alimentos vegetales y animales que consumen.

Las plantas para sintetizar sus aminoácidos necesitan nitrógeno, el cual toman de los compuestos presentes en el suelo que contienen nutrientes nitrogenados como el amoníaco y los nitratos. El origen del amoníaco se encuentra en la degradación de la materia orgánica de plantas y animales presentes en el suelo y los nitratos se obtienen por oxidación del amoníaco y el nitrógeno atmosférico durante las tormentas eléctricas (Brill, 1979).

La mayoría de los suelos son deficientes en nutrientes nitrogenados debido a la deficiente tecnología del uso del suelo. La necesidad que tienen los cultivos por este elemento como factor inductor en la producción, hace necesaria la aplicación de fertilizantes, ya sea en forma de nitrato de amonio, urea, sulfato de amonio, nitrato de potasio, etc. lo que eleva el rendimiento de granos en cereales, leguminosas y oleaginosas, y en el caso de cultivos forrajeros aumenta su rendimiento.

to y contenido de proteínas.

En la elaboración de los fertilizantes nitrogenados la materia prima principal es el amoníaco, la mayoría de las veces y este se obtiene por el proceso de Haber-Bosch que convierte el nitrógeno atmosférico en amoníaco bajo condiciones de alta temperatura (1832°C) y alta presión (200 atm.) en plantas industriales con capacidades de utilización de 1000 tons. de nitrógeno por día equivalentes a 1285 tons. de amoníaco (Douglas, 1975). La mayor parte del costo de su manufactura es la inversión, que en 1975 fue de 100 millones de dólares en una planta con capacidad de 1000 tons./día, esos costos aumentan por el hecho de que en los países menos desarrollados esas plantas operan por lo general a la mitad de su capacidad, y además la transportación, almacenamiento y la aplicación no son los adecuados (Hardy & Havelka, 1975).

Se ha calculado que para finales de este siglo, se requerirán anualmente cerca de 200×10^6 toneladas métricas de fertilizantes nitrogenados, siendo que en 1974 se usaron 40×10^6 toneladas de fertilizantes nitrogenados con un valor aproximado de 8 billones de dólares contra las 3.5×10^6 toneladas que fueron usadas hace 25 años (Judson, 1975; contenido en ci--

ta 22).

Las cosechas de leguminosas, para un alto rendimiento requieren cuatro veces más nitrógeno que las cosechas de cereales, razón por la cual su necesidad por fertilizantes nitrogenados es mayor.

La producción mundial de granos de leguminosas es aproximadamente de 115×10^6 toneladas anuales, siendo el frijol soya la mitad de esta cantidad, seguida por la de cacahuete, frijol y chícharo. Un cultivo de gran importancia en América Latina es el de frijol (Phaseolus vulgaris L.) en donde, se produce alrededor del 23% del abastecimiento mundial (P.A.O., -- 1974; contenido en cita 21).

En México se producen 420000 tons. de soya y 915000 tons. de frijol anuales (S.A.G., 1974; contenido en cita 36).

Para dar un ejemplo sobre la importancia de las leguminosas en la alimentación, se ha hecho una comparación del contenido de proteínas de la soya y el frijol con otros alimentos de consumo humano (Landa, 1973; contenido en cita 13).

Soya	33 - 42%
Frijol	23%
Carne de res	19%

Huevo	12%
Harina de trigo	10%
Arroz	6.7%
Leche	3.1%

Las leguminosas en general son una fuente importante de proteínas en dos formas:

1.- Para el consumo directo por humanos en países poco desarrollados.

2.- Para la alimentación de animales (ganado de engorda) en los países más desarrollados.

Establecida la importancia de los cultivos de leguminosas y dado el hecho de que el costo de los fertilizantes nitrogenados es cada vez más alto, la alternativa a la producción de fertilizantes nitrogenados es el desarrollo de una tecnología que aproveche la fijación biológica del nitrógeno atmosférico, como es el uso de la relación Rhizobium-leguminosa. En la simbiosis cada socio es inefectivo en la fijación de nitrógeno cuando está solo en su medio ambiente normal, pero es efectivo en la relación simbiótica (Brill, 1979).

Esta relación simbiótica Rhizobium-leguminosa, se estima que contribuye con 40×10^6 toneladas de nitrógeno anualmente

a la producción de granos de leguminosas (Judson,1975;contenido en cita 22).

Indudablemente que el desarrollo de la tecnología que incremente esta cantidad de nitrógeno proporcionado a las cosechas,será una llave que abrirá las perspectivas de un mayor rendimiento y por lo tanto la posibilidad de aumentar la producción de alimentos a menor costo (Hardy & Havelka,1975).

3.2 Características del género Rhizobium.

Las bacterias del género Rhizobium pertenecen al orden -- de los Eubacteriales y se caracterizan por ser organismos aerobios estrictos que producen nódulos en las raíces de las leguminosas.

Son bastoncillos de 0.5-0.9 μ m. por 1.2-3.0 μ m., comúnmente pleomórficos bajo condiciones de crecimiento adversas, a menudo contienen gránulos de poli- β -hidroxibutirato, los cuales son refractarios bajo contraste de fase, se tiñen con Safran Negro B y son solubles en cloroformo.

Son móviles, se desplazan por dos a seis flagelos peritricos o por un flagelo polar o subpolar, no producen esporas y son Gram negativos.

Crece en medios con carbohidratos y el crecimiento va acompañado por una copiosa producción de polisacáridos extracelulares.

Su metabolismo es respiratorio, el oxígeno molecular es el aceptor final del electrón terminal.

No produce β -ostoglicósidos (Bernerts & De Ley, 1963; contenido en cita 5).

No produce licuefacción de la gelatina o la licúa muy lentamente después de una incubación prolongada, la caseína y el

agar no son hidrolizados.

Producción escasa o nula de H_2S sobre el medio de agar -- sulfuro de bisulfo.

Las colonias son incoloras o de color blanco, con excepciones de las colonias rosa a rojo producidas por cepas de rhizobium que infecta a Lotononis bainesii.

Utilizan un amplio rango de carbohidratos, sin formación de gas, pero no hidrolizan a la celulosa y el almidón.

Las sales de amonio, nitratos y muchos aminoácidos pueden servir como fuentes de nitrógeno. Algunas cepas crecen en un medio simple de sales minerales, conteniendo sólo vitaminas de un hidrolizado libre de caseína, como única fuente de carbón y nitrógeno. Algunas cepas requieren vitaminas solubles en agua.

Aunque su metabolismo es aeróbico, a menudo son capaces de producir un excelente crecimiento bajo tensiones de oxígeno menores de 0.01 atm. (Wilson, 1940; contenido en cita 5).

La temperatura óptima para su crecimiento es de 25-30°C y el pH de 5.0-8.5.

Los miembros de este género característicamente son capaces de invadir los capilares de las raíces de las plantas leguminosas (familia Leguminosae), e incitar la producción de nódulos en la raíz, donde las bacterias penetran formando sim---

biontes intracelulares. Todas las bacterias muestran un rango de afinidad por su huésped (especificidad por huésped).

Las bacterias se presentan en los nódulos bajo formas pleomórficas (bacteroides), encerradas solas o en pequeños grupos donde la planta produjo sacos membranosos. Los bacteroides son los responsables de la fijación del nitrógeno molecular en formas combinadas utilizables por la planta huésped.

3.3 Conservación y control de calidad de las cepas de Rhizobium para producción de inoculantes.

Las cepas de Rhizobium que se usan para la producción de inoculantes de leguminosas deben ser altamente "efectivas"; - esto es, capaces de formar con el huésped una asociación que - fije nitrógeno y lo proporcione al huésped en forma asimila-- ble; debe ser también suficientemente "infectiva" y tener ca-- pacidad competitiva. Por infectiva se entiende que una cepa - tiene la propiedad de nodular un alto porcentaje de plantas a las cuales es aplicada. Si esto ocurre en un suelo que contig-- ne otras cepas de rhisobia capaces de nodular el mismo hués-- ped, dependerá de la capacidad competitiva de la cepa en la -- rizósfera de la leguminosa y esto es importante cuando una ce-- pa nueva es inoculada en un suelo que siempre ha tenido una - alta población de cepas nativas de rhisobia.

Por lo tanto el criterio para seleccionar una cepa para - la producción de inoculantes se basa en la capacidad que pre-- senta para fijar el nitrógeno en pruebas de campo tan bien co-- mo en las condiciones de invernadero. Supervivencia en el sue-- lo en presencia o ausencia de plantas huésped (Chatel, Green-- wood & Parker, 1968; contenido en cita 10), colonización de la - rizósfera y capacidad para competir con las poblaciones de --

rhizobia que se encuentran en forma nativa por la formación de nódulos en el huésped (Ireland & Vincent, 1968; contenido en cita 10) y especificidad por el huésped (Gibson & Brockwell, 1968; contenido en cita 10).

Sin embargo la capacidad del Rhizobium para fijar nitrógeno en simbiosis con las leguminosas se ve afectada si no se observan precauciones en su conservación y su manejo.

Los métodos de conservación de los cultivos de Rhizobium más comúnmente empleados son:

Cultivos en agar inclinado.

Cultivos en medios con agar, cubiertos con parafina.

Liofilización (desechado en frío y al vacío).

Cultivos desecados (método de las perlas de porcelana y suelo desecado).

Las cepas de Rhizobium pueden ser aplicadas como una suspensión de un cultivo puro desarrollado sobre agar, menos frecuentemente en medio líquido, o bien puede ser suministrado -- mezclado íntimamente con un portador sólido (suelo, turba, mezcla suelo-turba o suelo altamente orgánico). El cual puede -- haber sido, o no, esterilizado previamente (Vincent, 1975).

3.4 Inoculantes.

La práctica de inocular semillas con cultivos artificiales de rhizobia data desde 1896 (Voelcker, 1896; contenido en cita 38).

En este período inicial, el método consistía en suspender en agua un cultivo de bacterias desarrollado en medio sólido a base de agar, esta suspensión se usaba entonces para impregnar el suelo directamente o para inocular las semillas.

También es posible inocular sucesivamente las semillas -- de leguminosas usando cultivos en agar, liofilizados o cultivos en turba (McLeod & Roughley, 1961; contenido en cita 38), la última forma proporciona algunas ventajas sobresalientes, en las cuales se incluye el hecho de que brinda una mayor protección para los rhizobia cuando están en contacto con fertilizantes ácidos (Vincent, 1958; contenido en cita 38), aumenta la supervivencia del microorganismo sobre la semilla (Roughley, dato no publicado) y mejora la viabilidad por medio del encalado de las semillas (Shipton & Parker, 1967; contenido en cita 38), éste último método se aplica en los casos en que la germinación puede ser tardía o el pH del suelo no es favorable.

La calidad de los inoculantes de leguminosas depende del

número de rhizobia viable que contenga y de su efectividad -- para fijar nitrógeno en asociación con el huésped.

Si las leguminosas se establecen en un suelo en buenas -- condiciones y libre de otros rhizobia, se requieren 100 rhizobia por semilla para proveer de un nivel de inóculo satisfactorio, pero donde hay un gran número de rhizobia inefectivos -- y/o las condiciones son adversas para la supervivencia del -- Rhizobium, se requieren números que excedan el 10^6 microorganismos por semilla (Roughley, 1976).

La elección de cómo preparar el inóculo depende de algunos factores tales como:

a) Magnitud del pedido: Los cultivos en agar presentan -- menos dificultades cuando se los prepara en pequeñas cantidades, pero son menos aptos para la producción a gran escala.

b) Consideraciones de organización: Sólo es posible utilizar volúmenes grandes de inoculantes líquidos en forma inmediata y en un lugar cercano, los cultivos en turba o similares son especialmente adecuados para su distribución a largas distancias y para un almacenamiento prolongado.

c) La disponibilidad de los materiales, que es lo que determina el tipo de portador.

d) El énfasis puesto en que el producto final esté libre

de contaminantes, por ejemplo, cultivos puros sobre agar, turbas esterilizadas comparadas con las no estériles.

e) La importancia de la supervivencia del microorganismo sobre la semilla inoculada, por ejemplo, la superioridad de los cultivos en turba frente a los de agar o líquidos y la pobre supervivencia de los cultivos liofilizados (Vincent, 1975).

3.5 Generalidades sobre la turba.

La turba es el soporte universal usado en los inoculantes comerciales para leguminosas en los últimos 50 años, no se encuentra en cualquier parte del mundo, y donde la hay, es de un valor que puede variar, en su uso, como una base para inoculantes.

La turba se forma en climas húmedos y resulta de la acumulación y descomposición parcial de depósitos vegetales que se han conservado bajo condiciones de escasa aereación en los remansos de los lagos, estanques y pantanos.

El acumulamiento de plantas del género Sphagnum, es probablemente su forma más común y está compuesta por más de 300 especies de plantas del orden de los Sphagnales, comprendiendo la familia Sphagnaceae.

Este tipo de plantas se forma en diversos tipos de panta-

nos localidades en áreas del Norte de Europa, Asia y América, también existen depósitos en las regiones Antárticas.

Su composición química revela que contiene alrededor del 1% de nitrógeno; el fósforo y el potasio se hayan alrededor -- del 0.1%, es altamente ácida con un pH entre 3.0 y 4.5.

La turba incrementa la capacidad de almacenamiento de --- agua de los suelos y proporciona una mejor estructura a los - suelos de textura arcillosa.

3.6 Generalidades sobre la composta.

Una composta es básicamente una masa de materia orgánica hecha a base de desperdicios vegetales que es degradada por - la acción de microorganismos, el resultado de esta acción es - un material migajoso que cuando es agregado al suelo sirve co - mo acondicionador del mismo.

Su elaboración se hace frecuentemente apilando el mate--- rial orgánico por capas alternadas de desperdicios orgánicos y estiércol, formando pilas de 3 a 4 metros, comprimidas y ro--- ciadas con cal y alguna sal de potasio, tal como el sulfato o cloruro. Después de varias semanas, durante las cuales se ha - conservado la humedad por aplicaciones de agua, se corta con - un azadón y se voltea para formar una nueva pila en la cual -

Las distintas sustancias del contenido son mezcladas lo más - posible, pueden ser volteadas varias veces para acelerar la -- descomposición de los materiales que la componen.

La diversificación del uso de las compostas contribuye al aprovechamiento de los desechos sólidos orgánicos generados - en las metrópolis y en el campo. Actualmente en el Distrito - Federal, la industrialización de los desperdicios orgánicos se realiza en la "Planta Industrializadora de Desechos Sólidos" del Departamento del Distrito Federal, para obtener un producto denominado "Rico Suelo" que se recomienda como fertilizante de plantas de ornato.

Los beneficios que reporta el uso de las compostas como acondicionador de suelos son; mejor agregación, enriquecimiento de nutrientes, aumento de la porosidad y retención de la humedad.

3.7 Sustitutos de la turba.

Las comparaciones entre los inoculantes hechos con cultivos líquidos y los que tienen como base la turba, demuestran - que es muy superior esta última en cuanto a capacidad para -- mantener viables a los rhizobia (Fellers, 1918; Vincent, Thompson & Donovan, 1962; Brockwell & Phillips, 1965; Burton & Curley,

1965; Vincent, 1968; contenidos en cita 42).

Los cultivos líquidos muestran ausencia del poder de protección que da la turba a los rhizobias sobre la semilla después de la inoculación.

Las dificultades para disponer de la turba en algunas partes del mundo, han propiciado que se realice la búsqueda de -- sustitutos locales de la turba.

Dichos sustitutos son; suelo altamente orgánico, suelo enriquecido con nutrientes, tales como, harina de alfalfa, paja molida, levadura y sacarosa (Jensen, 1961; contenido en cita 42), carbón vegetal (Medlin & Newton, 1948; contenido en cita 42), algunas variedades del carbón mineral como la antracita y la -- lignita, suplementados con bentonita, vermiculita, harina de -- maíz, sacarosa y extracto de levadura (Paczkowski & Berryhill, 1979). Otros materiales que han recibido atención como posibles soportes para rhizobias son; el aserrín descompuesto, vermiculita, perlita (Fred et al., 1932; Vincent, 1965; contenidos en cita 42), composta de cáscara de arroz (Bonnier, 1960; contenido en cita 42), roca fosfórica sólida (Date, dato no publicado), -- composta de cáscara de café (Subba Rao, dato no publicado), composta de mazorcas de maíz (Wood, 1937; contenido en cita 9), bago de caña de azúcar (Leiderman, 1971; contenido en cita 42).

Muchos de estos soportes requieren ser enriquecidos con nutrientes (harina de soya, harina de alfalfa, harina de maíz, bentonita, sacarosa, extracto de levadura, etc.), con resultados satisfactorios la mayoría de las veces y aunque no se ha encontrado un sustituto que iguale las ventajas que proporciona la turba, se advierte también que existe una gran variedad de materiales que podrían soportar satisfactoriamente el crecimiento de los rrisobia (Strijdon & Deschodt, 1976), además del hecho de ser materiales que se obtienen con más facilidad que la turba, lo que los hace aceptables para la elaboración de inoculantes de leguminosas.

3.3 Tratamiento y preparación de los soportes.

La producción de inoculantes puede ser dividida en cuatro partes: una de ellas es la recolección y preparación de los soportes; la segunda el crecimiento del inóculo en un medio de cultivo líquido; la tercera es la mezcla del cultivo líquido con el soporte y la cuarta parte es el espacado adecuado del cultivo.

La naturaleza del soporte y su tratamiento previo afectan la calidad del inoculante (Roughley & Vincent, 1967).

La mayoría de los depósitos de turba son muy ácidos para

ser usados como base para inoculantes, lo que hace necesaria una previa neutralización a un pH de 6.5 a 7.0, con CaCO_3 finamente molido.

Si el soporte está húmedo al ser recolectado, debe ser drenado y secado primero a temperatura ambiente y finalmente se ajusta su humedad hasta un contenido de 5% usando aire caliente seco y comprimido. Se debe tener cuidado de mantener la temperatura del soporte abajo de los 100°C , las altas temperaturas de secado restringen el desarrollo subsecuente de los rhizobia por la degradación tóxica de la materia orgánica y produce calentamientos localizados cuando se humedece el soporte con el cultivo líquido (Roughley & Vincent, 1967), el soporte ya seco debe ser molido hasta alcanzar un tamaño de partícula que pase a través de un cedazo de malla 200, según normas de la British Standard, las partículas gruesas producen apelotonamientos cuando se impregna el soporte con el cultivo de Rhizobium y se adhiere muy poco a la superficie de la semilla (Roughley & Vincent, 1967).

El crecimiento de los rhizobia es más abundante en soportes estériles que en los no estériles (Roughley, 1968), esta diferencia también depende del tiempo y temperatura de almacenamiento.

Los métodos de esterilización de los soportes más comúnmente usados son; la esterilización por vapor a presión; la irradiación con rayos gamma y la esterilización con óxido de etileno, siendo esta última limitada e incompleta (Strijdon & Deschoedt, 1976) y la mejor es la esterilización con radiación, reportándose una excelente supervivencia de los rhizobia en la turba irradiada con rayos gamma (5.0×10^6 rad).

Este método es el que se usa para todos los inoculantes producidos en Australia (Roughley, 1968).

Por otra parte, el material de empaque debe permitir el intercambio de oxígeno, pero impedir el paso del agua, la literatura en este aspecto es confusa probablemente porque los rhizobia tienen una pequeña, pero definitiva demanda de intercambio gaseoso a través del material de empaque (Roughley, 1968).

Los soportes varían en su capacidad para absorber la humedad, lo cual determina la cantidad de cultivo líquido que debe ser agregada al hacer la inoculación. El cultivo se mezcla con el soporte hasta proveer un contenido de humedad de 45 a 50% en el caso de los soportes no estériles y de 60% para los soportes esterilizados previamente. La supervivencia de los rhizobia se puede ver seriamente afectada en forma adversa por encima o debajo de estos límites, sobre todo en el -

caso de los soportes no estériles (Roughley,1968).

Cuando el cultivo líquido ha sido absorbido e incorporado al soporte,se permite la maduración del cultivo por dos semanas,para rhizobia de crecimiento lento y de una semana para rhizobia de crecimiento rápido,incubando a 28°C,la maduración permite la disipación del calor y reduce el crecimiento de hongos. El almacenamiento después de la maduración debe efectuarse hasta donde sea posible a 4°C,se ha demostrado que las altas temperaturas afectan negativamente la supervivencia de los rhizobia en los inoculantes (Vincent,1958;contenido en -- cita 39).

4.- MATERIALES

Y

MÉTODOS.

4.- Materiales y métodos

El desarrollo de la parte experimental se realizó en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química.

Los materiales utilizados como soportes, que se escogieron para este estudio comparativo, el cual determinó su capacidad para permitir y promover el crecimiento de Rhizobium, son dos compostas de distinto origen y una turba.

Una de las compostas se denominó "CI" y estaba formada de desechos sólidos orgánicos (basuras) de la parte Norte de la Ciudad de México, los cuales se procesaron en la "Planta Industrializadora de Desechos Sólidos" del D.D.P., de acuerdo a un método propio (Roldán, 1979).

La segunda se denominó "CII" y es una composta formada a partir de desechos vegetales agrícolas y de jardín, fabricada por medio de un proceso semejante al anterior (a base de mantener la humedad, forma de los bancales y volteos), pero hecha manualmente sin utilizar equipo industrial y en pequeña escala (se procesaron 200 kg. de material orgánico).

La turba recibió el signo "T" con el cual se identificó a lo largo del experimento. Los yacimientos de turba son escasos en México y los depósitos existentes no se han estudiado

en detalle, la turba que se estudió en este experimento pertenece a un depósito descubierto recientemente; su origen son -- los materiales resultantes de la descomposición parcial de algas en los remansos de la Cuenca del Lerma.

La esterilización de los soportes se llevó a cabo en el Centro de Estudios Nucleares de la UNAM, la fuente de irradiación fue un equipo Gammabeam, con radiación gamma de Cobalto - 60, el tiempo de exposición duró 1.66 horas con una intensidad de dosis de 3.0 Megarads/hora, la dosis total fue de 5.0 Megarads.

4.1 Determinación de las propiedades físicas y químicas de los soportes.

1.- Determinación del pH.

Pesar 50 gr. de muestra y agregar 125 ml. de agua destilada, para tener una relación 1:2.5 muestra/agua, agitar durante 5 minutos, dejar sedimentar y reposar 30 minutos y leer en el potenciómetro el pH (Echegaray & Ramírez, 1978).

2.- Determinación del % de humedad.

Pesar 5 a 10 gr. de muestra tamizada y colocarlos en un pesafiltro a peso constante, calcular el porcentaje de humedad por la fórmula $\frac{A-B}{B-C} \times 100$, donde:

A = peso del pesafiltro + suelo húmedo

B = peso del pesafiltro + suelo seco

C = peso del pesafiltro vacío

3.- Determinación del color.

Colocar en cápsulas de porcelana dos porciones de 5 gr. de muestra, humedecer una de las porciones. Determinar el color en la muestra seca y en la húmeda por comparación con las tablas "Munsell".

4.- Determinación de la materia orgánica.

Se utilizó el método de Walkley & Black. Este método se --

basa en la oxidación de la materia orgánica utilizando el calor liberado por una solución de ácido sulfúrico. La muestra se trata con un exceso de agente oxidante (ácido crómico), el excedente se determinó por titulación con una solución valorada de sulfato ferroso (Jackson, 1960).

5.- Determinación del nitrógeno total.

La determinación se hizo por el método de Kjeldahl. Este método se basa en la oxidación de la materia orgánica con ácido sulfúrico, el cual se reduce a dióxido de azufre, seguida de una reducción del nitrógeno a ión amonio, provocada por el mismo dióxido de azufre. Después de alcalinizar la muestra digerida, el amoníaco se destila para determinarlo cuantitativamente por titulación con una solución de ácido bórico al 4% valorado (Jackson, 1960).

6.- Cálculo de la relación C/N.

Se determinó por la aplicación de la fórmula:

$$C/N = \frac{\% N.O.}{\% N_2 \text{ total}} \times 0.58 ; \text{ donde el valor de } 0.58 \text{ es el factor de Van Bemmelen (Jackson, 1960)}$$

7.- Determinación de las cenizas.

Este análisis se hizo por ignición de las muestras en una mufla ThermoLine a 800°C durante dos horas.

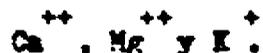
8.- Determinación de la capacidad de intercambio
catiónico total.

La capacidad de intercambio catiónico total se realizó -- por la valoración del ión potasio por flamometría.

Para hacer la determinación del ión potasio se lixiviaron 0.1 gr. de muestra con KOAc 1N y etanol al 96%, las soluciones resultantes se desechan, después se agrega una solución de -- NH_4OAc 1N y pH 7.0, el filtrado contiene el potasio que pasó - por intercambio (Jackson, 1960).

La determinación se realizó en un flaoómetro Perkin-Elmer H.V. - Vis Spectrophotometer ; Coleman 139.

9.- Determinación de los cationes intercambiables:



Esta determinación se hizo por flamometría, utilizando el mismo equipo de la determinación anterior.

Para preparar las soluciones patrón se realizaron una serie de diluciones con un contenido de 1000 ppm de K^+ , Ca^{++} y Mg^{++}

Se prepara un blanco que contenga todas las sales que se encontraban en la determinación analítica con excepción del - elemento a determinar (Jackson, 1960).

Para elaborar las curvas standard se asignó el siguiente

esquema:

	Potasio	Calcio	Magnesio
Intervalos de trabajo	0-100 ppm	0-100 ppm	0-300 ppm
Longitud de onda	770 nm	554 nm	370 nm

La curva de cada elemento químico se hace graficando el % de emisión contra las ppm de las curvas de las soluciones - patrón.

10.- Determinación de fósforo.

El método para determinar el fósforo de las muestras se escogió de acuerdo al pH que tenía cada muestra, de este modo las muestras que tenían pH alcalino o neutro se determinaron por el método del bicarbonato de sodio de Olsen.

Las muestras que presentaron pH ácido se trataron por el método de extracción ácida de Bray y Kurtz (Manual de Operaciones de Laboratorio de la Planta Industrializadora de Desechos Sólidos del D.D.F.).

11.- Determinación de la textura.

El método que se empleó para la determinación de la textura del suelo fue el de Bouyoucos, el cual se basa en la determinación de la velocidad de sedimentación de las partículas que componen la muestra, una vez que ha sido eliminada la

materia orgánica y las sustancias cementantes (Echegaray & Ramírez, 1978).

4.2 Identificación y características de cultivo de Rhizobium phaseoli.

Organismos:

Los experimentos reportados fueron hechos con tres cepas de Rhizobium phaseoli, provistas por FERTDEX, S.A.

Origen:

Número de la colección	Lugar de aislamiento	Huésped	Referencia
136 FM	Durango, Mex.	Phaseolus vulgaris	
137 FM	Durango, Mex.	Phaseolus vulgaris	
139 FM	Australia	Phaseolus vulgaris	CIAT # 57

4.2.1 Mantenimiento de los cultivos.

Las cepas de rhizobia fueron mantenidas en medio de agar-extracto de levadura manitol, cuya composición es la siguiente: K_2HPO_4 0.5 gr.; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.2 gr.; NaCl 0.1 gr.; Manitol 10 gr.; Extracto de levadura 0.4 gr.; Agua destilada 1000 ml. Cuando es necesario un agente neutralizante se agregan -- 3.0 gr. de $CaCO_3$ por litro de medio.

Todas las cepas fueron resembradas y su pureza checada -- una vez cada dos meses y se conservaron en refrigeración a -- 4°C.

4.2.2 Caracterización de los organismos.

4.2.2.1 Tinción y morfología. Todas las pruebas se llevaron a cabo con cultivos que tenían 7 días de crecimiento. - La tinción de los organismos se hizo por el método de Gram, - para la tinción de gránulos sudanófilos se utilizó una solución de Sudán Negro B y como colorante de contraste Safranina.

4.2.2.2 Características de las colonias. Se observó la morfología de las colonias en cultivos crecidos sobre agar extracto de levadura manitol, durante 7 días. Las características consideradas fueron elevación, margen, transparencia, tamaño de la colonia y producción de goma.

4.2.2.3 Características del desarrollo.

i. Desarrollo en agar extracto de levadura manitol. El medio de rutina para el cultivo de rhabdía es el de agar extracto de levadura manitol, para la diferenciación de las colonias de rhabdía de las de otras bacterias se agregan 10 ml. de una solución acuosa de Rojo Congo al 1/400. Placas con este medio fueron inoculadas e incubadas a 28°C, durante 3 días y se observó su desarrollo.

ii. Desarrollo en medio de Brockwell y diferenciación de

Agrobacterium.

El medio de Brockwell (Lozano, 1975) tiene la misma composición que el medio de agar extracto de levadura manitol, sólo la fuente de carbono ha sido sustituida por lactosa para detectar la posible presencia de 3-cetoglicósidos. Placas con este medio fueron inoculadas e incubadas a 28°C durante 3 días, al final de los cuales se agregan unas gotas de reactivo de Benedict y se observa la reacción después de una hora.

iii. Tolerancia al pH.

El pH de los tubos con agar extracto de levadura manitol fue ajustado después de la esterilización por la adición de HCl diluido estéril y de NaOH 0.1N estéril. Los tubos inoculados fueron incubados durante 7 días a 28°C y el desarrollo observado al final de este período. Los valores de pH usados fueron; pH = 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0.

iv. Desarrollo y cambio de pH en agar glucosa peptona.

La fórmula óptima para este medio es: Glucosa 5.0 gr.; peptona 10 gr.; agar 15 gr.; agua destilada 1000 ml. y como indicador se agregan 10 ml. de púrpura de bromocresol al 1% en solución alcohólica, por litro de medio. Los tubos con este medio, son inoculados e incubados a 30°C durante 48 horas, para detectar la posible presencia de microorganismos contaminan-

tes de crecimiento rápido y cambios en el pH.

4.2.2.4 Pruebas bioquímicas.

i. Crecimiento en leche tornasolada. Tubos con medio de leche tornasolada fueron inoculados e incubados a 28°C durante 4 semanas antes de ser examinados.

ii. Producción de ácido sulfhídrico (H₂S). Placas con medio de agar sulfuro de bismuto fueron inoculadas y se incubaron durante 7 días a 28°C, después de este período se examinaron para determinar la producción de H₂S.

iii. Actividad de la catalasa. Una gota de cultivo bacteriano se mezcló con una gota de peróxido de hidrógeno al 10% para observar la producción de gas.

iv. Licuefacción de la gelatina. Se usaron placas y tubos con medio de gelatina al 12%, los tubos inoculados fueron incubados a 28°C durante 2 meses antes de ser examinados y las placas inoculadas se incubaron a 28°C, siendo examinadas a los 14 días.

v. Tolerancia al NaCl. En las placas con medio de agar extracto de levadura manitol se incrementó la concentración de NaCl al 2 y 3%, las placas inoculadas se incubaron a 28°C durante 7 días, después de los cuales se examinó su crecimiento

to.

4.2.2.5 Utilización de carbohidratos.

Las tres cepas fueron probadas para determinar su capacidad para crecer en un medio que contiene un carbohidrato en particular como única fuente de carbono. Se probaron siete carbohidratos diferentes; rafinosa, glucosa, celulosa, fructosa, inulina, xilosa y lactosa. Las pruebas se llevaron a cabo en un medio basal de agar extracto de levadura, pero sin fuente de carbono y con el extracto de levadura reducido a la cuarta parte, como indicador se agregaron 5 ml. de una solución alcohólica de azul de bromotimol al 0.5% por cada litro de medio. Los carbohidratos se esterilizaron por filtración en filtro Seitz, el medio se vació en cajas Petri y se inoculó con 1 ml. de una suspensión bacteriana de 1×10^9 rhabdibacteria/ml. Cuando el agar solidificó se hicieron cuatro horadaciones distribuidas uniformemente con respecto a la orilla de la caja. En cada cavidad se pusieron unas gotas de la solución de cada carbohidrato por separado; como fuente de carbono, las placas así inoculadas se incubaron en posición no invertida a 23°C durante dos semanas, al final de las cuales se observó el desarrollo.

4.2.2.6 Propiedades de infectividad. Cada cepa fue probada con distintos huéspedes para determinar su capacidad para producir nodulación en su huésped específico. Se probaron cuatro tipos de leguminosas; Glicine max Merr., Medicago sativa L., Phaseolus vulgaris L. y Trifolium repens L. Las semillas pequeñas como Medicago sativa L. y Trifolium repens L. fueron sembradas en tubos y las semillas grandes como Glicine max Merr. y Phaseolus vulgaris L. se sembraron en jarras de Leonard, se utilizó como soporte vermiculita neutralizada, saturada de solución nutritiva para plántulas de Jensen. La determinación se hizo por triplicado con un testigo negativo (Vincent, 1975).

4.3 Producción de cultivos.

4.3.1 Preparación del inóculo.

El inóculo se preparó a partir de una suspensión de un cultivo puro de Rhizobium phaseoli en agar, que contenía 1×10^9 rhizobia/ml., para hacer la suspensión se utilizaron 10 ml. de una solución de sacarosa al 10%.

Quando se hubo obtenido una suspensión uniforme, se transfirió 1.0 ml. a cada uno de nueve matraces bafleados que contenían 100 ml. de medio líquido para rhizobia (Fred, Baldwin & McCoy, 1932; contenido en cita 38), cuya composición es la siguiente: K_2HPO_4 0.75 gr.; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.4 gr.; $CaCO_3$ 0.4 gr.; Extracto de levadura 3.0 gr.; Sacarosa* 10.0 gr.; Agua destilada 1000 ml.; pH 6.8.

Los matraces ya inoculados se colocaron en una incubadora a $28^\circ C$ y con agitación de 175 rpm durante 72 horas. Se hicieron ensayos de pureza del cultivo líquido cada 24 horas para detectar una posible contaminación del cultivo.

4.3.2 Control de calidad (cualitativo y cuantitativo).

Los parámetros de control de calidad fueron los siguientes:

4.3.2.1 Control cualitativo.

a) Determinación del pH. Para determinar la presencia de microorganismos contaminantes productores de acidez o alcalinidad (pH menor de 6 o mayor de 8 son sospechosos).

b) Frotis de Gram. Para la detección de microorganismos contaminantes Gram positivos, esporulados u otros con morfología diferente.

c) Inoculación en agar peptonado. Para detectar algunos microorganismos contaminantes comunes que crecen abundantemente al incubar de 24 a 48 horas a 30°C.

d) Desarrollo en agar extracto de levadura manitol. Restriar en tubos con agar extracto de levadura manitol adicionado con una solución de Rojo Congo 1/400, incubando a 28°C - para detectar microorganismos contaminantes de rápido desarrollo con características culturales distintas y/o absorción del colorante.

4.3.2.2 Control cuantitativo.

a) Recuento total de rhizobia. El recuento total se hizo siguiendo el método de estimación de la turbidez de la escala de McFarland (Kolmer, 1945).

b) Recuento de rhizobia viables. El recuento se realizó en cajas Petri, para lo cual se hicieron una serie de diluciones del inóculo de acuerdo a la proporción 1:10 para contar

a las colonias de rhizobia.

Cuando han sido revisados los controles de calidad y el resultado ha sido satisfactorio, se puede considerar apto un cultivo para la inoculación de los soportes.

4.3.3 Preparación de los soportes.

Las muestras se secaron primeramente a la temperatura -- ambiental del cuarto de trabajo. El material ya seco se molió en un molino eléctrico y después se tamizó en tamices de malla 200, hasta obtener un polvo fino de textura fina y uniforme.

La turba por tener un pH ligeramente ácido tuvo que ser neutralizada por adición de CaCO_3 finamente molido. Las muestras de compostas no requirieron ajuste de pH.

A continuación todas las muestras se colocaron en charolas de aluminio de 30 cm. de largo X 25 cm. de ancho X 5 cm. de altura y se pusieron a secar en la estufa a 60°C durante 4 horas aproximadamente, hasta que cada muestra en particular retuvo solamente el 5% de humedad. Una vez que se ajustó la humedad de cada soporte, se pesaron 20 gr. de cada uno en bolsitas de polietileno de 0.038 mm. de espesor y se sellaron cuidadosamente para evitar contaminación y desajuste de la -

humedad.

Todo el conjunto de bolsitas conteniendo los tres tipos de soportes se dividió a su vez en dos lotes. Un lote permaneció en las condiciones originales del envasado, es decir no se esterilizó, el segundo lote se esterilizó por radiación γ , la dosis total fue de 5.0 Megarads, con una intensidad de dosis de 3.0 Megarads/hora, el tiempo de exposición fue de 1.66 horas.

Habiendo recibido los soportes el tratamiento adecuado y el cultivo líquido de rhizobia satisfecho los ensayos de calidad, se procedió a mezclarlos.

4.3.4 Preparación de los inoculantes.

Los soportes que fueron esterilizados previamente, se mezclaron con 11.0 ml. de un cultivo líquido puro con un contenido de $6-7 \times 10^9$ rhizobia/ml. ajustando su humedad a un 60%.

Los soportes no estériles se mezclaron con 9.0 ml. de -- cultivo obteniéndose un 50% de humedad.

Los soportes se mantuvieron en continuo movimiento con agitación manual mientras se agregaba el cultivo líquido. Al terminarse el proceso de mezclado, las bolsitas con los soportes ya húmedos e impregnados con el cultivo se dejaron madu-

rar durante una semana, incubando a 28°C, después de lo cual se almacenaron en refrigeración a 4°C.

4.3.5 Curvas de supervivencia de Rhizobium phaseoli.

4.3.5.1 Recuento de rhizobia viables en cajas Petri. --

Los recuentos se hicieron, terminada la maduración a los 0, 15, 30 y 45 días.

La preparación de las diluciones se hizo de acuerdo al siguiente esquema:

Preparación de las diluciones	dilución en el tubo
a) 1 gr. de inoculante en 100 ml. de agua	10^{-2}
b) 1 ml. de (a) en 99 ml. de agua	10^{-4}
c) 1 ml. de (b) en 9 ml. de agua	10^{-5}
d) 1 ml. de (c) en 9 ml. de agua	10^{-6}
e) 1 ml. de (d) en 9 ml. de agua	10^{-7}
f) 1 ml. de (e) en 9 ml. de agua	10^{-8}
g) 1 ml. de (f) en 9 ml. de agua	10^{-9}

Inicialmente se usaron las diluciones (g) y (f) de todos los inoculantes para recuentos en placas, pero a medida que se llevaba a cabo el proceso de adaptación y disminución de los niveles de población de los rhizobia, se fueron requiriendo diluciones menores para los inoculantes cuyos soportes no

fueron esterilizados antes de la inoculación, por lo cual se requirió utilizar las diluciones (c), (d) y (e) hacia el final del período de experimentación. Para los soportes esterilizados antes de la inoculación se pudo continuar el uso de las diluciones (g) y (f), hasta la conclusión del experimento.

4.3.6 Inoculación de las semillas. El método que se eligió fue el recubrimiento de las semillas con CaCO_3 (calcita finamente pulverizada)^{**} dada la naturaleza ácida del suelo en que serían sembradas las plantas huésped.

4.3.6.1 Preparación de las semillas. Como no se pudo contar con semillas certificadas^{***} se utilizaron semillas de frijol canario, de cosecha reciente, intactas y limpias a las cuales se les determinó la capacidad de germinación, utilizando 100 semillas que se pusieron a germinar en cajas Petri en condiciones de humedad adecuadas, dando el resultado de 92% de semillas germinadas. Se seleccionaron las semillas de acuerdo a su tamaño, cuidando que este fuera lo más uniforme posible y después se pesaron.

Para eliminar contaminantes, las semillas se humedecieron en etanol al 95% y se sumergieron en HgCl_2 al 0.2% acidificado

de con 5ml./lt. de HCl concentrado, durante 3 minutos, luego se lavaron vigorosamente con agua destilada estéril 10 veces.

4.3.6.2 Recubrimiento de las semillas. Se pesaron 10 gr. de semillas de frijol ya tratadas y se les adicionó una mezcla de 1 gr. de inoculante y 1.5 ml. de adhesivo, el adhesivo se preparó con goma arábiga al 45% neutralizada y estéril. Se impregnaron perfectamente las semillas con el inoculante durante 10 minutos, cuidando de no dañar las semillas.

A parte se pesaron 3 gr. de CaCO_3 pulverizado y se distribuyeron a lo largo de un pliego de cartulina perfectamente limpia; sobre el CaCO_3 se pusieron las semillas y durante 5 minutos se mezclaron con el CaCO_3 , permitiendo que rodaran en el cartoncillo en forma rápida y suave hasta que quedaron totalmente recubiertas.

4.3.7 Siembra de las semillas recubiertas.

Las semillas recubiertas se sembraron en macetas de plástico que contenían 2 Kg. de suelo libre de fertilizantes de cualquier índole. Las plantas se desarrollaron en un invernadero donde la temperatura máxima era de 28.5°C durante el día y la mínima de 5°C durante la noche, con períodos de luz de 12 horas diarias. Las plantas se cosecharon a las 5 semanas de hq

ber sido sembradas.

*Nota : El asúcar morena promueve el crecimiento de los rhi-
sobia mejor que la sacarosa Q.P., la diferencia es de
 2.0×10^9 rhisobia/ml.

**Nota : No debe utilizarse CaCO_3 precipitado, porque produce
el resquebrajamiento del recubrimiento de la semilla
(pallet) y además se adhiere pobremente a la super-
ficie de la semilla.

***Nota : Se descartó la semilla certificada que proporcionó -
el SARH. porque presentaba cierta contaminación re-
sidual fúngica, a pesar de haber recibido el trata-
miento de desinfección.

4.3.3 Determinación del nitrógeno contenido en las plantas huésped.

A las plantas huésped cosechadas se les separó la parte --
aérea de la raíz; a la raíz se le determinó el número de nódu-
los presentes y su ubicación. La parte aérea se secó a tempe-
ratura ambiente, una vez que hojas y tallos estuvieron perfec-
tamente secos, se molieron hasta obtener un polvo fino al cual
se le determinó su contenido de nitrógeno total. (Mitchell, 1972).

En este método la reacción se basa en la formación de un -

compuesto coloreado resultante de la reacción de el sulfato -- de amonio (formado por la digestión de los tejidos vegetales) con fenol en medio alcalino (reacción de Berthelot) para formar azul de indofenol, cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de nitrógeno presente en los tejidos de las plantas y que es susceptible de ser medido colorimétricamente.

5.- R E S U L T A D O S.

Análisis Físicos y Químicos de los soportes y el suelo.

	CI	CII	Turba	Suelo
pH	7.90	6.80	6.10	6.15
% de humedad	13.46	41.00	63.03	9.24
Color (base seca)	10 YR 3/2 café grisáceo muy oscuro	10 YR 3/1 gris muy oscuro	5 YR 4/1 gris oscuro	10 YR 4/2 café grisáceo
Color (base húmeda)	10 YR 2/1 negro	10 YR 2/1 negro	5 YR 2.5/1 negro	10 YR 2/1 negro
% M.O.	25.53	41.40	23.46	10.005
% N ₂	0.609	1.075	1.086	0.256
Relación C/N	24.31	22.17	12.52	22.66
% de cenizas	70.17	42.45	40.41	83.10
C.I.C.T				
meq/100 gr.	5.1150	11.2531	21.4833	7.1611
K				
meq/100 gr.	1.4066	2.1099	0.5115	0.5115
Ca				
meq/ 100 gr.	0.8000	1.1750	0.7500	0.5750
Mg				
meq/100 gr.	0.3300	0.9166	1.2400	0.0833
Fósforo				
ppm	138	142	162	66

Textura del suelo : Mezcla arenoso (Arena 67.32%, Limo 18.62%, Arcilla 13.96%).

CI = Composta de basuras industrializadas.

CII = Composta de desechos agrícolas.

C.I.C.T. = Capacidad de intercambio catiónico total.

4.2 Resultados de la identificación y características de cultivo de Rhizobium phaseoli.

4.2.2.1 Tinción y morfología.

Todos los organismos examinados fueron bacilos Gram negativos, las células observadas presentaron extremos redondeados, no mostraron producción de esporas o cápsulas. Las células al ser teñidas con Sudán Negro B muestran pequeños gránulos color azul negro distribuidos en el interior de la célula.

4.2.2.2 Características de las colonias.

Las tres cepas produjeron colonias con un diámetro promedio de 4 mm. después de 7 días de incubación. Estas colonias presentaron forma convexa con margen circular definido y uniforme, de color blanco, transparentes y brillantes, produjeron una gran cantidad de goma de aspecto acuoso.

4.2.2.3 Características del desarrollo.

i. Las tres cepas crecieron abundantemente en el medio de agar extracto de levadura manitol formando colonias características que no absorbían el Rojo Congo.

ii. Hay desarrollo abundante en el medio de Brockwell. La diferenciación entre Agrobacterium y Rhizobium, se basa en la producción de 3-cetoglicósidos por Agrobacterium, los organis--

nes del género Rhizobium no lo producen. La presencia de ---
 3-cetoglicósidos se pone de manifiesto por la reacción de Bened-
 dict, que produce una coloración rojiza alrededor del desarro-
 llo bacteriano. En este caso ninguna de las tres cepas estu-
 diadas produjo reacción positiva de Benedict.

iii. Tolerancia al pH.

Todas las cepas mostraron crecimiento nulo a pH=4.0, esca-
 so a pH=5.0 y abundante a pH=6.0, 7.0 y 8.0.

iv. El desarrollo fue poco en el medio de agar glucosa --
 peptona y no se produjo ningún cambio en el pH del medio.

4.2.2.4 Pruebas bioquímicas.

i. Crecimiento en leche tornasolada con reacción ligera-
 mente alcalina y producción de zona de suero.

ii. Producción de ácido sulfhídrico. Ninguna cepa produjo
 H_2S y el desarrollo en este medio fue muy pobre.

iii. La actividad de la catalasa fue positiva para las --
 tres cepas.

iv. Licuafacción de la gelatina. Reacción negativa en to-
 das las pruebas.

v. Tolerancia al NaCl. Las concentraciones de 2 y 3% re-
 sultaron ser inhibitorias del crecimiento de Rhizobium. Las --
 tres cepas no fueron capaces de desarrollarse a tales concen-

traciones de NaCl.

4.2.2.5 Utilización de carbohidratos.

El desarrollo de las tres cepas fue muy abundante en las cajas que contenían: glucosa, fructuosa, inulina, xilosa, rafinosa y lactosa, sin producción de ácido y gas. En las cajas que contenían celulosa como fuente de carbono no hubo crecimiento bacteriano.

4.2.2.6 Propiedades de infectividad.

El único huésped que produjo nódulos al ser infectado por las cepas de Rhizobium phaseoli fue el frijol (Phaseolus vulgaris). No se produjeron reacciones cruzadas con los otros huéspedes testigo. El testigo control negativo no presentó nodulación.

TABLA 2.

RESULTADOS DE LA IDENTIFICACION Y CARACTERISTICAS
DE CULTIVO DE Rhizobium phaseoli.

	TINCION Y MORFOLOGIA		CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS
Cepa 136 FH	a) Tinción de Gram Bacilos cortos Gram(-), no pre- sentan esporas	b) Tinción con Sudán Negro B presencia de grá- nulos sudanófilos en el interior de las células.	Las colonias son redondas, con- vexas, transparentes y brillan- tes, producen goma de aspecto a- cuoso, tienen un diámetro prome- dio de 4 mm.
Cepa 137 FH	Bacilos cortos Gram (-), no pre- sentan esporas.	presencia de grá- nulos sudanófilos en el interior de las células.	Las colonias son redondas, con- vexas, transparentes y brillan- tes, producen goma de aspecto acuoso, tienen un diámetro pro- medio de 4 mm.
Cepa 139 FH	Bacilos cortos Gram (-), no pre- sentan esporas.	presencia de grá- nulos sudanófilos en el interior de las células.	Las colonias son redondas, con- vexas, transparentes y brillan- tes, producen goma de aspecto acuoso, tienen un diámetro pro- medio de 4 mm.

TABLE 3.

CARACTERISTICAS DEL CRECIMIENTO.

	1. Crecimiento en agar extracto de levadura manitol con Rojo Congo.	2. Crecimiento en medio de Brockwell.		3. Tolerancia al pH					4. Crecimiento en agar glucosa peptona.	
		a) crecimiento.	b) Reacción de Benedict.	a) 4.0	b) 5.0	c) 6.0	d) 7.0	e) 8.0	a) crecimiento	b) cambio de pH
Cepa 136 FM	Crecimiento de colonias características, sin absorción del colorante.	(+)	(-)	(-)	(±)	(+)	(+)	(+)	(±)	(-)
Cepa 137 FM	Crecimiento de colonias características, sin absorción del colorante.	(+)	(-)	(-)	(±)	(+)	(+)	(+)	(±)	(-)
Cepa 139 FM	Crecimiento de colonias características, sin absorción del colorante.	(+)	(-)	(-)	(±)	(+)	(+)	(+)	(±)	(-)

(+) = crecimiento positivo.

(-) = crecimiento negativo.

(±) = crecimiento escaso.

TABLA 4.

PRUEBAS BIOQUIMICAS.

	1. Crecimiento en leche tornasolada		2. Prod. de H ₂ S	3. Actividad de la catalasa.	4. Licuefacción de la gelatina.	5. Tolerancia al NaCl	
	a) Reacción	b) Prod. de zona de suero				a) 2%	b) 3%
Cepa 136 FN	alcalina	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Cepa 137 FN	alcalina	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Cepa 139 FN	alcalina	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)

TABLA 5.

UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS.

	1. Glucosa			2. Rafinosa			3. Fructuosa			4. Inulina		
	a) creci- miento	b) P.A	c) P.G.	a) crec.	b) P.A.	c) P.G.	a) crec.	b) P.A.	c) P.G.	a) crec.	b) P.A.	c) P.G.
Cepa 136 FM	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)
Cepa 137 FM	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)
Cepa 139 FM	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)

(+++) = crecimiento muy abundante.

F.A. = producción de ácido.

P.G. = producción de gas.

TABLA 5. (continuación).

	5. Xilosa			6. Lactosa			7. Celulosa.		
	a) crec.	b) P.A.	c) P.G.	a) crec.	b) P.A.	c) P.G.	a) crec.	b) P.A.	c) P.G.
Copa 136 EM	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Copa 137 EM	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Copa 139 EM	(+++)	(-)	(-)	(+++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(+++) = crecimiento muy abundante.

P.A. = producción de ácido.

P.G. = producción de gas.

TABLA 6.

PROPIEDADES DE INFECTIVIDAD.

	1. <u>Glicine max</u> <u>Merr.</u> a) nodulación	2. <u>Medicago sativa</u> <u>L.</u> a) nodulación	3. <u>Phaseolus vulgaris</u> <u>L.</u> a) nodulación	4. <u>Trifolium repens</u> <u>L.</u> a) nodulación
Cepa 136 FK	(-)	(-)	(+)	(-)
Cepa 137 FK	(-)	(-)	(+)	(-)
Cepa 139 FK	(-)	(-)	(+)	(-)

TABLA 7.

4.3.2 Resultados de los ensayos de calidad de los inóculos

4.3.2.1 Control cualitativo.

	Cepa 136 FM	Cepa 137 FM	Cepa 139 FM
pH	7.30	7.20	7.20
Tinción de Gram	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)
Agar peptonado			
a) cambio de pH	negativo	negativo	negativo
b) crecimiento	escaso	escaso	escaso
Agar extr. de lev. manitol.			
a) Desarrollo de contaminantes de crecimiento rápido	negativo	negativo	negativo
b) absorción del colorante	negativo	negativo	negativo

4.3.2.2 Control cuantitativo.

Recuento total de rhizobia (org/ml)	7.0×10^9	6.0×10^9	7.0×10^9
Recuento de los rhizobia viables (org/ml.)	6.8×10^9	5.9×10^9	6.8×10^9

Curvas de supervivencia de Rhizobium phaseoli.

Resultados de la cuenta de microorganismos viables que sobrevivieron en los tres materiales utilizados como soportes.

Se utilizaron tres cepas proporcionadas por FERTIMEX, S.A.

Significado de las claves:

C 136 FM - Cepa 136 FM

C 137 FM - Cepa 137 FM

C 139 FM - Cepa 139 FM

Clasificación en el catálogo
de cepas de FERTIMEX, S.A.

El tiempo de experimentación fue de 0 a 45 días, con intervalos de 15 días, durante los cuales se hicieron cuantificaciones de la población microbiana.

Los soportes utilizados fueron:

Composta cuyo origen fueron desechos de Ciudad (CI)

Composta cuyo origen fueron desechos agrícolas (CII)

Turba (T)

Las dos compostas y la turba, fueron utilizadas de la siguiente manera:

Soportes esterilizados con rayos gamma antes de ser inoculados con Rhizobium phaseoli (Serie \bar{J}).

Soportes sin esterilizar (Serie SR).

Los tratamientos se realizaron por triplicado para cada soporte (a,b,c repeticiones), de acuerdo a las variables del planteamiento estadístico.

La determinación del número de microorganismos viables se realizó por duplicado.

TABLA 8a.

CUENTA DIRECTA DE MICROORGANISMOS VIABLES $\times 10^8$

Cepa 136 FM	DIA 0		DIA 15		DIA 30		DIA 45		
Serie J									
CI J a	130.0	134.0	38.0	37.0	11.4	12.0	6.2	6.5	
CI J b	134.0	124.0	43.0	42.0	16.1	15.6	6.0	5.9	
CI J c	132.0	132.0	18.0	41.0	13.4	14.6	6.8	6.3	
<hr/>									
GII J a	167.0	136.0	294.0	290.0	292.0	298.0	290.0	284.0	
GII J b	147.0	169.0	294.0	280.0	276.0	280.0	270.0	270.0	
GII J c	165.0	168.0	296.0	264.0	282.0	280.0	288.0	286.0	
<hr/>									
T J a	168.0	185.0	310.0	280.0	320.0	310.0	320.0	310.0	
T J b	138.0	134.0	280.0	310.0	300.0	300.0	290.0	290.0	
T J c	177.0	196.0	300.0	290.0	310.0	310.0	300.0	300.0	
<hr/>									
Cepa 136 FM									
Serie SE									
CI SEa	124.0	114.0	2.6	1.8	1.68	1.82	1.15	1.17	
CI SEb	119.0	108.0	1.8	1.9	1.62	1.72	1.19	1.18	
CI SEc	120.0	115.0	2.5	2.5	1.74	1.69	1.20	1.19	
<hr/>									
GII SEa	138.0	153.0	9.0	8.0	6.0	7.2	7.0	6.2	
GII SEb	132.0	120.0	9.4	9.8	9.0	8.9	7.8	8.0	
GII SEc	140.0	146.0	7.7	9.0	7.9	8.7	7.9	8.3	
<hr/>									
T SEa	147.0	137.0	282.0	264.0	213.0	209.0	138.0	150.0	
T SEb	204.0	179.0	288.0	294.0	204.0	211.0	140.0	144.0	
T SEc	190.0	185.0	291.0	302.0	207.0	202.0	146.0	151.0	

CI = composta de basuras industrializadas.

GII = composta de desechos agrícolas.

T = turba.

TABLE 8b

Copa 136 FM

Serie J

PROMEDIO DE LAS LECTURAS Y LOGARITMOS DE LA CUENTA DIRECTA DE MICROORGANISMOS VIABLES .

	DIA 0		DIA 15		DIA 30		DIA 45	
	PROMEDIO	LOG	PROMEDIO	LOG	PROMEDIO	LOG	PROMEDIO	LOG
CI	134.0×10^8	10.1173	35.5×10^8	9.5622	13.9×10^8	9.1430	6.28×10^8	8.7979
CII	159.0×10^8	10.2014	286.0×10^8	10.4564	285.0×10^8	10.4548	280.0×10^8	10.4472
T	166.0×10^8	10.2201	294.0×10^8	10.4683	306.0×10^8	10.4857	301.0×10^8	10.4786
Copa 136 FM								
Serie SE								
CI	117.0×10^8	10.0682	2.18×10^3	8.3384	1.72×10^8	8.2355	1.18×10^8	8.0718
CII	138.0×10^8	10.1399	8.82×10^8	8.9454	7.95×10^8	8.9003	7.53×10^8	8.8767
T	174.0×10^8	10.2405	287.0×10^8	10.4579	208.0×10^8	10.3181	145.00×10^8	10.1614

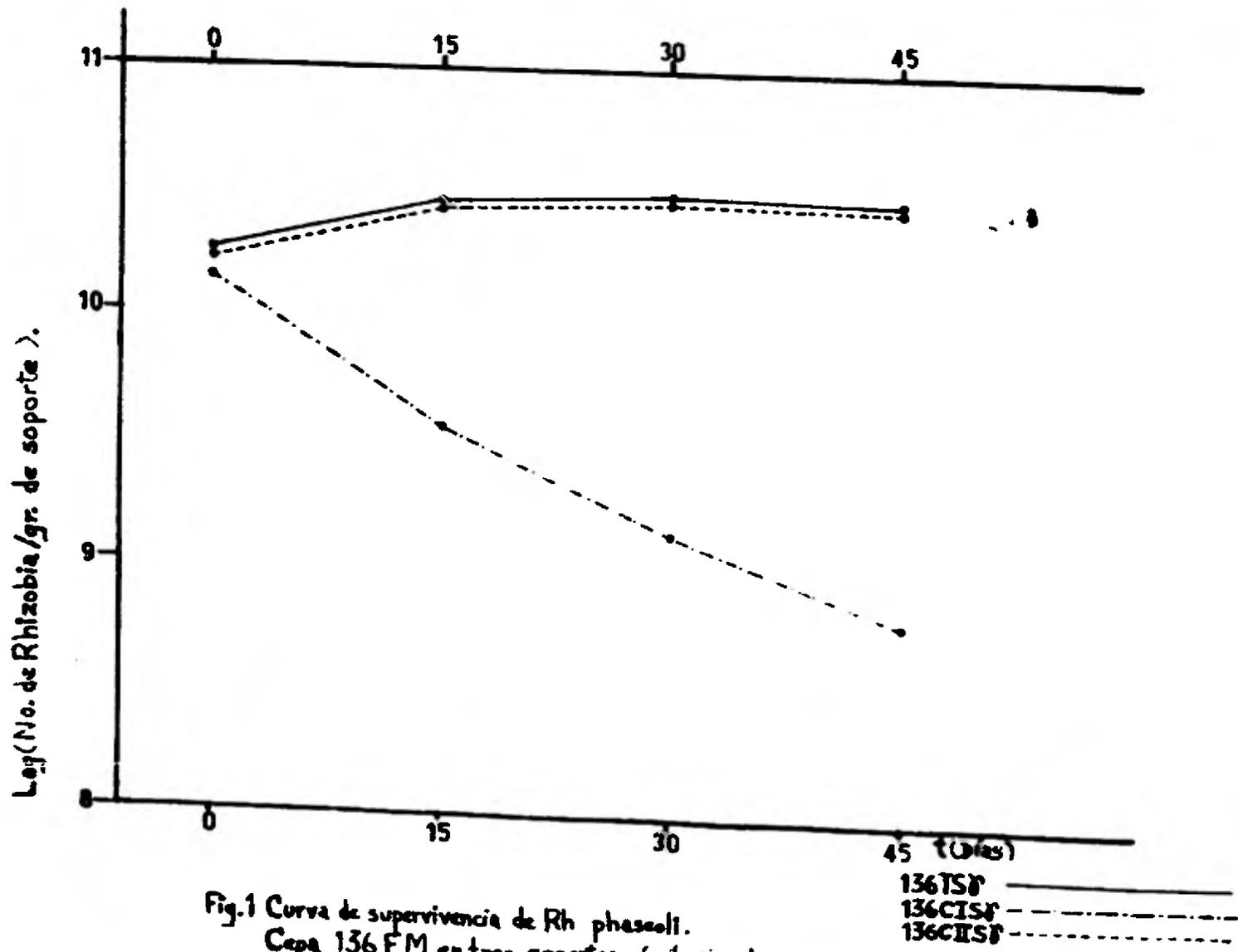


Fig.1 Curva de supervivencia de Rh phaseoli.
 Cepa 136 FM en tres soportes (esterilizados con rayos gama).
 (Los valores corresponden a la tabla 8b).

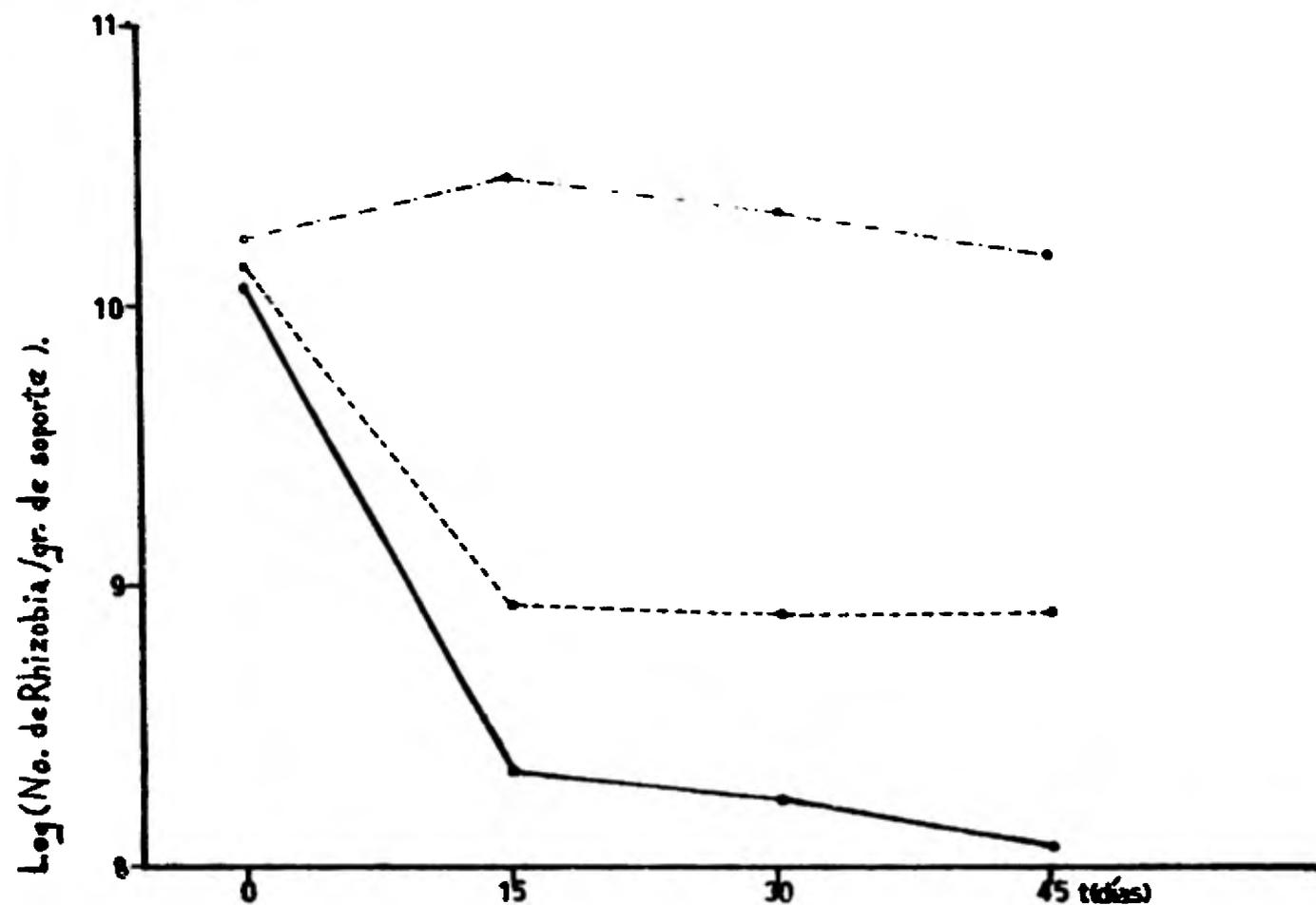


Fig.2 Curva de Supervivencia de Rh. pluvialis.
 Cepa 136 FM en tres soportes (sin esterilizar).
 (Los valores corresponden a la tabla 8b).

136TSE -----
 136CISE -----
 136CI SE -----

TABLE 4c

CUENTA DIRECTA DE MICROORGANISMOS VIABLES X 10⁸

Cepa 137 FM

Serie 7	DIA 0		DIA 15		DIA 30		DIA 45		
	CI 7 a	110.0	99.0	5.6	4.4	2.9	3.4	2.4	2.46
CI 7 b	97.0	108.0	4.8	5.4	3.5	3.5	2.52	2.5	
CI 7 c	88.0	95.0	5.8	5.3	2.4	2.6	2.5	2.7	
CI 7a	264.0	234.0	282.0	276.0	296.0	270.0	228.0	276.0	
CI 7b	252.0	260.0	293.0	288.0	288.0	294.0	270.0	276.0	
CI 7c	232.0	252.0	286.0	280.0	270.0	271.0	280.0	282.0	
T 7 a	198.0	203.0	246.0	265.0	267.0	266.0	262.0	260.0	
T 7 b	210.0	207.0	237.0	233.0	233.0	235.0	235.0	234.0	
T 7 c	209.0	211.0	228.0	223.0	225.0	229.0	224.0	227.0	
Cepa 137 FM									
Serie SE									
CI SEa	21.0	22.0	2.2	2.4	0.21	0.19	0.18	0.174	
CI SEb	21.0	19.0	1.4	2.9	0.18	0.20	0.174	0.173	
CI SEc	18.0	23.0	2.3	1.7	0.20	0.23	0.169	0.172	
CII SEa	142.0	185.0	27.0	30.0	26.4	23.4	19.0	19.8	
CII SEb	171.0	190.0	33.0	31.0	25.7	25.9	16.4	16.8	
CII SEc	192.0	187.0	37.0	35.0	27.1	26.7	19.8	16.7	
T SEa	198.0	201.0	216.0	219.0	140.0	142.0	138.0	135.0	
T SEb	222.0	211.0	215.0	209.0	137.0	139.0	132.0	137.0	
T SEc	196.0	207.0	213.0	217.0	146.0	143.0	148.0	145.0	

TABLA 9b. PROMEDIO DE LAS LECTURAS Y LOGARITMOS DE LA CUENTA DIRECTA DE MICROORGANISMOS VIABLES.

Copa 137 FN Serie J	DIA 0		DIA 15		DIA 30		DIA 45	
	PROMEDIO	LOG	PROMEDIO	LOG	PROMEDIO	LOG	PROMEDIO	LOG
CI	99.5 X 10 ⁸	9.9978	5.22 X 10 ⁸	8.7176	3.05 X 10 ⁸	8.4843	2.51 X 10 ⁸	8.3996
CII	249.0 X 10 ⁸	10.3962	284.0 X 10 ⁸	10.4533	282.0 X 10 ⁸	10.4502	267.0 X 10 ⁸	10.4265
T	206.0 X 10 ⁸	10.3139	239.0 X 10 ⁸	10.3784	243.0 X 10 ⁸	10.3856	240.0 X 10 ⁸	10.3802
<hr/>								
Copa 137 FN Serie SE								
CI	21.0 X 10 ⁸	9.3222	2.15 X 10 ⁸	8.3324	0.202 X 10 ⁸	7.3053	0.174 X 10 ⁸	7.2405
CII	178.0 X 10 ⁸	10.2504	32.2 X 10 ⁸	9.5078	25.9 X 10 ⁸	9.4133	18.1 X 10 ⁸	9.2576
T	207.0 X 10 ⁸	10.3160	215.0 X 10 ⁸	10.3324	143.0 X 10 ⁸	10.1553	139.0 X 10 ⁸	10.1430

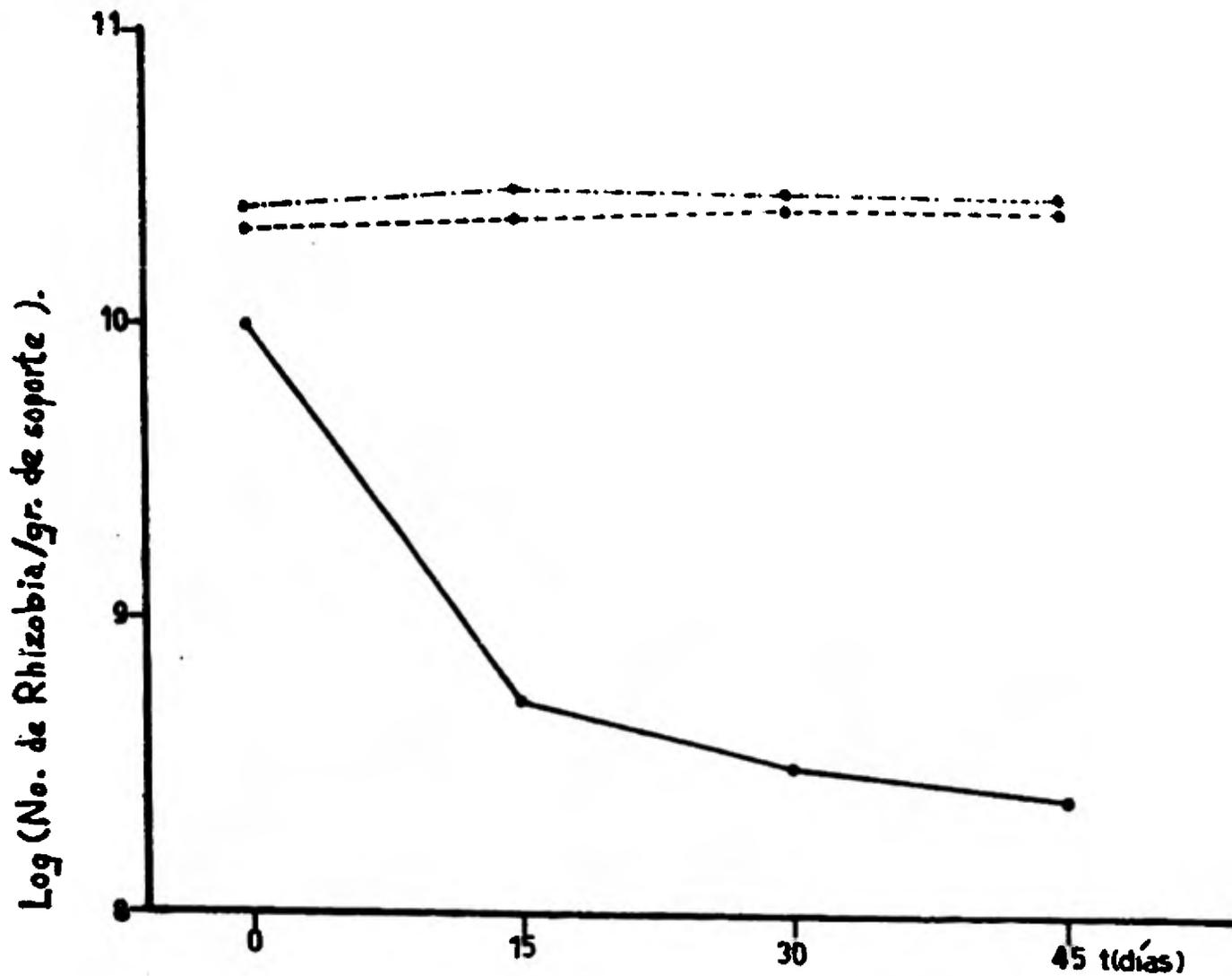


Fig. 3 Curva de supervivencia de *Rh. phaseoli*.
 Cepa 137 FM en tres soportes (esterilizados con rayos gamma).

(Los valores corresponden a la tabla 9a).

137T58 -----
 137C158 _____
 137C158 -.-.-.-.-

Fig. 4 Curva de supervivencia de Rh. phaseoli.
Cepa 137FM en tres soportes (sin esterilizar).
(Los valores corresponden a la tabla 9b).

Log (No. de Rhizobia /gr. de soporte).

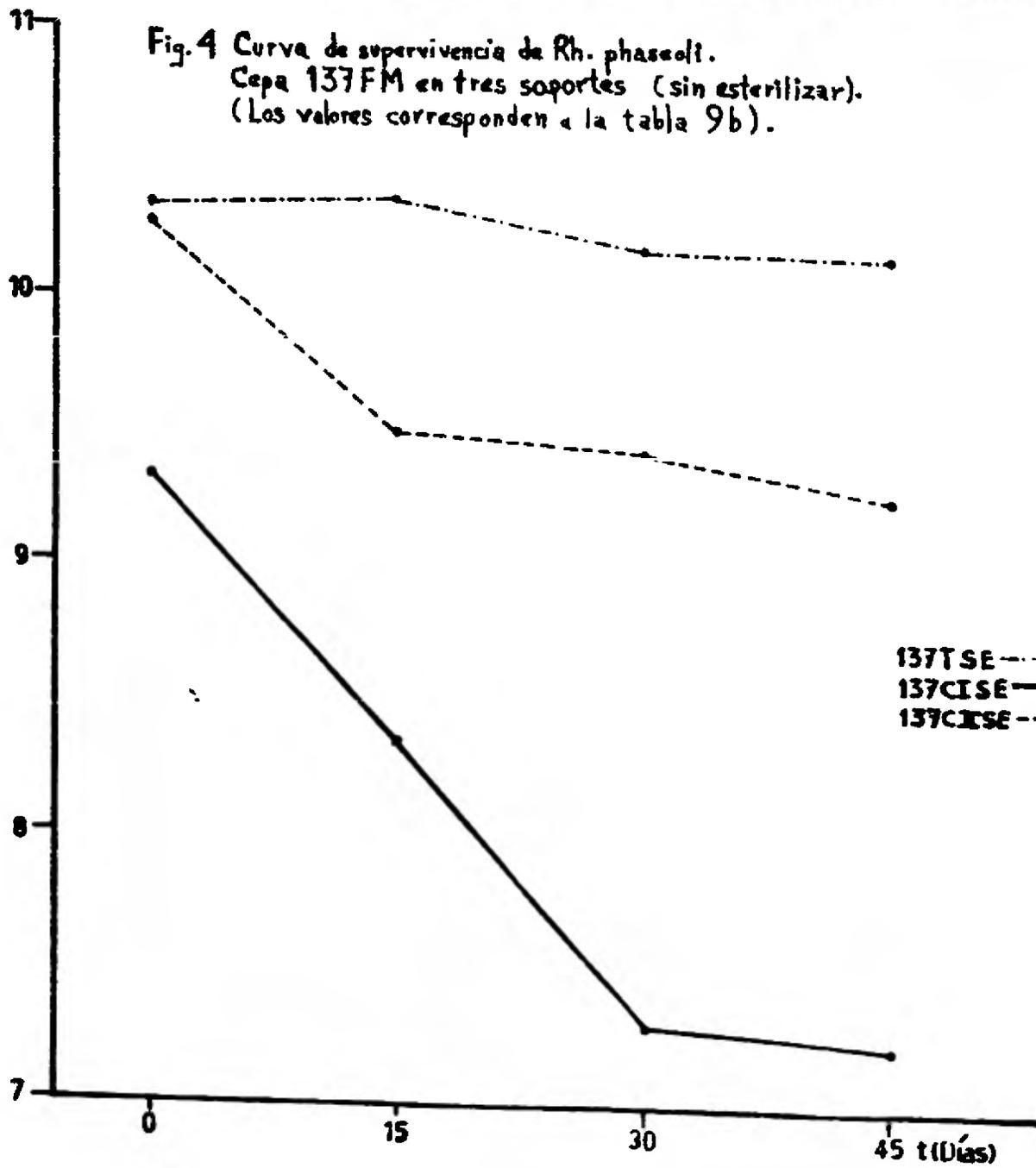


TABLA 10a.

Copa 139 FM

Serie J

CUENTA DIRECTA DE MICROORGANISMOS VIABLES X 10⁸

	DIA 0		DIA 15		DIA 30		DIA 45	
CIJ a	27.0	39.0	20.5	19.2	6.1	6.0	1.00	0.71
CIJ b	36.0	28.0	16.5	19.3	5.3	6.3	0.95	1.01
CIJ c	44.0	43.0	15.1	15.4	8.2	7.0	0.97	0.99
CIIJ a	160.0	150.0	264.0	252.0	203.0	213.0	192.0	189.0
CIIJ b	160.0	165.0	240.0	258.0	207.0	205.0	180.0	179.0
CIIJ c	150.0	167.0	260.0	259.0	223.0	220.0	187.0	190.0
TJ a	105.0	147.0	277.0	309.0	340.0	340.0	330.0	340.0
TJ b	113.0	160.0	311.0	313.0	360.0	350.0	340.0	340.0
TJ c	160.0	165.0	307.0	311.0	350.0	360.0	350.0	350.0
Copa 139 FM								
Serie SE								
CI SEa	32.0	38.0	2.2	2.0	0.46	0.40	0.138	0.135
CI SEb	33.0	32.0	2.7	2.0	0.37	0.41	0.144	0.144
CI SEc	39.0	37.0	2.6	2.4	0.39	0.37	0.150	0.145
CIJ SEa	36.0	37.0	15.0	16.0	7.2	6.8	4.5	4.3
CIJ SEb	39.0	38.0	17.0	16.0	7.4	6.6	4.0	4.5
CIJ SEc	34.0	39.0	18.0	19.0	6.8	6.6	5.1	4.6
T SEa	99.0	109.0	264.0	270.0	187.0	193.0	125.0	128.0
T SEb	133.0	127.0	267.0	263.0	190.0	197.0	148.0	145.0
T SEc	129.0	113.0	268.0	269.0	195.0	192.0	144.0	140.0

TABLA 10b.

PROMEDIOS DE LAS LECTURAS Y LOGARITMOS DE LA CUENTA DIRECTA DE MICROORGANISMOS VIABLES.

Cepa 139 FM Serie J	DIA 0		DIA 15		DIA 30		DIA 45	
	PROMEDIO	LOG	PROMEDIO	LOG	PROMEDIO	LOG	PROMEDIO	LOG
CI	36.2 X 10 ⁸	9.5587	17.7 X 10 ⁸	9.2479	6.48 X 10 ⁸	8.8115	0.93 X 10 ⁸	7.9724
CII	159.0 X 10 ⁸	10.2014	256.0 X 10 ⁸	10.4082	212.0 X 10 ⁸	10.3263	186.0 X 10 ⁸	10.2695
F	142.0 X 10 ⁸	10.1523	305.0 X 10 ⁸	10.4843	344.0 X 10 ⁸	10.5441	341.0 X 10 ⁸	10.5336
<hr/>								
Cepa 139 MM Serie SE	DIA 0		DIA 15		DIA 30		DIA 45	
	PROMEDIO	LOG	PROMEDIO	LOG	PROMEDIO	LOG	PROMEDIO	LOG
CI	35.2 X 10 ⁸	9.5465	2.32 X 10 ⁸	8.3654	0.40 X 10 ⁸	7.6020	0.143 X 10 ⁸	7.1553
CII	37.2 X 10 ⁸	9.5705	16.8 X 10 ⁸	9.2253	6.9 X 10 ⁸	8.8388	4.5 X 10 ⁸	8.6532
F	118.0 X 10 ⁸	10.0719	267.0 X 10 ⁸	10.4265	192.0 X 10 ⁸	10.2833	138.0 X 10 ⁸	10.1399

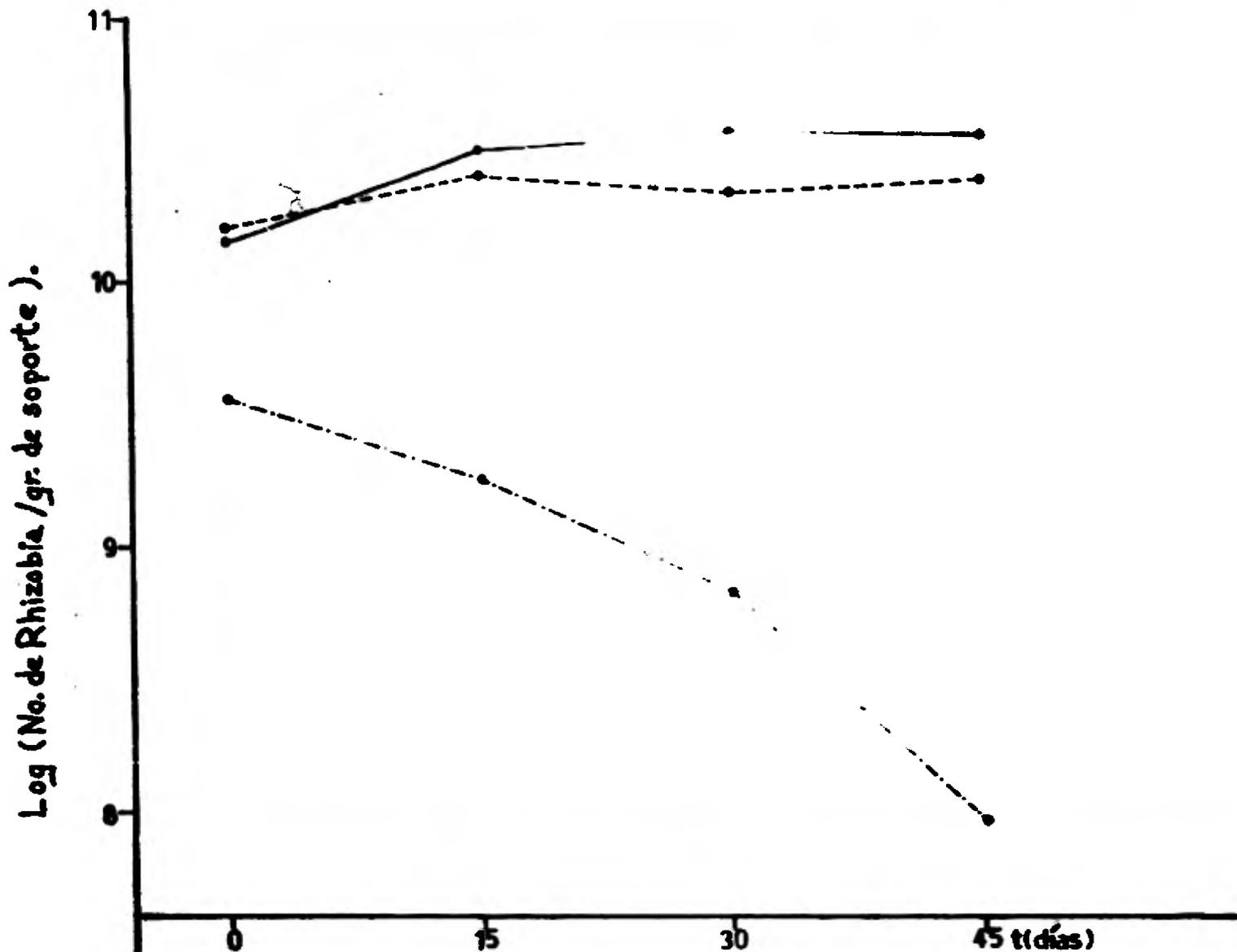
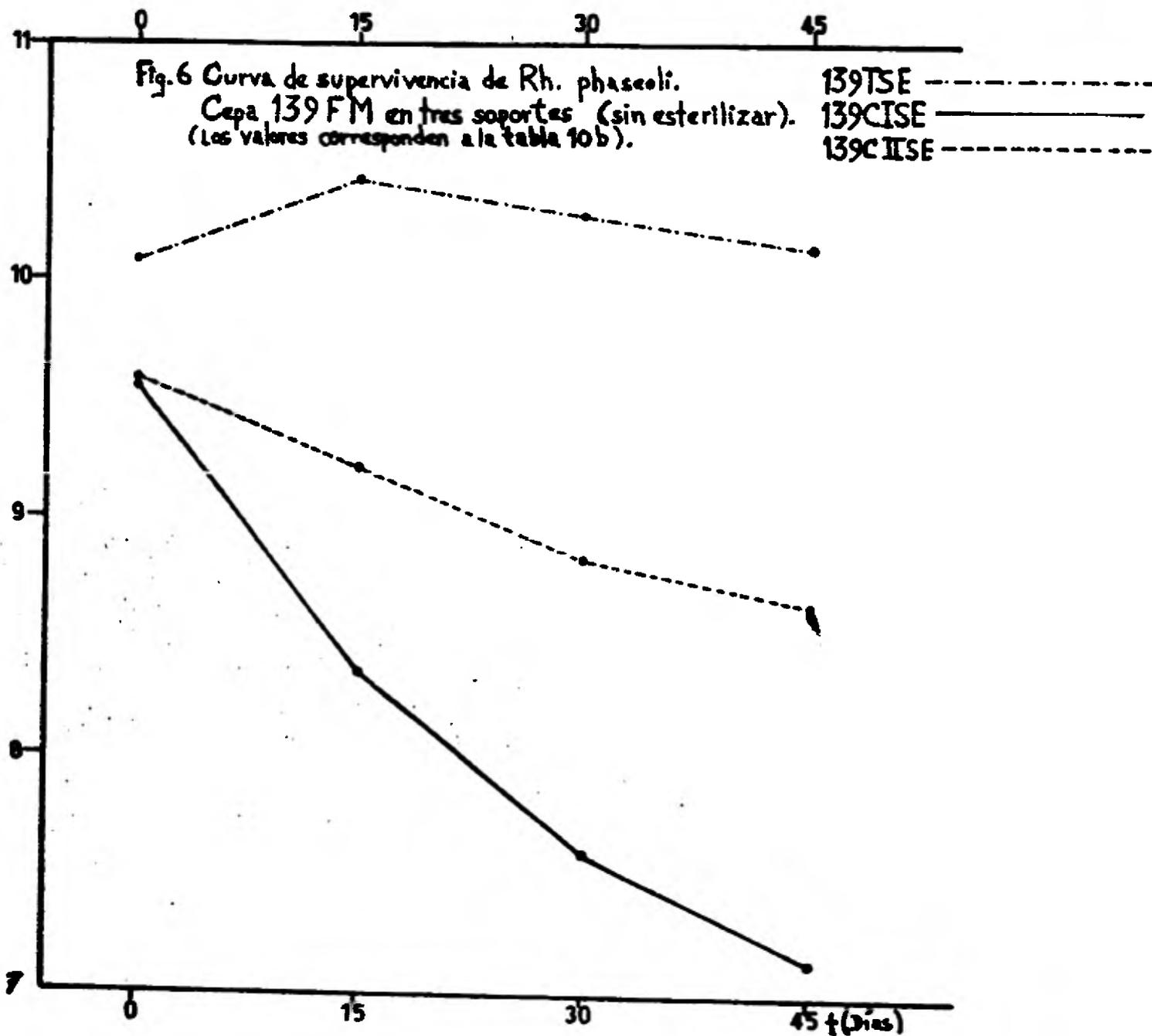


Fig.5 Curva de Supervivencia de Rh. phaseoli.
 Cope 139 FM en tres soportes (esterilizados
 con rayos gamma).
 (Los valores corresponden a la tabla 10b).

139TS —————
 139CS - - - - -
 139CIS - · - - -

Log(No. de Rhizobia / gr. de soporte).



Resultados del Análisis Estadístico.

Una vez planteado el modelo de parcelas divididas con tres factores principales y el tiempo como factor que divide a la parcela, se procedió a realizar el análisis correspondiente obteniéndose las tablas de Análisis de Varianza, cuyos resultados son los siguientes:

Se procedió a probar la hipótesis de no interacción entre los 4 factores (cepa, soporte, esterilización y tiempo), encontrándose que no se rechazó esta ($P = 0.9995$, donde P es el nivel de significancia descriptivo).

Hecha esta prueba se procedió a contrastar la hipótesis de no interacción entre 3 factores, encontrándose que en las 4 posibles pruebas (es decir las pruebas de no interacción entre cepa-soporte-esterilización, cepa-soporte-tiempo, cepa-esterilización-tiempo y soporte-esterilización-tiempo), se rechazaron estas con un nivel de significancia descriptivo menor que 0.0005. Por lo que este hecho marca la necesidad de partir el experimento en subexperimentos, considerando que uno de los factores pasará a ser considerado condición experimental y se contará sólo con tres factores de interés.

Como la hipótesis de no interacción entre tres y dos fac-

tores y sus posibles pruebas, se rechazó con un nivel de significancia descriptivo menor de 0.0005, se procedió a fijar -- los factores de menor interés como condiciones experimenta--- les, los factores que se fijaron fueron; tiempo, esterilización y cepa. Lo que proporcionó 24 modelos con sólo 1 criterio de clasificación (soportes).

En cada uno de los análisis de los soportes, la hipótesis a probar es la igualdad de soportes. En caso de rechazarse -- esta hipótesis se muestra la relación sugerida por los datos que guardan los 3 soportes en orden decreciente empleando la técnica de comparaciones múltiples de Scheffé.

El estudio estadístico completo viene en las tablas 2 a 7 del Apéndice.

TABLA 11. Resultados del Análisis Estadístico.

(Tiempo 0 días).

Fuente de variación	Soportes	P
Cepa 136 FM - S δ	CI = CII = T	0.05-0.10
Cepa 136 FM - SE	CI < CII CII < T CI < T	0.00006 0.00001 0.0005
Cepa 137 FM - S δ	CI < CII T < CII CI < T	0.00003 0.008 0.0005
Cepa 137 FM - SE	CI < T CI < CII CII \leq T*	0.0005 0.00002 0.027
Cepa 139 FM - S δ	CI < CII CII = T CI < T	0.0001 0.278 0.0005
Cepa 139 FM - SE	CI < T CI = CII CII < T	0.0005 0.942 0.0001

S δ = Serie δ (soportes esterilizados con rayos gamma).

SE = Serie SE (soportes sin esterilizar).

p = Nivel de significancia descriptivo.

*Esta decisión no es estadísticamente contundente, se requiere de experimentación adicional.

TABLA 12. Resultados del Análisis Estadístico.

(Tiempo 15 días).

Fuente de variación	Soportes	p
Cepa 136 FM - S δ	CI < T	0.000002
	CII = T	0.19
	CI < CII	0.0000023
Cepa 136 FM - SE	CI < T	0.0005
	CI = CII	0.49
	CII < T	0.000003
Cepa 137 FM - S δ	CI < CII	0.0005
	T < CII	0.003
	CI < T	0.0005
Cepa 137 FM - SE	CI < T	0.0005
	CI < CII	0.00009
	CII < T	0.000001
Cepa 139 FM - S δ	CI < T	0.0005
	CI < CII	0.000004
	CII < T	0.0006
Cepa 139 FM - SE	CI < T	0.0005
	CI < CII	0.0001
	CII < T	0.0000006

S δ = Serie δ (soportes esterilizados con rayos gamma).

SE = Serie SE (soportes sin esterilizar).

p = Nivel de significancia descriptivo.

TABLA 13. Resultados del Análisis Estadístico.

(Tiempo 30 días).

Fuente de variación	Soportes	P
Cepa 136 FM - S γ	CI < T	0.0005
	CI < CII	0.000003
	CII \leq T*	0.17
Cepa 136 FM - SE	CI < T	0.0005
	CII < T	0.000001
	CI \leq CII*	0.025
Cepa 137 FM - S γ	CI < CII	0.00001
	CI < T	0.0005
	T \leq CII*	0.0349
Cepa 137 FM - SE	CI < T	0.0005
	CI < CII	0.0002
	CII < T	0.000003
Cepa 139 FM - S γ	CI < T	0.0005
	CI < CII	0.000005
	CII < T	0.00001
Cepa 139 FM - SE	CI < T	0.0005
	CI < CII	0.001
	CII < T	0.0000007

S γ = Serie γ (soportes esterilizados con rayos gamma).

SE = Serie SE (soportes sin esterilizar).

p = Nivel de significancia descriptivo.

*Esta decisión no es estadísticamente contundente, se requiere de experimentación adicional.

TABLA 14. Resultados del Análisis Estadístico.

(Tiempo 45 días).

Fuente de variación	Soportes	p
Cepa 136 FM - S δ	CI < T	0.0005
	CI < CII	0.000005
	CII = T	0.06
Cepa 136 FM - SE	CI < T	0.0005
	CII < T	0.000001
	CI \leq CII*	0.0223
Cepa 137 FM - S δ	CI < CII	0.00001
	CII = T	0.113
	CI < T	0.0005
Cepa 137 FM - SE	CI < T	0.0005
	CI < CII	0.004
	CII < T	0.000004
Cepa 139 FM - S δ	CI < T	0.0005
	CI < CII	0.000004
	CII < T	0.000006
Cepa 139 FM - SE	CI < T	0.0005
	CI = CII	0.6971
	CII < T	0.00001

S δ = Serie δ (soportes esterilizados con rayos gamma).

SE = Serie SE (soportes sin esterilizar).

p = Nivel de significancia descriptivo.

*Esta decisión no es estadísticamente contundente, se requiere de experimentación adicional.

TABLA 15.- RESUMEN DE RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO.

	SERIE 7 (con radiación)			SERIE SE (sin radiación)		
	CEPA 136 FM	CEPA 137 FM	CEPA 139 FM	CEPA 136 FM	CEPA 137 FM	CEPA 139 FM
TIEMPO 0	CI=CII-T	CI < T < CII	CI < CII-T	CI < CII < T	CI < CII* < T	CI=CII < T
TIEMPO 15	CI < CII-T	CI < T < CII	CI < CII < T	CI=CII < T	CI < CII < T	CI < CII < T
TIEMPO 30	CI < CII* < T	CI < T < CII	CI < CII < T	CI* < CII < T	CI < CII < T	CI < CII < T
TIEMPO 45	CI < CII-T	CI < T=CII	CI < CII < T	CI* < CII < T	CI < CII < T	CI=CII < T

CI, CII y T representan el número de organismos viables por gramo de Composta I, Composta II y Turba respectivamente.

*Esta decisión no es estadísticamente contundente, se requiere de experimentación adicional.

Para poder hacer una estimación más aproximada de la población microbiana que sobrevivió en los soportes, se corrigieron las diferencias del número de microorganismos presentes en las distintas cantidades de inóculo que se agregó a los soportes estériles y a los no estériles, dando el valor de microorganismos viables en porciento; de esta forma se asignó el valor de 100% al número de rhizobia presentes en el inicio del período de experimentación (tiempo 0), para todos los soportes.

TABLA 16. Curvas del % de rizobia viable.

Soportes esterilizados con rayos gamma			Soportes sin esterilizar		
Cepa 136 FM S δ CI			Cepa 136 FM SE CI		
día	No. de rizobia $\times 10^8$	%	día	No. de rizobia $\times 10^8$	%
0	131.00	100.00	0	117.00	100.00
15	36.50	27.86	15	2.18	1.86
30	13.90	10.61	30	1.72	1.47
45	6.28	4.79	45	1.18	1.00
Cepa 136 FM S δ CII			Cepa 136 FM SE CII		
día	No. de rizobia $\times 10^8$	%	día	No. de rizobia $\times 10^8$	%
0	159.00	100.00	0	133.00	100.00
15	286.00	179.87	15	8.82	6.39
30	285.00	179.24	30	7.95	5.76
45	280.00	176.10	45	7.53	5.45
Cepa 136 FM S δ T			Cepa 136 FM SE T		
día	No. de rizobia $\times 10^8$	%	día	No. de rizobia $\times 10^8$	%
0	166.00	100.00	0	174.00	100.00
15	294.00	177.10	15	287.00	164.94
30	306.00	184.33	30	208.00	119.54
45	301.00	181.32	45	145.00	83.33

S δ = Serie δ (soporte esterilizados con rayos gamma).

SE = Serie SE (soportes sin esterilizar).

CURVA DEL % DE RHIZOBIA VIABLE.

Fig.7.-Cepa136 FM (soportes esterilizados con rayos γ).

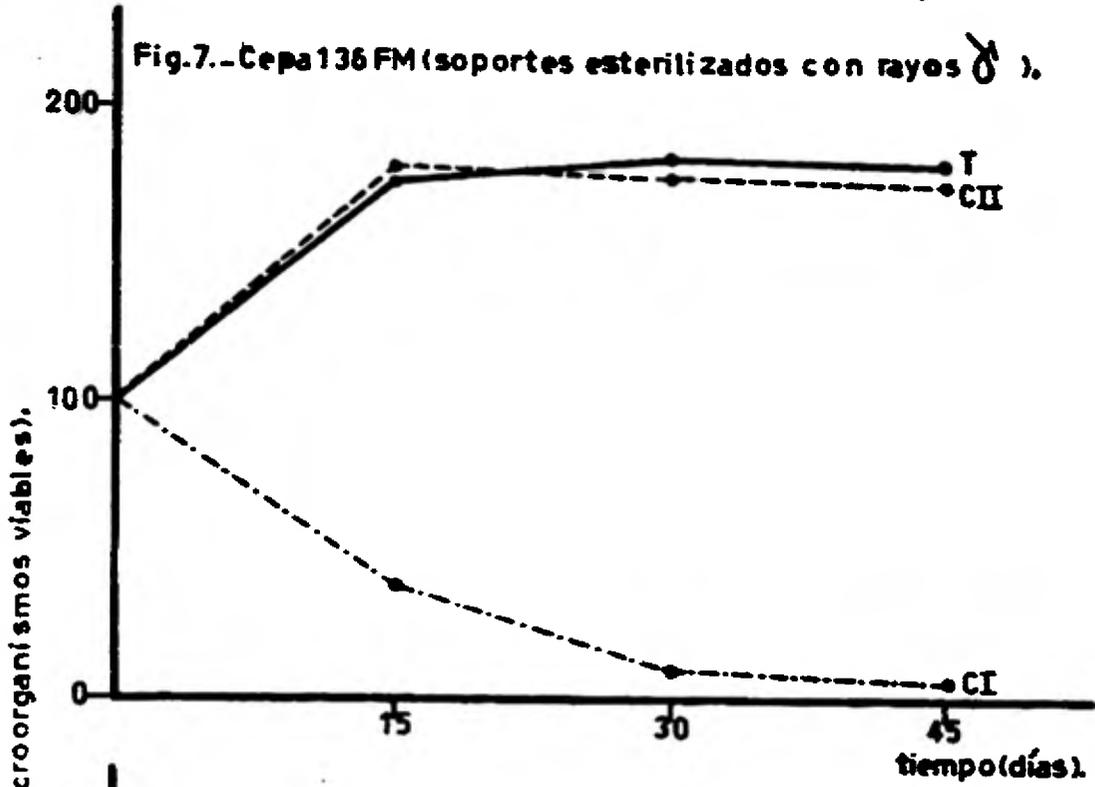


Fig.8.-Cepa136 FM (soportes sin esterilizar).

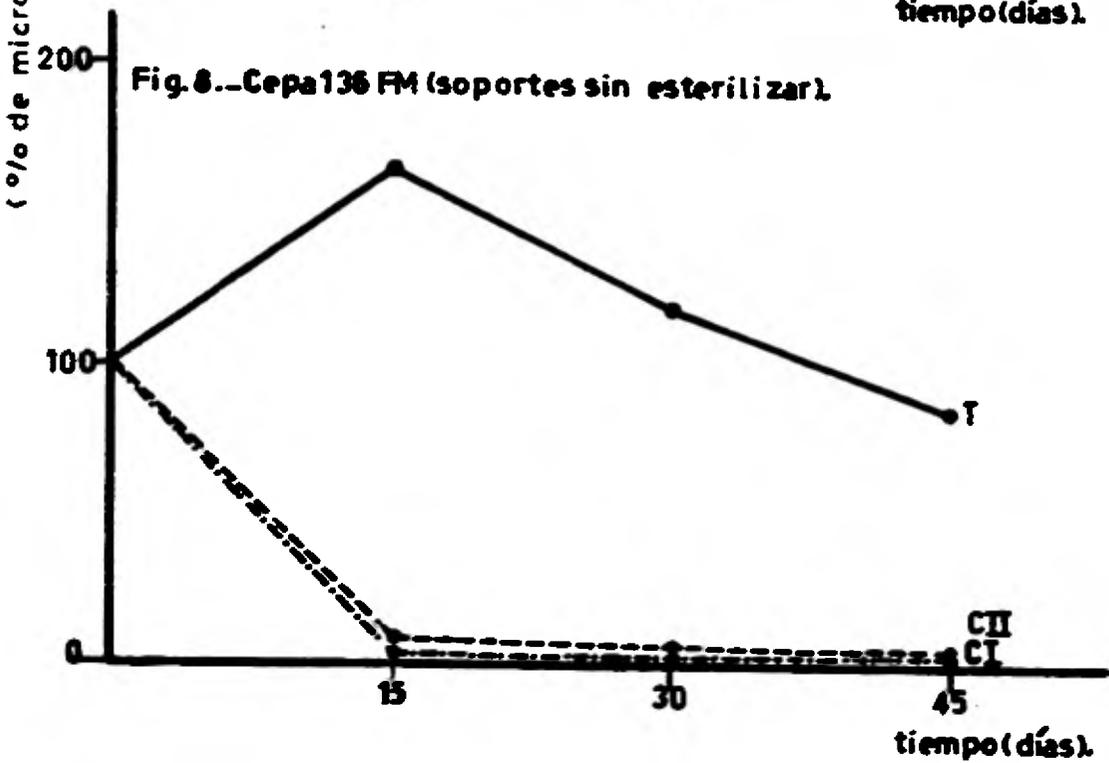


FIGURA 17. Curvas del % de rhizobia viable.

Soportes esterilizados con rayos gamma			Soportes sin esterilizar		
Cepa 137 FM SJ CI			Cepa 137 FM SE CI		
día	No. de rhizobia $\times 10^8$	%	día	No. de rhizobia $\times 10^8$	%
0	99.50	100.00	0	21.00	100.00
15	5.22	5.24	15	2.15	10.23
30	3.05	3.06	30	0.202	0.96
45	2.51	2.52	45	0.174	0.82
Cepa 137 FM SJ CII			Cepa 137 FM SE CII		
día	No. de rhizobia $\times 10^8$	%	día	No. de rhizobia $\times 10^8$	%
0	249.00	100.00	0	178.00	100.00
15	284.00	114.05	15	32.20	18.08
30	282.00	113.25	30	25.90	14.55
45	267.00	107.22	45	18.10	10.16
Cepa 137 FM SJ T			Cepa 137 FM SE T		
día	No. de rhizobia $\times 10^8$	%	día	No. de rhizobia $\times 10^8$	%
0	206.00	100.00	0	207.00	100.00
15	239.00	116.01	15	215.00	103.96
30	243.00	117.96	30	143.00	69.08
45	240.00	116.50	45	139.00	67.14

SJ = Serie J (soportes esterilizados con rayos gamma).

SE = Serie SE (soportes sin esterilizar).

CURVA DEL % DE RHIZOBIA VIABLE.

Fig. 9.-Cepa 137 FM (soportes esterilizados con rayos γ).

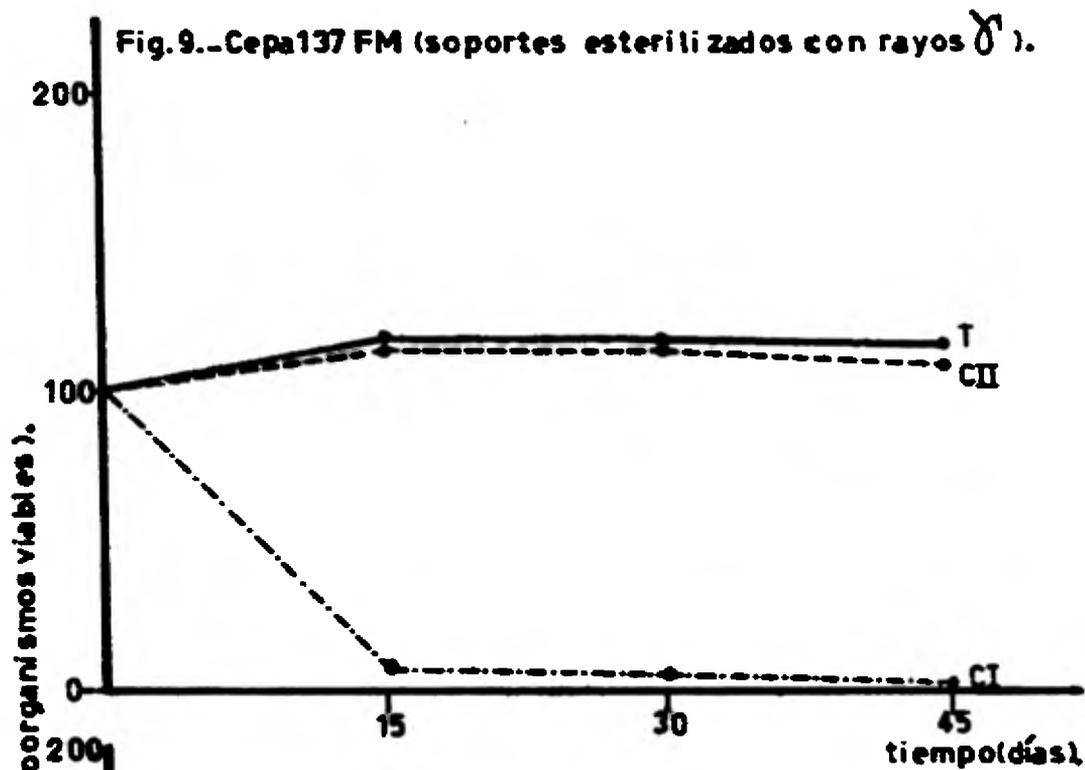


Fig. 10.-Cepa 137 FM (soportes sin esterilizar).

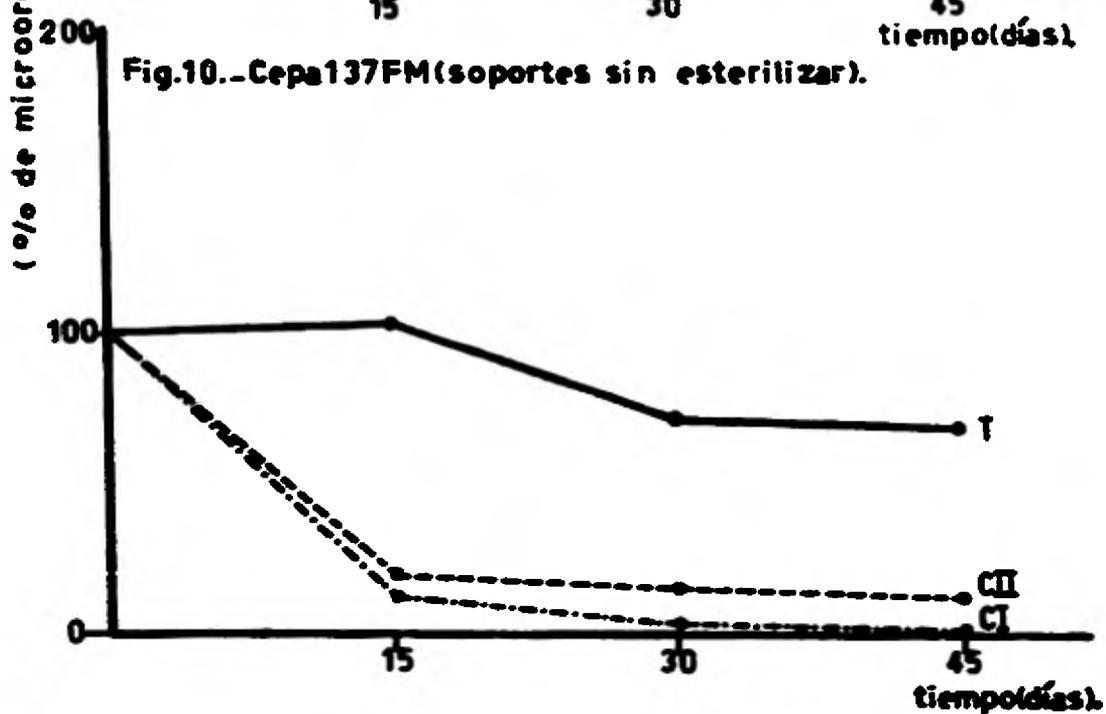


TABLA 18. Curvas del % de rizobia viable.

Soportes esterilizados con rayos gamma			Soportes sin esterilizar		
Cepa 139 FM S _f CI			Cepa 139 FM SE CI		
día	No. de rizobia X 10 ⁸	%	día	No. de rizobia X 10 ⁸	%
0	36.20	100.00	0	35.20	100.00
15	17.70	48.89	15	2.32	6.59
30	6.48	17.90	30	0.40	1.13
45	0.938	2.59	45	0.143	0.40
Cepa 139 FM S _f CII			Cepa 139 FM SE CII		
día	No. de rizobia X 10 ⁸	%	día	No. de rizobia X 10 ⁸	%
0	159.00	100.00	0	37.20	100.00
15	256.00	161.00	15	16.80	45.16
30	212.00	133.33	30	6.90	18.54
45	186.00	116.98	45	4.50	12.09
Cepa 139 FM S _f T			Cepa 139 FM SE T		
día	No. de rizobia X 10 ⁸	%	día	No. de rizobia X 10 ⁸	%
0	142.00	100.00	0	118.00	100.00
15	305.00	214.78	15	267.00	226.27
30	344.00	242.25	30	192.00	162.71
45	341.00	240.14	45	138.00	116.94

S_f = Serie *f* (Soportes esterilizados con rayos gamma).

SE = Serie SE (Soportes sin esterilizar).

CURVA DEL % DE RHIZOBIA VIABLE.

Fig.11.- Cepa 139 (soportes esterilizados con rayos γ)
FM

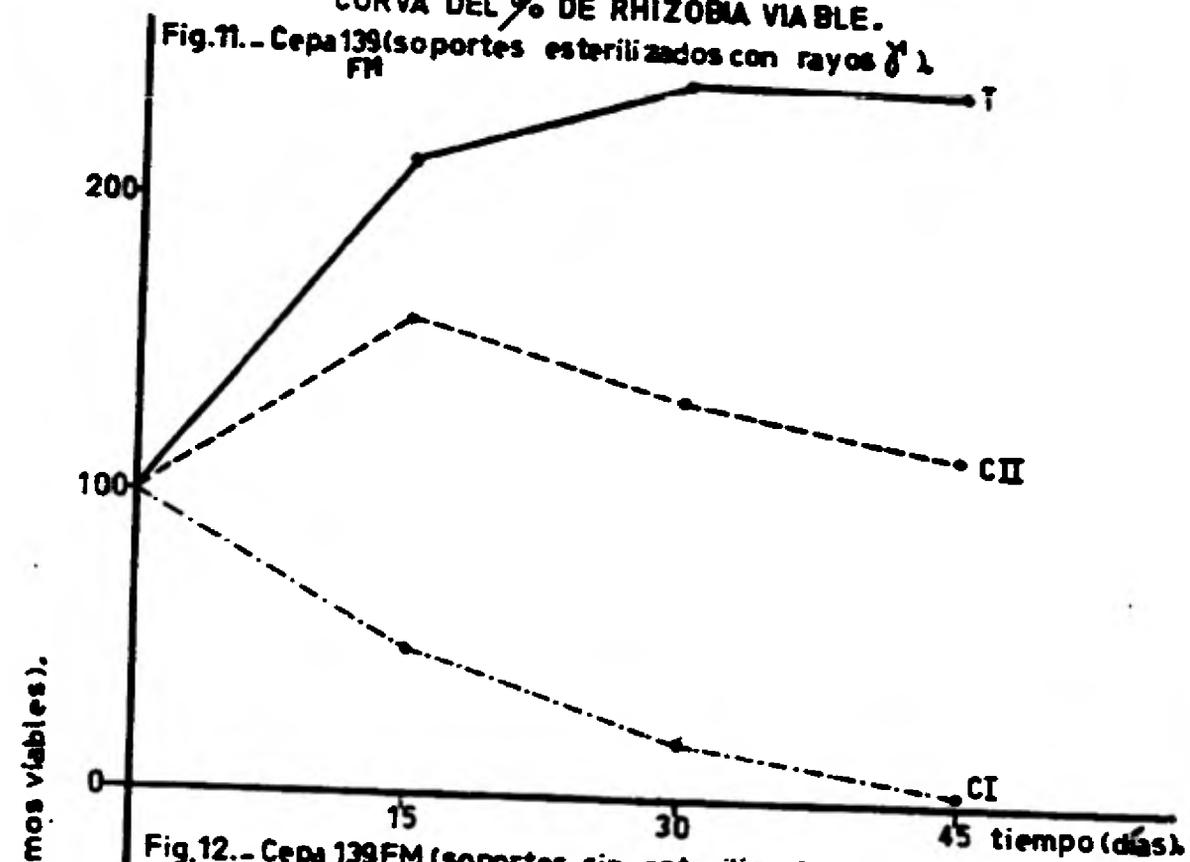


Fig.12.- Cepa 139 FM (soportes sin esterilizar).

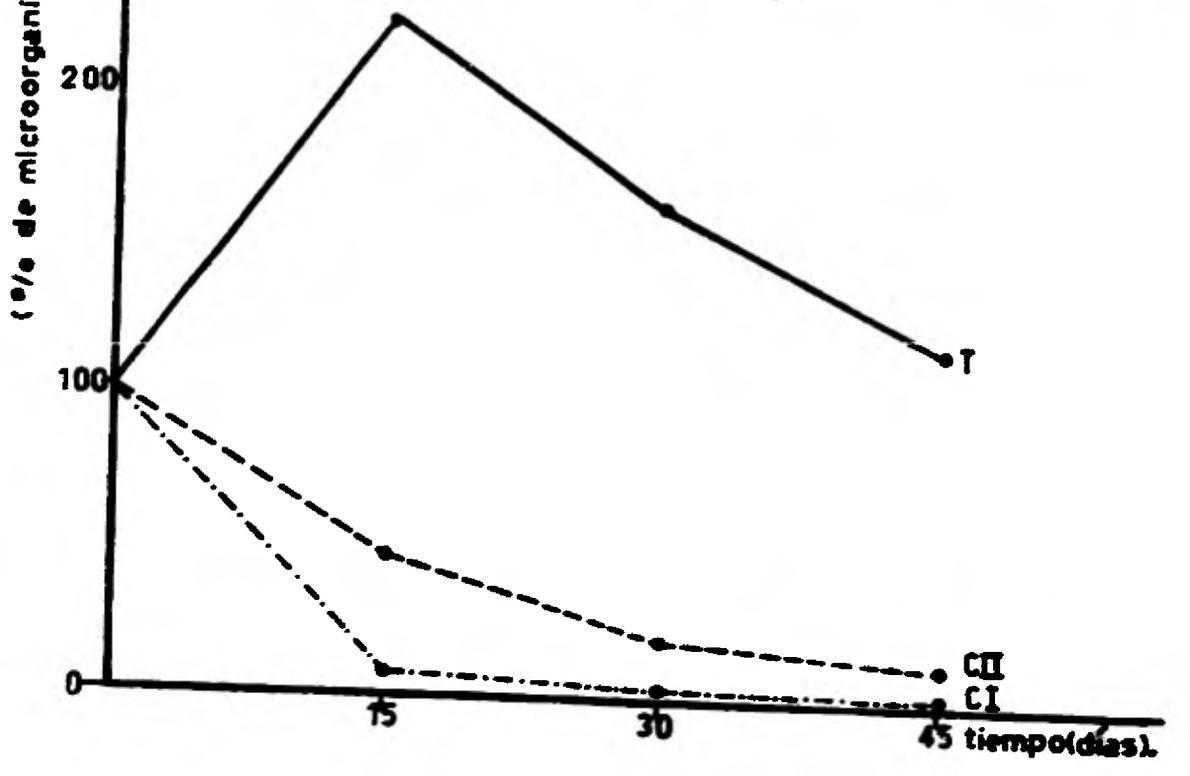


TABLA 19. Resultados de la inoculación de plantas de frijol
(Phaseolus vulgaris) con Rhizobium phaseoli.

	Altura (cms.)	Peso seco (grs.)	No.de nódulos	Nitrógeno (mg/gr.de planta)
Testigo^o				
(a)	10.5	0.45	0	0.96
(b)	10.0	0.46	0	0.88
X	10.25	0.455	0	0.92
Capa 136 FM en soportes esterilizados				
CI				
Sf a	16.00	1.67	44	1.20
Sf b	17.00	1.21	47	1.08
Sf c	15.00	0.76	36	1.26
X	16.00	1.2133	42.33	1.18
CII				
Sj a	16.00	0.95	42	1.18
Sj b	14.00	0.79	37	1.18
Sj c	18.00	1.62	50	1.22
X	16.00	1.12	43	1.1933
T				
Sf a	18.00	1.56	60	1.28
Sf b	16.50	1.45	57	1.24
Sf c	16.00	0.88	40	1.12
X	16.83	1.29	52.33	1.2133

Testigo^o = Plantas testigo sin inocular.

X = Promedio.

Sf = Series^f (soportes esterilizados con rayos gamma).

TABLE 20. Resultados de la inoculación de plantas de frijol
(Phaseolus vulgaris) con Rhizobium phaseoli.

	Altura (cms.)	Peso seco (gms.)	No. de nódulos	Nitrógeno (mg/gr. de planta)
Cepa 136 FM en soportes sin esterilizar				
CI				
SEa	16.00	0.63	35	1.10
SEb	17.00	0.85	37	1.00
SEc	15.00	1.00	40	1.02
Y	16.00	0.8266	37.33	1.04
CII				
SEa	17.50	0.84	50	1.18
SEb	17.00	0.74	40	1.20
SEc	13.00	0.72	37	1.00
Y	15.83	0.7666	42.33	1.1266
C				
SEa	14.00	0.88	38	1.22
SEb	17.00	0.95	43	1.08
SEc	16.00	1.00	38	1.00
Y	15.66	0.9433	39.66	1.10

Y = Promedio

SE = Serie SE (Soportes sin esterilizar).

TABLE 21. Resultados de la inoculación de plantas de frijol
(Phaseolus vulgaris) con Rhizobium phaseoli.

	Altura (cms.)	Peso seco (grs.)	No.de nódulos	Nitrógeno (mg/gr.de planta)
Cepa 137 FM en soportes esterilizados				
CI				
Sf a	16.00	0.97	35	1.20
Sf b	16.50	0.95	45	1.04
Sf c	15.00	0.84	40	1.12
\bar{X}	15.83	0.92	40	1.12
CII				
Sf a	17.00	1.14	51	1.26
Sf b	17.00	0.83	39	1.34
Sf c	16.50	0.90	42	1.28
\bar{X}	16.83	0.9566	44	1.2933
T				
Sf a	15.00	1.08	49	1.32
Sf b	15.00	0.81	39	1.34
Sf c	15.50	0.91	37	1.24
\bar{X}	15.1666	0.90	41.66	1.3000

\bar{X} = Promedio

Sf = Serie Sf (soportes esterilizados con rayos gamma).

MAPA 22. Resultados de la inoculación de plantas de frijol
(Phaseolus vulgaris) con Rhizobium phaseoli.

	Altura (cms.)	Peso seco (grs.)	No.de nódulos	Nitrógeno (mg/gr.de planta)
Cepa 137 FM en soportes sin esterilizar				
CI				
SEa	15.00	0.77	41	1.02
SEb	16.00	1.21	38	1.08
SEc	16.00	0.69	36	1.00
\bar{X}	15.66	0.99	38.33	1.03
CII				
SEa	18.00	0.76	38	1.08
SEb	14.00	0.73	36	1.08
SEc	16.00	0.96	37	1.00
\bar{X}	16.00	0.8166	37.00	1.0533
T				
SEa	16.00	0.97	43	1.16
SEb	17.00	0.88	37	1.00
SEc	16.00	0.96	39	1.14
\bar{X}	16.33	0.9366	39.66	1.10

\bar{X} = Promedio

SE = Serie SE (soportes sin esterilizar).

TABLA 23. Resultados de la inoculación de plantas de frijol
(Phaseolus vulgaris) con Rhizobium phaseoli.

	Altura (cms.)	Peso seco (grs.)	No. de nódulos	Nitrógeno (mg/gr. de planta)
Cepa 139 FM en soportes esterilizados				
CI				
Sf a	16.00	0.78	40	1.10
Sf b	16.00	1.00	46	1.02
Sf c	16.00	1.27	70	1.18
\bar{X}	16.00	1.0166	52.00	1.10
CII				
Sf a	17.50	0.71	37	1.16
Sf b	16.50	1.39	90	1.36
Sf c	17.50	0.78	39	1.18
\bar{X}	17.1666	0.96	55.3333	1.2333
T				
Sf a	18.00	0.79	41	1.14
Sf b	16.00	1.05	49	1.10
Sf c	18.50	1.12	62	1.28
\bar{X}	17.50	0.9866	50.66	1.1733

\bar{X} = Promedio

Sf = Serie^f (soportes esterilizados con rayos gamma).

TABLA 24. Resultados de la inoculación de plantas de frijol
(Phaseolus vulgaris) con Rhizobium phaseoli.

	Altura (cms.)	Peso seco (grs.)	No.de nódulos	Nitrógeno (ug/gr.de planta)
Ceps 139 FM en soportes sin esterilizar				
CI				
SEa	15.50	0.70	39	1.00
SEb	17.00	0.97	35	1.12
SEc	18.00	1.25	50	1.18
Y	16.83	0.9733	41.33	1.10
CII				
SEa	16.00	0.76	40	1.12
SEb	17.50	0.70	36	1.02
SEc	17.50	0.97	41	1.18
Y	17.00	0.81	39.00	1.1066
T				
SEa	16.00	0.81	44	1.08
SEb	16.00	1.01	49	1.18
SEc	16.00	0.79	40	1.02
Y	16.00	0.87	44.33	1.0933

Y = Promedio

SE = Serie SE (soportes sin esterilizar).

6.- D I S C U S S I O N .

6.- Discusión.

El comportamiento de las cepas de los microorganismos del género Rhizobium estudiados en la turba, se observó durante -- 45 días, encontrándose que sus poblaciones no eran menores a -- 2.4×10^{10} microorganismos/gr. de turba, en los soportes previamente esterilizados con rayos gamma.

La composta CI presentó una población de 9.38×10^7 microorganismos/gr. en las mismas condiciones; en tanto que la composta CII presentó una población de 1.86×10^{10} microorganismos/gr. como mínimo, lo cual significa que la esterilización con rayos gamma eleva la calidad de la composta CII como soporte para inoculantes.

En cambio en los soportes sin esterilizar la turba presentó 1.38×10^{10} microorganismos/gr., las dos compostas mostraron descenso en la viabilidad de los rhizobia, el cual fue más acentuado en la composta CI (1.43×10^7 microorganismos/gr.), que la composta CII (4.5×10^8 microorganismos /gr.).

Por lo que se deduce que la esterilización de los soportes tiene un efecto favorable para la supervivencia de los rhizobia y de acuerdo a lo observado, la composta CII se parece a la turba en la capacidad para mantener viables a estos

microorganismos cuando ha sido esterilizada; en forma no estéril mostró mejor comportamiento que la composta CI, que en todos los casos mostró poblaciones escasas de rhizobia.

Al final del período de experimentación se garantiza que - para la cepa 136 FM, la turba estéril conserva más del 100% de rhizobia viable y más del 80% en condiciones no estériles. Para la cepa 137 FM, la turba estéril mantiene más del 100% y el 67% cuando no se esteriliza. En el caso de la cepa 139 FM el nivel de rhizobia viable se mantuvo arriba del 100% en la turba estéril y en la no estéril.

En el caso de la composta CII cuando es esterilizada mantiene un nivel de más del 100% de microorganismos vivos para las tres cepas, la composta CII no estéril no proporciona un porcentaje de rhizobia viable digno de tomarse en cuenta.

La composta CI en ninguno de los casos presentó un porcentaje de población de rhizobia satisfactorio.

Las condiciones para que una composta pueda competir con la turba, y ser utilizada como soporte para Rhizobium son las siguientes:

1.- La elaboración de la composta con material vegetal -- que deberá estar libre de contaminación por metales pesados, pesticidas, vidrio, derivados del polivinilo, cianuro, arsénico, -

etc. que son los contaminantes más comunes en las basuras que se usan para la elaboración de la composta CI, la cual resultó ser la menos apropiada como soporte para rhizobia.

2.- Las propiedades físicas y químicas que afectan la calidad de la composta como soporte son; el pH que debe ser lo más cercano a la neutralidad, la capacidad de retención de humedad (la composta CII y la turba retuvieron el 41.00 y --- 63.03% de humedad después de ser secadas a la temperatura ambiente), el nitrógeno total que para la composta CII y la turba T fue de 1.075 y 1.036% respectivamente, el contenido de cenizas que en el caso de la composta CII y la turba T fue el más bajo de los tres soportes y la capacidad de intercambio catiónico total, donde la composta CII y la turba T tuvieron 11.25 y 21.48 meq/100gr. que resultaron ser los valores más altos de los soportes analizados.

3.- El factor más importante para que una composta pueda ser utilizada como sustituto de la turba es que debe estar libre de microorganismos contaminantes, por lo cual es necesaria su previa esterilización antes de ser impregnada con un cultivo de microorganismos del género Rhizobium.

Por otra parte, al hacer una comparación de los resultados de las curvas de supervivencia de Rhizobium phaseoli de este -

experimento con los resultados de otros trabajos que tratan sobre temas similares, se encontró que Paczkowski en 1979 al estudiar la supervivencia de Rhizobium phaseoli en diferentes fuentes de carbón mineral, observó que las curvas de supervivencia mostraron igual comportamiento en todos los casos analizados a las dos semanas de almacenamiento y a partir de ese tiempo podrían aumentar, disminuir o mantenerse constantes durante determinado tiempo. Este comportamiento es similar al obtenido en el presente trabajo realizado en compostas y turba; sin embargo en el experimento reportado por Paczkowski se observa que a partir de las dos primeras semanas de almacenamiento, las poblaciones de Rhizobium phaseoli no permanecen constantes; en algunos soportes tienden a aumentar, pero al transcurrir 4 o más semanas se observa un notable descenso en la población de rhizobia. En cambio en la turba y la composta CII esterilizadas que se estudiaron en el presente experimento, se obtuvieron valores constantes en la población de Rhizobium phaseoli a partir de las dos semanas de almacenamiento y no se observaron descensos bruscos en la población de los rhizobia durante todo el período de experimentación, mostrando una tendencia muy marcada de la población microbiana a

permanecer constante por más tiempo.

Yu en 1969 al estudiar el comportamiento de las compostas esterilizadas en autoclave como soportes para rhizobia, reportó que el Rhizobium japonicum presentaba mayor supervivencia en todos los casos en que la composta fue esterilizada y además recomienda la adición de sacarosa y extracto de levadura para aumentar la calidad del soporte; en las curvas de supervivencia se vuelve a observar que a las dos semanas de almacenamiento se obtiene el número máximo de microorganismos vivos y posteriormente comienza a disminuir y de acuerdo a sus resultados, comparados con los resultados del comportamiento de la composta CII utilizada en el presente estudio, encontramos que en el trabajo de Yu, solamente al añadir sacarosa y extracto de levadura se observaron valores constantes en el número de rhizobia viable únicamente durante 7 días. En la composta CII estéril se observaron valores constantes en la población de rhizobia hasta por 30 días y sin necesidad de agregarle nutrientes, lo cual significa que la calidad de la composta CII como soporte para microorganismos del género Rhizobium es superior a la calidad de la composta que utilizó Yu, también se advierte el hecho de que la esterilización de los soportes --

por rayos gamma es más benéfica para la supervivencia de los rhizobia que la esterilización en autoclave, en cambio en la composta CI no encontramos resultados que sean apropiados para satisfacer los requerimientos de las normas de calidad para la elaboración de inoculantes de leguminosas.

El análisis estadístico de los resultados de la cuenta de microorganismos viables por gramo de inoculante, indica lo siguiente:

- a) Existe interacción entre cepas, soportes y método de esterilización, al fijar el factor tiempo como una constante.
- b) Existe interacción entre cepas y soportes al tener tiempo y método de esterilización como constantes.
- c) Al probar la hipótesis de no interacción entre soportes y cepas, se encuentra que no hay suficiente evidencia para declarar si existe o no interacción entre soportes y cepas, por lo cual se rechaza y se procede a fijar los factores tiempo, método de esterilización y cepas como factores constantes.

Al concluir el análisis se observa que los soportes tienen características diferentes entre sí.

Los resultados obtenidos en el análisis de los datos de este estudio, establecen que la composta CI tiene la más baja

efectividad. Por lo que respecta a la turba T y la composta - CII, cuando el material no se esteriliza, la turba T aparece como el soporte que preserva al mayor número de rhisobia por -- grano.

Sin embargo, cuando se esteriliza con rayos gamma se encuentra que cuando se utilizan las cepas 136 FM y 137 PK, la composta CII resulta mejor o igual a la turba. Todos estos resultados podrían sugerir el empleo de las cepas 136 FM y 137 FM en la composta CII esterilizada como inoculantes que sustituyeran a los que están hechos a base de turba.

Finalmente se procedió a inocular semillas de frijol ---- (Phaseolus vulgaris) para determinar si el Rhizobium phaseoli después de adaptarse a los soportes y sobrevivir durante el período de almacenamiento, conserva aún sus propiedades de -- "infectividad" y "efectividad".

Esta fase del experimento no pudo ser analizada estadísticamente, porque no pudieron hacerse suficientes repeticiones dado que el material necesario para la experimentación era insuficiente, así como la falta de espacio para el desarrollo de las plantas.

Al tener presentes estas limitaciones, se decidió hacer -

una sola determinación en macetas de la afinidad de los rhizobia que sobrevivieron en los soportes, con sus huéspedes específicos. Se encontró que todos los inoculantes fueron capaces de inducir nodulación en el sistema radicular de las plantas huésped y tomando en cuenta que la semilla de frijol empleada en el experimento fue de una variedad criolla, se puede considerar que la nodulación fue satisfactoria, lo cual demuestra que estos microorganismos conservaron sus propiedades de "infectividad".

A las plantas cosechadas se les determinó la cantidad de nitrógeno contenido en sus tejidos, encontrándose que las plantas que presentaron nodulación, tuvieron los valores más altos en contenido de nitrógeno (1.03 - 1.30 mg. de nitrógeno/gr. de planta), en relación a las plantas testigo que no fueron inoculadas (0.92 mg. de nitrógeno/gr. de planta).

Este hecho nos llevó a la conclusión de que estos microorganismos también conservaron sus propiedades de "efectividad".

Estos resultados aunque no pudieron ser probados estadísticamente, como la comparación de la capacidad de los soportes para conservar y promover el crecimiento de los rhizobia, cu--

yo comportamiento si se sujetó a un análisis estadístico adecuado, demuestran que estos microorganismos sobrevivieron satisfactoriamente en los soportes de composta CII y turba T esterilizadas sin sufrir alteraciones en su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico, en simbiosis con la leguminosa huésped, lo cual sirve para corroborar el concepto de calidad de la composta CII y de la turba T esterilizadas como soportes adecuados para la elaboración de inoculantes de leguminosas.

7.- CONCLUSIONS.

7.- Conclusiones.

Los resultados obtenidos en este estudio establecen que - la composta CI es el soporte menos adecuado para la elabora-- ción de inoculantes de leguminosas.

En el caso de la turba F y la composta CII, la primera apa-- rece como el soporte que conserva el mayor número de rhizobia vivas; cuando no han sido esterilizadas previamente a la ino-- culación de estas con Rhizobium phaseoli, pero cuando la com-- posta CII se esteriliza con rayos gamma, conserva un número de rhizobia vivos mayor o igual que la turba, lo cual indica que la composta CII puede ser utilizada como soporte para rhizo-- bia, en sustitución de la turba, para la elaboración de inocu-- lantes de leguminosas, siempre y cuando se encuentre estéril - antes de ser inoculada con microorganismos del género ----- Rhizobium, por el tiempo de almacenamiento señalado en el es-- tudio (45 días).

El excelente comportamiento que demostró tener la compo-- sta CII esterilizada como soporte para rhizobia a lo largo del período de experimentación, nos indica la necesidad de conti-- nuar estudiando su comportamiento como soporte para Rhizobium phaseoli y para otras especies de microorganismos del género

Rhizobium, además de estudiar su supervivencia por períodos de almacenamiento aún más largos.

Otro hecho que se observa es que la esterilización de los soportes con rayos gamma es el método que mejores resultados aporta para la supervivencia de microorganismos del género -- Rhizobium, por lo que a pesar de su alto costo, es recomendable su uso, ya que las ventajas que reporta, superan con creces este inconveniente.

Todo lo anterior indica que se debe continuar la búsqueda de materiales orgánicos de desechos agrícolas, frutales, de jardín, etc. que sirvan como materia prima para la elaboración de compostas que reúnan características similares a las de la - composta CII que reúne cualidades suficientes para ser considerada un posible sustituto de la turba para la elaboración - de inoculantes de leguminosas y en caso de utilizar compostas como sustitutos de la turba se recomienda esterilizar con rayos gamma grandes volúmenes de composta, para poder así abatir los costos del proceso de esterilización y que el producto final sea accesible y de óptima calidad.

S.- R E S U M E N.

8.- Resumen.

Se examinó la supervivencia de las cepas de Rhizobium phaseoli 136 FM, 137 FM y 139 FM, durante 45 días en dos soportes orgánicos preparados con dos compostas de distinto origen, para conocer su potencialidad como posibles nuevas fuentes de materia prima para la elaboración de inoculantes para leguminosas, comparadas con la turba, que es el material que se ha usado comúnmente como soporte. Una de las compostas fue preparada a partir de basuras industrializadas en la "Planta Industrializadora de Desechos Sólidos" del D.D.F. (CI) y la otra se elaboró a partir de desechos agrícolas y de jardín (CII); la turba se obtuvo de un depósito localizado en la Cuenca del Lerma.

Las muestras de compostas (CI y CII) y la turba se dividieron en dos lotes, el primer lote se esterilizó con rayos gamma y el segundo lote se dejó sin esterilizar, antes de la inoculación de estos con las cepas de Rhizobium phaseoli.

En la turba y la composta CII estériles, se obtuvieron crecimientos excelentes de este microorganismo, no así en la composta CI que mostró un descenso notable en la población microbiológica.

De todos los soportes sin esterilizar, sólo la turba mantuvo altos niveles de rizobia durante los 45 días que comprendió el período de experimentación.

9.- A P E N D I C E.

PLANTEAMIENTO ESTADISTICO

El experimento que se ha presentado en la sección anterior involucra 4 factores de interés:

- i) Soportes con 3 niveles.
- ii) Cepas con 3 niveles.
- iii) Esterilización con 2 niveles.
- iv) Tiempo con 4 niveles.

Así pues, en principio un modelo que podría haberse empleado es un modelo con 4 criterios de clasificación. Sin embargo tomando en cuenta el número de niveles de cada uno de estos factores se puede observar que un modelo de este tipo requeriría 72 unidades experimentales por cada repetición y necesariamente tendrían que efectuarse al menos 2 repeticiones lo cual implica que ningún caso podrían emplearse menos de 144 unidades experimentales (u.e.).

Habiendo discutido este aspecto, resultó claro que tal magnitud en el número de unidades experimentales era absolutamente prohibitiva, debido en particular, a la disponibilidad del aparato de esterilización así como el material y espacio en el Laboratorio.

Como alternativa ante esta situación se decidió emplear un modelo en parcelas divididas con 3 criterios principales (Soporte, Cepa y Esterilización) que forman las parcelas y uno más (Tiempo) que las divide en Subparcelas. Bajo este esquema, de una misma u.e. se obtendría el material para los muestreos de 0,15,30 y 45 días reduciendo de esta forma el número de u.e. necesarias. De hecho, empleando 3 repeticiones, como fue el caso, el número de unidades es $3 \times 3 \times 3 = 54$,

con el cual sí fue posible trabajar. El precio que se tiene que pagar por el ahorro en u.e. al pasar del modelo con 4 criterios de clasificación al modelo en parcelas divididas es que ya no todos los efectos podrán ser analizados con la misma precisión. En este caso, los efectos del tiempo son sometidos a un exámen mas preciso que el resto de los factores. Sin embargo y en virtud de la sospecha previa de que existe interacción entre el tiempo y los demás factores, este efecto podrá ser evaluado con suficiente precisión para decidir si se puede proseguir el análisis de los demás factores a lo largo de los 4 diferentes períodos de almacenamiento de manera conjunta o es preferible conducir un estudio por separado para cada tiempo.

El modelo en parcelas divididas que se empleó se puede representar como sigue:

$$\begin{aligned}
 Y_{ijklm} = & \mu + \rho_i + \alpha_j + \beta_k + \gamma_l + (\rho\alpha)_{ij} + (\rho\beta)_{ik} + (\rho\gamma)_{il} \\
 & + (\alpha\beta)_{jk} + (\alpha\gamma)_{jl} + (\beta\gamma)_{kl} + (\alpha\beta\gamma)_{jkl} + (\rho\alpha\beta)_{ijk} + (\rho\alpha\gamma)_{ijl} \\
 & + (\rho\beta\gamma)_{ikl} + (\rho\alpha\beta\gamma)_{ijkl} + \delta_m + (\rho\delta)_{im} + (\alpha\delta)_{jm} + (\beta\delta)_{km} \\
 & + (\gamma\delta)_{lm} + (\rho\alpha\delta)_{ijm} + (\rho\beta\delta)_{ikm} + (\rho\gamma\delta)_{ilm} + (\alpha\beta\delta)_{jkm} \\
 & + (\alpha\gamma\delta)_{jlm} + (\beta\gamma\delta)_{klm} + (\alpha\beta\gamma\delta)_{jklm} + (\rho\alpha\beta\delta)_{ijkm} \\
 & + (\rho\alpha\gamma\delta)_{ijlm} + (\rho\beta\gamma\delta)_{iklm} + \epsilon_{ijklm}
 \end{aligned}$$

en donde Y_{ijklm} es el número de organismos vivos por gramo en la i -ésima repetición, del m -ésimo muestreo, en el régimen de esterili-

lización l en la cepa k y el soporte j .

μ es una media general.

ρ_i representa el efecto la i -ésima repetición; $i=1,2,3$

α_j el del j -ésimo soporte; $j=1,2,3$

β_k el de la k -ésima cepa; $k=1,2,3$

γ_l el del l -ésimo tratamiento de esterilización; $l=1,2$

δ_m el del m -ésimo período de almacenamiento; $m=1,2,3,4$

E_{ijklm} es un término de error aleatorio que describe la variación entre las diferentes observaciones y los demás términos se representan los diferentes efectos conjuntos de todos los factores bajo estudio.

La tabla de Análisis de Varianza que se emplea para analizar los resultados de este modelo es la que se presenta en el cuadro 1 del apéndice. La forma de proceder fué examinar los efectos conjuntos para determinar si son significativos en cuyo caso se fijan los niveles del factor de menor interés, para proceder al análisis de los correspondientes subexperimentos a través de modelos usuales de tres criterios de clasificación en donde a su vez, lo primero que se examina son los efectos conjuntos para decidir si se continúa la subdivisión a modelos de dos criterios y finalmente a modelos de un solo criterio de clasificación. En cualquier caso, las comparaciones múltiples, cuando fué necesario realizarlas, se efectuaron con la técnica de Scheffé.

TABLA 1. ANALISIS DE VARIANZA.
FUENTE DE VARIACION GRADOS DE LIBERTAD SUMAS DE CUADRADOS

R_1	(1-1)	$\frac{\sum Y_1 \dots \dots^2 - T}{jklm}$
W_j	(j-1)	$\frac{\sum Y_j \dots \dots^2 - T}{iklm}$
C_k	(k-1)	$\frac{\sum Y_k \dots \dots^2 - T}{ijlm}$
G_l	(l-1)	$\frac{\sum Y_l \dots \dots^2 - T}{ijkm}$
(RW)ij	(1-1) (j-1)	$Q_1 - P_1 - P_2 + T$
(RC)ik	(1-1) (k-1)	$Q_2 - P_1 - P_3 + T$
(RG)il	(1-1) (l-1)	$Q_3 - P_1 - P_4 + T$
(WC)jk	(j-1) (k-1)	$Q_4 - P_2 - P_3 + T$
(WG)jl	(j-1) (l-1)	$Q_5 - P_2 - P_4 + T$
(CG)kl	(k-1) (l-1)	$Q_6 - P_3 - P_4 + T$
(WCG)jkl	(j-1) (k-1) (l-1)	$R_1 - Q_4 - Q_5 - Q_6 + P_2 + P_3 + P_4 - T$
(RWC)ijk	(1-1) (j-1) (k-1)	$R_2 - Q_1 - Q_2 - Q_4 + P_1 + P_2 + P_3 - T$
(RWG)ijl	(1-1) (j-1) (l-1)	$R_3 - Q_1 - Q_3 - Q_5 + P_1 + P_2 + P_4 - T$
(RCG)ikl	(1-1) (k-1) (l-1)	$R_4 - Q_2 - Q_3 - Q_6 + P_1 + P_3 + P_4 - T$
(RWCG)ijkl	(1-1) (j-1) (k-1) (l-1)	$S_1 - R_2 - R_3 - R_4 + Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4 + Q_5 + Q_6 - P_1 - P_2 - P_3 - P_4 - T$
T_m	(m-1)	$\frac{\sum Y_m \dots \dots^2 - T}{ijkl}$
(RT)im	(1-1) (m-1)	$Q_7 - P_1 - P_5 + T$
(WT)jm	(j-1) (m-1)	$Q_8 - P_2 - P_5 + T$

TABLA 1. (continuación)

(CT)km	(k-1) (m-1)	$Q_9 - P_3 - P_5 + T$
(GT)lm	(l-1) (m-1)	$Q_{10} - P_4 - P_5 + T$
(RVT)ijm	(i-1) (j-1) (m-1)	$R_2 - Q_2 - Q_7 - Q_8 + P_1 + P_3 + P_5 - T$
(RCT)ikm	(i-1) (k-1) (m-1)	$R_6 - Q_2 - Q_7 - Q_9 + P_1 + P_3 + P_5 - T$
(RGT)ilm	(i-1) (l-1) (m-1)	$R_7 - Q_3 - Q_7 - Q_{10} + P_1 + P_4 + P_5 - T$
(VGT)jkm	(j-1) (k-1) (m-1)	$R_8 - Q_4 - Q_8 - Q_9 + P_2 + P_3 + P_5 - T$
(VGT)jlm	(j-1) (l-1) (m-1)	$R_9 - Q_5 - Q_8 - Q_{10} + P_2 + P_4 + P_5 - T$
(CGT)klm	(k-1) (l-1) (m-1)	$R_{10} - Q_6 - Q_9 - Q_{10} + P_3 + P_4 + P_5 - T$
(VCGT)ijklm	(j-1) (k-1) (l-1) (m-1)	$S_2 - R_1 - R_8 - R_9 - R_{10} + Q_4 + Q_5 + Q_8 + Q_6 + Q_9 + Q_{10} - P_2 - P_3 - P_4 - P_5 + T$
(RVT)ijklm	(i-1) (j-1) (k-1) (m-1)	$S_3 - R_2 - R_5 - R_6 - R_8 + Q_1 + Q_2 + Q_7 + Q_4 + Q_8 + Q_9 - P_1 - P_2 - P_3 - P_5 + T$
(RVT)ijlm	(i-1) (j-1) (l-1) (m-1)	$S_4 - R_5 - R_3 - R_7 - R_9 + Q_1 + Q_3 + Q_7 + Q_5 + Q_6 + Q_{10} - P_1 - P_2 - P_4 - P_5 + T$
(RCGT)iklm	(i-1) (k-1) (l-1) (m-1)	$S_5 - R_4 - R_6 - R_7 - R_{10} + Q_2 + Q_3 + Q_7 + Q_6 + Q_9 + Q_{10} - P_1 - P_3 - P_4 - P_5 + T$
(RVCGT)ijklm	(i-1) (j-1) (k-1) (l-1) (m-1)	$H - S_1 - S_2 - S_3 - S_4 - S_5 + \sum_{i=1}^{10} R_i - \sum_{i=1}^{10} Q_i + \sum_{i=1}^5 P_i - T$
TOTAL	ijklm-1	$\sum_{ijklm}^T 2 - T$

TABLA 2.

ANALISIS DE VARIANZA DE LOS GOICRTEC.

CRIA 136 F. SERIE J

TIEMPO	NEDIA GENERAL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	P
0 días	15200	20725666.66	10363333.33	2	4.0133	0.075
15 días	20594.44	1293140555.6	646570277.8	2	2445.0137	0.0005
30 días	20228.33	1606222116.7	803111058.35	2	1661.7332	0.0005
45 días	19587.222	1624737605.58	812368802.79	2	1038.1268	0.0005

F = frecuencia.

P = nivel de significancia descriptivo.

TABLA 3.

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS COLORES.

CEJA 136 AL ANÁLISIS DE

TIEMPO	MEDIA GENERAL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	P
0 días	14283.33	49715000.01	24857500.005	2	8.5056	0.0175
15 días	9902.78	1588009405.56	794004702.78	2	1560.6961	0.0005
30 días	7244.28	823431257.721	411715628.86	2	10243.8551	0.0005
45 días	5118.22	395279350.221	197639675.112	2	5047.4116	0.0005

F = frecuencia

P = nivel de significancia descriptivo.

TABLA 4.

ANALISIS DE VARIANZA DE LOS SOfORTES.

CEFA 137 FM SERIE 8

TIEMPO	MEDIA GENERAL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	F
0 días	18494.44	355840555.6	179920277.8	2	430.1632	0.0005
15 días	17601.67	1343822550.03	671911275.015	2	748.6407	0.0005
30 días	17368.33	1363917050.02	681958525.01	2	371.1288	0.0005
45 días	17050.54	1281987270.25	640993635.126	2	340.3965	0.0005

F = frecuencia

F = nivel de significancia descriptivo.

TABLA 5.

ANALISIS DE VARIANZA DE LOS SOPORTES.

CEPA 137 FM SERIE SE

TIEMPO	MEDIA GENERAL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	P
0 días	13488.89	599143888.92	299571944.46	2	349.355	0.0005
15 días	8305.00	795021116.66	397511558.33	2	5498.2963	0.0005
30 días	5607.83	3433844334.501	171692217.25	2	2094.9295	0.0005
45 días	5247.46	343009838.206	171504919.103	2	1137.8669	0.0005

F = frecuencia

P = nivel de significancia descriptivo.

TABLA 6.

ANALISIS DE VARIANZA DE LOS SOPORTES.

CEPA 139 FM SERIE Y

TIEMPO	MEDIA GENERAL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	P
0 días	11216.67	264255000.02	132127500.01	2	97.2121	0.0005
15 días	19261.11	1413510555.56	706755277.78	2	1494.048	0.0005
30 días	18943.8889	1792623505.59	8963117521795	2	1828.7826	0.0005
45 días	17625.72222	174585582.05	872927913.025	2	2825.8668	0.0005

F = frecuencia

P = nivel de significancia descriptivo.

TABLA 7.

ANALISIS DE VARIANZA DE LOS SOPORTES.

GRPA 139 FM SERIE SE.

TIEMPO	MEDIA GENERAL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	GRADOS DE LIBERTAD	F	P
0 días	6355.5556	135087222.226	67543611.113	2	110.5762	0.0005
15 días	9532.7778	1326798005.56	663399002.78	2	36467.1921	0.0005
30 días	6654.4444	712661755.554	356330877.777	2	25984.0527	0.0005
45 días	4765.8667	370270078.188	185135039.094	2	504.0849	0.0005

F = frecuencia

P = nivel de significancia descriptivo.

10.- BIBLIOGRAFIA.

10.- Bibliografía.

- 1.- Allison, P.E. Developments in soil science 3. Soil --- organic matter and its role in crop production. U.S. Depart--- ment of Agriculture, Washington D.C., U.S.A., 1973.
- 2.- Allison, L.E. Diagnóstico y rehabilitación de suelos -- salinos y sódicos. Departamento de Agricultura de los E.U.A. Ed. Limusa, 1973.
- 3.- Altamirano Islas, T. Procesamiento de los desechos só-- lidos (basura) para la obtención de la composta como regenera-- dor de suelos. Tesis, UNAM. Facultad de Química, 1977.
- 4.- Barrios León, M.E. Selección de cepas efectivas de --- Rhizobium japonicum para frijol soya variedad "Júpiter". Tesis UNAM. Facultad de Química, 1980.
- 5.- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th Ed. Ed. by Buchanan & Gibbons. Williams & Wilkins Co./Baltimore, 1974.
- 6.- Brill, W.J. Nitrogen fixation : Basis to applied. Ame-- rican Scientist 67 : 458 - 466, 1979.
- 7.- Burton, J.C. Methods of inoculating seeds and their --- effect on survival of rhizobia. International Biological Pro-- gram 7. Symbiotic nitrogen fixation in plants: pag. 175-187. P.S. Nutman (ed) Cambridge University Press, Cambridge, 1976.

8.- Carrillo Vázquez, M.E. Estudio comparativo del efecto de una mezcla de sustancias químicas sobre la microflora del ciclo del nitrógeno en composta. Tesis UNAM. Facultad de Química, 1980.

9.- Corby, H.D.L. A method of making a pure-culture, peat-type, legume inoculant, using a substitute for peat. International Biological Programme 7. Symbiotic nitrogen fixation in plants: pag. 169-172. P.S. Nutman (ed) Cambridge University Press, Cambridge, 1976.

10.- Date, R.A. A decade of legume inoculant quality control in Australia. Journal of the Australian Institute of Agricultural Science 25 : 27-37, 1969.

11.- Date, R.A. Nitrogen, a major limitation in the productivity of natural communities, crops and pastures in the Pacific area. Soil Biol. Biochem. 5 : 5-18, 1973.

12.- De Ley, J. & Rassel, A. DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus Rhizobium. J. gen. appl. Microbiology 44 : 85-91, 1965.

13.- Mispert. La Soya. Boletín informativo. Nitrasoil Mispert, Uruguay.

14.- Douglas, H.J. Improving nitrogen fixation. Science News 108 : 314-315, 1975.

- 15.- Echegaray Alemán, A. & Ramírez Gama, R.M. Prácticas de Microbiología Agrícola. UNAM. Facultad de Química, 1978.
- 16.- Ferrera-Cerrato, R. Inoculación de Rhizobium phaseoli a diferentes especies del género Phaseolus originarias de México. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 22 : 175-180, 1980.
- 17.- Gedrotz, K.K. Chemical Analysis of Soils. Israel Programme for scientific translations, Jerusalem, 1963.
- 18.- Graham, P.H. & Hubbell, D. Interacción del suelo, la planta y el Rhizobium en la agricultura tropical. Centro Internacional de Agricultura Tropical y Universidad de Florida, Gainesville, 1974.
- 19.- Graham, P.H.; Morales, U.M. & Cavallo, R. Materiales, excipientes y adhesivos de posible uso en inoculación de leguminosas en Colombia. Turrialba 24 (1) : 47-50, 1974.
- 20.- Graham, P.H. & Parker, C.A. Diagnostic features in the characterisation of the root-nodule bacteria of legumes. Plant and Soil 20 (3) : 383-396, 1964.
- 21.- Graham, P.H. & Rosas, J.C. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of Phaseolus vulgaris L. inoculated with Rhizobium. J. Agric. Sci. Camb. 83 : 503-508, 1977.
- 22.- Hardy, R.W.F. & Havelka, U.D. Nitrogen fixation re-----

search : A key to world food?. Science 133 : 633-643,1975.

23.- Hernández Gutiérrez, R. Estudio comparativo de sopor--
tes para la elaboración de inoculantes de leguminosas. Tesis -
UNAM. Facultad de Química, 1990.

24.- Hicks, Ch. R. Fundamental concepts in the design of --
experiments; 2nd edition. Holt, Rinehart & Winston; New York, 1973.

25.- Jackson, M.L. Soil Chemical Analysis. Prentice Hall,
Inc.; 2nd Ed., 1960.

26.- Kolmer, A.J. & Boerner, P. Approved Laboratory Tech---
nics; 4th Ed.; D. Appleton-Century Co., 1945.

27.- Lozano, C. The crown-gall bacteria and related spe---
cies. Boletín informativo CIAT., 1975.

28.- Manual de Operaciones de Laboratorio de la Planta In-
dustrializadora de Desechos Sólidos del D.F. México, D.F.

29.- Méndez, R.I. Modelos mixtos y aleatorio en el diseño
y análisis de experimentos . Comunicaciones técnicas No.31 ---
Vol.4 IIMAS. México, 1977.

30.- Mitchell, H.L. Microdetermination of nitrogen in plant
tissues. Journal of the A.O.A.C. 55 (1) : 1-3, 1972.

31.- Morita, H. Peat and its organic chemistry. Journal of
Chemical Education 57 (9) : 695-696, 1980.

32.- The New Encyclopaedia Britannica. Peat moss. Micro---

paedia 7 : 825,1974.

33.- The New Encyclopaedia Britannica. Technology of Agriculture. Macropaedia 1 : 351,1974.

34.- Paczkowski, M.W. & Berryhill, D.L. Survival of Rhizobium phaseoli in coal-based legume inoculants. Applied and Environmental Microbiology 38 (4) : 612-615,1979.

35.- Ramírez Medina, G. Clasificación de la rhisobia aislada de leguminosas nativas en el trópico de México. Unidad Central del I.N.I.P.,1978.

36.- Robles Sánchez, R. Producción de granos y forrajes: -- 1^a Edición. Editorial Limusa,1975.

37.- Roldán Kendoza, A. Investigación de microorganismos -- del ciclo del nitrógeno en el proceso de la degradación de los desechos sólidos, en la planta de tratamiento de la Ciudad de México. Tesis UNAM. Facultad de Química,1979.

38.- Roughley, R.J. The preparation and use of legume seed inoculants. Plant and Soil 32 : 675-701,1970.

39.- Roughley, R.J. The production of high quality inoculants and their contribution to legume yield. International -- Biological Programme 7. Symbiotic nitrogen fixation in plants: -- par. 185-187. P.S. Sutman (ed) Cambridge University Press, Cambridge,1976.

40.- Roughley, R.J. Some factors influencing the growth and survival of root-nodule bacteria in peat culture. J. Appl. --- Bacteriology 31 : 259-265, 1968.

41.- Roughley, R.J. & Vincent, J.M. Growth and survival of - Rhizobium sp in peat culture. J. Appl. Bacteriology 30 : 362-376, 1967.

42.- Strijdom, B.W. & Deschodt, C.C. Carriers of rhizobia -- and the effects of prior treatment on the survival of rhizobia. International Biological Programme 7. Symbiotic nitrogen fixation in plants : pag.151-169. P.S. Nutman (ed). Cambridge University Press, Cambridge, 1976.

43.- Tsien, H.S. & Schmidt, E.L. Viability of Rhizobium bacteroids. Applied and Environmental Microbiology 34 (6) : 854-856, 1977.

44.- Vincent, J.M. Manual Práctico de Rhizobiología. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, 1975.

45.- Wu, M.M.H. & Eno, K.C. Influence of autoclaved compost carrier on the survival of rhizobia for legume inoculant. --- Soils and Fertilizer in Taiwan 16 : 46-51, 1969.