

38  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**"ACTUALIZACION DE LA INFORMACION SOBRE  
LAS TECNICAS DE PRODUCCION DE  
INOCULANTES PARA SOYA"**

**TRABAJO MONOGRAFICO DE  
ACTUALIZACION MANCOMUNADO**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A N :  
BLANCA MARGARITA CRUZ SANTILLAN  
MARIA GUADALUPE GODINEZ ANDUAGA

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

## CONTENIDO

I.	Introducción.....	1
II.	Objetivos.....	5
III.	Generalidades.	
	3.1 Antecedentes históricos.....	6
	3.2 Características del género <u>Rhizobium</u> .....	11
IV.	Producción de células.	
	4.1 Selección de la cepa.....	13
	4.2 Obtención del medio de cultivo óptimo.....	18
	4.3 Conservación de la cepa.....	22
	4.4 Inicio de la producción.....	23
	4.5 Propagación del microorganismo.....	25
	4.6 Obtención del cultivo concentrado.....	26
V.	Soportes.....	28
	5.1 Obtención de la turba.....	30
	5.2 Selección del soporte.....	32
	5.3 Lavado, neutralizado y secado.....	34
	5.4 Molienda, tamizado y maduración.....	36
	5.5 Soportes no estériles.....	37
	5.6 Esterilización.....	38
	5.7 Soportes estériles.....	40
VI.	Preparación del inoculante.....	41
	6.1 Impregnación.....	42
	6.2 Agentes adhesivos.....	44
	6.3 Tipos de inoculantes.....	47
	6.4 Espacado.....	52
	6.5 Almacenamiento.....	55
VII.	Control de calidad.	
	7.1 Control de calidad del microorganismo.....	59
	7.2 Control de calidad del soporte.....	61
	7.3 Control de calidad del inoculante.....	62
VIII.	Aplicación en el campo.....	75
IX.	Conclusiones.....	82
X.	Bibliografía.....	85

## 1. INTRODUCCION

El nitrógeno es el elemento indispensable para la vida tanto animal como vegetal, ya que es el constituyente esencial de los tejidos. El aire atmosférico contiene de un 75 a 80% de nitrógeno libre; por lo que sobre cada hectárea hay aproximadamente unas 35,000 toneladas de nitrógeno.

Un suelo con deficiencia de nitrógeno se manifiesta en las plantas por un color amarillento en el follaje, los tallos se encuentran débiles y delgados, la producción es reducida.

Manteniendo un nivel adecuado de compuestos de nitrógeno asequibles a las plantas, en los suelos, se conserva un buen nivel de fertilidad ya que parte de las pérdidas de nitrógeno son debidas a que las plantas, absorben gran cantidad de nutrientes nitrogenados para alimentarse, además sus pérdidas son grandes, por el arrastre que hace el agua, ya sea de riego o por las lluvias y también a que el nitrógeno permanece insoluble debido a que las condiciones del suelo no son las propicias para la descomposición de la materia orgánica.

El nitrógeno es la materia prima para la fabricación de fertilizantes químicos nitrogenados; este elemento necesita combinarse con otros elementos adecuados, para que las plantas y la vida animal puedan aprovecharlo; desgraciadamente no se combina fácilmente con otros elementos; sino mediante agentes

poderosos como la descarga eléctrica o bien a través de reacciones químicas producidas por las altas presiones y temperaturas, ya que este proceso requiere de mucha energía.

(22)

El nitrógeno del aire fijado por microorganismos asociados con las plantas, puede producir, combinado con otros elementos químicos, proteínas dentro de las plantas, las cuales son el alimento principal de los animales herbívoros; ellos a su vez eliminan una parte de nitrógeno en forma de abono y de esta manera lo regresan al suelo; donde puede ser usado para mejorar las cosechas o bien perderse por lixiviación.

Ciertas bacterias (Rhizobium sp., Frankia sp y las Cianobacterias) utilizan el nitrógeno gaseoso presente en el suelo, de tal forma que lo hacen asimilable para la planta. Estos cambios que experimenta el nitrógeno son importantes y deben ser dirigidos hacia la fijación del nitrógeno en el suelo para el mejoramiento de la producción agrícola.

Es posible fijar una gran cantidad de nitrógeno atmosférico, mediante la siembra de plantas leguminosas, ya que éstas pueden transformarlo en nutrientes asimilables cuando se encuentran asociados con una bacteria del género Rhizobium, la cual toma el nitrógeno de la atmósfera del suelo y lo proporciona a la planta. El proceso realizado por esta asociación Rhizobium - Leguminosa,

se conoce como fijación simbiótica del nitrógeno. La simbiosis Rhizobium - Leguminosa es muy significativa para la agricultura moderna pues la cantidad de nitrógeno que se fija por este medio es sustancial. La figura No. 1 muestra el lugar que ocupan las leguminosas en el ciclo del nitrógeno. (17)

Muchos suelos carecen o tienen una cantidad mínima de bacterias pertenecientes al género Rhizobium que pueden asociarse con la leguminosa cultivada, por lo cual se hace necesario inocular, es decir introducir directamente al suelo bacterias vivas de Rhizobium o bien ser adheridas a la superficie de la semilla en el momento de la siembra, a fin de favorecer la asociación Rhizobium - Leguminosa, que origina la formación de protuberancias en el sistema radicular comúnmente conocidas como nódulos. (22)

Cuando un suelo es destinado al cultivo de leguminosas no es necesario aplicar nitrógeno, únicamente hay que asegurar la inoculación de la semilla para que sea aprovechable el nitrógeno gaseoso presente en el suelo. La cantidad de nitrógeno fijado por una leguminosa depende de la cantidad del inoculante, de su calidad, de una buena semilla y de las condiciones del medio ambiente. También es necesario proporcionar adecuadamente fósforo y calcio activos y otros nutrientes, para lograr un buen desarrollo de la planta con un sistema nodular efectivo.

De más de diez mil especies de leguminosas conocidas,

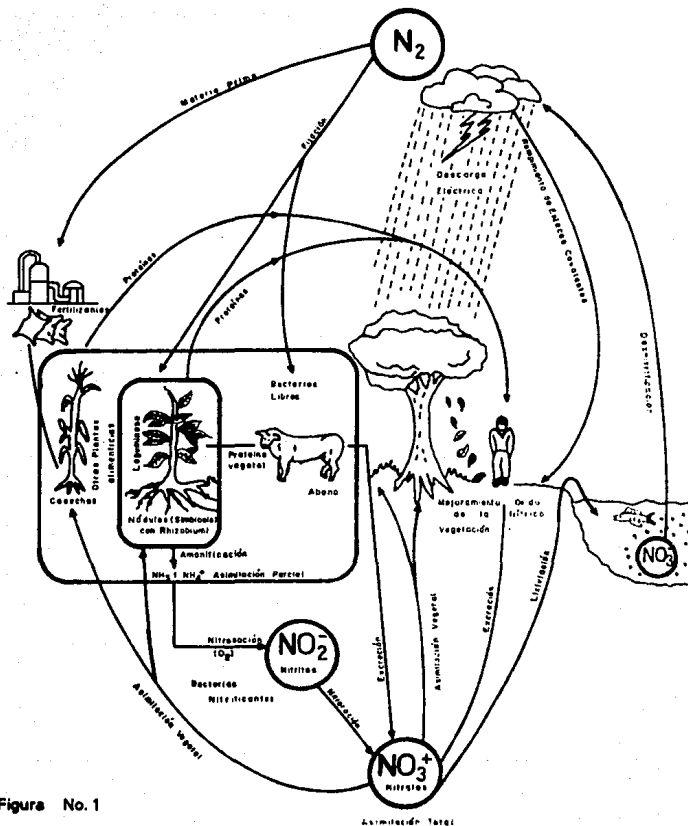


Figura No. 1

Lugar que ocupan las leguminosas dentro del ciclo del nitrógeno (17)

solamente doscientas son cultivadas y son las que más se utilizan como materia prima, base en nuestra alimentación, y también como abono verde para aumentar la fertilidad del suelo. Algunas de estas plantas son: el frijol, la lenteja, el chícharo, la alfalfa, el cacahuete, el garbanzo, la soya, el trébol, el haba y el ebo de los cuales se cultivan diferentes variedades.

La leguminosas tienen múltiples empleos en la agricultura, por las siguientes razones: sus hojas y frutos almacenan gran cantidad de proteínas teniendo por lo tanto gran valor como forraje especialmente cuando se utilizan en mezclas de raciones alimenticias. Son indispensables en los programas de rotación de cultivos, cuando han sido inoculados adecuadamente, ya que en esta forma pueden fijar el nitrógeno del aire que no puede ser aprovechado por otros cultivos distintos a las leguminosas. Aumentan la cantidad de nitrógeno aprovechable en el suelo, siendo aún mayor, cuando se entierran como abono verde e influyen en forma benéfica sobre los microorganismos que intervienen en la descomposición de la materia orgánica y ayudan a mejorar la textura del suelo facilitando la labranza y protegiéndola de la erosión. (18)

El uso de inoculantes microbianos da la posibilidad de incrementar la producción agrícola, de tal forma que se reduce la contaminación debida al uso de fertilizantes químicos y mantiene el suelo fértil. Los cultivos de leguminosas representan una importante fuente de abastecimiento de proteínas para la alimentación humana y animal.



## II. OBJETIVOS.

1. Indicar las características necesarias para que se lleve a cabo una buena nodulación, dando como consecuencia una fijación de nitrógeno
2. Mediante un diagrama, explicar el proceso de obtención de una suspensión de células en la elaboración de los inoculantes para soya (*Glycine max*).
3. Indicar las propiedades que presenta la turba para poder ser utilizada como soporte.
4. Describir el proceso, así mismo las variantes que se deben de tomar en cuenta en la producción de los inoculantes.
5. Señalar la importancia de los estándares dentro del control de calidad de los inoculantes.
6. Dar a conocer las condiciones adecuadas durante el almacenamiento y distribución de los inoculantes para leguminosas.
7. Hacer hincapié de la importancia del uso de los inoculantes en el campo; siendo estos de gran ayuda para el agricultor.

### III. GENERALIDADES.

#### 3.1 Antecedentes históricos.

Los Egipcios y Romanos empleaban las leguminosas como plantas forrajeras y mejoradoras del suelo. Los campesinos medievales europeos conocían los efectos beneficiosos de la rotación de estas plantas con otras plantas de cultivo.

En China la siembra de leguminosas es una práctica ancestral que se combina con la aplicación de desechos (vegetal, animal y humano) con la finalidad de aumentar el rendimiento de los cultivos por unidad de área.

El conocimiento de la simbiosis Rhizobium - Leguminosa se inicia cuando Liebig y Bousingault en 1830 demostraron experimentalmente la capacidad fijadora de las leguminosas al hacerlas crecer en un medio deficiente de nitrógeno y cuantificar la cantidad fijada de este elemento por las plantas.

En 1879 Frank reconoció que los nódulos radiculares de las leguminosas eran causados por bacterias, pero fue hasta 1886 que Hellriegel y Wilfert observaron por primera vez la relación nódulo - fijación de nitrógeno.

En 1888 Beijerinck aisló por primera vez a la bacteria causante de la nodulación, indicando la necesidad de suministrar artificialmente los microorganismos al suelo, lo que motivó el desarrollo de la industria de los inoculantes. (25)

En 1888 Hellriegel y Wilfart inocularon esta bacteria en semillas, por primera vez, en el suelo donde anteriormente habian crecido leguminosas; con el método que denominaron de "transferencia". Resultó aceptable la nodulación, sin embargo se presentaron problemas con la microflora indigena.

Las primeras prácticas de inoculación de semillas con cultivos artificiales de bacterias "radicícolas" se realizaron en 1896 por Nobbe, Hiltner y Voelcker cada quien por separado. Los dos primeros usaron un medio de cultivo para Rhizobium sp. a base de azúcar, asparagina, gelatina y extracto de leguminosa al que denominaron Nitragin y posteriormente utilizaron un método a base de algodón sin obtener resultados satisfactorio.

Voelcker trabajó por su parte con bacterias crecidas en un medio de agar suspendiendolas posteriormente en agua para inocular las semillas o el suelo. Algunos intentos para mejorar la introducción de cepas efectivas fueron desarrolladas por Marks en 1905, Mc Alpine en 1906 y Donan en 1912; sin embargo, es hasta fecha más reciente que la investigación en este campo tuvo mayor auge, ante el deseo y/o la necesidad de introducir exitosamente especies de leguminosas a nuevas áreas de cultivo.

En 1942 se realizó el primer experimento para probar la eficiencia de varias cepas de Rhizobium sp. Durante 1944 se determinaron algunos de los principales efectos del almacenaje en la longevidad y efectividad de 7 grupos cultivados, sobre diversos medios de agar y turba. El principio del método usado actualmente a base de turba seca, finamente molida y estéril se desarrolló en 1946 y en 1952 se estableció un método para la preparación masiva de inoculantes empaquetados. (25)

El desarrollo actual de la industria ha diversificado y especializado la investigación en este campo. Ante la deficiencia física o cualitativa de depósitos turberos; en muchos países se investigan diversos materiales para emplearlos como sustitutos de la turba, entre los cuales pueden citarse: mezclas de suelo y carbón, turba y suelos combinados, suelo con polvo de cáscara de coco, paja de trigo, bagazo de caña, polvo de celulosa, composta vegetal, lodo filtrado con desperdicios de la molienda de la caña de azúcar, polvo de cáscara de coco más composta de maíz, poliacrilamidas, cáscara de cacahuete, carbón, vermiculita, mazorcas de maíz molido, etc.

Los resultados son variables en cuanto a la calidad de los inoculantes sin embargo hasta el momento ningún material ha superado a la turba (Graham 1974). En otro sentido, se realizan pruebas con la finalidad de mejorar cepas; para obtener estabilidad genética, mayores capacidades infectivas, alta capacidad competitiva para la formación de nódulos; mayor

viabilidad y resistencia bajo diversas condiciones ambientales durante la preparación, el control de calidad, el almacenaje y la inoculación del producto.

En la actualidad la mayor parte de la producción de inoculantes (aproximadamente un 80% en Estados Unidos) se destinan básicamente a cultivos como la soya y la alfalfa; sin embargo siendo las leguminosas de las regiones tropicales, un grupo de gran importancia fitogeográfica por su abundancia y diversidad, no se han desarrollado métodos apropiados para capitalizar la fijación de nitrógeno de estas zonas y se considera que ante la problemática de la mal nutrición proteica de la gente y el alto costo de los fertilizantes para la producción de alimentos en los países en desarrollo, principalmente los situados en los trópicos, la explotación de la fijación biológica del nitrógeno (simbiótica o de vida libre) es una fuente promisoras de proteínas para consumo humano; pero es necesario ante todo poseer una tecnología de la producción de inoculantes, aplicable en estos países, que se consideren las necesidades regionales de tipo económico y biológico, ya que las leguminosas del trópico son significativamente distintas de aquellas de las regiones templadas y hay riesgo de tener pérdidas al tratar de introducir en esos países los inoculantes de otras latitudes. (25)

En México la aplicación de los inoculantes tiene un costo excesivo pues la mayoría se elaboran a base de turba importada.

En 1983 Nitragin Company, pionera en la elaboración de inoculantes, fabricó 600 toneladas de ellos, de los cuales del 60 al 70% fueron hechos para la soya, utilizando turba importada de Wisconsin, E.U.A.

Ante esta circunstancia FERTIMEX, planeó desarrollar una planta productora para emplear turba del país, con éste recurso no renovable; para evitar la dependencia del mercado exterior, se han realizado investigaciones encaminadas al desarrollo de una industria nacional para manufacturar inoculantes empleando materiales de desecho o no aprovechables en la actualidad.

En las investigaciones realizadas se han utilizado: aserrín, bagazo de caña y cáscara de coco, como base de inoculantes para soya. (25)

3.2 Características del género Rhizobium.

	<u>Capas de crecimiento rápido</u>	<u>Capas de crecimiento lento</u>
<b>Características:</b>		
<b>Morfología bacteriana.</b>	Son bacilos gram negativos que miden 0.5 - 0.9 micras de ancho por 1.2 - 3.0 micras de largo. Comúnmente pleomórfico bajo condiciones de crecimiento adversas. Frecuentemente presentan en su interior gránulos de poli - $\beta$ - hidroxibutirato, las cuales son refringentes observados en microscopia de contraste de fase. No tienen endosporas, son microorganismos aerobios, desarrollan bajo una tensión de $O_2$ menor a 0.01 atmósferas; su temperatura óptima 25 - 30 °C y un rango de pH de 5.0 a 8.5.	
<b>Movilidad.</b>	Se mueven por flagelos peritricos de 2 a 6.	Se mueven por un flagelo polar o subpolar.
<b>Medio de cultivo</b>	Agar - manitol - levadura y sales minerales.	
<b>Forma de las colonias.</b>	Son circulares convexas, semi-translúcidas y mucilaginosas usualmente de 2-3 mm de diámetro en 3-5 días. Tiene pronunciada turbidez después de 2-3 días de cultivo con agitación.	Son circulares puntiformes, opacas, rara vez translúcidas, blancas de textura convexa y granular y no exceden de 1 mm de diámetro entre 5-7 días.

Bioquímica.

Utilizan una variedad de carbohidratos como manitol, glucosa, usualmente prefieren sacarosa. Algunos necesitan biotina u otras vitaminas solubles en agua.

Prefieren utilizar pentosas como fuente de carbohidratos, no utilizan los disacáridos y polisacáridos. Usualmente no utilizan biotina.

Los principales mecanismos para el metabolismo de los carbohidratos parecen ser el ciclo de Enter - Doudoroff y el ciclo de las pentosas. (5, 6, 28, 29)

Infectividad.

Generalmente producen la formación de nódulos en leguminosas de zona tropical.

Causan nodulación sobre algunas leguminosas; en especial Bradyrhizobium japonicum nodula sobre Glycine sp. y ciertas cepas nodulan sobre Lupini sp.

Inmunología.

Presentan una aglutinación (flagelar y/o somática) con ciertos antisueros específicos. El antígeno flagelar es muy lábil al calor. Se da el caso de presentar reacciones cruzadas (Rhizobium meliloti).

Porcentaje de DNA.

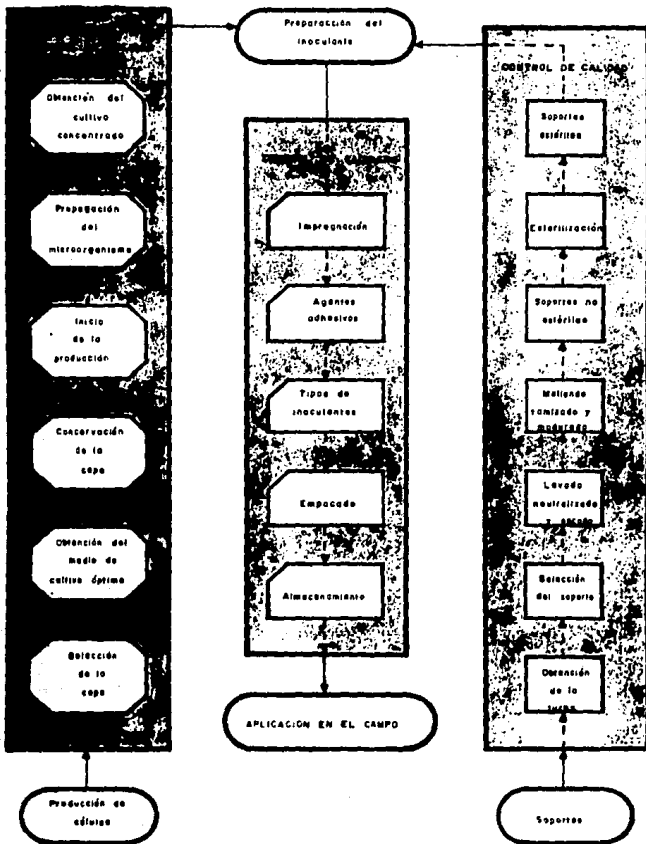
La G + C contenida en el DNA está en un rango de 59.1 a 63.1 moles % (Tm).

La G + C contenida en el DNA es de 61.1 a 65.5 moles % (Tm).

(5, 6)



# DIAGRAMA DEL PROCESO



#### IV. PRODUCCION DE CELULAS.

##### 4.1 Selección de la cepa.

La capacidad de fijación de nitrógeno y el poder de infección en las leguminosas son las características más importantes que deciden la elección de una cepa que será destinada a la preparación de un inoculante. Generalmente se trata de preparar inoculantes con cepas que sean efectivas frente diversas especies vegetales. (5)

Las bacterias de *Rhizobium* fundamentalmente deben tener las siguientes características:

**Infectividad:** Que es la capacidad de la bacteria para penetrar al sistema radicular y formar nódulos independientemente que fijen o no nitrógeno.

**Especificidad:** Que es una característica de la bacteria para fijar nitrógeno solamente con determinada leguminosa.

**Efectividad:** Que es el poder de la bacteria para absorber el nitrógeno atmosférico y hacerlo asimilable para la planta. En forma práctica se conoce la efectividad de un nódulo, observando

que la parte interna sea de color rojizo.

Virulencia: Que es la competitividad que tiene para penetrar al sistema radicular primero que otras bacterias de Rhizobium poco o nada efectivas. (16, 22)

#### **Modulación (infección de la raíz)**

La fijación del nitrógeno está ligada específicamente a la simbiosis de bacteria - planta y a la formación de nódulos. La infección de las raíces necesita la presencia, en la rizosfera, de grandes cantidades de Rhizobia libres ( $10^6$  -  $10^9$  células/ml.)

Se realiza a través del extremo de los pelos radicales, cuya pared es digerida mediante una pectinasa, permitiendo la entrada a las bacterias, al estar en contacto el Rhizobium sp efectivo con la raíz de la leguminosa, las bacterias aumentan en número y ocurre la colonización.

Una vez dentro de la raíz, las bacterias se disponen en largas cadenas paralelas, rodeadas de una membrana celulósica que se origina por invaginación de la pared externa del pelo radical. El conjunto forma una especie de filamento que va alargándose, ramificándose y atravesando, célula tras célula, los tejidos de la raíz.

Las bacterias que se encuentran en el interior del filamento

adquieren formas extrañas; de bacilos gigantes, en masa, en X, en Y, características de los bacteroides. El nódulo embrionario se origina por proliferación de células vegetales y bacterias. Se ha demostrado también que la formación del nódulo va acompañada de la producción y secreción de auxinas (ácido indolacético) por la planta. (ver figura No. 2)

El tamaño, color y distribución de nódulo sobre la raíz de la planta, da indicaciones de que la asociación Rhizobium - leguminosa es eficiente en la fijación del nitrógeno. (17, 24)

#### Coloración de los nódulos.

La efectividad de la asociación Rhizobium - Leguminosa puede ser determinada por medio de un corte, de un nódulo de la planta hospedera durante el periodo de florecimiento y notando el color del nódulo.

Los nódulos efectivos son grandes y tiene dentro una coloración rosa intenso, esto se debe a que poseen un pigmento. Se trata de una hemoproteína (Virtanen 1947) con propiedades y espectro de absorción análogos a los de la hemoglobina de animales superiores, llamada por ello leghemoglobina. La estructura de esta hemoproteína no es muy definida. (17)

La leghemoglobina, está asociada a la fijación de nitrógeno en los nódulos de la leguminosa, pero no es parte de la

1. Infección del filamento.
2. Invaginación de la pared externa de las vellosidades.
3. Nódulo embrionario.
4. Sistema vascular de la leguminosa.
5. Zona de fijación del nitrógeno

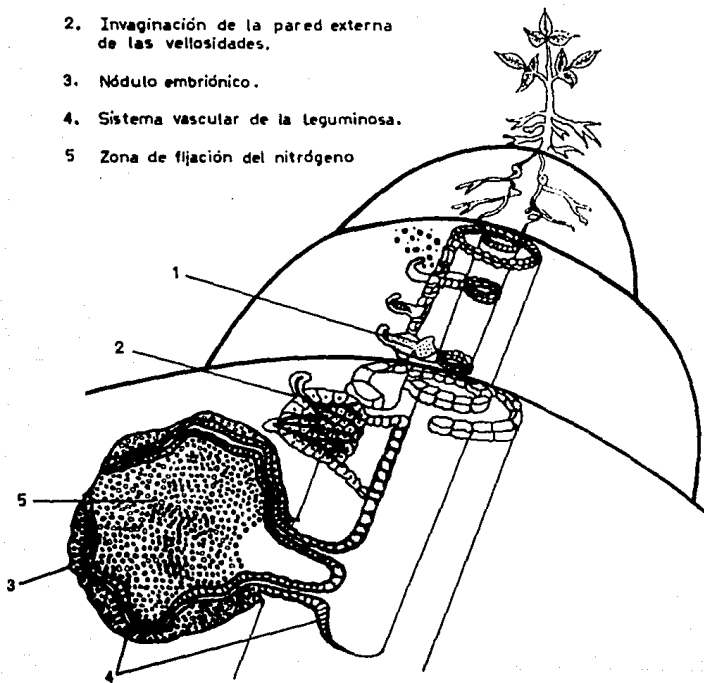


Figura No. 2

Proceso de infección y el desarrollo del nódulo sobre la raíz de la soja (*Glycine max*). (17)

nitrogenasa (enzima de la fijación del nitrógeno) ya que controla las necesidades de oxígeno en el interior del nódulo, de tal forma que induce a dicha enzima a que realice la fijación del nitrógeno.

Cuando las leguminosas son suministradas junto con fertilizantes nitrógenados los nódulos producidos son pequeños; después que el nitrógeno del suelo es consumido, los nódulos usualmente aumentan de tamaño y normalizan su función. (17)

Las características importantes que deben de tenerse en cuenta al seleccionar cepas activas del género *Rhizobium*, de acuerdo a varios autores entre los que se encuentran: Adkar y Bhardway (1), Burton J.C. (8,10), Date R.A. (16), Roughley y Pulsford (30), Stacey y Upchurch (38) y Williams P.M. (44) son las siguientes:

1. Ser capaces de formar nódulos con la cualidad de fijar nitrógeno.
2. Sobrevivir a los cambios ambientales durante las diferentes épocas del año.
3. Capacidad para desarrollarse en el medio de cultivo, en el soporte del inoculante y al mismo tiempo en el suelo, al ser inoculado.
4. Habilidad para competir con los *Rhizobia* propios del suelo.

5. Poder sobrevivir en el suelo independientemente de la planta hospedera.
6. Posibilidad de formar en poco tiempo nódulos efectivos sobre la raíz, en un amplio rango de temperaturas.
7. Alta sobrevivencia tanto en el soporte como en la semilla.
8. Capacidad de resistir variaciones de pH, del suelo y tener gran tolerancia a los macro y micronutrientes, así como a los pesticidas.

#### 4.2 Obtención del medio de cultivo óptimo.

Por lo que respecta a los requerimientos metabólicos, utilizan como fuente de carbono; polialcoholes, monosacáridos y sacáridos simples. Entre las fuentes de carbono más utilizadas se mencionan sacarosa, manitol, glicerol y lactosa y para casos particulares se indica el uso de pentosas.

En cuanto a la fuente de nitrógeno, se concluye que fuera de la planta Rhizobium es incapaz de utilizar el nitrógeno atmosférico, muchas cepas pueden utilizar el nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) como fuente suplementaria de nitrógeno.

Las cepas incapaces de usar nitrógeno inorgánico combinado son generalmente cultivadas con la adición de un aminoácido simple, como por ejemplo el ácido glutámico. Los hidrolizados de caseína son buenas fuentes de nitrógeno para el crecimiento de Bradyrhizobium japonicum. La urea ha sido utilizada también.

De tal forma que para obtener diversas fuentes de nitrógeno, factores y vitaminas se recurre casi exclusivamente al extracto o autolisado de levadura ya que es una excelente fuente de aminoácidos, factores de crecimiento, trazas de elementos y vitaminas indispensables para el crecimiento celular. Con el propósito de obtener altos rendimientos celulares se recomienda



el empleo de fuentes de nitrógeno suplementarias tales como nitratos y sales de amonio.

Respecto a las fuentes minerales se ha destacado la importancia de agregar  $Mg^{2+}$ ,  $PO_4^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Co^{3+}$  siendo este último utilizado por algunas cepas para sintetizar vitamina  $B_{12}$ . El fósforo es generalmente utilizado en la forma de fósforo inorgánico. (2, 3, 28)

Un medio líquido comunmente usado en la producción industrial, recomendado ampliamente, es el que se indica a continuación:

Manitol - - - - -	10 g/l
Extracto de levadura - - - - -	100 ml
$K_2HPO_4$ - - - - -	0.5 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - - - - -	0.2 g/l
NaCl - - - - -	0.1 g/l
$MnSO_4$ sol. al 10% - - - - -	2 gotas
$FeCl_3$ sol. al 10% - - - - -	2 gotas
$H_2O$ destilada - - - - -	900 ml

Se esteriliza a  $120^\circ C$  por 15 minutos (las fuentes de nitrógeno y carbono se esterilizan por separado).

El extracto de levadura se prepara con 100 g de levadura prensada, la cual se suspende en 1000 ml de agua destilada, se agita bien y se deja 2 horas a  $25^\circ C$  y después en el autoclave aproximadamente 50 minutos a la temperatura del vapor fluente.

Se centrifuga la suspensión y el líquido sobrenadante se ajusta a un pH de 6.8 y es utilizado como extracto de levadura (agua de levadura). La misma puede ser reemplazada en los medios de cultivo por extracto de levadura seca o en pasta en una concentración de 3 - 5 g/l. (2, 3)

A continuación se enlistan algunas modificaciones del medio anterior, utilizado por diferentes autores:

1. Balatti y Mazza (4)

utilizan:

Glicerol - - - - -	10.0 g/l *
Extracto de levadura - - - - -	4.0 g/l

\* En lugar de manitol

además le adicionan:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ - - - - -	0.3 g/l
$\text{KNO}_3$ - - - - -	0.8 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ - - - - -	0.3 g/l

Con la finalidad de aumentar el crecimiento y mantener el pH del cultivo en valores cercanos a la neutralidad. (pH = 6.8)

2. Pérez Chavez (25)

Se le adiciona:

$\text{CaCO}_3$ - - - - -	0.01 g/l *
---------------------------	------------

Rojo congo - - - - - 0.025 g/l  
Agar - - - - - 15.0 g/l  
Aforar a 1000 ml con agua destilada.  
\* Sólo en medio líquido.

Poner 300 ml en un matraz Erlenmeyer bafleado de 1000 ml en forma estéril. Incubar en agitación a 200 rpm durante 96 horas a temperatura de 29°C.

3. Corby H.D.L. y Thompson J.A. (13, 41)

De acuerdo a Fred et. al (1932) se le adiciona:

CaCO<sub>3</sub> - - - - - 3.0 g/l

y en lugar de manitol se puede utilizar sacarosa o glucosa.

4. Ruiz, Labandera y Williams P.H. (33, 44)

Estos autores utilizando el medio inicial encontrarán que aunque estos microorganismos utilizan monosacáridos y disacáridos, las cepas de crecimiento lento tales como Bradyrhizobium japonicum y Rhizobium lupini prefieren pentosas como la arabinosa.

5. Morales A. y Thompson B.G. (21, 40)

Le adicionan CaCl<sub>2</sub> al 0.1 g/l ajustando a un pH de 7.4.

### 4.3 Conservación de la cepa

Métodos para la conservación de la cepa:

a) Cultivos liofilizados.

Este método permite conservar la cepa por periodos amplios, que bien pueden estar comprendidos entre 10 y 15 años; disminuyendo así las posibilidades de encontrar variantes genéticas, debido a que no se requiere de la continua resiembra, esto favorece a que no se encuentren contaminantes. Teniendo como desventaja el costo del liofilizador (equipo).

b) Cultivo en medio con agar cubierto con parafina o vaselina estéril.

A diferencia del método anterior, este presenta algunas desventajas: como es el periodo de conservación reducido (maximo un año), por lo tanto existen problemas en cuanto a las resiembras, de tal forma que se presenta una contaminación originando así variantes genéticas. Como ventaja presenta un costo menor al anterior.

c) Cultivos en agar inclinado.

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

e) Congelamiento.

(14)

#### 4.4 Inicio de la producción.

El crecimiento del inóculo en un medio de cultivo líquido con una alta concentración celular, debe ser superior a  $1 \times 10^9$  células/ml. Para iniciar esta etapa se debe contar con cepas previamente seleccionadas para la leguminosa (soya), que presentan un alto poder de infectividad y capacidad de fijación de nitrógeno. (35)

Se debe tener un medio de cultivo correctamente balanceado para la cepa a desarrollar y un equipo de fermentación con todos sus accesorios y controles que aseguren la obtención de suspensiones de *Rhizobium* de alta concentración en cortos periodos de incubación. (14)

La primera etapa de un proceso industrial, es conveniente iniciarla en un agitador rotatorio. Se debe iniciar la producción con el desarrollo de las cepas en matraces bafleados en agitadores rotatorios o de movimiento recíproco, con inóculos que varían de 0.1 - 1.0% de volumen del medio de cultivo, de tal modo que cada matraz inicia el crecimiento con una concentración de inóculo alrededor de  $1 \times 10^6$  células/ml. Esto evita una incubación prolongada y reduce el riesgo de la contaminación. (4, 15, 20, 30, 36, 44)

Posteriormente se continúa la preparación del medio de cultivo para el desarrollo del inóculo en un tanque fermentador o bioreactor que sirve como inóculo de la producción industrial.

(5)

#### 4.3 Propagación del microorganismo.

La siguiente etapa del proceso es la propagación del microorganismo, la cual consiste en la transferencia de las suspensiones obtenidas en los agitadores bafleados hasta llegar al fermentador principal de producción. Tanto los fermentadores como los medios de cultivo de la etapa de propagación, deberán estar estériles. (5)

Durante el montaje de fermentadores para la propagación y la producción de células, el sistema debe estar sellado para prevenir la entrada de microorganismos contaminantes, ya que los filtros de aire aseguran que los contaminantes sean eliminados.

El tiempo medio de generación para las cepas de crecimiento rápido es de 4 horas, obteniéndose su número máximo viable de 1.5 a 3.0 días.

Para las cepas de crecimiento lento como es Bradyrhizobium japonicum, su tiempo medio de generación es de 6 a 12 horas, obteniéndose su número máximo viable de 4.5 a 8.0 días. (4, 15, 20, 30, 36, 44)

#### 4.6 Obtención del cultivo concentrado.

Los fermentadores que se pueden utilizar en la fermentación a nivel industria son de tipo Waldhoff o de turbina con inyección de aire estéril y también se pueden usar fermentadores simples con aire inyectado pero sin agitación. (5) (Ver figura No. 3 y No. 4)

Entre los servicios y accesorios que debe de tener una planta de fermentación, está el suministro de agua para refrigeración (manteniendo de esta manera la temperatura del proceso), vapor para esterilizar todos los equipos de fermentación, incluso cañerías y accesorios de aire estéril, el cual es obtenido por compresores que proveen el aire a determinada presión (no más de 2 a 3 atm.)

Para esterilizar el aire normalmente emplean filtros (lana de vidrio más asbesto) o filtros absolutos constituidos por celulosa, estos últimos son más eficientes y son los de elección para plantas modernas de fermentación. (5)

A continuación se mencionan algunas condiciones utilizadas en la producción celular:

Para el crecimiento óptimo se requiere aeración; en



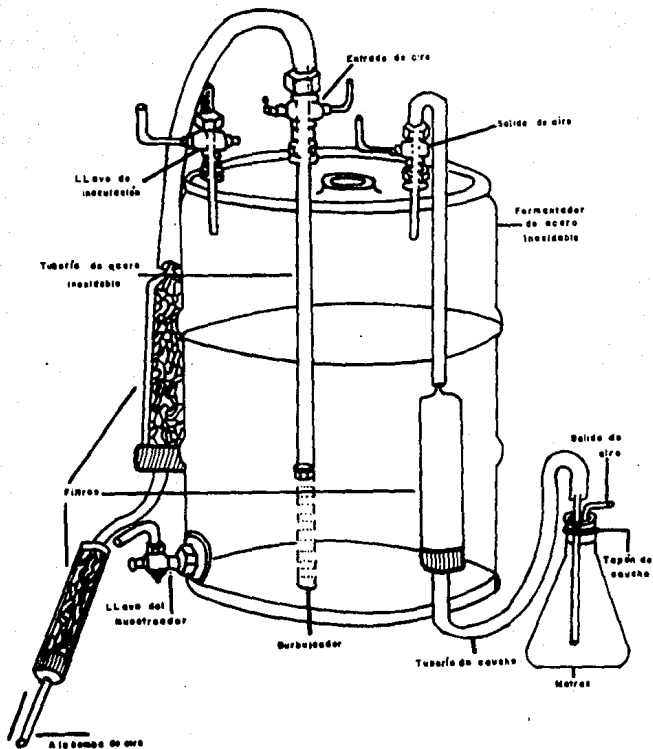
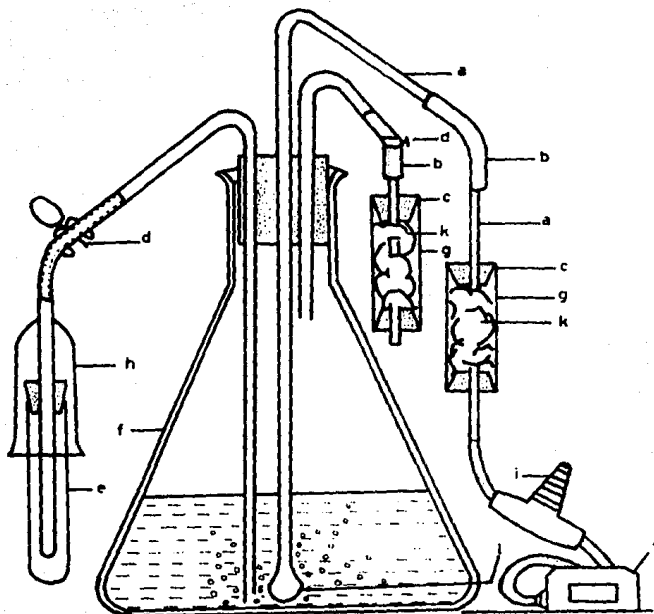


Figura No. 3

Diagrama de un fermentador sencillo hecho de acero inoxidable (41)



- |                                |                                  |
|--------------------------------|----------------------------------|
| a. Tuberia de acero inoxidable | g. Unidad de filtración de aire  |
| b. Tuberia de hule             | h. Cubierta del tubo de muestreo |
| c. Tapón de hule               | i. Llave de paso                 |
| d. Tornillo de ajuste          | j. Bomba de aire                 |
| e. Tubo de muestreo            | k. Algodón absorbente            |
| f. Matraz                      | l. Aspirador de vidrio poroso    |

Figura No. 4

Fermentador sencillo para la multiplicación de *Rhizobium* (5)

fermentadores de poco volumen (hasta 2 litros) puede llevarse a cabo simplemente por agitación; para fermentadores de producción a escala industrial con volúmenes de 1000 litros o más, es necesario el uso de aeración forzada (por inyección de aire estéril) con un régimen mínimo de 5 litros de aire/litro de cultivo/hora y a una temperatura de 26°C. (4, 15, 20, 30, 36, 44)

Al final del proceso, la suspensión de células obtenida será destinada a la impregnación del soporte. (5)

Con el medio de cultivo, en lo referente a su composición química, una aeración, temperatura adecuada y 1.0 por ciento del volumen del medio de cultivo, de inóculo inicial; se obtienen poblaciones de 4 a 5 x 10<sup>9</sup> células/ml después de 96 horas y este tiempo puede ser reducido aumentando la cantidad del inóculo. (44)

## V. SOPORTES.

Aspectos que se deben de tomar en cuenta en la preparación de inoculantes para leguminosas:

Disponer de un buen material de soporte para las bacterias, de tal forma que permita la conservación de la humedad para asegurar la viabilidad y una concentración inicial elevada de microorganismos.

Se requiere del equipo adecuado para las operaciones de molienda, mezclado y tamizado y así poder con las suspensiones de microorganismos obtenidas del proceso fermentativo impregnar los soportes.

El uso de los soportes ha permitido resolver el problema en forma simple y económica el problema de distribución y aumentar el tiempo de sobrevivencia de estos microorganismos.

La turba, por ser escasa en la naturaleza, no puede ser obtenida fácilmente; por lo que se ha investigado usar diferentes sustitutos de origen orgánico. Algunos investigadores han usado suelo y turba mezclados (Van Schreven 1954); otros suelos más carbón vegetal (Newbould 1951); arena más nutrientes (Afity 1968); carbón con o sin nutrientes (Strijdom y Deschodt 1976);

composta y elote de maíz (Corby 1976); bagazo de caña de azúcar (Leiderman 1971); lodo filtrado con caña de azúcar molida (Phipotts 1976) y celulosa en polvo (Pugashetti 1979).

Otro tipo de soporte fué preparado utilizando una composta de mazorcas de maíz; mezclando mazorcas con 2.5% de tierra caliza, 0.8% de superfosfatos y el 1.1% de nitrato de amonio, agregando agua y dejando fermentar por 30 semanas. La mezcla se guardó cubriéndola con plástico. Se observó que la sobrevivencia del Rhizobium era buena. (25)

Varios materiales como el bagazo de caña de azúcar, coco en polvo, cáscara de coco y harina, caña de azúcar con arcilla en polvo, vermiculita, carbón vegetal (7), cieno y otras sustancias han sido estudiadas con resultados favorables.

No es recomendable usar por el momento los materiales orgánicos del S.I.R.D.O. (Sistema Integral del Reciclamiento de Desechos Orgánicos) ya que es necesario establecer el contenido de materia orgánica durante la producción de la composta producida por este método. (25)

También se han hecho estudios utilizando lignita y  $\text{CaCO}_3$  (23, 34); filtrados de lodo; mazorcas de maíz molidas y mezcladas con fertilizantes y carbón, pero desgraciadamente no han dado buenos resultados; y aún se ha planteado la posibilidad de utilizar lirio acuático (27) como soporte de inoculantes para leguminosas. (25)

### 5.1 Obtención de la turba.

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

La turba se forma en climas húmedos y fríos y resulta de la acumulación y descomposición parcial de depósitos vegetales que se han conservado bajo condiciones de escasa aeración 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 de diversos tipos de pantanos localizados en áreas del Norte de Europa, Asia y América, también existen depósitos en las regiones Antártidas.

Su composición química revela que contiene alrededor del 0.1 por ciento de potasio, 1.0 por ciento de nitrógeno y pH altamente ácido entre 3.0 y 5.5. Estos valores son variables y las

diferencias se atribuyen al distinto origen botánico, la edad de la turba, la capacidad de retención de agua y a la microflora presente. (14)

La alta calidad en la preparación de los inoculantes para las leguminosas depende de la selección satisfactoria del material de soporte y su pre-tratamiento.

La turba o un suelo con alto contenido de materia orgánica son usados como soportes para Rhizobia. El tipo de turba puede afectar el número de microorganismos y su sobrevivencia, durante el almacenaje antes de aplicarse a la semilla o al suelo. (30, 44)

## 5.2 Selección del soporte.

La elección de la turba para ser utilizada como soporte en la producción comercial de inoculantes, es de enorme importancia ya que la calidad de los mismos depende estrechamente de las características de la turba utilizada.

Algunas de las propiedades más importantes a tener en cuenta son: contenido de materia orgánica, capacidad de retención de agua, pH, facilidad para promover el crecimiento y soportar una adecuada sobrevivencia de las Rhizobia utilizadas.

Las características físicas y químicas de la turba, pueden ser una indicación de su adaptabilidad a la producción de inoculantes, pero la elección última deberá basarse en los estudios de crecimiento y sobrevivencia de las Rhizobia como fué demostrado por Roughley y Vincent (1967). (14)

Considerando que las necesidades primordiales de las bacterias son: humedad, nutrientes y el pH, de la turba empleada debe poseer las siguientes características:

1. Aumentar la sobrevivencia de los Rhizobia durante el



almacenaje y distribución del inoculante y sobre todo cuando se inocula a la semilla.

2. Ser de fácil secado y triturado.
3. Disponible en cantidades adecuadas a bajo costo.
4. No tóxico para Rhizobia.
5. Buena adhesión para la semilla.
6. El material debe estar finamente molido para facilitar una buena mezcla con otros componentes y ser compatible con el suelo, al ser aplicado.
7. El pH debe estar entre 6.5 - 7.0.
8. Debe tener un alto contenido de materia orgánica, superior a 60%.
9. Tener bajo contenido de sales solubles, menor a 1%.

Entre los soportes que han sido utilizados para la preparación de inoculantes, el más empleado es la turba, el cual es un material de origen vegetal que generalmente se presenta con un pH bajo; sin embargo es el material más usado debido a que reúne las características necesarias para el desarrollo de esta bacteria, como es permitir una buena sobrevivencia, además de presentar una alta capacidad de retención de agua. (11, 15, 24, 41, 42, 44)

### **5.3 Lavado, neutralizado y secado.**

#### **Lavado:**

La turba debe obtenerse mojada, para después ser drenada o lavada y posteriormente ser neutralizada. (30)

#### **Neutralizado:**

La mayoría de las turbas son ácidas y se neutralizan generalmente con  $\text{CaCO}_3$  hasta obtener un pH de 6.5 - 7.0; entre otros agentes utilizados se encuentran  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .

El agente neutralizante es usualmente agregado a la turba antes de inocularla. Posteriormente se procede a efectuar un molido tan fino como sea posible, para asegurar una mezcla eficiente, pero en el caso de la Compañía Nitragin el agente neutralizante es agregado durante la mezcla de la turba y el medio de cultivo. (19, 30, 36)

#### **Secado:**

El secado debe efectuarse tomando en cuenta las variables de temperatura y tiempo. (19, 36)

La temperatura de la turba no debe exceder de 100°C durante el secado, ya que las altas temperaturas causan degradación y se producen sustancias tóxicas, lo cual restringe el crecimiento y la sobrevivencia de los Rhizobia. (30, 39)

#### 5.4 Molienda, tamizado y maduración.

##### Molienda y tamizado:

Seleccionar el tamaño de la partícula que es necesario en la preparación del soporte. El tamaño de la partícula se ajusta mediante el molido del soporte; para esto se emplean 3 tamaños: el llamado polvo fino que pasa a través de una malla de 200 - 300 mallas, el polvo regular que pasa a través de 100 - 200 mallas y el granular cuando se emplean de 16 - 15 mallas.

El secado de la turba, además de favorecer la molienda a una finura de 150 - 200 mallas, permite la incorporación de mayor cantidad del medio de cultivo bacteriano. (19, 36, 39)

##### Maduración:

La turba húmeda es pasada a través de un tamiz, esto es con la finalidad de remover los grumos (residuos). Posteriormente se pone a madurar en charolas con tapa de polietileno de 10 cm de profundidad, durante 72 a 96 horas a temperatura de 26°C.

Durante la maduración la humedad tiende a disminuir en la parte superior de la turba, esto se evita con una cubierta de polietileno. (30)

### 3.5 Soportes no estériles.

Los soportes no estériles normalmente son secados después de ser molidos, de esta manera la flora nativa no tiene la oportunidad de multiplicarse, antes de que el medio de cultivo con las células sea adicionado. (41)

La impregnación en los soportes no estériles se realiza mediante un rociador; o por la adición de una suspensión al soporte mezclandolo muy bien en un recipiente. Usualmente se agrega 1 parte de la suspensión por 2 partes del soporte seco.

Al final el contenido de humedad puede variar del 35 al 40% (Burton 1967) o del 45 al 50%, esto depende de la calidad del soporte. (15)

### 5.6 Esterilización.

La selección del método para la esterilización de la turba entre otros factores, depende del tipo de envase en el cual, el inoculante es colocado.

Los métodos de esterilización son los siguientes:

a) Esterilización con autoclave.

El uso de la autoclave es el único método, que deja absolutamente estéril al soporte, pero se ha encontrado como una desventaja que el material se altera durante la esterilización y también puede restringirse la transferencia de oxígeno en el inoculante. La esterilización se lleva a cabo durante 4 horas a 121°C. (30, 39)

b) Uso de gas.

El óxido de etileno, como carboxide (10% de óxido de etileno y 90% de CO<sub>2</sub>), ha sido usado comercialmente para esterilizar turbas, pero se han obtenido resultados muy variables, debido a que el gas debe penetrar completamente en la turba y después ser totalmente removido. La eliminación del gas residual en la turba empaquetada en un envase de polietileno es difícil de efectuar lo que puede ocasionar la inactivación de la

bacteria. (30, 39)

c) Radiaciones gamma.

La turba se distribuye en bolsas de polietileno de baja densidad de 0.05 mm y luego es esterilizada con radiaciones gamma 5 Mrad. Sin embargo este nivel no alcanza a esterilizar completamente a la turba, por lo tanto existen microorganismos sobrevivientes, los cuales aumentan su número de células (contaminantes) durante la vida media del inoculante. Pero rara vez ellos pasan el límite de  $10^7$  células/g de turba.

La sobrevivencia de los Rhizobia no se ve afectada seriamente por este nivel de contaminación. (30)

### 5.7 Soportes estériles.

El crecimiento de Rhizobia y su sobrevivencia son mejores en turbas estériles, la diferencia depende de la turba usada, la temperatura y la duración del almacenaje.

Para la preparación de células de crecimiento lento como son Bradyrhizobium japonicum, Rhizobium lupini es esencial la turba estéril. (30)

En el caso de los soportes estériles; el soporte es primeramente empacado en bolsas de polietileno en la cantidad requerida, procediéndose a la esterilización. (41)



## VI. PREPARACION DEL INOCULANTE.

Una de las etapas fundamentales que se toma en cuenta en la preparación de inoculantes para leguminosas, es la preparación de un medio de cultivo balanceado para lograr un buen desarrollo de la cepa, además del equipo de fermentación con todos sus accesorios y controles que aseguren la obtención de suspensiones muy concentradas de Rhizobia en un tiempo mínimo.

En cuanto a los métodos para obtener las suspensiones de estas células, consisten en utilizar la fermentación sumergida (cultivo agitado).

Por lo que respecta a la obtención de inóculos, se deben diferenciar distintas escalas: escala de laboratorio, escala de planta piloto y planta industrial.

## 6.1 Impregnación.

La manufactura de los inoculantes en gran escala, depende del crecimiento en el medio de cultivo, en el fermentador de producción, en el cual como mínimo debe contener  $10^9$  células/ml, el cual posteriormente es mezclado con el soporte.

La impregnación de los inoculantes, una vez estabilizados, en turbas no estériles, generalmente dan un contenido de aproximadamente 100 veces menos células, que en una turba esterilizada. (30)

La turba una vez impregnada con la suspensión bacteriana llega a obtener un valor de humedad del 50 al 60%, dependiendo del tipo de turba y el método de esterilización. Para turbas no estériles no es recomendable pasar de un valor de humedad del 55% debido a la proliferación de hongos. (19, 36)

La turba estéril empacada en bolsas de polietileno es inoculada por inyección; la suspensión de células es inyectada con una jeringa automática unida al fermentador. Luego de ser impregnado el soporte se procede a desintegrar los grumos que se forman durante el tratamiento con los medios de cultivo líquidos y se deja madurar de 2 a 3 días a temperatura ambiente.

Esta etapa tiene por objeto permitir la eliminación de gases producidos durante la fermentación que tiene lugar en el soporte debido a la presencia de Rhizobium sp y además favorecer el incremento de células de Rhizobium sp. (14)

Durante esta etapa el número de microorganismos aumenta rápidamente durante la primera semana, después de la inoculación y pueden continuar multiplicándose lentamente más allá de 4 semanas a 26°C. (30)

## 6.2 Agentes adhesivos.

Debido a que es conveniente mezclar el inoculante adecuado, con las semillas de la leguminosa que va a ser sembrada, es necesario agregar diversas sustancias; para evitar que el polvo del inoculante se desprenda y además proteger a las bacterias del medio ambiente.

### Adherentes:

Para asegurar que las bacterias del inoculante estén próximas a la raíz durante la germinación, se usan adhesivos, los cuales ayudan a impedir que el inoculante se desprenda con el manejo de la semilla.

En el caso de usar solamente agua para la inoculación, al evaporarse dicho líquido, el inoculante se desprende de la semilla y aunque cae también al suelo queda lejos de las raíces de la planta.

En la tabla No. 1 aparecen las dosis empleadas de algunos adherentes las que varían de acuerdo al tamaño de la semilla.

También puede emplearse leche, miel diluida, agua azucarada, goma arábiga, etc.; sin embargo con los materiales dulces se corre el riesgo de que las hormigas y hongos ocasionen daños a

las semillas inoculadas. (22)

Polvo de recubrimiento:

Las bacterias mueren fácilmente en los suelos ácidos o alcalinos carentes de humedad y con altas temperaturas, por lo que una semilla inoculada expuesta a estos factores rápidamente queda sin bacterias vivas, de ahí que sea conveniente recubrir las semillas con un material inerte para conservar la humedad, evitar la incidencia directa de los rayos solares y crear un ambiente favorable alrededor de la semilla, ya que el polvo de recubrimiento debe ser de reacción alcalina (carbonato de calcio), cuando la siembra se realice en un suelo ácido y de una reacción ácida cuando la siembra se realice en un suelo alcalino. El polvo de recubrimiento debe ser finamente molido. (22)

Tabla No. 1

10 Kg de semilla	Inoculación simple	Inoculación con revestimiento	
	Adherente Metil celulosa 2% Goma arábiga 20%	Adherente Metil Celulosa 4% Goma arábiga 40%	Polvo de recubrimiento Carbonato de calcio Roca fosfórica
Chica 1/	200 ml	200 ml	1 Kg
Mediana 2/	150 ml	150 ml	1 Kg
Grande 3/	100 ml	100 ml	1 Kg

- 1/ Tamaño similar a la semilla de trébol, Lotonis, etc...
- 2/ Tamaño similar a Siratro, Centrosema, Leucaena, soya, etc...
- 3/ Tamaño similar a Dolichos lab lab, frijol, etc...

Cantidades de adherente y polvo de recubrimiento para inocular y revestir 10 Kg de semilla de diferente tamaño. (22)

### 6.3 Tipos de inoculantes.

Los inoculantes se distribuyen comercialmente, en cuatro presentaciones:

1. Cultivos en medio sólido. (agar)
2. Cultivos en medio líquido. (caldo de cultivo)
3. Cultivos liofilizados.
4. Cultivos en polvo, con soporte.

#### 1. Cultivos en medio sólido.

Consisten en cultivos bacterianos desarrollados sobre una superficie de agar contenida en un envase de vidrio, en un ambiente estéril. Esta técnica se usa para producción en pequeña escala.

#### Ventajas:

1. La manufactura del producto es muy sencilla, barata y rápida.
2. El crecimiento es visible y los microorganismos contaminantes se detectan fácilmente por inspección visual.
3. No requiere de soportes.

#### Desventajas:

1. La cantidad de Rhizobia por unidad de volumen es baja

en comparación con otro tipo de inoculantes.

2. El inoculante tiene una vida media relativamente corta.
3. El envase se rompe fácilmente, requiere de una cuidadosa transportación y distribución.
4. La sobrevivencia de la bacteria sobre la semilla de leguminosa es inferior con respecto al inóculo a base turba.
5. También presenta dificultades en su aplicación, debido a la formación de grumos que evitan su aplicación uniforme. (26, 42)

### 2. Cultivos en medio líquido.

El crecimiento de Rhizobium en un medio líquido es una práctica rutinaria en el laboratorio y sirve también para ser usado directamente en la producción comercial, sólo se requiere escalar el proceso. Este tipo de inoculante tiene las siguientes ventajas y desventajas:

#### Ventajas:

1. Es de fácil aplicación a las semillas.
2. No es necesario humedecer las semillas para aplicar el producto, lo que permite economizar de 5 a 6 Kg de semilla por hectárea, que de otro modo se pierde por pudrición.
3. El medio líquido lubrica la sembradora impidiendo que



se tape, como ocurre cuando se usan inoculantes a base de polvo.

4. Ofrece la posibilidad de concentrar las células por centrifugación disminuyendo el volumen del líquido, minimizando los costos de transporte.

#### Desventajas:

1. La sobrevivencia sobre las semillas es similar a los inoculantes sobre agar, e inferior a aquellos que usan turba como soporte.
2. Requiere de un envase que sea desechable y económico así como refrigeración durante el almacenamiento y transporte para asegurar la sobrevivencia de las bacterias.
3. El tiempo de almacenaje es corto.

### 3. Cultivos liofilizados.

El proceso de liofilización es usado extensamente en la conservación de bacterias, alimentos, productos medicinales, así como en la preparación de inoculantes para la agricultura.

#### Ventajas:

1. Se presenta en pequeños volúmenes con altas concentraciones de células.
2. Vida media prolongada, especialmente en temperaturas

elevadas y no hay oportunidad para el crecimiento de microorganismos contaminantes.

**Desventajas:**

1. Se requiere de un equipo costosa y sofisticado, como es el liofilizador.
2. La sobrevivencia de la bacteria sobre la semilla es pobre. (26, 42)

**4. Cultivos en polvo con soporte.**

La mayoría de los inoculantes para leguminosas utilizan polvos orgánicos como materiales de soporte. Aunque se han probado muy diferentes soportes, la turba es el producto que ha sido el más adecuado para la formulación de los inoculantes utilizados actualmente.

**Ventajas:**

1. La vida media del producto es comparativamente más larga.
2. Tiene una mayor sobrevivencia los Rhizobia sobre las semillas de las leguminosas.

**Desventajas:**

1. Ocasiona el taponamiento de las maquinas sembradoras.
2. Es necesario humedecer las semillas para asegurar una buena distribución.

3. Hay pérdida de semillas por pudrición. (26, 42)

Otro forma de preparar inoculantes es la siguiente:

Scott y Bumgarner (1965) patentaron un proceso, el cual consiste en una suspensión de Rhizobia en aceite, la cual se deshidrata inyectando aire en forma de burbujas para remover el agua, posteriormente se centrifuga para separar el aceite de la bacteria; se procede a secar el centrifugado.

El microorganismo ya seco es finamente granulado y mezclado con un soporte, como el talco o caolín, con el fin de proveer un inóculo, el cual es usado en estado seco. (42)

#### 6.4 Empacado.

Para el empacado, los materiales que se utilizan son: vidrio, metal y plástico.

##### Empaques de vidrio:

Los frascos de vidrio han sido tradicionalmente usados en cultivos de agar, para inoculantes preparados en volúmenes pequeños y para cultivos puros en medios sólidos.

La sobrevivencia del cultivo pobre y el almacenamiento es restringido, aunque es previsto el intercambio de gas, mediante tapones de rosca, pero es más conveniente usar el método de sellado ya que facilita su manejo.

Van Schreven usó frascos de vidrio para ser inoculados con turba - suelo, los cuales son tapados con algodón lana y celofán para prevenir la pérdida de humedad. Las desventajas que presentan es que los frascos de vidrio ocupan mayor espacio y están sujetos a romperse.

### Empaques de metal:

Las latas de metal eran usadas para los cultivos en turba, ya que la unión entre la lata y su tapa es cubierta con una etiqueta fija y así el intercambio de aire es mínimo.

Aunque las latas pueden ser más resistentes a romperse que todo los frascos de vidrio, estas no conservan a la población. Las latas muestran una ventaja, que es la de ser retornables.  
(42)

### Empaques de plástico:

El desarrollo de esta industria, mostró un cambio en el empaqueo de los inoculantes, ya que la mayoría de éstos, a nivel mundial, son sólidos y pueden guardarse en bolsas de polietileno. La selección del material de plástico (empaquete flexible) como las bolsas de polietileno, facilita el intercambio de gas, ya que permite la difusión de  $O_2$  y  $CO_2$ , debido a pequeñas perforaciones efectuadas en la bolsa, la retención de humedad así como la resistencia a la temperatura.

El polietileno permite un alto intercambio de gas, relativamente es baja la pérdida de humedad y es sellado al calor. La esterilización de la turba es llevada a cabo en

autoclave y su temperatura depende de la densidad del polietileno, ya que el punto de fusión del polietileno, se eleva conforme se incrementa la densidad. (42)

Así, el polietileno con un espesor de 0.038 a 0.051 mm. cumple con estas necesidades. Pudiéndose esterilizar en autoclave a 121 °C, o más. Otra ventaja que presenta, es su fácil manejo en el transporte. (37)

Las direcciones impresas y alguna otra información adicional pueden ser hechas sobre el empaque; sin embargo se requiere de precauciones especiales para evitar perforar o dañar la capa de polietileno. La información del inoculante sobre el paquete varía dependiendo del país, pero la siguiente información es necesaria:

- a) Nombre de la leguminosa que es nodulada efectivamente por el producto.
- b) Cantidad de la semilla que debe ser utilizada para ese paquete.
- c) Instrucciones de aplicación.
- d) Número de lote.
- e) Fecha de caducidad (fecha después de la cual el producto no es considerado efectivo).
- f) Precaución sobre la temperatura de almacenaje.
- g) Responsabilidad legal o denegación.
- h) Nombre y dirección del fabricante. (11)

## 6.5 Almacenamiento.

Una vez que el inoculante ha sido empacado en bolsas de polietileno, se debe de almacenar en un cuarto oscuro a una temperatura de 4 a 5°C, ya que la disminución del número de Rhizobia viable está en función de la temperatura. (32)

Factores que afectan el crecimiento y la sobrevivencia de Rhizobia durante el almacenamiento y distribución.

### A. Humedad.

El efecto del contenido de humedad sobre la sobrevivencia de los microorganismos puede ser considerado tanto para los inoculantes preparados en turba estéril como en la no estéril, ya que hay competencia obvia entre Rhizobia y los microorganismos contaminantes, en particular en ciertos niveles de humedad.

El contenido de humedad en los inoculantes tiene un efecto marcado sobre el número de Rhizobia, ya que no sólo es crítico el nivel de humedad inicial sino que también hay una marcada relación entre el índice de mortalidad de Rhizobia y el índice de pérdida de agua durante el almacenaje.

Tal pérdida puede suceder cuando los inoculantes son almacenados bajo refrigeración, ya que las turbas simples y las turbas mezcladas (turba - suelo) varían ampliamente en su capacidad para retener la humedad. Esta propiedad es diferente en cada soporte, ya que absorben diferentes cantidades de humedad.

El contenido de humedad es la diferencia del peso de la turba húmeda, menos el peso de la turba seca; por lo tanto el porcentaje de humedad se define como el contenido de humedad entre el peso de la turba húmeda multiplicado por cien.

El método que utilizan algunos países para determinar el contenido de humedad, es mediante la expresión pF (potencial de humedad). Un ejemplo del contenido de humedad es el de la turba Badenoch la cual es expresada con valores de pF de 4.88, 4.15, 3.42 y 2.69 que equivalen respectivamente a un 30, 40, 50 y 60% de humedad. (30)

Vincent (1958) reporta que una pérdida de humedad del 24% en un inoculante almacenado a 5°C dió semanalmente un índice de mortalidad de 0.085, el cual es reducido a 0.001, si la pérdida de humedad es de 0.7%.

Roughley (1968) demostró que en turbas australianas no estériles, el rango óptimo de humedad es de 40 - 50% (pF 4.15 - 3.42) mientras que en turbas estériles el rango óptimo de humedad



es de 40 - 60% (pF 4.15 - 2.69). (42)

## **B. Aeración.**

Los reportes muestran que en los inoculantes, los Rhizobia crecen mejor sobre medios líquidos o sólidos siempre y cuando tengan buena aeración. (30)

La aeración puede ser lograda evitando la contaminación, con pequeñas perforaciones en las bolsas de polietileno, es importante tomar en cuenta que cualquier equipo adicional utilizado puede causar daño a la bolsa. Ciertos autores como Williams P.M. (44) mencionan que hay un mejoramiento en la sobrevivencia de las células, bajo las condiciones de acceso de aire.

Las latas selladas, los tubos cerrados y bolsas de polietileno de muy bajo intercambio gaseoso son inadecuadas; sin embargo el crecimiento y sobrevivencia de Rhizobia es bueno en bolsas de polietileno de mediano intercambio gaseoso. (44)

## **C. Temperatura.**

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la sobrevivencia de las bacterias está relacionado con la pureza del cultivo y la cantidad de humedad pérdida durante el

almacenamiento. Los cultivos preparados en soportes estériles, deben ser incubados a 26°C inmediatamente después de la adición de las células al soporte, lo cual promueve el crecimiento rápido de las células en el inoculante, por lo que ayuda a la sobrevivencia de los Rhizobia, si se mantiene constante el contenido de humedad.

Estudios efectuados semanalmente sobre la viabilidad de Rhizobia durante el periodo de almacenamiento de inoculantes, en turba no estéril, indican que el índice de mortalidad fué de 0.04% a 5°C y de 0.094% a 25°C; lo cual indica que al aumentar la temperatura aumenta el índice de mortalidad. (30, 37)

En la figura No. 5 se describen los pasos a seguir en la producción del inoculante.

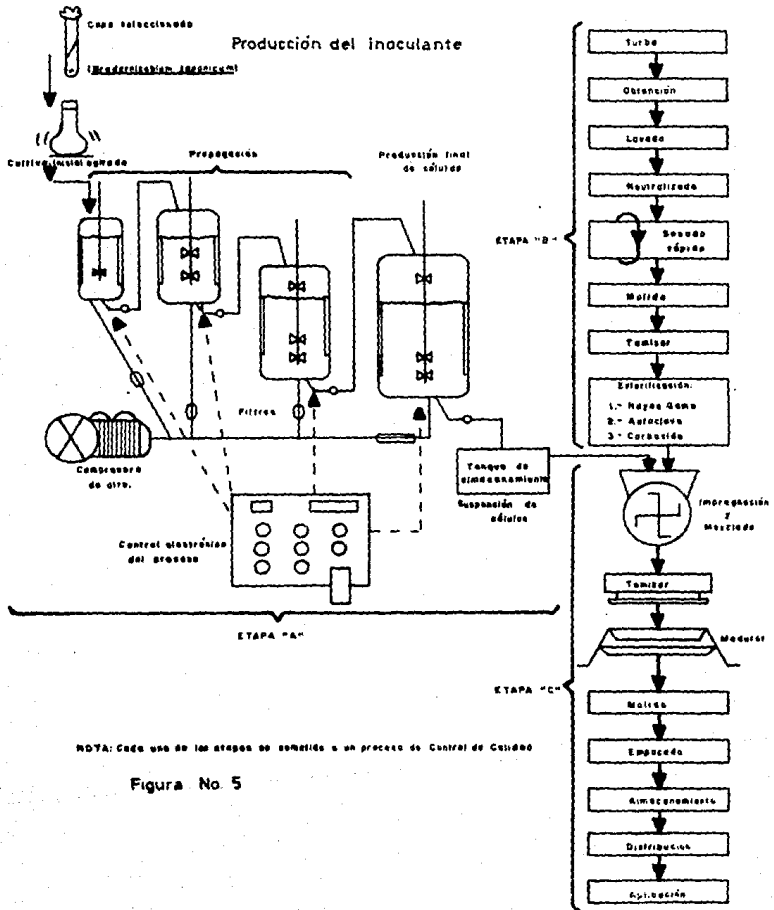


Figura No 5

## VII. CONTROL DE CALIDAD.

### 7.1 Control de calidad de la cepa.

El control de calidad de las cepas de Rhizobium para iniciar la producción de los inoculantes es el siguiente:

La cepa de colección que se utiliza al principio, en la producción de los inoculantes se denomina "Cultivo inicial" y debe estar siempre disponible para ser usada en el momento que se necesite, normalmente se encuentra en tubo de cultivo. Estos cultivos no varían ya que se originan de una misma cepa de colección, la cual se encuentra congelada en nitrógeno líquido.

Para asegurarse de que no exista cambio en la genética, debe ser mínima la transferencia de cultivo entre el cultivo inicial y los subcultivos.

Los procedimientos más sencillos para comprobar el cultivo inicial antes de empezar la producción de los inoculantes, son mostrados en la figura No. 6.

El proceso A. indica que la transferencia de masa que se hace de la cepa de colección al medio de cultivo es por siembra estriada

y todas las pruebas son hechas con base a la cepa de colección, la cual es fuente del inóculo para todo el cultivo inicial. Este método no facilita alguna información sobre el rango de variabilidad, dentro del cultivo. (tinción de gram, pureza, serología, habilidad para producir nódulos).

El proceso B. muestra el ensayo que se le hace al subcultivo, en cuanto a la habilidad para producir nódulos efectivos, ya que cualquier subcultivo que no fije nitrógeno efectivamente, se descarta.

El proceso C. indica que debido a la inestabilidad genética de los Rhizobia, se prueba una colonia aislada del cultivo inicial procedente de la cepa de colección. Todo esto se realiza antes de comenzar la producción de inoculantes. (41)

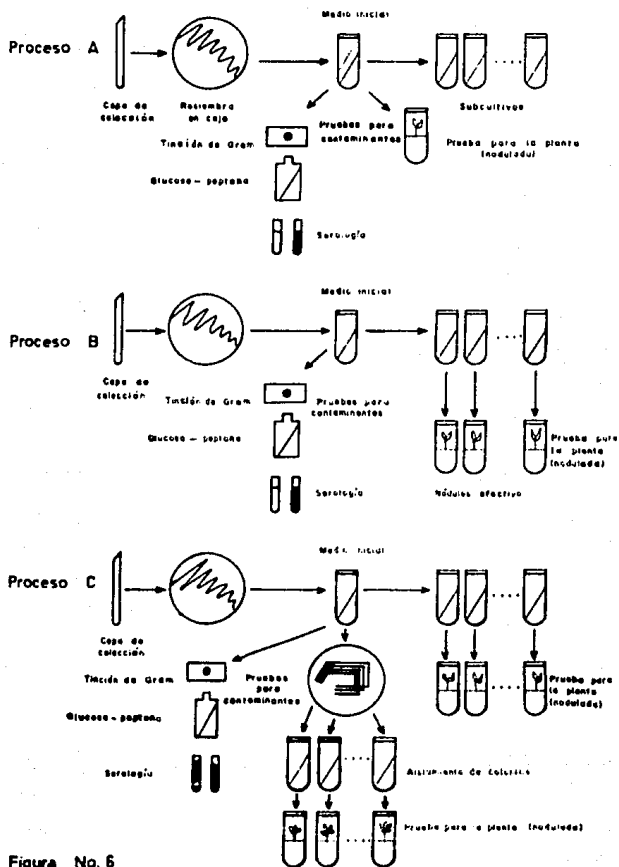


Figura No. 6

Control de calidad de la cepa. (41)

## 7.2 Control de calidad del soporte.

### a) Soporte no estéril.

Ensayos que se deben realizar esencialmente:

- \* Cuenta microbiana por dilución.
- \* Infección en la planta y cuantificación de nódulos.
- \* Identificación serológica en los nódulos.

(31, 32, 41, 42)

### b) Soporte estéril.

Ensayos que se deben efectuar:

- \* Tinción de Gram.
- \* Cuenta en placa.
- \* Identificación serológica.
- \* Detección de microorganismos contaminantes.
- \* Infección en la planta y cuantificación de nódulos.

(31, 32, 41, 42)

### **7.3 Control de calidad de los inoculantes.**

La calidad de estos productos será estrechamente ligada al método de fabricación y al control de calidad de su proceso, el cual varía ampliamente de país a país. (41)

El control de calidad de los inoculantes se basa en métodos de trabajo, equipos e instalaciones adecuadas para efectuar dichos controles durante el proceso y asegurar la calidad del producto antes de ser destinado a la venta.

En cuanto al control de calidad microbiológico, consiste en dos tipos de ensayos: uno cualitativo y otro cuantitativo.

#### **A. Pruebas o ensayos cualitativos.**

Estos consisten en las siguientes determinaciones:

- a) Verificación del pH.
- b) Realización de una aglutinación con antisueros específicos.
- c) Determinación de pureza mediante la siembra en un medio de glucosa - peptona - agar, en donde no debe haber crecimiento, ya que una contaminación se detecta mediante la presencia de crecimiento en el medio de cultivo.
- d) Observación al microscopio de un frotis, mediante la tinción de gram.



## **Pruebas o ensayos cuantitativos.**

Las pruebas que se realizan, son las siguientes:

- a) Cuenta total de células de Rhizobia, por medio de la cámara de Petroff - Haussner.
- b) Realización de la cuenta de células viables, por el método de cuenta en placa.
- c) Cuantificación del número de Rhizobia, a través del método de infección en la planta.

Para que un inoculante sea aceptado en el mercado, necesita tener como mínimo  $5 \times 10^8$  células viables/ml. y estar libre de microorganismos contaminantes. Se debe tomar en cuenta que existe una reglamentación precisa y confiable para el control de la calidad de los inoculantes.

Los sistemas más avanzados sobre el control de calidad son: A.I.R.C.S (Australian Inoculants Research and Control Service) y el U.D.A.L.S (University Department of Agriculture Laboratory Service). Estos sistemas tienen la finalidad de investigar el control de calidad bajo tres puntos de vista.

Según Date (1969) expresado como finalidades básicas:

1. Selección, ensayo y mantenimiento convenientes de las cepas de Rhizobia.
2. Control de calidad para los inoculantes de leguminosas.

3. Investigación de los factores que afectan la calidad y la eficiencia de los inoculantes en cuanto a la producción, distribución y usos. (26, 30)

#### A. Ensayos cualitativos.

1. Determinación del pH, el cual indica que existe contaminación si se encuentran valores abajo de 6 y arriba de 8.

2. Identificación serológica.

Aunque existe una amplia variedad de métodos inmunológicos, el más adecuado para este propósito, es la aglutinación somática.

Para efectuarlas se requiere del siguiente material:

- a) Antisuero: se utiliza un antisuero específico para Rhizobia el cuales almacenado en pequeños volúmenes y congelado.
- b) Antígeno: como antígeno se usa la suspensión de células de Rhizobia que debe tener una concentración mínima de  $10^7$  células/ml; esto es, con el fin de que al hacer la reacción de aglutinación, ésta sea clara y se eviten falsos negativos.
- c) Solución salina al 0.85% de NaCl.
- d) Tubos de ensayo de 1 ml de capacidad.
- e) Baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$  o  $52^{\circ}\text{C}$  de temperatura.

Procedimiento:

1. En un tubo de ensayo mezclar partes iguales en cantidad suficiente la suspensión del antígeno y de la solución salina, posteriormente se deja en agua hirviendo durante 30 minutos, esto es para inactivar los antígenos de los flagelos.
2. Usando una pipeta pasteur, mezclar en un primer tubo 18 gotas de la suspensión del antígeno previamente inactivado, con 2 gotas del antisuero; en un segundo tubo mezclar 18 gotas del mismo antígeno con 2 gotas de la solución salina, el cual es considerado como control.
3. A continuación se dejan los tubos en el baño maría a 52°C durante 4 horas o bien a 37°C durante toda la noche.
4. Una vez pasado el tiempo de reacción, la aglutinación somática es visible.

La reacción positiva empieza con una apariencia granular la cual procede a ser total. La presencia de una autoaglutinación en la solución salina (control), indica que la concentración de NaCl es elevada, por lo tanto deberá disminuirse a 0.5% de NaCl. (41, 42)

3. Prueba para detectar la contaminación microbiana (pureza).

\* Prueba de glucosa - peptona:

Se basa en que el medio glucosa - peptona no favorece el crecimiento de los Rhizobia, pero muchos microorganismos

contaminantes crecen fácilmente y tienden a producir un cambio de pH en el medio.

El medio de cultivo contiene:

Glucosa	- - - - -	5.0 g/l
Peptona	- - - - -	10.0 g/l
Agar	- - - - -	15.0 g/l
Violeta de Bromocresol	- - -	10.0 ml *
Agua destilada	- - - - -	900.0 ml

\* El violeta de bromocresol (1% en etanol) se adiciona al medio una vez disuelto el agar.

El medio ya preparado se distribuye en tubos de cultivo, en seguida se esterilizan y se inclinan los tubos. El medio de cultivo se siembra a través de estrias y se deja incubar a 28°C - 30°C durante 1 o 2 días; después se examina el cultivo y si presenta crecimiento asociado a un cambio de pH, esto indica una contaminación.

Algunas cepas de Rhizobium generalmente muestran escaso crecimiento sin un cambio apreciable de pH en el medio.

\* Tinción de Gram:

Este ensayo es de gran utilidad, ya que mediante un frotis teñido se puede determinar; la presencia de contaminantes; la presencia de contaminantes gram positivos, formación de esporas y células de diferente morfología. (41, 42)

## B. Ensayos cuantitativos.

### 1. Cuenta total de células de Rhizobia.

Se utiliza una cámara de cuenta, la cual tiene una profundidad de 0.002 cm, lo que requiere de menos ajustes ópticos del microscopio. Debe de usarse un microscopio de contraste de fases con objetivos de 20x y 40x.

La cámara esta dividida en cuadros de áreas conocidas, de esta manera a través de cálculos y factores de conversión se puede conocer el número de células por unidad de volumen. Una población mayor de  $10^8$  células/ml puede contarse sin la necesidad de hacer diluciones. La estimación incluye todas las células vivas o muertas. (41)

### 2. Cuenta en placa.

La cuenta en placa se usa para la valoración del número de células contenidas en un medio de cultivo líquido. La suspensión de células se diluye en serie, hasta obtener una dilución que contenga de 30 a 300 células.

Los materiales que se requieren para este ensayo son:

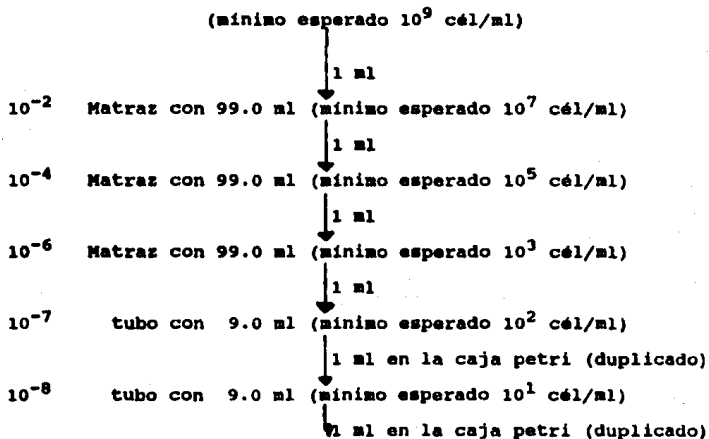
- a) Diluyente: este diluyente es agua estéril distribuida en matraces y tubos de ensayo; los matraces con 99 ml y los tubos de ensayo con 9.0 ml.
- b) Pipetas: se necesitan pipetas de 1 y 2 ml de capacidad.
- c) Medio de cultivo: el medio es agar - extracto de levadura -

manitol, colocado en las cajas de petri.

En el medio de cultivo que se utiliza en este ensayo, se omite la adición de  $\text{CaCO}_3$ , para evitar que se opaque el medio. El rojo congo que se le agrega al medio; indica la presencia de contaminantes, ya que los Rhizobia absorben menos el colorante que otras bacterias.

A continuación se muestra un ejemplo del proceso a seguir en la dilución de la suspensión de células, el cual debe tener como mínimo una concentración de  $10^9$  células/ml.

#### Dilución de la suspensión de células.



Las diluciones son mezcladas por agitación. Por otra parte se vierten de 10 a 15 ml del medio de cultivo en una caja petri y se mezcla con 1 ml de la dilución correspondiente; esto se hace por duplicado para cada dilución. El valor obtenido en las series, es resultado del número de colonias desarrolladas en la placa; las cuales deben estar aproximadamente entre 30 - 300 colonias por placa. (41, 42)

### 3. Determinación del número de Rhizobia viable sobre las semillas.

Primero se agregan las células a las semillas debido a que se hace la cuantificación de los Rhizobia viables sobre las semillas. Se cuantifica la cantidad de los Rhizobia, a los 0, 1, 7, 14, 21 y 28 días después de ser recubiertas. Para esto se procede a colocar 20 semillas previamente inoculadas en un matraz de 50 ml de capacidad, que contengan 20 ml de diluyente estéril, se agita vigorosamente durante 5 minutos para desprender los Rhizobia de las semillas, por lo tanto 1 ml de la suspensión resultante contiene los Rhizobia correspondientes a una semilla. Se hacen diluciones en serie de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$ . Se adiciona 0.1 ml de cada dilución a cajas petri para hacer la siembra en placa, esto se realiza por duplicado.

El medio de cultivo que contienen las placas deberá contener verde brillante (1.25 microgramos) es decir 0.015 g/l del medio de cultivo, esto es para diferenciar a las bacterias.

Los resultados se grafican en la siguiente forma: el logaritmo del número de células por semilla contra el tiempo de almacenamiento. (ver gráfica No. 1) (9, 36)

#### 4. Cuantificación del número de Rhizobia por infección de las raíces de la planta.

Debido a que no hay un método confiable para identificar a las bacterias nodulando la raíz de las leguminosas, se realiza el método de cuenta de células presentes en la infección de la raíz de la planta. Este debe ser valorado por el número de microorganismos que se encuentran en la suspensión del cultivo. Si el estándar requerido para una turba es de  $10^9$  cél/g y si la planta recibe una alícuota de 1 ml, la planta es probada en las diluciones  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-10}$ .

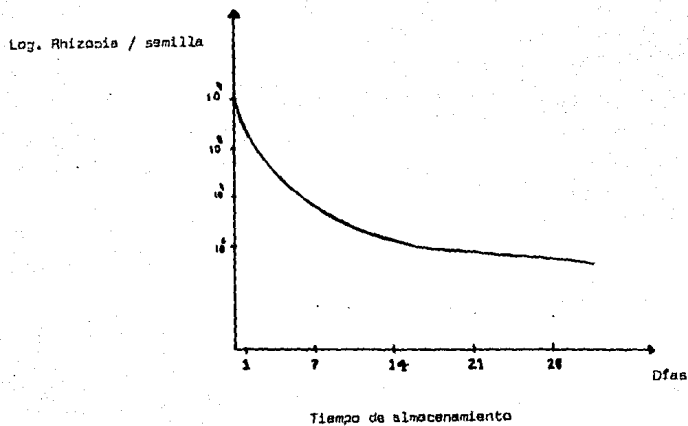
El material requerido para esta prueba es el mismo que se emplea en la cuenta por placa, excepto que se necesitan condiciones asépticas para el crecimiento de la planta. (41, 42)

La clave para el éxito de la nodulación usando cualquier cultivo estándar en turba; depende del número de Rhizobia requerida por la semilla, esto a su vez depende de:

- A. De la sobrevivencia del inóculo durante la aplicación a la semilla y la germinación de la semilla.
- B. La habilidad de los Rhizobia para colonizar la raíz de la



GRAFICA No. 1



Cuantificación del número de Rhizocis viable sobre las semillas

( 9, 30 )

semilla.

- C. La habilidad de la cepa inoculante para competir con los Rhizobia del suelo para infectar los sitios de la raíz de la semilla germinada. (44)

#### **Estándares.**

Aún cuando se recomiendan numerosos estándares de microorganismos que debe contener el inoculante, es necesario considerar otros factores que pueden repercutir en la viabilidad de los microorganismos introducidos al suelo

Hay una amplia evidencia en que el número mínimo de Rhizobia requerido para obtener una nodulación completa; tiene un rango extenso que va desde unas pocas semillas a cientos de semillas conforme a:

- A. El método de aplicación del inóculo.
- B. La temperatura y el tiempo entre la inoculación y la siembra.
- C. Los factores tóxicos asociados con el recubrimiento de la semilla (de cualquier naturaleza o el resultado de la aplicación de los pesticidas).
- D. Las condiciones del suelo.
- E. La competencia que ofrecen los Rhizobia nativos del suelo.

Se ha llegado a la conclusión que se necesita como mínimo de 300 a 3000 células por semilla. La relación existente entre el número de células durante la aplicación del cultivo, varía de acuerdo al tamaño de la semilla y la cantidad de semilla usada conforme al volumen de la turba. (43)

La viabilidad de estos microorganismos puede ser expresada en términos de número de células por gramo de inoculante o bien número de células por gramo de semilla.

A continuación se indican los diferentes estándares recomendados en diferentes países, para los inoculantes de esta clase:

País	Estándares
Australia	Se exige más de $1 \times 10^8$ Rhizobia viable, a excepción de <u>Rhizobium</u> que forma nódulos en <u>Lotonia</u> que es $3 \times 10^7$ (Date y Roughley 1977).
Canada	Un mínimo de $10^6$ Rhizobia viable por gramo de inoculante, pero el inóculo viable que se necesita por semilla es $10^3$ .

Checoslovaquia	3 x 10 <sup>8</sup> Rhizobia por gramo de inoculante.
Holanda	De 4 x 10 <sup>9</sup> a 25 x 10 <sup>9</sup> Rhizobia viable por gramo de inoculante.
Nueva Zelanda	1 x 10 <sup>8</sup> Rhizobia viable por gramo de inoculante.
Rusia	De 5 x 10 <sup>7</sup> a 10 x 10 <sup>7</sup> Rhizobia viable por gramo de inoculante.
Estados Unidos	<p>No hay una reglamentación exacta para la calidad de los inoculantes, cada estado establece sus propias reglas. Los estándares varían de estado a estado y están basados en las llamadas pruebas de emergencia.</p> <p>Las semillas son inoculadas conforme a un instructivo, plantadas en arena estéril o vermiculita; suministrándoles nutrientes deficientes en nitrógeno. Las plantas se cosechan después de 5 o 6 semanas. Las raíces son examinadas para buscar nódulos. En Indiana, si el 90% o más de las plantas tienen uno o más nódulos en la parte primaria de la raíz, la cepa se considera satisfactoria, con 67 a 90% de plantas con</p>

uno o más nódulos la prueba es regular. Si las plantas muestreadas están noduladas un 67% o menos, se considera a la cepa no satisfactoria. (12, 26)

País	Estándares
Australia	$10^9$ Rhizobia viable (fabricado) con 0.1% de contaminantes.
India	$10^8$ Rhizobia viable (manufacturado) con 1.0% de contaminantes.
Dinamarca	De $4 \times 10^9$ a $2.5 \times 10^{10}$ Rhizobia viable.
Rusia	De $5 \times 10^7$ a $1 \times 10^8$ Rhizobia viable.
U.S.A	$3 \times 10^8$ Rhizobia viable. (1)

En seguida se mencionan algunas instituciones que elaboran inoculantes en México y algunas normas de control de calidad de su producto. (12, 26)

INSTITUCIONES QUE ELABORAN INOCULANTES EN MEXICO Y ALGUNAS NORMAS DE CONTROL DE CALIDAD DE SU PRODUCTO.

Institucion	Localidad	Tamaño de Particula	Soporte Esteril	Poblacion de rizobias en el inoculante	Garantia	Control de Calidad
FERTIMEX	México, D.F.	200 mallas	Si	10 a 10	6 meses	Quantificación de <u>Rhizobium</u> / g de turba.
Lab. de Microbiología Programa de Empleo Rural	Matehuala S.L.P.	200 mallas	Si	10	8 meses	Quantificación de <u>Rhizobium</u> / g de turba.
Colegio de Postgraduados.	Chapingo, México.	200 mallas	Si	10	8 meses	Quantificación de <u>Rhizobium</u> / g de turba
Química Laca va. S.A.	Lechería Edo. de México.	200 mallas	Si	5 x 10	6 meses	Quantificación de <u>Rhizobium</u> / g de turba.
Nitragin. S.A.	Guadalajara Jalisco	100 y 200 mallas	Si	10	6 meses	Quantificación de <u>Rhizobium</u> / g de turba.
FIRA.	Tezoyuca, Morelos	100 mallas	Si	10	8 meses	Quantificación de <u>Rhizobium</u> / g de turba

\* A base de turba

## VIII. APLICACION EN EL CAMPO

Normalmente, los inoculantes deben ser aplicados directamente a la semilla, sin embargo algunas semillas de leguminosas contienen en su superficie factores tóxicos a estas bacterias y debido a su toxicidad ocasionan fracasos en las inoculaciones. (32)

Métodos de aplicación de los inoculantes en las semillas.

### \* Método de inoculación directa.

El inoculante se aplica directamente al suelo.

### \* Método de inoculación indirecta.

El inoculante se mezcla con la semilla, fuera del área de siembra.

La inoculación indirecta incluye diferentes métodos de aplicación:

#### 1. Método de inoculación en seco.

Consiste en humedecer el suelo para posteriormente agregar la mezcla del inoculante y la semilla. Este método sólo involucra la aplicación del inóculo en polvo a la semilla; es el más simple

de los métodos, pero a su vez es poco efectivo, ya que el inoculante se adhiere probablemente en poca cantidad y la sobrevivencia de los Rhizobia que se han adherido a la semilla no es adecuada. Este método es recomendable para inocular grandes cantidades de leguminosas. (32)

## 2. Método de inoculación a través de rociado.

En éste método primero se humedece la semilla con una solución adherente que bien puede ser: goma arábica, metil celulosa o simplemente agua y posteriormente se agrega el inoculante.

La solución o el agua, deben contener disueltos en proporción de una décima parte de su volumen: miel, melaza o jarabe; lo cual permite que las bacterias sobrevivan de 2 a 3 semanas. Si durante un tiempo no llueve es conveniente humedecer el suelo. Este tratamiento es adecuado para plantas de semillas lisas como la soya, el frijol, el trébol, el haba, etc. (18)

## 3. Método de inoculación adherente \*Slurry\*

Consiste en agregar agua al inoculante antes de ser mezclado con la semilla. Los inoculantes primero son mezclados



con agua (ver tabla No. 2) hasta tener una consistencia homogénea, en seguida se adiciona goma o azúcar (sacarosa al 10%, goma arábiga al 10% y metil celulosa al 1%).

El agua que se adiciona es con el fin de mejorar la adhesión de los inoculantes a las semillas. El uso de la azúcar en los inoculantes sirve para disminuir el índice de mortalidad de los Rhizobía sobre la semilla seca.

La cantidad de agua varía con las diferentes semillas ya que es necesaria más agua para las semillas pequeñas que para las semillas grandes, debido a que el área de superficie que va a ser recubierta es mayor. Es importante hacer hincapié en que las semillas deben estar completamente recubiertas con las partículas del inoculante.

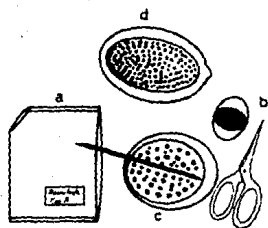
A continuación se ilustran los pasos a seguir en la inoculación de la semilla por el método de \*Slurry\* (ver figura No. 7).

Tabla No. 2

Cantidad de agua e inoculante para la inoculación de varias semillas de leguminosas de varios tamaños, por el método de \*Slurry\*.

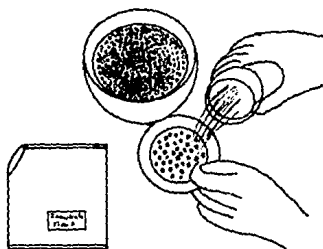
Especie de leguminosa	Semillas (No/Kg)	Inoculante (g/25Kg de semilla)	Agua (ml/25Kg de semilla)	Adherente (ml/25Kg de semilla)
<i>Trifolium repens</i> (trébol blanco)	2,000,000	110	625	750
<i>Medicago sativa</i> (Alfalfa)	500,000	110	550	650
<i>Coronilla varia</i> (Crown vetch)	250,000	110	550	650
<i>Vigna radiata</i> (Green gram)	25,000	110	500	550
<i>Vigna unguiculata</i> (Cowpea)	10,000	110	375	437
<i>Glycine max</i> (Soya)	5,000	110	250	287
<i>Cicer arietinum</i> (Garbanzo)	2,000	110	250	287
<i>Vicia faba</i> (Broad bean)	1,250	110	175	200

(17)

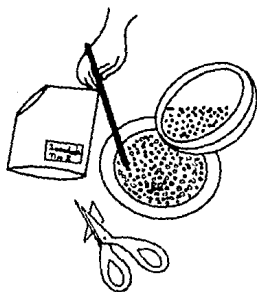


Muestra el equipo necesario

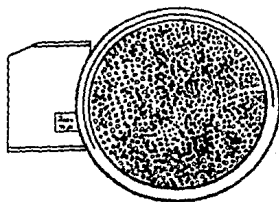
- a)- Inoculante
- b)- Agua
- c)- Adherente
- d)- Semillas



Adición del agua y del agente adherente al inoculante



Mezclado del inoculante con las semillas



Semillas revestidas con el inoculante

Figura No. 7

Inoculación de la semilla por el método de "Slurry"

#### 4. Método de las semillas revestidas.

Consiste en agregar un agente neutralizante, tal como el carbonato de calcio, a las semillas ya recubiertas por el inoculante. Este método mejora la sobrevivencia de algunas bacterias sobre la semilla, involucra el uso de la goma arábiga (40%) o metil celulosa (1.5%) como adhesivo para el inóculo de la semilla, posteriormente estas semillas son revestidas finamente con carbonato de calcio y roca fosfórica.

La roca fosfórica es generalmente recomendada en este método; ya que ayuda a las semillas que son sembradas en suelos con un pH de 5.5 - 6.0 o bien cuando las semillas son sembradas en contacto con fertilizantes ácidos. (32)

Es necesario tener todos los materiales requeridos un día anterior a la siembra, destacando por su importancia los siguientes:

1. Inoculante con los microorganismos específicos.
2. Adherente preparado; ya que las gomas arábicas requieren de tiempo para su dilución, la cual se hace poniendo agua suficiente en un recipiente a un nivel de 5 cm de altura, 40% de goma arábiga, la cual es espolvoreada en la superficie del recipiente; se deja reposar durante 24 a 30 horas. Posteriormente se agregan 15 g/l de carbonato de calcio, se

agita vigorosamente y de esta manera queda listo el adherente para su uso.

3. Semilla escarificada, si es necesario.

4. Polvo de recubrimiento ( $\text{CaCO}_3$ , roca fosfórica) finamente molido en caso que se quiera recubrir la semilla. (32)

#### **Semillas pre-inoculada.**

En el suelo, las bacterias fijadoras de nitrógeno normalmente se mantiene en un medio propicio antes de penetrar a la raíz de la planta y posteriormente forman las nodulaciones que las protegen de la acción que pueden tener otros microorganismos extraños.

En cambio las semillas que han sido inoculadas y guardadas durante cierto tiempo para después ser usadas (semillas pre-inoculadas) están expuestas, tanto a los contaminantes por organismos extraños, como a cambios de temperatura y humedad en el medio ambiente.

En los últimos años se ha tratado de introducir al mercado, la semilla pre-inoculada, para lo cual se han realizado numerosos experimentos; la mayoría de ellos comprueban que las semillas pre-inoculadas solo pueden dar resultados positivos, si son sembradas en un término de tres meses a partir del tratamiento, conservandolas mientras tanto a una temperatura alrededor de  $5^\circ\text{C}$  y sin exponerlas a los cambios ambientales que pudiera terminar

con la vida de la bacteria o reducir su viabilidad. (18)

Para obtener los beneficios de una buena inoculación.

1. Use el inoculante que corresponda a la especie de leguminosa que vaya a sembrar.
2. Siga exactamente las instrucciones de manejo que están marcadas en el paquete.
3. Si su siembra es en seco, emplee doble dosis del inoculante para la semilla.
4. Si sigue el método de rociar la semilla para mezclarla con el inoculante emplee solamente la dosis necesaria.
5. La cantidad de la semilla que puede ser tratada con el inoculante, esta especificada en cada dosis.
6. Inocule sus semillas de leguminosas en todos los casos y especialmente en siembras nuevas, para que se active la fijación de nitrógeno del suelo. (18)

## IX. CONCLUSIONES.

1. Es importante que las cepas a utilizar conserven sus características de infectividad, especificidad, efectividad y virulencia, para determinada especie de leguminosa, en este caso, para la soya (*Glycine max*), proporcionando una buena nodulación como resultado de la fijación del nitrógeno.
2. Entre los soportes que se emplean para la producción de los inoculantes, el más apropiado actualmente es la turba, debido a que los experimentos realizados en muchos países, han demostrado que estos microorganismos crecen satisfactoriamente en ella.
3. Las propiedades que caracterizan a la turba como soporte son: contenido de materia orgánica, capacidad de retención de agua, pH adecuado, facilidad para promover el crecimiento y soportar una adecuada sobrevivencia de los *Rhizobia*.
4. Los soportes estériles presentan la ventaja de que eliminan la competencia de los microorganismos contaminantes, así como los efectos de antagonismo que interfieren con la adaptación y sobrevivencia del *Rhizobium*.

5. Se encontró que para producir inoculantes de elevada calidad, es recomendable utilizar soportes estériles debido a que los microorganismos presentan un buen desarrollo y además sobreviven las cepas de crecimiento lento, tal es el caso de Bradyrhizobium japonicum; aunque se pueden producir inoculantes de buena calidad, empleando soportes no estériles cuando se utilizan cepas de crecimiento rápido, obteniendo así un buen número de células en corto tiempo, con menos costo.
  
6. En la bibliografía reportada se encontró, que la gran mayoría de los autores recomiendan que el proceso de esterilización del soporte (turba) sea a través de radiaciones gamma con una sola dosis de  $5 \times 10^6$  Rad.
  
7. Referente a las presentaciones en que se distribuyen los inoculantes, el cultivo liofilizado, es el más adecuado debido a que el microorganismo presenta una prolongada vida media, se presenta en pequeños volúmenes con altas concentraciones de células y no da oportunidad a que haya crecimiento de contaminantes.
  
8. Por lo que se refiere al empacado, se destaca el uso de bolsas de polietileno de alta densidad, debido a las ventajas que este proporciona tanto en su manejo como en su distribución,



las cuales han sido satisfactorias.

9. Para obtener un inoculante de alta calidad es necesario llevar un minucioso control de calidad tanto de la cepa como del soporte (turba), mediante ensayos cualitativos y cuantitativos del inoculante.

## X. BIBLIOGRAFIA.

1. Adkar S.S., Bhardwaj R. 1984  
"Production of quality legume inoculants"  
Preceeding of Sympostum on Increasing Pulse. Production in  
India Constraints and Oppotunities. Octubre 1982 New Delhi,  
India. Pág. 341 - 350.
2. Alexander M. 1980  
"Introducción a la Microbiología del suelo"  
Editorial A.G.T. Editor S.A. México D.F.
3. Anyango, B.; Kena, S.D.; Balasundaram, V.R.; Widdowson, D.  
1985  
"Legume inoculants production at the Naibori Mircen"  
Proc. of the first conference of the African Association  
for Biological Nitrogen Fixation (AABNF) held in Naibori,  
Kenya. 23 to 27 July. Pág. 213 - 223.
4. Balatti, A.P.; Mazza, L.A.; Moretti, E. 1987  
"Aeration requirements of Rhizobium cultures"  
Mircen Journal of Applied Microbiology and Biotechnology.  
A Research Journal for Biotechnology in the Developing  
World. Vol. 3, No. 3. Pág. 227 - 234.
5. Balatti, A.P. 1981  
"Producción de inoculantes"  
Centro de Investigaciones y Desarrollo de Fermentaciones  
Industriales. Facultad de Ciencias Exactas 47 y 115. La  
Plata, Argentina. Pág. 1 - 21.
6. Bergey's. 1984  
"Manual of Systematic Bacteriology"  
Ed. by N.R. Krieg and J.C. Holt Baltimore. Williams and  
Wilking. Based on Bergey's Manual of Determination  
Bacteriology. Pág. 261 - 264.

7. Bhatnagar, R.S.; Jauhri, K.S.; Iswaran, V. 1982  
 "Survival of Rhizobium japonicum in charcoal bentonite based carrier"  
 (Legume Inoculants Production in India.)  
 Current Science. Vol. 51, No. 8 April 20 1982 Pág. 430 - 432.
  
8. Burton J.C. 1982  
 "Modern Concept in Legume Inoculation"  
 Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. By: Graham, P.H. & Harris, S.C. (Eds.) CIAT. Cali Colombia. Pág. 105 - 114.
  
9. Burton J.C. 1975  
 "Methods of inoculating seeds and their effect on survival of Rhizobia"  
 International Biological Programme 7 Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Edited by Nutman, P.S. Cambridge Univ. Press. Chapter 15 Pág. 175 - 189.
  
10. Burton J.C. 1980  
 "New Developments in Inoculating Legume"  
 Recent Advances on Biological Nitrogen Fixation. By Nubba, Rao N.S. Edward Arnold, India. Pág. 380 - 405.
  
11. Burton J.C. 1985  
 "Production and use of legume inoculants in African"  
 Proc. of the First Conference of the African Association for Biological Nitrogen Fixation (AABNF) held in Naibori, Kenya. 23 to 27 July 1984. Pág. 119 - 134.
  
12. Cano Zavala N.L. 1988  
 "Estudio comparativo de la calidad de diferentes inoculantes biológicos"  
 Tesis de licenciatura. Facultad de Química, U.N.A.M.
  
13. Corby H.D.L. 1975  
 "A method of marking a pure - culture, peat - type legume inoculants, using a substitute for peat"  
 International Biological Programme 7 Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Edited by Nutman, P.S. Cambridge University Press. U.S.A. Chapter 14. Pág. 169 - 173.

14. Cordova Uscanga R. 1986  
"Evaluación de la turba nacional como soporte para  
inoculantes de leguminosas con cepas de Rhizobium japonicum."  
Tesis de licenciatura. Facultad de Química, U.N.A.M.
15. Date R.A. 1976  
"Legume inoculant production"  
Proceeding - Indian National Science Academy - part B.  
Vol. 40, No. 6. Pág. 667 - 686.
16. Date R.A. 1975  
"Principle of Rhizobium strain selection"  
International Biological Programme 7 Symbiotic Nitrogen  
Fixation in Plants. Edited by Nutman, P.S. Cambridge  
University Press. U.S.A. Chapter 12. Pág. 137 - 150.
17. F.A.O. 1984  
"Legume inoculants and their use"  
A pocket, Manual, Food and Agriculture Organization, Rome.  
Pág. 1 - 63.
18. Flora Microbiana S.A.  
"Inoculación de las leguminosas"  
Nitrobacter, México. Biblioteca Central de la Universidad  
Autónoma de Chapingo. Estado de México.
19. Iswaran V. 1969  
"Maintenance, production and distribution of legume  
inoculants"  
Science and Culture. Vol. 35, No. 9. Pág. 453 - 457.
20. Macary H.S.; Beunard P.; Montaje D.; Tranchang J.P. 1986  
"Setting and diffusion of a production system for legume -  
Rhizobium"  
Symbiosis Vol. 2, No. 1 - 3. Pág. 363 - 366.
21. Morales Avelino F.D. y Escamilla Sánchez J.B. 1987  
"Producción de inoculantes: Crecimiento de Rhizobium  
phaseoli"

Sociedad Nacional de la Fijación Biológica del Nitrógeno  
México. 1er Congreso Nacional. 25 - 27 Febrero 1987.  
Memorias y Resúmenes, Xalapa, Veracruz.

22. Moreno Quiroz Ing. Antonio. 1982  
"Manual sobre inoculación y revestimiento de semillas de leguminosas"  
Boletín informativo. No. 128. (F.I.R.A.) Vol. XIII.  
Abril 1982 Pág. 22 - 34.
23. Odeyami, O.; Okoronkwo, N. 1985  
"The suitability of local materials as carriers for Rhizobia in legume inoculant production in Nigeria"  
Proc. of the First Conference of the African Association for Biological Nitrogen Fixation (AABNF) held in Naibori, Kenya. 23 to 27 July 1984. Pág. 135 - 150.
24. Okon Y.; Hadar Y. 1987  
"Microbial Inoculants as crop - yield enhancers"  
Critical Reviews in Biotechnology. Vol. 6 C.R.G.
25. Pérez Chavez R.G.; Lugo S.A. 1985  
"Evaluación del abono orgánico obtenido del SIRDO (Sistema Integral del Reciclamiento de Desechos Orgánicos) para uso como posible soporte de inoculantes de leguminosas"  
Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. U.N.A.M.
26. Ramírez Gama R.M.; Ferrera Cerrato R. 1986  
"Control de calidad de inoculantes. Tipos de inoculantes. Formas de inoculación"  
Curso Latinoamericano sobre Investigación y Producción de Soya y Chicharo de vaca.  
Instituto Internacional de Agricultura Trópic. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de México. Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo. Tampico, Tamps.
27. Ramírez R.M., D. Muñoz G.; B. Vezga y O. Monroy. 1983  
"Estudio de una composta de lirio acuático como posible sustituto de turba utilizada como soporte de inoculantes de leguminosas"  
Resúmenes: XIV Congreso Nacional de Microbiología.

28. Rhodes Alan y Fletcher Derek. 1969  
"Principios de Microbiología Industrial"  
Editorial Acribia Zaragoza (España).
29. Rose Anthony H. 1977  
"Microbiología Química (Introducción a la Fisiología Microbiana)"  
Segunda edición, editorial Alhambra. México.
30. Roughley R.J.; Pulsford D.J. 1982  
"Production and Control Legume Inoculants"  
Nitrogen Fixation in Legumes. Edited by J.M. Vincent.  
Edition Beregersen, F.J.; John Wiley & Sons. Ltd. Pág.  
193 - 209.
31. Roughley R.J. 1976  
"The production of high quality inoculants and their  
contribution to legume yield"  
International Biological Programme 7 Symbiotic Nitrogen  
Fixation in Plants. Edited by Nutman, P.S. Cambridge  
University Press. U.S.A. Chapter 11. Pág. 125 - 136.
32. Roughley R.J. 1982  
"The storage quality control and use of legume seed  
inoculants"  
Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical  
Agriculture. By: Graham, P.H. & Harris, S.C. (Eds.) CIAT Cali  
Colombia. Pág. 115 - 126.
33. Ruiz A.F.; Labandera C.; Oriva R.; Sta Ma, J.  
"Crecimiento y sobrevivencia de *Rhizobium japonicum* (CS -  
1809) y *Rhizobium trifolii* (Wu - 290) en turbas españolas de  
diferentes orígenes"  
Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Av. Puerta  
de Hierro s/n, Madrid 3.  
Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, San Jose  
de la Rinconada, Sevilla, España. Pág. 1 - 9.

34. Sahni V.P. 1977  
 "Inoculants for India"  
 Miscellaneous Publication, Hawaii. University Cooperative  
 Extension Service 19, No. 145. Pág. 413 - 427.
35. Somasegaran P.; Halliday J. 1982  
 "Dilution of liquid Rhizobium cultures to increase  
 production capacity of inoculant plants"  
 Applied and Environmental Microbiology. Vol. 44, No. 2  
 Pág. 330 -333.
36. Somasegaran P.; Hoben H. and Halliday J. 1981  
 "Ejercicios Prácticos en Tecnología Rhizobium - Leguminosa  
 preparado por Somasegaran P. et al."  
 Curso de Tecnología de Rhizobium y Producción de  
 inoculantes. (Manual de prácticas) sección D. Tecnología  
 de la inoculación. U.N.A.M.; U.A.CH. y FERTIMEX. Pág.  
 66 - 80.
37. Somasegaran P. 1985  
 "Inoculant Production with Diluted Liquid Culture of  
 Rhizobium spp. Peat, Sterility Requirements, Storage and  
 Plant Effectiveness"  
 Applied and Environmental Microbiology. 1985 Vol. 50, No.  
 2 Pág. 398 - 405.
38. Stacey G. and Upchurch R.G. 1984  
 "Rhizobium inoculation of legume"  
 Trends in Biotechnology. Vol. 2. Pág. 65 - 68.
39. Strijdom B.W. & Deschodt C.C. 1976  
 "Carrier of Rhizobia and the effects of prior treatment on  
 the survival of Rhizobia"  
 International Biological Programme 7 Symbiotic Nitrogen  
 Fixation in Plants. Edited by Nutman, P.S. Cambridge  
 University Press. U.S.A. Chapter 13. Pág. 151 - 168.
40. Thompson B.G.; Leps W.T. 1986  
 "Effect of dissolved oxygen on growth and production of  
 exopolisaccharide by Rhizobium trifolii"  
 Journal of Fermentation Technology. Vol. 64, No. 4 Pág  
 335 - 338.

41. Thompson J.A. 1984  
"Production and Quality Control of Carrier - Based Legume Inoculants"  
Information Bulletin No. 17 / International Crops Research Institute for Semi - Arid Tropics. ICRISAT Patancheru P.O. Andhra Pradesh 502 324, India. Pág. 1 - 37.
  
42. Thompson J.A. 1987  
"Production and Quality Control of Legume Inoculants"  
Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. Edited by Bergersen, F.J.; John Wiley & Sons. Ltd. Pág. 489 - 533.
  
43. Vincent J.M. 1977  
"Quality Control of Inoculats"  
Miscellaneous Publication, Hawaii. University Cooperative Extension Service. No. 145. Pág. 447 - 456.
  
44. Williams P.M. 1984  
"Currents use of legume inoculants technology"  
Biological Nitrogen Fixation. Ecology, Technology and Physiology. Edited by Martin Alexander. Plenum Press New York and London. Pág. 173 - 199.