

22  
2 Gen.



# Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**"EVALUACION DE LA TURBA NACIONAL COMO  
SOPORTE PARA INOCULANTES DE LEGUMINOSAS  
CON CEPAS DE RHIZOBIUM JAPONICUM".**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

**P r e s e n t a :**

**CORDOVA USCANGA RUBEN**



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

1.- Introducción.

2.- Objetivo.

3.- Generalidades de la producción de inoculantes.

3.1 Características de Rhizobium

3.1.1 Morfológicas.

3.1.2 Asociativas.

3.1.3 Taxonómicas.

3.1.4 Importancia.

3.1.5 Selección de cepas.

3.2 Colección.

3.3 Medios de cultivo y propagación.

3.4 Soportes.

3.5 Otros soportes.

3.6 Manufactura de inoculantes.

3.7 Control de calidad.

3.8 Tipos de inoculantes.

4.- Antecedentes y situación actual en México en la producción de inoculantes.

5.- Material y Métodos.

6.- Resultados y Discusión.

7.- Conclusiones.

8.- Bibliografía.

## 1.- INTRODUCCION

Desde hace más de 5 000 años de antigüedad se tiene conocimiento del efecto benéfico de las leguminosas sobre la fertilidad del suelo y fue hasta el año de 1866, cuando Hellriegel descubrió la presencia de nódulos en las raíces de las leguminosas y en 1888 Beijerinck, puso de manifiesto que este efecto es debido a la bacteria del género Rhizobium la que aisló de nódulos de leguminosas. (4)

Este conocimiento determinó el inicio de las prácticas de inoculación las que consistían únicamente en transferir suelos de parcelas en las que se habían cultivado leguminosas a aquellas parcelas en las que se iban a sembrar estos cultivos con objeto de asegurar la presencia de la bacteria. Esta práctica simple fue desechada ya que simultáneamente a la introducción de la bacteria de interés, con frecuencia se introducían otros microorganismos patógenos. Por otra parte la importancia económica de esta asociación dió origen a una gran cantidad de estudios que dieron a conocer la importancia de emplear en la inoculación cepas específicas para la leguminosa a cultivar, así como de emplear cepas previamente seleccionadas con base en su eficiencia en la fijación de nitrógeno, interespecificidad, adaptación al suelo y grado de competencia con cepas existentes en el mismo.

Simultáneamente se han efectuado estudios referentes a la propagación de Rhizobium y formas más adecuadas de introducir el Rhizobium al suelo, lo que condujo a la producción de inoculantes con fines agrícolas.

Respecto a la forma de introducir los cultivos masivos de Rhizobium al suelo existen numerosas técnicas, siendo a la fecha lo más común la impregnación del cultivo de Rhizobium a un soporte sólido pulverizado y esterilizado con el que se recubren las semillas inmediatamente antes de ser sembradas.

Los soportes que se han empleado con este fin son variados y la turba es el más ampliamente usado por reunir características que permiten la multiplicación y sobrevivencia de Rhizobium por períodos largos y porque en esta presentación es fácil de manejar a nivel agrícola.

En los Estados Unidos Mexicanos para la elaboración de inoculantes se emplea turba importada, llegando en 1979 a 403 267 kilogramos, que fueron utilizados en la elaboración de diferentes productos. (38)

Como consecuencia en 1976 se inició la búsqueda de turberas en el país, las que fueron localizadas en zonas indicadas como Histosoles y las que presentaron diferentes característi--

cas. Con fines de emplear la turba como soporte de inoculantes en FERTIMEX se selecciono un yacimiento ubicado en el Estado de México el que reúne características físicas y químicas similares a las turbas de importación empleadas con este fin. Y aun cuando las características físicas y químicas son un índice de su utilidad para la producción de inoculantes, deben efectuarse estudios de crecimiento y sobrevivencia de las cepas utilizadas. En relación a este último aspecto existen reportes de que en esta turba se propagan y sobreviven adecuadamente cepas de R. phaseoli que corresponden al grupo de crecimiento rápido.

Por lo que en este trabajo se pretende contribuir al conocimiento de la turba nacional para emplearla como soporte para la producción de inoculantes, para ello se evaluará la sobrevivencia y comportamiento de dos cepas de R. japonicum que corresponden al grupo de crecimiento lento del cual no existe información.

## 2.- OBJETIVOS

En el presente estudio se evaluará el comportamiento de 2 cepas de Bradyrhizobium japonicum inoculadas en turba nacional mediante:

- Determinación del número de células viables a diferentes periodos de maduración y almacenamiento del inoculante biológico.
- Evaluación de la capacidad infectiva y efectiva de las 2 cepas empleadas, a fin de determinar si conservan sus características iniciales.
- Comparar el efecto de 2 procesos de esterilización sobre el soporte empleado y la viabilidad de los microorganismos en dicho soporte.

### 3.- GENERALIDADES DE LA PRODUCCION DE INOCULANTES

Los inoculantes son cultivos vivos y concentrados de rizobia seleccionados e impregnados a un soporte estéril.

De tal modo que el primer paso para producir inoculantes es tener cepas de Rhizobium debidamente seleccionadas.

#### 3.1 Características generales de Rhizobium.

##### 3.1.1 Morfológicas.

Las bacterias del género Rhizobium presentan las siguientes características: son bacilos de 0.5-0.9 x 1.2 - 3.0  $\mu$ , Gram negativos, no producen esporas, en estado joven son móviles desplazándose por dos a seis flagelos peritricos o por un flagelo subpolar.

En condiciones de crecimiento adversas y en cultivos viejos presentan gránulos de poli-B-hidroxitirato.

##### 3.1.2 Asociativas.

Rhizobium es una bacteria que se encuentra normalmente en el suelo donde crecen leguminosas y establece asociación con las mismas.

En esta forma la bacteria fija el nitrógeno de la atmósfera favoreciendo el desarrollo de su simbiote.

Estos organismos fijadores de nitrógeno dan lugar a los nódulos de las raíces de las plantas leguminosas, dentro de los cuales, las formas bacteroides de Rhizobium fijan el nitrógeno. Los nódulos que tienen aptitud para fijar el nitrógeno se denominan eficaces y desde la década de 1940 se sabe que la eficacia va asociada con la presencia de un pigmento rojo en los nódulos. Este pigmento, que vuelve a los nódulos ligeramente rosados y que pueden observarse con toda claridad cuando los nódulos se cortan en dos mitades, es una hemoproteína bastante parecida a la hemoglobina de la sangre de los mamíferos. Se denomina "Leghemoglobina". (7)

Su importancia fue un enigma hasta mediados de la década de 1970 cuando investigadores de Australia demostraron su función. Resulta que transporta oxígeno, exactamente igual que la hemoglobina, pero su afinidad por el oxígeno es tan fuerte que lo entrega a los rizobias a una concentración que es inocua para su nitrogenasa. De este modo la Leghemoglobina representa una especie de tampón (amortiguador) del oxígeno, impide la acumulación de concentraciones elevadas de oxígeno libre, mientras que al mismo tiempo proporciona el oxígeno necesario para el metabolismo de Rhizobium.

El nódulo de la raíz de las leguminosas es, pues un - complejo sumamente especializado en el que la fijación de nitrógeno y el consumo de oxígeno se vuelven compatibles fisiológicamente.

### 3.1.3 Taxonómicas.

En la octava edición del Manual de Bergey, 1974 - Rhizobium fue ubicado en la parte 7 como perteneciente a la familia Rhizobiaceae. Incluyendo dentro del género Rhizobium a - todas las especies capaces de establecer asociaciones mutualistas con las leguminosas.

Los estudios de taxonomía numérica y de composición de bases del ADN mostraron la conveniencia de revisar la clasificación tradicional. (13)

A nivel de especies, la taxonomía expuesta en este manual sobre el género Rhizobium se basó en el supuesto tradicional de que cada especie sólo puede inducir la formación de nódulos en su leguminosa específica (4). Como a continuación se indican:

|   |   |
|---|---|
| Rhizobium                               | Plantas noduladas   |
| <u>R. meliloti</u>                      | Alfalfa y Trébol dulce.   |
| <u>R. Trifolii</u>                      | Trébol común.   |
| <u>R. lequinosarum</u>                  | Chfcharos, Haba y Lentejas.   |
| <u>R. phaseoli</u>                      | Frijol y Habichuela.  |
| <u>R. lupinf</u>                        | Lupinos y Soya.   |
| <u>R. japonicum</u>                     | Soya.   |
| R. sp. (tipo Garbanzo)<br>no designados | Garbanzo, Cacahuete, Frijol<br>Lima, Jícama, Arveja coronada y<br>otras especies. |
| R. sp.                                  | Garbanzo, Trébol común y Arveja.  |

Los defectos de esta clasificación basada en la infectividad selectiva son notables. En primer lugar, la promiscuidad simbiótica es un hecho frecuente, hasta el punto de que sólo Rhizobium meliloti cumple estrictamente el criterio original de nodulación específica (7). En segundo lugar, porque han sido descritas hasta 14,000 especies de leguminosas, de las cuales sólo han sido estudiadas un 8 a 10 por ciento desde el punto de vista de la nodulación (7). Ello sin contar que Rhizobium puede formar asociaciones simbióticas con no leguminosas (7). Por lo que en la novena edición del Manual de Bergey, 1984 la clasificación de esta bacteria simbiótica fijadora de nitrógeno fue modificada notablemente, quedando separada en dos géneros -

con base en los criterios que a continuación se describen:

| CRITERIOS   | GENEROS          |                       |
|---|------------------|-----------------------|
|   | <u>Rhizobium</u> | <u>Bradyrhizobium</u> |
| 1 Capacidad de inducir la formación de nódulos en leguminosas independientemente de que fijen o no nitrógeno. | +                | +                     |
| 2 Infección de leguminosas  |                  |                       |
| a) de zonas templadas   | +                | -                     |
| b) de zonas tropicales  | -                | +                     |
| 3 Crecimiento en medio de Extracto de Levadura Manitol Agar.  |                  |                       |
| a) Rápido   | +                | -                     |
| b) Lento  | -                | +                     |
| 4 En medio de Manitol y sales minerales producen  |                  |                       |
| a) acidez   | +                | -                     |
| b) alcalinidad  | -                | +                     |
| 5 Porcentaje de G + C en el ADN   | 59 - 64 (Tm)     | 61 - 65 (Tm)          |

Del género Bradyrhizobium unicamente se describe a la especie japonicum y se propone establecer otras especies hasta-

reunir más evidencias que permitan ubicarlas de manera adecuada. Como quiera uno de los criterios que se sigue empleando es el de la característica de crecimiento rápido y lento.

El grupo de crecimiento rápido produce enturbiamiento en medio líquido y colonias visibles en medio sólido en un período de 3 a 5 días de incubación a 28°C. En tanto que el grupo de crecimiento lento requiere de 8 a 10 días para producir desarrollo visible, tanto en medio líquido como sólido.

Esta división tampoco es absoluta, debido a que se presentan variaciones en el desarrollo por adición, eliminación o sustitución en el medio de cultivo, de fuentes de carbono, nitrógeno o extractos orgánicos.

#### 3.1.4 Importancia.

La explotación agrícola de cepas de Rhizobium seleccionadas que son altamente efectivas en la fijación de nitrógeno depende de la disponibilidad de una tecnología de inoculación, en la cual la cepa se cultiva en forma masiva, se incorpora en un material que sirve como soporte en el que sobrevivirá durante su distribución y estancia en el mercado, y es entonces cuando se introduce al suelo en cantidades adecuadas para que nodulen las leguminosas sembradas. (35) (36)

La esencia de la inoculación de leguminosas es el empleo de una gran población de cepas de Rhizobium altamente efectivas en la fijación de nitrógeno que son compatibles con la variedad de leguminosa hospedera para favorecer el establecimiento de una estrecha relación que se inicia con la infección de la bacteria durante la emergencia de la radícula y asegurar de esta manera que la mayoría de los nódulos que se forman, contengan el Rhizobium introducido (15). Es importante evaluar la necesidad de inocular una leguminosa, en particular en un sitio específico. En ocasiones una población adecuada de cepas nativas asegurará la buena nodulación sin necesidad de inocular.

Alternativamente, una cepa de un inoculante no puede sobrevivir en número adecuado o ser suficientemente competitiva entre la microflora nativa para formar nódulos, y ningún beneficio económico en el rendimiento resulta de la inversión en la inoculación.

Las bacterias introducidas al suelo con la semilla, debido a su estratégica situación, están capacitadas para competir ventajosamente con cualquier cepa nativa por los sitios de infección en la raíz de la leguminosa huésped, como consecuencia de la concentración del inoculante en las proximidades de los sitios potenciales de infección, que contrasta con la más amplia y uniforme distribución de la población nativa en el terreno. (15)

Por lo tanto, la competencia ventajosa de las cepas - efectivas introducidas, sobre la población natural, es sin duda, uno de los objetivos más importantes de la inoculación artificial de las semillas leguminosas.

Por otra parte, se sabe que la mayoría de las cepas rhizobianas nativas no son capaces de producir la nodulación rápidamente. De tal modo que mediante la inoculación se asegura la infección temprana, pronta formación del nódulo y el inicio temprano de la fijación del nitrógeno que son los objetivos prácticos e importantes en el establecimiento de este tipo de simbiosis ya que si la leguminosa debe esperar a ser infectada por las bacterias del suelo, no adquiere el vigor que posee una planta inoculada artificialmente.

Cuando en el suelo hay una población abundante en cepas con baja capacidad competitiva y que efectúan la infección tardíamente la nodulación por las cepas introducidas se facilita enormemente, ya que permite el desarrollo (en número y persistencia) de las cepas del inoculante en el suelo.

El principal objetivo de la inoculación de las leguminosas es la de proporcionar suficiente Rhizobium para que sea efectiva la nodulación del huésped. El número de células que se necesitan para lograr este objetivo, depende de varios facto

res tales como: Forma y edad de los inoculantes, cepas utilizadas, método de aplicación, tipo y tamaño de la semilla, clima, temperatura, humedad, tipo de suelo, preparación del terreno y posiblemente otros más. (35) (15)

Existen diferentes métodos para la producción de inoculantes para leguminosas.

### 3.1.5 Selección de cepas.

Aun cuando el Rhizobium se encuentra en forma natural en el suelo, existen cepas que son más eficientes en el proceso de reducción de nitrógeno por lo que con el fin de optimizar el efecto de esta asociación se emplean inoculantes con cepas seleccionadas con base en su eficiencia en la fijación de nitrógeno, capacidad competitiva con otros rizobia y el comportamiento de éstas bacterias en los soportes durante las diferentes etapas de la producción y manejo de inoculante, así como su comportamiento de adaptación al suelo.

La selección de las cepas de rizobia se basa en las siguientes cualidades:

- Formación de nódulos con capacidad de fijación y suministro adecuado de  $N_2$ .
- Amplio espectro, es decir que sean efectivas frente a -  
diversas variedades y aun especies vegetales.
- Competitividad con rizobia nativos.
- Capacidad de nodular en un intervalo amplio de temperatura.  
q
- Habilidad para crecer en medios de cultivo, en el soporte y en el suelo al ser inoculadas.
- Habilidad para sobrevivir a cambios de estación en el -  
suelo. (4)

La habilidad del Rhizobium para nodular y fijar nitrógeno son dos funciones separadas y distintas, y aunque la nodulación es un prerrequisito para la fijación del nitrógeno, la formación del nódulo no asegura la efectividad, esto se debe a que la infectividad y la efectividad son propiedades de la simbiosis en sí misma, y si se cambia uno de sus miembros, estas propiedades pueden resultar alteradas, ya que una asociación efectiva entre una cepa particular de Rhizobium y una variedad espe

cífica de leguminosa representa un delicado balance entre la -  
constitución genética de los dos tipos de organismos. (12)

La capacidad fijadora de nitrógeno por Rhizobium en aso  
ciación con leguminosas es frecuentemente afectada por mal manejo  
en su conservación y propagación.

### 3.2 Colección.

Para la conservación de cepas de Rhizobium, Vincent -  
(1971) recomienda la liofilización para asegurar una conserva--  
ción genéticamente estable, y porque en esta forma el cultivo-  
es fácilmente almacenado. Otros métodos de conservación comun-  
mente empleados son:

- Cultivos en agar inclinado.
- Cultivos en medios con agar cubiertos con parafina o va  
selina estéril.
- Cultivos desecados (método de las perlas de porcelana y  
suelo desecado).
- Congelamiento.

### 3.3 Medios de cultivo y propagación.

Existe una literatura muy extensa acerca de los requerimientos nutricionales de Rhizobium y se sabe que este microorganismo utiliza monosacáridos, disacáridos y trisacáridos, alcoholes, ácidos y se sabe que las especies difieren en sus necesidades y capacidad para utilizar las fuentes de carbono y que esta capacidad es influenciada por el medio basal, potencial de óxido-reducción, tamaño del inóculo, método de cultivo y posiblemente otros factores. Si bien estos microorganismos no son demasiado exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales, los medios de producción deben satisfacer todas sus necesidades para lograr altos rendimientos celulares.

Entre las fuentes de carbono más utilizadas se mencionan sacarosa, manitol, glicerol, lactosa, etc., y para algunos casos particulares se indica el uso de pentosas.

En cuanto a la fuente de nitrógeno, factores de desarrollo y vitaminas, casi se usa exclusivamente extracto o autolizado de levadura el que es una fuente excelente de aminoácidos, factores de crecimiento, vitaminas y trazas de elementos indispensables para el crecimiento celular. Entre las sales minerales se adicionan a los medios fosfatos monopotásico y dipotásico, cloruro de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de hie

rro, sulfato de manganeso y cloruro de calcio.

Algunos autores recomiendan fuentes suplementarias de - nitrógeno tales como nitratos y sales de amonio.

En todo proceso fermentativo no es posible dar un medio tipo ya que el éxito del mismo depende de la interacción-medio-de cultivo, por lo que es necesario realizar una elección cuidada para cada microorganismo particular, teniendo en cuenta la influencia de otras variables como: cantidad y calidad del - inóculo, propiedades físico-químicas del medio y condiciones - operativas. En la tabla 3 se exponen algunos de los medios de cultivo empleados para la propagación de Rhizobium con fines in- dustriales.

En este caso particular es de gran importancia conside- rar en la formulación del medio de cultivo los siguientes aspec- tos:

- Que los rizobia desarrollados retengan su capacidad fija- dora de nitrógeno.
- Que los rizobia alcancen cuentas de células viables ele- vadas. Esto es deseable en el caldo de propagación así- como en el vehículo o soporte empleados para inocular 7 semillas o suelo.

Tabla 3.- Medios de cultivo recomendados para la propagación de Rhizobium. (4)

| Ingredientes<br>g/lit                                | Wright*<br>(1925) | Bond<br>(1940) | Van Schreven<br>(1953) | Burton<br>(1967) | Date<br>(1976) |
|--|-------------------|----------------|------------------------|------------------|----------------|
| Sacarosa   | ----              | 10.0           | 15.0                   | 10.0             | ----           |
| Manitol  | 10.0              | ----           | ----                   | 2.0              | 10.0           |
| K <sub>3</sub> P <sub>0</sub> 4                      | ----              | ----           | ----                   | 0.1              | ----           |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                      | 0.5               | 9.6            | 0.5                    | ----             | 0.5            |
| KH <sub>2</sub> P <sub>0</sub> 4                     | ----              | ----           | ----                   | 0.37             | ----           |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 0.2               | 0.2            | 0.2                    | 0.18             | 0.8            |
| NaCl   | 0.1               | 0.1            | ----                   | 0.06             | 0.2            |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     | ----              | ----           | ----                   | 0.10             | ----           |
| CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O                 | ----              | ----           | ----                   | 0.04             | ----           |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O | ----              | ----           | ----                   | ----             | ----           |
| CaCO <sub>3</sub>                                    | 3.0               | 1.0            | 2.0                    | 0.25             | ----           |
| Glutamato de calcio                                  | ----              | 1.5            | ----                   | ----             | ----           |
| FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O                 | ----              | ----           | ----                   | ----             | 0.1            |
| Agua de levadura(ml)                                 | 100.0             | 50.0           | 100.0                  | ----             | 100.0          |
| Autolizado de levadura                               | ----              | ----           | ----                   | 1.0              | ----           |
| Agua (ml)  | 900.0             | 950.0          | 900.0                  | 1000.0           | 900.0          |

(\* ) Comunmente denominado Fred y Waksman medio 79.

### Otros factores.

Necesidades de oxígeno. Rhizobium es un microorganismo aerobio obligado, existen autores que indican que estos microorganismos crecen en medios con tensiones de oxígeno tan bajas - como 0.01 atm.(4). Sin embargo es necesario tener en cuenta - que las necesidades de oxígeno pueden ser influenciados por la - composición del medio de cultivo, la concentración celular y - por la presencia de polisacáridos extracelulares los que modifi - can sensiblemente los valores de viscosidad. Burton menciona - que una presión de 0.15 atmósferas es óptima para la respira - ción o suministro de 1 litro de aire/min. por cada 20 litros de medio.

El intervalo de temperatura óptimas es de 28 a 30°C, - con excepción de R.meliloti que desarrolla a 35°C!

El tamaño del inóculo es de 0.1, 1.0, 5.0 y 10.0 por - ciento. Con un buen medio, una aereación y temperatura adecua - das y 1.0 por ciento de inóculo inicial se obtienen poblaciones - de 4 o 5 X 10<sup>9</sup> después de 96 horas y este tiempo puede ser redu - cido aumentando la cantidad de inóculo.

Las variaciones de pH en el medio son mínimas aún con - las cepas productoras de ácido. Un cambio drástico en el pH -

del medio normalmente indica contaminación y es necesario recordar que un buen inoculante debe estar libre de contaminantes.

### 3.4 Soportes.

Con los caldos obtenidos una vez completado el proceso fermentativo generalmente se impregnan materiales en estado de polvo fino denominados soportes. (1)

El uso de dichos soportes ha permitido resolver en forma simple el problema de distribución y fundamentalmente aumentar el tiempo de sobrevivencia de estos microorganismos (Date - 1970). (25)

Las cualidades que debe reunir un buen soporte son las siguientes: (4)

- No tóxicos para las especies de Rhizobium.
- Buena absorción.
- Fácil pulverización.
- Fácil esterilización.
- Buena adhesión a las semillas.
- Disponibilidad a bajo costo.

Entre los soportes que se emplean para la fabricación de inoculantes se tienen: turba, diferentes tipos de suelos (suelos altamente orgánicos o enriquecidos con harina de alfalfa, paja molida, levadura y sacarosa), carbón vegetal, algunas variedades de carbón mineral como la antracita y la lignita suplementados con bentonita, vermiculita, harina de maíz, sacarosa y extracto de levadura.

Otros materiales empleados son el aserrín descompuesto, vermiculita, perlita, composta de cáscara de arroz, roca fosfórica molida, compostas de cáscaras de café, de mazorcas de maíz y de bagazo de caña de azúcar. Muchos de estos soportes requieren el enriquecimiento con harina de alfalfa, harina de maíz, bentonita, sacarosa y extracto de levadura. (16) (27)

Aun cuando muchos de estos materiales han demostrado soportar satisfactoriamente el crecimiento de rizobia, actualmente el más empleado es la turba. (36)

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

El acumulamiento de plantas del género Sphagnum, es probablemente su forma más común y está compuesta por más de 300 - especies de plantas del orden de los Sphagnales, comprendiendo la familia Sphagnaceae. Este tipo de plantas se forma en diversos tipos de 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 y 5.5. Estos valores son variables y - las diferencias se atribuyen al distinto origen botánico, la - edad de la turba, a la capacidad de retención de agua y a la microfiora presente. (27)

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. (32)

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

Las características físicas y químicas de la turba, pueden ser una indicación de su adaptabilidad a la producción de inoculantes, pero la selección última deberá basarse en los estudios de crecimiento y sobrevivencia de las razas utilizadas como fue demostrado por Roughley y Vincent (1967). (31)

Actualmente la turba que se utiliza en México para la elaboración de inoculantes es importada de Estados Unidos, llegando en 1979 a 403 267 kilogramos, que fueron utilizados en la elaboración en diferentes productos (38). Como consecuencia de la dificultad que se presenta para importar la turba se procedió a buscar turberas en el país, que al mismo tiempo que se pudieran utilizar con este fin, fueran capaces de proveer grandes cantidades de este material.

Tomando en consideración los estudios de suelos efectuados en diferentes zonas del país por A. Flores Díaz. se realizó un muestreo de las zonas indicadas como Histosoles (39)

Varias muestras de material se desecharon debido a su elevada concentración de sales, continuandose el estudio solo con el proveniente de un yacimiento que muestra un potencial de 4 400 000 toneladas de turba. (39)

En la elaboración y desarrollo de este trabajo, el soporte, en este caso la turba, cubre una parte importante en la fabricación del inoculante ya que la calidad del primero determina la sobrevivencia de las bacterias durante el almacenamiento.

En la producción de inoculantes se emplea turba importada, la que presenta características físicas y químicas adecuadas para la preservación de los microorganismos de interés. Sin embargo es importante mencionar que existen turberas nacionales y que el empleo de éstas producirá erogaciones de importaciones, pero para ser empleada como vehículo de inoculantes es necesario evaluar el comportamiento de la misma frente al comportamiento de numerosas cepas de Rhizobium.

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

- Elevada retención de agua.
- Alto contenido de materia orgánica
- y pH neutro.

### 3.5 Otros soportes.

En la búsqueda de otras alternativas que permitan sustituir a la turba como soporte en la producción de inoculantes se ha investigado la adaptación y sobrevivencia de Rhizobium en diversos portadores como carbón, bentonita, harina de alfalfa y - sucrosa (Strijdom & Deschodt, 1975) (10), demostrando ser satisfactorios durante un período de 6 meses, filtrados apelmazados - que se obtienen al procesar la caña de azúcar que mantienen poblaciones de rizobia superiores a  $1 \times 10^9$  por gramo de inoculante durante 5 meses (24) (25), abonos procedentes del reciclamiento de desechos orgánicos (SIRDO) que mantienen poblaciones elevadas de células viables ( $10^8$ ) durante 3 meses (20), cascari llas de algodón, arroz y ajonjolí en comparación con carbón mineral y turba resultaron satisfactorios durante 3 meses y medio donde mantuvieron poblaciones de rizobia arriba de  $10^6$  (22), paja de trigo (34), lirio acuático y compostas de lirio acuático - (28), también se han estudiado con estos fines y demostrando - ser soportes buenos y recomendables durante un período de 3 meses. Así como éstos, hay otros soportes estudiados con resultados satisfactorios la mayoría de las veces (27). Son alternativas que pueden sustituir a la turba debido a que poseen las características adecuadas para mantener poblaciones elevadas - de células viables y conservar además la capacidad de infección y fijación de nitrógeno de los microorganismos.

Numerosos intentos han sido realizados con la finalidad de sustituir a la turba, pero se ha demostrado que es el mejor soporte y el más ampliamente usado en la producción de inoculantes. (10)

### 3.6 Manufactura de inoculantes.

La producción de inoculantes puede ser dividida en cinco partes:

- Una de ellas es la recolección y preparación de los soportes. Disponer de un buen soporte que permita su impregnación a altos valores de humedad para asegurar una alta concentración inicial de microorganismos y del equipo adecuado para las operaciones de molienda, mezclado, tamizado, etc.. La naturaleza del soporte y su tratamiento previo afectan la calidad del inoculante (31). El soporte antes de ser impregnado con el caldo de fermentación debe ser secado y molido (malla tamiz-150-200), el secado, además, de favorecer la operación posterior de molienda, permite la incorporación de mayor cantidad de caldo de cultivo y reduce la microflora nativa del mismo (1). La operación de secado debe efectuarse fijando cuidadosamente las variables temperatura y tiempo, ya que los soportes con muy baja tensión de -

humedad pueden provocar mortandad de gran número de bacterias durante la impregnación con los caldos debido al calor liberado durante la inoculación. Además, si la temperatura de secado es demasiado elevada pueden formarse compuestos inhibitorios que impiden o retardan la posterior multiplicación de las bacterias. Por lo tanto, se recomienda efectuar el secado a temperatura no mayor de 100°C y reducir la humedad hasta aproximadamente un 9 por ciento. El soporte una vez impregnado con los caldos llega a un valor de humedad que puede estar comprendido entre el 50 y 60 por ciento, dependiendo del tipo de soporte y tipo de esterilización del mismo. Los inoculantes con un 30 por ciento de humedad son muy secos y no son adecuados como fue demostrado por trabajos realizados en Australia. (19)

Los soportes antes de ser impregnados pueden ser esterilizados con vapor o con radiaciones gamma, de los dos métodos el más aconsejable y económico cuando es posible hacerlo es el que utiliza radiaciones. Una dosis de  $5 \times 10^6$  rads. es suficiente para obtener una buena esterilización. Es importante esterilizar el soporte antes de ser empleado en la producción de inoculantes para elevar la calidad de éstos, sobre todo porque los rizobias sobreviven más y mejor cuando el soporte esta -

libre de contaminantes. (11)

Aunque se pueden producir inoculantes de elevada calidad empleando soportes no esteriles (Burton, 1967) cuando se utilizan rizobia de crecimiento rápido, porque presentan buenos desarrollos y sobreviven adecuadamente (Roughley & Vincent, 1967; Vincent, 1968) es evidente que cuando los soportes son esterilizados muestran un comportamiento superior, sobre todo para las cepas de Rhizobium de crecimiento lento. (11)

El calor es el más comunmente usado para esterilizar la turba (e.g. Newbould, 1951; Van Schreven, 1958, 1963 1970), aunque es menos favorable para rizobia, que la turba esterilizada con radiaciones gamma a una dosis de  $5 \times 10^6$  rads. (Roughley & Vincent, 1967). (11)

- La segunda es el crecimiento del inóculo en un medio de cultivo líquido. La obtención de caldos con Rhizobium de alta concentración celular, superior a  $1 \times 10^9$  cel/ml. Para efectuar esta etapa se debe contar con cepas previamente seleccionadas para la leguminosa a ser inoculada, que presenten un alto poder de invasividad 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 proceso.

- La tercera comprende la mezcla del cultivo líquido con el soporte, luego de impregnado el soporte se procede a desintegrar los grumos que se forman durante el tratamiento con los caldos y se deja madurar de 2 a 3 días a temperatura ambiente. Esta etapa tiene por objeto permitir el escape de gases producidos durante la fermentación que tiene lugar en el soporte debido a la presencia de Rhizobium y además favorecer el incremento de células rizobiales.
  
- En la cuarta fase debe considerarse que el material de empaque permita el intercambio de oxígeno, pero impida el paso del agua, la literatura en este aspecto es confusa probablemente porque los rizobia tienen una pequeña, pero definitiva demanda de intercambio gaseoso a través del material de empaque. (30)

El polietileno es casi exclusivamente usado para este fin ya que permite el intercambio gaseoso con el ambiente.

te e impide la evaporación de agua. Es aconsejable utilizar un recipiente de un espesor de 20-25 *H*.

- Quinta parte referente al control de los inoculantes. - Disponer de técnicas e instalaciones para efectuar los controles durante el proceso y asegurar la calidad del producto antes de ser destinado a la venta. (1) (2)

A nivel industrial en el proceso de fermentación existe una etapa de desarrollo del inóculo inicial, que se hace en máquinas rotatorias y otra etapa inicial que es la preparación del medio de cultivo para el medio inóculo y el medio de fermentación. La secuencia de etapas en el proceso son las siguientes:

- A. Desarrollo de un inóculo en una máquina agitadora.
- B. Esterilización del tanque de inoculación.
- C. Preparación del medio de cultivo para el tanque de inoculación.
- D. Transferencia de los cultivos obtenidos en máquinas rotatorias al tanque de inoculación.
- E. Fermentación en el tanque de inoculación.

F. Esterilización del tanque industrial.

G. Preparación del medio de cultivo en el tanque de fermentación.

H. Siembra del tanque industrial con el desarrollo del tanque inóculo a una proporción del 5 por ciento de su volumen.

Al final del proceso la suspensión obtenida en el tanque industrial será destinada a la impregnación del soporte. (1)

### 3.7 Control de calidad.

El control de calidad de los inoculantes de Rhizobium es efectuada solamente en muy pocos centros de investigación, variando los estándares y métodos de prueba. (4)

Por ejemplo en Australia, la organización central (AIRCS, Australiant, Inoculant Research and Control Service) a través del personal del departamento de agricultura que es quien se encarga de asegurar la calidad de los inoculantes mediante lo siguiente:

A. Examen y selección de las cepas de Rhizobium.

La buena calidad de los cultivos son el producto de un programa integrado de selección de cepas, propagación de un número elevado de rizobia, libres de contaminación y la vigilancia en la distribución del inoculante con la finalidad de evitar elevados cambios de temperatura en su almacenaje. Solamente se emplean cepas recomendadas por la AIRCS. (29)

B. Mantenimiento y salida de los cultivos tipo de las cepas seleccionadas.

C. Control de calidad del cultivo antes de que sea mezclado con la turba, y

D. Calidad del inoculante almacenado, así como de los inoculantes distribuidos mediante la cuantificación del número de rizobia viables por gramo de producto, considerando como satisfactorio un mínimo de  $10^8$  rizobia viables por gramo, anteriormente se había establecido como estándar  $10^6$  rizobia por gramo. (4)

Las pruebas que se realizan son:

A. Al cultivo.

1. Pruebas cualitativas.

- (a) pH. Abajo de 6 y arriba de 8, generalmente indica contaminación.
- (b) Aglutinación con antisueros específicos.
- (c) Ausencia de desarrollo sobre Glucosa Peptona Agar. Un apreciable desarrollo indica contaminación, el cual está frecuentemente asociado a un cambio de pH.
- (d) Frotis y tinción de Gram.
- (e) Cultivo sobre Levadura Manitol Agar.

2. Pruebas cuantativas.

- (a) Cuenta total de células (en cámara de Petroff Haussser).
- (b) Cuenta de células viables en placa.
- (c) Aceptación o rechazo del cultivo.  
Se aceptan cultivos con un mínimo de  $500 \times 10^6$  rizo-  
bia viables por mililitro y que estén libres de con-  
taminantes.

## B. Al inoculante.

Se le determina el número de células viables por cuenta en placa e infección en planta según método descrito - por Date y Vincent, (1962). (8)

En contraste con Australia, donde hay un centro responsable de la calidad de los inoculantes, en Estados Unidos, los productores de inoculantes son los propios responsables de seleccionar las cepas de rizobia y de montar o establecer sus propios estándares de manufactura. No hay una reglamentación exacta para la calidad de los inoculantes. Cada estado tiene sus propias normas de control de calidad, siendo necesario especificar la viabilidad de los rizobia en los inoculantes almacenados.

En Australia los inoculantes tienen 6 meses como límite para su caducidad después de su preparación, en comparación con los 12 meses que se establecen en los Estados Unidos. (8)

### 3.8 Tipos de inoculantes.

Las principales formas en que se presentan comercialmente los inoculantes son: (6)

- Cultivos sobre Agar:

Es un cultivo desarrollado sobre una superficie de agar, dentro de un envase de vidrio, esta técnica se usa para la producción en pequeña escala.

Ventajas:

- La manufactura del producto es muy sencilla.
- El crecimiento es visible y muchos contaminantes se pueden detectar por inspección visual.

Desventajas:

- La cantidad de rizobia por unidad de volumen es baja en comparación con otros tipos de inoculantes.
  - El inoculante tiene una vida media relativamente corta.
  - El envase puede romperse fácilmente.
  - La sobrevivencia del inoculante sobre las semillas es inferior con respecto al que usa turba como soporte.
  - Presenta dificultades en su aplicación, debido a la formación de cantidades considerables de gomas.
- Cultivos en caldo:

El crecimiento de Rhizobium en un medio líquido es una práctica normal de laboratorio; para ser usado en la producción comercial de inoculantes solamente se requiere un cambio de escala.

#### Ventajas:

- El producto es de fácil aplicación a las semillas. - Para los propósitos especiales, las células pueden ser concentradas por centrifugación, minimizando los costos de transporte.

No es necesario humedecer las semillas para aplicar el producto, con lo cual se ahorran hasta 5 ó 6 kilogramos de semilla por hectárea, que de otro modo se pierde por pudrición.

El caldo lubrica a la sembradora impidiendo además que se tape, como ocurre cuando se usan los inoculantes a base de polvos.

#### Desventajas:

- Como inóculo para las semillas, la sobrevivencia de las bacterias es semejante a la de la preparación sobre agar, e inferior a aquellos que usan turba como -

soporte.

- Es necesario un envase desechable y económico.
- La sobrevivencia durante el transporte y el almacenaje puede requerir refrigeración.
- Tiempo de almacenaje es corto.
- Cultivos liofilizados:

El proceso de liofilización es ampliamente usado en la preparación de productos medicinales, alimenticios y bacterianos; se ha aplicado con buenos resultados a la preparación de cultivos de Rhizobium en los Estados Unidos y Australia.

Ventajas:

- Pequeños volúmenes con altas concentraciones de células.
- Una prolongada vida media, especialmente en temperaturas elevadas.
- Nula oportunidad para el crecimiento de contaminantes.

## Desventajas:

- Se requiere de equipo de precio elevado.
- Pobre sobrevivencia sobre la semilla.
- Inoculantes con polvos como soporte:

La mayoría de los inoculantes para leguminosas utilizan polvos orgánicos como material de soporte. Aunque se han probado muchos soportes alternos, la turba, es el producto más adecuado para la formulación de inoculantes utilizados actualmente.

## Ventajas:

- Mayor sobrevivencia de los rizobias sobre la semilla.
- Vida media del producto comparativamente larga.

## Desventajas:

- Problema de dispersión o distribución sobre la semilla.
- En ocasiones tapan las sembradoras.
- Pérdida de semilla por pudrición. (6)

Aunque en los últimos años han ocurrido avances de importancia en la aplicación (sistemas de entrega) de inoculantes de leguminosas, se pueden diferenciar dos sistemas básicos.

1. Sistema indirecto de aplicación (al suelo).
2. Sistema directo de aplicación (a la semilla).

El sistema indirecto incluye dos tipos: granular y líquido. La Compañía Nitragin desarrollo el sistema granular a principios de la década del setenta como modo de dosificar cantidades masivas de bacterias por medio de equipos aplicadores de insecticidas en la siembra, sobre soya, cacahuete y chícharo. Los sistemas líquidos han existido por muchos años, pero presentan ciertos problemas como métodos aceptables de inoculación.

Los sistemas de aplicación a la semilla incluye dos tipos: a) Previo a la siembra, b) Pre inoculación.

El primer sistema citado no es más que el procedimiento convencionalmente conocido de mezclar la semilla y el inoculante.

La preinoculación de semillas consiste en inocular las semillas antes de venderlas al agricultor. Este sistema se usa frecuentemente con leguminosas de semillas pequeñas como la alfalfa. (21)

#### 4. ANTECEDENTES Y SITUACION ACTUAL EN MEXICO DE LA PRODUCCION DE INOCULANTES

La industria de los inoculantes para leguminosas tuvo su origen a principios del año de 1900, y fue hasta despues del año 1925 que se prestó mayor atención a la importancia de estos productos en el desarrollo de la agricultura.

Actualmente el desarrollo de la industria de producción de inoculantes ha adquirido una gran importancia como consecuencia del aumento de las áreas sembradas con leguminosas, ya sea como forraje o como alimento para humanos.

Los inoculantes son producidos en Estados Unidos, Australia, India, la mayoría de los países Europeos y en America Latina en Argentina, Uruguay, Brasil y México, países en los que se producen mediante diferentes métodos y se distribuyen con diferentes presentaciones. (1)

En México, los primeros estudios de que se tienen referencia sobre la relación Rhizobium-leguminosas fueron efectuados en los años cuarenta por Casas Campillo y Sánchez Marroquín, entre otros. En 1950 el mismo Casas Campillo inició la producción de inoculantes en la Comisión Nacional del Maíz, donde se buscaba introducir el cultivo de la soya en México; estos estu-

dios duraron tres años y luego fueron suspendidos. (38)

En 1953 se fundó AGROLAB, S.A. que produjo durante cinco años inoculantes para soya, chícharo, haba, frijol, alfalfa, lenteja y veza con cepas nativas de rizobia y turba nacional, - el producto fue registrado con el nombre comercial de "Rhizobin".

En 1955 los laboratorios FLORA-MICROBIANA, S.A. comenzaron a producir otro inoculante llamado Nitrobacter, producto - que desapareció en 1960.

En esta época se empezó a importar inoculantes de la - empresa NITRAGIN, S.A. la que se estableció en México en 1963 - en Guadalajara, Jal.

En 1967 Anderson Clayton empezó a producir el inoculante PAGADOR, para soya, frijol, alfalfa y trébol, empleando turba importada de Estados Unidos y cepas nativas e introducidas - (38). Este producto desapareció en 1976.

En 1981 la SRA a través de la Comisión Técnica para el programa de empleo rural en Matehuala, S.L.P. inició la producción de inoculantes con cepas nativas para las siguientes leguminosas: Acacia, Leucaena y Prosopis, estos productos eran distribuidos en forma gratuita. (33)

En Tezoyuca, Mor. FIRA en 1977 inició también la producción de inoculantes para Soya, Siratro, Leucaena y Centrosema. - Estos productos también fueron distribuidos en forma gratuita. - (23)

Los actuales productores de inoculantes en México son los siguientes:

A.- NITRAGIN, S.A. de C.V. que inició sus actividades en 1963 en Guadalajara, Jal. el esquema de producción que emplean es el siguiente: (14)

Cepas. Son seleccionadas a través de experimentos a nivel de invernadero y campo.

Soporte. Emplean turba importada de Estados Unidos, la cual es esterilizada. Tamaño de partícula de 200 mallas.

Propagación. Utilizan fermentadores con capacidad de 3,500 litros.

Mezcla. Se efectúa en forma automática.

Envase. El proceso es manual y emplean bolsas de polietileno.

Control de Calidad. Las pruebas que efectúan en el caldo del cultivo son el número de células por mililitro, - detección microscópica de contaminantes y determinación del pH. Y en el producto terminado el NMP, el - cual no debe ser menor de  $100 \times 10^6$  cels/g. y contenido de humedad.

B.- INDIAPAC SHAMROCK DE MEXICO, S.A. de C.V.

Esta empresa produce el Dianitro-Fix a partir de 1975, - el que es producido en Guadalajara, Jal. produce para - frijol, soya, alfalfa y garbanzo en la presentación de bolsas de plástico de 25 kg. con un costo de \$ 660.00/ Kg. (3)

C.- QUIMICA LUCAVA, S.A. de C.V. inició su producción en - 1971, elaborando inoculantes para alfalfa, soya, caca-- huate, chfcharo, haba y garbanzo.

Esquema de producción:

|              | 1971-1977  | 1983-1985 |
|--------------|--|-----------|
| <u>Cepas</u> | Originarias de Bél<br>gica a partir de -<br>1973 emplean cepas<br>indígenas. |           |

|                       | 1971-1977  | 1983-1985  |
|-----------------------|--|--|
| <u>Soporte</u>        | Mezcla de harina de alfalfa, paja de cebada, carbonato de calcio y una arcilla pesada. | Turba importada de Estados Unidos.               |
| <u>Esterilización</u> | Autoclave.   | Autoclave.                                       |
| <u>Propagación</u>    | En frascos de vidrio con agitación manual.   | Fermentadores de 1,800 litros de capacidad.      |
| <u>Mezcla</u>         | Manual.  | Mecánica.  |
| <u>Empaque</u>        | Manual en botellas de plástico.  | Semiautomático en bolsas de polietileno de 1-kg. |

La distribución la efectúan a través de compañías distribuidoras de productos agroquímicos.

Los inoculantes que produjeron en años recientes son específicos para soya y los volúmenes de producción corresponden a 5.5 toneladas en 1983, 55 toneladas en 1984 y tienen programada para 1985 una producción de 100 a 120 toneladas y para 1986, 200 toneladas.

Su producción es distribuida en Sonora y Sinaloa en -  
proporciones de 60 y 40 por ciento respectivamente. (5)

El costo por kilogramo fue en 1984 de \$ 480.00.

#### D.- FERTILIZANTES MEXICANOS, S.A.

En 1975 esta empresa estableció el programa de inoculan  
tes para leguminosas con el objeto de sustituir parcial-  
mente la utilización de fertilizantes químicos.

El trabajo se ha enfocado en su mayor parte al frijol, -  
usando turbas nacionales, en 1979 se comenzó a trabajar  
con R. japonicum, ampliando continuamente la producción  
de inoculantes.

Actualmente Fertimex está planeando la construcción de-  
una planta productora de inoculantes con capacidad ini-  
cial de 5,000 toneladas por año y se calcula esté ope--  
rando para 1986, en donde el 80 por ciento de la produc-  
ción será para frijol. (38)

El esquema de producción que emplean es el siguiente:

Cepas. Cepas de colección las que han sido aisladas lo-  
calmente y otras proceden de colecciones internaciona-  
les. Estas han sido sometidas a un proceso de selec- -

ción, trabajos que se iniciaron en 1976 y de evaluación a nivel de campo en los estados de Sonora, Sinaloa, Tamaulipas, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Puebla, Hidalgo, Chiapas, Oaxaca, México y San Luis Potosí.

Soporte. Emplean turba nacional esterilizada con un tamaño de partícula de 200 mallas.

Propagación. No utilizan fermentadores, solo recipientes para producir en pequeña escala.

Mezcla. Es automática.

Envase. El proceso es manual.

Presentación. Bolsas de polietileno de 500 gramos.

Control de Calidad. Lo efectúan en el producto terminado y después de su empleo al lugar donde fue destinado el inoculante. Determinando para los dos casos el NMP de Rhizobium y contenido de humedad. (37)

En 1984 se produjo el inoculante necesario para 1,683 hectáreas de cultivo distribuyéndose de la siguiente manera:

| ESTADOS        | LEGUMINOSAS       |
|----------------|-------------------|
| Chihuahua      | frijol            |
| Durango        | frijol            |
| Edo. de México | chfcharo y trébol |
| Jalisco        | frijol            |
| L. Laguna      | frijol y alfalfa  |
| Michoacán      | soya              |
| Nayarit        | frijol            |
| Puebla         | soya y garbanzo   |
| Sinaloa        | soya              |
| Sonora         | frijol y soya     |
| Tamaulipas     | frijol y soya     |
| Veracruz       | frijol            |
| Zacatecas      | frijol            |

Otros productos de inoculantes. Diferentes instituciones de enseñanza e investigación tales como el Colegio de Postgraduados de Chapingo, el Colegio Superior de Agricultura Tropical en Cárdenas, Tab. (de reciente desaparición), la Universidad Nacional Autónoma de México, el Centro Regional de Ciencias Biológicas y el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados, etc. elaboran los inoculantes que emplean en sus trabajos de invernadero y campo. (38)

Con relación al control de inoculantes, existen normas básicas que rigen igualmente en todos los países como son: la habilidad para competir de la bacteria que se encuentra en el inoculante, una población que garantice la sobrevivencia de la bacteria en el tiempo de adaptación al suelo, que el soporte esté libre de microorganismos antagónicos a Rhizobium y que el inoculante sea de fácil manejo.

Cada país tiene sus propias normas de control de calidad, en la tabla 1 se exponen algunas de interés.

En México no hay normas legales para este tipo de productos. La expedición de licencia por parte de las autoridades solo exige que cumplan las especificaciones que dan los mismos fabricantes. La licencia se renueva cada dos años. (9)

En la tabla 2 se exponen algunas características de los inoculantes producidos en México.

Tabla 1. Normas para el Control de Calidad en diferentes Países. (26)

| País           | Standar   |
|----------------|---|
| Australia      | Se exige más de $1 \times 10^8$ rizobia viables, a excepción de <u>Rhizobium</u> que forma nódulos en <u>Lotononis</u> que es $3 \times 10^7$ (Date & Roughley 1977). |
| Canadá         | Un mínimo de $10^6$ rizobia viables por gramo de inoculante es aceptable, pero el inóculo viable - que se necesita por semilla es $10^3$ .                            |
| Checoslovaquia | $3 \times 10^8$ rizobia viables por gramo de inoculante.  |
| Nueva Zelanda  | $1 \times 10^8$ rizobia viables por gramo de inoculante.  |
| Rusia          | 5 a $10 \times 10^7$ rizobia viables por gramo de inoculante.   |
| Estados Unidos | En los Estados Unidos no hay una reglamentación exacta para la calidad de los inoculantes, cada estado establece sus propias normas.                                  |

Tabla 2. Instituciones que elaboran inoculantes en México y algunas características de los inoculantes. (26)

| Institución   | Localidad            | Tamaño de partícula | Soporte + esteril | Población de rizobia en el inoculante. | Uni- cepa | Multi- cepa | Garantía | Control de calidad |
|---|----------------------|---------------------|-------------------|--|-----------|-------------|----------|--------------------|
| Fertimex  | México, D.F.         | 200 mallas          | Sf                | $10^8$ a $10^9$                        |           | +           | 6 meses  | "                  |
| Lab. de Microb. programa de empleo rural.               | Matehuala, S.L.P.    | 200 mallas          | Sf                | $10^8$                                 | +         | +/-         | 8 meses  | "                  |
| Colegio de Postgraduados                                | Chapingo, México.    | 200 mallas          | Sf                | $10^9$                                 | +         | +           | 6 meses  | "                  |
| Qufmica Lucava, S.A.                                    | Edo. de México.      | 200 mallas          | Sf                | $5 \times 10^8$                        | +         |             | 6 meses  | "                  |
| Nitragin  | Guadalajara, Jalisco | 100 y 200 mallas    | Sf                | $10^8$                                 | +         | +           | 6 meses  | "                  |
| FIRA  | Tezoyuca, Morelos.   | 100 mallas          | Sf                | $10^8$                                 | -         | +           | 6 meses  | "                  |
| Fac. de Qufmica, UNAM y el Instituto de Geología, UNAM. | México, D.F.         | 200 mallas          | Sf                | $10^9$                                 | +         |             | 6 meses  | "                  |

+ A base de turba.

" Cuantificación de Rhizobium/g de turba.

## 5.- MATERIAL Y METODOS

A.- Se empleo turba donada por FERTILIZANTES MEXICANOS, S.A. de un tamaño de partícula de 200 mallas, a la que se le determinaron las siguientes características:

- Porcentaje de humedad y capacidad de retención de agua- según el método de la AOAC (1970).
- pH. Para lo que se empleó la relación turba-agua 1:2.5- y un potenciómetro Beckman pH Meter Mod. H2. (27)
- Materia orgánica.  
Se utilizó el método de Walkley & Black. Este método se basa en la oxidación de la materia orgánica utilizando- el calor liberado por una solución de ácido sulfúrico.- La muestra se trata con un exceso de agente oxidante - (ácido crómico), el excedente se determina por titula- ción con una solución valorada de sulfato ferroso (Jack- son, 1960).
- Nitrógeno total.  
La determinación se hizo por el método de Kjeldahl. - Este método se basa en la oxidación de la materia orgá- nica con ácido sulfúrico, el cual se reduce a dióxido -

de azufre, seguida de una reducción del nitrógeno a ión amonio, provocada por el mismo dióxido de azufre, después de alcalinizar la muestra digerida, el amoniaco se destila para determinarlo cuantitativamente por titulación con una solución de ácido bórico al 4 por ciento. (17)

A la turba se le ajustó el pH a 6.8 mediante la adición de  $\text{CaCO}_3$  en proporción de 5 por ciento.

Esterilización.- Se emplearon dos métodos de esterilización que corresponden a:

- Tratamiento con vapor húmedo y presión para lo que se colocó en autoclave a  $120^\circ\text{C}$  y 15 libras de presión durante una hora.
- Radiaciones gamma, efectuada en el Centro de Estudios Nucleares de la UNAM.

La fuente de irradiación fue un equipo Gammabeam, con radiación gamma de cobalto 60, aplicando una dosis de 6 megarads.

Al soporte esterilizado por los procedimientos anteriores se le sometió a determinaciones de control de esterilidad,-

para lo que se inoculó la turba esterilizada en placas de petri que contenían Papa-Dextrosa-Agar y Extracto de Levadura Manitol-Agar.

#### B.- Cepas.

Se emplearon 2 cepas de R. japonicum que corresponden a las claves FQ9 y FQ17 del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química UNAM.

A estas se le determinó pureza y se procedió a su propagación en el medio de Extracto de Levadura Manitol, incubándose a 28°C y a 200 rpm. Para determinar la curva de crecimiento, la que se evaluó por el método turbidimétrico de la escala de Mc Farland (18). Realizándose la lectura en un Fotómetro Klett-Summerson Mod. 800-3.

Para efectos de inoculación en turba se estableció como período de incubación 6 días a los cuales los microorganismos probados alcanzaron la etapa de transición entre las fases logarítmica y estacionaria que es la recomendada en la producción de inoculantes.

#### C.- Preparación del inoculante.

El soporte fue dividido en 3 lotes con 48 bolsas cada una, cada bolsa con 10 g. de turba.

Lote 1. Sin esterilización.

Lote 2. Esterilizado por autoclave el que se envasó en condiciones asépticas.

Lote 3. Esterilizado por exposición de las bolsas con la turba a radiaciones gamma.

Cada lote se subdividió en 3 paquetes de 16 bolsas que fueron utilizadas de la siguiente manera:

Lote 1.

1.1 Control

1.2 Inoculadas con la cepa FQ9

1.3 Inoculadas con la cepa FQ17

Lote 2.

2.1 Control

2.2 Inoculadas con la cepa FQ9

2.3 Inoculadas con la cepa FQ17

Lote 3.

3.1 Control

3.2 Inoculadas con la cepa FQ9

3.3 Inoculadas con la cepa FQ17

La inoculación se efectuó adicionando 7.5 ml. del cultivo correspondiente con una jeringa esteril, ajustando la humedad a 60 porciento.

En el caso de los controles se agrego el mismo volumen de medio de cultivo esteril empleado en la propagación de las cepas.

#### Cuantificación de Rhizobium.

Los inóculos contenfan una población de rizobia de -  
28.74 X 10<sup>19</sup> microorganismos por mililitro para la cepa FQ9 y -  
12.84 X 10<sup>19</sup> microorganismos por mililitro para la cepa FQ17.

El número de células viables en el cultivo se cuantificó por el método de Miles y Misra. (41)

Las bolsas inoculadas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 7 días para favorecer la maduración del inoculante.

Posteriormente se procedió a conservarlos en temperaturas que fluctuaron entre 20 y 30°C tratando de reproducir las temperaturas de almacenamiento y distribución al campo.

La cuantificación de células viables se efectuó a diferentes periodos con la finalidad de efectuar el seguimiento del periodo de maduración y la sobrevivencia de Rhizobium y consecuentemente de la calidad del inoculante preparado.

Los tiempos a los que se efectuó esta determinación corresponden a 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 y 150 días.

Con objeto de comprobar las características de infectividad y efectividad en la fijación de nitrógeno de los inoculantes preparados, estos fueron probados en el hospedero adecuado para lo que se emplearon semillas desinfectadas de soya variedad JUPITER, las que se colocaron en Jarras de Leonard modificadas con vermiculita a pH 7.0 y la solución de Jensen.

Las plantas se mantuvieron en invernadero a temperatura de 25°C y una humedad relativa de 70 por ciento durante un periodo de 45 días después de los cuáles se evaluó el peso seco de la parte aérea y el número y peso seco de los nódulos. (41)

Esta determinación se realizó en los inoculantes almacenados durante 7, 30 y 75 días.

## 6.- RESULTADOS Y DISCUSION

Características fisicoquímicas de la turba

Los resultados de los análisis practicados a la turba nacional se muestran en la tabla 4, como comparación se incluyen en la tabla 5 datos sobre la turba nacional proporcionados por FERTIMEX, S.A. y en la tabla 6 datos sobre las turbas de Winconsin, Badenock y NP, utilizadas en la elaboración de inoculantes en Estados Unidos, Australia y España respectivamente.

(39)

Los resultados de la capacidad de retención de agua, contenido de materia orgánica y pH, muestran que la turba nacional en estudio llena los requisitos fisicoquímicos más importantes para ser empleada como soporte en la elaboración de inoculantes, ya que presenta características similares a las reportadas en la tabla 5.

Tabla 4. Resultados del análisis de la turba.  
Facultad de Química. UNAM.

|                                | %      |
|--------------------------------|--------|
| N total                        | 1.75   |
| Materia orgánica               | 66.90  |
| Capacidad de retención de agua | 125.00 |
| pH relación 1:2.5              | 5.35   |

Tabla 5. Resultados de los análisis de la turba.  
FERTIMEX, S.A.

|                                 | %                     |
|---------------------------------|-----------------------|
| Pérdida por calcinación a 500°C | 66.70                 |
| N total                         | 1.68                  |
| P total                         | 0.13                  |
| K                               | 0.08                  |
| S                               | 0.53                  |
| Ca                              | 1.33                  |
| Mg                              | 0.70                  |
| Fe                              | 0.40                  |
| Na                              | 0.11                  |
| C como C                        | 34.20                 |
| Sales solubles                  | 0.74                  |
| RIA                             | 17.70                 |
| Capacidad de retención de agua  | 240.00<br>ppm         |
| Mn                              | 220                   |
| Cu                              | 30                    |
| B                               | 5                     |
| Cloruros                        |                       |
| Carbonatos                      | No contiene           |
| CIC                             | 95.6 meq de Na/100 g. |
| pH relación 1:3                 | 6.2                   |
| Al, Mo y Co                     | Trazas                |

Tabla 6. Características físico-químicas de turbas de diferente origen.

|           | Materia orgánica<br>% | N<br>% | P<br>% | K<br>% | Capacidad retención de agua<br>g/100 g de turba seca | RIA<br>% | pH   | Densidad |
|-----------|-----------------------|--------|--------|--------|--|----------|------|----------|
| México*   | 66.2                  | 1.68   | 0.13   | 0.08   | 240  | 17.7     | 6.2  | 0.50     |
| Badenock  | 64.3                  | 1.83   | 0.22   | 0.15   | 320  | 12.0     | 6.8  | ----     |
| Wisconsin | 86.8                  | 1.62   | ----   | ----   | ---  | 13.2     | 5.0  | ----     |
| NP        | 69.3                  | 1.12   | ----   | ----   | 172  | 30.7     | 6.9  | ----     |
| México**  | 66.9                  | 1.75   | ----   | ----   | 125  | ----     | 5.35 | ----     |

(\*) Resultados obtenidos en Fertimex.

(\*\*) Resultados obtenidos en la Facultad de Química, UNAM.

### Control de Esterilización

El tiempo de calentamiento y dosis de radiaciones fueron adecuados ya que no se registró desarrollo de microorganismos en los soportes después de esterilizarlos.

### Curva de crecimiento de Rhizobium

Mediante la presente curva se definió la fecha de la inoculación en los soportes, eligiendo el sexto día. Ver tabla 7.

Tabla 7. Curva de crecimiento de las cepas de Rhizobium japonicum FQ9 y FQ17.

| T(Días)  | FQ9 | FQ17 |
|----------|-----|------|
| Unidades | UK  | UK   |
| 0        | 12  | 14   |
| 1        | 51  | 62.5 |
| 2        | 117 | 167  |
| 3        | 122 | 253  |
| 4        | 169 | 335  |
| 5        | 169 | 410  |
| 6        | 178 | 430  |
| 7        | 180 | 455  |
| 8        | 178 | 530  |
| 9        | 178 | 530  |
| 10       | 178 | 530  |

### Cuantificación de Rhizobium en los diferentes tratamientos.

#### Turba sin esterilizar.

En los 3 sublotes del lote 1 que corresponden al no inoculado y los 2 inoculados se registró un desarrollo abundante de otro tipo de microorganismos que impidieron el desarrollo de Rhizobium.

Esta determinación se efectuó únicamente a los tiempos 0 y 5 días y se procedió a eliminar este lote.

#### Turba esterilizada control.

No se registró desarrollo de ningún microorganismo en todas las determinaciones efectuadas durante el período que duró el experimento.

#### Turba esterilizada.

Los resultados de la sobrevivencia de las bacterias se muestran en la tabla 8 y como comparación se incluyen en la tabla 9 los resultados de la sobrevivencia de una cepa afectiva de Rhizobium phaseoli; FM en turba nacional. (39)

Tabla 8. Resultados de la sobrevivencia de las cepas de Rhizobium japonicum (FQ9 y FQ17).

| T(Días) | FQ9<br>cel/g de inoculante |                       |       | FQ17<br>cel/g de inoculante |                       |       |
|---------|----------------------------|-----------------------|-------|-----------------------------|-----------------------|-------|
|         | Autoclave                  | Rad.                  | gamma | Autoclave                   | Rad.                  | gamma |
| 0       | $5.12 \times 10^{13}$      | $1.15 \times 10^{14}$ |       | $5.01 \times 10^{11}$       | $1.25 \times 10^{10}$ |       |
| 5       | $3.16 \times 10^{18}$      | $1.99 \times 10^{14}$ |       | $2.13 \times 10^{14}$       | $3.09 \times 10^{14}$ |       |
| 10      | $2.13 \times 10^{18}$      | $1.58 \times 10^{14}$ |       | $3.38 \times 10^{16}$       | $6.31 \times 10^{15}$ |       |
| 15      | $9.33 \times 10^{17}$      | $3.16 \times 10^{14}$ |       | $1.07 \times 10^{18}$       | $1.20 \times 10^{18}$ |       |
| 30      | $1.48 \times 10^{18}$      | $2.13 \times 10^{18}$ |       | $8.51 \times 10^{15}$       | $2.51 \times 10^{16}$ |       |
| 60      | $1.86 \times 10^{18}$      | $7.94 \times 10^{19}$ |       | $1.58 \times 10^{16}$       | $7.94 \times 10^{15}$ |       |
| 90      | $5.01 \times 10^{17}$      | $1.07 \times 10^{16}$ |       | $1.07 \times 10^{16}$       | $1.99 \times 10^{14}$ |       |
| 120     | $3.38 \times 10^{15}$      | $5.01 \times 10^{15}$ |       | $3.98 \times 10^{13}$       | $1.58 \times 10^{10}$ |       |
| 150     | $5.01 \times 10^{14}$      | $7.94 \times 10^{11}$ |       | $1.99 \times 10^{14}$       | $6.31 \times 10^9$    |       |

Tabla 9. Contenido de humedad y número de células por gramo de inoculantes de una cepa efectiva de Rhizobium phaseoli.

(39)

| % Humedad | Células/g de inoculante | Tiempo (Días) |
|-----------|-------------------------|---------------|
| 48.8      | $3.5 \times 10^9$       | 15            |
| 48.0      | $2.4 \times 10^8$       | 30            |
| 47.0      | $1.7 \times 10^8$       | 120           |
| 45.33     | $5.5 \times 10^7$       | 180           |

La concentración de rizobias vivas/ml. que se introdujeron en la turba para los tratamientos fue de  $28.74 \times 10^{19}$  células por mililitro para FQ9 y de  $12.84 \times 10^{19}$  células por mililitro para FQ17.

En las primeras determinaciones realizadas a los productos, en el inicio de la prueba (Tiempo 0) se encontró que la población de células agregadas inicialmente disminuyó bruscamente en esta fase en ambos tratamientos. En las determinaciones posteriores que se muestran en la tabla 8 se observa que el inoculante FQ9 alcanzó su estado de madurez a los cinco días en el que se registró el mayor número de células por gramo de producto, cantidad que permaneció constante hasta los 90 días de almacenamiento para el tratamiento con vapor húmedo; mientras que por el tratamiento con radiaciones gamma, el número de células por gramo de producto tuvo un comportamiento constante durante la etapa de maduración ascendiendo notablemente entre los 30 y 60 días de almacenamiento, registrando posteriormente un desenso celular gradual.

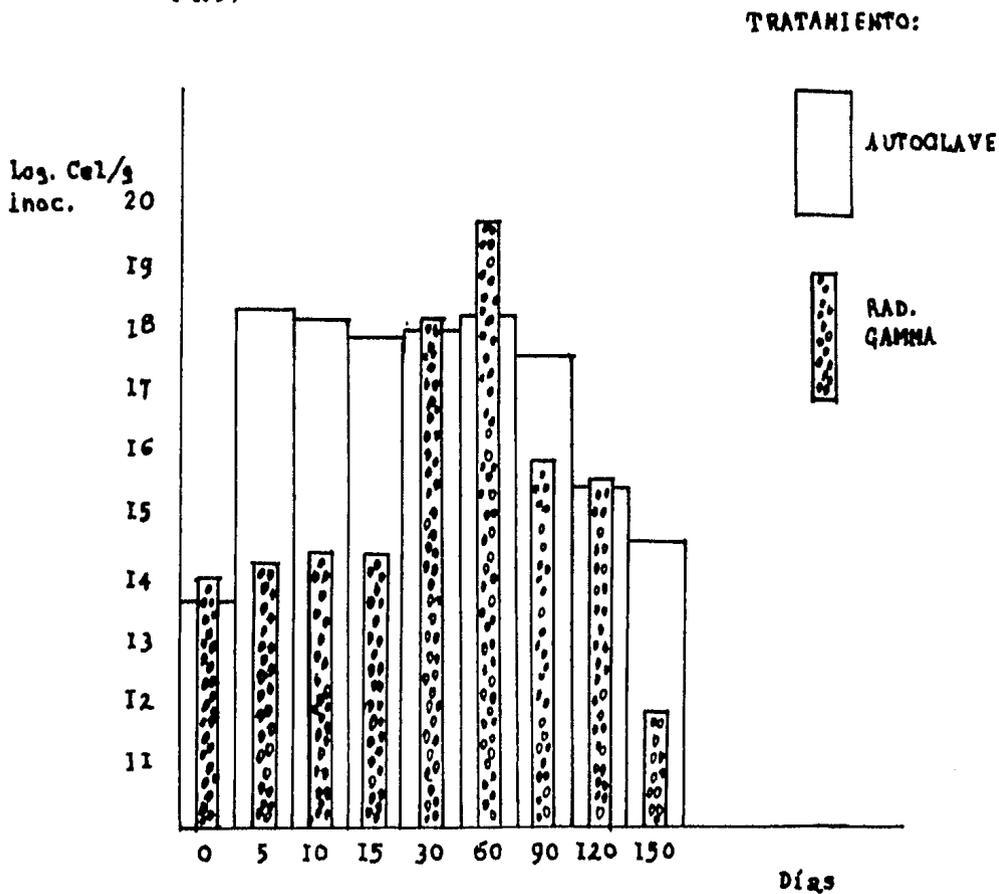
En ambos tratamientos el tiempo de almacenamiento fue de 5 meses.

Por otro lado en la misma tabla 8 se muestra el comportamiento de sobrevivencia celular de la cepa FQ17, la cual fue-

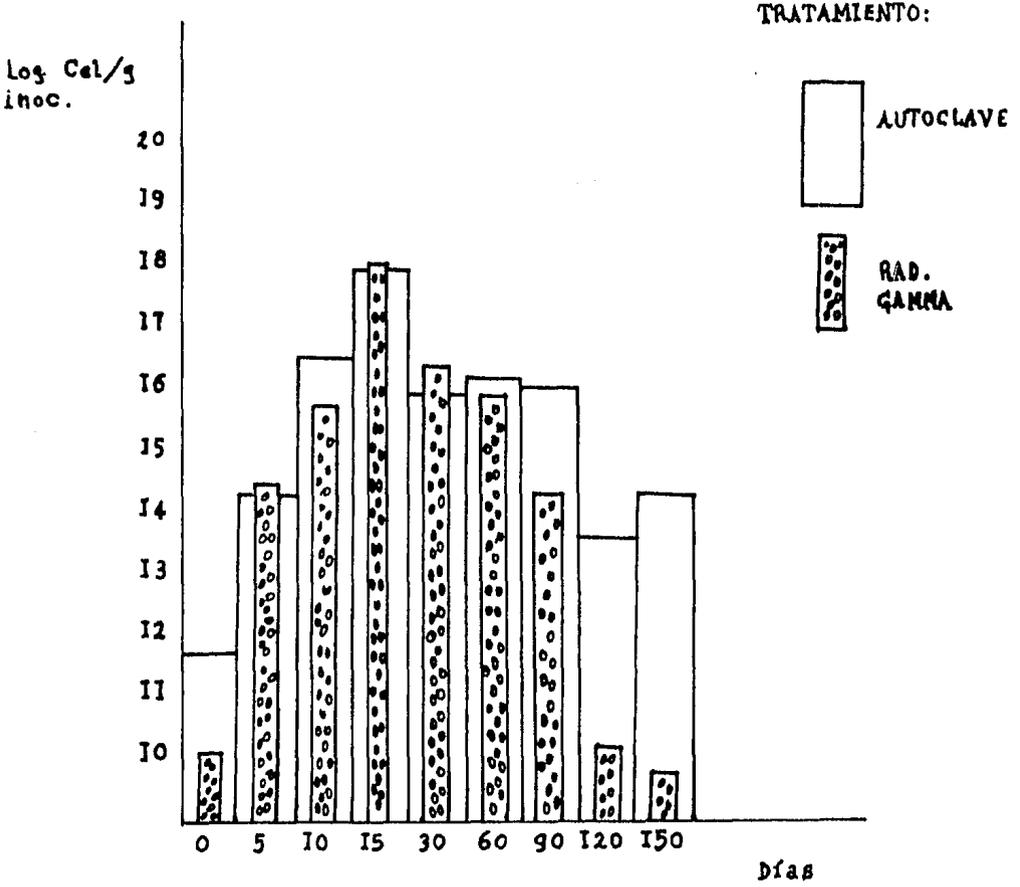
similar para ambos tratamientos manteniendo un ascenso gradual en el número de células por gramo de producto durante la etapa de maduración para posteriormente manifestar un descenso gradual hasta el término de la prueba.

Ambas cepas registraron una población celular arriba de  $10^9$  rizobia por gramo de producto durante los 5 meses que duró la prueba.

GRAFICA I. SOBREVIVENCIA DE RHIZOBIUM JAPONICUM FQ(9)



GRAFICA 2. SOBREVIVENCIA DE RHIZOBIUM JAPONICUM FQ(17)



Infectividad y efectividad de Rhizobium

Los resultados de infectividad y efectividad se muestran en las tablas 10 y 11 respectivamente.

Tabla 10

|      | Masa nodular (gramos) |      |      |               |      |      |
|------|-----------------------|------|------|---------------|------|------|
|      | Vapor húmedo          |      |      | Rad. gamma    |      |      |
|      | Tiempo (Días)         |      |      | Tiempo (Días) |      |      |
|      | 7                     | 30   | 75   | 7             | 30   | 75   |
| FQ9  | 0.12                  | 0.24 | 0.31 | 0.16          | 0.25 | 0.34 |
| FQ17 | 0.15                  | 0.23 | 0.23 | 0.08          | 0.23 | 0.26 |
| C(+) | 0.12                  | ---- | ---- | ----          | ---- | ---- |
| C(-) | 0.07                  | ---- | ---- | 0.08          | ---- | ---- |

Tabla 11

|      | Peso seco de la parte aérea (gramos) |      |      |               |      |      |
|------|--------------------------------------|------|------|---------------|------|------|
|      | Vapor húmedo                         |      |      | Rad. gamma    |      |      |
|      | Tiempo (Días)                        |      |      | Tiempo (Días) |      |      |
|      | 7                                    | 30   | 75   | 7             | 30   | 75   |
| FQ9  | 1.93                                 | 2.66 | 4.32 | 2.30          | 2.58 | 4.07 |
| FQ17 | 2.10                                 | 2.68 | 3.42 | 1.92          | 2.93 | 3.98 |
| C(+) | 2.92                                 | 3.56 | 4.32 | 3.10          | 3.41 | 4.40 |
| C(-) | 1.69                                 | 1.52 | 1.68 | 1.87          | 1.45 | 1.61 |

Dado que la población de Rhizobium por gramo de turba - mantenida durante toda la etapa de la prueba fue alto, resultó - muy prometedor encontrar como las bacterias inoculadas conservan sus características infectivas y su alta capacidad efectiva como se muestra en las tablas 10 y 11 respectivamente. Los resultados de las inoculaciones efectuadas a los 30 y 75 días se esperaban similares dado que la población de Rhizobium por gramo de - turba resultó elevado, la diferencia en cuanto a mayor peso no - refleja mayor efectividad sino que este experimento se realizó - en mejores condiciones ya que en el experimento de los 30 días - se registró una plaga del llamado falso medidor que aún cuando - se controló se detecta el efecto en los tratamientos probados.

Si bien es cierto que el control (+) de nitrógeno man- tiene un peso seco muy superior tanto en su masa nodular como en la parte aérea, los rizobia FQ9 son los que mejor manifiestan su capacidad infectiva y efectiva en comparación con los rizobia - FQ17, pero sin alcanzar el nivel del control (+) de nitrógeno. - Las observaciones realizadas más importantes en las diferentes - etapas de infección fueron que la mayoría de los nódulos se en- contraba en la parte superior de la raíz principal, consistían - de nódulos grandes, uniformes y de color rosa al partirlos por - la mitad, resultando estos datos importantes dado que reflejan - la efectividad de los mismos. En el experimento de los 7 días - se encontró que los controles tanto positivo como negativo se -

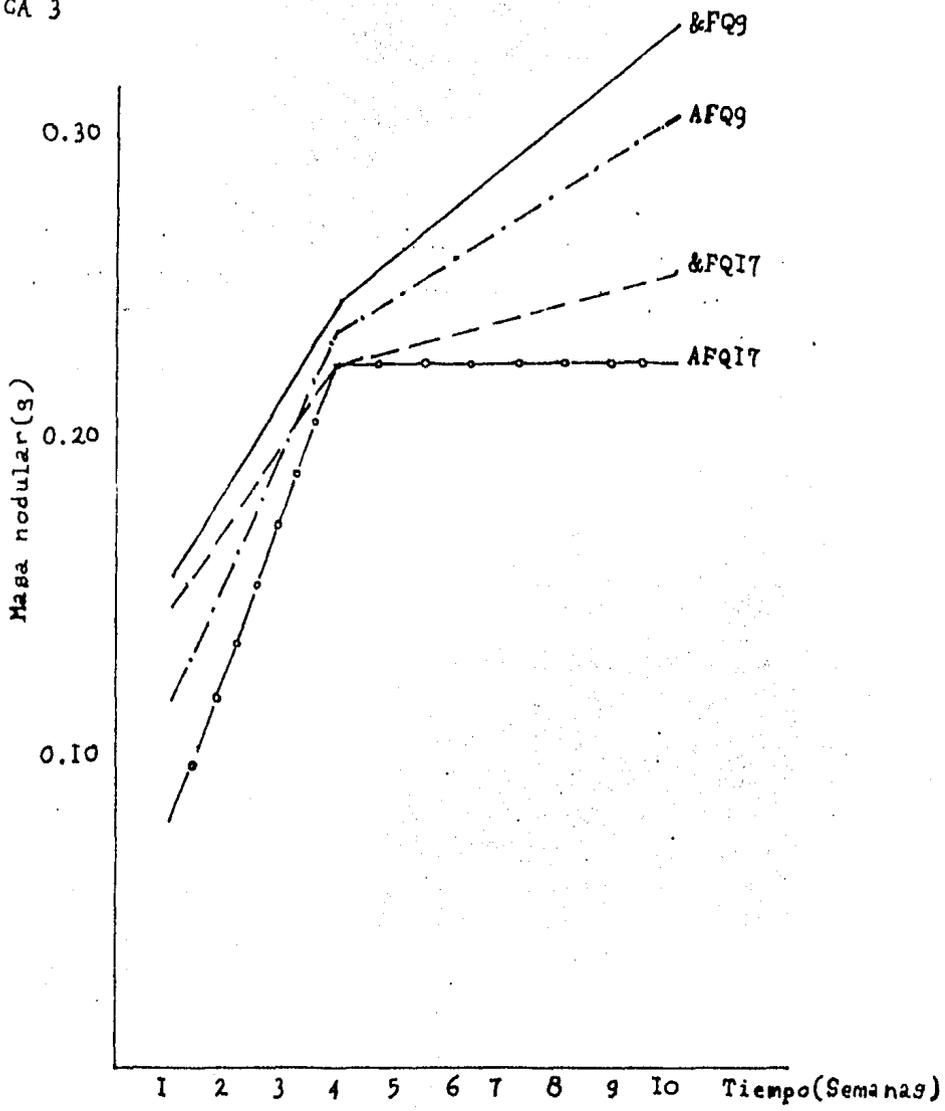
contaminaron posiblemente debido a la manipulación observandose nodulación en la parte superior de la raíz principal, eliminándose esto en los demás experimentos.

Durante el período de trabajo se analizó que el tratamiento más recomendable para la sobrevivencia de las cepas FQ9 y FQ17 es mediante vapor húmedo, el cual mantiene una población celular superior al tratamiento con radiaciones gamma.

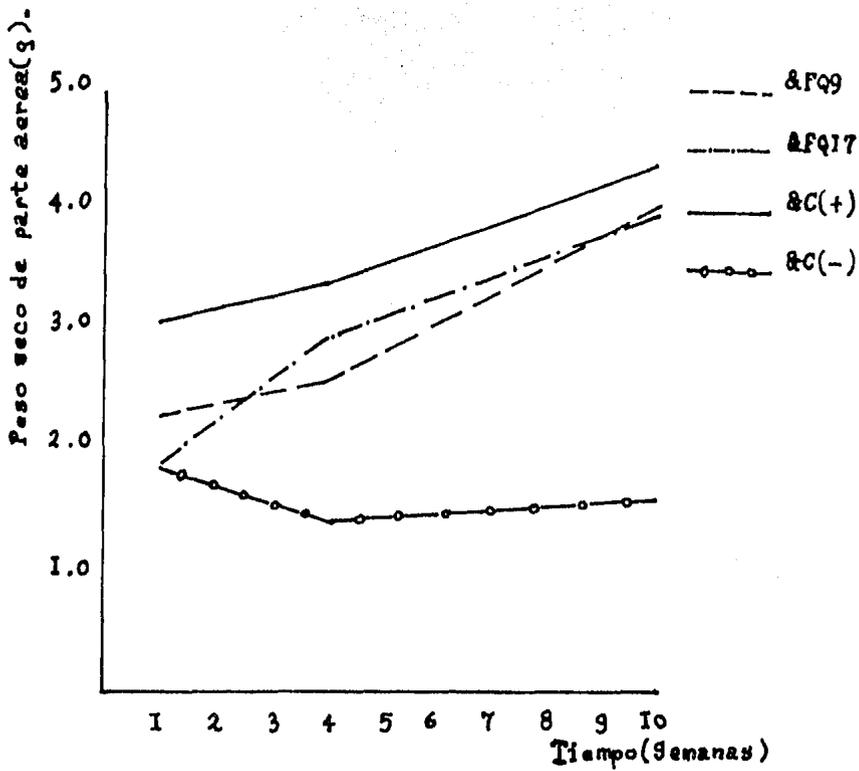
Según estos resultados, las cepas FQ9 y FQ17 es estudio sobreviven en un alto porcentaje en turba nacional y durante un período adecuado para su uso en la industria de los inoculantes en México.

La sobrevivencia de las dos cepas de R. japonicum en la turba nacional es similar a la sobrevivencia de Rhizobium de desarrollo rápido. Estos últimos estudios fueron realizados en Fertimex.

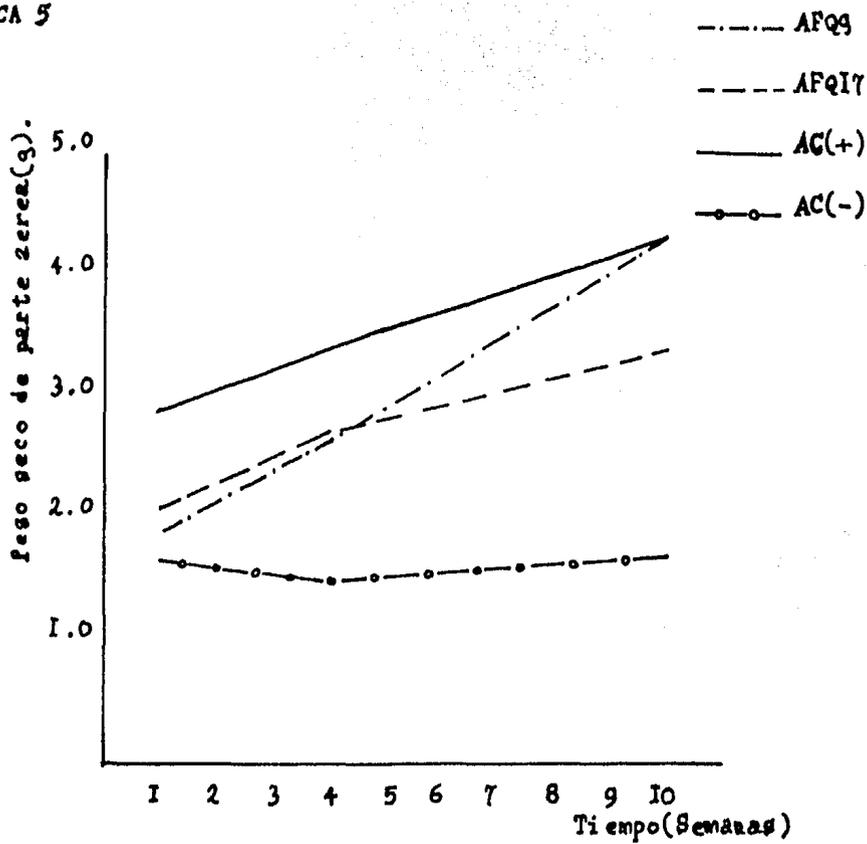
GRAFICA 3



GRAPICA 4



GRAFICA 5



## 7.- CONCLUSIONES

- 1.- Dado que la turba contiene materia orgánica en altas proporciones y condiciones que favorecen el desarrollo de cualquier tipo de microorganismo es necesario esterilizar los soportes para eliminar competencia de otros microorganismos así como efectos de antagonismo que interfieran con la adaptación y sobrevivencia del microorganismo de interés.
- 2.- Los procesos de esterilización utilizados fueron adecuados y por lo tanto recomendables. De tal modo que su elección en la industria dependerá de las condiciones económicas de que se dispongan.
- 3.- Las dos cepas empleadas fueron capaces de propagarse, adaptarse y sobrevivir a través de los 5 meses que duro el experimento.
- 4.- Ambas cepas conservaron sus características de infectividad y efectividad.
- 5.- Con base en lo anterior y en el comportamiento de Rhizobium de crecimiento rápido reportado en trabajos previos se considera que la turba nacional es un soporte adecuado para la producción de inoculantes.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Balatti, A. (1981). Producción de inoculantes. Centro de - Investigaciones y Desarrollo de Fermentaciones Industriales, Fac. de Ciencias Exactas. 47 y 115 La Plata, Argentina.
- 2.- Balatti, A. y Mazza, A. L. (1978). Producción de inoculantes para leguminosas. Rev. Lat. amer. Microbiol. 20: 87-93.
- 3.- Boletín de difusión Diamond. (1984). México, D.F.
- 4.- Burton, C.J. (1979). Rhizobium Species. Microbial Technology, I: 28-57, Academic Press. New York, U.S.A.
- 5.- Cárdenas, R.A. (1985). Comunicación personal. Química Lucava, S.A. México, D.F.
- 6.- Cárdenas, R.A. y Rivera, H. (1983). Nitrógeno, imprescindible en la agricultura. Agro-síntesis vol. 14/No. 6: 42-48.
- 7.- Casadesus, J. y Olivares, J. (1978). Genética de Rhizobium y de la fijación de nitrógeno. An. de Edafología y Agrobiología. Tomo XXXVII No. 9-10, Madrid, España.
- 8.- Date, R.A. (1969). A decade of legume inoculant quality control in Australia. The Journal of the Australian Institute of Agricultural Science. March. pág. 27-37.

- 9.- Departamento de Suelos y Laboratorios. (1981). Solicitud de registro de productos. Dirección General de Extensión Agrícola. SARH. México, D.F.
- 10.- Deschodt, C.C. and Strijdon, W.B. (1976). Suitability of a Coal-Bentonite base as Carrier of rhizobia in inoculants. *Phytophylactica* 8: 1-6.
- 11.- Deschodt, C.C. and Strijdom, W.B. (1974). Effect of prior-treatment of peat with ethylene oxide or methyl bromide on survival of rhizobia in inoculants. *Phytophylactica* 6: 229-234.
- 12.- Dietrich, W.; Erhard, M.; Rainer, S.; Birgit, W. (1980).- Development of nodules of *Glycine max* infected with and ineffective strain of *Rhizobium japonicum*. *Planta* 147: 320-329.
- 13.- Elkan, H.G. (1971). Biochemical and Genetical aspects of the Taxonomy of *Rhizobium japonicum*. *Plant and Soil*, Vol.-especial: 35-104.
- 14.- Guzmán, M.E. (1985). Comunicación personal. (Itirafın de México, S.A.

- 15.- Guzmán, M.E. (1984). Conferencia, Curso sobre tecnología - de Rhizobium y producción de inoculantes (no publicado). Nitragin de México, S.A.
- 16.- Hernández, G.R. (1980). Estudio comparativo de soportes - para la elaboración de inoculantes de leguminosas. Tesis Licenciatura. Fac. de Química, UNAM.
- 17.- Jackson, M.L. (1960). Soil Chemical Analysis. Prentice - Hall. inc.; 2nd ed. New Jersey, U.S.A.
- 18.- Kolmer, A.J. and Boerner, F. (1945). Approved Laboratory - Technics; 4th ed.; D. Appleton-Century Co. U.S.A.
- 19.- López, E.S. y Giardini, A.R. (1977). Sobrevivencia de - Rhizobium phaseoli en turba esterilizada. *Bragantia*, 36: - 39-42, Octubre.
- 20.- Lugo, A.; Pérez, R. y Muñoz, D. (1984). Utilización de - un abono procedente del reciclamiento de desechos orgánicos como soporte para Rhizobium. Resumen XII Reunión Latino Americana sobre Rhizobium. Campinas, Brasil.
- 21.- Matchette, F.J. (1982). Leguminosas, Inoculación y Fija- ción de nitrógeno: Análisis y explicación. Informe prepara

do por: The Nitragin Company, Inc. Caracas, Venezuela Re--  
presentado por Herring Ecológica, S.A.

- 22.- Mora de González, N.; Gómez, M. y González, R. (1984).  
Evaluación de materiales con posibilidad de ser usados co-  
mo soportes para inoculantes. Resumen XII Reunión Latino-  
Americana sobre Rhizobium. Campinas, Brasil.
- 23.- Moreno, Q.A. (1982). Manual sobre inoculación y revesti- -  
miento de semillas de leguminosas. FIRA. Boletín informati-  
vo # 128, Vol. 13: 22-34. México, D.F.
- 24.- Moretti, L.V. y Saito, M.T.S. (1978). Crescimento e Sobre-  
vivencia de Rhizobium phaseoli EM Torta de filtro de cana,  
"Peat-Moss" e Turfa comercial. O Solo, Piracicaba, sp, -  
70(1): 44-46, Jan/Jun.
- 25.- Philpotts, H. (1976). Filter mud as a carrier for Rhizobium  
inoculants. Journal of applied Bacteriology, 41: 277-281.  
England.
- 26.- Ramirez Gama, R.M.; Rodríguez, M.M.N. y Ferrara Cerratto,-  
R. (1984). Estado actual de la investigación sobre fija- -  
ción biológica de nitrógeno en México. XII Reunión Latino-  
Americana sobre Rhizobium. Campinas, Brasil.

- 27.- Ramirez, R.M. (1982). Estudio comparativo de la sobrevivencia de Rhizobium phaseoli en compostas y turba. Tesis Licenciatura. Fac. de Quimica, UNAM.
- 28.- Ramirez, R.M.; Muñoz, G.D.; Vesga, B. y Monroy, O. (1983). Estudio de una composta de lirio acuatico como posible sustituto de turba utilizada como soporte de inoculantes de leguminosas. Resúmenes XIV Congreso Nacional de Microbiología. Asociación Mexicana de Microbiología. Chihuahua, Chih. Abril.
- 29.- Roughley, R.J. (1973). The Australian inoculants. Research and Control Service. Reprinted from the Agricultural Gazette of N.S.W., Vol. 83, part. 4, August.
- 30.- Roughley, R.J. (1968). Some factors influencing the growth and survival of root-nodule bacteria in peat culture. J. Appl. Bacteriology, 31: 259-265. England.
- 31.- Roughley, R.J. and Vincent, J.M. (1967). Growth and survival of Rhizobium sp in peat culture. J. Appl. Bacteriology, 30: 362-376. England.
- 32.- Ruiz, A.F.; Labandera, C.; Orive, R. y Santa Maria, J. (1982). Crecimiento y sobrevivencia de Rhizobium japonicum

- (C8-1809) y *Rhizobium trifolii* (WE-290) en turbas españolas de diferentes orígenes. INIA s/n, Madrid 3, Sevilla, - España.
- 33.- Sánchez, G.H.F. (1985). Comunicación personal. Fertimex, - S.A. México, D.F.
- 34.- Schiel, E. y Dieguez, R.N. (1970). Nuevo portador para inoculantes de leguminosas a base de paja de trigo. Revista de Investigaciones Agropecuarias, INTA, Buenos Aires, Rep. Argentina, Serie 2, Biología y Producción Vegetal, Vol. - VII, No. 4: 211-237.
- 35.- Somasegaran, P. and Halliday, J. (1982). Dilución of liquid Rhizobium cultures to increase production capacity of inoculant plants. Applied and Environmental Microbiology, - 44 # 2, U.S.A.
- 36.- Somasegaran, P. y Halliday, J. (1981). En ejercicios prácticos en tecnología Rhizobium-leguminosa. Colegio de Postgraduados de Chapingo.
- 37.- Trujillo, G.G. (1985). Comunicación personal. Fertimex, - S.A. México, D.F.

- 38.- Trujillo, G.G. (1980). Producción de inoculantes en México. Fertilizantes Mexicanos, S.A. Departamento de Evaluación - de Fertilizantes, México, D.F.
- 39.- Trujillo, G.G. (1981). Comportamiento de una turba nacional utilizada como soporte para inoculante de leguminosas. Fertilizantes Mexicanos, S.A. Departamento de Evaluación - de Fertilizantes, México, D.F.
- 40.- Vincent, J.M. (1971). The production and use of inoculants. Ann. Sem. Met. y Planea. Pesquisas con leg. tropicais - IPEACS: 133-151. Brasil.
- 41.- Vincent, J.M. (1975). Manual práctico de Rhizobiología. - Ed. Hemisferio sur, Buenos Aires, Argentina.