



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

BO 267/85

Ej-3

“EVALUACION DEL ABONO ORGANICO OBTENIDO  
DEL S.I.R.D.O. (SISTEMA INTEGRAL DE RECICLAMIENTO  
DE DESECHOS ORGANICOS) PARA USO COMO POSIBLE  
SOPORTE DE INOCULANTES DE LEGUMINOSAS”



U.N.A.M. CAMPUS  
IZTACALA

**E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A N

RICARDO GERARDO PEREZ CHAVEZ

Y

ARMANDO LUGO SOTELO

1985

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

"Ahora nos falta ver si, por ser hombre, merece la muerte.

"Entiendo yo, señores, que nunca ha negado nadie, ¡y cómo había de negarlo yo; que todas las criaturas son producidas - por nuestra común madre la Naturaleza, para vivir en sociedad. Ahora bien, si yo pruebo que el hombre parece nacido para romper la perla, ¿no probaré a la vez que, yendo contra el fin de la -- creación, merece que la Naturaleza se arrepienta de su obra?

Fragmento de "Historia de los Pájaros".  
Cyrano de Bergerac.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a los profesores del Area Microbiología de la UAM-Iztapalapa: David Muñoz, por la dirección del presente trabajo, y Ma. de los Angeles Aquiahuatl, por su valiosa cooperación - que nos procuró un gran ahorro de esfuerzo y tiempo; a Raúl Rueda, profesor del Area Matemáticas de la misma - institución, por su ayuda al plantear el desarrollo experimental; a Agustín Vargas, profesor del Departamento de Matemáticas de la ENEP-Iztacala, por su asesoriamento en la interpretación estadística; a Gerardo Arriaga, Rocío Dueñas y Mario Fernández, por su colaboración en la producción de material gráfico; a Mario Ballesteros y Francisco Ruiz, ININ-Unidad de Irradiación Gamma, por la esterilización de parte del material; al Grupo de -- Tecnología Alternativa, por habernos proporcionado información y abono del proceso SIRDO y finalmente a la - Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, por permitirnos el uso de sus instalaciones.

R.G.P.Ch. & A.L.S.

## **RESUMEN**

---

Se realizó un experimento comparativo para determinar la calidad como soporte de una composta obtenida a partir de desechos orgánicos y turba mexicana. Ambas se inocularon, por separado y en combinaciones proporcionales, con una cepa de *Rhizobium phaseoli* CIAT-632 cuyas densidades poblacionales se determinaron por el método de cuenta viable en placa. Se utilizó un diseño factorial para evaluar el efecto del soporte y la interacción tiempo soporte. Se obtuvieron buenos resultados con una mezcla al 50% de turba y composta durante 135 días. En los soportes con mayor cantidad de composta se observaron colonias contaminantes que se sobrepusieron a las poblaciones de rizobia, por los que aquéllos se esterilizaron por radiación gamma y se evaluaron durante 30 días sin encontrar efectos tóxicos. El análisis físico-químico indicó que el lote de composta usado contenía un bajo porcentaje de materia orgánica, alto contenido de Fe y baja concentración de algunos metales pesados, por lo que se recomienda mejorar la selección de materiales de origen y tratar de elevar y mantener el contenido de materia orgánica.

# **INDICE**

I. AGRADECIMIENTOS.....	v
II. RESUMEN.....	vi
1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVO.....	9
3. ANTECEDENTES.....	10
4. METODOLOGIA.....	22
4.1. Preparación de los Soportes.....	22
4.2. Preparación del Inóculo.....	23
4.3. Preparación del Inoculante.....	24
4.4. Diseño Experimental.....	25
5. RESULTADOS.....	29
6. DISCUSION.....	59
7. CONCLUSION.....	76
8. ANEXOS.....	79
8.1. Determinación de Metales Pesados....	80
8.2. Esterilización con Rayos Gamma.....	82
8.3. Modelo Estadístico.....	83
8.4. Neutralización de Soportes.....	85
8.5. Análisis Físicos, Químicos y Bio lógicos de la Composta.....	87
9. BIBLIOGRAFIA.....	90

## ***INTRODUCCION***

---

Uno de los problemas fundamentales en el mundo es la alimentación. En México la disponibilidad *per capita* de calorías es aceptable (2,500 a 2,600 cal/día), pero paradójicamente cerca de un 60% de la población padece desnutrición (Quintero, 1984). Los factores que propician esta situación son diversos: distribución, especulación, desculturización, carestía y entre ellos la incapacidad productiva no es primordial por ser la solución básicamente política, social y económica (Bermúdez, 1984; Chávez, 1984). Por lo tanto, es necesario considerar ante el incremento poblacional y la problemática —o franca incapacidad— de incorporar a la producción agrícola zonas no explotadas actualmente (Halliday, 1976; Elrlich, 1971), el desarrollo de formas alternativas para aumentar la eficiencia en la producción de alimentos (Bourgues, 1984; Gálvez, 1984) buscando un equilibrio entre el uso intensivo de la tierra, la conservación de los recursos, la buena calidad del ambiente y un desarrollo social y económico satisfactorio (Morales & Pineda, 1982; Gómez-Pompa & Toledo, 1971).

Los intentos por aumentar la producción de los --

cultivos están comúnmente asociados a tecnología que produce fuertes perturbaciones en los ciclos de la biósfera (Huidobro, 1984; Brown, 1970), ya que la explotación de un ecosistema sólo es posible cuando se disminuye su madurez y/o se detiene la sucesión, con la consecuente disminución de la diversidad y el aumento en la importancia de la circulación de nutrientes por fuera de los organismos (Margalef, 1981), factores que implican disminución de los mecanismos homeostáticos de la biogeocenosis (Acot, 1978). La mantención de la explotación con una alta productividad neta de la comunidad por lapsos prolongados, en el caso específico de los agroecosistemas, requiere de un considerable aporte energético externo o subsidio a través del cultivo mecanizado, la irrigación, la selección genética, el uso de biocidas y la aplicación de fertilizantes (Odum, 1972), sin que el aumento en rendimiento o la energía que contienen los alimentos así producidos sean proporcionales a la inversión energética (Brown, 1970), generándose además, gran cantidad de poluciones físicas y químicas (Acot, 1978) que pueden mantenerse y acumularse en los ecosistemas por ser excesivas o no existir los procesos naturales específicos para su degradación (Margalef, 1981; Odum, 1972).

Entre los principales limitantes de la agricultura moderna se encuentra la disponibilidad de fósforo y

nitrógeno; el primero por su ciclo biogeoquímico sedimentario y el segundo por ser, tal vez en la actualidad, el nutriente más importante debido a que el requerimiento en los cultivos es muy elevado (Rojas, 1982; Medina, 1977). Sin embargo, a pesar de su relativa abundancia en la atmósfera, 79% de su composición corresponde a la forma gaseosa  $N_2$ , sólo lo que se considera nitrógeno inorgánico es aprovechable para las plantas ( $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ) y estas formas del elemento se pierden constantemente del suelo ya sea por lixiviación, volatilización y en la cosecha; además de que la microflora edáfica compete ventajosamente con los cultivos por los iones nitrogenados (inmovilización) (Alexander, 1980; Ruiz *et al*, 1967) por lo que para mantener las altas tasas de producción agrícola deben aportarse continuamente fertilizantes químicos (Rojas, 1982).

La producción industrial de fertilizantes nitrogenados es muy onerosa desde el punto de vista energético, ambiental y, por ende, económico ya que la fijación del  $N_2$  por el proceso de Haber-Bosh (Sienko & Plane, 1972) requiere para la reducción hasta  $NH_3$ , combustibles fósiles como fuentes energética y de hidrógeno, encareciendo notablemente el precio de los alimentos (Brill, 1977).

En 1974 el consumo de fertilizantes nitrogenados

Faltan páginas

N° 445

ción (Alexander, 1980).

La inoculación consiste básicamente en introducir al suelo la cepa de *Rhizobium* en forma directa o impregnando las semillas; en ambos casos se emplea un inoculante que consta de un material que sirve como soporte a las bacterias manteniéndolas viables por prolongados períodos de tiempo, sin que pierdan sus características típicas de infectividad y efectividad (Alexander, 1980).

La turba es el material que se emplea comúnmente como soporte para inoculantes por sus características como alta capacidad de retención de agua y elevada cantidad de materia orgánica (Burton, 1981). En muchos países, particularmente los de regiones tropicales que no poseen depósitos turberos o donde la turba disponible no es de calidad, se han probado diversos materiales como excipientes alternativos con la finalidad de disminuir los costos de aplicación de inoculantes, siendo promisorias por ahora algunas formulaciones a base de carbón y composta (García, 1981).

La composta puede considerarse como un humus artificial resultante del tratamiento y manejo especializado del material orgánico propenso a descomposición, cuyo origen puede ser agrícola, industrial o urbano. El

proceso de composteo es una solución aceptable y económica para procesar desechos al aprovechar el producto básicamente como abono (Rubio, 1979).

En la Ciudad de México, cuyo crecimiento y transformación están entre los más espectaculares del mundo (Olea, 1982) el proceso de composteo podría ser una alternativa interesante ya que la dotación de servicios públicos requieren de inversiones cuantiosas que no son productivas, pues en una megalópolis de tales dimensiones dichos servicios se encuentran en la etapa de rendimiento decreciente (Flores, 1981). Así, la eliminación de desechos sólidos es uno de los principales problemas del Distrito Federal, ya que tan sólo dentro de sus límites políticos se producen 34,966 toneladas diarias de basura, y hay que considerar que la zona urbana abarca un área mucho mayor, y al ser deficientes colecta y procesamiento de desechos, las condiciones sanitarias son precarias (SAROP, 1982).

El Sistema Integral de Reciclamiento de Desechos Orgánicos (SIRDO) posee una tecnología que combina la descomposición aerobia y anaerobia para el procesamiento de los desechos sólidos, simultáneamente con las aguas negras (Cuadro 1), resultando como producto final un abono en forma de tierra seca rico en macro y micronutrientes (Cuadro 2). El SIRDO representa una al

ternativa para lugares donde no existe drenaje y recolección de basura ya que mediante el tratamiento de de sechos evita la formación de focos de contaminación me mejorando así el aspecto sanitario de la localidad. Además, el producto resultante tiene un valor económico - como abono que puede incrementarse al ser usado como - soporte para inoculantes de leguminosas, permitiendo - así un mayor ingreso a la comunidad (Mena, 1983).

## **OBJETIVO**

Con base en lo anteriormente expuesto, el objetivo que delinea el presente trabajo es: Determinar la Utilidad del Abono obtenido del SIRDO como Soporte de Bacterias de la especie *Rhizobium phaseoli* en Inoculantes para Leguminosas, al usarlo Integro o en Combinación con Turba Nacional, mediante Cuenta Viable Periódica durante un lapso de 135 días en Almacén a 4°C.

## **ANTECEDENTES**

Las características de las leguminosas y sus efectos sobre los suelos han sido reconocidas en diferentes épocas y culturas. Egipcios y Romanos las empleaban como plantas forrajeras y mejoradoras del suelo (DISPERT, 1968). Los campesinos medioevales europeos conocían los efectos beneficiosos de la rotación de estas plantas -- con otras formas cultivables (Pratt, 1965). En China, - la siembra de leguminosas es una práctica ancestral que se combina con la aplicación de desperdicios (vegetales, animales y humanos) con la finalidad de aumentar el rendimiento por unidad de área (King, 1911 *op. cit.* Foth & Turk, 1972).

Un cultivo de leguminosas puede requerir cuatro veces la cantidad de nitrógeno necesaria para otros cultivos (Frederik, 1978); sin embargo, cuando existe nodulación efectiva el nitrógeno no es un factor limitante para las leguminosas. En tales circunstancias su consumo (ingesta) provee proteínas vegetales de muy buena calidad, mejor que las de los cereales, llegando a compararse con las proteínas de origen animal (Boerma, 1970).

Además de su valor alimentario las leguminosas pue

den incrementar la productividad del suelo mejorando su fertilidad, al usarlas como abono verde (Daubenmire, -- 1979) y/o por sus exudados radiculares de sustancias ni trogenadas asimilables por otras plantas (Alexander, -- 1980), cuando se siembran como cultivo alterno espacial o temporalmente con algún otro.

Recientemente se ha cuantificado la relación de -- las leguminosas con el aumento de la productividad de -- los suelos. El rendimiento de una zona con monocultivo de maíz puede incrementarse significativamente cuando -- se usa una rotación maíz-avena-leguminosa durante tres años en la misma zona (Page & Willard, 1946). En condi-- ciones propicias es posible tener ganancias promedio -- de nitrógeno de 100 kg/ha/año (Alexander, 1980), e in-- clusive se reportan ganancias de 300 kg/ha/año en la -- URSS (Imshenetsky, 1978), aunque debe mencionarse que -- estos rendimientos se han obtenido en campos experimen-- tales con condiciones muy favorables. No obstante, cual-- quier aumento en la productividad por efecto de las le-- guminosas tiene como condición *a priori* la formación de nódulos radiculares, consecuencia de una infección por bacterias del género *Rhizobium spp.* siendo éstas las -- responsables de la fijación del nitrógeno atmosférico -- por poseer el mecanismo bioquímico conocido como siste-- ma nitrogenasa (Brill, 1977) cuyos requerimientos ener-- géticos y de condiciones anaerobias condicionan que la

fijación se realice, casi exclusivamente, al producirse la asociación de planta y bacteria.

La simbiosis *Rhizobium-Leguminosae* es muy significativa para la agricultura moderna pues la cantidad de nitrógeno que se fija por este medio es sustancial (-- Dawson, 1970), calculándose que en 1973 fueron fijadas  $182.5 \cdot 10^6$  toneladas de nitrógeno (Hardy & Holstein, --- 1973) lo que significó cinco veces el fertilizante usado ese año; además debe considerarse que el desarrollo de una tecnología que aproveche la fijación biológica - del nitrógeno atmosférico será una llave que abrirá las perspectivas de mayor rendimiento a menor costo (Hardy & Havelka, 1975). Por tanto, es muy importante el estudio de la simbiosis sobre todo si se considera que cada cepa de *Rhizobium* posee características propias de in--fectividad; más aún, de la totalidad de las infecciones sólo un 5% desarrollan nódulos y de éstos sólo un peque ño porcentaje es efectivo. En algunos casos la relación puede devenir en parasitismo en diversos grados, según la tasa de fijación cubra las demandas del hospedero, e inclusive una infección masiva puede ocasionar su muer--te (Alexander, 1980).

El conocimiento de la simbiosis *Rhizobium-Legumino sae* se inició cuando Liebig y Busingnault, en 1830 (*op. cit.* Burton, 1967), demostraron experimentalmente la ca

pacidad fijadora de las leguminosas al hacerlas crecer en un medio deficiente en nitrógeno y cuantificar la cantidad fijada del elemento. En 1879 Frank (*op. cit.* Soriano, 1978) reconoció que los nódulos radiculares de las leguminosas eran causados por bacterias, pero fue hasta 1886 que Hellriegel y Wilfart (*op. cit.* Burris, 1974) observaron por primera vez la relación nódulo-fijación.

En 1888 Beijerinck (*op. cit.* Vargas, 1969) aisló por vez primera 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. No obstante -- fueron los mismos Hellriegel y Wilfart quienes en 1888 (*op. cit.* Jordan, 1962) inocularon por primera vez semillas con suelo donde habían crecido leguminosas anteriormente, con el método que denominaron como *transfe-rencia*. Resultó aceptable la nodulación, sin embargo, se presentó el problema de contaminación del suelo inoculado además de que los costos de transferencia de -- suelos resultaron muy elevados.

Las primeras prácticas de inoculación de semillas con cultivos artificiales la realizaron en 1896, por -- separado, Nobbe, Hiltner (*op. cit.* Hernández, 1980) y Voelcker (*op. cit.* Roughley, 1981). Los primeros usaron

un medio de cultivo a base de azúcar, aspargina, gelatina y extracto de leguminosas al que denominaron *nitrógeno* y posteriormente trataron un método a base de algodon sin obtener resultados satisfactorios. Por su parte Voelcker trabajó con bacterias crecidas en un medio agarizado suspendiéndolas posteriormente en agua para inocular las semillas o el suelo. Este método aún es empleado en Australia en pequeña escala.

Algunos intentos por mejorar la introducción de cepas efectivas fueron desarrollados por Marks (1905), Mc Alpine (1906) y Donan (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 (Roughley & Pulsford, 1982).

En 1942 se realizó el primer experimento para probar la eficiencia de varias cepas de *Rhizobium*. Durante 1944 se determinaron algunos de los principales efectos del almacenaje en la longevidad y efectividad de siete grupos cultivados sobre diversos medios agarizados y turba. El principio del método usado en la actualidad a base de turba seca, finamente molida y estéril se desarrolló en 1946 y, en 1952, finalmente se estableció un método para preparación masiva de inoculantes empaquetados en *pliofilm duplex* (Roughley & Pulsford, 1982).

El desarrollo actual de la industria de los inoculantes ha diversificado y especializado la investigación en este campo. Por un lado, 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 (Newbold, 1951), turba y suelo combinados (Van Scherven *et al*, 1954), suelo con polvo de cáscara de coco (John, 1966), paja de trigo (Schiel & Diegues, 1970), bagazo de caña (Liederman, 1971), polvo de celulosa (Pugashetti *et al*, 1971), composta vegetal (Iswaran *et al*, 1972), lodo filtrado con desperdicios de la molienda de la caña de azúcar (Philpots, 1976), polvo de cáscara de coco más composta de mazorcas de maíz (Corby, 1976), poliacrilamida (Dommergues & Diem, 1979), cáscara de cacahuate, carbón, vermiculita, mazorcas y poliacrilamida (Sparrow & Ham, 1983). 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 *et al*, 1974). En otro sentido, se realizan pruebas con la finalidad de mejorar las cepas para obtener estabilidad genética, mayores capacidades infectivas y efectivas, alta capacidad competitiva para la formación de nódulos, mayor viablez y resistencia bajo diversas condiciones ambientales durante la preparación, el almacenaje y la inoculación (Date, 1976; Brockwell *et al*, 1968).

A pesar del auge y desarrollo de la tecnología de los inoculantes, pocos estudios han utilizado *Rhizobium phaseoli* (Strijdom & Deschodt, 1976) huésped del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivo de gran importancia alimentaria en América Latina donde se produce el 23% del abastecimiento mundial (FAO, 1974 *op. cit.* - Ham & Hubell, 1974), ya que la mayor parte de la producción de inoculantes (aproximadamente un 80% en Estados Unidos) se destina básicamente a cultivos como la soya (*Glycine max* L.) y la alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Darte & Roughley, 1977); más aún siendo las leguminosas -- tropicales un grupo de gran importancia fitogeográfica por su abundancia y diversidad (la mayor proporción de las aproximadamente 13,000 especies descritas se encuentran en estas regiones) no se han desarrollado métodos apropiados para capitalizar la fijación de  $N_2$  de estas zonas (Alexander, 1980; Frederick, 1978; Spargue, 1975) y se considera que ante la problemática de la malnutrición proteica y el alto costo de los fertilizantes para producción de alimentos en los países en desarrollo, -- principalmente en los trópicos, la explotación de la fijación biológica del  $N_2$  (simbiótica o de vida libre) es una fuente promisoría de nitrógeno proteico para consumo humano; sin embargo, es necesario ante todo poseer -- una tecnología de inoculantes aplicable en estos países (Ayanaba, 1978) que consideren necesidades regionales -- de tipo económico y de tipo biológico, ya que las legumi

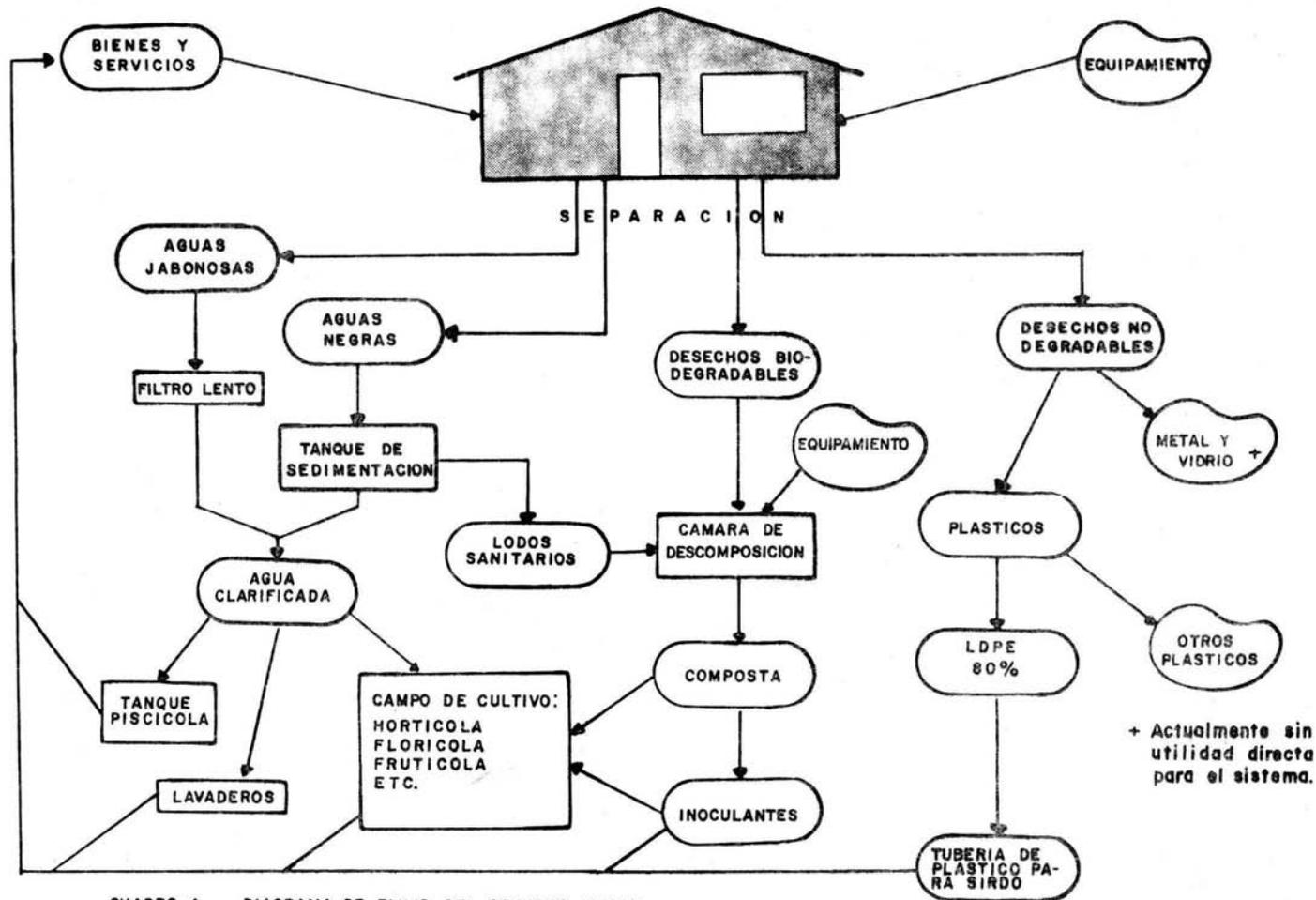
nosas del trópico son significativamente distintas de las de regiones templadas (Morales & Pineda, 1982; Sparingue, 1975) lo que ocasiona riesgos de tener grandes pérdidas económicas al tratar de introducir, en países pobres, ya sea leguminosas de otras latitudes o inoculantes producidos en otros países o continentes. En el primer caso el problema puede ocasionarse porque las cepas nativas de *Rhizobium* spp. no sean infectivas o efectivas en las plantas introducidas; y en el segundo caso puede suceder que exista fuerte competencia de las cepas importadas con las cepas nativas en detrimento de las plantas o bien que por ser cepas de espectro amplio no sean lo suficientemente infectivas (Roughley & Pulsford, 1982). Esto es muy importante en países como México donde las cepas para inoculación no se especifican por el gobierno o son distribuidas por algún tipo de agencia de control, como sucede en Australia, Nueva Zelanda y Brasil principalmente, sino que cada productor debe probar sus propias cepas y/o conseguirlas de otras fuentes (Date, 1976).

En México la aplicación de inoculantes tiene un costo excesivo pues la mayoría se elabora a base de turba importada (Quintero, 1975). En 1983 Nitragin, industria pionera en la elaboración de inoculantes (con sede en Guadalajara, Jal.) fabricó 600 toneladas de las cuales del 60 al 70% correspondió para soya, utilizando --

turba importada de Wisconsin, E.U. (Guzmán, 1984). Ante estas circunstancias FERTIMEX, planeó desarrollar una planta productora para emplear turba del país (Trujillo, 1981). Sin embargo, siendo este un recurso no renovable (Halliday, 1976) y para evitar dependencia del mercado exterior, se han realizado investigaciones encaminadas al desarrollo de una industria nacional para manufacturar inoculantes, empleando materiales de desecho o no aprovechados en la actualidad. Algunos de estos trabajos emplearon cepas de *R. phaseoli* y otros utilizaron especies de leguminosas poco estudiadas, pero aún son pocos los esfuerzos desarrollados para la consecución de estos objetivos. Entre las investigaciones realizadas se pueden citar las siguientes: cachaza y suelo tratado con *R. trifolii* (Hernández, 1980); aserrín, bagazo de caña y cáscara de coco con *R. japonicum* (García, --- 1981); compostas agrícola y urbana con *R. phaseoli* (Ramírez, 1982); composta de lirio acuático con *R. phaseoli* (Muñoz, 1983).

En consecuencia este trabajo tiene el propósito de contribuir en la búsqueda de un soporte alternativo a la turba, investigando el abono obtenido del SIRDO ya que podría constituirse como una materia prima cualitativa y cuantitativamente adecuada para la producción industrial de inoculantes, pues en su elaboración se utilizan aguas negras y materiales orgánicos de desecho y

se estima que su producción oscila entre 0.25 y 30 tons/año, dependiendo de las dimensiones del sistema y del número de familias participantes (Mena, 1983).



CUADRO 1. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO SIRDO.



**conafрут**  
**C.R.D.F.**  
**Oxxutzcab**

CUADRO 2. .

COMPOSICION DEL ABONO ORGANICO POR COSECHA.  
( 4 COSECHAS )

FECHA :	XII - 81	VIII - 82	III - 83	VI - 83.
COSECHA :		2a. *	3a.	4a.
CAMARA :	A	A	B	A
PH ( 1:5 )	7.72	7.89	6.88	7.10
M.O. ( % )	39.04	24.63	45.21	22.34
REL. C/N.	15.5	17.7	12.3	12.4
N ( % )	1.46	0.81	2.14	1.05
P ( % )	0.38	0.23	0.59	0.30
K ( % )	0.41	0.92	0.45	0.44
Ca ( % )	3.94	11.12	12.43	4.86
Mg ( % )	0.33	0.33	0.38	0.30
Na ( % )	0.38	0.40	0.29	0.10
B (PPM)	15.6	11.91	25	26
Fe (PPM)	23088	26500	8304	23500
Mn (PPM)	374	340	172	915
Cu (PPM)	44	28	72	29
Zn (PPM)	312	129	531	151

\* MUESTRA CONTAMINADA CON AGUAS JABONOSAS.

comisión nacional de fruticultura SARH

km. 14.5 carretera México-toluca-méxico 18 d. f.

apdo. postal 41-740- México 10. d. f.

conmutador con 10 líneas 570-24-99

## **METODOLOGIA**

Para cumplir el objetivo y de acuerdo al modelo experimental se prepararon cinco soportes a base de composta del SIRDO y/o turba nacional, proporcionada por FERTIMEX, obteniéndose cuatro soportes experimentales ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  y  $S_4$ ), un testigo experimental ( $S_5$ ) y dos testigos de contaminación ( $S_6$  y  $S_7$ ) como lo muestra el cuadro 3.

<u>SOPORTE</u>	<u>COMPOSICION COMPOSTA : TURBA</u>	<u>PORCENTAJE DE COMPOSTA EN EL SOPORTE</u>
$S_1$	1 : 0	100%
$S_2$	3 : 1	75%
$S_3$	1 : 1	50%
$S_4$	1 : 3	25%
$S_5$	0 : 1	0%
$S_6$	1 : 0	100%
$S_7$	0 : 1	0%

Cuadro 3. Composición Proporcional y Porcentual de los Soportes Experimentales y de los Testigos.

### PREPARACION DE LOS SOPORTES.

La composta y la turba fueron secadas a temperatura ambiente, molidas y tamizadas a malla 200 (Burton, 1981). A cada soporte se le determinó el contenido de Materia -

Orgánica (% MO) por el método de Walkley y Black (Jackson, 1976), Humedad (% H), Capacidad de Retención de -- Agua (CRA) (Caldwell, Carlyle & Dawson, 1967) y pH (Jack<sup>son</sup>, 1976) en relación 1:2.5 (soporte:agua) con un po-- tenciómetro Corning 125. Las pruebas de pH y %H se rea-- lizaron nuevamente al preparar el inoculante y al fina-- lizar los períodos de maduración y almacenaje. Además, a los soportes S<sub>1</sub> y S<sub>5</sub> se les realizaron pruebas para - cuantificar fósforo (P) (Jackson, 1976) y nitrógeno to-- tal (% N) por el método de micro-Kjeldhal (Jackson, 1976), mientras que en los Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial (LANFI) se les practicaron pruebas para de-- terminar concentraciones de metales pesados (Cd, As, Hg y Pb) (Anexo 1).

Los soportes se neutralizaron mediante la adición de HCl 1.0 N y Ca(OH)<sub>2</sub> en sustitución de CaCO<sub>3</sub> (Mc Kea-- gue, 1978). Por último se esterilizaron en frascos de - vidrio por calor húmedo a 121°C y 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> durante -- cuatro horas. Cada frasco contenía 10 ± 0.05 g de sopor-- te.

#### PREPARACION DEL INOCULO.

Se utilizó una cepa de colección del Laboratorio - de Microbiología Agrícola de la Universidad Autónoma Me-- tropolitana Iztapalapa de *Rhizobium phaseoli* CIAT-632,

la cual se procedió a crecer en medio líquido constituido por extracto de levadura/manitol/rojo congo (ELMRC, modificado de Vincent, 1975; cuadro 4) en un rango de temperatura de  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  en una estufa "Riossa" y en agitación a  $200 \pm 5$  rpm en un agitador "Shaker Lab-Line" durante 96 horas, obteniéndose la densidad poblacional al finalizar este lapso.

<u>REACTIVO</u>	<u>CANTIDAD POR LITRO</u>
-Manitol	7.00 g
-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.00 g
-MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.20 g
-NaCl	0.10 g
-Extracto de Levadura	0.50 g
-CaCO <sub>3</sub> (1)	0.01 g
-Agua Destilada	Aforar
-Rojo Congo	0.025 g
-Agar (2)	15.00 g

Cuadro 4. Constitución del Medio de Cultivo Extracto de Levadura/Manitol/Rojo Congo (ELMRC). pH 6.8 - 7.0.

(1) Únicamente se utiliza en medio líquido y no se adiciona en medio sólido.

(2) Sólo se utiliza para preparar medio sólido.

#### PREPARACION DEL INOCULANTE (SOPORTE + INOCULO).

Los soportes ya esterilizados fueron introducidos, en campo estéril, en bolsas nuevas de polietileno, que se consideraron estériles, con un poro de 0.05 mm  $\phi$  y un tamaño de 15.15 cm para posteriormente introducir el inóculo y adicionar agua destilada, desionizada y este-

rilizada hasta alcanzar la humedad de 60 - 70% usada en la preparación de inoculantes, así como la cantidad necesaria de ácido o base para llegar a un pH neutro, en las proporciones que se indican en el cuadro 5. Finalmente las bolsas fueron cerradas herméticamente por calor con una selladora comercial.

SOPORTE	VOLUMEN DE INOCULO (ml)	VOLUMEN DE H <sub>2</sub> O (ml)	VOLUMEN DE HCl 1.0 N	CANTIDAD DE Ca(OH) <sub>2</sub> (g)
S <sub>1</sub>	2.5	---	0.6	-----
S <sub>2</sub>	2.5	0.7	0.6	-----
S <sub>3</sub>	2.5	1.5	---	0.0266
S <sub>4</sub>	2.5	2.1	---	0.0556
S <sub>5</sub>	2.5	3.2	---	0.0837
S <sub>6</sub>	---	2.5	0.6	-----
S <sub>7</sub>	---	5.7	---	0.0837

Cuadro 5. Preparación de los Inoculantes incluyendo los reactivos de Neutralización.

Al concluir la preparación las bolsas fueron debidamente etiquetadas y puestas en incubadora de marca comercial para iniciar así la fase de maduración de 15 días a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Concluida esta fase las bolsas pasaron a la fase de almacenaje en refrigeración a  $4 \pm 0.5^\circ\text{C}$  por un lapso de 135 días para observar el control de calidad de los inoculantes elaborados.

#### DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para la evaluación estadística se recurrió a un di seño de tipo factorial (A-B) de efectos fijos (Daniel, 1979) (Anexo 3) para determinar interacción y/o diferen cias significativas entre los soportes, realizando con teo de rizobios viables periódicamente (Vincent, 1975) para cada soporte de acuerdo al siguiente cuadro.

NUMERO DE CONTEO	TIEMPO (DIAS)	CLAVE
1	0	t <sub>0</sub>
2	7	t <sub>7</sub>
3	15	t <sub>15</sub>
4	30	t <sub>30</sub>
5	45	t <sub>45</sub>
6	60	t <sub>60</sub>
7	75	t <sub>75</sub>
8	90	t <sub>90</sub>
9	105	t <sub>105</sub>
10	120	t <sub>120</sub>
11	135	t <sub>135</sub>

Cuadro 6. Periodicidad del Conteo expresada en días a partir de la elaboración de los inoculantes.

Se elaboraron tres bolsas o réplicas por soporte - por tiempo para un total de 33 bolsas por tratamiento y un total general de 165 bolsas.

En cada cuenta viable se realizó para cada bolsa - conteo en placa por duplicado (Vincent, 1975) de las di

luciones  $1:10^6$ ,  $1:10^7$ ,  $1:10^8$ ,  $1:10^9$ ,  $1:10^{10}$  y  $1:10^{11}$  -- considerando sólo la dilución en cuyas dos cajas el número de colonias oscilase entre 5 y 50. Los valores de densidad poblacional se obtuvieron como el promedio de ambas cajas multiplicado por la exponencial de la dilución. La constitución de la placa fue a base de medio - agarizado ELMRC-Agar (Cuadro 4).

Para los soportes  $S_6$  y  $S_7$  se realizaron conteos en  $t_0$ ,  $t_{30}$ ,  $t_{60}$ ,  $t_{90}$  y  $t_{120}$  utilizándose una bolsa por testigo por conteo.

En vista de la contaminación observada y reportada en resultados y discusión se procedió a que los sopor--tes con relación composta:turba de 1:0 (100% de compos--ta) y 3:1 (75% de composta) fueran también esteriliza--dos por radiación a una dosis de  $5.0 \cdot 10^6$  rads (Roughley & Pulsford, 1982) (Anexo 2) y posteriormente fueron preparados como inoculantes para compararlos por separado con turba esterilizada por calor húmedo, elaborándose - además tres testigos de contaminación como se indica en el cuadro 7, donde también se mencionan las cantidades de agua y reactivos de neutralización.

Con estos soportes se siguió un procedimiento aná--logo al descrito anteriormente (Preparación de los So--portes y del Inoculante), salvo que las bolsas fueron -

selladas con el soporte dentro antes de la esterilización y la adición del inóculo se realizó después mediante un corte y posterior sello, siempre en campo estéril. Los tiempos de conteo fueron  $t_0$ ,  $t_7$ ,  $t_{15}$  y  $t_{30}$ .

SOPORTE	COMPOSICION COMPOSTA:TURBA	VOLUMEN DE INOCULO (ml)	VOLUMEN DE H <sub>2</sub> O (ml)	VOLUMEN DE HCl 1.0 N	CANTIDAD Ca(OH) <sub>2</sub> (g)
SR <sub>1</sub>	1:0	2.5	3.5	0.6	-----
SR <sub>2</sub>	3:1	2.5	3.5	0.6	-----
SR <sub>3</sub>	0:1	2.5	4.0	---	0.0837
SR <sub>4</sub>	1:0	---	6.0	0.6	-----
SR <sub>5</sub>	3:1	---	6.0	0.6	-----
SR <sub>6</sub>	0:1	---	6.5	---	0.0837

Cuadro 7. Preparación de los Soportes Radiados (SR<sub>1</sub> y SR<sub>2</sub>) para su comparación con Turba (SR<sub>3</sub>) y sus respectivos testigos de contaminación (SR<sub>4</sub>, SR<sub>5</sub> y SR<sub>6</sub>).

## **RESULTADOS**

La caracterización fisicoquímica de los soportes - se presenta en el cuadro 8.1; con fines comparativos algunos de estos datos se utilizaron para elaborar perfiles gráficos que se encuentran en el cuadro 8.2.

Los valores de %M0, %H, CRA y pH fueron analizados por el método de regresión lineal simple (Daniels, 1979) determinándose la relación empírica de cada uno de estos factores con respecto a la composición porcentual de turba en el soporte. Todos los coeficientes de correlación fueron superiores a  $|0.94|$  y las regresiones fueron significativas a un nivel crítico de  $\alpha = 0.01$  para %M0 y %H y  $\alpha = 0.05$  para CRA. En las gráficas 1 a 4 se presentan los valores empleados en las regresiones.

Las cantidades de HCl 1.0 N o  $\text{Ca(OH)}_2$  empleadas para neutralizar los soportes se obtuvieron mediante interpolación en curvas de titulación, que se muestran en gráficas (Anexo 4).

La determinación de pH en  $t_0$  ( $\text{pH}_0$ ) indicó que los valores para los soportes neutralizados por acidificación ( $S_1$  y  $S_2$ ) fueron menores que 7.0, mientras que los

soportes que se basificaron ( $S_3$ ,  $S_4$  y  $S_5$ ) el pH fue superior a 7.0; estos datos junto con los de las pruebas efectuadas en  $t_{135}$  ( $pH_{135}$ ) se presentan en el cuadro 9, pudiéndose observar que en general existe una tendencia al incremento de pH en el inoculante a medida que transcurre el tiempo, con excepción del soporte  $S_5$  donde se registra decremento aunque su valor al final de la fase experimental se considera neutro ( $pH = 6.9$ ). En los otros soportes el cambio promedio de pH fue de  $|0.69 \pm 0.09|$ , sin embargo, la conclusión del análisis estadístico es que la variación de pH entre  $t_0$  y  $t_{135}$  en conjunto, no es significativa. La prueba empleada fue una prueba de parejas de muestras usando estadístico "t" (Parker, 1981).

En el cuadro 10 se encuentran los valores de  $\%H \pm E\bar{x}$  obtenidos en  $t_0$  y  $t_{135}$  ( $\%H_0$  y  $\%H_{135}$ ), incluyéndose, con fines comparativos, los valores de  $\%H_{\chi} \pm E\bar{x}$  (de los soportes en bruto). El decremento de humedad entre  $t_0$  y  $t_{135}$  se analizó estadísticamente con la prueba de "t-pareada", encontrándose que el cambio medio de porcentaje de humedad fue  $\bar{\Delta}(\%H) = -25.39 \pm 8.60$  siendo esta variación significativa con un nivel crítico de  $\alpha = 0.05$  pero no a nivel  $\alpha = 0.01$ . Dado que existió un aumento sensible entre los  $E\bar{x}$  de las cuantificaciones de  $\%H$  a los soportes en bruto y los inoculantes, se decidió analizar estas variaciones por medio de un "ANDEVA" de clasi

ficación simple (Parker, 1981), concluyendo que existían diferencias significativas y además que:

$$E\bar{x}(\%H_{\chi}) \neq E\bar{x}(\%H_0) = E\bar{x}(\%H_{135})$$

contra lo esperado que era:

$$E\bar{x}(\%H_{\chi}) = E\bar{x}(\%H_0) \neq E\bar{x}(\%H_{135})$$

Estas últimas comparaciones se realizaron siguiendo el método de prueba de rango múltiple "S.S.R." (Parker, 1981).

Las pruebas de pH y %H correspondientes a  $t_{15}$  (final de la maduración) no pudieron realizarse por causas ajenas al desarrollo del trabajo.

La densidad poblacional rizobiana en el inóculo lijado adicionado a los soportes fue de  $2.0 \cdot 10^9 \pm 0.950 \cdot 10^9$  bacterias/ml.

La cuenta viable inicial  $t_0$  se realizó minutos después de preparado el inoculante. A partir de este momento se detectan respuestas diferenciales de la cepa en cada soporte, obteniéndose un promedio de  $5.915 \cdot 10^8 \pm 3.846 \cdot 10^8$  bacterias/gr en el primer conteo.

En el soporte  $S_1$  en la cuenta  $t_{15}$  se observaron bacterias y hongos contaminantes que se reconocieron por su intensa absorción de colorante (rojo congo) o por sus colonias de color blanco, según el caso. Las evaluaciones posteriores se caracterizaron por la proliferación de estos microorganismos que a los 45 días resultaron ya incontables, dificultando la observación de las colonias rizobianas, las cuales disminuyeron -- gradualmente hasta valores menores de  $10^6$  bacterias/gr en  $t_{75}$ .

El soporte  $S_2$  también mostró la contaminación descrita anteriormente sólo que a partir de  $t_{30}$ , siendo -- incontables las colonias contaminantes para  $t_{45}$  mientras que las colonias rizobianas declinaron y en  $t_{105}$  ya no fueron observables en las diluciones  $1:10^6$ .

Las bacterias contaminantes fueron identificadas por tinción de Gram como bacilos negativos (Gaviño, -- Juárez & Figueroa, 1980). En algunas cajas de siembra de estos dos soportes también se observaron ocasionalmente colonias de color blanco cremoso, translúcidas -- que producían mucílago, de crecimiento extenso (ocupando casi toda la placa), con bordes semejando dendritas, sin observarse absorción de rojo congo, constituidas -- por bacilos gram positivos de aproximadamente dos veces el tamaño de un rizobio característico. Se intentó

inducir nodulación en frijol en jarras de Leonard (Vincent, 1975), pero la aplicación de la técnica fue deficiente y no se obtuvieron resultados. Los valores de densidad poblacional y la ocurrencia de la contaminación en estos dos soportes se indican en el cuadro 11 junto con los resultados cualitativos de los testigos de contaminación ( $S_6$  y  $S_7$ ); el carácter positivo que se reporta en  $S_6$  —a base de composta exclusivamente— se debió a una forma de contaminación similar a la hallada en  $S_1$  y  $S_2$  y que ya ha sido descrita anteriormente, mientras que en  $S_7$  —a base de turba— todas las evaluaciones fueron negativas.

Los valores de densidad poblacional por réplica-tiempo-soporte ( $y_{ijk}$ ) para  $S_3$ ,  $S_4$  y  $S_5$  se encuentran respectivamente en los cuadros 12, 13 y 14 incluyéndose además la densidad poblacional media tiempo-soporte ( $\bar{y}_{ij.}$ ), su error típico ( $E\bar{y}$ ) así como su valor relativo respecto al promedio (%).

En el soporte  $S_3$  en el número de rizobios existen fluctuaciones entre  $5.769 \cdot 10^{10}$  y  $1.445 \cdot 10^{10}$  bacterias/gr en el lapso de  $t_{15}$  a  $t_{75}$  con posterior disminución. En este caso se encontraron algunas bolsas con contaminantes sin ser una característica sistémica.

Sobre los soportes con mayor cantidad de turba --

( $S_4$  y  $S_5$ ) se obtienen, en los diversos conteos, los mayores valores poblacionales. El comportamiento de los rizobias es, en general, muy similar en ambos casos siendo ligeramente superiores las poblaciones de  $S_5$ . En estos soportes el tamaño poblacional alcanza valores cercanos a  $10^{11}$  bacterias/gr (durante la maduración) y una disminución notable entre  $t_{75}$  y  $t_{90}$ ; aunque se debe mencionar que entre estos dos tiempos de conteo ocurrió -- una descompostura del refrigerador, por lo que todas -- las bolsas estuvieron cerca de una semana a una temperatura aproximada de  $30^{\circ}\text{C}$ . La gráfica 5 presenta las curvas de supervivencia de los rizobias en los cinco soportes. Cada punto representa un  $\bar{y}_{ij}$ , expresado como logaritmo decimal.

Los resultados del análisis de varianza (ANDEVA - I) para los soportes esterilizados en autoclave se muestran en el cuadro 15. Los datos de los tratamientos  $S_1$  y  $S_2$  se excluyeron del análisis, por las características de contaminación. Las conclusiones del análisis son: el efecto de la interacción es no significativa, así como tampoco lo es el efecto de los soportes; mientras que -- el efecto de tiempo es significativo a un nivel crítico  $\alpha = 0.01$ .

Se realizó un análisis para determinar autocorrelación por los métodos gráfico y analítico. En ambos ca--

sos se analizaron los residuos de la regresión lineal simple ( $\hat{y}_{ij}$ ) (mínimos cuadrados ordinarios) y los valores observados ( $\bar{y}_{ij}$ ). Los valores residuales ( $\hat{e}_i = \bar{y}_{ij} - \hat{y}_{ij}$ ) se encuentran en la gráfica 6, que visualmente parece indicar autocorrelación positiva, pero no fue -- confirmada por el método analítico pues el estadístico "d" para  $S_4$  y  $S_5$  cae en la región de aceptación de  $H_0$ , mientras que para  $S_3$ , "d" se encuentra en la región de incertidumbre a un nivel crítico de  $\alpha = 0.05$  (Gujarati, 1981).

El análisis de regresión con varias muestras (cuadro 16) confirmó que no existen diferencias significativas entre las pendientes de las curvas de regresión de cada uno de los soportes (Ostle, 1965).

El cuadro 17 contiene los valores de: densidad poblacional media por soporte ( $\bar{y}_{i..}$ ) y densidad poblacional media general ( $\bar{y}...$ ) así como las ecuaciones empíricas de crecimiento poblacional para cada uno de los soportes que se utilizaron para obtener las  $\hat{y}_{ij}$ , así como la ecuación teórica general.

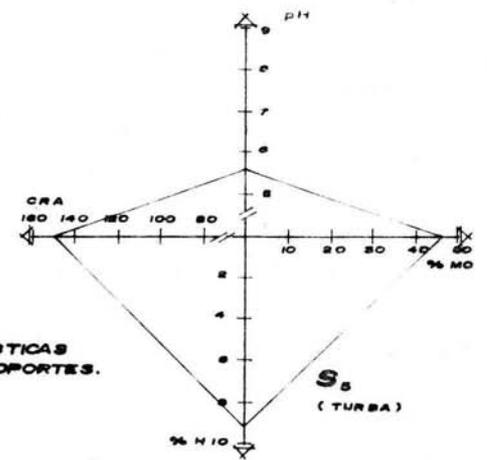
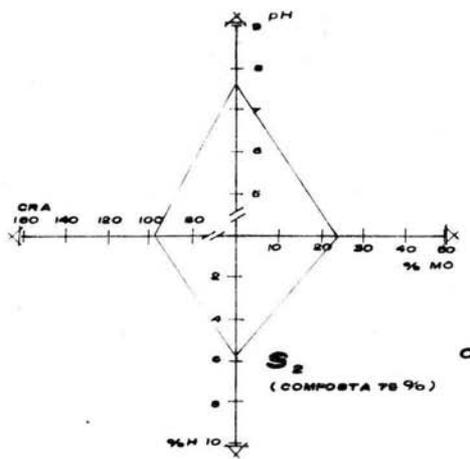
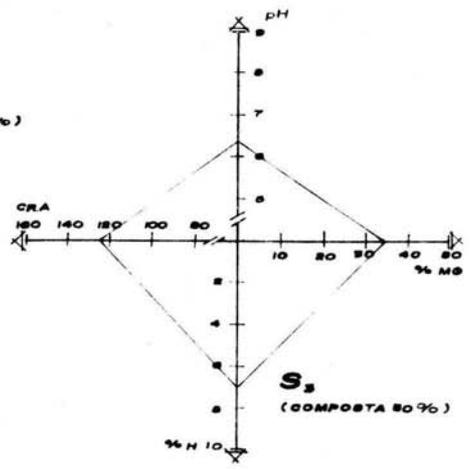
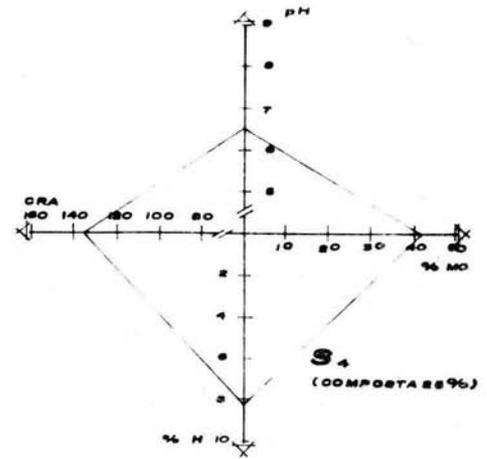
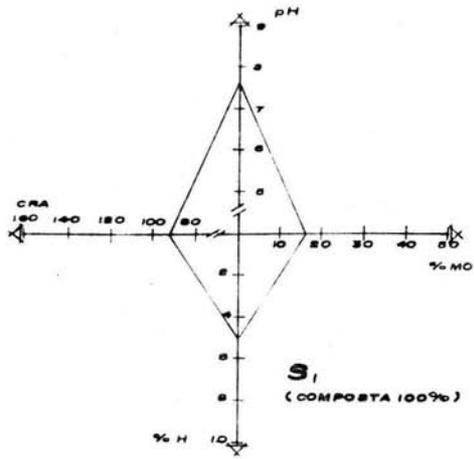
Para los soportes  $SR_1$ ,  $SR_2$  y  $SR_3$  y sus respectivos testigos los valores de densidad poblacional se encuentran en el cuadro 18 y en la gráfica 7 se observan sus curvas de supervivencia. Los valores del ANDEVA II

para estos resultados se proporcionan en el cuadro 19 y las conclusiones son: a) que no existe interacción significativa y b) que la diferencia entre los soportes es no significativa. El valor poblacional medio general -- fue de  $2.855 \cdot 10^9 \pm 0.840 \cdot 10^9$  bacterias/gr.

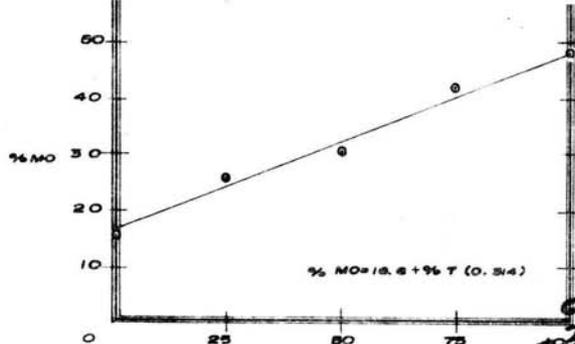
En el cuadro 20 se presenta un resumen de los -- análisis estadísticos efectuados.

SOPORTE	% MO	% H <sub>i</sub>	% CRA	pH	% N	P (ppm)
S <sub>1</sub>	16.5	5.0	90.4	7.7	1.26	112.55
S <sub>2</sub>	25.3	5.9	97.9	7.6	----	-----
S <sub>3</sub>	30.5	6.8	120.0	6.5	----	-----
S <sub>4</sub>	41.5	8.2	136.0	6.6	----	-----
S <sub>5</sub>	47.6	9.1	155.1	5.7	1.61	23.08

CUADRO 8.1 Resumen de características fisicoquímicas en los soportes antes de la inoculación.

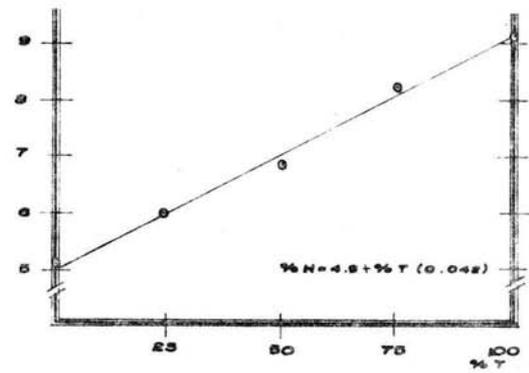


CUADRO 2.2 SILUETAS DE CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LOS SOPORTES.



GRÁFICA 1 PORCENTAJE (%T) VS. PORCENTAJE DE MATERIA ORGÁNICA (%MO) EN LOS SOPORTES.

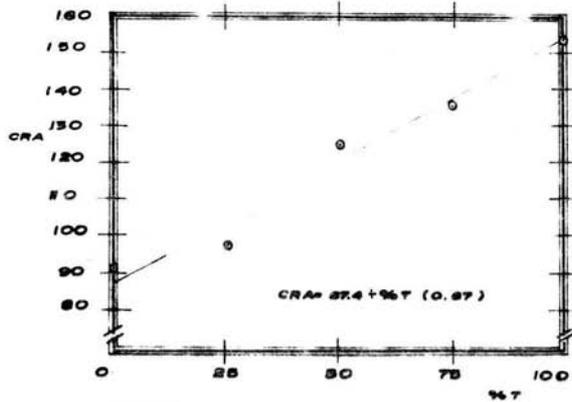
% N



GRÁFICA 2 PORCENTAJE DE TURBIA (%T) VS. PORCENTAJE DE NITRÓGENO (%N) EN LOS SOPORTES.

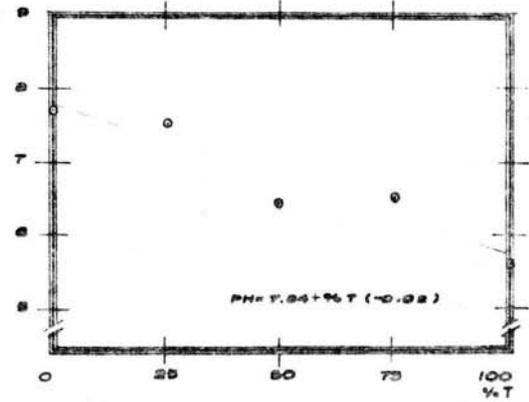


UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA  
LIMA - PERU



GRÁFICA 3 PORCENTAJE DE TURBIA (%T) VS. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA) EN LOS SOPORTES.

pH



GRÁFICA 4 PORCENTAJE DE TURBIA (%T) VS. pH EN LOS SOPORTES.

SOPORTE	pH <sub>0</sub>	pH <sub>135</sub>	RANGO
S <sub>1</sub>	6.98	7.89	-0.92
S <sub>2</sub>	6.83	7.53	-0.67
S <sub>3</sub>	7.22	7.73	-0.48
S <sub>4</sub>	7.16	7.80	-0.64
S <sub>5</sub>	7.34	6.88	0.44

Prueba para parejas de muestras usando el estadístico "t".

$$\lambda = 4; \bar{\Delta} = 0.46; S_{\bar{\Delta}} = 0.54$$

$$t = -1.910; Q(t) > \alpha = 0.05$$

Conclusión: la variación de pH al inicio y al final del período experimental es no significativa.

CUADRO 9. Determinaciones de pH a los soportes durante el período experimental y análisis estadístico de la variación.

SOPORTE	$\%H_{\lambda} \pm E\bar{x}_{\lambda}$	$\%H_0 \pm E\bar{x}_0$	$\%H_{135} \pm E\bar{x}_{135}$
S <sub>1</sub>	5.00 ± 0.21	21.36 ± 1.25	18.17 ± 1.08
S <sub>2</sub>	5.90 ± 0.48	24.27 ± 1.17	16.17 ± 1.57
S <sub>3</sub>	6.75 ± 0.59	57.55 ± 1.16	24.26 ± 1.39
S <sub>4</sub>	8.15 ± 0.50	69.91 ± 1.77	22.17 ± 1.20
S <sub>5</sub>	9.10 ± 0.27	73.01 ± 0.67	34.42 ± 0.87
$\bar{x}$	6.98 ± 0.41	49.22 ± 1.20	23.04 ± 1.22

A) t-student (parejas de datos).

$$t = -3.067; Q(t) < \alpha = 0.05$$

Conclusión: la variación de  $\%H_0$  y  $\%H_{135}$  es significativa con  $\alpha = 0.05$

B) ANDEVA (clasificación simple).

$$F = 12.778; Q(F) < \alpha = 0.01$$

Conclusión: significativa.

C) S.S.R.

$$E\bar{x}_{135} > E\bar{x}_0 > E\bar{x}_{\lambda}$$

$$\Delta_{135-\lambda} = 0.794; Q(\Delta) > \alpha = 0.05$$

$$\Delta_{0-\lambda} = 0.812; Q(\Delta) > \alpha = 0.05$$

$$\Delta_{135-0} = 0.018; Q(\Delta) > \alpha = 0.05$$

Conclusión: la diferencia entre los  $E\bar{y}$  de  $\%H_{135}$  y  $\%H_0$  los hace estadísticamente iguales entre sí y significativamente distintos al  $E\bar{y}(\%H_{\lambda})$ .

Cuadro 10. Análisis Estadístico de los Porcentajes de Humedad (%H) y los Valores del Error Típico ( $E\bar{y}$ ).

CONTEO	$S_1$			$S_2$			CONTAMINACION	
	$\bar{y}_{ijk}$			$\bar{y}_{ijk}$			$S_6$	$S_7$
	1	2	3	1	2	3		
$t_0$	0.450	0.450	0.450	0.575	0.053	0.550	—	—
$t_7$	0.065	0.365	0.390	0.335	2.850	0.650		
$t_{15}$	0.115	0.540*	1.860	1.650	1.550	24.000		
$t_{30}$	1.550*	23.000*	1.150*	0.570	10.950*	1.360	+	-
$t_{45}$	**	15.500*	0.260*	82.500*	6.500	**		
$t_{60}$	7.500*	0.250*	**	6.000	19.000*	2.050*	+	-
$t_{75}$	**	**	**	0.165*	15.000*	0.040*		
$t_{90}$	**	**	**	**	0.195*	0.140*	+	-
$t_{105}$	**	**	**	**	**	**		
$t_{120}$	**	**	**	**	**	**	+	-
$t_{135}$	**	**	**	**	**	**		

\* Muestras Contaminadas. \*\* Muestras Contaminadas sin colonias rizobianas observables.

Cuadro 11. Ocurrencia de la Contaminación en  $S_1$  y  $S_2$  y Resultados Cualitativos en los Testigos  $S_6$  y  $S_7$ .

CONTEO	$y_{ijk}$			$\bar{y}_{ij.}$	$E_{\bar{y}}$	%
	1	2	3			
t <sub>0</sub>	1.400	0.650	1.250	1.100	0.281	25.55
t <sub>7</sub>	2.250	0.200	4.500	2.317	1.521	65.64
t <sub>15</sub>	1.350	4.000	3.900	3.083	1.062	34.45
t <sub>30</sub>	0.090	43.000	130.000	57.697	42.804	80.74
t <sub>45</sub>	7.500	37.000	16.000	20.167	10.737	53.24
t <sub>60</sub>	13.000	38.000	110.000	53.667	35.611	66.36
t <sub>75</sub>	2.850	20.000	20.500	14.450	7.106	49.17
t <sub>90</sub>	2.220	1.000	1.000	0.740	0.318	42.97
t <sub>105</sub>	0.150	0.800	3.600	1.517	1.296	85.43
t <sub>120</sub>	0.450	0.020	1.200	0.557	0.422	75.76
t <sub>135</sub>	0.900	0.075	0.100	0.358	0.332	92.74

CUADRO 12. Valores de densidad poblacional en el soporte S<sub>3</sub> por réplica por conteo ( $y_{ijk}$ ) incluidos -- los valores medios por conteo ( $\bar{y}_{ij.}$ ) con su -- respectivo error típico ( $E_{\bar{y}}$ ) y el valor porcentual del error con respecto a su media (%). Los valores absolutos se multiplican por la exponencial 10<sup>9</sup> y las unidades son bacterias viables por gramo de soporte.

CONTEO	$y_{ijk}$			$\bar{y}_{ij.}$	$E_{\bar{y}}$	%
	1	2	3			
$t_0$	0.865	0.560	0.775	0.733	0.111	15.11
$t_7$	6.550	7.000	6.950	6.833	0.174	2.55
$t_{15}$	87.000	125.000	5.500	72.500	43.173	59.55
$t_{30}$	4.450	195.000	24.000	74.483	74.124	99.52
$t_{45}$	24.500	140.000	34.000	66.167	45.338	68.52
$t_{60}$	54.000	63.000	1.450	39.483	23.507	59.54
$t_{75}$	112.000	3.250	17.500	44.250	41.793	94.45
$t_{90}$	5.000	3.500	4.000	4.167	0.540	12.96
$t_{105}$	3.400	3.550	3.600	3.517	0.074	2.09
$t_{120}$	0.450	6.500	3.000	3.317	2.148	64.76
$t_{135}$	1.000	0.290	2.450	1.247	0.778	62.44

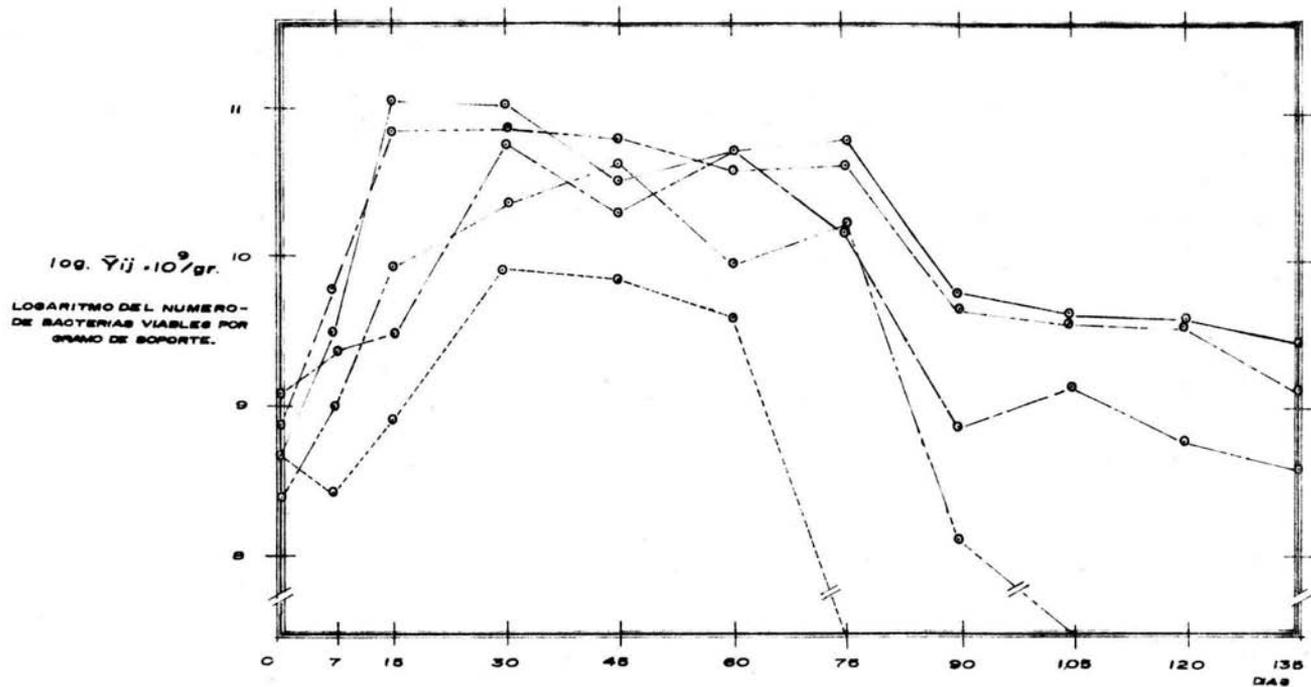
CUADRO 13. Valores de densidad poblacional en el soporte  $S_4$  por réplica por conteo ( $y_{ijk}$ ) incluidos -- los valores medios por conteo ( $\bar{y}_{ij.}$ ) con su -- respectivo error típico ( $E_{\bar{y}}$ ) y el valor porcentual del error con respecto a su media (%). Los valores absolutos se multiplican por la -- exponencial  $10^9$  y las unidades son bacterias viables por gramo de soporte.

CONTEO	$y_{ijk}$			$\bar{y}_{ij}$	$E_{\bar{y}}$	%
	1	2	3			
t <sub>9</sub>	0.450	0.117	0.775	0.447	0.233	52.01
t <sub>7</sub>	2.100	3.600	3.850	3.183	0.669	21.02
t <sub>15</sub>	280.000	57.000	22.500	119.833	98.837	82.48
t <sub>30</sub>	3.300	285.000	38.000	108.767	108.616	99.86
t <sub>45</sub>	27.000	59.500	13.500	33.333	16.719	50.16
t <sub>60</sub>	70.000	36.000	59.500	55.167	12.310	22.31
t <sub>75</sub>	89.000	5.500	107.500	67.333	38.426	57.07
t <sub>90</sub>	7.500	3.400	7.000	5.967	1.582	26.51
t <sub>105</sub>	3.650	3.400	4.000	3.817	0.368	9.64
t <sub>120</sub>	0.850	5.000	4.500	3.450	1.602	46.43
t <sub>135</sub>	3.500	1.950	2.000	2.483	0.623	25.08

**CUADRO 14.** Valores de densidad poblacional en el soporte S<sub>5</sub> por réplica por conteo ( $y_{ijk}$ ) incluidos -- los valores medios por conteo ( $\bar{y}_{ij}$ ) con su -- respectivo error típico ( $E_{\bar{y}}$ ) y el valor porcentual del error con respecto a su media (%). Los valores absolutos se multiplican por la exponencial 10<sup>9</sup> y las unidades son bacterias viables por gramo de soporte.

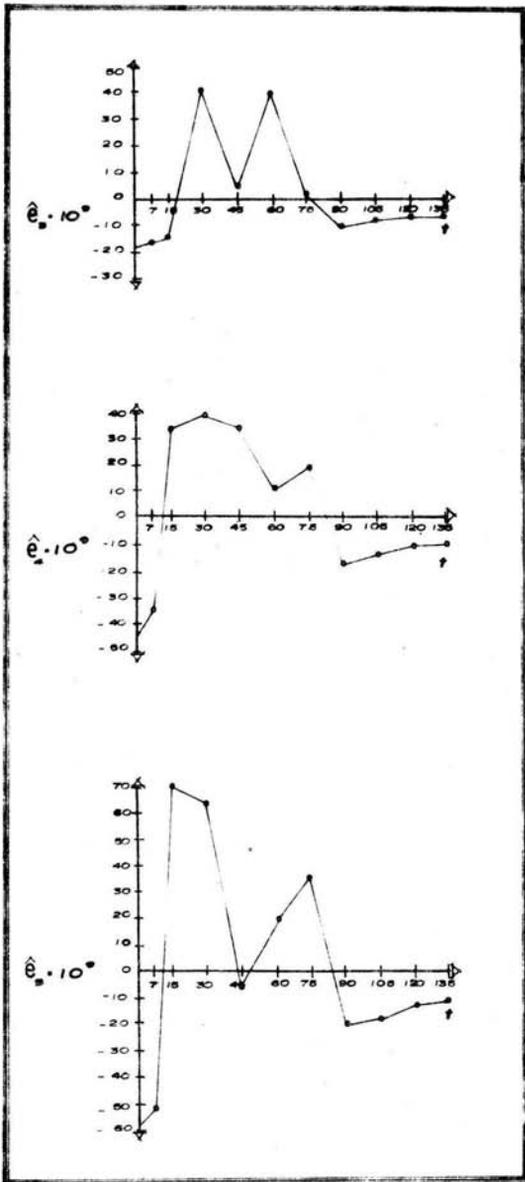
FUENTES DE VARIACION	$\lambda$	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	$\alpha$
SOPORTES	2	$8.644 \cdot 10^{21}$	$4.322 \cdot 10^{21}$	1.837	$p > 0.05$
TIEMPO	10	$7.909 \cdot 10^{22}$	$7.909 \cdot 10^{21}$	3.361	$p < 0.01$
INTERACCION	20	$2.425 \cdot 10^{22}$	$1.213 \cdot 10^{21}$	0.515	$p > 0.05$
ERROR RESIDUAL	66	$1.553 \cdot 10^{23}$	$2.353 \cdot 10^{21}$	-----	-----
TOTAL	98	$2.673 \cdot 10^{23}$	-----	-----	-----

CUADRO 15. Análisis de Varianza (ANDEVA I) para los Soportes Esterilizados por Calor Húmedo.



GRAFICA 5 CURVAS DE SUPERVIVENCIA DE *Rhizobium phaseoli*:

- S<sub>1</sub> (COMPOSTA 100%)
- S<sub>2</sub> (COMPOSTA 75%)
- S<sub>3</sub> (COMPOSTA 50%)
- S<sub>4</sub> (COMPOSTA 25%)
- S<sub>5</sub> (TURBA)



GRAFICA 6 RESIDUOS ( $\hat{e}_t$ ) DE LAS DIFERENCIAS DE LOS VALORES DE REGRESION ( $\hat{Y}_{ij} - \hat{Y}_{.j}$ ) CONTRA EL TIEMPO (t) EN DIAS.

GRUPOS	$\Sigma X^2$	$\Sigma Y^2$	$\Sigma XY$	$\Sigma Y^2 - (\Sigma XY)^2 / \Sigma X^2$		$\Sigma \hat{e}_t^2$	$\Sigma \hat{e}_t \cdot \hat{e}_{t-1}$	d
S <sub>3</sub>	385	6843.972	643.186	5769.457	- - - -	4475.564	634.019	1.717
S <sub>4</sub>	385	18788.527	1202.493	15032.710	- - - -	8415.177	3905.115	1.072
S <sub>5</sub>	385	34957.002	1510.500	29030.741	- - - -	17755.607	3933.423	1.558
R E G R E S I O N P O N D E R A D A				49832.908				
REGRESION COMUNAL	11555	60589.500	3356.179	50837.173				

$$F_0 = 0.2721 < 3.35 F_{(\alpha = 0.05, \lambda = 2.27)}$$

CUADRO 16.1 Prueba estadística de la regresión de varios grupos y el valor obtenido del estadístico "F<sub>0</sub>" inferior al valor de "F" de tablas con  $\alpha = 0.05$  y  $\lambda = 2,27$

CUADRO 16.2 Prueba estadística para determinar -- autocorrelación.

DENSIDAD MEDIA POBLACIONAL  
 $(\bar{y}_{i..} \pm E\bar{y}) \cdot 10^9$ .

ECUACION EMPIRICA DE CRECIMIENTO  
 POBLACIONAL.

S<sub>3</sub> 15.042 ± 10.599

$$\hat{y}_{j.} \cdot 10^9 = 20.686 - 0.104 x^*$$

S<sub>4</sub> 30.291 ± 17.301

$$\hat{y}_{j.} \cdot 10^9 = 46.605 - 0.287 x^*$$

S<sub>5</sub> 36.695 ± 24.688

$$\hat{y}_{j.} \cdot 10^9 = 60.512 - 0.384 x^*$$

$$(\bar{y}_{...} \pm E\bar{y}) \cdot 10^9 = 26.549 \pm 9.555$$

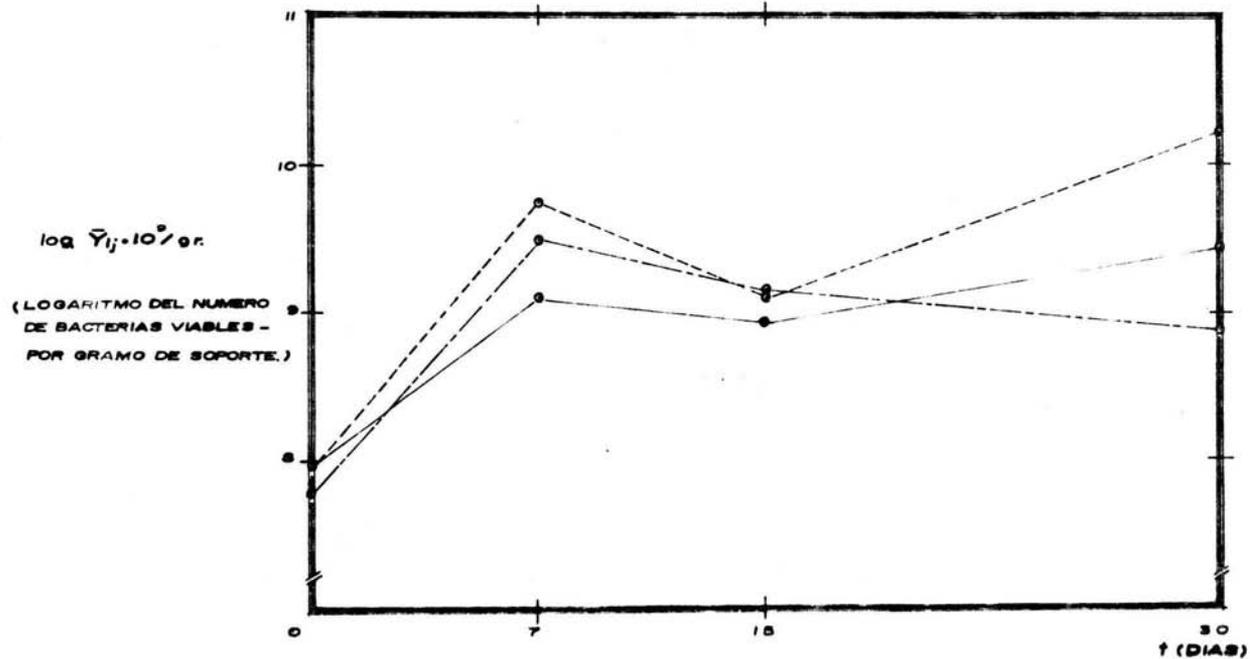
$$\hat{y}_{.j.} \cdot 10^9 = 42.598 - 0.259 x^*$$

\*x Número de días a partir de la preparación, indicado por el subíndice de t<sub>x</sub>.

CUADRO 17. Parámetros poblacionales de *Rhizobium phaseoli*. Se indican respectivamente para cada soporte y en conjunto: Densidad Media Poblacional ( $\bar{y}_{i..} \pm E\bar{y}$ ,  $\bar{y}_{...} \pm E\bar{y}$ ) y la relación empírica de Crecimiento Poblacional ( $\hat{y}_{j.} \cdot 10^9$ ,  $\hat{y}_{.j.} \cdot 10^9$ ) obtenida del ajuste por el método de Regresión Lineal Simple por Mínimos Cuadrados.

CUADRO 18. Densidad poblacional en los soportes SR<sub>1</sub>, SR<sub>2</sub> y SR<sub>3</sub> por réplica-tiempo-soporte ---- ( $y_{ijk}$ ). Densidad media poblacional por soporte-conteo ( $\bar{y}_{ij}$ ) al finalizar los conteos ( $\bar{y}_{i..}$ ) y valor medio general ( $\bar{y}...$ ) Se incluyen las observaciones de los testigos de contaminación. Todos los valores se multiplican por la exponencial  $10^9$  y las unidades son bacterias por gramo de soporte.

CONTEO	SR <sub>1</sub>	SR <sub>2</sub>	SR <sub>3</sub>	TESTIGOS		
	$y_{ijk}$	$y_{ijk}$	$y_{ijk}$	SR <sub>4</sub>	SR <sub>5</sub>	SR <sub>6</sub>
t <sub>0</sub>	0.040	0.050	0.205			
	0.020	0.095	0.045			
	0.100	0.100	0.030			
$\bar{y}_{ij}$	0.053	0.082	0.093			
	$\pm$	$\pm$	$\pm$			
	0.029	0.019	0.069	-	-	-
t <sub>7</sub>	4.000	3.000	1.650			
	1.500	4.500	1.650			
	4.000	9.500	0.500			
$\bar{y}_{ij}$	3.167	5.667	1.267			
	$\pm$	$\pm$	$\pm$			
	1.021	2.407	0.469	-	-	-
t <sub>15</sub>	1.750	1.400	0.500			
	1.850	1.500	2.000			
	1.000	1.050	0.100			
$\bar{y}_{ij}$	1.533	1.317	0.867			
	$\pm$	$\pm$	$\pm$			
	0.329	0.167	0.708	-	-	-
t <sub>30</sub>	0.650	11.000	6.700			
	1.150	3.500	1.300			
	0.300	35.000	1.050			
$\bar{y}_{ij}$	0.700	16.500	3.017			
	$\pm$	$\pm$	$\pm$			
	0.302	11.635	2.257	-	-	-
$\bar{y}_{i..}$	1.363	5.891	1.311			
	$\pm$	$\pm$	$\pm$			
	0.419	2.969	0.553			
$\bar{y}_{...}$	2.855 $\pm$ 1.012					



GRAFICA 7 CURVAS DE SUPERVIVENCIA DE *Rhizobium phaseoli*;

----- SR<sub>1</sub> (COMPOSTA 100%)  
 - - - - - SR<sub>2</sub> (COMPOSTA 75%)  
 \_\_\_\_\_ SR<sub>3</sub> (TURBA)

FUENTE DE VARIACION	$\lambda$	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	$\alpha$
SOPORTE	2	$1.166 \cdot 10^{20}$	$8.297 \cdot 10^{19}$	3.358	$p > 0.05$
TIEMPO	3	$2.311 \cdot 10^{20}$	$7.704 \cdot 10^{19}$	3.318	$p < 0.05$
INTERACCION	6	$3.008 \cdot 10^{20}$	$5.013 \cdot 10^{19}$	2.029	$p > 0.05$
ERROR RESIDUAL	24	$5.930 \cdot 10^{20}$	$2.471 \cdot 10^{19}$		
TOTAL	35	$1.291 \cdot 10^{21}$			

CUADRO 19. Análisis de Varianza (ANDEVA II) para los soportes este  
rilizados por radiación gamma (SR).

CUADRO 20. RESUMEN DE ANALISIS ESTADISTICOS.

INFERENCIA ESTADISTICA Y OBJETIVO.	HIPOTESIS	VALOR DEL ESTADISTICO OBTENIDO.	SIGNIFICACION DESCRIPTIVA	CONCLUSION
<p>- ANALISIS DE REGRESION. Determinar si el coeficiente de correlación es significativo para la relación empírica entre el contenido de -- turba en el soporte y las siguien-- tes variables.</p>				
% MO	$H_0: \rho=0, H_A: \rho \neq 0$	t = 5.867	p < 0.01	Se rechaza $H_0$ → Correlación Significativa.
% H	$H_0: \rho=0, H_A: \rho \neq 0$	t = 7.000	p < 0.01	Se rechaza $H_0$ → Correlación Significativa.
CRA	$H_0: \rho=0, H_A: \rho \neq 0$	t = 3.706	p < 0.05	Se rechaza $H_0$ → Correlación Significativa.
pH	$H_0: \rho=0, H_A: \rho \neq 0$	t = -1.701	p > 0.05	No se rechaza $H_0$ → Co-- rrelación No Significati-- va.
<p>- PRUEBA PARA PAREJAS DE MUESTRAS. Estimar si el cambio de pH en los inoculantes al inicio y al final del desarrollo experimental fue -- significativo</p>				
- PRUEBA PARA PAREJAS DE MUESTRAS	$H_0: \bar{\Delta}=0, H_A: \bar{\Delta} \neq 0$	t = -1.910	p > 0.05	No se rechaza $H_0$ → Dife-- rencias No Significati-- vas. (*)

<p>Estimar si el cambio de %H en los inoculantes al inicio y al final del desarrollo experimental fue - significativo.</p>	$H_0: \bar{\Delta} = 0, H_A: \bar{\Delta} \neq 0 \quad t = -3.067 \quad p < 0.05$	<p>Se rechaza <math>H_0</math> → Diferencias Significativas. (*)</p>
<p>- ANALISIS DE VARIANZA (Diseño Completamente Aleatorizado). Determinar si el cambio en el error típico de las determinaciones de humedad varió significativamente al - final del desarrollo experimental con respecto a las determinaciones pre y post inoculación.</p>	$H_0: \Sigma \epsilon = 0, H_A: \Sigma \epsilon \neq 0 \quad F = \quad p < 0.01$	<p>Se rechaza <math>H_0</math> → Diferencias Significativas.</p>
<p>- PRUEBA DE RANGO MULTIPLE. Establecer si la diferencia entre las medias del error típico, en la determinación de humedades, son significativamente distintas.</p>	$H_0: \bar{\epsilon}_1 = \bar{\epsilon}_2 = \bar{\epsilon}_3 \quad \Delta_3 = 0.794 \quad p < 0.05$ $H_A: \bar{\epsilon}_1 \neq \bar{\epsilon}_2 \neq \bar{\epsilon}_3$	<p>Se rechaza <math>H_0</math> → la media mayor es significativamente distinta de la menor.</p>
	$H_0: \bar{\epsilon}_1 = \bar{\epsilon}_2 \quad \Delta_2 = 0.812 \quad p < 0.05$ $H_A: \bar{\epsilon}_1 \neq \bar{\epsilon}_2$	<p>Se rechaza <math>H_0</math> → la media menor es significativamente distinta de la inmediata mayor.</p>
	$H_0: \bar{\epsilon}_2 = \bar{\epsilon}_3 \quad \Delta_2 = 0.018 \quad p > 0.05$ $H_A: \bar{\epsilon}_2 \neq \bar{\epsilon}_3$	<p>No se rechaza <math>H_0</math> → la media mayor y la inmediata me</p>

- ANALISIS DE VARIANZA (Factorial).

Determinar si existen diferencias significativas entre los soportes y/o si existe alguna interacción significativa de tiempo-soporte sobre las poblaciones de *R. phaeoli*.

$$H_0: \Sigma\alpha=0, H_A: \Sigma\alpha \neq 0 \quad F = 1.837 \quad p > 0.05$$

$$H_0: \Sigma\alpha\beta=0 \quad F = 0.515 \quad p > 0.05$$

$$H_A: \Sigma\alpha\beta \neq 0$$

nor son iguales.

No se rechaza  $H_0$  + no hay diferencias significativas en el efecto de los soportes.

No se rechaza  $H_0$  + no existe interacción significativa.

- ANALISIS DE AUTOCORRELACION. Para los soportes.

$$H_0: \bar{\rho}=0, H_A: \bar{\rho} \neq 0 \quad \alpha=0.05$$

$S_3$   
 $S_4$

$$d = 1.717 \quad 4-d_\mu < d < 4-d_1$$

$$d = 1.072 \quad d < 4-d_\mu$$

No es concluyente.

Se acepta  $H_0$  + no hay autocorrelación.

$S_5$

$$d = 1.558 \quad d < 4-d_\mu$$

Se acepta  $H_0$  + no hay autocorrelación.

- ANALISIS DE REGRESION (Para varias muestras). Determinar si las pendientes en varias muestras pertenecen a la misma población.

$$H_0: \rho_1 = \rho_2 = \rho_3 \quad F = 0.2721 \quad p > 0.05$$

$$H_A: \rho_1 \neq \rho_2 \neq \rho_3$$

No se rechaza  $H_0$  + no hay diferencias significativas entre las pendientes.

- ANALISIS DE VARIANZA (Factorial).

$$H_0: \Sigma\alpha=0 \quad F = 3.358 \quad p > 0.05$$

No se rechaza  $H_0$  + no hay diferencias significativas.

Determinar si existen diferencias significativas entre los soportes irradiados y/o si existe alguna interacción significativa de tiempo-soporte sobre las poblaciones de *R. phaseoli*.

$$H_A: \Sigma \alpha \neq 0$$

$$H_0: \Sigma \alpha \beta = 0$$

$$H_A: \Sigma \alpha \beta \neq 0$$

$$F = 2.029 \quad p > 0.05$$

diferencias significativas para el efecto de los soportes.

No se rechaza  $H_0$  → No interacción significativa.

---

(\*) Pruebas de Dos Colas.

Entre las características fisicoquímicas de la turba, que la hacen el soporte usado con mayor frecuencia a nivel mundial en la industria de los inoculantes, se encuentran su contenido de nutrimentos y su elevada proporción de materia orgánica que a su vez determinan --- otras propiedades importantes como v. gr. la capacidad de retención de agua o la capacidad amortiguadora, y que en conjunto mantienen viables y genéticamente estables a poblaciones rizobianas por lapsos prolongados, brindándoles protección ante variaciones ambientales v. gr., cambios de pH y desecación (Date, 1976); pero como se indicó la turba puede resultar costosa. Por tanto, ante la necesidad de producir inoculantes se trabaja con diversos materiales con la finalidad de encontrar un excipiente idóneo para reemplazarla y su evaluación implica que previamente cumplan con algunos requisitos además - de algunas variables fisicoquímicas básicas, tales como: a) que tal material sea asequible con facilidad, de preferencia localmente; b) sin complicaciones para procesar y esterilizar o en todo caso que no contenga microorganismos contaminantes, patógenos o que pudiesen competir con los rizobia por los nutrimentos; c) que no sea tóxico, o dicho de otra forma, que se encuentre li-

bre de contaminantes como metales pesados, pesticidas, derivados de polivinilo, cianuro, arsénico y vidrio entre otros; finalmente d) que sea barato (Graham *et. al.*, 1974). De ahí que al observar algunas características de las compostas del proceso SIRDO (Cuadro 2) se consideró la posibilidad de emplearlas como soporte para inoculantes, ya que inicialmente cumplen con algunas de las cualidades deseadas al poseer, en promedio, una elevada proporción de materia orgánica ( $\%MO = 35.5 \pm 2.5$ ) aunque no tan alta como la de la turba usada en Australia donde  $\%MO = 86.6$  (Burton, 1981); además por su contenido de nutrientes se consideran ricas en macroelementos (N, P, K, Ca y Mg) y muy ricas en algunos microelementos (Cu, Mn, Zn y B), contraindicándose concentraciones elevadas de Fe y Na. En general se le tiene como un abono de buena calidad (SARH-CONAFRUT, 1981) y desde el punto de vista sanitario es aceptable (SSA, 1981)(Anexo 5). Por otro lado, como material alternativo posee el atractivo de que podría adquirirse fácilmente en distintas localidades al funcionar el SIRDO en varias partes de la República (+); es también un material barato com-

---

(+) SIRDO HUMEDO. En operación: Col. Mercedes Barrera, Mérida, -- Yuc. (2 unidades, 24 familias); Col. México Nuevo, Atizapán -- de Zaragoza, Edo. de México (1 unidad, 80 familias).

En construcción: Tepepan, Xochimilco, D.F. (1 -- unidad, 20 familias); Liberación del Pueblo, USSCOVI, Tlalpan, D.F. (58 familias).

En proyecto: El Molino, Iztapalapa, D.F. (1340 familias); Col. Bosques del Pedregal, Ajusco, D.F., Manzana -- 20 Sector 3 (10 familias); Los Reyes, Edo. de México (320 fa-

parado con la turba, comercializándose el kilogramo de composta como abono a \$40.00 mientras que el kilogramo de turba cuesta aproximadamente \$200.00 (++) lo que podría significar una disminución en el costo de producción de inoculantes en el país y con la ventaja adicional de hacer más rentable al SIRDO, lo que representa una buena alternativa para mejorar las condiciones sanitarias al evitar la inapropiada acumulación de desechos sólidos y líquidos en zonas carentes de drenaje y colecta de basura.

Para la realización de este trabajo se eligió la cuarta cosecha por ser la más reciente y la que menores posibilidades tiene de haber sufrido degradación de materia orgánica en el almacén (Muñoz, 1984), aunque su contenido de materia orgánica era el más bajo de las cuatro cosechas (Cuadro 2), por lo que se decidió combinarla con turba nacional tratando de mejorar su calidad orgánica.

De acuerdo a la descripción metodológica, la primera parte del trabajo se dedicó a evaluar las caracterís

---

mías (Mena, 1983).

(++) Precios de 1983 al iniciar el presente trabajo (Mena, 1983 & Ríbera, 1985).

ticas fisicoquímicas de los materiales a fin de conocer sus condiciones iniciales y determinar en las pruebas - más rápidas y sencillas como pH, %MO, %H y CRA si dichas variables en las mezclas turba-composta seguían un patrón aditivo, de acuerdo con la proporción de sus componentes, confirmada por las correlaciones y sus niveles de significación, lo que permitió que pruebas más - costosas y/o laboriosas como las de nitrógeno total, potasio y metales pesados pudiesen practicarse exclusivamente a la turba y la composta, logrando calcularse por interpolación los valores deseados en sus mezclas.

La determinación de %MO realizada en el laboratorio (16%) fue inferior al 22% reportado inicialmente -- por la SARH para la cuarta cosecha, lo que parece indicar que la degradación orgánica en la composta continúa durante el período de almacenamiento, por lo que sería recomendable confirmarlo y en todo caso determinar la - tasa de descomposición de materia orgánica con el fin - de obtener un mejor control de calidad.

El %MO en los soportes está relacionado proporcionalmente con su contenido de turba y como una consecuencia el %H y la CRA siguen comportamientos similares; -- así la CRA en la composta fue del 90.4% mientras que en la turba nacional fue de 155.1%, aunque en la turba usada en Australia la CRA puede llegar a ser de hasta 300%

(Burton, 1981), pero su contenido de materia orgánica - puede ser de casi el doble del de la turba mexicana; -- por lo tanto, las cantidades de agua agregadas al soporte después del inóculo para lograr la consistencia esponjosa necesaria fueron de 0 hasta 3.2 ml en cada 10 g de soporte, determinando que los %H<sub>0</sub> variasen ampliamente y, tal vez con ello, la potencial vida media del soporte al disminuir la disponibilidad de agua. Así la  $\Delta\%H_0$  fue de 25.39%, encontrándose ya en S<sub>3</sub> valores cercanos al 60 - 70% deseables al preparar inoculantes --- (Roughley & Pulsford, 1982). La adición diferencial de agua se realizó debido a que al agregar inicialmente un "stock" bacteriano constante en el soporte (2.5 ml por 10 g) la composta (S<sub>1</sub>) llegaba a la saturación húmeda, mientras que la turba (S<sub>5</sub>) quedaba demasiado seca, optando entonces por mantener constante la máxima cantidad de agua en cada soporte en lugar de la cantidad absoluta de agua agregada.

Por otro lado, a lo largo del desarrollo experimental se detectaron gran cantidad de bolsas (>60%) en las que el sellado por calor fue más o menos imperfecto debido a que la bolsa en ocasiones era derretida por el aparato, dejando pequeños orificios, lo que se pensó -- provocaría una pérdida heterogénea de la humedad además del consecuente aumento en la evaporación. Por lo que se decidió no sólo determinar si la cantidad de agua en

Los soportes en  $t_{135}$  era significativamente diferente a la de  $t_0$ , sino que también probar si, debido a la azarosa imperfección en el sellado de las bolsas, se incrementaba la variación media ( $E\bar{x}$ ) no sólo entre  $t_0$  y  $t_{135}$  sino también de las determinaciones de  $\%H_2$  a los soportes en bruto. Aunque la conclusión estadística indica que las pérdidas de agua son significativas, por lo que probablemente habría que buscar una forma de sellado más efectiva tal como practicar varios dobleces a la bolsa y mantenerlos con una cinta adhesiva, no podría atribuirse exclusivamente a la forma de sellar los cambios de humedad lo que es corroborado por el análisis de los  $E\bar{x}$ 's, siendo plausible la posibilidad de la existencia de alguna variable no cuantificada al producir el inoculante, tal como la influencia de la esterilización por calor húmedo en forma no homogénea en los  $\%H_2$  antes de agregar el inóculo pues se observó que, en diferentes grados, el polvo se humedeció a pesar de haber sido esterilizado en frascos con tapón de sello de goma, teniendo que recurrir a utilizar una espátula estéril para raspar las paredes del frasco en el momento de vaciar el polvo a las bolsas, ya que quedaba adherido al vidrio debido básicamente a la humedad adquirida durante la esterilización.

Una práctica común en la producción de inoculantes a base de turba se refiere a su neutralización con  $\text{CaCO}_3$

(Roughley, 1981) ya que el desarrollo óptimo de *Rhizobium spp.* se obtiene en un rango de  $6.5 \leq \text{pH} \leq 7.0$  (Vargas, 1969), no obstante en el caso del presente trabajo debido al pH básico de la composta se consideró la posibilidad de neutralizar las combinaciones que resultasen con esta característica utilizando para ello ácido clorhídrico. Los resultados fueron satisfactorios para estos soportes ( $S_1$  y  $S_2$ ), pero curiosamente en los soportes ácidos ( $S_3$ ,  $S_4$  y  $S_5$ ), a los que se les agregó  $\text{Ca(OH)}_2$  en lugar de  $\text{CaCO}_3$  por ser el primero un poco más soluble, los valores de pH fueron superiores a 7.0, debido posiblemente a los efectos combinados del  $\text{Ca(OH)}_2$  en el soporte y el  $\text{CaCO}_3$  del medio (ELMRC, Cuadro 4). De cualquier forma la capacidad amortiguadora de la turba, también relacionada con su mayor proporción de materia orgánica, quedó manifiesta al finalizar el período experimental al ser el único soporte que quedó dentro del rango óptimo, contra la tendencia generalizada al aumento de pH en los otros soportes; sin embargo, esta elevación, de acuerdo con la conclusión del análisis estadístico, no produce efectos de consideración. Finalmente debe mencionarse que este punto es controversial. Para algunos autores como Sparrow & Ham (1983) el pH no es un factor primordial mientras que para Date (1976) es uno de los parámetros que determinarán la calidad del inoculante.

La presencia de hongos y bacterias contaminantes - en los soportes  $S_1$  y  $S_2$  condicionó su exclusión definitiva del ANDEVA I, aunque en un principio se consideró la posibilidad de incluirlos aún con el riesgo de sesgar la comparación, ya que los valores de bolsas contaminadas podrían estimarse a partir de las muestras no contaminadas de la misma intersección tiempo-soporte, - pero al constituirse la mencionada contaminación en una característica sistémica en ambos soportes y al no realizarse diluciones inferiores a  $1:10^6$ , por considerar - que una densidad menor a  $1 \cdot 10^6$  bacterias por gramo estaría por abajo del límite de calidad (Muñoz, 1984), se - decidió eliminarlos del análisis con la intención de tener un modelo estadístico balanceado y evitar pérdidas en el nivel de confiabilidad del mismo (Méndez, 1981).

Del análisis de  $S_3$ ,  $S_4$  y  $S_5$  se concluyó que no --- existió alguna combinación tiempo-soporte estadísticamente distinta de otras, lo que no subordinó la comprobación de la hipótesis acerca de la igualdad de tratamientos específicamente (Daniel, 1979) pues el efecto - significativo del tiempo no es de interés primordial y de hecho se esperaba rechazar la hipótesis nula número 2 (Anexo 3) (Durán, 1985), ya que en el análisis se incluyen densidades poblacionales correspondientes a las fases de inoculación, maduración y almacenaje en los -- cuales existen grandes variaciones del tamaño poblacio-

nal.

El ANDEVA I realizado no permite rechazar la hipótesis nula del efecto de los soportes; sin embargo, no dejan de llamar la atención dos hechos: el primero de ellos es que las medias individuales en cada tratamiento siguen un orden de magnitud que posiblemente esté correlacionado positivamente con la proporción de turba en el soporte como lo están las características fisicoquímicas más favorables para el desarrollo de los rizobios, ya que en la composta la cantidad de materia orgánica y la capacidad de retención de agua son bajas y, como ya se indicó, las combinaciones muestran caracteres proporcionales a las de sus componentes; además, en la composta existen elevadas concentraciones de Fe que podría actuar como inhibidor del crecimiento microbiano (Muñoz, 1984). El segundo de los hechos es que los valores del error de las medias ( $\bar{y}_{ij}$ ) en general son elevados; la comparación puede realizarse ya que los  $E_{\bar{y}}$  se presentan como porcentajes de sus  $\bar{y}_{ij}$ , para evitar confusiones debidas a las escalas, y puesto que el análisis de varianza es muy sensible a la variación individual de cada medición —tanto que el efecto de los factores podría quedar enmascarado por el alto valor del error— que podría achacarse a diversas variables no controladas tales como: a) el sellado imperfecto de las bolsas, que originalmente se pensó ocasionaría evaporación e in

tercambio gaseoso heterogéneos en las bolsas que a su vez sería factible de correlacionar con las variaciones entre réplicas, no obstante esta suposición no pudo comprobarse pues como se indicó, los  $F\bar{x}$  de las determinaciones de BH fueron estadísticamente iguales al iniciar y al finalizar los conteos y; b) el método de cuenta viable en placa, aunque puede economizar tiempo y recursos tanto humanos como materiales y monetarios (Hernández, 1980), es indirecto y provee una fuente considerable de error (Odum, 1972) ya que los valores obtenidos están dados por muestras tomadas de muestras en un proceso iterativo desde el gramo de soporte tomado de cada bolsa hasta la última alícuota de una serie de por lo menos cinco diluciones sucesivas. Por lo tanto, se aplicó un análisis para detectar una posible autocorrelación que enmascarase el efecto de los soportes, que al no resultar significativa permitió utilizar el análisis de regresión para varias muestras (Ostle, 1965) empleando exclusivamente los valores de cada intersección soporte-tiempo ( $\bar{y}_{ij}$ ) a fin de evitar el efecto de las variaciones individuales. La conclusión de este último análisis no fue distinta de la conclusión del ANDEVA I, por lo tanto se acepta que las diferencias entre los soportes es meramente azarosa; no obstante debe recordarse que éste último análisis es menos sensible que el ANDEVA I, por lo tanto no debe dejar de considerarse la posibilidad que de haber realizado un diseño experimen-

tal con mayor sensibilidad (tal vez un mayor número de muestras), se podrían haber puesto de manifiesto diferencias que en estos análisis no fueron significativas (Vargas, 1985).

Las normas de calidad convencionales indican que, en Australia, para un inoculante a base de turba, es aceptable un valor de  $2000 \cdot 10^6$  bacterias/gramo por un lapso no inferior a 6 meses (Roughley, 1981); sin embargo, puesto que en México no existe reglamentación al respecto (Muñoz, 1984) y ante la proliferación de inoculantes a base de una gran diversidad de materiales alternativos a la turba, lo mejor es indicar, en estos casos, las características individuales tanto de densidad poblacional como de caducidad (Burton, 1931), por lo que ante las conclusiones estadísticas en este trabajo, puede decirse que un inoculante a base de composta y turba combinadas en proporciones de hasta 1:1 (50% - 50%), mantiene viables hasta por 135 días poblaciones bacterianas de *Rhizobium phaseoli* CIAT-632 en una densidad de  $2.655 \cdot 10^{10} \pm 0.955 \cdot 10^{10}$  bacterias/gramo y de acuerdo con la ecuación empírica general la población no alcanzaría una densidad inferior a los  $2 \cdot 10^9$  bacterias/gramo antes de 156 días, no obstante éste último aserto debe verificarse empíricamente puesto que el coeficiente de correlación resultó menor a -0.9. Finalmente queda agregar que el uso de una formulación como la

descrita en este párrafo tendría la ventaja adicional - de no requerir del proceso de neutralización debido a - su pH casi neutro.

Es posible que el promedio general de los soportes hubiese sido mayor de no haber existido la elevación in controlada de la temperatura entre  $t_{75}$  y  $t_{90}$  y cuyo --- efecto tal vez haya sido la causa del colapso poblacio- nal entre estos dos tiempos, pues esta fue la única va- riación conspicua a la cual podría achacarse el fenóme- no; además de que al restaurar la temperatura a  $4^{\circ}\text{C}$  los conteos indicaron que el decremento poblacional conti-- nuó en forma muy similar a la que se observaba antes -- del accidente.

La esterilización por calor húmedo en la produc--- ción de inoculantes a base de turba es la mejor manera para obtener cultivos puros de *Rhizobium spp.* (Roughley & Pulsford, 1982), por tal motivo en este trabajo se -- eligió dicho método con una variación, que consistió de un aumento en la dosis de 1 a 4 horas, ya que la compos<sub>ta</sub> por su origen es evidente que debe tener asociados - microorganismos termofílicos y/o esporogénicos, puesto que en el proceso productivo se llegan a alcanzar tempe- raturas cercanas a los  $60^{\circ}\text{C}$  (Mena, 1983). No obstante a pesar de la esterilización la contaminación biológica - no pudo ser evitada y es muy difícil explicar su presen

cia y su origen, lo que sí es notable es el patrón de aparición y ocurrencia que parece seguir una relación inversa a la cantidad de la composta en el soporte más de tipo temporal y cualitativa que cuantitativa, ya que la contaminación se detectó gradualmente primero en algunas bolsas del soporte  $S_1$  que aumentaron su número en el transcurso del tiempo, a la par que se iniciaba en el soporte  $S_2$  para convertirse finalmente en un fenómeno generalizado en ambos tratamientos, mientras que en  $S_3$ , el soporte con mayor cantidad de composta después de los anteriores, también se encontraron algunas bolsas contaminadas, aunque su número fue irrelevante (<10%).

Estos resultados podrían ser los hechos más relevantes para emitir una posible explicación, y aunque es muy aventurado afirmarlo, la evidencia sugiere que la composta podría mantener algunos microorganismos esporulados que resistieron la esterilización y que proliferaron en la fase de maduración en condiciones para ellos más adecuadas. Otra evidencia a favor de ésta hipótesis es la ausencia de contaminantes en los soportes irradiados. La posibilidad de que la contaminación ocurriese por la manipulación de las bolsas, durante la adición de la cepa o al tomar las muestras, se considera poco probable ya que de lo contrario habría afectado a todas las bolsas distribuyéndose aleatoriamente por todos los soportes y no básicamente en aquéllos con mayor canti-

dad de composta, reforzando esta consideración el hecho de que en las bolsas testigo de la composta ( $S_6$ ) la contaminación fue positiva y del mismo tipo que en  $S_1$  y en  $S_2$ , mientras que en el testigo de la turba ( $S_7$ ) no hubo contaminación. A la luz de estos resultados se consideró necesario haber tenido testigos para cada uno de los soportes y no sólo para  $S_1$  y  $S_5$ . Ramírez (1982) al evaluar compostas de origen rural y urbano, esta última similar a la composta del SIRDO, no reporta (sin indicar lo contrario) la presencia de microorganismos contaminantes.

Debido a la especial morfología de las colonias de crecimiento extenso encontradas ocasionalmente en algunas cajas, se sospechó de un caso de pleomorfismo, característica común del género *Rhizobium* spp. (Vargas, -1969); desafortunadamente no fue posible inducir nodulación en frijol, una de las pocas formas sencillas de --identificar género y especie (Alexander, 1980).

La proliferación de formas contaminantes no permite emitir una decisión definitiva sobre la calidad de la composta como soporte de inoculantes, ya que la disminución de la población rizobiana pudo deberse a diversos factores o a su interacción, entre estos se podrían mencionar: a) competencia directa de los rizobia con -- las poblaciones contaminantes o una forma de inhibición

competitiva por la producción de alguna sustancia tóxica para los primeros (antibiosis); b) presencia de algunas sustancias tóxicas para los rizobias que podrían derivarse ya sea de los materiales de origen de la composta como podrían ser hierro, sodio, metales pesados o -- bien alguna sustancia derivada de la degradación de materia orgánica por el calor durante la esterilización -- (Roughley & Pulsford, 1982), sin olvidar que durante -- las fases de producción de la composta tanto en el tanque de sedimentación como en la cámara de fermentación interviene una microcomunidad muy diversa (Metcalf & -- Eddy, 1979) cuyos productos de secreción o excreción podrían constituirse en antibióticos para los rizobias, -- aunque en tal caso dichas sustancias deben tener especificidad muy alta ya que de lo contrario el proceso de -- composteo no podría completarse. Por lo tanto, con la -- finalidad de corroborar si la contaminación fue debida o no a la manipulación del material experimental y para evaluar la respuesta de los rizobias --en caso de no --- existir toxicidad-- en los soportes, éstos se esterilizaron por medio de radiación, método que mantiene la mayoría de sus características evitando posibles cambios ocasionados por calor (Schröder, 1972), probándose la viabilidad de la cepa CIAT-632.

No encontrar contaminación en los soportes SR<sub>1</sub>, -- SR<sub>2</sub> y SR<sub>3</sub> ni alguna diferencia significativa en cuanto

a la densidad poblacional de *R. phaseoli* entre los tres, implica que la composta *per se* no contiene elementos tóxicos y por tanto podría evaluarse en un desarrollo experimental de mayor envergadura; sin embargo, debe considerarse que la esterilización por radiación es un método costoso por lo que antes de aplicarlo debe considerarse si en la producción masiva, en caso de lograr un buen nivel de calidad, el costo del método podrá amortizarse por el valor del inoculante (Ramírez, 1982).

Es necesario recordar que este trabajo es limitado en su conclusión general pues la evaluación de un material como soporte requiere la investigación exhaustiva de otras variables como otras especies *v. gr.* *R. japonicum* u otras cepas del mismo *R. phaseoli* ya que cada una proporciona respuestas específicas bajo distintas condiciones (Sparrow & Ham, 1983) como el tipo de soporte, la humedad, la temperatura de almacenaje, el modo de esterilización (si se aplica), el tipo de empaque, etc., que además parecen tener un efecto sinérgico (Roughley, 1981). Además no debe olvidarse que la mejor comprobación a la funcionalidad de un soporte se produce al verificar en el campo de cultivo si las cepas inoculadas son infectivas y efectivas (Date, 1976).

De cualquier forma es necesario recalcar que el desarrollo de una industria de inoculantes con la compos-

ta como materia prima, implica primero lograr uniformidad en el proceso de producción para disminuir la diferencia en porcentajes de materia orgánica entre cosechas, y segundo, aumentar el contenido medio del porcentaje de materia orgánica tratando de llevarlo hasta un mínimo de 50 - 60%, pues como ya se mencionó ésta es -- una de las propiedades primordiales para un soporte.

## **CONCLUSION**

1. La utilización de la composta del SIRDO como soporte para inoculantes es posible, en las condiciones experimentales descritas, cuando dicho material se combina con turba nacional en una proporción de hasta 1:1 (50% a 50%), manteniendo densidades poblacionales de *Rhizobium phaseoli* CIAT-632 de  $2.655 \cdot 10^{10} \pm 0.955 \cdot 10^{10}$  bacterias/gramo de soporte en un lapso de 135 días, aunque se considera la posibilidad de que un diseño experimental más sensible podría haber puesto en evidencia diferencias significativas entre los soportes experimentales empleados y, por tanto, la proporción de composta utilizable en un inoculante tal vez sería inferior a la encontrada en este trabajo. De cualquier forma, la capacidad de la composta para usarse como soporte en la producción comercial de inoculantes requiere aún de investigaciones exhaustivas que involucren diversas condiciones experimentales, como el empleo de otras cepas o variación en las formas de almacenaje e inclusive aplicación de otros métodos de evaluación, aunque la confirmación decisiva deberá producirse en el campo, comprobando que además de la viabilidad se mantienen las capacidades infectiva y efectiva de la cepa.

2. El empleo de un soporte constituido mayoritariamente por la composta del SIRDO no es recomendable por el momento ya que: a) es necesario uniformizar el contenido de materia orgánica durante la producción de la -- composta, pues la variación entre las cuatro cosechas -- obtenidas hasta el inicio del presente trabajo fue bastante amplia, considerando que la proporción de la cuarta cosecha en específico fue muy baja —lo que a la vez influyó negativamente en otras propiedades deseables como la capacidad de retención de agua y la capacidad --- amortiguadora de pH—; b) es posible que por su origen la composta utilizada en una proporción 1:0 (100%) contenga microorganismos esporulados con capacidad para resistir la esterilización por calor húmedo durante cuartro horas a 121°C y 1.5 kg/cm<sup>2</sup>; los cuales se desarro-- llan y proliferan durante la fase de maduración y c) el contenido de fierro en la composta se considera elevado, hecho que podría corregirse aumentando la eficiencia en la separación selectiva de los desechos sólidos que originan la composta.

3. La esterilización por radiación gamma de los soportes básicamente por composta corroboró la inexistencia de sustancias tóxicas que podrían inhibir el desarrollo rizobiano, por lo menos durante la fase crítica en la maduración del inoculante, considerando que la -- densidad poblacional media en los soportes durante los

30 primeros días es aceptable desde el punto de vista de calidad; sin embargo, la utilización de este método de esterilización es costosa y poco práctica, por lo que sería difícilmente amortizable en caso de comercializar el inoculante.

4. Encontrar la forma apropiada para usar la composta del SIRDO como soporte implica una potencial disminución en los costos de producción de inoculantes en México, por ser un material asequible con facilidad y de bajo costo o por lo menos no tan costoso como la turba importada, además de ser una contribución para solucionar el problema de la basura en el país. Por otro lado, significaría un beneficio sanitario y económico directo para la comunidad que lo produzca ya que la composta empleada en la producción de inoculantes haría más rentable el sistema al incrementar el precio de venta de la composta.



**U.N.A.M. CAMPUS  
IZTACALA**

1. Determinación de Metales Pesados.
2. Esterilización con Rayos Gamma.
3. Modelo Estadístico.
4. Neutralización de Soportes.
5. Análisis Físicos, Químicos y Biológicos de  
    la Composta.



**L. F. O. I.**  
**LABORATORIOS  
NACIONALES  
DE FOMENTO  
INDUSTRIAL**

ANEXO 1.

Ref: DQ. 775.84

O.T. 473

Julio 10, 1984.

Dr. Alejandro Hernández R.  
Jefe Interino- Depto. Biotecnología  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud.  
Av. Purísima y Michoacán  
Iztapalapa.  
México 13, D.F.

Estimado doctor Hernández:

Este informe se refiere al análisis de las muestras ----  
marcadas por usted como: Pios, Sirdo, Turba y Azolla, --  
recibidas en este laboratorio el día 25 de junio de 1984,  
junto con su solicitud de servicios.

A continuación se informan los resultados obtenidos y --  
los métodos utilizados:

M U E S T R A S :

Determinación	Sirdo	Azolla	Turba	Pids	Método
Cd ug/100 ml.	menor de 0.5	menor de 0.5	menor de 0.5	menor de 0.5	Ditizona GCL3
As ug/100 ml.	5.9	3.7	menor de 1.0	menor de 1.0	ácido/pi- ridina.
Hg ug/100 ml.	menor de 1.0	menor de 1.0	menor de 1.0	12.3	Ditizona GCL3
Pb ug/100 ml.	5.8	14.9	19.1	49.5	Ditizona C CL4

Av. Industria Militar 2  
11200 México, D.F.  
Tel. 589-01-99  
Telex 017 71-596 INFAME  
CABLE LANFIMEX

En su sede corporativa en:  
Apdo Postal 41-537



LABORATORIOS  
NACIONALES  
DE FOMENTO  
INDUSTRIAL

.2.  
DQ. 775.84  
O.T. 473

Referencia bibliográfica.- Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 14 th. Edition 1975. APHA. AWWA WPCF.

Esperamos tener la oportunidad de servirle nuevamente.

Atentamente,

*Adela Reyes Rodríguez*

Quím. Adela Reyes Rodríguez  
Jefe Del Depato. Central de  
Análisis.

*Gabriel Cendejas A.*

Quím. Gabriel Cendejas A.  
Subdirector de Ingeniería  
y Servicios Técnicos Cen-  
trales.

ARR/CCC/CPM/mvh

Av. Industria Militar 261  
11200 México, D.F.  
Tel 589-01-99  
Telex 017 71 986 ENFIME  
CABLE LANFIMEA

En el caso correspondiente a  
Apdo. Postal 41-537

ANEXO 2.

Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares

Julio 13 de 1984.

M. en C. DAVID MUÑOZ GONZALEZ,  
Responsable del Proyecto SIRDO  
Departamento de Biotecnología  
U.A.M. - IZTAPALAPA  
P r e s e n t e .

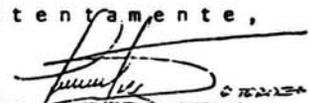
Por este conducto le informamos que fueron irradiadas las muestras de material orgánico del proceso SIRDO, que nos fueron enviados el día 9 del presente mes.

Estas muestras fueron irradiadas en el Irradiador experimental Gammacell 220 de Cobalto 60 durante 17.5 hrs., recibiendo una dosis total de 5.0 Mrad.

La dosimetría empleada con estas pruebas fue a base de dosímetros de Acrílico Rojo AECL (Batch 4, Run 1).

Por otro lado, hacemos de su conocimiento que no se observaron cambios físicos aparentes.

Atentamente,

  
ING. MARIO BALLESTEROS  
Unidad de Irradiación Gamma.

\*pvna

### ANEXO 3. MODELO ESTADISTICO.

Diseño experimental de tipo factorial (A·B), donde:

$$A_{(\text{soporte})} = \{S_1, S_2, S_3, S_4, S_5\}$$

$$B_{(\text{tiempo})} = \{t_0, t_7, t_{15}, t_{30}, t_{45}, t_{60}, t_{75}, t_{90}, \\ t_{105}, t_{120}, t_{135}\}$$

El modelo, de efectos fijos para diseño completamente aleatorizado, puede describirse de la siguiente forma:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

donde:

$$i = 1, 2, 3, 4, 5.$$

$$j = 1, 2, 3, \dots, 11.$$

$$k = 1, 2, 3.$$

$y_{ijk}$  es una observación típica,  $\mu$  es una constante,  $\alpha$  representa un efecto debido al factor  $A_{(\text{soporte})}$ ,  $\beta$  - representa un efecto debido a la interacción de los factores  $A$  y  $B$ , y  $e_{ijk}$  representa un error experimental.

- Suposiciones: a) Las observaciones en cada una de las  $i_j$  celdas constituyen una -- muestra aleatoria de tamaño  $n$  extraída de la población definida por la combinación particular de los niveles de los factores.
- b) Cada una de las  $i_j$  poblaciones -- está normalmente distribuida.
- c) Todas las poblaciones tienen la misma varianza.

Hipótesis:

$$(1) H_0: \sum_{i=1}^5 \alpha_i = 0 \quad VS \quad H_A: \sum_{i=1}^5 \alpha_i \neq 0$$

$$(2) H_0: \sum_{j=1}^{11} \beta_j = 0 \quad VS \quad H_A: \sum_{j=1}^{11} \beta_j \neq 0$$

$$(3) H_0: \sum_{i,j=1,1}^{5,11} (\alpha\beta)_{ij} = 0 \quad VS \quad H_A: \sum_{i,j=1,1}^{5,11} (\alpha\beta)_{ij} \neq 0.$$

#### ANEXO 4. NEUTRALIZACION DE SOPORTES.

La neutralización de los soportes ácidos se efectuó con  $\text{Ca(OH)}_2$  sólido, pero al realizar las determinaciones para las curvas de titulación se empleó una solución de 0.05 M; la relación es la siguiente:

$$\text{Ca(OH)}_2 \text{ g} = 3.704 \cdot 10^{-3} \text{ g/ml} \cdot V_1 \text{ ml}$$

donde:

$\text{Ca(OH)}_2 \text{ g}$  = masa en gramos de hidróxido de calcio.

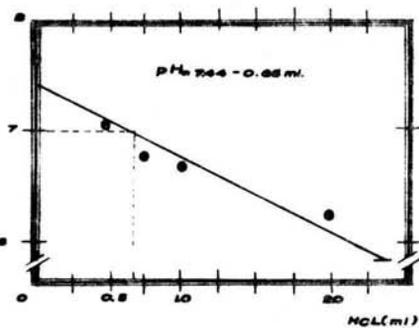
$V_1$  = volumen de solución 0.05 M de  $\text{Ca(OH)}_2$   
expresada en ml.

Mientras que la relación entre  $\text{Ca(OH)}_2$  o  $\text{CaCO}_3$  sólido es de:

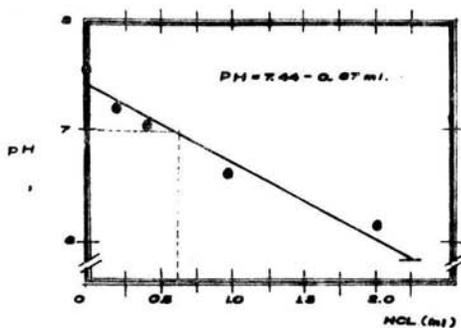
$$\text{CaCO}_3 \text{ g} = 1.35 \text{ Ca(OH)}_2 \text{ g}$$

donde:

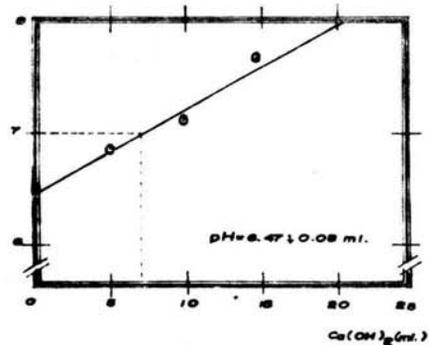
$\text{CaCO}_3 \text{ g}$  = masa en gramos de carbonato de calcio con el mismo equivalente gramo de calcio en - una masa dada de hidróxido de calcio.



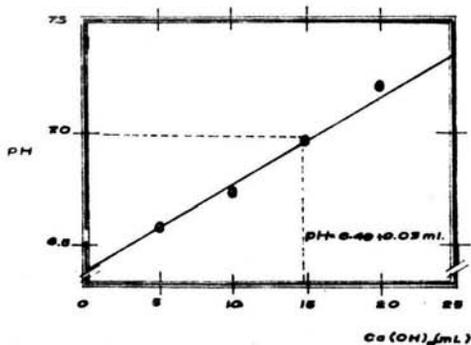
CURVA DE TITULACION PARA EL SOPORTE S<sub>1</sub>



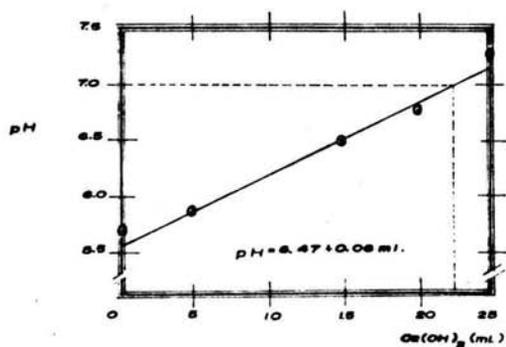
CURVA DE TITULACION PARA EL SOPORTE S<sub>2</sub>



CURVA DE TITULACION PARA EL SOPORTE S<sub>3</sub>



CURVA DE TITULACION PARA EL SOPORTE S<sub>4</sub>



CURVA DE TITULACION PARA EL SOPORTE S<sub>5</sub>

## LABORATORIOS DE ANALISIS

EUGENIO PALOMO EROSA Q. F. B.  
TIT. REG. NUM. 948 S. S. A.  
CEDULA 26,060 DE LA D. G. P.  
TEL. 1-37-40

EDIFICIO "LA NACIONAL" DESP. 207  
TELEFONO 1-39-36  
AUTORIZACION NUMERO 199 S. S. A.  
MÉRIDA, YUCATAN, MÉXICO.

EUGENIO A. PALOMO GONZALEZ Q. F. I.  
TIT. REG. 3488 S. S. A.  
CEDULA 176388 DE LA D. G. P.  
TEL. 3-64-78

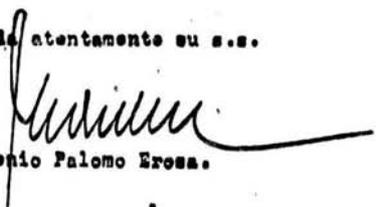
9 de octubre de 1981.

ANALISIS BACTERIOLÓGICO DE UNA MUESTRA DE ABONO "CAMARA COLECTIVA" del  
SISTEMA INTEGRAL DE RECICLAMIENTO DE DESHECHOS DOMESTICOS, LOTE M-17 -  
FRACCIONAMIENTO ZAZIL - KA. COLONIA MERCEDES BARRERA.

GERMENES DEL GRUPO COLI AEROGENOS:	0.	por gramo.
GERMENES DEL GRUPO SHIGELLA-SALMONELLA:	0.	por gramo.
GERMENES MESOFILICOS POR GRAMO:	12.600,000	por gramo.
AMIBA DISENTERICA:	NO SE ENCONTRO.	
HELMINTOS PATOGENOS:	NO SE ENCONTRO.	

CONTIENE LARVAS DE INSECTOS, HUEVECILLOS DE NEMATODOS DE TIERRA y PROTOZO-  
RIOS NO PATOGENOS.

Le saluda atentamente su s.s.

  
Q.F. Eugenio Palomo Erosa.



COMISION NACIONAL DE FRUTICULTURA  
S.A.R.H.

## MEMORANDUM

Cxlutzcob, Yuc., 16 de Dic. DE 1951.

PARA ING. VICTOR LOPEZ ALONSO.

DE ING. ALFREDO HANJABEE R.

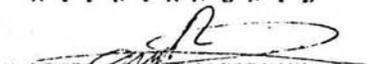
### ANEXO 5.2.

El Ing. Joaquín Reyes Franco solicitó se analizara una muestra de Abono Orgánico " CÁMARA COLECTIVA", la cual le informo a Usted en forma detallada las conclusiones que arrojó de dicho Análisis.

El Análisis Físico, Químico efectuado por técnicos de nuestros laboratorios de suelos, aguas y plantas en dicho abono nos dice:

- 1).- La materia Orgánica es la principal aportación del abono, por lo que se considera super-rico esto redundará en mejorar la estructura del suelo, retención del agua y protección contra la erosión.
- 2).- También es rico en N, P, K, Ca y Mg. Comparado con la Composta, Estiercol Vacuno, Estiercol Percino y Estiercol Bovino arroja casi resultados semejantes de N, P, K, Ca y Mg.
- 3).- El contenido de Sodio en la muestra es muy bajo, sin embargo se observó que el reporte del laboratorio de agrología indica que puede ser tóxico, por lo cual se sugiere se realicen análisis periódicos.
- 4).- Los micronutrientes como Cu, Fe, Mn, Zn y B son altos en comparación con los abonos Orgánicos descritos en el inciso (2).
- 5).- Al dosificar este abono se debe tomar en cuenta los microorganismos ya que estos pueden generar toxinas.
- 6).- El Fe presente en dicha muestra es muy alto y puede repercutir en toxicidad a algunas plantas y esto a su vez causa un desajuste en el metabolismo dando por consecuencia deficiencia de micronutrientes. (Cámara Colectiva)
- 7).- 1 Ton. de abono es equivalente a:  
122 Kgs. de Sulfato de Amonio (20.5%) N= 2.501%  
65 Kgs. de Superfosfato (20%) P= 1.3 %  
13 Kgs. de Sulfato de Potasio (50%) K= 0.9 %

ATENTAMENTE

  
ING. ALFREDO HANJABEE R.  
JEFE DE LABORATORIOS.

c.c.p. MINUTARIO.  
c.c.p. ING. JOAQUIN REYES FRANCO.-DELEGADO ESTATAL YUCATAN.  
AER/iae.



Instituto  
de Biología

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

Apartado Postal 70-230  
México 28, D.F.  
Tel. 550 52 75 ext.

ANEXO 5.3.

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA

Ciudad Universitaria D.F. a 2 de Abril de 1982.

C. Ing. Josefina Mora  
Coordinadora del Grupo  
Tecnología Alternativa  
Merida, Yuc.

En relación a la consulta presentada por Ud. a el  
Laboratorio de Helmintología, con fecha 2 de Marzo de 1982; hacemos de su  
conocimiento el resultado de el análisis de su muestra de abono obtenida  
de la cámara acrílica. La muestra fué procesada por la Biol. Rosa Elena  
Manzanilla y el Biol. Froilán Esquina, con técnicas adecuadas para la  
obtención de Pironomátodos y otras formas de Helmintos Patógenos,  
obteniéndose resultados negativos en todos los ensayos realizados.

Para los fines que haya lugar se entiende la  
presente.

Atentamente,

M. en C. Rafael Izquierdo Arguedo  
Coordinador de el Laboratorio de Helmintología  
Instituto de Biología, UNAM.  
Apto. Post. 70-150  
Ciudad Universitaria 04510, D.F.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Acot, Pascal. 1978. *Introducción a la Ecología*. (Tr. Eva Grosser). Nueva Imagen. México. 151 pp.
2. Alexander Martin. 1980. *Introducción a la Microbiología del Suelo*. (Tr. Juan J. Peña C.). 2a. ed. AGT --- Editor. México. p. 241-352.
3. Ayanaba, A. 1978. *Manpower Needs for Soil Fertility Maintenance in Developing Nations*. GIAM V. Global Impacts of Applied Microbiology. U.N.E.P./UNESCO/ICRO. p. 97-103.
4. Bermúdez, G. 1984. *Del Taco al Filete: Revolución -- Cultural*. Información Científica y Tecnológica. 5(78): 29-33.
5. Boerma, A.H. 1970. *Un Plan Agrícola Mundial*. En: *Los Alimentos*. (Tr. Abel Marine). Selecciones del Scientific American. H. Blume. 1975. España. p. 267-282.
6. Bourges, H. 1984. *La Tecnología de Alimentos, Base para la Solución del Problema Social en Nuestro País*. (Entr. Norma Herrera). Información Científica y Tecnológica. 6(78):43-45.
7. Brill, J.W. 1977. *Fijación Biológica del Nitrógeno*. Ciencia y Desarrollo. 17:30-40.
8. Brockwell, J.; Dudman, W.F.; Gibson, A.H.; Hely, F. W. & Robinson, A.C. 1968. Trans. 9<sup>th</sup> Intern. Coung.

Soil Sci. Australia. Vol. 2:103-114.

9. Brown, E. 1970. *La Producción Humana de Alimento -- como Proceso en la Biosfera*. En: "El Hombre y la -- Ecosfera". (Tr. Arturo Compte). Selecciones del -- Scientific American. H. Blume. 1971. España. p. -- 87-97.
10. Burris, H.R. 1974. *Biological Nitrogen Fixation -- (1924-1974)*. Plant. Physiol. 54:443-449.
11. Burton, J.C. 1967. *Rhizobium Culture and Use*. In: "Microbial Technology". H.J. Peppier Universal Ch. 1:1-333. Reinhold Pub.
12. ————— 1981. *Modern Concepts in Legume Inoculation*. P. Graham & S. Harris. Based on Papers -- Presented at a Workshop Held at CIAT, Colombia. p. 105-113.
13. Caldwell, A.C.; Carlyle, R.E. & Dawson, R.E. 1967. *A Practical Manual of Soil*. Schmit, E.L. Microbiology Lab. Methods. Soils Bull. 7. 69 pp.
14. Chávez, A. 1984. *La Nutrición en México*. (Entr. -- Rebeca Slomansky). Información Científica y Tecnológica. 5(73):26-28.
15. Corby, H.L.D. 1976. *A Method of Making Pure Culture Peat Type Legume Inoculants Using a Substitute for Peat*. In: "Symbiotic Nitrogen Fixation in --- Plants". P.S. Nutman. Cambridge Univ. Press. En--- gland. p. 169-173.
16. Cronquist, A. 1981. *Introducción a la Botánica*. --

- (Tr. Antonio Marino). 4a. Impresión. CECSA. México. 848 pp.
17. Daniel, W.W. 1979. *Bioestadística: Base para el -- Análisis de las Ciencias de la Salud.* (Tr. Hernan Pérez C.). Limusa. México. p. 132-242.
  18. Date, R.A. 1976. *Principals of Rhizobium Strain -- Selection.* In: "Symbiotic Nitrogen Fixation in --- Plants". P.S. Nutman. Cambridge Univ. Press. En--- gland. p. 137-150.
  19. ————— & Roughley, R.J. 1977. *Preparation of - Legume Seed Inoculants.* In: "A Treatise on Dinitro gen Fixation". Secc. IV. Agronomy & Ecology, R. -- Hardy & H. Gibson, Willey, USA. p. 243-276.
  20. Daubenmire, R.F. 1979. *Ecología Vegetal. Tratado - de Autecología de Plantas.* (Tr. Gabriela Berrondo). Limusa. México. p. 37, 374-375.
  21. Dawson, C.R. 1970. *Potential for Increasing Protein Production by Legume Inoculation.* *Plant & Soil.* **32** 655-673.
  22. DISPERT, S.A. 1968. *Praderas. Guía Manual Agrodispert Nitrasoil.* Laboratorios DISPERT, S.A. Uruguay. s/p.
  23. Dommergues, Y.R.; Dieu, H.G. 1979. *Polyacrylamide Entrapped Rhizobium As Inoculants for Legumes.* --- *Appl. Envir. Micro.* **37(4):779-781.**
  24. Durán, A. 1985. *Comunicación Personal.*
  25. Elrich, P.R. 1971. *The Population Bomb.* **Ballatine**

- Books Inc. New York. p. 91-107.
26. Flores, E. 1981. *El Crecimiento Urbano: Causas y Efectos Económicos*. (Tomado del Libro del mismo Autor "Tratado de Economía Agrícola"). FCE. México. Por Comunidad CONACyT. Serie La Ciudad. Núms. 136-137. p. 61-67.
  27. Foth, H.D. & L.M. Turk. 1972. *Fundamentos de la Ciencia del Suelo*. (Tr. Antonio Marino). 5a. ed. - CECSA. México. 527 pp.
  28. Frederick, L.R. 1978. *Biological Nitrogen Fixation: Research Need for Agricultural Development in the Tropics*. GIAM V. Global Impacts of Applied Microbiology. UNEP. UNESCO. ICRO. p. 88-96.
  29. Gálvez, M. 1984. *Suplementación de Alimentos con Proteínas*. Información Científica y Tecnológica. - 6(95):30-32.
  30. Gaviño G.; C. Juárez & H. Figueroa. 1980. *Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo*. 1a. ed. Limusa. México. p. 95.
  31. García, O.C. 1981. *Materiales de Desecho como Soportes para la Elaboración de Inoculantes*. Tesis. --- ENCB. IPN. México. 42 pp.
  32. Gómez-Pompa, A. & Toledo, V.M. 1971. *Medio Ambiente y Desarrollo*. Publicación Especial de CONACyT. México. 1:71-83.
  33. Graham, P.H. & Hubell, D. 1974. *Interacción del Suelo, la Planta u el Rhizobium en la Agricultura*

- Tropical*. Centro Internacional de Agricultura Tropical y la Universidad de Florida. Gainesville, USA s/n.
34. Graham, P.H.; Morales, V.M. & Cavallo, R. 1974. -- *Materiales Excipientes y Adhesivos de Posibles usos en la Inoculación de Leguminosas en Colombia*. Turrialba. 24:47-50.
  35. Gujarati, D. 1981. *Econometría Básica*. 1a. ed. McGraw Hill Latinoamericana. México. p. 220-235.
  36. Guzmán, E. 1984. *Comunicación Personal*. Industria Nitragin, S.A.
  37. Halliday, J. 1976. *Energía y Fijación de Nitrógeno*. VIII. Relar, CIAT. Cali, Colombia. p. 153-177.
  38. Hardy, R.W.F. & R.D. Holstein. In Ballentine and - Guarraia, 1973. Symp. Env. Protection Agency. s/p.
  39. ————— & Havelka, V.D. 1975. *Nitrogen Fixation Research: A Key To World Food?* Science. 188: 633-645.
  40. Hernández, G.R. 1980. *Estudio Comparativo de Soportes para la Elaboración de Inoculantes de Leguminosas en México*. Tesis. Fac. de Química. UNAM. 61 pp.
  41. Hewitt, E.J. 1952. Trans. 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> Comm. Int. - Soc. Soil Sci. Dublin. 1:107-118.
  42. Huidobro, J. 1984. *La Industria Alimentaria en México*. Información Científica y Tecnológica. 5(78): 22-25.
  43. Imshenetsky, A.A. 1978. *Selection of Nodule Bacte-*

- teria. GIAM. V. Global Impacts of Applied Microbiology. UNEP. UNESCO. ICRO. p. 123-128.
44. Iswaran, B.; A. Sen & R. Appe. 1972. *Plant Compost as Substitute for Peat for Legume Inoculants*. *Curr. Sci.* 41(8):299.
  45. Jackson, N.L. 1976. *Análisis Químico de Suelos*. -- (Tr. José Beltrán). 3a. ed. Omega. España. 662 pp.
  46. John, K.P. 1966. *J. Rubber Res. Inst. Malaya*. 19: 173.
  47. Jordan, D.C. 1962. *The Bacteroids of Genus Rhizobium*. *Bact. Rev.* 26:119-141.
  48. Lehninger, A.L. 1972. *Bioquímica. Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular*. (Tr. F. Clavet & J. Bozal). Omega. Barcelona. 887 pp.
  49. Liederman, J. 1971. *Ragasse as and Excipient for Legume Inoculants*. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*. 48:51-58.
  50. Lloyd, R.F. 1979. *Current Research on Biological Nitrogen Fixation in the USA. Planning and International Network of Legume Inoculation Trials*. College Tropical Agriculture and Human Resources. University of Hawaii. p. 28.
  51. Margalef, R. 1981. *Ecología*. 2a. ed. Planeta. Barcelona. 252 pp.
  52. Mc. Keague, J.A. 1978. *Manual on Soil Sampling and Methods of Analysis*. Canadian Soc. of Soil Science. s/p.

53. Medina, E. 1977. *Introducción a la Ecofisiología -- Vegetal*. Monografía #16. Serie Biología. Programa - Regional Científico y Tecnológico de la OEA. p. 85-87.
54. Mena, J. 1983. *Comunicación Personal*.
55. Méndez, R.I. 1981. *Modelos Estadísticos Lineales: - Interpretación y Aplicaciones*. 2a. ed. CONACyT. p. 101-107.
56. Metcalf & Eddy Inc. 1979. *Wastewater Engineering: - Treatment, Disposal and Reuse*. Mc. Graw Hill. New - York. 193 pp.
57. Morales, H.L. & G. Pineda. 1982. *Bioenergética y -- Desarrollo Rural*. Ponencia al Encuentro Interdisciplinario sobre Energía y Sociedad. México, D.F.
58. Muñoz, D. 1983. *Estudio de una Composta de Lirio - Acuático como posible sustituto de Turba utilizada como Soporte de Inoculantes de Leguminosas*. XIV -- Congreso Nacional de Microbiología. Veracruz, Méxi co.
59. ----- 1984. *Comunicación Personal*.
60. Newbould, F.H.S. 1951. *Studies on Humus Type Legume Inoculants*. I. Growth and Survival in Storage. *Sci. Agric.* 31:436-469.
61. Odum, E.P. 1972. *Ecología*. (Tr. Carlos Gerhard O.). 3a. ed. Interamericana. México. 639 pp.
62. Olea, O. 1982. *La Catástrofe Habita entre Nosotros. De la Ciudad al Ecosistema*. *Comunidad*. Nos. 136-137

- (Abr.-Mayo). CONACyT. p. 122-126.
63. Ostle, B. 1965. *Estadística Aplicada*. (Tr. Dagoberto de la Serna). 1a. ed. Limusa. México. p. 228-233.
64. Page, J. & C. Willard. 1946. *Cropping Systems and Soil Properties*. Soil Sci. Am Proc. 11:78.
65. Parker, R.E. 1981. *Estadística para Biólogos*. (Tr. Luis Serra). 1a. ed. Omega. España. 136 pp. Serie Cuadernos de Biología.
66. Philpots, H. 1976. J. Appl. Bact. 41:227.
67. Pratt, C.J. 1965. *Fertilizantes Químicos*. En: "El Hombre y la Ecósfera". (Tr. Arturo Compte). Seleccionaciones de Scientific American. Blume. España. 1971. p. 264-275.
68. Pugashetti, B.K.; Gopalgowta, H.S. & Patil, R.B. - 1971. *Cellulose powder as Legume Inoculant Base*. -- Curr. Sci. 40:496.
69. Quintero, M.J. 1975. *Comportamiento de Algunos Materiales Usados como Soporte en la Elaboración de Inoculantes en México*. C. P. de la ENCB. IPN. México. s/p.
70. Quintero, R. 1984. *La Alimentación en México: Un Problema por Resolver*. (Entr. José Angel Leyva). - Información Científica y Tecnológica. 6(95):46-47.
71. Ramírez, R.M. 1982. *Estudio Comparativo de la Supervivencia de Rhizobium phaseoli en Compostas y Turba*. Tesis. Fac. de Química. UNAM. 133 pp.

72. Ribera, H. 1985. *Comunicación Personal*. Industria Química Lucava, S.A.
73. Rojas, G.M. 1982. *Fisiología Vegetal Aplicada*. 2a. ed. Mc. Graw Hill. México.
74. Roughley, R.J. & D.J. Pulsford. 1982. *Production and Control of Legume Inoculants — Nitrogen Fixation in Legumes — Based on Proceedings of an International Seminar Sponsored by the Australian Development Assistance Bureau and University of Sidney*. Ed. by J.M. Vincent. Ac. Press. p. 193-209.
75. ————— 1981. *The Storage Quality Control and Use of Legume Seed Inoculants*. Ed. by Graham and Harris. Based on Papers Presented at Workshop Held at CIAT, Colombia. p. 115-125.
76. Rubio, M.D. 1979. *Evaluación de los Residuos Orgánicos Estabilizados (Compost) Obtenidos del Basuro de Monterrey, N.L., desde el Punto de Vista de su Utilidad Agrícola*. Tesis. GIA. Monterrey. México.
77. Ruíz, O.; D. Nieto & I. Larios. 1967. *Tratado Elemental de Botánica*. 10a. ed. ECLALSA. México. 730 pp.
78. SAHOP. 1982. *La Contaminación en el Valle de México*. Información Científica y Tecnológica. 3(49):5-12.
79. Schiell, E. & R. Dieguez. 1970. *Nuevo Portador para Inoculantes de Leguminosas a Base de Paja de Trigo*.

- Rev. Invest. Agropecuarias. 2(4):211-235.
80. Schröder, E.C. 1972. *Crecimiento de Rhizobium meliloti en Suelos Irradiados*. Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium. Montevideo.
  81. Sienko, H. & R. Plane. 1972. *Química*. (Tr. Federico Portillo). 1a. ed. Aguilar. España. p. 521-523.
  82. Soriano, S. 1978. *Contribution of Ecological Soil Microbiology to Agricultural Production*. GIAM. V. Global Impacts of Applied Microbiology. UNEP/UNESCO/ICRO. Malaysia. p. 104-112.
  83. Spargue, H.B. 1975. *The Contribution of Legume to Continuously Productive Agricultural Systems for the Tropics and Subtropics*. Tech. Ser. Bull. 12 Office of Agriculture, T.A.B. Agency for International -- Development. USA.
  84. Sparrow, S. & G. Ham. 1983. *Survival of Rhizobium phaseoli in Six Carrier Materials*. Agronom. Jour. 75:181-184.
  85. Strijdom, B.W. & C.C. Deschodt. 1976. *Carriers of Rhizobia and the Effects of Prior Treatment on the Survival of Rhizobia*. In: "Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants". P.J. Nutman. Cambridge Univ. Press. London. p. 151-158.
  86. Trujillo, G. 1981. *Producción de Inoculantes en México*. Trabajo Presentado en el International Workshop of Biological Nitrogen Fixation. Technological for Tropical Agriculture. Cali, Colombia.

87. Valdez, M. & D. Hubella. 1969. *Fertilizantes Naturales para Plantas Leguminosas*. IPII. México. p. -- 1-14.
88. Van Scherven, D.; Osten, D. & D. Lindenber. 1954. *On the Production of Legume Inoculants in a Mixture of Peat and Soil*. *Ant. van Leeuw.* 20:33-57.
89. Vargas, R.E. 1969. *Aspectos Microbiológicos de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno por Rhizobium -- spp.* UACH. México. 215 pp.
90. Vargas, V.A. 1985. *Comunicación Personal*. ENEP. Iztacala.
91. Venkatarman, G.S. 1978. *The Agricultural role of - Nitrogen-Fixing Bluegreen Algae*. GIAM. V. *Global -- Impacts of Applied Microbiology*. UNEP/UNESCO/ICRO. Malaysia. p. 129-138.
92. Vincent, J.M. 1975. *A Manual for Practical Study - of Root Nodule Bacteria*. IBP. Handbook 15. Blackwell. Oxford. p. 164.