

Nº 23
251



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CALIDAD DE
DIFERENTES INOCULANTES BIOLÓGICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

NORMA LAURA CANO ZAVALA

MEXICO, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

I INTRODUCCION

II GENERALIDADES

- 2.1 DEFINICION DE INOCULANTE E IMPORTANCIA DE SU USO
- 2.2 ASPECTOS GENERALES DE RHIZOBIUM Y BRADYRHIZOBIUM
- 2.3 ANTECEDENTES HISTORICOS
- 2.4 IMPORTANCIA DEL CONTROL DE CALIDAD
- 2.5 PRODUCCION DE LOS INOCULANTES BIOLOGICOS
- 2.6 CONTROL DE CALIDAD Y ESTANDARES DE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS
- 2.7 METODOLOGIA EN EL CONTROL DE CALIDAD PARA INOCULANTES BIOLOGICOS AGRICOLAS
- 2.8 SECUENCIA DE ENSAYOS DE CONTROL DE CALIDAD EN LA ELABORACION DE INOCULANTES A BASE DE SOPORTES SOLIDOS
- 2.9 TIPOS DE INOCULANTES Y METODOS DE APLICACION

III OBJETIVOS

IV PARTE EXPERIMENTAL

V DISCUSION DE RESULTADOS

VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

VII BIBLIOGRAFIA

VIII APENDICE

- 8.1 MEDIO EXTRACTO DE LEVADURA MANITOL AGAR ROJO CONGO
- 8.2 MEDIO PEPTONA GLUCOSA AGAR PUPURA DE BROMOCRESOL
- 8.3 COLORANTES DE GRAM Y TECNICA DE TINCION
- 8.4 SOLUCION NUTRITIVA DE JENSEN
- 8.5 ESQUEMA DEL SOPORTE PARA EL ENSAYO DE INFECCION EN PLANTA (NNP)
- 8.6 ESQUEMA DEL BASTIDOR DE ALAMBRE Y MADERA
- 8.7 ESQUEMA DE UNIDADES EXPERIMENTALES EMPLEADAS EN EL METODO DE INFECCION
- 8.8 ESQUEMA DE UNIDADES EXPERIMENTALES PARA DETERMINAR EFECTIVIDAD EN LA FIJACION DE NITROGENO
- 8.9 TABLA DE FISHER & YATES

I INTRODUCCION

Las necesidades del nitrógeno para aumentar la producción agrícola han sido cubiertas, generalmente a través de la aplicación de fertilizantes nitrogenados.

Estos fertilizantes se obtienen industrialmente mediante la reducción del dinitrógeno atmosférico, proceso en el que se requiere el consumo de grandes cantidades de energía.

El nitrógeno atmosférico es también reducido a través de un proceso biológico natural, en el que intervienen numerosos microorganismos procarióticos. Este conocimiento y la importancia que tiene sobre la fertilidad del suelo, determinó el surgimiento de la Industria productora de Inoculantes Biológicos que es empleada como alternativa para aumentar la productividad agrícola, ésta a su vez permite disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados y los riesgos de contaminación que se derivan de la aplicación constante y desmedida de los mismos.

Los Inoculantes Biológicos más empleados son aquellos que contienen bacterias de la familia Rhizobiaceae, las que se asocian con leguminosas y a través de la relación mutualista fijan el nitrógeno atmosférico. Estos tienen la ventaja de ser económicos y por lo tanto su adquisición está más al alcance del agricultor, pero para proporcionar los beneficios que se esperan, el productor debe reunir ciertas características cualitativas y cuantitativas, las que serán dadas con los cuidados y buen manejo durante el proceso de producción, condiciones de almacenamiento y distribución, para lo que se requiere de una supervisión continua que asegure la calidad del producto.

En los Estados Unidos Mexicanos, la producción de inoculantes se inició en los años 40 y su consumo ha aumentado considerablemente en la última década.

Estos productos son registrados en la Dirección General de Política y Desarrollo Agropecuario y Forestal, y la calidad de los mismos es responsabilidad de cada una de las industrias que los fabrican, las que se basan en normas o límites de calidad internos acordes a las referencias mundiales y no a normas oficiales, ya que no existe un reglamento que marque los requisitos mínimos que debe cumplir un inoculante, lo que conduce a una gran variabilidad de los productos que se expenden.

Lo anterior indica la importancia de establecer un reglamento de normas de calidad, así como de la metodología adecuada para determinar la calidad de este tipo de productos.

Por lo que en este trabajo se plantea como objetivos:

- Comprobar la variabilidad de algunos de los productos que se distribuyen en nuestro país, para ello se realizó un estudio comparativo de cinco productos comerciales, elaborados por Química Lucava, Nitragin, Fertimex, Bianitro-Fix y Fira. Y seis productos elaborados en la Facultad de Química, UNAM.
- Ofrecer la secuencia que debe tener un manual de procedimientos de control de calidad que sirva de base en la elaboración de inoculantes sólidos.

II GENERALIDADES

2.1 DEFINICION DE INOCULANTE E IMPORTANCIA DE SU USO

Los Inoculantes Biológicos Agrícolas son mezclas de cultivos bacterianos cuyo uso tiene la finalidad de favorecer la nutrición de los vegetales superiores e incrementar la productividad agrícola.

Como ejemplo de estos se tienen a las "Fosfobacterias" - que son mezclas de bacterias y algunos hongos, los que a través de su actividad mineralizadora y solubilizadora de compuestos fosfatados orgánicos e inorgánicos aumentan en el suelo la cantidad de fósforo disponible.

Otro ejemplo es el conocido como Inoculante para Leguminosa o Nitrógenas. Estos están constituidos por bacterias de la familia Rhizobiaceae, las que tienen la propiedad de infectar las raíces de las leguminosas donde forman nódulos y bajo esta asociación fijan el nitrógeno atmosférico, el que al ser reducido es utilizado por las mismas bacterias y por la leguminosa a las que están asociadas, aumentando de este modo la cantidad de nitrógeno disponible para la planta. Debido a la especificidad de la simbiosis entre la leguminosa y los rhizobia, existe inoculantes para soya, frijol, alfalfa, cacahuete, trébol, entre otras.

Los Inoculantes Biológicos se expenden bajo diferentes - formas de presentación y se aplican sobre la semilla o directamente en el suelo.

2.2 ASPECTOS GENERALES DE RHIZOBIUM Y BRADYRHIZOBIUM

Estas bacterias se caracterizan por su capacidad para formar nódulos en las raíces de algunas leguminosas, bajo esta asociación algunas participan en la adquisición del nitrógeno atmosférico mediante una reacción simbiótica, que permite que el nitrógeno atmosférico sea transformado a una forma aprovechable por el vegetal.

La infectividad o habilidad para formar los nódulos, y la efectividad o capacidad de fijar el nitrógeno, son propiedades de la simbiosis en sí misma, y si se cambia uno de los integrantes de la asociación estas propiedades pueden resultar alteradas, ya que una asociación efectiva entre una cepa en particular del microorganismo y una variedad específica de la leguminosa representa un delicado balance entre la constitución genética de dos tipos de organismos diferentes que varían dentro de límites amplios.

Estas bacterias habitan en el suelo, son aerobias y quimiorganotróficas, fermentan varios carbohidratos, algunas veces acumulan ácido pero no gas.

En el cuadro 2.2.1 se describen sus características tintoriales y de crecimiento en Extracto de Levadura Manitol Agar Rojo Congo (ELMAR), Peptona Glucosa Agar Púrpura de Bromocresol (PGAPB), Leche tornasolada, así como su Serología e Invasividad.

2.2.1 CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LOS GENEROS
RHIZOBIUM Y BRADYRHIZOBIUM (5,6).

5

CARACTERISTICAS	GENERO RHIZOBIUM	GENERO BRADYRHIZOBIUM
Morfología y Tinción	Bacilos cortos (0.5-0.9 micras de ancho y de 1.2-3.0 micras de largo), Gram negativos, móviles, algunas veces llegan a asociarse en cadenas cortas, presentan gránulos prominentes del polímero Beta-Hidroxibutirato, no presentan endosporas.	
Crecimiento en ELMARC	Colonias redondas, planas, convexas ó cónicas; incoloras o blancas, firmes, con goma, absorben poco colorante (rosa translúcido). Cepas de crecimiento rápido (3-5 d). El tamaño de las colonias es de 2-4 mm de diámetro.	Colonias redondas, planas, convexas o cónicas; incoloras, blancas raramente rosas, translúcidas, gomosas y firmes; cepas de crecimiento lento (se detectan a los 5-10 días de incubación) con tamaño no mayor de 1 mm de diámetro.
Crecimiento en PGAPB Temp. 25-28 °C Incub. 48 h	No hay crecimiento, y cuando llega a crecer provoca poco cambio del pH. Este medio facilita la detección de los contaminantes.	
Leshe - Tornasolada Temp. 25 °C.	Reacción alcalina con zona de suero.	Reacción alcalina sin zona de suero.
Invasividad	Nodulan a las leguminosas de clima templado: <u>R. leguminosarum</u> , <u>R. phaseoli</u> , <u>R. trifolii</u> , <u>R. meliloti</u> .	Nodulan a las leguminosas tropicales: <u>R. japonicum</u> , <u>R. lupini</u> .
Serología	Aglutinación (flagelar y/ó somática) con antisuero específico. Los antígenos flagelares son lábiles al calor. Pueden presentarse reacciones cruzadas con <u>Agrobacterium</u> y <u>R. meliloti</u> .	
Otras	Productor de acidez, prefiere como carbohidratos a la glucosa, manitol, sacarosa; algunas cepas regulare vitaminas; pH 6 - 7.	Productor de alcalinidad; prefiere a las pentosas; algunas cepas no requieren de vitaminas; pH óptimo 6.0 - 7.0.

2.3 ANTECEDENTES HISTORICOS

La importancia de la simbiosis bacteria-leguminosa en la fertilidad del suelo, motivó un interés creciente por este tipo de asociación y su aplicación, lo que condujo a la producción de inoculantes y a la fundación de Legislaciones Oficiales en las Inspecciones del Control de Calidad en los países con mayor desarrollo del producto.

A continuación se citan cronologicamente los aspectos más sobresalientes de los estudios realizados durante el periodo de 1830-1986.

1830. BOUSSINGAULT Y LIEBIG dieron a conocer la importancia que las leguminosas tienen en la fertilidad del suelo y comprobaron que éstas extraen el nitrógeno de la atmósfera al hacerlas crecer mediante la cuantificación de este elemento en la planta (citado en 9).

1866. HELLRIEGEL descubrió la presencia de los nódulos en las raíces de las leguminosas (citado en 31).

1866. HELLRIEGEL Y WILPARTH formularon y reportaron que las bacterias interaccionaban con las raíces jóvenes de las leguminosas formando los nódulos radiculares, los cuales asimilaban el nitrógeno elemental del aire, y después las plantas usaban parte de los compuestos sintetizados por las bacterias (citados en 19).

1888. BEIJERINCK aisló el organismo causal de la nodulación al que le dió el nombre de Bacillus radicicola, que posteriormente designó con el nombre genérico de Rhizobium e indicó la necesidad de suministrar éstas bacterias artificialmente a

los suelos, hecho que motivó al desarrollo de la Industria de los Inoculantes para leguminosas. Poco después empezó el cultivo de especies de Rhizobium para incrementar el cultivo de leguminosas (citado en 16).

1888, HELLRIEGEL Y WILFARTH. Con objeto de asegurar la presencia de rhizobia en áreas donde se cultiva la leguminosa de interés propusieron como método de inoculación la "transferencia del suelo", donde previamente se había detectado la presencia de Rhizobia, a las nuevas zonas. Este procedimiento presentó numerosas desventajas como el costo elevado para la transportación de volúmenes grandes del suelo, y la introducción de las semillas u organismos patógenos a las plantas, como mohos, bacterias competidoras de origen nativo y nemátodos.

Lo que determinó la necesidad de usar cultivos bacterianos puros (citado en 16).

1885-1919, PRIMER PERIODO. Abarca el Desarrollo fundamental de los Inoculantes (citado en 28).

1895. NOBBE Y HILTNER inician la Industria de los Inoculantes en los Estados Unidos de Norteamérica. Introducen a nivel laboratorio un soporte a base de un medio de cultivo para el crecimiento de las bacterias fijadoras del nitrógeno, con el nombre de "Nitragin". La presentación del producto consistía en una botella de 10 onzas con una capa de medio sólido, que contenía azúcar, asparagina, gelatina y extracto de levadura (citado en 50).

1896, NOBBE Y HILTNER. Debido a que el producto obtenido con el medio anteriormente mencionado resultó inadecuado para mantener a los microorganismos vivos, introdujeron otra formulación que contenía peptona al 2% ó leche desnatada y agar solidificado, sobre el cual propagaba a la bacteria y en el mo-

mento de aplicarse al campo suspendían el cultivo bacteriano en agua. Esta suspensión era utilizada para impregnar directamente al suelo o a las semillas (citado en 35).

1900. En este año surgió la Industria de los inoculantes a nivel comercial (citado en 50).

1902. Se probó otro tipo de soporte que consistió en algodón impregnado con el cultivo bacteriano, posteriormente este se secaba y empacaba acompañado con un paquete de nutrientes.

Antes de usarse el algodón se ponía en baño de agua tibia (28-37 °C), donde se adicionaban los nutrientes y en este medio se humedecía las semillas o se inculaba una pequeña cantidad del suelo que era esparcida en el mismo. Los resultados no fueron satisfactorios debido a que los microorganismos murieron en el proceso de secado del algodón (citado en 19).

1905. CANADA inicia la producción de los Inoculantes a escala Comercial (citado en 21).

1912, ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA. Se funda la Legislación de los Estados Individuales, en el control de calidad (citado en 50).

1914. SUECIA produce inoculantes empleando soportes esterilizados, siendo elaborados en el Colegio de Agricultura (citado en 50).

1918, SEGUNDO PERIODO. A partir de ésta fecha la inoculación con cultivos artificiales adquiere mayor aceptación, lo que determina el crecimiento de la Industria que progresa notablemente y se desarrollan las inspecciones de rutina (citado en 28).

1920-1940, ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA expande la Industria de los Inoculantes (citado en 50).

1930. FRED discute los aspectos culturales y morfológicos de las bacterias. Los aspectos prácticos de la inoculación, la determinación del nitrógeno fijado en el laboratorio, como en el campo; además de la producción de los inoculantes (citado en 50).

1932. Existían 11 productos comerciales en todo el mundo (citado en 19).

1934, INDIA inicia la producción de los inoculantes (citado en 50).

1940. A finales de los años cuarenta Uruguay y Argentina inician la producción de los inoculantes (citado en 50).

1954-1977. En este período la literatura acerca de la importancia que deriva el uso de inoculantes aumenta de manera explosiva y aparecen numerosos informes acerca de la diferencia de producción ocasionada por la utilización de inoculantes y fertilizantes (citado en 12).

1954. AUSTRALIA inicia el control de calidad debido a los resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos a nivel campo y laboratorio. En 1955 se intensifican los estudios de la relación raíz-nódulo-bacteria; y se discute el establecimiento de los estándares para mejorar la calidad de los inoculantes (citado en 21). Surgiendo en 1956 un Laboratorio de Servicio en el Departamento de Agricultura de la Universidad (U-DALS). Este fué fundado por grupos de microbiólogos de diferentes instituciones los que establecen un sistema progresivo del control de cepas usadas para la preparación del inoculante, así como

de su producción, venta y uso.

Con esta institución los productores contribuyen en los ensayos y proveen financiamiento para los estudios. En 1971 desaparece y surge la AIRCS (Australian Inoculants Research and Control Service) (citado en 21).

1956. SUD AFRICA organizó un cuerpo de control semejante al de Australia. Mientras que en la India los detalles de los estándares y mecanismo de control de calidad no son claros. En Nueva Zelanda la ICSTS (Inoculant and Coated Testing Service) es el organismo responsable del control de calidad. Mientras que en Canadá no existe un organismo responsable pero sí estándares de control (citado en 50).

1958. VAN SCHREVEN introduce la presentación en botes tapados con celofán y algodón para proveer una mayor humedad (citado en 50).

1960. BONNIER sugiere el uso de los soportes sólidos (citado en 19).

1965. SCOTT Y BURNGARNER generan un producto diferente en el cual se suspende el cultivo concentrado de Rhizobia en aceite, y se le disminuye la humedad que contiene. Después del proceso de secado las células se colectan por centrifugación o por filtración y se mezclan con un soporte como talco o kaolin, forma de presentación final como un inóculo sólido (citado en 54).

1966. FRASER sugiere los granulos de Rhizobia para la inoculación junto con las semillas en el campo. Se preparan esparciendo una mezcla de los microorganismos desarrollados sobre leche desnatada pulverizada y sacarosa, sobre sulfato de calcio hemihidratado y carboximetilcelulosa (citado en 21).

1975. ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA. "The Indiana State Chemist" es la única autoridad que publica la calidad de los inoculantes (citado en 50).

1950-1986, ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. Casas Campillo inició la producción de los inoculantes en la Comisión Nacional del Maiz (citado en 9). Tres años después surge AGROLAB, S.A. con su producto "Rhizobin"; mientras que en 1955 los laboratorios FLORA MICROBIANA, S.A. producen el inoculante Nitrobacter producto que desapareció en 1960. En 1963 se estableció en Guadalajara, Jalisco la Empresa Nitragin. En 1967 Anderson Clayton empezó a producir el inoculante Pagador, que desapareció en 1976.

En 1977 FIRA inicia la producción de los inoculantes y en 1981 en Matehuala S.L.P. a través de la Comisión Técnica para el programa de empleo rural.

(citado en 19).

Actualmente existen 7 industrias que tienen registrados ante la Dirección General de Política y Desarrollo Agropecuario y Forestal, 24 productos que a continuación se exponen:

- Empresas Nitragin, S.A. Guadalajara, Jalisco.
 - Inoculante para chícharo
 - Inoculante para soya
 - Inoculante para alfalfa
 - Inoculante para garbanzo
 - Inoculante para frijol
- SDS Biotech de México, S.S. de C.V. México, D.F.
 - Inoculante Dianitro Fix Soya

-Insecticidas del Pacífico, S.A. Cd Obregón, Sonora.

Inoculante para garbanzo

Inoculante para soya

-Química Lucava, S.A. de C.V. Tultitlán, Edo de México.

Inoculante para frijol

Inoculante para soya

Inoculante para soya-Inoculante Líquido

-Fertilizantes Mexicanos, S.A. México, D.F.

Nitrobiol Inoculante para alfalfa

Nitrobiol Inoculante para cacahuete

Nitrobiol Inoculante para frijol

Nitrobiol Inoculante para garbanzo

Nitrobiol Inoculante para soya

Nitrobiol Inoculante para lenteja

Nitrobiol Inoculante para chícharo

Nitrobiol Inoculante para haba

-Semillas, Implementos y Abonos, S.A.H. Matamoros, Tamps.

Triple NOCTIN-L (líquido)

-Bioagro de México, S.A. de C.V. Cd. Obregón Sonora.

Inoculante Multicepa Legume-Bacter (soya)

Inoculante Multicepa Legume-Bacter (frijol)

Inoculante Multivepa Legume-Bacter (garbanzo)

(14).

La producción de inoculantes también se efectúa en diversas instituciones de investigación, realizándola a escala de laboratorio para fines de experimentación y entre estas se tiene:

- Facultad de Química, UNAM.
- Instituto de Geología, UNAM.
- Colegio de Postgraduados, Chapingo.
- Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
- CINVESTAV, IPN. Unidad Irapuato.

2.4 IMPORTANCIA DEL CONTROL DE CALIDAD

Un Departamento de Control de Calidad tiene como función el certificar la calidad de los productos que se fabrican en una Industria o Laboratorio, lo que involucra el caracterizar a la materia prima, al material de envase y empaque, así como verificar el buen funcionamiento durante el proceso de fabricación, el control de productos intermedios, del producto terminado y duración del producto.

Lo anterior indica que el control de calidad requiere de un conjunto de conocimientos técnicos, analíticos y administrativos. Y que solo a través de este esfuerzo comunal y consciente se llegará a la obtención de un producto satisfactorio para el consumidor y para el fabricante.

De tal modo que el Departamento de Control de Calidad, para realizar adecuadamente sus funciones, se apoya en los departamentos de planeación y producción, que con base en los objetivos de la empresa, referencias bibliográficas mundiales reportadas, técnicas reportadas y desarrolladas por la propia empresa, deberán establecer las características del material, equipo y proceso empleados así como del producto terminado, variaciones y límites aceptados y estándares de calidad de cada uno de los factores involucrados. Los que deberán estar dentro de un margen de seguridad.

Con el objeto de suministrar al comprador o cliente productos con características óptimas, se requieren medidas adicionales de manipulación en el almacenamiento, transporte y servicio post-venta, de modo tal que la calidad se mantenga intacta, dentro de ciertos límites de seguridad desde el momento en que el producto está listo hasta que llega al consumidor.

Esto último es particularmente importante para los inoculantes biológicos de uso agrícola que son sensibles a los cambios extremos de temperatura o bien son expuestos a contaminación microbiana a causa de la ruptura de envases ocasionada por insectos, roedores o mal manejo durante el transporte, lo que se traduce en una gran variabilidad de la salida de este tipo de producto.

Por lo que para asegurar la calidad de los mismos se requiere la utilización de cepas adecuadas, un control estricto en el proceso de producción, almacenamiento y distribución de los mismos así como del manejo durante su aplicación.

(39).

Para tener un mejor entendimiento de las características que debe reunir un producto de este tipo, en las páginas siguientes se resumen los aspectos generales del proceso de producción, especificaciones de materias primas, producto en proceso y producto terminado y los análisis recomendados para determinar la calidad en las diferentes etapas de producción.

2.5 PRODUCCION DE LOS INOCULANTES BIOLOGICOS

Existen dos métodos que ejemplifican la producción de los inoculantes a base de un soporte sólido. El "Europeo" y el de los "Estados Unidos de Norteamérica" los cuales se muestran en el diagrama 2.5.1.

En el proceso de producción se consideran

- 1) Materia prima que involucra
 - Selección y mantenimiento de cepas
 - Elección del soporte
 - Elección de ingredientes para el caldo de cultivo

2) Características y condiciones del proceso de producción que incluyen

- Preparación del soporte
- Preparación del caldo de cultivo
- Activación del cultivo madre
- Fermentación
- Impregnación
- Maduración y envase
- Almacenamiento

3) Características del producto terminado

- Selección y mantenimiento de las cepas de Rhizobium.

La selección se efectúa con base a los siguientes criterios: efectividad en la fijación del nitrógeno, capacidad de establecer una simbiosis eficiente con numerosas especies o con un rango amplio de variedades de la misma especie (1,2, 52) y la habilidad de la cepa para crecer en los medios de cul

tivo y soporte así como en las condiciones del suelo y clima - donde será aplicada (32,34,47,48,49).

Las cepas seleccionadas pueden ser conservadas bajo dos sistemas de mantenimiento que corresponden a cultivos liofilizados en ampollitas ó bien en medio de agar inclinado en tubos y sellados con parafina líquida. El primero es un método mas a decuado debido a que permite conservar a las cepas por periodo más prolongados (15 a 20 años), minimizando la necesidad de re siembra, así como la contaminación y variación genética. En - tanto que con el segundo método la maduración se limita a un - año y por lo tanto existen mayores riesgos en cuanto a los pro blemas ya mencionados (54).

Para la manufactura del inoculante de cada cepa se reali- zan subcultivos que son utilizados durante el año de produc- ción a los que se les realizan ensayos de control (32).

Descripción resumida del manejo y ensayos que se rea- lizan en las cepas de colección recomendadas para la manufactura de inoculantes, de acuerdo a su forma de mantenimiento (21).

PRESENTACION	TRATAMIENTO	ENSAYOS
Cepa de colección (liofilizada)	De cada cepa se prepara un cultivo y se almacena a - 4 °C a partir del - cual se preparan los subcultivos - que se requieren para el año.	- Efectividad en la fijación del ni- trógeno. - Tinción de Gram - Aglutinación con suero inmune espe- cífico.

PRESENTACION	TRATAMIENTO	ENSAYOS
Cultivo sellado (con parafina)	Se preparan 15 subcultivos(12 <u>cul</u> tivos madre para la manufactura, 2 de <u>re</u> ferencia por año, y 1 de testigo.	- Efectividad en la fijación del nitrógeno - Tinción de Gram
Cultivo madre	Son 12 y se <u>em</u> plea 1 por mes.	- Aglutinación - Tinción de Gram

-Elección del soporte.

Los soportes que se usan actualmente son sólidos ó líquidos.

Estos deben reunir características físicas y químicas - que aseguren:

- la sobrevivencia de la bacteria de interés durante el almacenamiento y distribución del inoculante
- facilidad del manejo durante su distribución y aplicación
- disponibilidad y bajo costo

A continuación se describen las características en que - se basan la selección de soportes sólidos, que a la fecha son los de mayor uso:

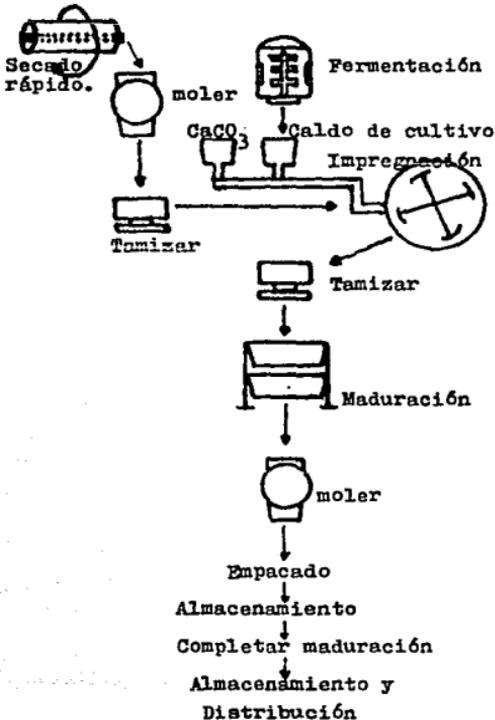
- facilidad de pulverización
- facilidad de esterilización
- buena capacidad de retención de la humedad
- buena adhesión a la semilla
- pH neutro

Diagrama 2.5.1

Método de Producción de Inoculantes a base de un soporte sólido

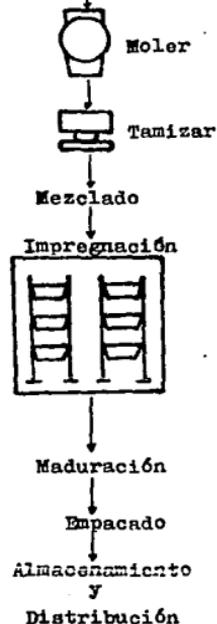
(38)

Método por Nitragin



Método Europeo

Secar y ajustar el pH del soporte



Una vez obtenido el caldo de cultivo en los fermentadores es transferido a un tanque en el cual se encuentra el soporte neutralizado y esterilizado, y con la ayuda de un dispersor de baja presión se mezclan. Se procede a Tamizar, Pre-Madurar, Moler, Empacar, Almacenar, Completar la maduración y Almacenamiento-Distribución.

Método que consiste en ajustar el pH y esterilizar el soporte (además de moler y tamizar), se enriquece antes de ser impregnado con un cultivo de Rhizobium, dentro de una cámara aséptica. Y se almacena antes de su distribución a 4°C.

-Preparación del soporte.

Las características anteriores del soporte se ajustan a las necesidades específicas que debe reunir el soporte y que se refieren a: tamaño de partícula, pH, humedad y esterilidad (54).

•Tamaño de partícula. Se ajusta mediante el molido del soporte. Se emplean 3 tamaños, el llamado polvo fino que pasa a través de una malla de 200-300, el polvo regular que pasa a través de mallas 100-200 y granulado cuando se emplean mallas de 16-50 (30,51).

•pH. Muchos de los soportes son ácidos, lo cual no favorece la sobrevivencia y crecimiento de rhizobia por lo que se requiere ajustar el pH de 6.5 a 7.3 . El agente neutralizante más satisfactorio es carbonato de calcio (17,35,38,54).

•Humedad. Iebe presentar un 9% de humedad final con lo cual se favorece la operación de molienda y permite una mayor cantidad de incorporación del caldo de cultivo al soporte (3).

La acción del tiempo y la temperatura de secado involucran la posible formación de productos tóxicos por la degradación del soporte. Por lo que se recomiendan temperaturas de 80 a 100 °C por 24 horas en el secado por horno eléctrico (38).

En el secado rápido los sólidos se pasan a través de un cilindro giratorio cuyo interior calienta por recirculación del aire a temperatura de 620-650 °C. El tiempo de exposición de los sólidos es de 2-3 minutos obteniéndose del 7 al 8 por ciento de humedad sin la descomposición del soporte, además se tiene el soporte estéril (54).

•Esterilización. Los métodos más empleados son:

- i.) Autoclave, realizado a 121 °C a 15 lb/in² por 3-4 ho-

ras (3,38,52,54).

- ii) Radiación, de 5×10^6 Rads (51).
- iii) Gas, empleándose oxido de etileno el cual se difunde completamente pero es difícil remover los residuos, que son tóxicos al Rhizobium (3,50).

Se recomienda el uso de soporte estéril para aumentar la vida media del producto, especialmente cuando se emplea cepas de crecimiento lento (54).

-Elección de ingredientes y preparación del caldo de cultivo.

El medio estandar está basado en el uso de una fuente de carbono, fuente de nitrógeno, mezcla de sales y en algunos casos factores de crecimiento, ajustado a un pH de 6.8 a 7.3 (50).

-Como fuente de carbono se emplean diferentes azúcares mono y disacáridos y pentosas para las especies de lento crecimiento; siendo las más comunes el manitol y sacarosa, también se usa glicerol. Los productores prefieren a la sacarosa por su bajo costo, pero deben considerarse las necesidades de las cepas involucradas en el proceso (38,50).

La fuente de nitrógeno varía desde nitrato de potasio (3) hasta el uso de extracto de levadura en una concentración que proporcione simultáneamente los factores de crecimiento (50).

-Activación del cultivo madre.

-Obtención del inóculo de alta concentración celular, que se realiza en matraces Erlenmeyer usando una quinta parte del volumen del medio líquido en relación a la capacidad del matraz (4), y se incuba a temperatura de 23 a 32 °C dependiendo

de la especie ó bien a 35 °C en el caso de Rhizobium meliloti (3,16,30,50), en agitación para favorecer la aereación y por un periodo de tiempo que varía de acuerdo al tiempo de generación de la especie y condiciones de incubación, ver tabla 2.5.1 (16,30,38,50).

Tabla 2.5.1 Periodos de incubación recomendados en el proceso de producción de inoculantes (50).

Velocidad de Crecimiento	Tiempo máximo de Generación	Volúmen del Inóculo y Tiempo de Incubación	
		0.1%	1.0%
Crec. rápido	2-4 h	25-53 h	18-36 h
Crec. lento	6-12 h	78-156 h	54-108 h

-Fermentación.

El cultivo obtenido puede ser empleado para impregnar el soporte (producción a nivel laboratorio) o bien como inóculo para el escalamiento de producción a nivel industrial, en cuyo caso las características del inóculo varían de 0.1, 0.5 y 10%.

A nivel industrial se utilizan tanques de acero inoxidable, la capacidad de los fermentadores varía de 10-20 l hasta 30,000 l (4). Se opera al 75% de la capacidad debido a la formación de espuma, cuando se emplean cepas de lento crecimiento mientras que para las de rápido crecimiento se recomienda llenar al 60% de su capacidad y se utiliza un agente antiespumante (50).

Para favorecer la concentración de oxígeno adecuado es necesario realizar agitación mecánica o permitir la entrada de aire que proporciona una presión positiva minimizando la conta

minación.

El flujo del aire que se recomienda es de 0.5 a 120 l de aire/h, por litro de medio (38).

Balatti y Mazza reportan trabajos experimentales en las que se emplean agitaciones de 200 R.P.M. y con 0.5 volumen del aire/volumen de aire por medio minuto para determinadas especies (3).

Los cultivos obtenidos no deben ser almacenados por más de 24 h y deben estar a 4°C (54).

-Impregnación (Mezcla del soporte y cultivo bacteriano).

Se realiza por agitación continua del soporte y la suspensión celular, bajo condiciones asépticas (26,38).

Cuando el soporte no se encuentra estéril la impregnación debe proporcionar una humedad del 35-40% en base en el peso seco; en tanto que con soporte estéril se ajusta del 50-60% (38,50). Para soporte pulverizado y granulado debe tener del 32-34% de humedad (54).

-Maduración y envase.

El tiempo de maduración varía, cuando se emplean cepas de crecimiento lento es de 5-10 días a 25-38°C (3,17,54).

Para las de crecimiento rápido de 2-3 días a temperatura ambiente (19).

En el método de los Estados Unidos de Norteamérica la etapa de maduración se lleva a cabo en las charolas por 2 días, éstas son cubiertas con plástico para evitar la desecación, después se tamiza y se empaca en bolsas de polietileno sellados con pequeños orificios para facilitar el intercambio gaseoso (54).

Se envasan en bolsas de polietileno (con espesor de 0.0375 mm - 0.053 mm) lo que permite un intercambio gaseoso suficiente y satisfactorio y mantiene el nivel de humedad necesario (54).

-Almacenamiento.

Después del proceso de maduración y empaçado en las bolsas de polietileno, se conservan en un lugar obscuro a 4-5 °C (3,18,30,38,50).

Roughley reporta que el decrecimiento va en proporción a la temperatura, 0.04% a 5 °C y 0.0944% a 25 °C (37).

-Características del producto terminado.

Se recomienda registrar en el rótulo especificaciones - que incluyen población mínima de bacterias/g de inoculante, - hospedero, condiciones de almacenamiento y distribución, fecha de caducidad. Y como requisito ausencia de contaminantes (11).

2.6 CONTROL DE CALIDAD Y ESTANDARES DE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS

La información del capítulo anterior indica que el control de calidad de los inoculantes para leguminosas implica un proceso de inspección continuo, en cada una de las etapas de producción así como en el producto terminado, antes de su venta o distribución, y cuando se encuentra cercano a la fecha de caducidad.

La metodología que se lleva acabo implica pruebas a nivel laboratorio, invernadero y/o campo, dependiendo del tipo y grado de información que se necesita así como de los factores tiempo y dinero. Realizándose ensayos cualitativos y cuantitativos.

A nivel mundial, el control de calidad de los inoculantes para leguminosas solamente en pocos casos se realiza en centros de investigación, y los estándares mínimos y prácticas de control varían en los diferentes países (19).

En Australia, Uruguay, U.R.S.S. y Checoslovaquia, la producción de los inoculantes y control de calidad dependen completamente de agencias gubernamentales (54).

En NUEVA ZELANDA el sistema oficial de control de inoculantes fué iniciado en el año de 1979 conocido como I.C.S.T.S. ("The Inoculant and Coated Seed Testing Service") el que estuvo operado por el Ministerio de Agricultura y Pesca, proveyendo un servicio similar al que otorga la A.I.R.C.S. en Australia (54).

En CANADA el cuerpo responsable del control de calidad co rresponde al Departamento de Agricultura, que establece las es pecificaciones que debe llevar el paquete y el número de mi-- croorganismos viables en el inoculante (21).

En URUGUAY el Laboratorio de Microbiología del suelo y - Control de Inoculantes del Ministerio de Agricultura y Pesca, estableció los controles de calidad para los inoculantes impor tados y nacionales. Estos laboratorios además proveen como scr vicios para el fabricante la selección de especies de Rhizo--- bium, la determinación de la pureza y cuenta viable, y rectifi cación de la cuenta viable en el producto después de su distri bución (54).

En los ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMERICA el control de cali dad recae directamente sobre el fabricante e involucra la expe dición de licencias para la producción independiente en cada - estado como Indiana, Wisconsin, Ohio y Maryland presentan esta tutos con el establecimiento de ciertos estandares, los que va rían de estado a estado aún cuando todos presentan la misma ba se.

Por ejemplo la ley de inoculantes para leguminosas en In diana data de 1937 en que el estado se responsabilizó de los ensayos de control de laboratorio y de invernadero tales como:

- determinación de contaminantes
- cuenta en placa de rhizobia viable
- habilidad de las cepas para inducir la nodulación
- determinación de peso seco de la planta para comprobar la efectividad de la cepa en la fijación de nitrógeno.

Ellos incluyen en los membretes las condiciones de alma-- cenamiento y fecha de expiración.

En AUSTRALIA, en 1956, la Universidad de Sidney y el Departamento de Agricultura de "New South Wales" apoyados por la C.S.I.R.O. fundaron la U.D.A.L.S. ("University Department of Agriculture Laboratory Service) en donde se desarrolló un sistema de control de calidad para los inoculantes comerciales en el que se consideraba la infectividad y efectividad de la bacteria en el producto. La U.D.A.L.S. fué financiada por largo tiempo por los productores, después por la "Dray, Meat and Wool Research Trust Funds" y el Banco de Reserva de Australia (16).

En 1966 el Departamento de Agricultura de "New South Wales" fué nominado para establecer un nuevo organismo, nombrado como "The Australian Inoculants Research and Control Service" (A.I.R.C.S.) (38).

La A.I.R.C.S. contempla el control de calidad en todos sus aspectos y promueve servicios que se agrupan en tres paquetes:

- 1.- Selección, ensayo y mantenimiento de las especies de rhizobia convenientes.
- 2.- Control de calidad de los inoculantes
- 3.- Investigación de los factores que afectan la calidad y eficiencia de los inoculantes en la producción, distribución y empleo de los mismos.

A petición del productor y en relación con los dos primeros incisos la A.I.R.C.S. provee el cultivo madre al que determina pureza mediante serología.

Durante el proceso de producción se realizan pruebas cualitativas en el cultivo que se empleará para impregnar el soporte, así como en el producto terminado después de su maduración y antes de su distribución, y pruebas para determinar la

fecha de caducidad del producto.

Recomienda almacenar el producto a 4 °C durante 5 6 6 meses y transportarlo para su distribución durante la noche y en refrigeración.

(19,38,50)

Los ensayos que se consideran prioritarios antes de la -- distribución corresponden a : cuenta viable, identificación serológica, infección en planta, ensayos de efectividad y contenido de humedad.

Recomiendan especificar en el rótulo el tipo de soporte empleado.

Ensayos prioritarios en inoculantes a base de soporte estéril: cuenta en placa, infección en planta, identidad serológica, detección de los contaminantes, tinción de Gram.

Ensayos prioritarios en inoculantes a base de soportes no estériles: esencialmente cuenta por dilución e infección en -- planta e identidad serológica de los nódulos.

Ensayos opcionales para los inoculantes previamente ensayados: humedad, dilución e infección en planta.

(19,37,38,50).

Límites del Número de Rhizobia establecidos en los
Inoculantes a base de un soporte sólido en el mundo

País	Estandar
Australia	<p>Soporte estéril: 1×10^9 Rhizobia/g inoculante, después de la fecha de caducidad 10^8. Para <u>Lotononis</u> de 5-30 x 10^8. Después de la fecha de caducidad 3×10^7. Si presenta 10^8 -- proporciona 100 Rhizobia/semilla.</p> <p>Y se considera:</p> <ul style="list-style-type: none"> •Calidad muy deficiente con cuenta de 10^7 Rhizobia/g inoculante •Calidad deficiente si es de 10^7 a 10^8 (con 2 meses de caducidad) •Calidad satisfactoria si es de 10^9 (con 6 meses de caducidad) •Calidad muy satisfactoria si es mayor a 10^9 (con 9-12 meses de caducidad) <p>(19,38,50,54).</p>
Canadá	<p>Satisfactorio con 1×10^6 Rhizobia/g inoculante, lo que proporciona un mínimo de 1×10^3 Rhizobia/semilla (19,54).</p>

País	Estandar
Checoslovaquia	Aceptable cuando es de 3×10^8 Rhizobia/g inoculante (19,54).
U.S.A	Basado en estudios porcentuales de la nodulación: <ul style="list-style-type: none"> • Satisfactorio: si el 90% o más de las plantas presenta 1 ó más nódulos sobre la raíz primaria y las características de las plantas son comparables a la del control fertilizado. • Regular: si del 67% al 90% de las plantas contiene 1 ó más nódulos. • Insatisfactorio: si es menor al 67% de las plantas noduladas. (54).
Holanda	De 4 a 25×10^9 Rhizobia/g inoculante (19,54).
India	De 1×10^8 , y después de la fecha de caducidad se acepta un mínimo de 1×10^7 Rhizobia/g inoculante (11,54).
Nva. Zelanda	Después de la fecha de caducidad (6 meses) se permite un mínimo de 1×10^8 Rhizobia/g inoculante, lo que garantiza 300 Rhizobias viables por semilla después de almacenarse a 20°C por 28 días (19,54).

País	Estandar
Sud Africa	A base de soporte estéril, un mínimo de 1×10^8 células/g inoculante (50).
URSS	De 5×10^7 Rhizobia/g inoculante (19,54).
Uruguay	Cerca de la fecha de caducidad, un mínimo de 1×10^7 Rhizobia/g inoculante (54).
Estados Unidos Mexicanos	<p>Se muestra las diferentes características de los inoculantes en algunas Instituciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> •Fertimex •Lab. Microb. Programa de Empleo Rural •Colegio de Postgraduados •Quimica Lucava, S.A. •Nitragin •FIRA •Fac. Química, UNAM •Instituto de Geología, UNAM (ver tabla continua)

(15,19).

Características de los Inoculantes elaborados en los Estados Unidos Mexicanos (15,19,23)

Institución	Localidad	Soporte		Inoculante		Población de la Rhizobia y Garrañtía	Control de Calidad
		tamaño de partícula	turba estéril	uni- cepa	multi- cepa		
Fertimex	México, D.F.	malla 200	sí	-	+	10^8-10^9 (6 meses)	Quantificación del No. Rhizobium/g inoculante.
Lab.Microb. Programa de Empleo Rural	Matemuala, S.L.P.	"	"	+	+/-	10^8 (6 meses)	"
Colegio de Postgraduados	Chapingo, México.	"	"	+	+	10^9 (6 meses)	"
Química, Luogva, S.A.	Edo.Mex.	"	"	+	-	10^8 (6 meses)	"
Nitragin	Guadalajara, Jalisco	" y 100	"	+	+	10^8 (6 meses)	"
PIRA	Tenoyuca, Morelos.	malla 100	"	-	+	10^8 (6 meses)	"
Fac. Química, UNAM y el Instituto de Geología, UNAM	México, D.F.	malla 200	"	+	-	10^9 (6 meses)	"

2.7 METODOLOGIA EN EL CONTROL DE CALIDAD
PARA INOCULANTES BIOLÓGICOS AGRÍCOLAS

Se clasifica en ensayos cualitativos y cuantitativos:

ENSAYOS CUALITATIVOS	ENSAYOS CUANTITATIVOS
<ul style="list-style-type: none"> -Rectificación del rótulo -Determinación de la Pureza: •Inoculación en Peptona Glucosa Agar •Inoculación en Extracto de Levadura Manitol -- Agar •Tinción de Gram •Determinación del pH •Identificación por <u>Aglut</u>inación. 	<ul style="list-style-type: none"> -Determinación de la humedad. -Cuenta total de células -Número de Rhizobia viable por el método de dilución y siembra en placa -Ensayos en el invernadero: •Método de Dilución e Infección en Planta (infectividad) •Determinación de la Efectividad.

ENSAYOS CUALITATIVOS

RECTIFICACION DEL ROTULO. Lleva la información básica que caracteriza al producto empacado como:

- Nombre(s) de la(s) leguminosa(s) para el cual debe emplearse
- Género y especie de la bacteria presente
- Número de Rhizobia por gramo de inoculante o semilla
- Contenido neto
- Cantidad de semilla o superficie a tratar
- Instrucciones para su uso

- Condiciones para su almacenamiento
- Fecha de caducidad
- Número de lote
- Nombre y dirección del productor

(11,50).

DETERMINACION DE LA PUREZA. En el cultivo madre, en el -- cultivo de producción y en el producto terminado, existen va-- rios ensayos que complementan la detección de los microorganismos contaminantes cuyas características macroscópicas y microscópicas deben ser diferentes a la bacteria de interés (ver tabla 2.2.1). Estas determinaciones se efectúan mediante:

-Inoculación en Peptona Glucosa Agar e incubación a 28 - 30 °C durante 24-48 h. El crecimiento abundante en este medio de cultivo indica la presencia de contaminantes que frecuentemente se asocia con el cambio del pH que se observa al incluir al medio base un indicador (Púrpura de Bromocresol: 10 ml de una solución al 1.0% en etanol, por litro de medio).

Agrobacterium es el contaminante más común; crece abundantemente con cambios apreciables del valor de pH (7,21,37, - 51,52).

-Inoculación en Extracto de Levadura Manitol Agar Rojo -- Congo e incubación a 28-30 °C. En este medio Rhizobium presenta características específicas, por lo que el desarrollo de colonias con características diferentes a aquellas (ver tabla -- 2.2.1) así como la presencia de colonias que absorben el colorante adicionado al medio base, indica la presencia de contaminantes. Es necesario incubar en la obscuridad para evitar que las especies de Rhizobium absorban el colorante por el efecto de la luz (7,11,21,50,52).

La ausencia de contaminantes en diluciones desde 10^6 inoculadas en los medios de cultivo anteriores, indica que el ino

culante es aceptable (50).

•Tinción de Gram. Se realiza de cada colonia detectada en los medios anteriores que presente características macroscópicas diferentes a las de la bacteria de interés (21,24,28,37, - 50,52).

•Determinación del pH. Cuando el pH del cultivo líquido inoculado es mayor a 8 o menor a 6 indica la probable presencia de contaminantes (21,24). Excepto en los casos de Rhizobium meliloti que produce un pH de 5,4 y para los cultivos de Lotononis que alcaliniza el cultivo (50).

•Identificación por aglutinación. Verifica la estirpe usada. Es una técnica recomendada por su simpleza, y facilidad. La tipificación serológica por aglutinación da la posibilidad de una caracterización rápida de la estirpe presente en los nódulos, que contienen los bacteroides con los antígenos que aglutinan específicamente al suero inmune contra la especie que - dió origen al nódulo. La desventaja principal que presenta este ensayo es que el laboratorio de control de calidad debe disponer de los sueros inmunes anti-cepa de las bacterias que emplean en la fabricación de los inoculantes biológicos (21,24, 50,52,54).

ENSAYOS CUANTITATIVOS

DETERMINACION DE LA HUMEDAD. Se determina por pérdida de peso al secado (15,37,51).

CUENTA TOTAL DE CELULAS (CAMARA DE PETROFF HAUSSER). Se emplea un microscopio de contraste de fase y un objetivo de 20-40 X, los microorganismos cuantificados no permiten diferen

ciar a las células vivas de las muertas. Los resultados están dados por el número de células por volúmen (21,50).

DETERMINACION DEL NUMERO DE RHIZOBIA VIABLE. Se emplea el método de dilución y cuenta en placa y el medio de cultivo ELMARC. Se realiza una serie de diluciones decimales de una muestra representativa hasta obtener cajas con 30 a 300 colonias. En este medio Rhizobium presenta características culturales específicas que facilitan su cuantificación, pero no es posible distinguir a las diferentes cepas del Rhizobium cuando se trata de inoculantes multicepa (17,24,33).

En este medio se realiza simultáneamente la detección y cuantificación de los contaminantes. O bien para evitar el desarrollo de éstos y evaluar el número real de Rhizobia se agrega al medio cualquiera de los siguientes componentes:

- Oligomicina (2.5 ml/l, de una solución al 1%)
- Rosa de Bengala (30 mcg/ml)
- Penta Cloro Nitro Benceno (PCNB) (50 mcg/ml)
- Rosa de Bengala-Oligomicina (30 ppm/30 ppm)
- Oligomicina-Rosa de Bengala-PCNB (30 ppm/7.5 ppm/50 ppm)
- Verde Brillante-Rojo Congo-Azida de Sodio-PCNB (0.1 ppm/25 ppm/0.1 ppm/5 ppm)

(11).

El agente diluyente varía, empleándose agua destilada, solución salina (0.85%), ó solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.2). El tiempo para obtener resultados varía de 4 a 6 días para las especies de crecimiento rápido y de 7 a 10 días para las de crecimiento lento. Las desventajas que presenta éste método es que el medio empleado para las placas no es selectivo, y los contaminantes presentes llegan a predominar sobre el número de Rhizobia (11,21,50). Considerándose como una cuenta im práctica cuando existe de contaminantes el 0.1% (37), y cuando existe presencia de éstos hasta la dilución 10^6 (50).

ENSAYOS EN EL INVERNADERO. Se emplea el método de dilución e infección en planta y se determina la habilidad para formar nódulos y la efectividad (capacidad de la fijación del nitrógeno), mediante evaluaciones de peso seco de parte aérea, peso seco de nódulos y nitrógeno total.

En éstos ensayos se deben considerar: el hospedero específico, las condiciones del invernadero como son la temperatura que influye en el desarrollo de la especie de la planta que se emplea, el periodo de luz, la circulación del aire, y evitar la contaminación entre tratamientos.

Existe una gran variedad de sistemas para este tipo de ensayos que incluyen: tubos de ensayo, Jarras de Leonard, Vasos de Glazard, Macetas y Bolsas de polietileno. El material de soporte puede ser diferente en cada caso, al igual que la forma en que son esterilizados.

El método de dilución e infección en planta es conocido con el nombre del número más probable (NMP). Método indirecto que involucra la inoculación de diluciones crecientes en las semillas del hospedero específico, las que son cultivadas en condiciones de invernadero.

Cuando únicamente se trata de establecer el número de Rhizobia se requiere de un tiempo menor, y se asume que la presencia de una bacteria es suficiente para inducir la nodulación, por lo que para determinar el NMP se detectarán únicamente los nódulos. El cálculo de Rhizobia por gramo de inoculante se basa en la "Teoría del Máximo Probable" y de la "Densidad estimada" que describen Fisher & Yates (27,53).

La desinfección de las semillas se efectúa de acuerdo a su tamaño y características de su cubierta, y se emplea agua oxigenada y alcohol etílico al 95% ó Ac. Sulfúrico ó NaOCl ó

HgCl_2 al 0.2% (11,29).

El vehículo para las diluciones puede ser solución salina, agua destilada, ó solución amortiguadora de fosfatos. Cuando se emplea inoculantes a base de aceites se emplea un agente surfactante como Tween ó Span 85 (50).

Para el riego de las plantas se han descrito numerosas soluciones nutritivas (11,50,51).

2.8 SECUENCIA DE ENSAYOS DE CONTROL DE CALIDAD EN LA ELABORACION DE INOCULANTES A BASE DE SOPORTES SOLIDOS

ENSAYOS	MATERIA PRIMA			PROCESO DE PRODUCCION		
	CC	S	MC	CM	F	PT
Físicos y Químicos						
-Características del rótula (con especificaciones diferentes en cada caso)	+	+	+	+	+	+
-pH		+	+	+	+	+
-Tamaño de partícula	+					
-Contenido de humedad	+					+
-Características nutricionales	+	+				

" + " = sí se realiza el ensayo indicado

CC = Cepa de Colección

CM = Cultivo madre (stock)

S = Soporte

F = Fermentación

MC = Medio de Cultivo

PT = Producto Terminado

2.8 SECUENCIA DE ENSAYOS DE CONTROL DE CALIDAD EN LA
ELABORACION DE INOCULANTES A BASE DE SOPORTES SOLIDOS
(CONTINUACION)

ENSAYOS	MATERIA PRIMA			PROCESO DE PRODUCCION		
	CC	S	MC	CM	F	PT
•Tinción de Gram	+	+		+	+	+
•Aglutinación	+			+	+	+
•Desarrollo en ELMARC	+			+	+	+
•Detección de contami nantes por aglutina-- ción en PGAPB	+	+		+	+	+
•Cuenta total				+	+	
•Cuenta de viables	+			+	+	+
•Infectividad	+			+	+	+
•Efectividad	+			+	+	+

" + " = sí se realiza el ensayo indicado

CC = Cepa de colección

CM = Cultivo Madre(stock)

S = Soporte

F = Fermentación

MC = Medio de Cultivo

PT = Producto Terminado

2.9 TIPOS DE INOCULANTES Y METODOS DE APLICACION

Dependiendo del soporte base del cultivo bacteriano se clasifican en :

•Inoculante a base de un cultivo seco en aceite: a la suspensión celular después de un proceso de secado es recolectado e impregnado en aceite (de origen animal o vegetal) con lo cual se reduce el contenido de agua de las células sin afectar su viabilidad. El contenido de humedad varía del 1-10% . Esta presentación del inoculante es estable a temperatura de 75 °C.

Sólo se produce a nivel laboratorio ó a pequeña escala, - se aplica sobre la semilla.

(50,54).

•Inoculante a base de un cultivo desarrollado en agar: se presenta en un recipiente de vidrio en el cual se encuentra -- propagada la bacteria sobre la superficie sólida del agar nutritivo.

Para su aplicación se lava la superficie del medio de cultivo con agua estéril, y con ésta suspensión concentrada de microorganismos se humedecen las semillas o se aplica al suelo.

Su producción y aplicación es sencilla; al ser visible el crecimiento se detectan fácilmente los contaminantes.

(50,54).

•Inoculante a base de cultivo liofilizado: en el proceso de liofilización el cultivo precongelado es desecado por sublimación al vacío, reduciendo la actividad metabólica al mínimo y obtiene en un pequeño volumen una alta concentración de células.

las, además que ocupa poco espacio al almacenarse; el tiempo de vida media del producto es mayor aún a temperaturas altas.

Para emplearse simplemente se reconstituye en solución reguladora de fosfatos ó SSI ó caldo de cultivo; tiene como desventaja que el equipo empleado es complejo y caro.

(19,50,54).

•Inoculante a base de cultivos congelados concentrados: el cultivo bacteriano es concentrado en una pasta, empaçado y congelado rápidamente, sometidos a congelación con hielo seco.

Almacenado a 0 °C por 8 meses. Tienen que ser usado en menos de 24 h. Únicamente se aplica con la técnica de "slurry".

(54).

•Inoculante a base de un soporte sólido: depende del tamaño de partícula del soporte (polvo fino, polvo regular y granulado), cuyas características garantizan la sobrevivencia de la bacteria aumentando el tiempo de vida media del producto.

A nivel industrial ésta presentación es la más empleada.

La gran variedad de soportes que pueden usarse permiten el empleo de cepas de Rhizobium específicas y amplían su uso en una gran variedad de leguminosas.

(34,50,54).

APLICACION DEL INOCULANTE

Si se mezcla el inoculante y la semilla fuera del área de siembra se le denomina método indirecto (20), y directo -- cuando el inoculante se aplica al suelo (8).

El método indirecto comprende varias técnicas de aplicación:

-método en seco, cuando la mezcla de inoculante y semilla se incorpora al suelo humedecido (23,37,40-46).

-método de "slurry", cuando al inoculante se le adiciona agua antes de mezclarse con la semilla (25,29).

-método de rociado, si primeramente se humecta a la semilla con agua, goma arábiga u otra solución adherente y después se adiciona al inoculante (13,25,31).

-Recubrimiento, cuando se le adiciona un agente neutralizante (Carbonato de calcio) sobre la semilla ya recubierta con el inoculante (10,34,37).

III OBJETIVOS

- 3.1 Comprobar la variabilidad de algunos inoculantes -- que se distribuyen en el país, mediante la determinación de la calidad de 11 inoculantes biológicos (6 elaborados en la Facultad de Química y 5 comerciales).
- 3.1.1 Determinar el número de Bradyrhizobia viables - por gramo de inoculante.
 - 3.1.2 Detectar la presencia de contaminantes.
 - 3.1.3 Determinar la proporción de los contaminantes - en relación al Bradyrhizobia presente.
 - 3.1.4 Corroborar la capacidad infectiva y efectiva de las bacterias.
 - 3.1.5 Caracterizar la calidad de los productos empleados con base en las determinaciones anteriores.
 - 3.1.6 Comparar la calidad y competitividad de los productos analizados.
- 3.2 Proporcionar la secuencia que debe tener un manual de procedimientos de control de calidad que sirva de base en la elaboración de inoculantes sólidos que son los de mayor uso en el país.

IV PARTE EXPERIMENTAL

4.1 INOCULANTE. Los productos que se emplearon fueron:

- INOCULANTE DIANITRO FIX SOYA
- NITROBIOL. INOCULANTE PARA SOYA (FERTILIZANTES MEXICANOS, S.A.)
- LUCANIT. INOCULANTE PARA SOYA (QUIMICA LUCAVA, S.A. de C.V.)
- INOCULANTE PARA SOYA (EMPRESAS NITRAGIN)
- INOCULANTE PARA SOYA (FIRA)
- INOCULANTE PARA SOYA. CEPA FQ₄ (FAC. QUIMICA, UNAM)
- INOCULANTE PARA SOYA. CEPA FQ₇ (FAC. QUIMICA, UNAM)
- INOCULANTE PARA SOYA. CEPA FQ₈ (FAC. QUIMICA, UNAM)
- INOCULANTE PARA SOYA. CEPA FQ₉ (FAC. QUIMICA, UNAM)
- INOCULANTE PARA SOYA. CEPA FQ₁₇ (FAC. QUIMICA, UNAM)
- INOCULANTE PARA SOYA. CEPA FQ₁₈ (FAC. QUIMICA, UNAM)

Estos fueron adquiridos en tiendas comerciales, a través de agricultores y en la Fac. de Química, UNAM. Todos se conservaron en refrigeración hasta el momento de su análisis.

El orden en que están mencionados los inoculantes comerciales es independiente al orden en que están denotados en los análisis.

4.1.1 DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

Muestra las determinaciones físicas y microbiológicas a partir del inoculante sólido ó de una serie de diluciones decimales (Ver diagrama).

4.2 DETERMINACIONES FISICAS

4.2.1 PH

Se empleó una relación inoculante-agua 1:10, y se tomó la lectura en un potenciómetro Beckman pH meter Md H2 (51,52).

4.2.2 % Humedad

Por pérdida a temperatura de 98 °C hasta peso constante (17).

$$\% H = \frac{P_i - P_f}{P_i}$$

Donde:

% H = Por ciento de humedad

P_i = Peso de la muestra húmeda

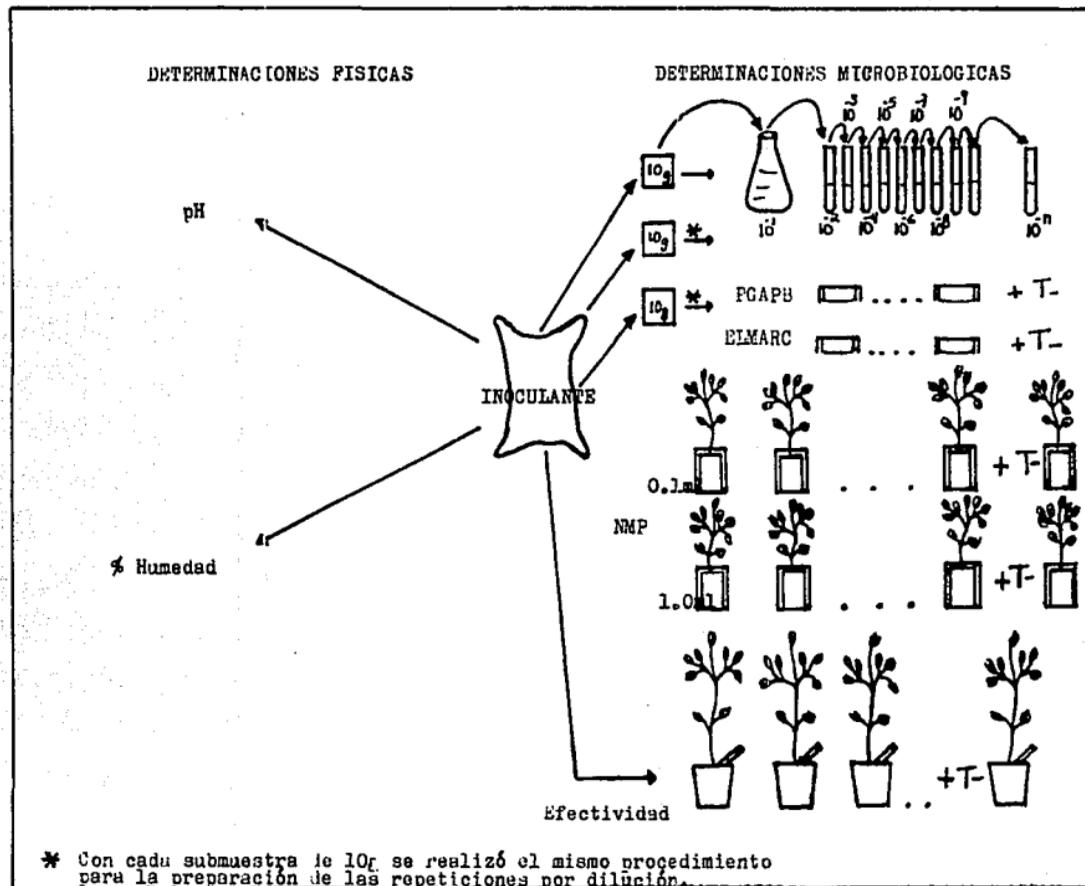
P_f = Peso de la muestra a peso constante

4.3 DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

4.3.1 Determinación de Bradyrhizobia viables por gramo de inoculante en base húmeda por el método de dilución y siembra en placa.

Se toman 3 submuestras del inoculante de 10 g de cada una. Preparar tres series de diluciones de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ empleando como vehículo una solución salina al 0.85 %.

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



En cajas de Petri estériles colocar 1.0 ml de las diluciones 10^{-6} a 10^{-10} de cada una de las series con lo que se tiene cada dilución por triplicado.

Agregar a cada caja petri 20 ml del medio Extracto de la vadura manitol agar rojo congo (apéndice 8.1), el que deberá estar a temperatura de 40 a 45 °C.

Incubar durante 10 días a temperatura de 28-30 °C.

Seleccionar las cajas que contengan menos de 300 colonias y se cuantifican las colonias que presentan las características típicas de Bradyrhizobium (17,52).

4.3.2 Detección de contaminantes

Se empleó el método de dilución y siembra en placa descrito en el inciso anterior, empleando los medios de cultivo Extracto de levadura manitol rojo congo y Peptona glucosa púrpura de bromocresol (apéndice 8.1 y 8.2). Incubación a 28 °C durante 10 días y 48 horas respectivamente. De las colonias atípicas desarrolladas en ELMARC se hicieron frotis y coloraciones por la técnica de Gram (apéndice 8.3).

4.3.3 Determinación de la proporción de Rhizobia y contaminantes.

Se realizó con base en la cuantificación de colonias típicas y atípicas desarrolladas en el medio de ELMARC.

4.3.4 Determinación de la capacidad infectiva, por el método de dilución e inoculación en el hospedero específico.

Se probaron 2 niveles de inoculación (0.1 y 1.0 ml) para ello con cada inoculante se procedió a:

-Preparación de las unidades experimentales.

En 548 bolsas de polietileno negras, se colocó una hoja de papel filtro grueso previamente esterilizado (apéndice

ce 8.5). Estas se dividieron en 11 series de 48 bolsas - y 1 de 20. Se colocaron en un bastidor de alambre (apéndice 8.6) y a cada bolsa se le agregan 20 ml de solución nutritiva de Jensen esterilizada libre de nitrógeno (apéndice 8.4).

-Preparación de las semillas.

Se emplearon semillas de Glycine max variedad Jupiter. Se seleccionaron semillas de igual tamaño y sin daños -- aparentes. Estas se colocaron en un frasco y fueron desinfectadas por tratamiento con etanol al 95 % e hipoclorito de sodio al 5 %. El exceso de desinfectante se eliminó mediante lavados con agua estéril.

Las semillas desinfectadas se colocaron en cajas de petri con algodón y papel estéril y humedecidos y se dejaron a 28 °C durante 3 días para su germinación.

En condiciones de asepsia y con pinzas estériles se colocó 1 semilla germinada en cada bolsa.

-Inoculación de las semillas.

Con cada inoculante se prepararon 2 series de diluciones de 10^{-1} a 10^{-8} .

Con las diluciones 10^{-3} a 10^{-8} de cada serie se inocularon por duplicado 0.1 ó 1.0 ml con lo que se probó cada dilución por cuadruplicado en los dos niveles de inoculación, empleándose 48 bolsas por inoculante y 20 bolsas como testigos.

Las unidades experimentales se colocaron en invernadero durante 3 semanas procediéndose a detectar la presencia o ausencia de nódulos (apéndice 8.7) y determinar el número más probable (NMP) de rhizobia.

-Determinación del NMP.

Se cuantificó el número total de bolsas positivas y se consultaron las tablas de Fisher & Yates (apéndice

8.9), en donde:

$$n = 4$$

$$s = 6$$

$$\text{Rhizobia/g inoculante} = \frac{m \times d}{v \times g}$$

m = NMP en la dilución mínima

d = inverso de la primera dilución empleada

v = volumen de la muestra adicionada

g = peso de la muestra.

(17,52,53).

4.3.5 Determinación de la efectividad en la fijación de nitrógeno.

Se realizó con 9 de los 11 inoculantes en estudio, empleando macetas con tezontle y solución nutritiva libre de nitrógeno (apéndice 8.4).

-Preparación de unidades experimentales:

Macetas de 20 cm de diámetro fueron lavadas y desinfectadas con cloralex y cubiertas con papel estroza.

El soporte (tezontle) se lavó y se le ajustó el pH a 7.0. Este fué empacado en bolsa de polipropileno y se esterilizó por exposición a vapor corriente durante 90 minutos. En condiciones de asepsia se llenaron las macetas con el tezontle estéril y se humedecieron con 350 ml de solución de Jensen (apéndice 8.4).

-Desinfección de las semillas e inoculación.

Se pesaron 11 lotes de 5 g de semilla de Glycine max variedad Jupiter. Estos se colocaron en 11 frascos y se agregó hipoclorito de sodio al 5 % (v/v) durante 5 minutos, se decantó el desinfectante y se lavaron 10 veces -

con agua estéril a fin de eliminar el desinfectante. Se agregó en cada frasco 0.1 ml de adherente (goma arábiga al 40 %) y se agitó para cubrir las semillas y se procedió a agregar 0.2 g del inoculante a probar procurando que las semillas quedaran perfectamente cubiertas. Con una espátula desinfectada se procedió a colocar de - cada lote o tratamiento 6 semillas por maceta, las que se dejaron germinar y de ellas se dejaron 2 plantas por maceta.

Las unidades (apéndice 8.8) se colocaron en el invernadero a temperatura mínima nocturna de 13°C y máxima diurna de 32°C y 13 h luz.

En el periodo de crecimiento se dieron riesgos alternos de solución nutritiva y agua esteril.

La cosecha se realizó a los 50 días y se evaluó el peso seco de nódulos y parte aérea.

-Diseño experimental: Completamente al azar con 3 repeticiones.

-Descripción de los tratamientos y claves:

Inoculantes comerciales

- 1.- A
- 2.- B
- 3.- C
- 4.- D
- 5.- E

Inoculantes preparados con cepas de la colección de la Fac. de Química, UNAM.

- 6.- FQ₈
- 7.- FQ₉
- 8.- FQ₁₇
- 9.- FQ₁₈
- 10.- Testigo negativo.

Tabla No.1

Resultados de algunas características físicas de once inoculantes (Se expresa la media de 3 repeticiones)

Inoculantes	Características	
	pH .	%Humedad ..
A	6.2	37.4
B	7.2	51.1
C	6.8	42.9
D	6.8	40.3
E	6.4	54.6
FQ ₄	7.4	42.8
FQ ₇	7.3	39.3
FQ ₈	7.4	43.1
FQ ₉	7.1	40.2
FQ ₁₇	7.1	41.1
FQ ₁₈	6.2	37.7

* Metodología p.46

** Metodología p.46

Tabla No. 2

Número de *Bradyrhizobia/g* inoculante

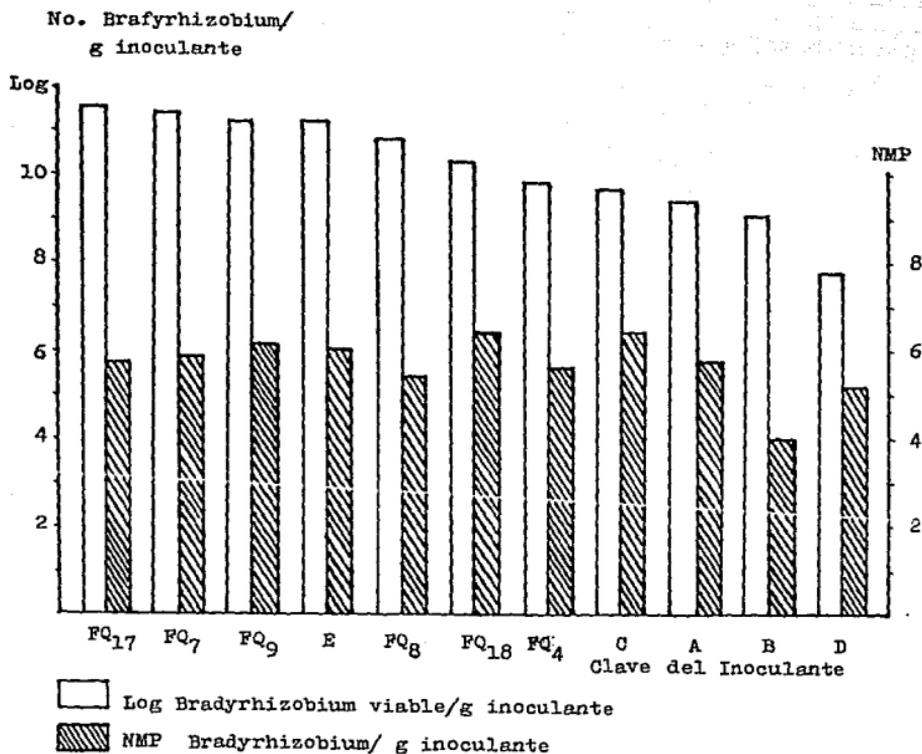
Tipo de inoculante	Cuenta en placa	Infección en planta	
		1.0ml	NMP.. 0.1ml
A	2.6×10^9	2.7×10^5	8.6×10^5
B	1.3×10^9	1.2×10^4	1.3×10^4
C	5.9×10^9	9.9×10^5	3.2×10^6
D	5.9×10^7	3.9×10^5	1.7×10^5
E	1.7×10^{11}	5.9×10^5	1.2×10^6
FQ ₄	7.1×10^9	4.1×10^5	2.7×10^5
FQ ₇	9.8×10^{11}	8.5×10^5	2.7×10^5
FQ ₈	2.1×10^{10}	1.3×10^5	3.0×10^5
FQ ₉	6.7×10^{11}	5.9×10^5	1.7×10^6
FQ ₁₇	3.1×10^{11}	7.1×10^5	3.0×10^5
FQ ₁₈	2.3×10^{10}	1.4×10^6	3.1×10^6

*Metodología pp. 46-47

**Metodología pp. 47-49

Gráfica No.1

Relación del No. de Bradyrhizobium y el NMP de Bradyrhizobium infectiva por gramo de inoculante.



Gráfica No. 2

Relación del NMP bajo dos niveles de inoculación

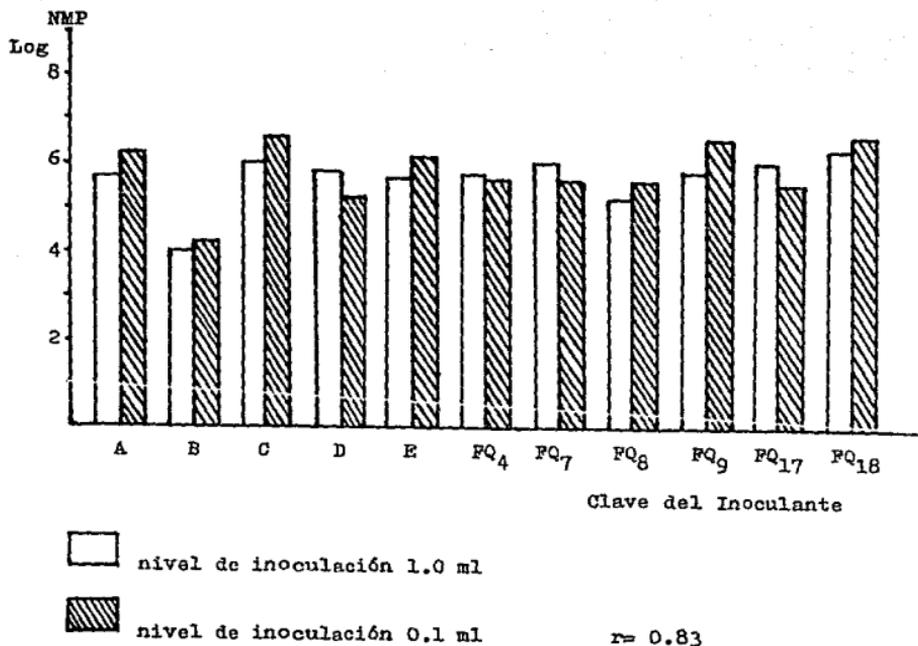


Tabla No. 3.1

Descripción de algunas características culturales de contaminantes desarrollados en el medio de cultivo PGAPB.

Tipo del Inoculante	Características de Coloniales	Contaminantes. Microscópicas
A	(1) Mayor a 2mm de diámetro, mucosas, blancas, cóncavas, con bordes regulares, productoras de acidez. (2) menor a 2mm de diámetro, mucosas, azules, planas, -- con bordes regulares.	bacilos grandes Gram negativo bacilos grandes Gram negativo
E	Idem. (2) (3) mayor a 2mm de diámetro, mucosas, bordes regulares, amarillentas, productoras de acidez.	Idem. (2) bacilos grandes Gram negativo
PQA	Idem. (2)	Idem. (2)

Tabla No. 3.2

Descripción de algunas características culturales de contaminantes desarrollados en el medio de cultivo ELMARC

Tipo del Inoculante	Características de Contaminantes	
	Coloniales	Microscópicas
A	(1) menor a 2mm de diámetro, mucosas, amarillentas, planas, bordes irregulares.	cocos Gram negativo
B	Idem. (1) (2) crecimiento de hongos (3) mayor a 2mm de diámetro, transparentes, amarillentas, bordes regulares.	Idem. (1) bacilos delgados Gram negativo
C	Idem. (1) Idem. (2)	Idem. (1)
E	Idem. (3)	Idem. (3)

* Metodología pp. 47

Tabla No.4

Resultados de la cuantificación de los contaminantes presentes en los inoculantes (medio de cultivo ELMARC)

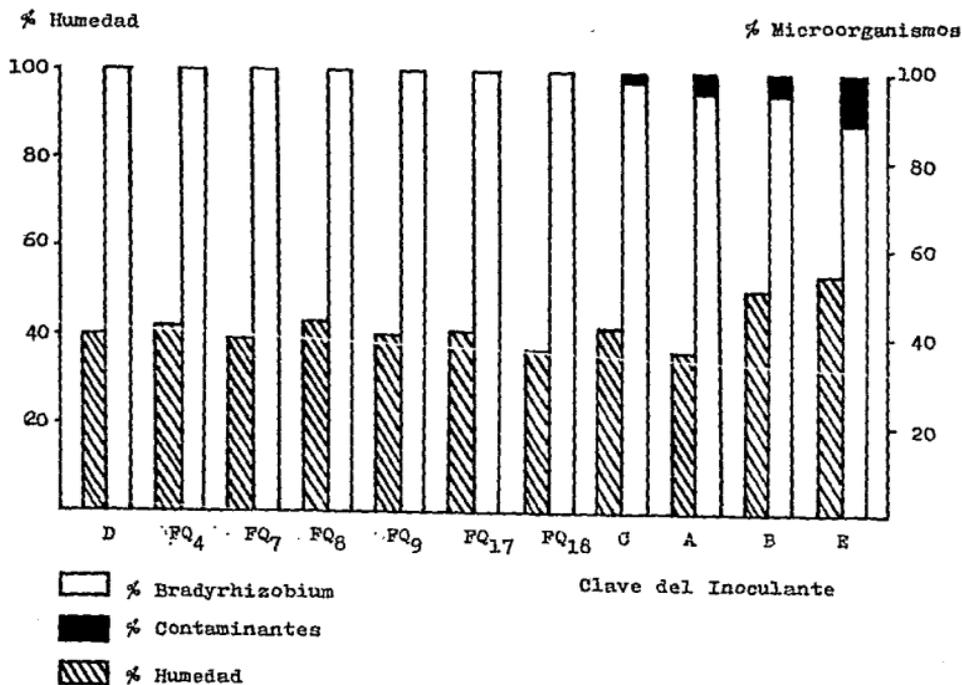
Tipo de inoculantes	Log. microorganismos/g inoculante		%Contaminantes..
	Bradyrhizobium	Contaminantes	
A	9.41	0.44	4.5
B	9.11	0.43	4.6
C	9.77	0.02	0.2
D	7.77	0.0	0.0
E	11.19	1.57	11.6
FQ ₄	9.83	0.0	0.0
FQ ₇	11.36	0.0	0.0
FQ ₈	10.85	0.0	0.0
FQ ₉	11.23	0.0	0.0
FQ ₁₇	11.49	0.0	0.0
FQ ₁₈	10.32	0.0	0.0

* Metodología pp. 47

** Metodología pp. 47

Gráfica No. 3

Relación porcentual del No. Bradyrhizobium-No. Contaminantes viables presentes en el medio de ELMARC con respecto al % humedad



(% Contaminantes- %Humedad, $r=0.73$)

Tabla No. 5

Resultados de las pruebas de efectividad en la fijación del nitrógeno. ..

Inoculante	Determinación del peso seco	
	parte aérea/planta (g)	nódulos t/planta (mg)
FQ ₁₇	0.52 a	28.9
FQ ₈	0.50 b	28.9
C	0.50 b	12.4
FQ ₁₈	0.47 c	18.2
FQ ₉	0.37 d	45.5
A	0.33 e	22.8
E	0.33 e	12.7
T-	0.32 e	0.0
B	0.21 f	53.2
D	0.16 g	2.9

Peso seco de la parte aérea (g)

Inoculante	Repetición			\bar{T}_t	\bar{X}_t
	I	II	III		
A	0.28	0.42	0.34	0.99	0.33
B	0.20	0.23	0.19	0.62	0.21
C	0.40	0.50	0.61	1.51	0.50
D	0.18	0.19	0.12	0.49	0.16
E	0.40	0.20	0.39	0.99	0.33
FQ ₈	0.52	0.56	0.43	1.51	0.50
FQ ₉	0.54	0.27	0.30	1.11	0.37
FQ ₁₇	0.46	0.56	0.55	1.57	0.52
FQ ₁₈	0.34	0.42	0.55	1.31	0.47
T-	0.35	0.24	0.36	0.95	0.32
				$\bar{X}_t = 1.05$	$\bar{X} = 0.37$

Análisis de Varianza

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F _{cal}	F _{5%}
Total	29	0.61			
Tratamiento	9	0.41	0.045	4.5	2.35
Error	20	0.20	0.010		

GL: Grados de libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrado medio

Prueba de separación de Duncan

Diferencia significativa mínima = 0.017

F	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R	1.0		1.08		1.12		1.14		1.15
		1.05		1.10		1.13		1.15	
DSM		0.0178		0.0187		0.0192		0.0195	
	0.017		0.0184		0.0194		0.0193		0.0195

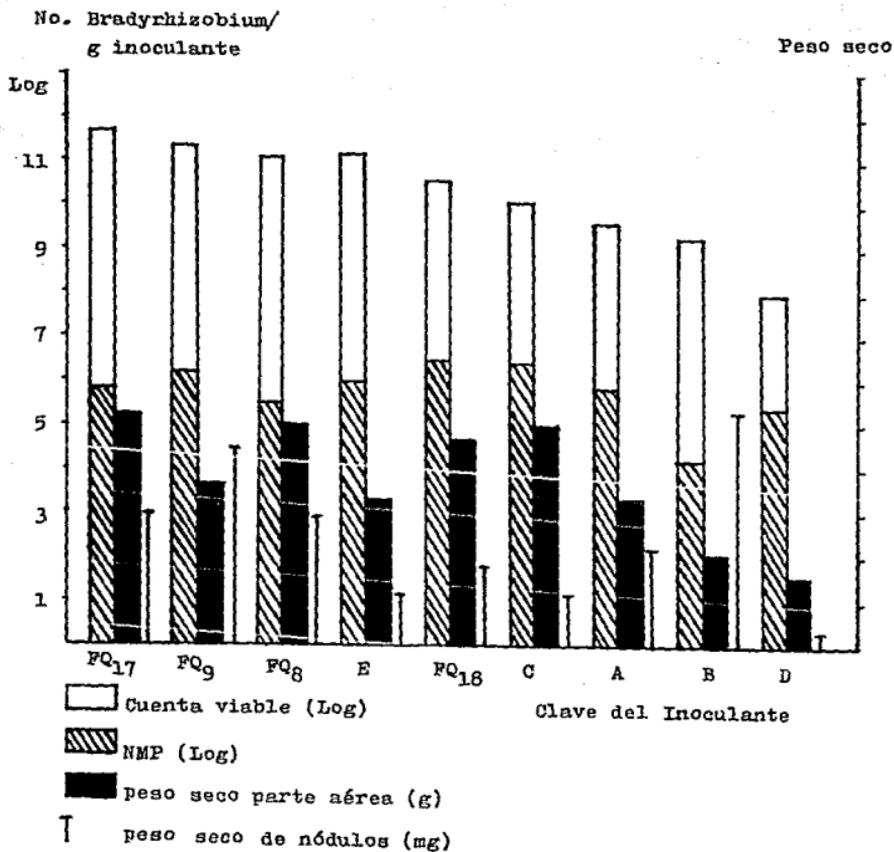
Ordenación de las medias de los tratamientos en forma ascendente.

			A			C	
D	B	T-	E	FQ ₉	FQ ₁₃	FQ ₈	FQ ₁₇
0.16	0.21	0.32	0.33	0.37	0.47	0.50	0.52



Gráfica No. 3

Relación de los resultados obtenidos en la cuenta viable-
NMP- peso seco de parte aérea y peso seco de nódulos.



V DISCUSION DE RESULTADOS

-En la tabla No.1 se observa que los valores de pH obtenidos son muy similares a los recomendados en la literatura los que fluctuan entre 6.2 y 7.4 .

-Respecto al contenido de humedad la literatura indica para inoculantes a base de soportes estériles valores de 50 a 60 % y para aquellos en que se emplean soportes no estériles de 35 a 40 %.

Los inoculantes estudiados corresponden a los primeros, y el contenido de humedad fué adecuado en E y B .

En tanto que en los otros los valores resultaron inferiores variando entre 37.4 a 43.1 (Tabla No.1).

-La correlación entre pH y contenido de humedad fué de 0.008 (Tabla No.1).

-Respecto al número de rhizobia viables por gramo de inoculante se tiene que únicamente en el caso de la muestra D se registró de 10^7 células/g inoculante a base de soporte estéril (Tabla No.2).

-Los resultados obtenidos por el método de infección en planta permitieron corroborar las variaciones reportadas en la literatura respecto al número de células viables establecidas por el método en placa. Así mismo se comprobó que las cepas contenidas en los diferentes inoculantes mantienen su capacidad infectiva (Tabla No.2 y Gráfica 1).

Otro aspecto interesante encontrado es que no hay variaciones considerables producidas por los diferentes niveles de

inoculación, observándose una correlación de 0.83 (Gráfica -- No.2).

-Los resultados de las tablas 3.1 y 3.2 indican la presencia de contaminantes en 4 de los 5 inoculantes comerciales estudiados y en uno de los seis producidos en la Facultad de Química, registrándose en éste último una cantidad muy baja de contaminación.

Las observaciones microscópicas de las colonias desarrolladas en los medios PGAPB y ELMARC indican que los contaminantes más frecuentes corresponden a bacilos Gram negativos - productores de acidez, se detectaron formas coccoides en menor proporción y bacilos Gram negativos pero productores de alcalinidad.

Es interesante hacer notar que en las muestras A y E en donde hubo gran cantidad de contaminantes productores de ácido corresponden a las muestras en las que se obtuvo un pH menor (Tablas No.1, 3.1 y 3.2).

Respecto a la cantidad de los contaminantes los valores resultaron muy elevados en las muestras de inoculante comer--cial, las que varían de 0.2% a 11.5%, siendo el máximo permitible de 0.1% (Tabla No.4).

-En la Gráfica 3 se correlaciona el contenido de humedad con el número de microorganismos viables la que resultó de -- 0.73 y se tiene que en tres de las muestras que presentaron mayor cantidad de humedad se detectó mayor cantidad de contaminantes.

-En la Tabla No.5 se expone los resultados de peso seco de parte aérea y peso de nódulos que indican la efectividad e infectividad de las diferentes cepas presentes en los inoculantes estudiados.

De ellos se realizó el análisis estadístico empleando un nivel de significancia de 0.05.

El análisis de varianza muestra que hay diferencia significativa entre los inoculantes. Teniéndose que los inoculantes que contienen cepas más eficientes corresponden a FQ₈, FQ₁₇ y C los que a la vez no presentaron contaminación ó en el caso del inoculante C sólo presentó 0.2%. En tanto que las cepas de los inoculantes comerciales A, E, B y D son ineficientes dando valores de peso seco igual o inferior al testigo negativo, observándose que el tratamiento D dió los valores más bajos en cuanto a cuenta viable y peso seco de parte aérea.

Los valores de masa nodular indican que todas las cepas son infectivas. La cepa del inoculante B mostró alta infectividad y baja efectividad, y nuevamente el inoculante D corresponde a los valores más bajos (Gráfica No.4).

VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1.- Se comprobó la variabilidad en la Calidad de los diferentes inoculantes biológicos estudiados.

Las características de contenido de humedad, pH, número de Rhizobia viables/g inoculante y efectividad en los diferentes inoculantes estudiados fueron variables.

En cuanto a la infectividad fueron similares en 9 de los 11 inoculantes.

2.- La presencia de microorganismos contaminantes en el -- inoculante estudiado está directamente relacionado con la alta humedad del producto así como con los valores de pH más bajos obtenidos.

3.- La diferencia de los valores obtenidos por la cuenta viable en placa y NMP varían exponencialmente, siempre es menor la cuenta por el NMP, resultados que concuerdan con la literatura (33,35). La diferencia entre estos métodos es mayor cuando los inoculantes han sido expuestos a condiciones adversas en su distribución y almacenamiento (principalmente a las elevadas temperaturas) (33).

La diferencia se acentúa cuando el inoculante presenta contaminantes, esto probablemente se debe a que los contaminantes son considerados como Rhizobia en la cuenta viable (27, 55).

Como base en lo anterior para ensayos de control de -- calidad se recomienda el método del NMP, con el que se elimina la posibilidad de incluir en la cuenta a los contaminantes y el.. que simultáneamente permite determinar las características de infectividad.

Y es indiferente emplear como nivel de inoculación 1 ó 0.1 ml en la determinación del NMP.

4.- La variación más acentuada se observó en la efectividad de las cepas que constituyen a los diferentes inoculantes. Esto indica que la sola determinación de rhizobia viables por gramo de inoculante, no asegura la calidad del mismo. Y que para obtener los beneficios que se esperan de estos productos es necesario exigir la utilización de cepas efectivas y específicas, características que deben incluirse en el control de calidad. Esta determinación debe realizarse preferentemente en los ceparios para eliminar el riesgo de fabricación de lotes de inoculantes con cepas que carezcan de las propiedades mencionadas.

5.- Los ensayos de control de calidad indican que los inoculantes elaborados en la Facultad de Química y el comercial C reúnen todas las características que satisfacen la calidad del producto.

Los inoculantes A y E aún cuando fueron satisfactorios presentaron contaminación por lo que se recomienda mayor cuidado durante su manipulación.

Al considerar el número de rhizobia/g de inoculante, los productos B y D son satisfactorios, sin embargo estos no se recomiendan por contener cepas inefectivas en la fijación de nitrógeno o inespecíficas para la variedad empleada.

6.- Lo anterior indica la importancia de realizar el ensayo de efectividad en la fijación de nitrógeno ya que el número elevado de rhizobias viables por gramo de inoculante no asegura la calidad de este tipo de productos.

7.- Considerando la importancia de este tipo de productos

y de que en nuestro país la producción y aplicación de los --
mismos va en aumento se recomienda:

-Establecer NORMAS de control de calidad las que debe--
ran ser dadas por una secretaría gubernamental, y en las que --
se debe considerar la materia prima, proceso de producción y
producto terminado (ver generalidades en el punto 2.8).

-Estandarizar la metodología para realizar las dife--
rentes pruebas de control de calidad, misma que deberá ser usa
da por industrias y laboratorios de control.

VII BIBLIOGRAFIA

- 1.- AMARGER, N. 1981
"SELECTION OF RHIZOBIUM STRAINS ON THEIR COMPETITIVE ABILITY FOR NODULATION"
Soil Biol. Biochem. Vol. 13 pp: 481-486.
- 2.- A.D.I.F.A.L. 1986
(ASOCIACION PARA EL DESARROLLO DE LA INDUSTRIA DE LOS FERTILIZANTES EN AMERICA LATINA, A.C.)
"FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO"
Vol. VIII No. 15 : 9-24. Mayo-Junio.
- 3.- BALATTI, A.P. & MAZZA, L.A. 1978
"PRODUCTION OF INOCULANTS OF LEGUMINOSSES"
Rev. Lat. Amer. Microbiol. Vol. 20 pp: 87-93
- 4.- BALATTI, A.P. 1982
"CULTURING RHIZOBIUM IN LARGE ESCALE FERMENTORS"
In: B.N.F. Technology for Tropical Agriculture.
By Graham, P.M. & Harris, S.C. (Eds)
Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
March 9-13 pp: 127-132
- 5.- BERGEY'S 1974
"BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY"
Co-Editors: R.E. Buchanan & N.E. Gibbons
9th Edition. The Williams Wilkins Company/Baltimore

- 6.- BERGEY'S 1984
"BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY"
Editor: John G. Holt
The Williams Wilkins Company/Baltimore.
- 7.- BERMUDEZ, G.J.; BAKES, B.C.; SILVESTRINI, H.E. 1978
"ENSEÑANZA DE LA RHIZOBIOLOGIA EN LA FACULTAD DE ---
CIENCIAS AGRARIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ---
NOROESTE"
En: Trabajos presentados en la IX Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium.
Argentina, pp: 356-359.
- 8.- BOONKERD, N.; ARUNSRI, C.; RUNGRATT, W.; VASUVAT, Y. 1985
"EFFECTS OF POST-EMERGENCE INOCULATION ON FIELD GROWN SOYBEANS"
Mircen Journal, 1: 155-161.
- 9.- BUENO, J.J. 1975
"EFECTO DE TRES INOCULANTES Y SUS INTERACCIONES CON NIVELES DE NITROGENO Y FOSFORO SOBRE EL RENDIMIENTO Y CONTENIDO DE PROTEINA EN SOYA"
Tesis de Maestria. Colegio de Postgraduados.
Chapingo, México.
- 10.- BURTON, J.C. 1975
"METHODS OF INOCULATING SEEDS AND THEIR EFFECT ON ---
SURVIVAL OF RHIZOBIA"
In: Symbiotic Nitrogen Fixation In Plants.
By Nutman, P.S. Vol. 7 pp: 175-188.
Cambridge Univ. Press.

- 11.- BURTON, J.C. 1978
"MONITORING QUALITY EN LEGUME AND PRE-INOCULATED SEED"
En: Trabajos Presentados en la IX Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium.
Argentina, pp: 308-325.
- 12.- BURTON, J.C. 1980
"NEW DEVELOPMENTS IN INOCULATING LEGUMES"
In: Recent Advances on Biological Nitrogen Fixation.
By Nubba, Rao N.S.
Edward Arnold, India. pp: 380-405.
- 13.- BURTON, J.C. 1981
"MODERN CONCEPTS IN LEGUME INOCULATION"
In: B.N.F Technology For Tropical Agriculture.
By: Graum, P.H. & Harris, S.C. (Eds).
CIAT. Cali Colombia. pp: 105-114.
- 14.- CARDENAS, A. 1986
"COMUNICACION PERSONAL"
Director General de Política y Desarrollo Agropecuario y Forestal.
Dirección de Desarrollo Agrícola. Lab. de Fertilizantes. México, D.F.
- 15.- CARDENAS, R.A. 1985
"COMUNICACION PERSONAL"
QUIMICA LUCAVA, S.A. de C.V.
Tultitlán, Edo. de México.
- 16.- CARDENAS, R.A. & RIVERA, H. 1983
"NITROGENO IMPRESCINDIBLE EN LA AGRICULTURA"
Agro-Síntesis. Vol. 14 No. 6 pp: 42-48.

- 17.- COMITE NACIONAL DE LA FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO. 1984
"CURSO TECNOLÓGICO DE RHIZOBIUM Y PRODUCCION DE INOCULANTES"
CNFEN.; CONACYT.; Facultad de Química, UNAM.; C.P. , Chapigno.; FERTIMEX y Universidad Autónoma de Chapiggo.
pp: 59-67 ,México.
- 18.- CORBY, H.D.L. 1975
"A METHOD OF MAKING A PURE CULTURE, PEAT, LEGUMES , - INOCULANT, USING A SUBSTITUTE FOR PEAT"
In: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants.
By: Nutman, P.S. Cambridge Univ. Press.
Vol. 7 : 167-173.
- 19.- CORDOVA, U.R. 1985
"EVALUACION DE LA TURBA NACIONAL COMO SOPORTE PARA INOCULANTES DE LEGUMINOSAS CON CEPAS DE RHIZOBIUM JAPONICUM"
Tesis Licenciatura. Fac. Química, UNAM. México.
- 20.- CHAMBER, M.A. 1983
"SELECTION OF SEVERAL METHODS FOR RHIZOBIA INOCULATION ON NODULATION AND YIELD SOYBEANS"
Plant and Soil. Vol. 74 pp: 481-486.
- 21.- DATE, R.A. 1969
"A DECADE OF LEGUME QUALITY CONTROL IN AUSTRALIA"
Journal of Australian Institute of Agricultural Science Vol. 35 pp: 27-39

- 22.- DATE, R.A. 1976
"PRINCIPLES OF RHIZOBIUM STRAIN SELECTION"
In: Symbiotic Nitrogen Fixation In Plants.
By: Nutman, P.S.
Cambridge University Press. USA. pp: 137-150.
- 23.- EMPRESAS NITRAGIN, S.A. 1984
"INOCULANTE NITRAGIN"
Folleto
México.
- 24.- F.A.O. FIAT PLANTS. 1965
"REPORT TO GOVERNMENT OF URUGUAY LEGUME INOCULANT
PRODUCTION"
Expanded Program of Technical Asistance No. 2012
Rome, Italy.
- 25.- FLORA MICROBIANA
"INOCULACION DE LAS LEGUMINOSAS"
Folleto
NITROBACTER. México.
- 26.- HERNANDEZ, G.R. 1980
"ESTUDIO COMPARATIVO DE SOPORTES PARA LA ELABORACION
DE SOPORTES PARA INOCULANTES DE LEGUMINOSAS EN MEXICO"
Tesis Licenciatura, UNAM. México.
- 27.- HILTBOLD, A.E.; THURLON, D.L.; SKIPPER, H.D. 1980
"EVALUATION OF COMMERCIAL SOYBEAN INOCULANTS BY
VARIOUS TECHNIQUES"
Agronomy Journal Vol. 72 July-August.
- 28.- HOFER, A. 1936
"METHODS OF INSPECTION OF COMMERCIAL LEGUME INOCULANTS"
J.A. Soc. Agron. 28: 655-671.

- 29.- KREMER, J.R. & PETERSON, L.H. 1982
"EFFECT OS INOCULANT CARRIER ON SURVIVAL OF RHIZOBIUM
ON INOCULATED SEED"
Soil Science. Vol. 134 No. 2 pp: 117-125.
- 30.- LABANDERA, C.; ORIVE, R.; TEMPRANO, F. 1978
"PRODUCCION DE INOCULANTES PARA SOJA EN ESPAÑA EN LOS
AÑOS 1977 Y 1978 "
En: IX Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium.
Argentina.
- 31.- LUCANIT. 1985
"INOCULANTE PARA SOYA"
Folleto
Química Lucava, S.A. de C.V. Tultitlán, Edo de México.
- 32.- MILTON, A.T.V. & ALERT, R.S. 1981
"EFICIENCIA DE INOCULANTES COMERCIAIS DE ESTIRPES
NATIVAS DE RHIZOBIUM PARA SEIS LEGUMINOSAS EN UN SOLO
DE CERRADO"
Pesq. Agropec. Bras. Brasilia. 16(3): 375-362.
Maio/Jun.
- 33.- NANTAKON, B. & WEAVER, R.W. 1982
"COWPEA RHIZOBIA: COMPARISON OF PLANT INFECTION AND
PLATE COUNTS"
Soil Biol. Biochem. Vol. 14 pp:305-307.
- 34.- PINSON, R.M.A. LOURDES. 1978
"EFECTO DE LA INOCULACION DE RHIZOBIUM JAPONICUM EN
EL RENDIMIENTO DE SOYA"
Tesis Licenciatura, Fac. Química, UNAM.

- 35.- RAMIREZ, R.M. 1982
"ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SUPERVIVENCIA DE RHIZOBIUM
PHASEOLI EN COMPOSTAS Y TURBA"
Tesis Licenciatura, Fac. Química UNAM.
- 36.- RHIZOBIUM-MIRGEN-INFORMATIVO. 1978
Microbiological Resources Center
UNEP/UNESCO/ICRO
Porto Alegre, R.S. Brasil.
- 37.- ROUGHLEY, R.J. 1982
"THE STORAGE QUALITY CONTROL, AND USE OF LEGUME SEED
INOCULANT"
In: B.N.F. Technology for Tropical Agriculture
By: Graham, P.H. & Harris, S.C. (Eds)
CIAT. Cali Colombia. pp: 115-124.
- 38.- ROUGHLEY, R.J. & PULSFORD, D.J. 1982
"PRODUCTION AND CONTROL OF LEGUME INOCULANTS"
In: Nitrogen Fixation Legume. Edition Berergersen, F.J.
pp: 115-124.
- 39.- SANCHEZ, S.A. 1980
"LA INSPECCION Y EL CONTROL DE LA CALIDAD"
Editorial Limusa. Cuarta Edición. México.
- 40.- SARH-INIP. 1984
FOLLETO TECNICO
No. 1 Septiembre. México.
- 41.- SARH-INIP. 1984
FOLLETO TECNICO
No. 14 Octubre. México.

- 42.- SARH-INIP. 1985
FOLLETO TECNICO
No. 1 Abril. México.
- 43.- SARH-INIP. 1985
FOLLETO TECNICO
No. 5 Abril. México.
- 44.- SARH-INIP. 1985
FOLLETO TECNICO
No. 13 Junio. México.
- 45.- SARH-INIP. 1985
FOLLETO TECNICO
No.1 Julio. México.
- 46.- SARH-INIP. 1985
FOLLETO TECNICO
No.2 Julio. México.
- 47.- SHARMA, D.S. & TILAK, K.V.B.R. 1974
"COMPARATIVE EFFICIENCY OF DIFFERENT COMMERCIAL
INOCULANT OF RHIZOBIUM JAPONICUM ON FIELD GROWN
SOYBEANS"
Indian J. Agric. Res. 8(4): 223-226.
- 48.- SMITH, R.S. & RIO ESCURRA, G.A. 1982
"SOYBEAN INOCULANT TYPES AND RATES EVALUATED UNDER
DRY IRRIGATED FIELD CONDITIONS"
The Journal of Agriculture of the University of
Puerto Rico. Vol. 66(4) : 241-249.

- 49.- STEINBORN, J. & ROUGHLEY, R.J. 1974
"SODIUM CHLORIDE AS A CAUSE OF LOW NUMBERS OF
RHIZOBIUM IN LEGUME INOCULANTS"
J. Appl. Bact. Vol. 37: 93-99.
- 50.- THOMPSON, J.A. 1980
"PRODUCTION AND QUALITY CONTROL OF LEGUMES INOCULANTS"
In: Methods for Evaluating Biological Nitrogen
Fixation.
By: Bergersen, F.J.; John Wiley & Sons. Ltd. ...
pp: 489-533.
- 51.- TRUJILLO, G.G. 1985
"COMUNICACION PERSONAL"
FERTIMEX, México, D.F.
- 52.- VINCENT, J.J. 1975
"MANUAL PRACTICO DE RHIZOBIOLOGIA"
Centro Regional de Ayuda Técnica, Argentina.
- 53.- WEAVER, R.W. & FREDERICK, L.R. 1972
"A NEW TECHNIQUE FOR MOST PROBABLE NUMBER COUNTS
OF RHIZOBIA"
Plant and Soil. Vol. 36 pp: 219-222.
- 54.- WILLIAMS, P.M. 1984
"CURRENT USE LEGUME INOCULANT TECHNOLOGY"
In: B.N.F. Ecology, Technology, and Physiology.
Edited by Martin Alexander.
Plenum Press New York and London, pp: 173-199.
- 55.- WILSON, D.O. & TRANG, K.M. 1980
"EFFECTS OF STORAGE TEMPERATURE AND ENUMERATION
METHOD ON RHIZOBIUM SPP. NUMBERS IN PEATS INOCULANTS"
Trop. Agric. (Trinidad). Vol. 57, No. 3. July. 233-238.

VIII APENDICE

8.1 Medio Extracto de levadura manitol agar rojo congo
(ELMARC)

K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de levadura	0.4 g
Manitol	10.0 g
Agar	15.0 g
Rojo congo	10.0 ml
(Sol. acuosa 1-400)	
Agua destilada	1.0 l

Ajustar el pH a 6.8-7.0

Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb/in²
durante 15 minutos.

8.2 Medio Peptona glucosa agar púrpura de bromocresol
(PGAPB)

Peptona	20.0 g
Glucosa	10.0 g
Púrpura de bromocresol	10.0 ml
(sol. alcohólica al 1.0%)	
Agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 l

Ajustar el pH a 6.8-7.0

Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 lb/in²
por 15 minutos.

8.3 Colorantes de Gram y técnica de tinción

A) Solución de Cristal violeta

Cristal violeta	10 g
Oxalato de amonio	4 g
Alcohol etílico	100 ml
Agua destilada	400 ml

B) Solución de Yodo

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Alcohol etílico	25 ml
Agua destilada	100 ml

C) Solución alcohol-yodo

Solución de yodo (B)	5 ml
Alcohol etílico	95 ml

D) Colorante Secundario

Safranina	10 ml
(sol. alcohólica al 2.5 %)	
Agua destilada	100 ml

Técnica de Tinción

- preparar y fijar la muestra para una tinción simple
- teñir con la solución cristal violeta por 1 minuto
- lavar con agua
- enjuagar con solución B y dejar actuar por 1 minuto
- drenar la solución y decolorar con solución alcohol-yodo
- lavar con agua

- dejar actuar por 5 minutos la solución de safranina
- lavar con agua
- quitar el exceso de agua y dejar secar
- examinar directamente bajo aceite de inmersión

Las bacterias que absorben el cristal violeta (colorante primario) son Gram positivas y Gram negativos cuando absorben el colorante secundario (safranina).

8.4 Solución Nutritiva de Jensen

CaHPO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.2 g
FeCl ₃	0.01 g
Micronutrientes	1.0 ml
Agua destilada	1.0 l

Ajustar el pH a 6.8-7.0

Antes de usarse diluir 1:4 con agua destilada

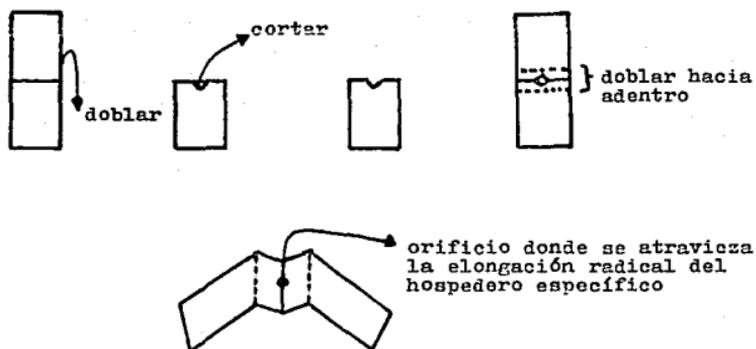
Esterilizar en autoclave: 15 lb/in² por 15 minutos.

Micronutrientes

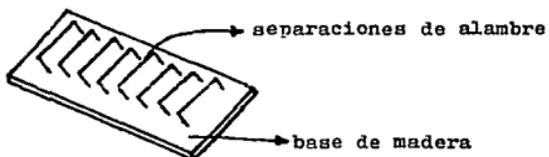
H ₃ BO ₃	0.05 %
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.05 %
ZnSO ₄	0.005 %
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.005 %
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.002 %
Agua destilada	100.0 ml

8.5 Esquema del soporte para el ensayo de Infección en planta (NMP).

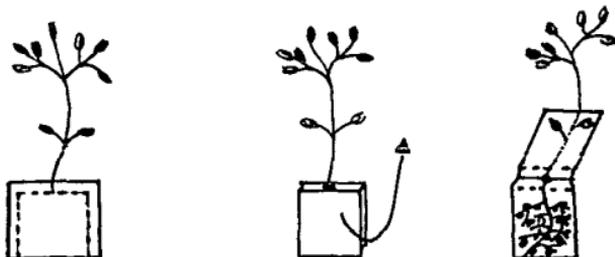
corte y dobléz del papel filtro



8.6 Esquema del bastidor de alambre y madera.



8.7 Esquema de unidades experimentales empleadas en el método de infección.



8.8 Esquema de unidades experimentales para determinar efectividad en la fijación de nitrógeno.



8.9 Tabla de Fisher & Yates

Cantidad (M) de rhizobia estimada según
el recuento de plantas infectadas:

83

Diluciones 1/10

(A=10)

Lects. positivos

n=4	n=2	s=10							
40	20	7.0×10^8							
39									
38	19	6.9							
37			3.4						
36	18	1.8							
35			1.0_7						
34	17	5.9×10^7							
33			3.1						
32	16	1.7		s=8					
31			1.0_6	7.0×10^6					
30	15	5.8×10^6			6.9				
29			3.1			3.1			
28	14	1.7			1.7				
27			1.0_5			1.0_5			
26	13	5.8×10^5			5.9×10^5				
25			3.1			3.1			
24	12	1.7			1.7		s=6		
23			1.0_4			1.0_4	7.0×10^4		
22	11	5.8×10^4			5.8×10^4			6.9	
21			3.1			3.1			
20	10	1.7			1.7			1.8	
19			1.0_3			1.0_3		3.4	
18	9	5.8×10^3			5.8×10^3			5.8×10^3	
17			3.1			3.1			
16	8	1.7			1.7			1.7	
15			1.0_2			1.0_2		s=4	
14	7	5.8×10^2			5.8×10^2			7.0×10^2	
13			3.1			3.1			
12	6	1.7			1.7			6.9	
11			1.0_1			1.0_1		3.4	
10	5	5.8×10^1			5.8×10^1			5.9×10^1	
9			3.1			3.1			
8	4	1.7			1.7			1.7	
7			1.0_1			1.0_1			
6	3	5.8×10^1			5.8×10^1			5.8×10^1	
5			3.1			3.1			
4	2	1.7			1.7			1.7	
3			1.0			1.0			
2	1	0.6			0.6			0.6	
1			0.6			0.6			
0	0							0.6	
Amplitud aproximada			10^9		10^7		10^5		10^3
Factor, 95% de los límites de confianza (x, \bar{x})			n= 2		6.6				
			n= 4		3.8				

Calculado según el cuadro VIII₂ de Fisher & Yates (1963)