

TM
Z5320
FCB
1990
G35

TM

Z532

FCB

1990

G35

Ej.2

DE

1.3



1020091454

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**EVALUACION DE LA EFICIENCIA DEL USO DE
SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES COMO
MATERIAL DE SOPORTE PARA INOCULANTES
DE SOYA**

TESIS

**Que para obtener el Grado de Maestro en Ciencias con
Especialidad en MICROBIOLOGIA**

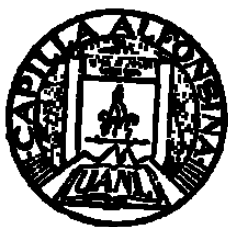
PRESENTA

Francisco Rafael de la Garza Requena

MONTERREY, N. L.

OCTUBRE DE 1990

74
ZS320
FCB
1990
G35



FONDO TESIS
163622

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

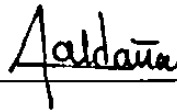
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

TITULO: "EVALUACION DE LA EFICIENCIA DEL USO DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES COMO MATERIAL DE SOPORTE PARA INOCULANTES DE SOYA."

TRABAJO DE TESIS QUE PRESENTA EL SR. FCO. RAFAEL DE LA GARZA REQUENA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA.

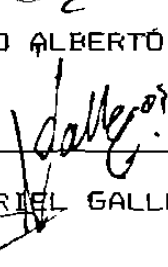
COMISION DE TESIS



PRESIDENTE: M.C. JORGE MIGUEL SALDAÑA ACOSTA



SECRETARIO: M.C. HUGO ALBERTO LUNA OLVERA



VOCAL: M.C. GABRIEL GALLEGOS MORALES

Este trabajo fué llevado a cabo en el Instituto de Ecología y Alimentos de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, ubicado en Cd. Victoria, Tamps., bajo la dirección del M.C. Jorge Miguel Saldaña Acosta.

Un reconocimiento especial para la M.C. Rosa María Ramírez-Gama por su asesoría en la selección de cepas de Rhizobium, que da sustento al presente trabajo.

DEDICATORIA

Con mucho amor dedico este trabajo a mi esposa Juanita, a mis hijos Gustavo y Adrián, esperando pagarles con creces por los sacrificios que tuvieron que hacer al acompañarme en esta aventura que fueron mis estudios de maestría.

A mis padres y hermanos por el apoyo de siempre.

A mis amigos, que gracias a Dios son muchos.

I N D I C E

	Página
Comisión de Tesis -----	2
Dedicatoria -----	4
Agradecimientos -----	7
Resumen -----	8
Introducción -----	9
Antecedentes -----	11
Hipótesis -----	16
Materiales -----	18
Métodos -----	19
Resultados -----	26
Discusión -----	37
Conclusión -----	39
Bibliografía -----	40

INDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

	Página
Figura 1	----- 28 Bis
Figura 2	----- 29 Bis
Figura 3	----- 30 Bis
Gráfica 1	----- 34 Bis
Figura 4	----- 35 Bis

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi agradecimiento al Instituto de Ecología y Alimentos de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, por las facilidades prestadas para la realización del presente trabajo de investigación. Vaya este agradecimiento para todo el personal que de una manera u otra me brindaron su apoyo desinteresado. Especial reconocimiento a mi amigo el QBP Luis M. Pérez Quilantán que mantuvo viva la llama de la rhizobiología en el IEA, y que con su capacidad de trabajo la magnificó.

Agradezco la confianza mostrada por el Director de Investigación Científica de la U.A.T., Dr. Emmanuel Méndez P. Así mismo las palabras de aliento y respaldo de los Directores del IEA, Biol. Luis Hernández S. y M.C. Eduardo González H.

Al equipo de trabajo de la M.C. Rosa Ma. Ramírez-Gama del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la U.N.A.M., por compartir su experiencia en este campo del conocimiento, que de una manera importante influyeron en el planteamiento y desarrollo de este trabajo.

Al M.C. Jorge Miguel Saldaña Acosta por su paciencia y dirección manifestadas en la revisión de este documento, por sus sugerencias y en su caso en las correcciones de métodos, estilo, etc., esperando haber interpretado su sentir sobre este trabajo.

Al M.C. Hugo Alberto Luna Olvera y al M.C. Gabriel Gallegos Morales, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus observaciones que ayudaron a dar la forma final del mismo.

Un agradecimiento muy especial al Lic. Pablo Moreno D. por su ayuda en la transcripción de este documento.

R E S U M E N

La fabricación tradicional de los inoculantes para soya, incluye como soporte a la turba. Este material perteneciente a los histosoles (Jackson, 1982), es muy escaso en el país haciéndose necesaria su importación. Esto como es de esperarse, aumenta los costos de producción de estos insumos agrícolas. En este trabajo se plantea la posibilidad de emplear a otros materiales como soporte para los inoculantes de soya. Para tal efecto se colectaron cuatro diferentes materiales: bagazo de caña de azúcar, rastrojo de soya, soca de sorgo y composta; los cuales fueron comparados con la turba, soporte de referencia, para determinar su potencial como vehículo bacteriano. Estos materiales fueron sometidos a análisis físicos y químicos, así como a la determinación de las características que deben de tener los materiales que son usados como soporte de inoculantes. Se realizaron pruebas de sobrevivencia bacteriana en los cuatro diferentes materiales. Para ello se empleó a la cepa RjFQ 17 de Bradyrhizobium japonicum, seleccionada a través de tres experimentos. Para validar a estos materiales como vehículo bacteriano, se prepararon inoculantes para soya que incluían a la cepa RjFQ 17 como inóculo y a los cuatro materiales, en forma individual, como soporte de los mismos. Estos inoculantes fueron probados en un experimento llevado a cabo en Jarras de Leonard y bajo condiciones de invernadero. Los resultados obtenidos indican que el rastrojo de soya ofrece una buena alternativa como material de soporte para inoculantes de soya.

EVALUACION DE LA EFICIENCIA DEL USO DE SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES COMO MATERIAL DE SOPORTE PARA INOCULANTES DE SOYA.

Introducción.- En la actualidad y en el futuro cercano, la soya representa una fuente económica y accesible de proteínas para la humanidad, así como de una serie de productos alternos como aceites, alimento para ganado, etc., sin contar con la fertilización nitrogenada que en forma natural "realiza" la planta en los suelos donde se cultiva.

Esto ha originado que el cultivo de la soya haya cobrado gran interés; en la República Mexicana se cultivan al rededor de 400,000 ha/año (INEGI 1987) correspondiendole al estado de Tamaulipas entre 50,000 y 60,000 ha. Una práctica que ya es común entre los productores de soya es el uso de los inoculantes. Esta costumbre proviene de experiencias que han demostrado las bondades de la bacterización de semillas de leguminosas.

La fabricación tradicional de inoculantes incluye como soporte a la turba. Este material perteneciente a los histosoles es muy escaso en el país por lo que se hace necesario su importación, como es de esperarse esta situación tiene un efecto inflacionario en el costo de producción estos insumos agrícolas.

Ante esta situación, en el presente trabajo se plantea el uso de subproductos agroindustriales tales como el bagazo de caña de azúcar, rastrojo de soya, soca de sorgo y composta, que son abundantes en la zona centro-sur del estado, como soportes para inoculantes de soya.

Objetivos:

1.- Seleccionar a la(s) cepa(s) mejor adaptadas a las condiciones de siembra (variedades de semillas, clima, suelo, etc.) de la región soyera del estado de Tamaulipas.

2.- Determinar la sobrevivencia de las cepas de Bradyrhizobium japonicum de interés, en los cuatro diferentes sustratos.

3.- Determinar la eficiencia de los inoculantes preparados con los cuatro diferentes sustratos.

4.- Evaluar los costos de producción de los inoculantes involucrando a los cuatro sustratos.

Objetivo mediato: Obtención de un soporte de calidad, preparado a partir de productos locales que contribuya a abaratar los costos de producción de los inoculantes de soya.

Plan de Trabajo:

La primera actividad de este trabajo de investigación fué la selección de cepas bacterianas, llevada a cabo en tres experimentos, dos a nivel de invernadero y un tercero a nivel de campo.

Las siguientes actividades de este estudio se dividieron en dos etapas: una de laboratorio y la segunda a nivel de invernadero.

En la primera etapa se hicieron análisis físicoquímicos de los cuatro sustratos. Los parámetros a considerar fueron: pH, materia orgánica, N, P, K, relación C/N y capacidad de retención de agua. También se determinó la sobrevivencia de las cepas bacterianas en estos materiales, a diferentes tiempos.

La segunda etapa se llevó a cabo en Jarras de Leonard donde se probaron los inoculantes preparados con los cuatro sustratos en cuestión. Se hicieron muestreos para determinar: número de plantas noduladas, tipo de nódulos y localización de los mismos.

Así mismo se efectuó un análisis económico de los costos de producción, poniendo especial énfasis en el precio de los sustratos así como de los tratamientos a los que deben someterse los productos antes de ser usados como soporte para inoculantes.

ANTECEDENTES:

A la fecha se ha logrado obtener las variedades de semilla mejor adaptadas a las condiciones edáficas y climatológicas de la región sojera del estado de Tamaulipas, entidad donde se desarrolló este trabajo de investigación. Estas son en orden de importancia: 'Júpiter', 'Santa Rosa' y UFV-1.

Con relación al uso de fertilizantes químicos, se han determinado las dosis óptimas económicas para esta leguminosa. Para el nitrógeno existen dos zonas con sus dosis respectivas 20 y 30 Kg/ha. Para el fósforo existe una sola dosis, 40 Kg/ha en las dos zonas.

En el renglón de los inoculantes se han probado los comerciales que se expenden en la región. Los resultados obtenidos no han sido del todo satisfactorios, esto dio lugar a una línea de investigación por parte del Instituto de Ecología y Alimentos de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, que consistió en una selección secuencial de cepas de Rhizobium japonicum, cuya meta fué la obtención de las cepas mejor adaptadas a las condiciones edáficas y climatológicas de la región sojera de Tamaulipas y con interespecificidad con las semillas de interés comercial. Se tienen actualmente dos cepas bacterianas que cumplen con estos requisitos: RjFQ 16 y RjFQ 17.

Ruiz Argueso, et al (1976) probaron 7 turbas españolas como portadoras de Rhizobium (cepas CB1809 y WU290) Las turbas difirieron marcadamente en su contenido de materia orgánica y en la capacidad para retener agua. Todas las turbas tuvieron cantidades bajas de nitrógeno amoniacal y nítrico, pero hubo diferencias en el contenido de cloruros. El pH de las turbas naturales variaron entre 4.1 y 7.4. Los resultados obtenidos indican que después de dos semanas de almacenamiento, el crecimiento de la cepa CB1809 fué mayor que el de la cepa WU290 en todas las turbas. Las turbas AGRO, Humer y NP soportaron el mayor crecimiento de las cepas, mientras que la tbI manifestó un claro efecto inhibitor del crecimiento. Después de 26 semanas de almacenamiento, 6 de las 7 turbas inoculadas con la cepa CB1809, tuvieron poblaciones de 3.5×10^5 a 10^5 , la turba tbI fué la excepción con 3×10^2 a 10^2 .

A. Balatti et al (1976) en su trabajo "Producción de Inoculantes para Leguminosas", estudiaron la obtención de inoculante empleando turbas de la Tierra del Fuego, solas o en mezcla con otros materiales tales como el humus, alfalfa, etc. Las experiencias fueron realizadas con soportes con y sin esterilización. Las temperaturas de mantenimiento fueron 5 y 25 grados centígrados. En general se observó que las turbas presentaron buena

capacidad de retención de agua. En cuanto a la sobrevivencia se observó que muestras esterilizadas de turba+humus presentaron valores que están por encima de 600 millones de células por gramo de inoculante después de los 300 días.

Arreguin y Moreno (1978) probaron como soporte tres mezclas obtenidas de cuatro fuentes, tales como: bonote y carbón de coco y dos suelos orgánicos, uno de reacción alcalina y otra ácida. Se obtuvieron poblaciones superiores a las de 10×10^8 cel/g en los inoculantes producidos con las tres mezclas. Lo que indicó que no hubo diferencia con respecto a los soportes probados.

Ordorica y Valdez R. (1978) probaron tres soportes para inoculantes de leguminosas. Los materiales empleados fueron: bagazo de caña, cachaza y una turba del estado de México. Los resultados obtenidos indican que: la turba esterilizada por autoclave o por rayos Gama y aún sin esterilizar se manifiesta como el mejor soporte de los tres ensayados.

Pacheco B. (1978) sembró experimentalmente alfalfa y soya para determinar la eficiencia de diferentes inoculantes experimentales en cuya elaboración se usaron como soportes: a) yeso b) una mezcla de 1/3 de talco y 2/3 de yeso; c) talco y yeso en partes iguales. En cuanto al rendimiento, los tratamientos que incluían inoculantes experimentales no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al producto agarizado, mientras que los testigos sin inocular rindieron menos que los tratamientos inoculados.

Lugo et al (1985) reportan un trabajo donde reciclan desechos orgánicos (heces fecales, basura doméstica, papel, cartón, etc.) obteniéndose un producto en forma de tierra seca el cual es comercializado como abono para jardín. Estudiaron el comportamiento de una cepa de Rhizobium phaseoli CIAT 632 en esta composta, en turba (FERTIMEX) y diferentes combinaciones de ambas durante 90 días. No hubo diferencia significativa en el desarrollo de Rhizobium en turba y en algunas combinaciones composta-turba.

Rodriguez M. et al (1978) hicieron una evaluación microbiológica y de sobrevivencia de Rhizobium en turbas procedentes del estado de México. Con respecto a la sobrevivencia de Rhizobium se encontraron diferencias en la población desde el tiempo cero debido a la capacidad de absorción de agua que varió entre cada muestra.

En la preparación de soportes para inoculantes, la utilización de polvos finos facilita la distribución de inoculantes y aumenta el tiempo de sobrevivencia de los

microorganismos de interés (Roughley & Vincent, 1967).

Como material de soporte se han empleado un gran número de materiales como la turba, suelos altamente orgánicos o enriquecidos con harina de alfalfa, carbón vegetal, etc. (Batthyany, 1978).

La elección del material a emplear en la producción de inoculantes es de gran importancia, ya que la calidad de los mismos depende de las características de la materia prima; considerando las necesidades primordiales de la bacteria y la manipulación que se dará al producto; el material a emplear debe poseer las siguientes características (Batthyany, 1978):

- Elevada retención de humedad
- Alto contenido de materia orgánica
- pH neutro
- Carente de compuestos tóxicos para la bacteria de interés
- Fácil pulverización
- Fácil esterilización
- Buena adhesión a las semillas
- Disponibilidad a bajo costo.

El contar con un soporte que permita su impregnación a valores altos de humedad asegura una alta concentración inicial de microorganismos (Balatti, 1981). El tamaño de las partículas es importante ya que de ello depende su adhesión a las semillas al efectuar la inoculación en el campo. Por lo que es necesario moler el material para obtener partículas de 0.25 mm (Burton, 1967).

El secado facilita la molienda, reduce la flora nativa y permite la incorporación de mayor cantidad de caldo de cultivo (Balatti, 1981). Se recomienda efectuar el secado a temperatura no mayor de 100° C y reducir la humedad hasta aproximadamente un 9%. Estas variables deben fijarse cuidadosamente, ya que temperaturas más elevadas dan lugar a la formación de compuestos que inhiben el desarrollo posterior de la bacteria y las tensiones bajas de humedad provocan la mortandad de un gran número de bacterias durante la impregnación con los caldos como resultado del calor liberado durante la inoculación. Algunos autores recomiendan como alternativa el secado del soporte a temperatura ambiente y el aire.

Los soportes secados y molidos deben ser esterilizados con vapor o con radiaciones gamma. El primer método es más comúnmente usado, aunque es menos favorable para Rhizobium (Batthyany, 1978). Es bien sabido que la esterilización eleva la calidad de los inoculantes porque los rizobia sobreviven por un período mayor de tiempo en ausencia de contaminantes. Aun cuando se

producen inoculantes de elevada calidad con soportes no estériles (Burton, 1967), estos son recomendados para rizobia de desarrollo rápido, sin embargo es evidente que en soportes esterilizados las cepas introducidas muestran un comportamiento superior especialmente aquellas de crecimiento lento (Burton, 1967).

Con respecto a la propagación del inóculo, para la preparación de inoculantes, en medio líquido se debe contar con cepas previamente seleccionadas para la leguminosa a ser inoculada, que presentan las siguientes características (Date, 1978): Alto poder de infectividad; capacidad elevada de fijación de nitrógeno; capacidad competitiva por el sitio de infección radicular; y capacidad de sobrevivir en los suelos a ser introducidas.

Se sabe que los cultivos de estas cepas propagados para la inoculación deben alcanzar concentraciones de células superiores a 10^9 a 10^7 microorganismos/ml en períodos de tiempo cortos. Para ellos se requiere un medio de cultivo correctamente balanceado y regular las condiciones de pH, temperatura y aireación. En relación a los requerimientos nutricionales, se sabe que Bradyrhizobium y Rhizobium no son demasiado exigentes, pero que los medios de producción deben satisfacer todas sus necesidades para lograr rendimientos celulares altos. Entre las fuentes de carbono más utilizadas se reportan sacarosa, manitol, glicerol y lactosa, para algunos casos particulares se indica el uso de pentosas. En cuanto a la fuente de nitrógeno, factores de desarrollo y vitaminas, casi se usa exclusivamente extracto o autolizado de levadura. Y como sales minerales necesarias se mencionan fosfatos monopotásico y dipotásico, cloruro de sodio, sulfato de magnesio y de hierro, y cloruro de calcio. Algunos autores recomiendan fuentes suplementarias de nitrógeno, tales como nitratos y sales de amonio (Alexander, 1982).

Respecto al pH y temperatura, se sabe que este tipo de microorganismos se desarrolla adecuadamente en valores de pH de 6.8 a 7.0 y de 28 a 30°C de temperatura. Las variaciones de pH en el medio son mínimas, aún con las cepas productoras de ácido; los cambios drásticos de pH en el cultivo, normalmente indican contaminaciones (Jordan, 1986), es importante recordar que un buen inoculante debe estar exento de contaminantes.

De las necesidades de oxígeno se tiene que Rhizobium es aerobio obligado aun cuando algunos autores reportan crecimiento con tensiones de oxígeno tan bajas como 0.01 atm (Date, 1969). Sin embargo es necesario considerar que las necesidades de oxígeno pueden ser influenciadas por la composición del medio de cultivo, la concentración celular y la presencia de polisacáridos extracelulares

lo que modifican sensiblemente la viscosidad del medio. Burton (1979) menciona que una presión de 0.15 atm o el suministro de 1 litro de aire/minuto por cada 20 litros de medio es óptima para que este microorganismo efectúe una respiración adecuada.

Otro factor muy importante es el referente al tamaño del inóculo, recomendándose inóculos de 0.1, 1.0, 5.0 y 10.0 por ciento (Balatti, 1981). Con un buen medio de cultivo, aireación y temperaturas adecuadas y un inóculo inicial del 1% se obtienen poblaciones de 4 o 5×10^9 a la 9^a en un período de 96 horas, tiempo que es posible reducir incrementando la cantidad del inóculo (Balatti, 1981). Es necesario mencionar que en todo proceso fermentativo, el éxito del mismo depende de la interacción microorganismo-medio de cultivo-condiciones ambientales. Por lo que es necesario realizar para cada microorganismo particular, una elección cuidadosa de las variables ya descritas y de las condiciones operativas.

Para la inoculación de los diferentes soportes, básicamente se emplean dos métodos: el descrito por Van Schereyn (1970), comúnmente usado en Europa, que consiste en agregar una cantidad pequeña de inóculo al soporte estéril que contiene promotores de crecimiento y cierta cantidad de agua que ayuda a alcanzar el contenido final de humedad recomendado. En este se aumenta de 100 a 1000 veces la cantidad de rizobia inicial dentro del soporte antes de su distribución. La otra alternativa se emplea en los Estados Unidos de Norteamérica y en Australia, en ella se agrega un volumen grande de cultivo (aproximadamente 30-50% del peso total final) al soporte casi seco (9-10% de humedad). La mezcla del cultivo y soporte se efectúa por aspersión o por agitación del soporte y cultivo incorporado (Batthyany, 1978).

La proporción del cultivo y soporte varían, ésta es condicionada por la naturaleza y capacidad de retención de humedad del soporte, siendo recomendable agregar el cultivo en proporciones que permitan al soporte mantenerse friable y evitar la formación de grumos. Las proporciones reportadas de cultivo-soporte corresponden a 1:1.5 y 1:2 (Burton, 1979). La mezcla se deja madurar durante 2 a 3 días a temperatura ambiente. Esta etapa tiene por objeto favorecer el escape de los gases producidos durante la fermentación que tiene lugar en el soporte debido a la presencia de rizobia y favorecer el aumento de células rizobiales (Burton, 1979).

Para el empaque de los inoculantes se han empleado diversos materiales, actualmente ha adquirido gran popularidad el polietileno por su fácil manejo en la distribución, aun cuando presenta algunas desventajas como el no poder ser esterilizado por autoclave.

1020091454

Balatti (1981) menciona que las características que debe reunir el material de empaque son : que permita el intercambio gaseoso; que impida el paso del agua y resistencia a la temperatura

Los estándares para el control de calidad varían ampliamente de un país a otro, aunque existen normas básicas que rigen en todos: 1) Número elevado de bacterias, con el fin de garantizar un número adecuado por semilla inoculada y favorecer la infección además de asegurar la sobrevivencia de la bacteria en tiempo de adaptación al suelo; 2) Que el soporte esté libre de microorganismos antagónicos a Rhizobium; 3) Que el inoculante sea fácil de manejar. Se aceptan cultivos con un mínimo de 5×10^8 rizobias/ml que estén libres de contaminantes (Balatti, 1981).

Para el control de calidad del producto se determina el número de células viables por cuenta en placa e infección en planta según el método descrito por Date y Vincent (1978) el cual se exige en diferentes países:

Australia	1×10^8 rizobias/g		
Canada	1×10^6 rizobias/g		
Checoslovaquia	3×10^8 rizobias/g		
Rusia	10×10^7 rizobias/g		
EUA	cada estado	establece	su control.

Hipótesis de Trabajo: EXISTEN EN LA REGION SUBPRODUCTOS AGROINDUSTRIALES CON UN BUEN POTENCIAL PARA SU USO COMO SOPORTES PARA INOCULANTES DE SOYA QUE ABATIRIAN LOS COSTOS DE PRODUCCION DE LOS MISMOS.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

MATERIALES:

Material Biológico

- Se utilizaron las cepas de Rhizobium japonicum con las claves RjFQ 4, 5, 7, 9, 12, 16, 17 y 18, pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ecología y Alimentos de la Universidad Autónoma de Tamaulipas.
- Semilla de soya variedad "Júpiter" de la Productora Nacional de Semillas, SARH.
- Semilla de soya de las variedades UFV-1 y Santa Rosa de producción local del Ejido "Celaya", Mante, Tamps.

Reactivos

- Medios de cultivo (de la marca Bioxon)
 - Agar Extracto de Levadura Manitol (ELMA)
 - Agar Extracto de Levadura Manitol Rojo Congo (ELMAR).
 - Agar nutritivo (AN)
- Solución nutritiva de Jensen (Vincent, 1970)

Ca HPD4	1 g
K2 HPD4	0.2 g
Mg SO4.7 H2O	0.2 g
Na Cl	0.2 g
Fe Cl3	0.1 g
Agua Destilada	1000 ml

Se le agrega un mililitro de una solución de oligoelementos por cada litro de la solución anterior.

Solución de oligoelementos:

Bo	0.05 %
Mn	0.05 %
Zn	0.005 %
Mo	0.005 %
Cu	0.002 %

METODOS

Secuencia del trabajo Experimental .-

El trabajo experimental se desarrolló en dos grandes etapas. En la primera se llevó a cabo una selección secuencial de cepas de Bradyrhizobium japonicum, a través de tres experimentos: dos bajo condiciones de invernadero, y uno más a nivel de campo. El primero en jarras de Leonard en donde las condiciones microbiológicas y nutricionales estuvieron controladas; el segundo en macetas que contenían suelo de los municipios de Mante y González. El tercer experimento fué conducido a nivel de campo, en donde se evaluó el efecto de las diferentes cepas bacterianas en el rendimiento en grano de la soya.

En la segunda etapa se colectaron cuatro materiales producidos regionalmente y con potencial para ser usados como material de soporte para inoculantes de soya. Estos sustratos fueron analizados física y químicamente, posteriormente se probó la sobrevivencia bacteriana sobre los mismos, usándose en este caso a la cepa RjFQ 17 de Bradyrhizobium japonicum, previamente seleccionada. Finalmente se realizó un experimento en jarras de Leonard, bajo condiciones de invernadero, donde se validaron inoculantes experimentales en los que se usaron a estos diferentes materiales como soporte.

1 Selección de Cepas

La selección de cepas se llevó a cabo a través de tres experimentos independientes; los dos primeros a nivel de invernadero y el tercero bajo condiciones de campo.

En el primer ensayo la unidad experimental estuvo constituida por Jarras de Leonard, donde las condiciones nutricionales y microbiológicas fueron controladas. Se emplearon tres variedades de semilla, "Júpiter", "UFV-1" y "Santa Rosa". La solución nutritiva usada fué la de Jensen (Vincent, 1976). La duración aproximada de este experimento fué de ocho semanas tiempo necesario para que se complete la nodulación, en base a los resultados obtenidos, se llevó a cabo la primera selección de cepas. Considerandose para ello la afinidad de las mismas por las variedades de semilla a prueba.

Preparación de Jarras de Leonard según Vincent, 1975:

1.- La mitad superior de la unidad consiste en una botella de cerveza o licor de 700 ml de capacidad, a la que se le ha quitado el fondo para obtener una terminación a nivel plano.

2.- La mitad inferior (reservorio) consiste en una jarra o frasco cuyas dimensiones permiten que la botella invertida encaje perfectamente y que el cuello de la botella llegue hasta 2-4 cm del fondo de la jarra.

3.- Se utiliza una mecha de algodón para impulsar el ascenso capilar de la solución nutritiva de Jensen desde el reservorio hasta la parte superior del vaso de desarrollo.

4.- Se llenan las botellas, hasta 5 cm abajo de la parte superior, con arena de río bien lavada, de grosor moderado y con un pH entre 6.8 y 7.0.

5.- Se prepara la solución nutritiva para plántulas (según Jensen), diluir a 1/5 y humedecer el frasco desde la parte superior hasta que el líquido comience a fluir dentro del reservorio. Llenar el reservorio con la misma solución nutritiva hasta 2 cm de distancia de la unión de ambos recipientes.

6.- Se cubre toda la unidad con papel, asegurándolo con bandas elásticas o con cinta adhesiva resistente al calor.

7.- Esterilizar en autoclave toda la unidad a 120°C durante dos horas y mantener intacta la cubierta hasta el

momento de su utilización.

El segundo experimento bajo condiciones de invernadero, fué realizado en macetas de plástico con capacidad de 5 kilogramos, conteniendo suelo proveniente de la región sojera del estado de Tamaulipas, concretamente de los municipios del Mante y González. Para este ensayo se seleccionó a la variedad de soya "Júpiter", por ser la más usada en la zona de estudio. En este caso se -- involucró además de las cepas bacterianas, la adición de fertilizante nitrogenado (urea, 46 % de N), en dosis -- correspondientes a 20, 40, 60, 80 y 100 Kg/ha. Se hicieron lecturas a las ocho semanas del experimento, teniéndose en cuenta para la evaluación de la efectividad de la inoculación: porcentaje de nodulación, peso seco de la parte aérea de la planta y el nitrógeno total de la misma.

La validación de las cepas a nivel de campo se llevó a cabo en el Ej. Plan de Guadalupe, municipio del Mante. Se utilizaron siete tratamientos que involucraban como inoculantes a las cepas RjFQ 16 y 17, que presentaron los mejores resultados en los dos experimentos anteriores, de acuerdo a los objetivos iniciales; fertilización nitrogenada en forma de urea (40 Kg/ha), y fertilización fosforada en forma de superfosfato triple de calcio (40 Kg/ha). Se usaron estas dosis de fertilizantes, tanto de nitrógeno como de fósforo, por ser las recomendadas para la región en estudio. La semilla empleada fué variedad "Júpiter" de la PRONASE. Cada tratamiento contó con cinco repeticiones, en una distribución de bloques al azar. El parámetro más importante en este experimento fué el rendimiento en grano.

2 Colecta de materiales

La composta fué adquirida en una planta productora de fertilizante orgánico, localizada en el rancho "El Palamar" (Km 30, carretera Cd. Victoria-Soto La Marina). Se llevó a cabo un muestreo compuesto de varias piletas, se mezclaron 10 diferentes muestras y se concentraron en una sola.

El bagazo de caña se obtuvo en el Ingenio Azucarero de Cd. Mante, Tamps. Se tomaron tres muestras por lote en 5 lotes diferentes y se concentraron en una sola

Con respecto al rastrojo de soya, este fué colectado en forma manual en una parcela ubicada en el ejido "Celaya", del municipio del Mante, Tamps. La muestra inicial fué de aproximadamente 10 Kg.

La soca de sorgo fué colectada en el rancho "El 13", localizado en el Km 13 de la carretera Cd. Victoria Matamoros.

El tamaño de muestra en todos los casos fué de diez Kilogramos.

3 Análisis Fisicoquímicos

3.1 Preparación de las muestras.- Todos los materiales fueron sometidos a secado en estufa, a una temperatura de 60°C,- hasta obtener peso constante. Un vez que se tuvo el material seco se procedió al molido del mismo, empleándose para ello un molino de cuchillas. Después de que el material fué molido, se llevo a cabo el tamizado - de los mismos, esto se consiguió con un agitador de tamices, usandose en este caso un tamiz de 200 ma-llas. El material así obtenido se conservó en bolsas de polietileno a temperatura ambiente hasta su uso.

3.2 Análisis Físicos

Determinación del pH. El material se disolvió en agua destilada en una relación 5:1 (agua:muestra), se determinó el pH de esta suspensión en un potenciómetro.

La capacidad de retención de humedad fue determinada por un metodo gravimétrico en papel filtro de acuerdo a Jackson (1982).

3.3 Análisis Químicos

El contenido de materia orgánica y a la vez el del carbono fueron determinados por el método de Walkly-Black (Jackson, 1982).

El porcentaje de nitrógeno fué determinado por el método de Kjeldahl (Jackson, 1982).

4 Caracterización de los materiales

4.1 Facilidad de pulverización.- Para esta prueba se pesó un kilogramo de los materiales (como materia prima), posteriormente se sometió al molido y tamizado con el tamiz del número 200. Una vez que se terminó con el procedimiento de tamizado, se pesó la cantidad de muestra pulverizada que pasó a través de este tamiz, y por diferencia con el peso inicial de muestra, se determinó el porcentaje de material pulverizado. El resultado de esta prueba se manifiesta en porcentaje, y este dependió de la cantidad de cada material que después de ser molido y tamizado paso a través del tamiz del número 200.

4.2 Normas de esterilización

Se prepararon lotes de un kilogramo de cada material, con

cinco repeticiones. Se sometieron a esterilización en autoclave, a una presión de 15 libras; esta presión se aplicó por diferentes tiempos, 30, 60, 90, 120 y 150 minutos. Se colocó una cinta indicadora de esterilización en el centro de la muestra como referencia de esterilizado. De lotes en los que la cinta indicadora marcó positivo, se tomaron muestras de aproximadamente un gramo y se transfirieron a cajas petri con agar nutritivo a un pH de 6.8-7.0, se incubaron por 48 horas a una temperatura de 25°C, para confirmar la eficacia del proceso y esterilidad de material.

4.3 Adhesión a la semilla

Se impregnaron 10 g de semilla de la variedad "Júpiter", con el adherente comercial Nitragin, preparado a base de goma árabiga, las cuales fueron puestas en contacto con 10 g de cada material a emplearse como soporte, previamente molidos y tamizados. Se estableció una calificación de ++++ al material que cubrió el 100% de la superficie de las semillas disminuyéndose esta hasta + para el material que mostró menor adhesión.

5 Preparación de los soportes

Los materiales a emplearse como soporte para la preparación de inoculantes, fueron sometidos a secado, molido y tamizado, se prepararon lotes de 100 g en matraces Erlenmeyer de 250 cc, en los cuales fueron esterilizados bajo las condiciones previamente establecidas.

6 Propagación de las cepas

6.1 Activación de cepas.-La cepa empleada para esta parte del trabajo fué la denominada RjFQ 17. Esta fué recibida liofilizada, en ampolleta conteniendo 1g de material. Bajo condiciones de asepsia se abrió la ampolleta y se le introdujo un mililitro de agua de la llave estéril, se agitó vigorosamente con la misma pipeta. Con esta suspensión bacteriana se inoculó un matraz Erlenmeyer de 250 cc conteniendo 100 ml de caldo de extracto de levadura manitol, en una relación de 1:100 se incubó en agitación rotatoria (250 rpm) durante cinco días, a una temperatura promedio de 28 °C.

6.2 Propagación.- De este cultivo de cinco días de edad se transfirieron alícuotas de 5 ml a diez matraces Erlenmeyer de 250 cc conteniendo 100 ml de caldo ELM, los cuales fueron incubados bajo las condiciones ya descritas. Posteriormente se conservaron en refrigeración a una temperatura aproximada de 8°C.

7 Recuento en placa

Se prepararon diluciones decimales de cada uno de los cultivos de cinco días, tanto del cultivo inicial (activación de cepas) como de los matarces de propagación que servirían para impregnar los soportes. Se transfirió 1 ml de las diluciones 10^{-8} y 10^{-9} , a cajas petri a las que se les añadió 10 ml de ELMAR (Extracto de Levadura Manitol Rojo Congo Agar) a una temperatura de 40°C , se mezcló éste con la alícuota de la suspensión bacteriana, se incubaron a 28°C en estufa bacteriológica durante 5-7 días. Posteriormente se hicieron las lecturas de las cajas. Para determinar el número de unidades formadoras de colonia (ufc). El medio de crecimiento empleado fue el descrito por Fred y Waksman, No. 79, cuya composición es la siguiente: K_2HPO_4 0.5g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g; NaCl 0.1g; Manitol 10.0g; Extracto de levadura 4.0g; Agua destilada 1000 ml; el pH se ajusta a 6.8-7.0.

7 Impregnación de los soportes y preparación de Inoculante

Los materiales a emplearse como soporte previamente preparados y en cantidades de 100 g, se impregnaron agregando 40 ml del cultivo de cinco días con 10^{-9} cel/ml aproximadamente, para obtener del 50 al 60 % de humedad en el soporte. Se dejó madurar durante tres días a temperatura ambiente (promedio de 25°C). Posteriormente se colocaron a 8°C hasta su uso.

8 Determinación de la sobrevivencia bacteriana

Una vez terminado el tiempo de maduración de los inoculantes, fue determinada la capacidad de sobrevivencia de la cepa RjFQ 17 de Bradyrhizobium japonicum en los diferentes soportes; para ello se tomaron muestras representativas de un gramo de los diferentes inoculantes (soporte diferente) a los 15, 30, 45 y 60 días después de la maduración. Se hicieron diluciones decimales hasta 10^{-9} . Se transfirió 1 ml de las diluciones 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} a cajas petri a las que se les añadió 10 ml de ELMAR, se incubaron a 28 grados C en estufa bacteriológica durante 5-7 días. Se hicieron las lecturas y recuento pertinentes.

10 Validación de los Inoculantes Experimentales

Para ello se emplearon inoculantes de 60 días de edad. Estos productos preparados usando como soporte a los diferentes materiales, fueron validados como tales en un experimento a nivel de invernadero, llevado a cabo en Jarras de Leonard a una temperatura promedio de 25°C .

10.1 Lista de Tratamientos para la validación de los inoculantes preparados usando a los cuatro diferentes materiales como soportes.

Tratamiento	Soporte
1 Sin Inoculante	---
2 Inoculante I	TURBA
3 Inoculante II	COMPOSTA
4 Inoculante III	BAGAZO DE CAÑA
5 Inoculante IV	RASTROJO DE SOYA
6 Inoculante V	SOCA DE SORGO

Estos tratamientos fueron aplicados en cinco repeticiones, con una distribución completamente al azar.

10.2 Preparación de las Jarras de Leonard

Estas unidades experimentales fueron preparadas según Vincent (1975). El soporte fue arena de río lavada, con un pH de 7.1 (1:2). La solución nutritiva fué la de Jensen (citado por Vincent, 1975).

Se preparó una dilución a 1/4 de la solución patrón para llenar la parte inferior de la jarra.

10.3 Desinfección de la Semilla

La semilla usada en este experimento fué de la variedad - "Jupiter", proveniente de la Productora Nacional de Semilla de la SARH. La desinfección se llevó a cabo haciéndose una modificación a la técnica citada por Vincent (1975). Primero se sumergió la semilla en alcohol etílico al 70 % durante un minuto; después se mantiene tres minutos en cloruro mercúrico al 0.2 %, acidificado, posteriormente se le dieron cinco lavados con agua estéril.

10.4 Inoculación de la Semilla

La inoculación de la semilla se llevó a cabo en frascos de boca ancha esteriles. Se añadió a las semillas previamente desinfectadas, adherente comercial (Nitragin) en una relación adherente-agua destilada, 1:5, posteriormente se agregaron 5 g de cada uno de los cuatro inoculantes a probar. Esta mezcla se agitó con movimientos circulares para que las semillas quedaran completamente impregnadas.

Las semillas así inoculadas fueron sembradas en Jarras de Leonard a una densidad de 6 semillas por unidad; a la semana se eliminó una planta de cada unidad quedando solamente cinco (plantas) de ellas. En los casos que fué necesario se hizo un rellenado de la solución nutritiva

en las jarras, empleándose para ello la solución de Jensen estéril, previamente preparada.

10.5 Evaluación del Experimento

Entre la séptima y octava semana, al inicio de la floración, se dió por terminado el ensayo, y se procedió a la evaluación del mismo. Para ello se extrajeron las plantas con todo y la arena adherida a las raíces. Posteriormente, sobre un cedazo y bajo el chorro suave del agua, se eliminó la arena para facilitar las lecturas de los parámetros a considerar. Se contó el número de plantas noduladas por repetición (jarra), y se determinó el porcentaje con respecto al total de plantas (por repetición).

Para la evaluación de la efectividad de los distintos materiales susceptibles de ser usados como vehículo de los microorganismos, se consideró el número de plantas noduladas y el porcentaje de nodulación.

10 Análisis Económico del costo de los soportes

Para este análisis solamente se consideró a el costo que pudieran tener los diferentes materiales en prueba, esto es como materia prima. El tratamiento que se les daría para poder ser usados como soporte de los inoculantes sería el mismo para todos.

RESULTADOS

1 SELECCION DE CEPAS

1.1 PRUEBAS DE AFINIDAD

Con la finalidad de establecer la especificidad de las cepas de Bradyrhizobium a emplearse en la preparación de los inoculantes, por las diferentes variedades de semilla utilizadas en la región; se evaluó su capacidad de nodular estas leguminosas a nivel de invernadero en jarras de Leonard. Las cepas RjFQ 16 y 17 fueron las que mostraron mayor capacidad de asociación simbiótica, quedando en segundo término las cepas RjFQ 4 y 18 que solo fueron capaces de nodular dos variedades de semilla (Júpiter y UFV-1); la cepa RjFQ 9 mostró solo afinidad por las variedades Júpiter y Santa Rosa; la cepa RjFQ 12 que noduló con las variedades Santa Rosa y UFV-1; y en último término las cepas RjFQ 5 y 7 que solo fueron capaces de nodular en una variedad, la Santa Rosa y la UFV-1 respectivamente.

Tabla 1. ESPECIFICIDAD DE LAS CEPAS DE Rhizobium japonicum POR LAS VARIETADES DE SOYA "JUPITER", "SANTA ROSA" Y "UFV-1", BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO.

VARIEDAD DE SOYA	C E P A S							
	RjFQ 4	5	7	9	12	16	17	18
JUPITER	+	-	-	+	-	+	+	+
STA. ROSA	-	+	-	+	+	+	+	-
UFV - 1	+	-	+	-	+	+	+	+

+ = AFINIDAD

- = NO AFINIDAD

1.2 EXPERIMENTO II A

Comportamiento de las cepas de Bradyrhizobium japonicum a nivel de invernadero, en suelos de la región sojera de Tamaulipas (del Mante y V. González).

En la segunda fase de la selección de cepas de B. japonicum, efectuado a nivel de invernadero en macetas con suelo de la región sojera de Tamaulipas, para el suelo del Mante se encontró que la inoculación de la variedad "Júpiter" de soya, con cualquiera de las cepas de Bradyrhizobium específica (Tabla 1), suplió en buena medida al abono químico nitrogenado (Tabla 2, Fig 1). Sin embargo como puede apreciarse en la tabla 2 el proceso de inoculación no reemplaza del todo al abono nitrogenado químico, ya que en presencia de las sales de nitrógeno y fósforo y sin inoculación, el rendimiento en materia seca fué significativamente mayor que el testigo negativo. Este hecho se repite con los tratamientos inoculados.

Tabla 2. EFECTO DE LOS INOCULANTES Y LA FERTILIZACION NITROGENADA Y FOSFATADA EN EL RENDIMIENTO EN MATERIA VERDE EVALUADA COMO PESO SECO DE LA PLANTA.

TRATAMIENTOS			PESO SECO DE LA PLANTA (g)	
*N	^P	+I		
20	40	-	10.09	A
00	40	RjFQ 16	7.65	B
00	40	RjFQ 17	7.72	B
00	40	RjFQ 4	6.39	B
00	40	RjFQ 9	5.91	B
00	00	-	3.9	C

DMS 0.01

* = Nitrógeno Kg/ha
 ^ = Fósforo Kg/ha
 + = Inoculación

RENDIMIENTO EN MATERIA VERDE SUELO DE MANTE

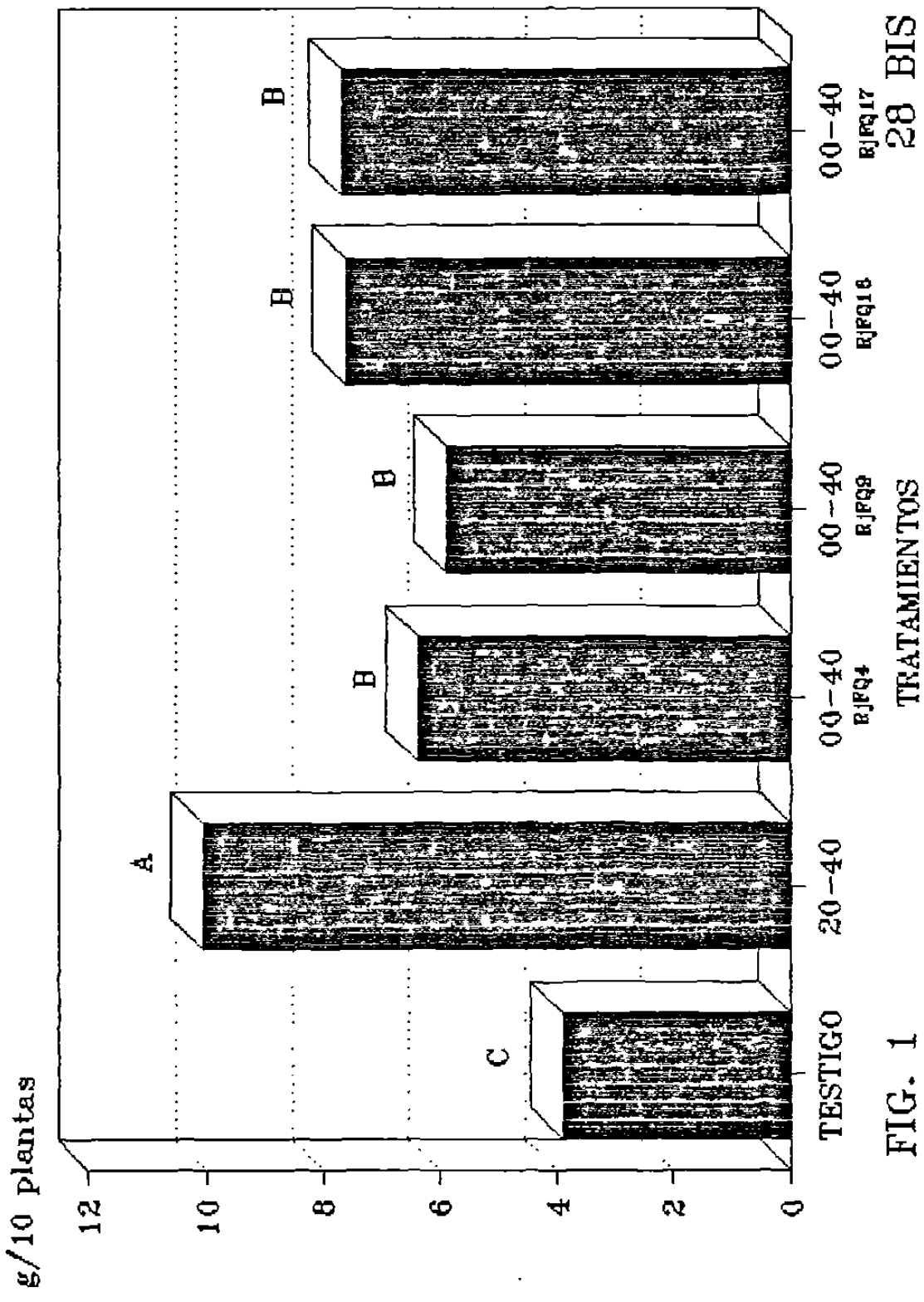


FIG. 1

1.2 EXPERIMENTO II B

Para el suelo de González se observó que la inoculación de la semilla con las cepas RjFQ 9, 16 y 17, dió mejores resultados y más homogéneos, dado que no se encontró diferencia significativa entre la inoculación y la aplicación de fertilizante químico solamente (tabla 3); pero si mostrando diferencia significativa contra el control; en este tipo de suelo, aparentemente, la inoculación puede remplazar el uso de abono nitrogenado químico en alto porcentaje, pues no se encontró diferencia significativa entre el material no inoculado con abono químico y el inoculado sin abono nitrogenado (Tabla 3, Fig. 2).

Tabla 3. EFECTO DE LOS INOCULANTES Y LA FERTILIZACION NITROGENADA Y FOSFATADA EN EL RENDIMIENTO EN MATERIA VERDE EVALUADO COMO PESO SECO DE LA PLANTA.

TRATAMIENTOS			PESO SECO DE LA PLANTA (g)
*N	^P	+I	
00	40	RjFQ 17	5.2 A
40	40	-	4.84 A
00	40	RjFQ 16	4.49 A
00	40	RjFQ 9	4.43 A
00	00	-	3.7 B

DMS 0.01

*= Nitrógeno Kg/ha

^= Fósforo Kg/ha

+ = Inoculación

RENDIMIENTO EN MATERIA VERDE SUELO DE GONZALEZ

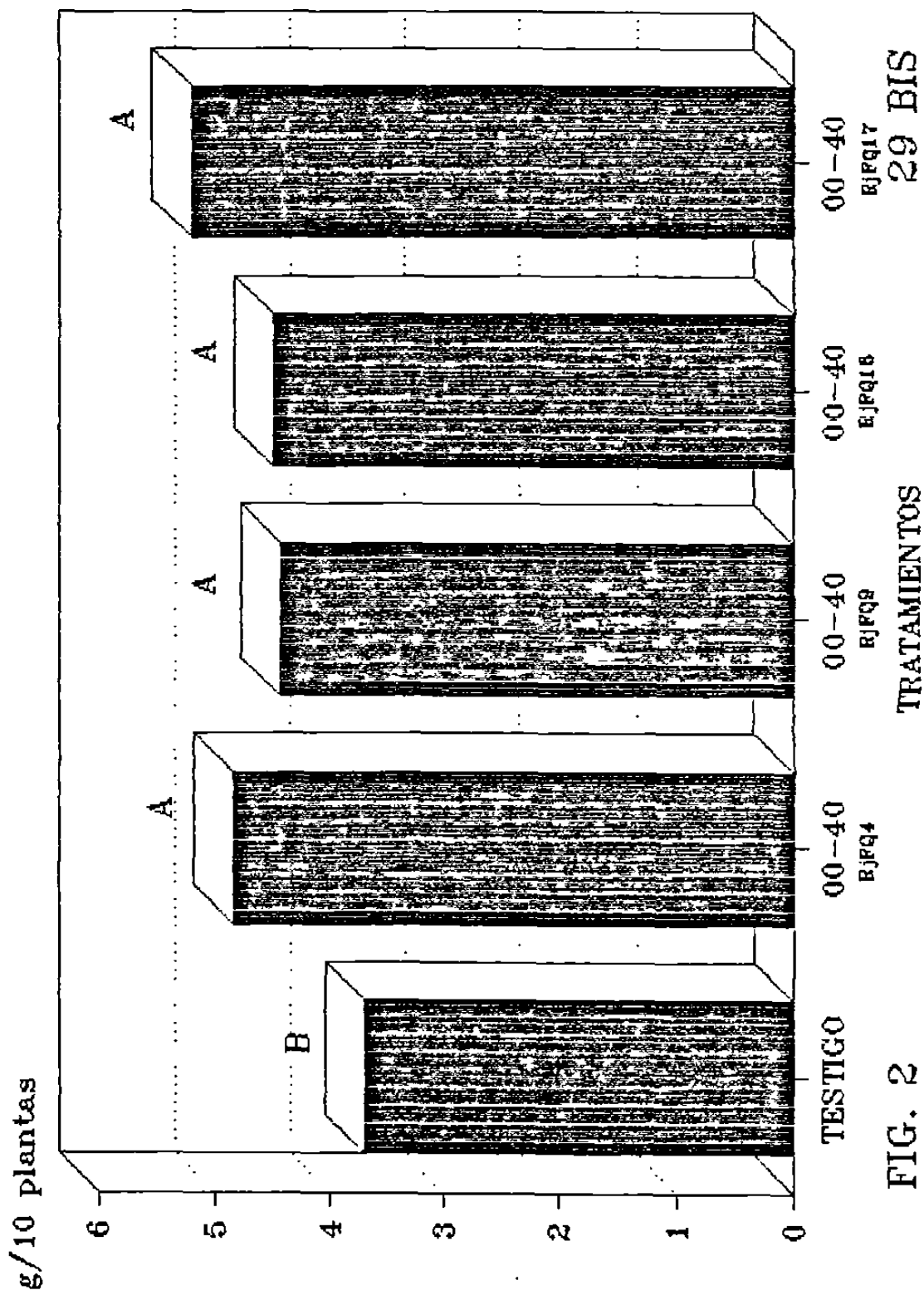


FIG. 2

1.3 EXPERIMENTO III

La evaluación de los inoculantes experimentales a nivel de campo, fué realizada en el Ej. Plan de Guadalupe, municipio del Mante, Tamps. Los resultados obtenidos indican que el mejor tratamiento, con respecto al rendimiento en grano por hectárea, fué el que incluía a la cepa RjFQ 17 como inoculante más fertilización con fósforo en una dosis de 40 Kg/ha. Este tratamiento supera al testigo negativo con 437.5 Kg. También se observa el efecto positivo de la interacción inóculo-fósforo, pues la misma cepa sin este fertilizante produjo 313 Kg menos. Este efecto positivo del fósforo se observó también con la cepa RjFQ 16, la fertilizada produjo 942.2 Kg, la sin fertilizar 718.2 Kg. El segundo grupo estadístico estuvo formado por el testigo positivo (N + P); la cepa RjFQ 16 + P; el testigo + P; y la cepa RjFQ 17 sin fertilizante. Los tratamientos que menor rendimiento produjeron: cepa RjFQ 16 sin fertilizante y el testigo absoluto. Tabla 4.

Tabla 4. EVALUACION DEL EFECTO DE LA INOCULACION DE LA SEMILLA DE SOYA VARIEDAD "JUPITER" CON LAS CEPAS DE Bradyrhizobium japonicum RjFQ 16 y 17 Y FERTILIZACION NITROGENADA Y FOSFATADA, VALORADOS COMO RENDIMIENTO DE GRANO.

TRATAMIENTOS			MEDIA DEL RENDIMIENTO EN GRANO	
N	P	I	(Kg/ha)	
00	40	RjFQ 17	1090.3	A
40	40	-	976.7	AB
00	40	RjFQ 16	942.2	AB
00	40	-	798.71	AB
00	00	RjFQ 17	777.22	AB
00	00	RjFQ 16	718.2	B
00	00	-	642.8	B

Nivel de significancia= 0.05
DMS = 356.04

RENDIMIENTO EN GRANO EXP. DE CAMPO

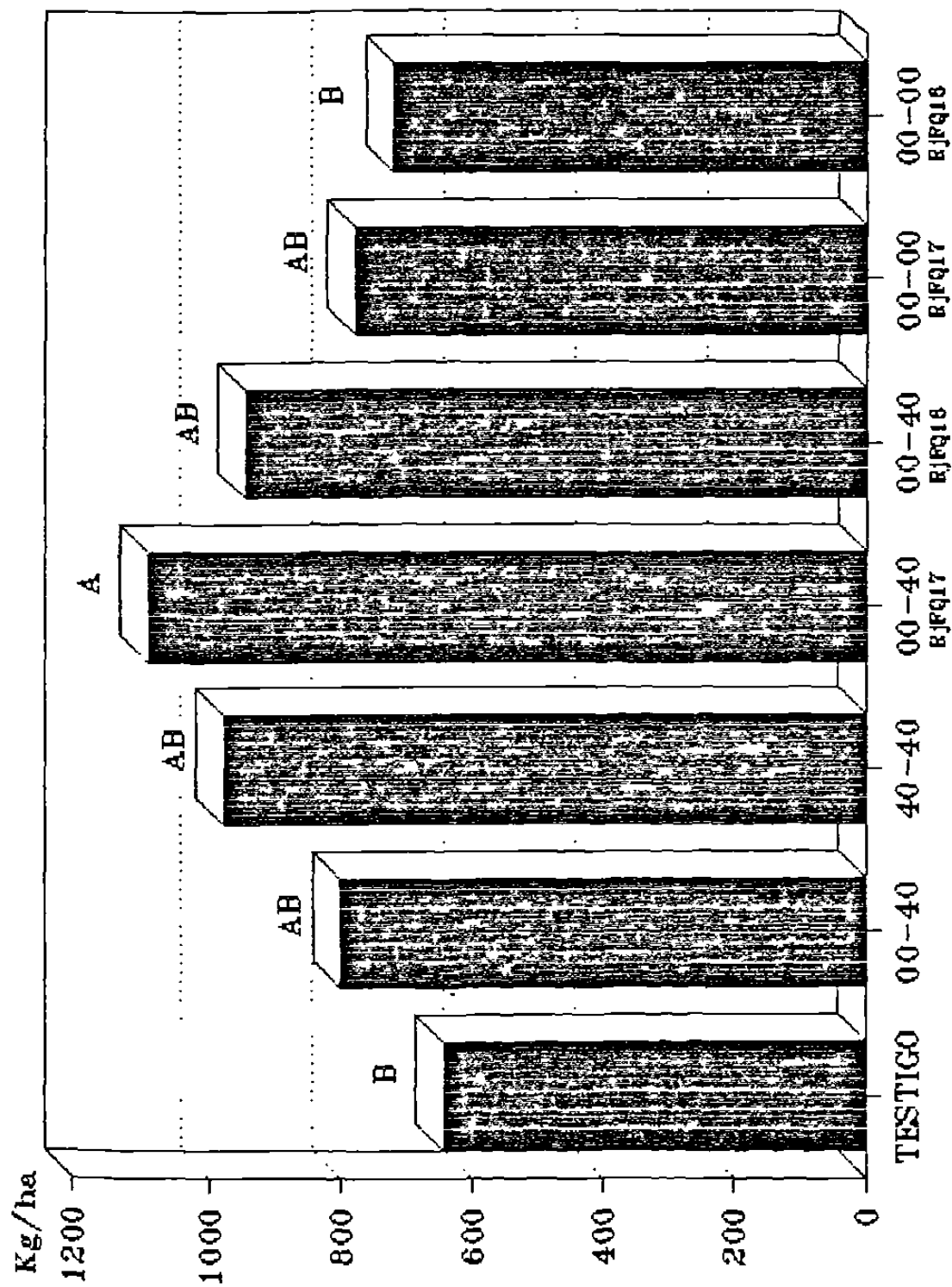


FIG. 3

TRATAMIENTOS

2 ANALISIS FISICOQUIMICOS

De acuerdo con los resultados de los análisis fisicoquímicos de los diferentes materiales, el rastrojo de soya presenta características muy semejantes a las de la turba, soporte de referencia. El material que mostró características fisicoquímicas muy diferentes al soporte de referencia fue la composta, los otros materiales presentaron una desviación variable en relación a los parámetros establecidos para la turba. (Tabla 5). Entre los parámetros más importantes, se pueden mencionar a el pH, el contenido de materia orgánica y a la capacidad de retención de humedad.

Tabla 5. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LOS MATERIALES A EMPLEARSE COMO SOPORTE EN LOS INOCULANTES.

MATERIAL	CAPACIDAD DE RETENCION DE HUMEDAD (ml de agua/100g soporte)	pH	%M.O.	%N	%C	C/N
TURBA	255	6.0	72.5	1.7	42	24.7
COMPOSTA	174	8.9	37.7	2.3	21	9.5
BAGAZO DE CAÑA	305	6.5	55.0	1.1	25	22.0
RASTROJO DE SOYA	230	6.1	77.4	1.5	45	30.0
SOCA DE SORGO	251	6.7	48.0	0.9	28	31.0

3 CARACTERIZACION DE LOS MATERIALES A USARSE COMO SOPORTES DE LOS INOCULANTES

Existen ciertas características que es deseable estén presentes en los materiales que se van a usar como soporte para los inoculantes, entre ellas están la facilidad de pulverización, facilidad de esterilización, adhesión a la semilla. En este caso el rastrojo de la soya y la composta mostraron parámetros muy similares al material de referencia. El bagazo de caña y la soca de sorgo presentaron mayor dificultad de pulverización y una menor adhesión a la semilla (Tabla 6).

Tabla 6. CARACTERISTICAS DE LOS MATERIALES A SER EMPLEADOS COMO SOPORTE DE LOS INOCULANTES.

MATERIAL	FACILIDAD DE FULVERIZACION	FACILIDAD DE ESTERILIZACION	ADHESION A LA SEMILLA *
TURBA	88 a 95 %	100 minutos	+ + +
COMPOSTA	85 a 90 %	120 minutos	+ + +
BAGAZO DE CAÑA	66 a 70 %	100 minutos	+ +
RASTROJO DE SOYA	80 a 85 %	100 minutos	+ + +
SOCA DE SORGO	69 a 73 %	100 minutos	+ +

* ++++ = 100 %
 +++ = 75 %
 ++ = 50 %
 + = 25 %

4 PROPAGACION DE LAS CEFAS

La activación y propagación de la cepa RjFQ 17 en caldo ELM por cinco días dió el rendimiento celular necesario para la impregnación de los diferentes materiales a emplearse como soportes para la preparación de inoculantes. El rendimiento celular promedio fué de 3×10^9 a la 9 células / ml .

El rastrojo de soya se comportó de manera similar al material de soporte de referencia (turba), en cuanto a la capacidad de mantener a la cepa bacteriana, su número de unidades formadoras de colonias promedio fué tan alto como en el momento de la preparación del inoculante hasta los 60 días; la composta fué el material donde la cepa bacteriana mostró su menor capacidad de sobrevivencia disminuyendo la población en un logaritmo base 10 a los 30 días de edad y dos a los 45 días (tabla 8). En relación al bagazo de caña y la soca de sorgo mostraron un comportamiento similar en cuanto a su capacidad de mantener a la cepa bacteriana ya que la población de Rhizobium disminuyó en un logaritmo base 10 a los 45 días y otro más a los 60 días de edad.

Tabla 7. CUANTIFICACION DEL NUMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE LA CEPA RjFQ 17 CRECIENDO EN CALDO ELM A UNA TEMPERATURA DE 28°C.

MATRAZ	No. DE MICROORGANISMOS POR MILILITRO (u.f.c.)
INOCULO	3.5×10^9
Rj - I	2.7×10^9
Rj - II	3.2×10^9
Rj - III	3.6×10^9
Rj - IV	3.8×10^9
Rj - V	4.0×10^9

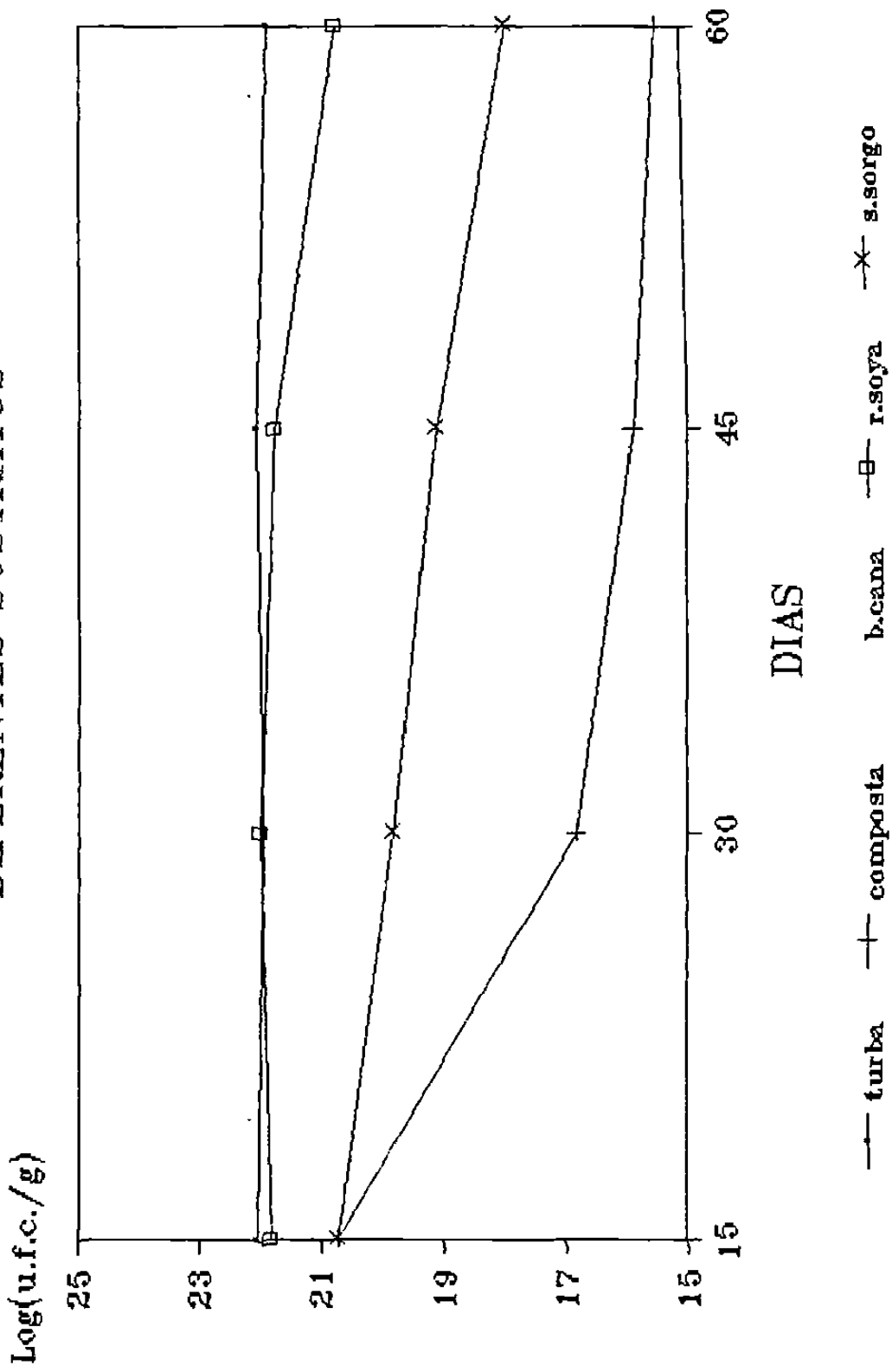
5 SOBREVIVENCIA BACTERIANA

La capacidad de sobrevivencia es una característica necesaria en las cepas a ser empleadas en la preparación de los inoculantes, esta puede ser afectada por el tipo de soporte empleado. En la tabla 8 se presentan los resultados obtenidos en el ensayo de sobrevivencia bacteriana en los diferentes sustratos. El rastrojo de soya mantuvo a los 60 días la población bacteriana en 10^9 a la 9 ufc/g la misma que la turba; le siguen el bagazo de caña y la soca de sorgo con 10^8 a la 7 ufc/g; finalmente la composta con 10^6 a la 6 ufc/g.

Tabla 8. VIABILIDAD DE LA CEPA RjFQ 17 SOBRE LOS DIFERENTES MATERIALES EMPLEADOS COMO SOPORTE EN LA PREPARACION DE INOCULANTES.

SOPORTE	T I E M P O E N D I A S			
	15	30	45	60
TURBA	3.8×10^9	3.5×10^9	3.9×10^9	3.2×10^9
COMPOSTA	1.0×10^9	2.0×10^7	8.0×10^6	5.0×10^6
BAGAZO DE CAÑA	2×10^9	1.0×10^9	5.0×10^8	8.0×10^7
R. DE SOYA	3.0×10^9	3.6×10^9	2.9×10^9	1.0×10^9
S. DE SORGO	1.0×10^9	4.0×10^8	2.0×10^8	6.0×10^7

SOBREVIVENCIA BACTERIANA EN LOS
DIFERENTES SUSTRATOS



GRAF. 1 34 BIS

6 VALIDACION DE LOS MATERIALES COMO VEHICULO BACTERIANO

La eficiencia de los diferentes inoculantes preparados usando a los cuatro materiales como soporte, fué determinada como porcentaje de nodulación en un ensayo en Jarras de Leonard a nivel de invernadero, bajo las mismas condiciones ya mencionadas en métodos para la selección de cepas de Rhizobium.

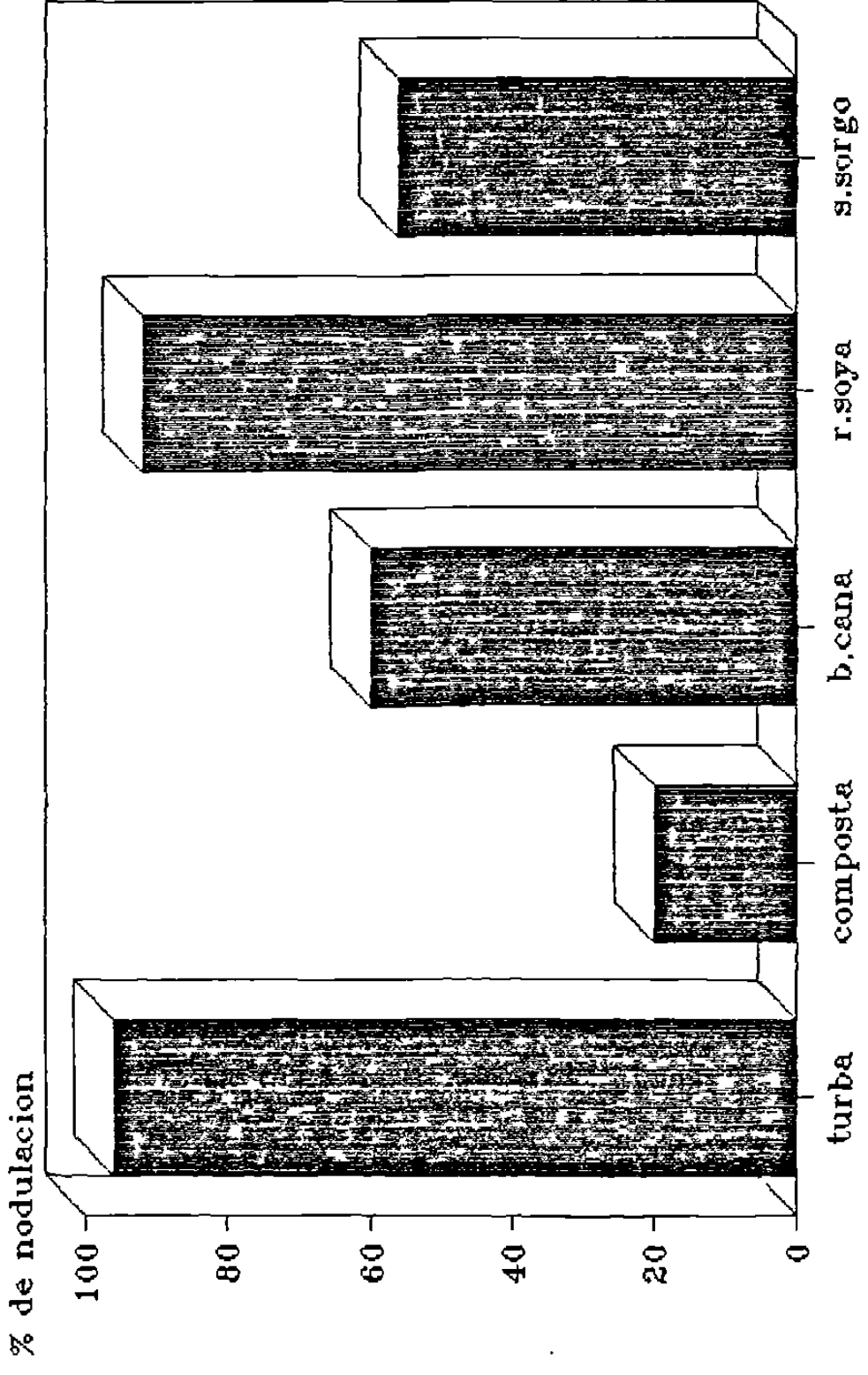
Se encontró que el inoculante donde se empleó como soporte al rastrojo de soya, no mostró diferencia significativa contra el que incluyó como soporte a la turba material de referencia; en segundo lugar encontramos al bagazo de caña y a la soca de sorgo y en último lugar con muy baja eficiencia a la composta (Tabla 9).

Tabla 9. EN ESTA TABLA SE PRESENTA EL NUMERO DE PLANTAS NODULADAS POR REPETICION, ASI COMO EL PORCENTAJE DE NODULACION. NO SE MENCIONA AL TRATAMIENTO TESTIGO YA QUE NO HUBO NODULACION EN NINGUNA DE LAS REPETICIONES.

REPETICIONES

INOCULANTE	I	II	III	IV	V	PORCENTAJE DE NODULACION
I (TURBA)	5	4	5	5	5	96 %
II (COMPOSTA)	-	2	-	1	2	20 %
III (B. DE CAÑA)	2	3	4	2	4	60 %
IV (R. DE SOYA)	4	5	5	4	5	92 %
V (S. DE SORGO)	3	4	3	1	3	56 %

VALIDACION DE MATERIALES COMO
VEHICULO BACTERIANO



MATERIALES
35 BIS

FIG. 4

8 EVALUACION DE LOS COSTOS DE PRODUCCION DE LOS SOPORTES

De los materiales incluidos en este ensayo, el que tiene un precio definido es la composta (\$ 300,000.00/Ton). Es comercializada para usarse como fertilizante orgánico en jardines y arboles frutales.

A la soca de sorgo eventualmente se le asigna un precio, que es variable y arbitrario, cuando es usado como forraje. Pero generalmente es incorporado al suelo como desecho de cosecha.

El bagazo de caña fué empleado en un tiempo como materia prima de la industria dedicada a la fabricación de triplay y aglomerados, pero dejó de usarse debido a que los resultados obtenidos no fueron los esperados. Actualmente constituye material de desperdicio de la industria azucarera.

El rastrojo de soya generalmente es incorporado al suelo. Esto habla de que no tiene un valor agregado. La inversión sería como en el caso de la soca de sorgo y el bagazo de caña, la colecta y su transportación.

Se le puede asignar un precio promedio para la soca de sorgo, el bagazo de caña y el rastrojo de soya, de \$ 150,000.00/ton + \$ 29,000.00/ton de transporte (considerando 200 km de recorrido en promedio para la recolección de los mismos), lo que daría un total de \$179,000.00 por tonelada de materia prima.

Por otro lado, la inversión que se haría en el tratamiento de estos materiales, para ser usados como soportes, sería en el mismo rango para todos ya que fueron sometidos a un maquilado similar. Al respecto, considerando el secado, el molido y tamizado de los materiales, se puede pensar en un costo de \$50,000.00 por tonelada de materia prima, esto sería el maquilado.

Si se suman el precio de la materia prima, el del transporte y el de la maquila de la misma, se obtiene un costo de 229,000.00 por tonelada de soporte preparado a partir de estos tres materiales (soca de sorgo, bagazo de caña y rastrojo de soya).

El precio promedio de la turba en los Estados Unidos de Norteamérica es de 350,000.00/ton, según Kinney Bonded Warehouse Inc. de Donna, Texas. Si se le agrega el precio de la maquila, el costo por tonelada de turba lista para usarse como soporte sería de \$400,000.00.

DISCUSION

En el primer experimento de la selección de cepas, que sirvió para determinar la afinidad bacteriana por las variedades de semilla con interés comercial, se tiene que las cepas más afines fueron la RjFQ 16 y 17, ya que estas fueron capaces de nodular en las tres variedades de soya probadas. En el segundo grupo quedaron las cepas RjFQ 4, 9, 12 y 18. Las que mostraron menor afinidad fueron las cepas RjFQ 5 y 7.

Con respecto al rendimiento en peso seco de la planta (experimento en macetas), se observó que las mejores cepas al respecto fueron la RjFQ 16 y 17.

En la evaluación llevada a cabo a nivel de campo, los mejores rendimientos en grano se obtuvieron en los tratamientos que incluían a las cepas RjFQ 16 y 17 como inoculantes. En esta parte del trabajo se usaron a estas dos cepas porque fueron las mejores de acuerdo a los objetivos marcados al inicio de la investigación. La diferencia fué de 392.4 Kg, promedio, con respecto al testigo negativo; y de 144.2 Kg, promedio, con respecto al testigo positivo.

Atendiendo a los resultados obtenidos en los análisis físico-químicos, el rastrojo de soya presenta, en algunos parámetros, valores similares a los reportados por la turba -material de referencia-. Se tiene por ejemplo que: la turba posee una capacidad de retención de humedad de 255, mientras que la del rastrojo de soya es de 230, es decir no existe mucha diferencia; lo que respecta al pH, también los valores están muy cercanos, 6.0 para la turba y 6.1 para el rastrojo de soya; en cuanto al contenido de materia orgánica tienen valores semejantes, en este caso el rastrojo de soya (77.4 %) supera a la turba (72.5 %).

El bagazo de caña presenta buena retención de humedad, pero tiende a formar grumos, cosa que no es deseable en los soportes para inoculantes, este material debe ser friable. Esto es congruente con el trabajo realizado por Rodríguez et al (1978) en el que obtuvieron diferencias en la población bacteriana creciendo en turbas con diferentes valores de capacidad de retención de humedad. Su pH está en un rango aceptable, pero su contenido de materia orgánica (55 %) se considera bajo para los fines de esta investigación.

La composta tiene un pH muy elevado (7.9), esto puede afectar la sobrevivencia bacteriana. Los resultados obtenidos difieren de los reportados por Lugo et al (1985), en su trabajo obtuvieron buena sobrevivencia bacteriana en las compostas que ellos usaron. La

diferencia pudiera deberse al origen de la composta, la de ellos provenia de basura doméstica, heces fecales y desechos orgánicos y la nuestra de soca de sorgo, estiércol y fertilizantes inorgánicos. Su contenido de materia orgánica fué pobre (37.7 %), y su capacidad de retención de humedad también fué baja.

En lo que se refiere a las características de los soportes, se tiene que: la turba, la composta y el rastrojo de soya, presentan facilidad para pulverización semejantes. Sobresale la turba (88-95 %), le sigue la composta (85-90 %) y después el rastrojo de soya (80-85 %).

El bagazo de caña y la soca de sorgo presentaron menor facilidad de pulverización; estos dos materiales son muy semejantes, poseen un cascara más ó menos dura. Los valores para la caña fueron de 66-70 % y para la soca de sorgo de 68-73 %, valores que se consideran bajos para los propósitos de este estudio.

En el ensayo realizado para determinar la sobrevivencia bacteriana en los diferentes materiales, se encontró que el rastrojo de soya mantuvo la población en 10⁹ ufc/g la misma que la turba; le siguieron el bagazo de caña y la soca de sorgo en un rango de 10⁸ a la 7⁷ ufc/g; y finalmente la composta en un rango de 10⁸ a la 6⁶ ufc/g. -- Estos resultados pueden ser debidos al contenido de materia orgánica, a la capacidad de retención de humedad y al pH de los diferentes materiales, de acuerdo con Battyany, 1978.

Al determinarse el tiempo de esterilización en autoclave, se observó que todos los materiales, a excepción de la composta (120 min.), requirieron de 100 minutos para ello.

En cuanto a la adhesión a la semilla, los mejores materiales fueron: la composta y el rastrojo de soya que presentaron valores iguales a la turba, material de referencia, esto debido probablemente a la similitud de características de facilidad de pulverización.

En lo referente a los costos de producción de los soportes, se tiene que los más económicos serian: el bagazo de caña, el rastrojo de soya y la soca de sorgo, por no tener un valor agregado. Y por consiguiente el más caro seria el que incluyera a la composta, ya que tiene un valor de mercado.

CONCLUSION

Si existen en la región de estudio, zona centro-sur del estado de Tamaulipas, materiales producidos localmente, - que puedan ser usados como soporte en la producción de inoculantes para soya. Es pertinente mencionar que los resultados obtenidos en esta prueba, son aplicables siempre y cuando sea empleada como inóculo a la cepa de Rhizobium japonicum marcada con la clave RjFQ 17, esto es como una primera aproximación. Es conveniente repetir estas experiencias usándose para ello a un número mayor de cepas bacterianas de comprobada efectividad en la fijación de nitrógeno atmosférico, con capacidad para infectar a diferentes variedades de soya, etc.. Un camino a seguir podría ser, el de profundizar en el uso del rastrojo de soya como soporte ya que dió magníficos resultados en este ensayo.

Los resultados obtenidos a través del desarrollo de esta investigación, indican que: en el rastrojo de la soya se puede tener una buena alternativa de materia prima en la producción de soportes para inoculantes de soya. Este material es el que más se asemeja a la turba, soporte de referencia; su contenido de materia orgánica es de 77.4 %, mientras que el de la turba es de 72.5 %; su capacidad de retención de humedad es de 230 ml/100 g de material, el de la turba es de 255 ml/100 g de material; su contenido de nitrógeno es de 1.5 %, el de la turba es de 1.7 %; la facilidad de pulverización del rastrojo de soya es de 80-85 %, la de la turba es de 88-95 %; tienen la misma facilidad de esterilización; la misma adhesión a la semilla; con respecto a la sobrevivencia bacteriana a los 60 días, tuvieron un comportamiento similar, el rastrojo de soya 1×10^9 a la 9, la turba 3.2×10^9 a la 9 ufc/g.

Los demás materiales, soca de sorgo, bagazo de caña y la composta, tienen algunos valores semejantes a la turba en unos parámetros, pero difieren grandemente en otros. Esta situación los hace poco recomendables como material de soporte en la fabricación de inoculantes para soya. Una alternativa pudiera ser el uso combinado de estos diferentes materiales, pretendiéndose con esto aprovechar algunas de las características presentes en ellos, esto sería obviamente, objetivo de otro trabajo de investigación.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Alexander, M. (1980). Introducción a la Microbiología del Suelo. A.G.T. Editor, S.A., México, D.F. pp 329-330, 338.
- 2.- Alexander, M. (1982). Biological Nitrogen Fixation. In: Priorities in Biotechnology Research for International Development. Academy Press, Washington, D.C.
- 3.- Arreguín, A.L., Moreno, A. (1978). Prueba de selección de un soporte para bacterias de Rhizobium IX Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium, Cocoyoc, Morelos, México. pp 53.
- 4.- Balatti, A. (1978) Producción de Inoculantes. Centro de Investigaciones y Desarrollo de Fermentaciones Industriales. Fac. de Ciencias Exactas. 47-115. La Plata, Argentina.
- 5.- Batthyany, C. (1976). Producción y Control de Inoculantes para Leguminosas. In: Reunión Latinoamericana de Rhizobium. Cali, Colombia. pp 31-41.
- 6.- Burdon/Williams (1978). Microbiología. Publicaciones Cultural, S.A. México, D.F. pp 354-355.
- 7.- Burton, C.J. (1979). Rhizobium Species. Microbial Tchnology. I: 28-57, Academic Press. New York, USA.
- 8.- Campbell, R. (1987). Ecología Microbiana. Editorial Limusa, S.A. de C.V. México, D.F. pp 243-245.
- 9.- Chapman, D.H. y Prat, P.F. (1986). Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas. Ed. Trillas, S.A. de C.V., México, D.F. pp 102-103, 149-150.
- 10.- Crozat, Y., Morel, C. (1982). Survival rates of Rhizobium japonicum populations introduced into different soils. Soil Biol. Biochem 14: 401-405.

- 11.- Date, R.A. (1969). A decade of legume inoculant quality control in Australia. The Journal of the Australian Institute of Agricultural Science. March 27-37.
- 12.- Date, R. (1970). Microbiological problems in the inoculation and nodulation of legumes. Plant Soil 32: 703-725.
- 13.- Date, R.A. (1976). Especificidad en la simbiosis Rhizobium-Leguminosas. En: Reunión Latinoamericana de Rhizobium 8. Cali, Colombia, 1976. Actas pp 56.
- 14.- Date, R.A. (1976). Principles of Rhizobium strain selection in: Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Nutman, P.S. IBF 7.
- 15.- Date, R.A. & Holliday, J. (1979). Selecting Rhizobium for acide, infertile soils of the tropics. Nature 277 : 62-64.
- 16.- Deschodt, C.C. and Strijdon, W.B. (1976). Suitability of Coal-Ben-tonite base as carrier of rizobia in inoculants. Phytophylactica 8:1-6.
- 17.- Ferrera, R, Jalpa, D. (1980). Inoculación de soya (Glycine max (L.) Merrill) con diferentes cepas de Rhizobium japonicum en Cuetzalan, Puebla, Biotica 54:191-197..
- 18.- Freire, J.R. & Vidor, C. (1978). Fixacao do dinitrogenio pola simbiose soja-Rhizobium japonicum in: Miyasaka, Shiro Ed. A soja no Brasil. pp 227-233
- 19.- Freire, J.R., Kolling, J., Godinho, I. & Pereira, J. (1976). Competicao, sobrevivencia e especializacao simbiotica de estirpes de soya. Ata da IV Reuniao Conjunta de Pesquisa da soya RS/SC. Santa Maria, R.S.
- 20.- García, S.D., Aguilar, G.M., De la Garza, R.F. y Ramírez-Gama, R.M. (1977). Influencia de la fertilización con N,P,K e inoculación sobre el rendimiento de soya. II Reunión de Información. Gobierno del Estado de Tamaulipas-SARH. Cd. Diaz Ordaz, Tamps., México. pp 62-69.
- 21.- García, S.D., De la Garza, R.F., Aguilar, G.M. y Ramírez-Gama, R.M. (1981). Programa de inoculación de soya en el Estado de Tamaulipas (PISET:I). Resumen Seminario Fijación Biológica del Nitrógeno. México, 1981. pp 5.
- 22.- Hernández, G.R. (1980). Estudio comparativo de soportes para la elaboración de inoculantes de

leguminosas. Tesis de Licenciatura, Fac. de Química, UNAM, no publicada. pp 25-37.

- 23.- INEGI (1987). Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos. Aguascalientes, Ags. México. pp 608, 612.
- 24.- INEGI (1988). Anuario Estadístico del Estado de Tamaulipas. Aguascalientes, Ags. México. pp 112.
- 25.- Jackson, M.L. (1982). Análisis Químico de Suelos. Cuarta Edición. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, España. pp 254-255, 259-260, 282-284.
- 26.- Jansen, H. & Barend, W. (1985). Effectiveness of Rhizobium strains used in inoculants after their introduction into soil. Appl. Environ. Microbiol. 49: 127-131.
- 27.- Jiro, H., Douglas, A. (1984). Fast-growing Rhizobium japonicum that effectively nodulates several commercial soybeans cultivars. Appl. Environ. Microbiol. 48 :234-235.
- 28.- Lugo, A., Pérez, R., Muñoz, D. (1985). Composta obtenida de la descomposición de desechos orgánicos y su utilización como soporte de Rhizobium. En: III Reunión sobre fijación biológica del nitrógeno. México, D.F. pp 42.
- 29.- Ordorica, M.A., Valdez, R. M. (1978). Prueba de diferentes materiales como soporte de inoculantes para leguminosas. En: IX Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium. Cocoyoc, Morelos. pp 53.
- 30.- Pacheco, B. J.C. (1978). Nuevo inoculante para leguminosas procesado en pastillas. En: IX - Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium. Cocoyoc, Morelos. pp 55.
- 31.- Ramírez, R.M. (1982). Estudio comparativo de la sobrevivencia de Rhizobium phaseoli en compostas y turba. Tesis de Licenciatura. Fac. de Química, UNAM. pp 13-16.
- 32.- Rodríguez, N., Ferrera-Cerrato, R., López, A. E. (1987). Evaluación microbiológica y sobrevivencia de Rhizobium sobre turbas procedentes del Estado de México. En: 20 Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Zacatecas, Zac. pp 162.
- 33.- Roughley, R.J. and Vincent, J.M. (1976). Growth and survival of Rhizobium sp. in peat culture. J. Appl. Bacteriology. 30 : 362-376.

- 34.- SARH-INIA. (1984). Guía para la asistencia técnica agrícola. Segunda Edición. pp 14-21.
- 35.- Sociedad Nacional de la Fijación Biológica del Nitrógeno (1986). Tecnología de Rhizobium y producción de Inoculantes. Manual de prácticas. pp 52, 59-61.
- 36.- Somasegaran, P. & Holliday, J. (1982). Dilution of liquid Rhizobium cultures to increase production capacity of inoculant plants. Applied and Environmental Microbiology. 44 Vol 2 , USA.
- 37.- The American Type Culture Collection. Catalogue of Strain I, Fourteenth Edition, 1980. Rockville Maryland, 20852, USA. pp 7.
- 38.- Tran, P. et al (1984). Rhizobium inoculant for soybean (Glycine max (L.) Merrill) in Mekong Delta. I Response of soybean to Rhizobium inoculation. Plant Soil 79:235-140.
- 39.- Vincent, J.M. (1970). A manual for practical study of root nodule bacteria IBF. Handbook 15, Blackwell Sci. Pubs, Oxford, England. pp 68, 147-157.

