
NORMA CUBANA

NC

1101: 2015

**BIOPREPARADOS — INOCULANTE MICROBIANO A BASE
DE *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* Y *BACILLUS
MEGATHERIUM* — MÉTODOS DE ENSAYO**

**Biosubstances — *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus megatherium* microbial
inoculants — Test methods**

ICS: 07.080; 65.080

1. Edición Octubre 2015
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 El Vedado, La Habana. Cuba.
Teléfono: 78300835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio
Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

NC 1101: 2015

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Órgano Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN 3 de Gestión Ambiental, integrado por especialistas de las siguientes entidades:

- | | |
|--|--|
| - Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente | - Ministerio de Industrias |
| - Ministerio de la Agricultura | - Ministerio del Interior |
| - Agencia de Medio Ambiente | - Ministerio de Salud Pública |
| - Centro de Información, Gestión y Educación Ambiental | - Unión de Empresas de Recuperación de Materias Primas |
| - Instituto de Suelos | |
| - Centro de Inspección y Control Ambiental | - Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología |
| - Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos | - Instituto de Meteorología |
| - Centro de Gestión y Desarrollo de la Calidad | - Ministerio de la Construcción |
| - Instituto de Planificación Física | - Ministerio del Turismo |
| - Ministerio de la Industria Alimentaria | - CUPET |
| - Ministerio de la Agricultura | - Oficina Nacional de Normalización |
| - Ministerio de las Fuerzas Armadas Revolucionarias | |

© NC, 2015

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, El Vedado, La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

BIOPREPARADOS — INOCULANTE MICROBIANO A BASE DE *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM* Y *BACILLUS MEGATHERIUM* — MÉTODOS DE ENSAYO

1 Objeto

Esta Norma Cubana define los requisitos del biopreparado obtenido a partir de cepas bacterianas de las especies *Azotobacter chroococcum* y *Bacillus megatherium* var *phosphaticum* para su aplicación a los cultivos agrícolas de importancia económica, así como los procedimientos analíticos para la determinación de la composición e indicadores de la calidad del producto.

2 Referencias normativas

Los documentos que se mencionan seguidamente son indispensables para la aplicación de esta Norma Cubana. Para las referencias fechadas, sólo se toma en consideración la edición citada. Para las no fechadas, se toma en cuenta la última edición del documento de referencia (incluyendo todas las enmiendas).

NC-ISO 3696: 2004. Agua para uso en análisis de laboratorio. Especificación y método de ensayo.

NC-ISO 4833: 2002 Productos alimenticios y bebidas — Métodos de ensayo microbiológico — Determinación del conteo total de microorganismos aerobios mesófilos viables.

3 Términos y definiciones

A los fines de este documento, se aplican los siguientes términos y definiciones:

3.1 bioproducto

sustancias obtenidas por vía biológica o biotecnología (NC 1089: 2015).

3.2 biopreparado

suspensión de cultivo elaborado a base de bacterias de los géneros *azotobacter chroococcum* y *bacillus megatherium*, en partes de 60: 40 (v: v), que se caracteriza por una superpoblación de células obtenidas por fermentación sumergida de ambas cepas bacterianas, correctamente seleccionadas en medio de cultivo Dimargón modificado.

3.3 biofertilizante

producto de origen biológico que cumple con el requisito de aportar o movilizar nutrientes para la utilización de las plantas.

3.4 lote

conjunto de bolsas con bio producto o bio fertilizante y/o los recipientes con líquido del bio producto o bio fertilizante, producidos a partir de una fermentación de obtención del producto.

3.5 biomasa

materia orgánica que se origina en un proceso biológico natural o provocado, utilizable como fuente de energía.

3.6 fermentación

cambio químico que sufre una sustancia por la acción de un fermento.

3.7 muestra elemental

constituida por el primer conjunto de porciones (unidades o tomas elementales) tomadas en la población disponible para el muestreo.

3.8 agua estéril

agua para análisis sometida a esterilización, con vapor a presión a 121 °C durante 20 min.

4 Métodos de ensayo**4.1 Orden de los ensayos**

- Determinación de la concentración o biomasa
- Determinación de la apariencia, color y olor
- Determinación del pH
- Determinación de la viabilidad
- Determinación de las características morfológicas tintoriales y de la presencia de microorganismos contaminantes

5 Determinación de la concentración o biomasa**5.1 Muestreo**

Homogenizar previamente la muestra, tomar 1 mL y realizar diluciones de 1:10 durante las primeras horas del proceso de fermentación y de 1:20 para el resto del tiempo que dure el proceso, así como para el producto terminado.

5.2 Procedimiento

Realizar la determinación mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm con cubeta de vidrio, excepto en los apartados modificados que se establecen a continuación. Conjuntamente realizar un ensayo en blanco, utilizando agua destilada con las especificidades establecidas por la NC-ISO 3696.

5.3 Expresión de los resultados

Obtener el valor de la absorbancia corregida (A_c) mediante la ecuación 1:

$$A_c = a \cdot f \quad (1)$$

donde:

a es el valor de absorbancia medida a 490 nm

f es el factor de dilución a la que se somete la porción de ensayos

6 Conteo total de microorganismos por la cámara de Neubauer

6.1 Objeto

Establece la forma directa de determinar el número de microorganismos presentes en la muestra.

6.2 Fundamento del método

Se basa en el conteo directo de células por cuadrante al microscopio óptico, en la cámara de Neubauer.

6.3 Equipos y cristalería

- Microscopio óptico
- Cámara de Neubauer de 0,01 mm de profundidad
- Tubos capilares

6.4 Determinación

Realizar diluciones sucesivas a la porción de ensayo (1 mL), de manera que la cantidad de células en la cámara esté entre 30 y 300. Llenar la cámara a través de un tubo capilar, contar 5, si la cámara tiene 25 cuadrantes y contar 4 si tiene 16 cuadrantes.

6.5 Expresión de los resultados

La concentración (C) se calcula por la ecuación 2:

$$C = Knd \quad (\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}) \quad (2)$$

donde:

C es la concentración de células en $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$

k es la constante de la cámara de Neubauer

n es el número de células contadas en los cuadrantes de la cámara

d es el número de dilución

7 Conteo total de microorganismos aerobios mesófilos viables

Utilizar el método, en caso que haya que solucionar discrepancias, utilizando el medio de cultivo Dimargón agarizado. Utilizar agua estéril para la preparación de la porción de ensayo.

8 Determinación de la apariencia, color y olor

8.1 Fundamento del método

Este método se basa en la observación visual de la muestra contenida en un recipiente de vidrio transparente.

8.2 Determinación

Transferir 250 mL previamente homogeneizados y realizar la observación a trasluz.

8.3 Expresión de los resultados

Determinar según lo establecido en 5.1

9 Determinación del pH

Realizar la normativa establecida. Agitar constantemente la muestra, incluso en el momento de las mediciones.

10 Determinación de la viabilidad**10.1 Método de la gota colgante**

Se basa en la observación directa al microscopio de la muestra contenida en un juego de cubre y porta objeto especializado para este ensayo.

10.1.1 Equipos y cristalería

- Microscopio óptico con lente de inmersión 100X
- Asa microbiológica
- Porta objeto excavado y cubre objeto.

10.1.2 Determinación

Tomar de 1 a 2 asadas de la muestra y depositar en la superficie del cubre objeto, en el cual se pondrán pequeñas porciones del material adhesivo en sus extremos. Súper poner el cubre objeto, haciendo coincidir el centro del cubre (gota) con el centro del menisco del porta objeto. Invertir el porta objeto una vez adheridos ambos y proceder a la observación directa de la muestra al microscopio.

10.1.3 Expresión de los resultados

- En este método los resultados son apreciativos y están dados por la presencia de motilidad en las células.

11 Determinación de las características morfológicas tintoriales y presencia de microorganismos contaminantes**11.1 Fundamento**

Se basa en la observación directa de la muestra al microscopio.

11.2 Equipos y cristalería

- Microscopio óptico con lente de inmersión de 100X
- Asa microbiológica
- Mechero de gas o alcohol.

11.3 Determinación

Tomar de 2 a 3 asadas de la muestra y depositar en la superficie del porta objeto, extender y fijar por flameo. Proceder a la tinción de Gram y observar al microscopio.

11.4 Expresión de los resultados

Determinar según lo establecido en 5.3.

Bibliografía

- [1] India, IS 9138: 1979. Azotobacter. Inoculante. Especificaciones.
- [2] Cuba, NC 92-02: 1986 Control de la Calidad. Muestreo de líquidos.
- [3] Cuba, NC108: 2001. Norma general para el etiquetado de los alimentos pre- envasados.
- [4] Cuba, NC 1089: 2015 Biopreparados — Inoculante microbiano a base de *bradyrhizobium* y *rhizobium* — Especificaciones.

- [5] Cuba, Dibut Álvarez, B. Martínez Viera R. González Pérez R. Tecnología para la producción industrial de Biopreparados a base de *Azotobacter* sp. En resúmenes de la V Jornada Científica del INIFAT. 1990.
- [6] Cuba, Dibut Álvarez, B. Biofertilizantes como insumos en Agricultura Sostenible, Cosío Editores, Sinaloa, México, 154 pp., ISBN 03-2005-101213315900-01.2005.