

*Aufiteatus*

UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

INFLUENCIA DE LA COMPOSICION DE  
MEDIO Y CONDICIONES OPERATIVAS SOBRE  
EL CRECIMIENTO CELULAR DE UNA CEPA  
DE RHIZOBIUM JAPONICUM

TESIS

*No 615 (2)*



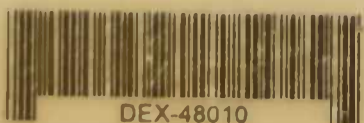
Don .....  
S. ....  
30-9-75  
7580. Inv. B. 48010

*No 615 (2)*

CARMEN R. LOPRETO

1975

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
Biblioteca  
50 y 115 1° subsuelo  
biblioteca@exactas.unip.edu.ar  
Tel 0221 422-6977/79 int. 129



DEX-48010

UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

INFLUENCIA DE LA COMPOSICION DE  
MEDIO Y CONDICIONES OPERATIVAS SOBRE  
EL CRECIMIENTO CELULAR DE UNA CEPA  
DE RHIZOBIUM JAPONICUM

TESIS

Don.....  
C.....  
Fecha 30-9.....  
Inv. B. 67580..... Inv. B. 48010



CARMEN R. LOPRETO

1975

Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales bajo la dirección de los Profesores Dres. Antonio P. Balatti y Luis A. Mazza.

Deseo expresar un profundo agradecimiento a los Profesores Dres. Antonio P. Balatti y Luis A. Mazza, quienes me dieron la oportunidad de realizar este trabajo y me guiaron permanentemente durante su ejecución.

Asimismo deseo expresar mi gratitud hacia aquellas personas que con su experiencia y ayuda desinteresada me brindaron su apoyo en la realización de este trabajo, de manera especial a los Dres. R. J. Ertola, R. F. Segovia, R. Daguerre, C. M. Cuevas, María Márquez, a los Técnicos R. Romano y O. Mariño, de la Cátedra de Biotecnología de la Fac. de C. Exactas, como así también a los Ing. R. Diéguez, L. G. de Olivero y J. Pacheco Basurco, del Instituto de Microbiología del INTA, Castelar y al Dr. R. Lagunas, de la Cátedra de Patología II, de la Fac. de C. Médicas de La Plata.





## INTRODUCCION

Entre las fuentes de proteínas vegetales interesa destacar la importancia de las leguminosas, capaces de sintetizar sus proteínas, aun en suelos pobres en compuestos nitrogenados, utilizando el nitrógeno atmosférico mediante la acción de ciertas bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*.

Cada especie de leguminosa requiere su cepa efectiva. Las bacterias penetran a través de la raíz y producen nódulos característicos que contienen grandes cantidades de microorganismos en forma de bacteroides, los cuales, en simbiosis con el vegetal, transforman el nitrógeno atmosférico en componentes intermediarios para la síntesis proteica. En ausencia de dichas bacterias las leguminosas requieren para su crecimiento el nitrógeno del suelo en forma similar a otras plantas no leguminosas. Se ha estimado que algunas variedades son capaces de fijar de 200 a 400 kilogramos de nitrógeno por hectárea, lo que equivaldría a adicionar cantidades superiores a 1.200 kilogramos de nitrato de sodio en igual superficie<sup>(1)</sup>. El habitat natural de estas bacterias es el suelo, pero no siempre están presentes en el suelo, o no se encuentran en él las cepas específicas para la leguminosa a ser cultivada. En estos casos se hace necesaria la incorporación de las bacterias a los cultivos, lo que puede lograrse mediante técnicas relativamente simples. La necesidad de suministrar artificialmente dichos microorganismos ha conducido al desarrollo de la industria de los inoculantes.

Estos hechos son de relevante importancia, ya que mejoran el rendimiento de la producción. La inoculación de leguminosas tiene un significado especial, principalmente en aquellos países que son deficitarios en proteínas,



pues hace posible obtener variedades comestibles de leguminosas, las cuales son fuente de aminoácidos esenciales. Por otra parte, constituyen una forma indirecta y positiva de mejorar los suelos, y en consecuencia los forrajes, lo cual se traduce en un aumento de la producción de leche y carnes<sup>(2)</sup>.

Las especies de *Rhizobium* pueden clasificarse en dos grupos, teniendo en cuenta la distinta velocidad de crecimiento: especies de crecimiento lento y especies de crecimiento rápido. Entre las primeras podemos mencionar: *Rhizobium japonicum* y *Rhizobium lupini* y entre las últimas: *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium phaseoli* y *Rhizobium tripholii*. En general, estos microorganismos utilizan para su crecimiento polialcoholes, monosacáridos y disacáridos como fuentes de carbono y aunque algunas cepas son capaces de utilizar trisacáridos no metabolizan el almidón. Si bien pueden fijar el nitrógeno atmosférico, este fenómeno tiene lugar sólo cuando se establece la simbiosis con el vegetal. En cultivos in vitro es necesario incorporar al medio una forma asimilable de nitrógeno para lograr el desarrollo del microorganismo. Estas bacterias son capaces de crecer en medios que contienen sales de amonio, pero los mayores rendimientos celulares se logran empleando medios que llevan en su composición aminoácidos de bajo peso molecular y ciertos factores de crecimiento<sup>(3), (4), (5), (6)</sup>.

En general los *Rhizobium* se incorporan a la especie vegetal a través de inoculantes. Existen diferentes métodos de producción de inoculantes para leguminosas. Uno de los de mayor aplicación en escala industrial consiste en el desarrollo de la cepa de *Rhizobium* en un medio líquido y la posterior impregnación de un soporte con la suspensión bacteriana obtenida. En la preparación de un inoculante debe tenerse fundamentalmente en cuenta, entre otros aspectos,

la disponibilidad de un medio de cultivo correctamente balanceado para la cepa a desarrollar, y el establecimiento de condiciones de operación que permitan obtener caldos con alta concentración celular para ser utilizados en la impregnación de soportes.

Como en todo proceso fermentativo, el éxito del mismo depende fundamentalmente de la interacción entre el microorganismo y el medio; por lo tanto no es posible establecer o dar un medio tipo para el desarrollo de este género, es necesario proceder a una cuidadosa elección de los distintos componentes para cada cepa particular, teniendo en cuenta además la influencia de otras variables como cantidad y calidad del inóculo, propiedades fisicoquímicas del medio, capacidad respiratoria y condiciones operativas.

De acuerdo con las consideraciones anteriores y como una contribución a la industria de los inoculantes en nuestro país, se ha encarado el presente trabajo con el objeto de estudiar uno de los aspectos que hacen a la preparación de los mismos. El tema está relacionado con la obtención de caldos con alta concentración celular, y se refiere a la influencia de la composición del medio y condiciones de operación sobre la velocidad de crecimiento de una cepa de Rhizobium japonicum.

Este trabajo comprende el estudio del crecimiento celular en la etapa de arlenmeyers agitados y fermentadores con agitación mecánica, en el que se consideran variables de medio y operación. Además, estos estudios se completan con experiencias de crecimiento de plantas de soja inoculadas y cultivadas artificialmente, realizadas con el objeto de establecer si las variables estudiadas modifican la capacidad simbiótica, efectividad, invasividad y capacidad de fijación de nitrógeno de la cepa.



## MICROORGANISMO

La cepa utilizada, Rhizobium japonicum E-45, fue suministrada por el Instituto de Microbiología del INTA. Esta cepa es efectiva en la inoculación de soja, variedades Amarilla común, Clark, CNS, Chipawa. FAV 30-2, Halesoy 71, Halesoy 321, Hampton 266, Harosoy, Hawkeye, Hill, Hood, Lee, Ogden, S 100, Scott, Amsoy, Bragg, Dorman, Hark, Hardee, Inta Stuart, Mensoy 1, Mensoy 2, Mensoy 6 y Shelby.

El género *Rhizobium* está constituido por bacterias cuyo habitat natural es el suelo, aeróbicas, heterotróficas, capaces de invadir las raíces de las plantas leguminosas y formar nódulos en los que fijan el nitrógeno atmosférico. Esta propiedad es la característica más saliente para distinguir el género *Rhizobium* de otros géneros de bacterias. El tamaño de las células es aproximadamente de 0,5 - 0,9 x 1,2 - 3,0 micrones. Son bastones Gram negativos, generalmente móviles cuando jóvenes, flagelados. Las células contienen gránulos característicos de un polímero del  $\beta$ -hidroxibutirato, que se tiñen con Sudán negro y por observación microscópica con iluminación en contraste de fase, se presentan como cuerpos altamente refráctiles. La mayoría de las células producen abundante polisacárido extracelular que modifica las propiedades reológicas de los medios, lo que puede afectar marcadamente los fenómenos de transferencia durante el cultivo celular<sup>(7)</sup>.

Las bacterias sufren cambios morfológicos, dentro de las células del nódulo, a forma de bacteroides, que son células ramificadas o engrosadas, incapaces de crecer sobre un medio de cultivo manteniendo las características de células modificadas. Las bacterias están incluidas



en las membranas de las formaciones que las hospedan, a veces aisladas, a veces agrupadas. La disposición de los bacteroides dentro de la membrana puede ser de valor taxonómico. La parte interior de los nódulos en la zona bacteroide es de color rosado debido a la leg-hemoglobina acumulada por estas células de las plantas, la que desempeña una importante función en los procesos de óxido-reducción que conducen a la fijación de nitrógeno.

### Características culturales

Los requerimientos nutricionales de las especies de *Rhizobium* de crecimiento rápido han sido bien estudiadas, en cambio no existen muchos trabajos referentes a las necesidades del *Rhizobium japonicum* y otras especies de crecimiento lento. De acuerdo con los trabajos realizados por Elkan y colaboradores (8), se demuestra que esta especie de *Rhizobium* utiliza un reducido número de fuentes de carbono; además existen marcadas diferencias entre distintas cepas. Entre las fuentes de carbono más frecuentemente metabolizadas por un número considerable de cepas, se mencionan gluconato, glucosa, galactosa, glicerol, manosa, manitol, arabinosa, sorbitol y fructosa. Con respecto a las fuentes de nitrógeno, es necesario destacar que el género *Rhizobium* no fija nitrógeno atmosférico cuando crece en un medio de cultivo artificial, por lo cual es necesario suministrar nitrógeno orgánico o inorgánico. Muchas cepas de *Rhizobium* utilizan sales de amonio o nitratos como fuente de nitrógeno, pero el máximo crecimiento se alcanza con el suministro de aminoácidos de bajo peso molecular. Para cumplir con esta exigencia se ha utilizado en forma extensiva extracto de levadura, corn steep liquor, hidrolizado de caseína, proteínas de soja, etc.

De todas estas fuentes de nitrógeno orgánico y factores de crecimiento el extracto de levadura es el que se prefiere porque cubre mejor las exigencias del microorganismo. Las razones para ello podrían ser las siguientes<sup>(9)</sup>: 1) es una buena fuente de aminoácidos; 2) contiene elementos traza esenciales y vitaminas indispensables para el crecimiento del *Rhizobium*. Es una buena fuente de biotina, niacina, piridoxina, riboflavina y tiamina, pero es importante destacar que algunas cepas de *Rhizobium* de crecimiento lento no son estimuladas sino inhibidas por la biotina<sup>(10)</sup>, por encima de ciertas concentraciones que varían con la cepa; 3) favorece la obtención de un potencial de óxido reducción que es adecuado para el crecimiento del *Rhizobium*; 4) actúa como donador de hidrógeno en los procesos respiratorios; 5) el extracto de levadura contiene significativas cantidades, desde el punto de vista nutricional, de hierro, calcio, magnesio, estroncio, sodio, potasio, bario, manganeso, cobre, plomo, aluminio y vanadio<sup>(11)</sup>.

En lo que se refiere a los elementos minerales requeridos para el desarrollo del *Rhizobium japonicum* se pueden citar los resultados de trabajos realizados por varios investigadores. Thorne y Walker<sup>(12)</sup> determinaron que la concentración óptima de hierro, para algunas cepas de *Rhizobium japonicum*, es de 10 ppm. Itano y Matsuura han establecido que son aconsejables concentraciones bajas del elemento vanadio para el desarrollo del *Rhizobium*. Norris ha establecido que los niveles moderados de calcio (2 ppm) son más adecuados que los niveles altos para un buen crecimiento<sup>(13)</sup>. Badawy y Allen<sup>(14)</sup> han demostrado la importancia del ion calcio para el crecimiento del *Rhizobium* y la necesidad de establecer para cada caso el



nivel de dicho elemento en el medio de cultivo. Vincent<sup>(15)</sup> destaca que las células de *Rhizobium* tienen requerimientos especiales para calcio y magnesio, siendo suficientes las concentraciones en que estos elementos se encuentran como impurezas en los medios de cultivo. Lowe, Evans y Ahmed<sup>(16)(17)</sup> muestran que el cobalto es un factor importante para el crecimiento del *Rhizobium* in vitro, particularmente en lo que se refiere a la síntesis de vitamina B<sub>12</sub>.

El género *Rhizobium* está formado por microorganismos aerobios, pero existen notables diferencias entre distintas especies en cuanto a las necesidades de oxígeno en el medio, en relación al crecimiento celular. Así, para algunos casos, se ha logrado buen crecimiento con una tensión de O<sub>2</sub> de 0,01 atmósfera<sup>(18) (19)</sup> y en otros con una presión parcial de O<sub>2</sub> de 0,15 atmósfera<sup>(20) (21)</sup>, por lo tanto, es necesario para cada cepa determinar las condiciones que aseguren una óptima disponibilidad de O<sub>2</sub>.

La temperatura óptima del cultivo es de 25 - 30°C, el pH óptimo es de 6 - 7.

### Taxonomía

Las especies de *Rhizobium* se pueden diferenciar:

- 1) por sus características culturales;
- 2) por diferencias simbióticas (rango de hospedantes)<sup>(7)</sup>;
- 3) por diferencias serológicas<sup>(22) (23) (24)</sup>;
- 4) por diferencias genéticas<sup>(25) (26)</sup>;
- 5) por su susceptibilidad al bacteriófago<sup>(27)</sup>.

El *Rhizobium japonicum* pertenece a las cepas de crecimiento lento; desarrolla en forma pobre o moderada en el medio YMA (extracto de levadura, manitol, agar)<sup>(22)</sup> en diez días dando una pátina color blanco o rosado con poca producción de goma; no desarrolla en el medio com-



puesto por glucosa, agar y peptona (7) (22).

El Rhizobium japonicum nodula específicamente las raíces de soja (*Glycine max*) y puede nodular algunas especies de *Phaseolus*. A su vez, la soja puede ser nodulada, pero con pocos nódulos, por Cowpea rhizobia y muy raramente por Rhizobium lupini.

## METODOLOGIA

### Medidas de concentración celular

Las técnicas empleadas para medir la concentración celular en los caldos de fermentación fueron las siguientes:

a) Técnica turbidimétrica: la D.O. de los caldos diluidos convenientemente es directamente proporcional a la concentración celular, la que fue determinada mediante un espectrofotómetro fotocolorímetro "Spectronio 20" a 600nm. Para determinar el rango óptimo de lectura en la escala del fotocolorímetro se determinó la D.O. para una serie de suspensiones de Rhizobium japonicum, de concentración celular creciente, de lo que resultó el rango de lectura conveniente desde 0,20 a 0,60 unidades de D.O. Empleando 600nm, se construyeron curvas de calibración de D.O. en función de peso seco de células y D.O. en función de concentración celular de células viables (28).

b) Técnica gravimétrica: la masa celular fue separada por centrifugación durante 20 minutos a 30.900 g. Las células fueron lavadas dos veces con agua destilada. Luego se determinó el peso seco de las células a 105°C, expresando los resultados en mg de células secas / 100 ml de caldo. Los resultados pueden observarse en la figura n°1.

c) Técnica de recuento de microorganismos viables: se practicó el método de recuento de células viables por dilución en cajas de Petri (29).

Teniendo en cuenta la correlación que se encontró entre las técnicas gravimétrica y turbidimétrica para

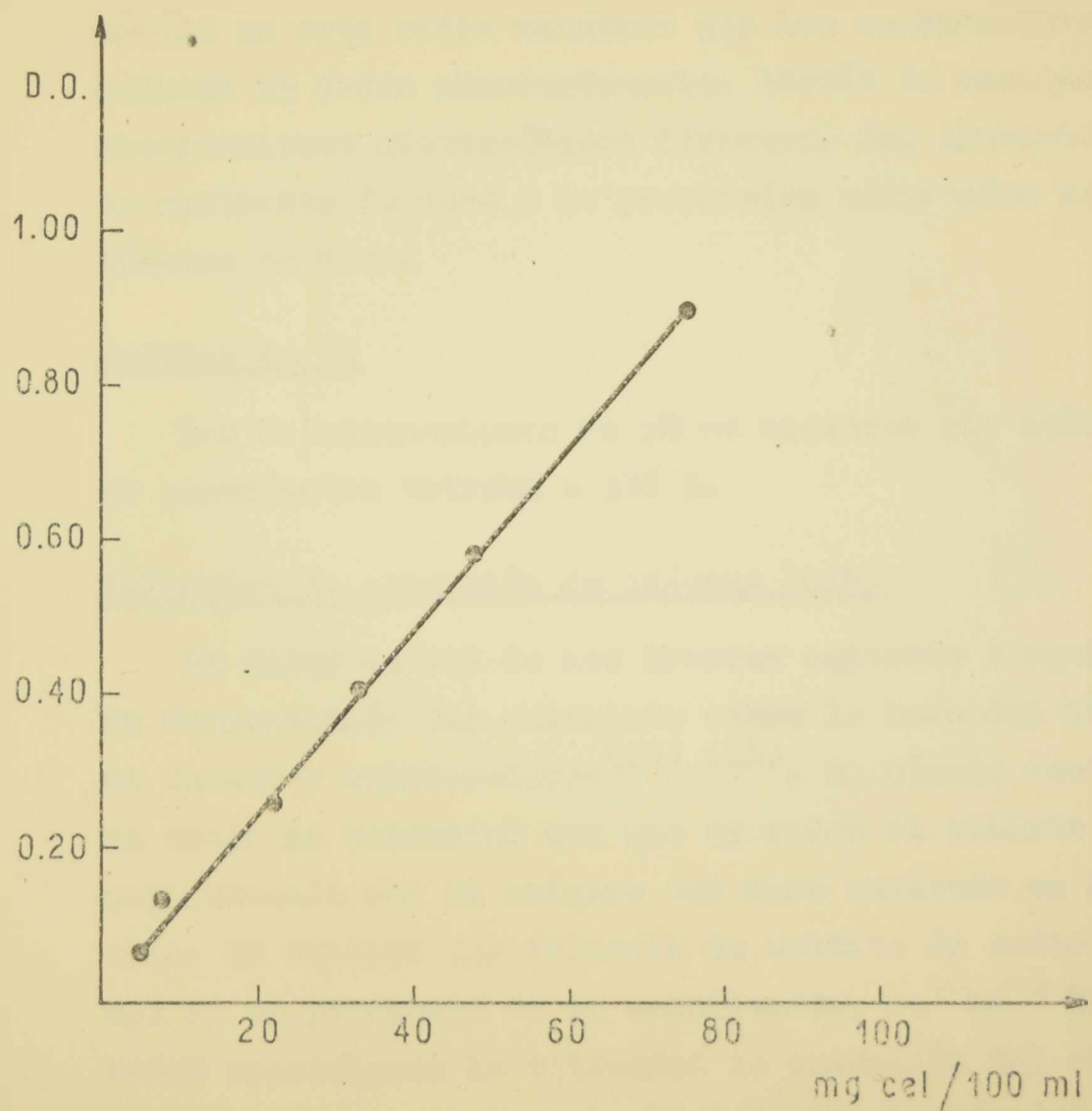


Figura 1. Evaluación del crecimiento celular. Relación entre peso seco de células y densidad óptica.



la evaluación del crecimiento celular, se utilizó por su simplicidad, en todos los ensayos el método turbidimétrico, que se complementó con el método de recuento de células viables.

#### Control de contaminantes

Como control de pureza de los cultivos se hicieron siembras periódicas de los caldos de fermentación en un medio agarizado que contiene glucosa, peptona y cloruro de sodio<sup>(23)</sup>. El Rhizobium japonicum no desarrolla en este medio mientras que los contaminantes comunes lo hacen abundantemente. Además se realizaron observaciones microscópicas directas, con iluminación en contraste de fase y de preparados coloreados con la técnica de Gram.

#### Medidas de pH

Las determinaciones de pH se hicieron por medio de un peachimetro Metrohm E 396 B.

#### Velocidad de absorción de oxígeno (OAR)

El valor de OAR de los frascos agitados y equipos de fermentación fue calculado sobre la base del método de Cooper y colaboradores<sup>(30) (31)</sup>. El método consiste en medir la velocidad con que se oxida el sulfito de sodio por reacción con el oxígeno del aire empleado en la aeración. Se utiliza una solución de sulfito de sodio (0,5 a 0,8 N) en presencia de un catalizador,  $\text{Cu}^{++} 10^{-3}$  M; en estas condiciones la velocidad de oxidación del sulfito es mucho mayor que la velocidad de disolución del oxígeno,

además es independiente de la concentración de sulfito por encima de 0,015 moles/l. La solución de sulfito de sodio se coloca en los frascos erlenmeyers o en el fermentador, se agita y aerea, y se saca periódicamente una muestra en la que se valora iodométricamente el sulfito que no ha reaccionado. La velocidad de oxidación es casi instantánea, la concentración de oxígeno disuelto en el líquido es prácticamente cero, y la velocidad de absorción estará dada por:

$$\frac{dC}{d\theta} = K_{1a} \cdot C^{\infty}$$

$C^{\infty}$ : concentración de saturación de oxígeno

$K_{1a}$ : coeficiente volumétrico total de transferencia de oxígeno en unidades de fase líquida por unidad de diferencia de concentración ( $h^{-1}$ ).

Las determinaciones en el caso de erlenmeyers agitados se realizaron con 200 ml de  $SO_3Na_2$  0,5 N, en presencia de  $Cu^{++} 10^{-3}$  M, en erlenmeyers de un litro de capacidad, colocados en agitador rotatorio a 230 rpm y 2,5 cm de excentricidad, en cuarto estufa a 30°C. Para determinar el OAR ( $dC/d\theta$ ) de los tanques de fermentación se utilizó 2.500 ml de solución de  $SO_3Na_2$  0,5N,  $Cu^{++} 10^{-3}$  M, en tanques agitados de 8 litros de capacidad; el caudal de aire y la agitación fueron controlados por medio del caudalímetro y del taquímetro que posee el equipo. La temperatura se mantuvo a 30°C.

#### Evaluación de nitrógeno

La determinación de nitrógeno de los vegetales se

realizó por el método de Kjeldahl<sup>(32)</sup>, utilizando la parte aérea de las plantas, secadas en estufa con circulación de aire, molidas y homogeneizadas. Se extrajeron muestras representativas por cada repetición empleando la técnica del cuarteo. Los resultados se expresan en % de nitrógeno referido a masa seca a 105 °C.

### Valoración de glicerol

La concentración de glicerol en los caldos de fermentación se determinó por medio de la técnica colorimétrica de M.Lambert y A.C. Neish<sup>(33)</sup>. El método se basa en la oxidación del glicerol a formaldehído por medio de ácido periódico. El formaldehído por reacción con ácido cromotrópico desarrolla un compuesto coloreado que se mide a 570 nm.

### Tiempo de generación

El tiempo de generación fue calculado en la fase de crecimiento logarítmico, en base a la ecuación:<sup>(34)</sup>

$$\phi_g = \frac{\ln 2 ( t - t_0 )}{\ln X - \ln X_0}$$

$\phi_g$  : tiempo de generación (tiempo promedio necesario para que se duplique la masa celular (h) )

$t - t_0$  : intervalo de tiempo

$X - X_0$  : incremento de la biomasa en el tiempo  $t - t_0$ .



### Velocidad específica máxima de crecimiento

La velocidad específica máxima de crecimiento ( $h^{-1}$ ) fue calculada de acuerdo a la expresión<sup>(34)</sup>:

$$\mu_{\max} = \frac{\ln X - \ln X_0}{t - t_0}$$

### Micrografías electrónicas

El material fue suspendido en el volumen mínimo de suero humano con el fin de obtener una mayor cantidad de bacterias en la inclusión y fue preparado posteriormente, para su examen con un microscopio electrónico Philips 200 operado a 60 kv, siguiendo la técnica propuesta por Lagunas y colaboradores<sup>(35)</sup>.

### Microorganismo

El microorganismo empleado en estas experiencias proviene del Instituto de Microbiología del INTA, cultivado en agar de Ashby modificado según Fred, Baldwin y Mc Coy<sup>(36)</sup> y agregados propuestos por Schiel y Ragonese<sup>(37)</sup>. Para conservar las cepas se utilizó el medio de cultivo mencionado, su composición se indica en la Tabla 1.

Los estudios de crecimiento se iniciaron empleando el mismo medio utilizado para el mantenimiento del microorganismo, sin el agregado de Rojo Congo y agar y reemplazando el agua de levadura por extracto de levadura Difco en concentración de 1 g/l, y nitrato de potasio en concentración de 0,8 g/l.

Tabla 1

Medio de Ashby modificado según Fred. Baldwin y Mc Coy  
y agregados propuestos por Schiel y Ragonesse.

Agar	15,0	g
Manitol	10,0	g
$K_2HPO_4$	0,5	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	g
NaCl	0,1	g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , sol.acuosa al 10%	0,1	ml
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ , sol.acuosa al 10%	0,1	ml
Agua de levadura, pH 6,8	100,0	ml
Agua destilada	900,0	ml
Rojo Congo, sol.acuosa 1:400	10,0	ml

## INOCULO

Los inóculos fueron preparados a partir de tubos de mantenimiento de la cepa. La composición del medio de cultivo del inóculo fue en todos los casos igual a la del medio de fermentación, con excepción de la concentración de extracto de levadura, que se utilizó siempre en concentración de 1 g/l en los inóculos.

Para iniciar cada proceso se sembró a partir de un tubo de mantenimiento, con ansa de platino, un erlenmeyer de 500 ml de capacidad con 50 ml de medio de cultivo. Se dejó desarrollar durante 72 horas en agitador rotatorio, a 230 rpm y 2,5 cm de excentricidad<sup>(38)</sup>, en cuarto estufa a 30°C. Estos cultivos fueron empleados para sembrar los medios de fermentación. Con el objeto de obtener resultados comparativos en las distintas experiencias, se fijó la concentración celular y tiempo de desarrollo del inóculo. En todos los casos se utilizaron inóculos de 68 a 72 horas de desarrollo. Estas condiciones fueron ajustadas en base al estudio de las curvas de crecimiento del inóculo (fig.2), determinándose valores de pH, D.O. y células viables en función de tiempo de proceso. A las 72 horas de cultivo el inóculo se encuentra en la etapa de crecimiento logarítmico, el pH está comprendido entre 7,0 y 7,2 y la concentración celular es de  $7 \times 10^9$  células/ml. Sembrando al 5 % en el medio de fermentación se inicia el proceso con una concentración celular de  $3,5 \times 10^8$  células viables/ml (D.O. = 0,12).



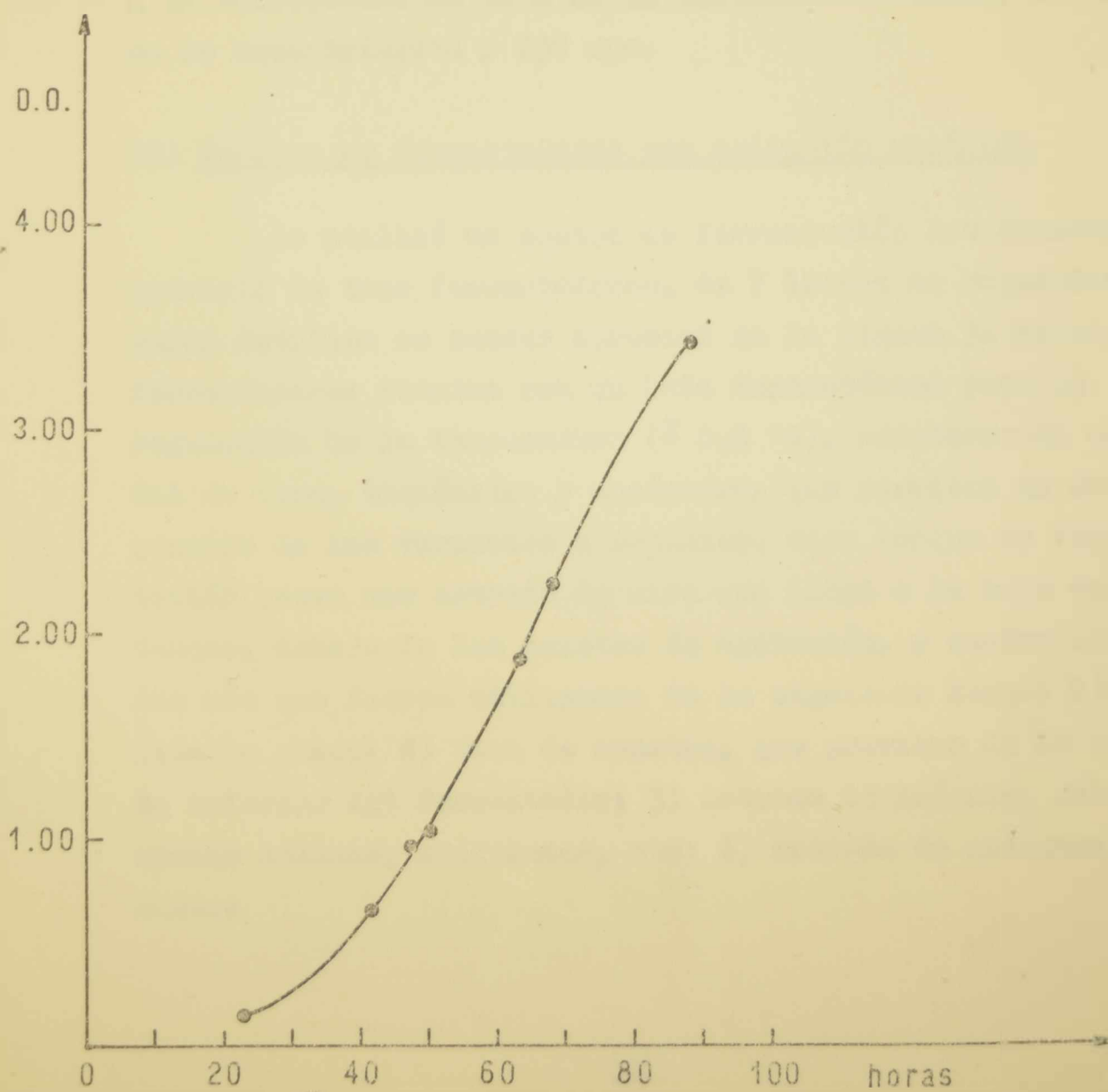
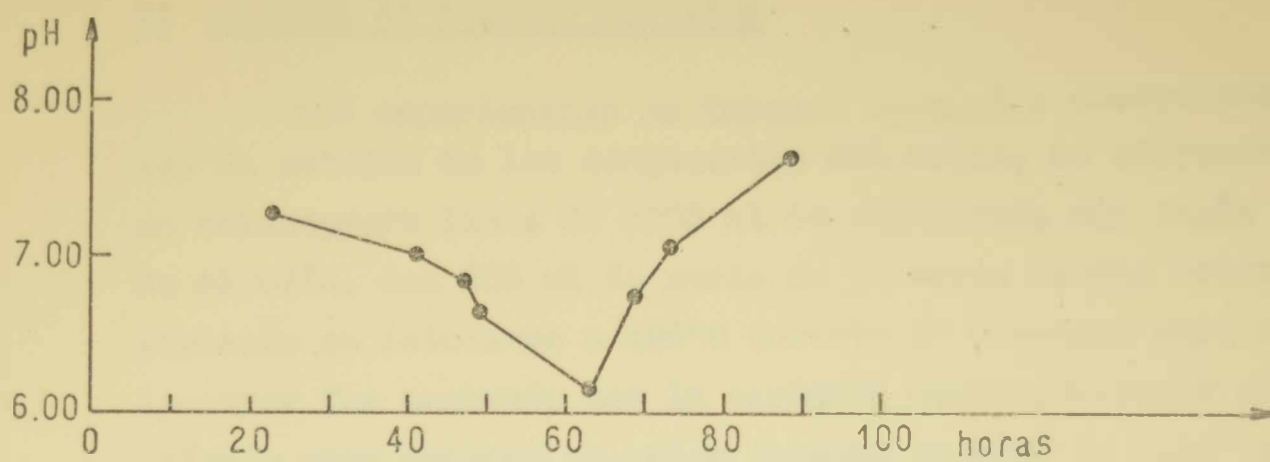


Fig. 2. Curvas de pH y crecimiento celular del *Rhizobium japonicum* (medio inoculo)

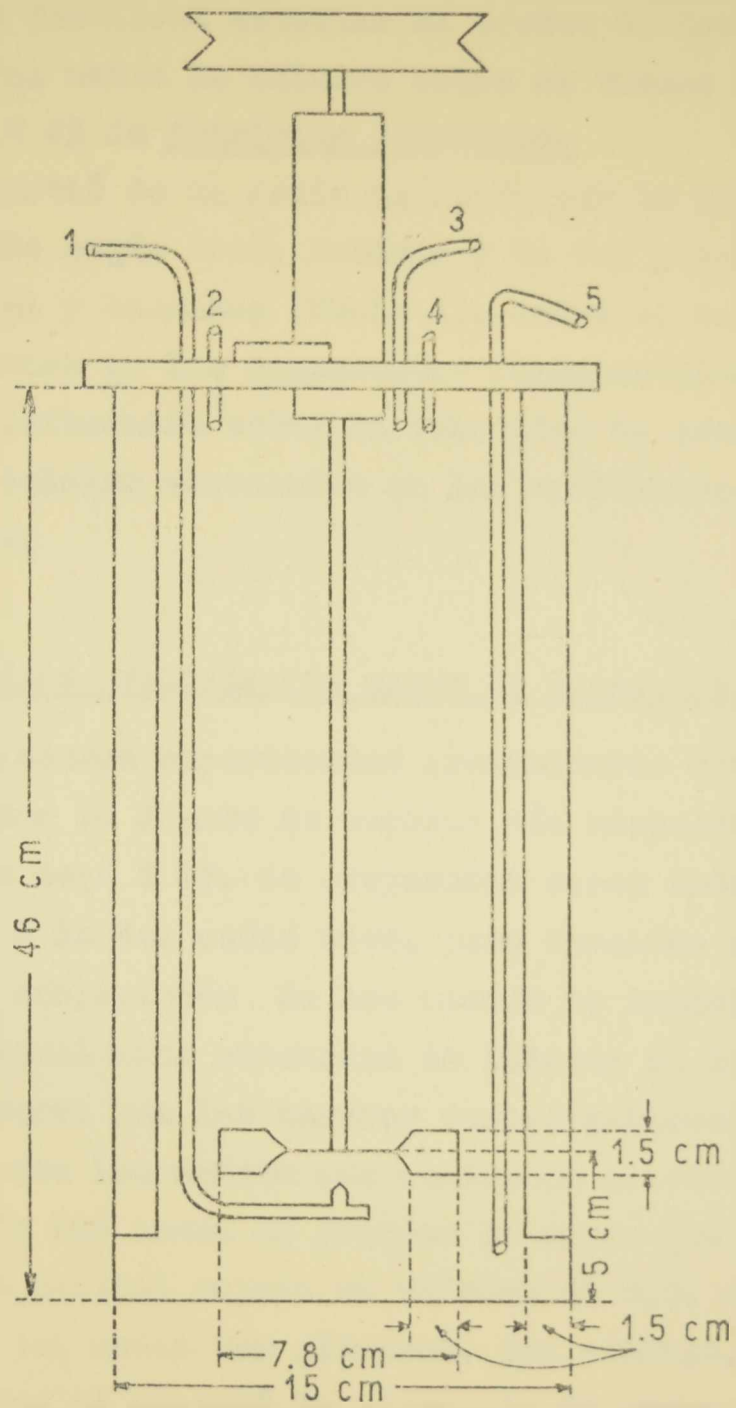
## EQUIPOS Y CONDICIONES DE OPERACION

### I) Ensayos en frascos agitados

Las experiencias en frascos agitados, correspondientes al estudio de los componentes del medio, se efectuaron en erlenmeyers lisos de 1000 ml de capacidad, con tapón de algodón, con 200 ml de medio de cultivo. Previa esterilización en autoclave a 120°C durante 20 minutos, cada erlenmeyer fue sembrado con la cantidad correspondiente de inóculo para obtener un valor inicial de D.O. de 0,12 unidades. Los erlenmeyers fueron colocados en cuarto estufa a la temperatura de 30°C en un agitador rotatorio, con 2,5 cm de excentricidad y 230 rpm.

### II) Ensayos en fermentadores con agitación mecánica

Se utilizó un equipo de fermentación New Brunswick, provisto de tres fermentadores, de 7 litros de capacidad, cuyos detalles se pueden apreciar en la figura 3. Estos fermentadores cuentan con un baño termostático para la regulación de la temperatura ( $\pm 0,5$  °C), medidores de caudal de aire, taquímetro y manómetro, que permiten un control preciso de las variables a estudiar. Cada tanque de fermentación posee una entrada de aire que llega a la base del tanque, debajo de las paletas de agitación, y cuatro entradas más que fueron utilizadas de la siguiente forma: 1) salida de gases; 2) toma de muestra, que proviene de la parte inferior del fermentador; 3) entrada de inóculo, soluciones salinas, nutrientes, etc; 4) entrada de antiespumante.



1. entrada de aire
2. entrada de inóculo
3. salida de gases
4. entrada de antiespumante
5. toma de muestra

Fig. 3. Esquema del fermentador



## RESULTADOS

### Ensayos realizados en erlenmeyers agitados

Los ensayos llevados a cabo en erlenmeyers agitados tuvieron como finalidad estudiar el efecto de los distintos componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de generación de la cepa E 45 de Rhizobium japonicum.

Se partió de un medio indicado por la bibliografía (Ashby modificado según Fred, Baldwin y Mc Coy y agregados propuestos por Schiel y Ragonese (Tabla 1), sobre el cual se hicieron modificaciones en los componentes fundamentales a fin de estudiar la influencia sobre la velocidad de crecimiento y concentración celular alcanzadas en las condiciones indicadas anteriormente.

#### 1) Estudios preliminares sobre la fuente de carbono

Se hicieron experiencias preliminares con el objeto de seleccionar la fuente de carbono más adecuada para el desarrollo de la cepa E 45. Se prepararon cinco medios de igual composición a la del medio base, pero variando la fuente de carbono. La composición de los mismos se indica en la tabla 2.

Los resultados obtenidos se indican en la figura 4, donde se observa que las mayores concentraciones celulares se obtienen con los medios que contienen glicerol y manitol. Después de 100 horas de proceso la curva que corresponde al medio con manitol supera en valores de D.O. a la curva de crecimiento del medio con glicerol. Sin embargo, en esta etapa del proceso se observó la presencia de grumos visibles a simple vista en el medio con manitol. La observación microscópica de estos grumos los mostró como asociaciones celulares. Además, la viscosidad del medio con manitol aumenta notable-

Tabla 2

Composición de los medios utilizados en ensayos preliminares

Componentes	Medio n°				
	1	2	3	4	5
fuentes de carbono (10 g)	manitol	glicerol	galactosa	glucosa	sacarosa
extracto de Levadura Difco	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
$\text{PO}_4\text{HK}_2$	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
$\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
$\text{ClNa}$	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
$\text{SO}_4\text{Mn}$ solución al 10%	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
$\text{Cl}_3\text{Fe}$ solución al 10%	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
$\text{NO}_3\text{K}$	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
agua destilada	1000	1000	1000	1000	1000

pH antes de esterilizar 7,2  
 Esterilización en autoclave a 120°C, 20 minutos.

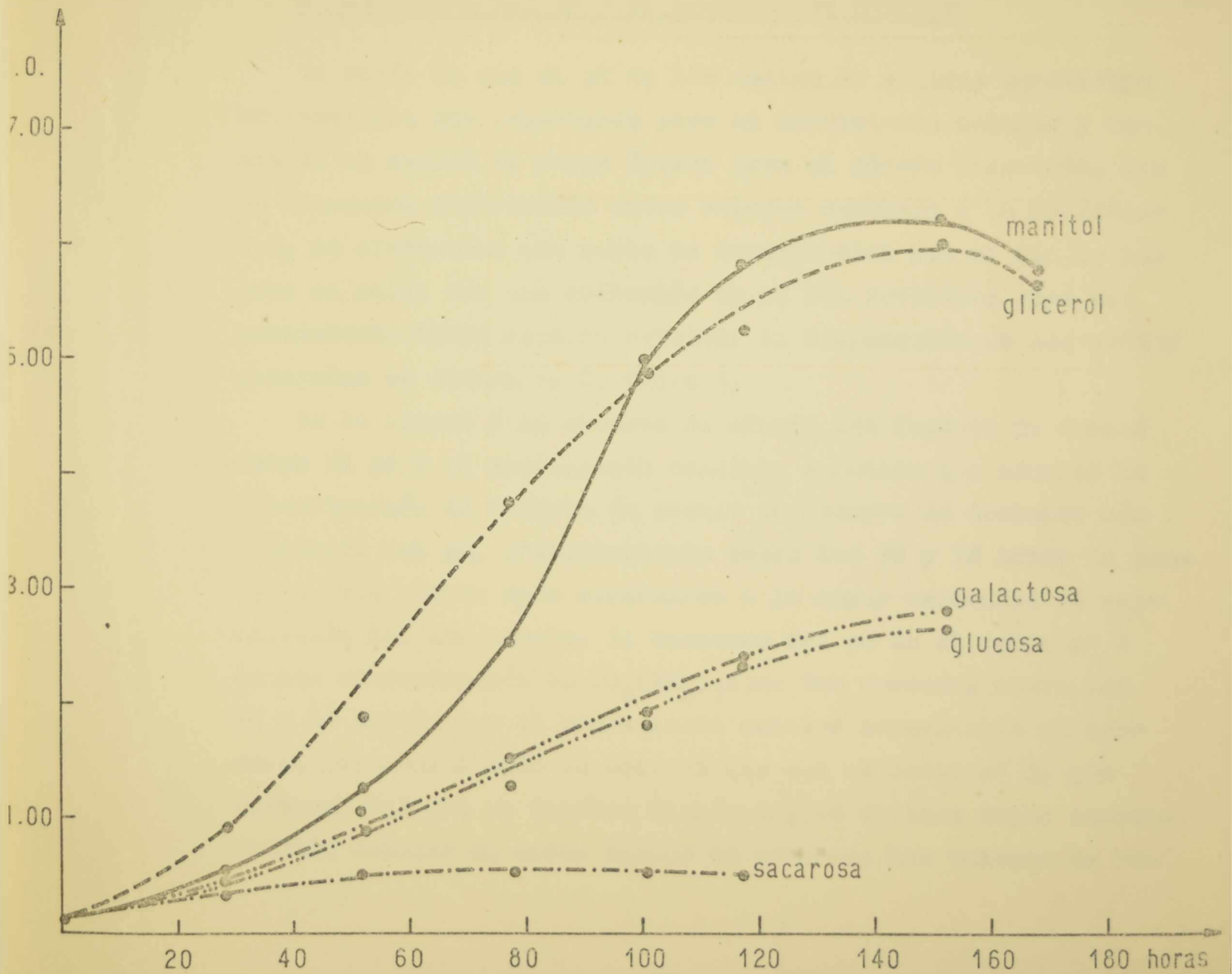
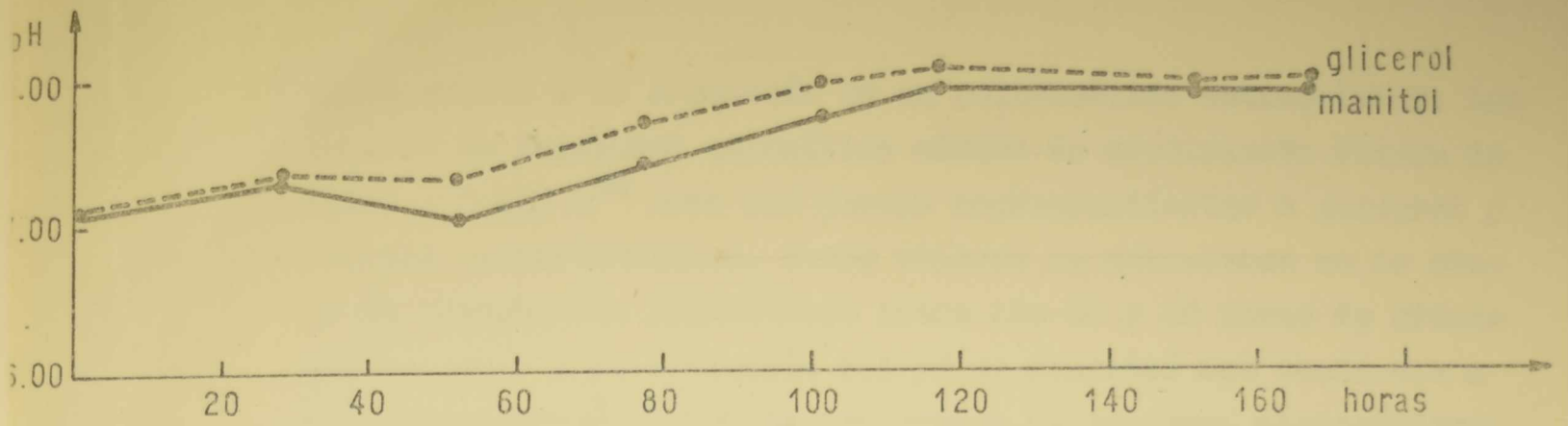


Fig. 4. Influencia de la naturaleza de la fuente de carbono sobre el crecimiento celular (medio base).



mente debido a la formación de un polisacárido extracelular. Los valores de velocidad específica máxima de crecimiento fueron de 0,044 y 0,039 h<sup>-1</sup> para las curvas correspondientes a glicerol y manitol respectivamente. Estos valores se calcularon en la etapa de crecimiento logarítmico entre las 20 y 40 horas de proceso. Respecto a la evolución del pH se comprobó una tendencia a la alcalinización a medida que avanza el proceso, alcanzándose valores superiores a 8,0 al final del mismo.

## 2) Influencia de la concentración de fosfato diamónico sobre la evolución del pH y el crecimiento celular

En razón de que el pH de los medios de cultivo constituye una variable muy importante para el crecimiento celular y teniendo en cuenta el rango óptimo para el género *Rhizobium*, que se encuentra comprendido entre valores cercanos a la neutralidad, se efectuaron una serie de experiencias con el fin de lograr un caldo con una evolución de pH más favorable para el crecimiento de la cepa en estudio. La composición de los medios ensayados se indica en la tabla 3.

En la figura 5 se observa el efecto del fosfato de amonio sobre el pH y el crecimiento celular. A medida que aumenta la concentración de fosfato de amonio se observa un descenso más acentuado del pH, principalmente entre las 36 y 72 horas de proceso. Este efecto debe atribuirse a la mayor velocidad de asimilación del ion amonio. El descenso del pH en el medio n° 4 (mayor concentración de  $\text{PO}_4(\text{NH}_4)_2\text{H}$ ) es tan marcado, entre las 36 y 65 horas, que el crecimiento celular experimenta un sensible retardo. Además se observa que con el medio n° 3, que contiene 0,3 g/l de fosfato diamónico, se obtiene mayor concentración celular en menor tiempo de proceso. Los valores de ve-

Tabla 3

Composición de los medios utilizados en los estudios sobre la influencia de la concentración de  $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$  sobre la evolución de pH y el crecimiento celular

Componentes	medio n°				
	1	2	3	4	5
manitol	10	-	-	-	-
glicerol	-	10	10	10	10
extracto de levadura Difco	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
$\text{PO}_4\text{HK}_2$	0,5	0,5	0,5	0,5	(*)
$\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
$\text{ClNa}$	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
$\text{SO}_4\text{Mn}$ soluc. 10%	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
$\text{Cl}_3\text{Fe}$ soluc. 10%	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
$\text{NO}_3\text{K}$	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
$\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$	-	0,1	0,3	0,5	0,3
agua destilada	1000	1000	1000	1000	1000

(\*) En el medio n° 5 en lugar de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  0,5 g/l, se agregó una mezcla reguladora de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  0,75 g/l y  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  0,50 g/l

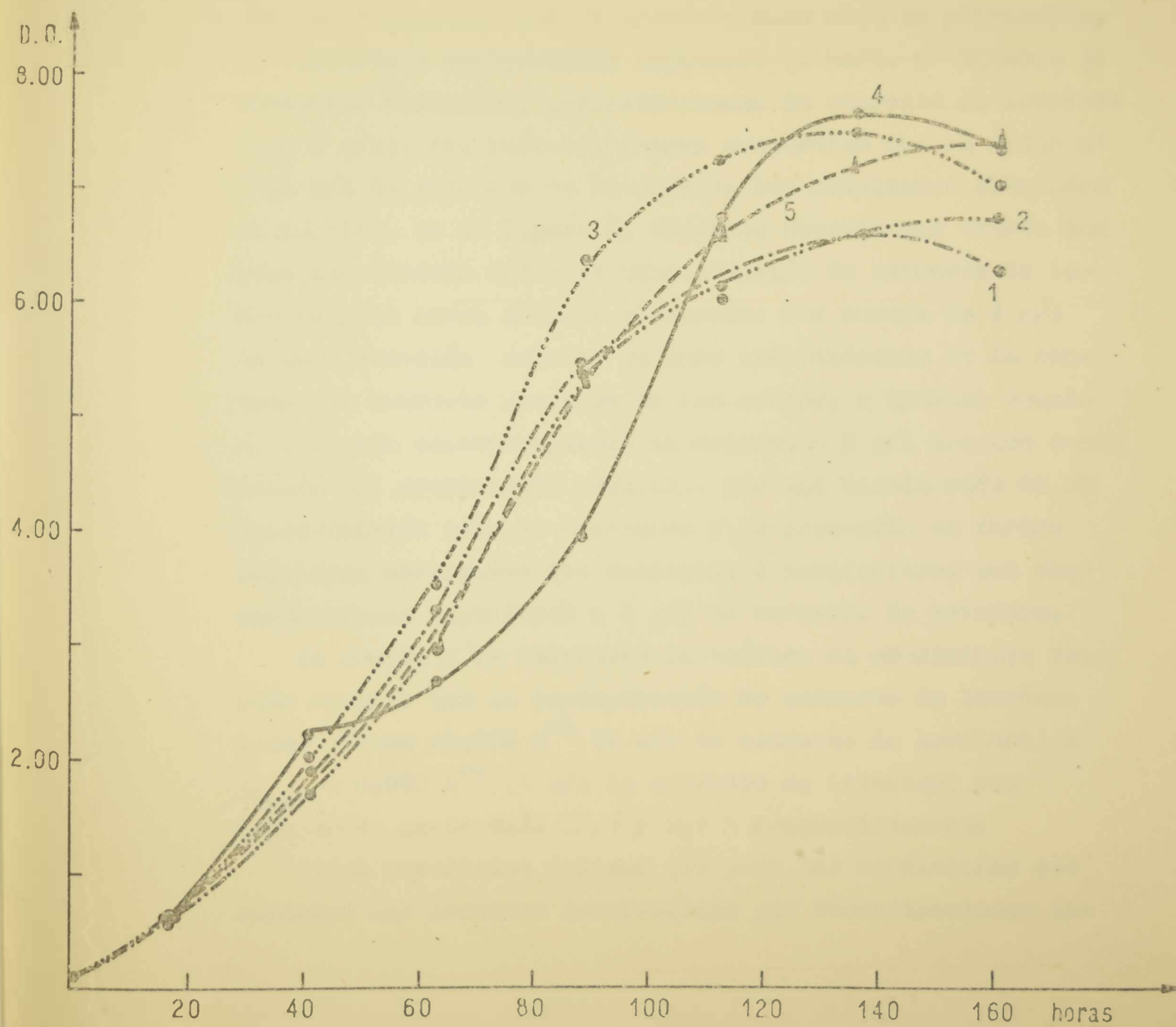
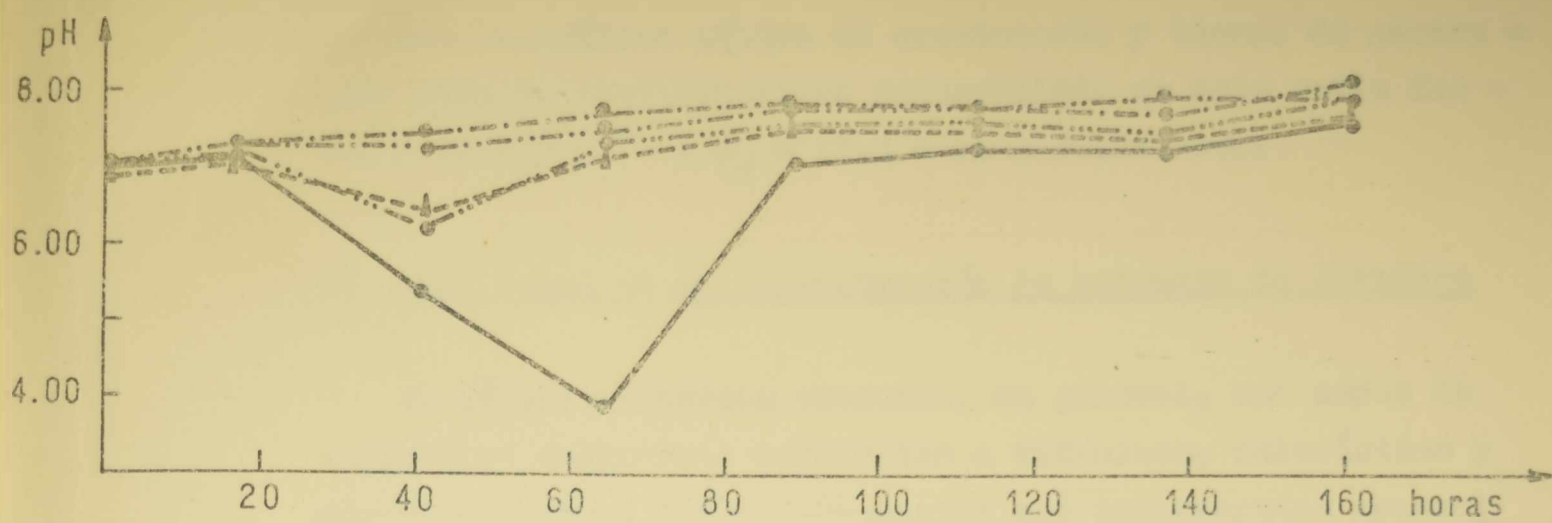


Fig. 5. Influencia de la concentración de fosfato de amonio sobre la evolución de pH y crecimiento celular.



locidad específica máxima de crecimiento y tiempo de generación para el microorganismo desarrollado en este medio fueron  $\mu = 0,056 \text{ h}^{-1}$  y  $\theta_g = 12,3 \text{ h}$  respectivamente.

### 3) Influencia de la concentración de extracto de levadura

El género *Rhizobium* presenta, en general, una serie de exigencias nutritivas referentes a vitaminas, aminoácidos y elementos traza. Dichos compuestos son incorporados generalmente al medio de cultivo por el extracto de levadura. Dado que los requerimientos dependen de cada cepa en particular, se realizaron experiencias empleando el medio n° 3 (Tabla 3) ensayando diferentes concentraciones de extracto de levadura (1 a 7 g/l). Los inoculos fueron preparados con el medio n° 3 (1 g/l de extracto de levadura). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6, donde se observa que existe una relación directa entre la concentración de extracto de levadura y el nivel celular alcanzado. Por encima de 4 g/l la concentración celular se hace independiente de la cantidad de extracto presente en los medios, e incluso cuando se utilizan concentraciones superiores a 5 g/l aparece inhibición del crecimiento revelable por una disminución de la concentración celular alcanzada y la presencia de formas celulares aberrantes que comienzan a manifestarse con concentraciones superiores a 4 g/l de extracto de levadura.

En cuanto a la velocidad específica de crecimiento también aumenta con la concentración de extracto de levadura desde  $\mu_{\max} = 0,058 \text{ h}^{-1}$  (1 g/l de extracto de levadura) a  $\mu_{\max} = 0,080 \text{ h}^{-1}$  (4 g/l de extracto de levadura) con tiempos de generación 11,9 y 8,7 h respectivamente.

Estos resultados indican que para las condiciones estudiadas los factores incorporados por concentraciones in-

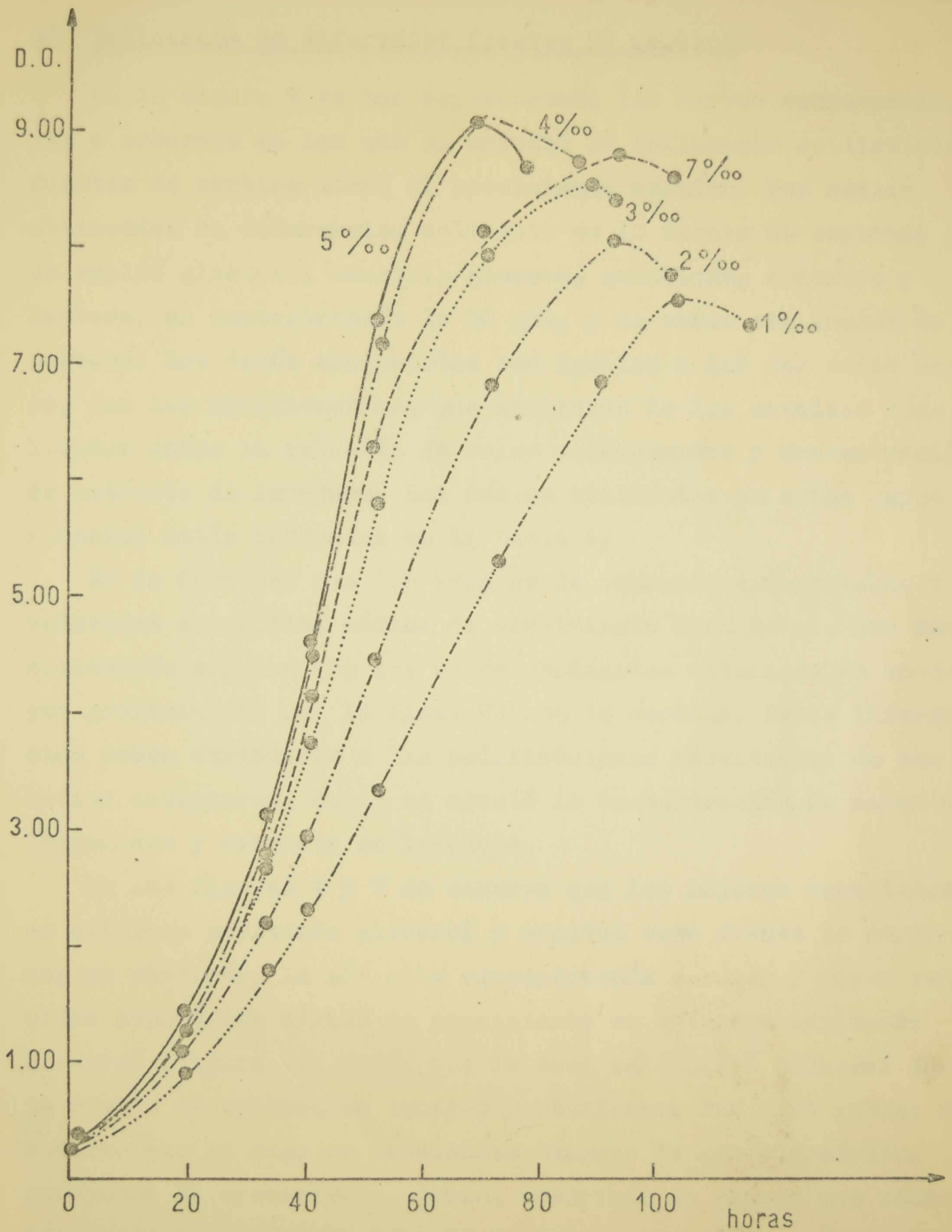


Fig. 6. Influencia de la concentración de extracto de levadura sobre el crecimiento celular.

feriores a 4 g/l de extracto de levadura limitan el crecimiento de la cepa en estudio, y que por encima de 5 g/l se observa un efecto inhibitorio del crecimiento.

#### 4) Influencia de diferentes fuentes de carbono

En la figura 7 se han representado las curvas correspondientes a procesos en los que se estudió la influencia de distintas fuentes de carbono sobre el crecimiento celular. Los medios utilizados se diferencian solamente en la fuente de carbono; se empleó glicerol, manitol, glucosa, galactosa, sacarosa y lactosa, en concentración de 10 g/l, y un medio sin fuente de carbono. Los demás componentes son iguales a los del medio base, con las modificaciones que surgieron de los estudios realizados sobre la relación de sales nitrogenadas y concentración de extracto de levadura. Los medios utilizados en estas experiencias están indicados en la tabla 4.

Es de destacar que los valores de concentración celular y velocidad específica máxima de crecimiento alcanzados, son sensiblemente mayores que los correspondientes obtenidos en ensayos preliminares con la misma fuente de carbono. Estas diferencias deben atribuirse a las modificaciones resultantes de estudios anteriores, donde se ajustó la concentración de sales nitrogenadas y extracto de levadura.

En las figuras 4 y 7 se observa que los mejores resultados se obtienen empleando glicerol y manitol como fuente de carbono; no obstante, la más alta concentración celular y mayor velocidad específica máxima de crecimiento se obtienen empleando glicerol (figura 7), razón por la cual se decidió utilizar esta fuente de carbono en ensayos posteriores. Por otra parte, se observa que la cepa no metaboliza ninguno de los disacáridos ensayados. El crecimiento parcial observado en medios que contienen lactosa y sacarosa debe atribuirse a la utilización de com-



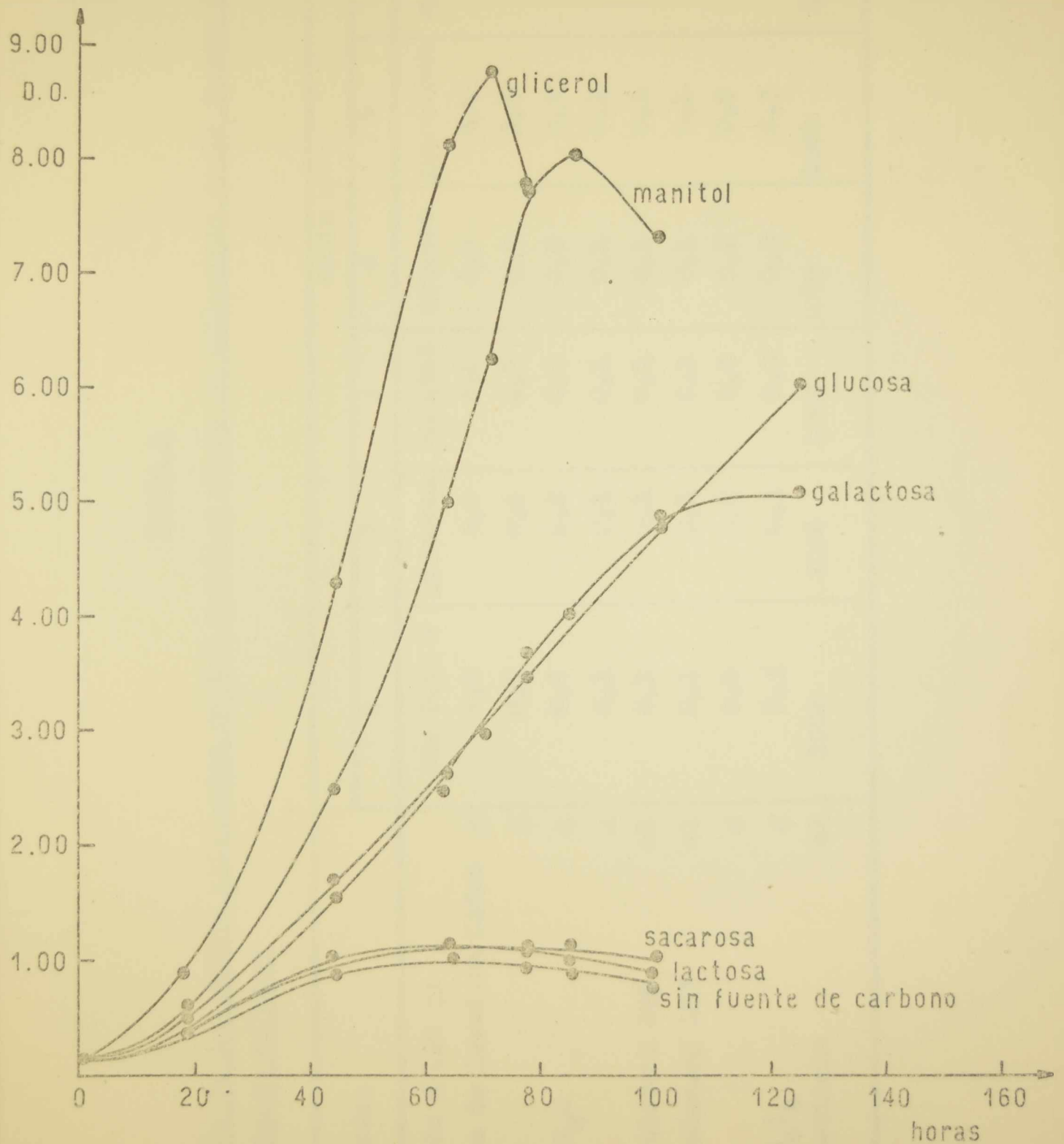


Fig. 7. Influencia de la fuente de carbono sobre el crecimiento celular (medio balanceado).



puestos hidrocarbonados presentes en el extracto de levadura, ya que los ensayos que se realizaron empleando el medio sin fuente de carbono adicional conducen a resultados similares a los obtenidos con lactosa y sacarosa.

Una vez seleccionada la fuente de carbono, se realizaron nuevas experiencias utilizando el medio n°2 (Tabla 4) con distintas concentraciones de glicerol (2 a 14 g/l), con el fin de establecer la concentración mínima de esta fuente de carbono que asegure una concentración celular superior a las establecidas para los cultivos que deben ser empleados en la preparación de inoculantes. Los resultados muestran que, para las condiciones ensayadas, concentraciones de glicerol inferiores a 10 g/l actúan como sustrato límite; por encima de esa concentración se obtienen caldos de elevada viscosidad a partir de las 60 horas de proceso, debido a la formación de un polisacárido extracelular y la presencia de asociaciones celulares. Las curvas correspondientes a 12 y 14 g/l de glicerol se han representado con líneas punteadas, ya que las características que presentan esos cultivos después de las 60 horas no permiten la determinación correcta del crecimiento celular por las técnicas ensayadas (figura 8).

Con el medio de cultivo balanceado (Tabla 5), se realizó un estudio del proceso midiendo D.O., pH, Células viables, peso seco de células y consumo de glicerol. En la figura 9 se han representado las curvas correspondientes al proceso mencionado.

Comparando estos resultados con los obtenidos en los primeros ensayos donde se utilizó el medio base, se observa la influencia favorable del balance efectuado en cuanto a factores de crecimiento, fuente de carbono y compuestos nitrogenados, ya que la velocidad específica máxima de crecimiento prácticamente duplica su valor ( $\mu_1 = 0,044$  y  $\mu_2 = 0,080 \text{ h}^{-1}$ ). En cuanto al glicerol, que resultó ser la fuente de carbono seleccionada,



se observa que se metaboliza totalmente, con una constante de rendimiento ( $y$  = células producidas/fuente de carbono consumida) de 0,5 gramos cel/g. La curva de crecimiento expresada en función de número de células viables muestra a las 36 horas de proceso una concentración celular superior a  $10^{10}$  células/ml, valor que se encuentra por encima de los mínimos establecidos para caldos habitualmente destinados a la preparación de inoculantes.

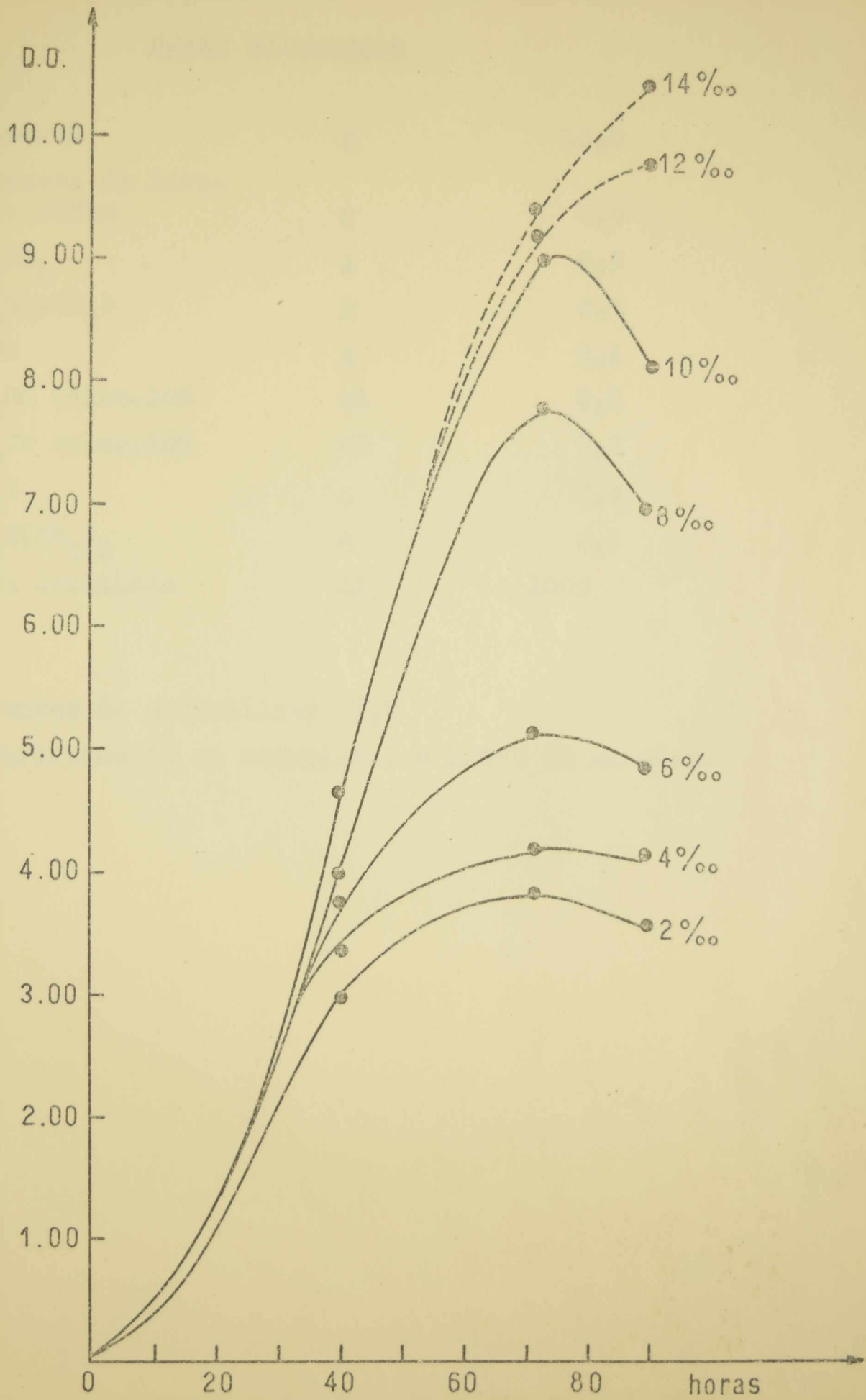


Fig. 8. Influencia de la concentración de glicerol sobre el crecimiento celular.

Tabla 5

Medio balanceado

glicerol	g	10,0
extracto de levadura Difco	g	4,0
$\text{PO}_4\text{HK}_2$	g	0,5
$\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	g	0,2
ClNa	g	0,1
$\text{SO}_4\text{Mn}$ soluc.10%	ml	0,1
$\text{Cl}_3\text{Fe}$ soluc.10%	ml	0,1
$\text{NO}_3\text{K}$	g	0,8
$\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$	g	0,3
agua destilada	ml	1000

pH antes de esterilizar 7,2

Esterilización en autoclave, a 120°C 20 minutos.



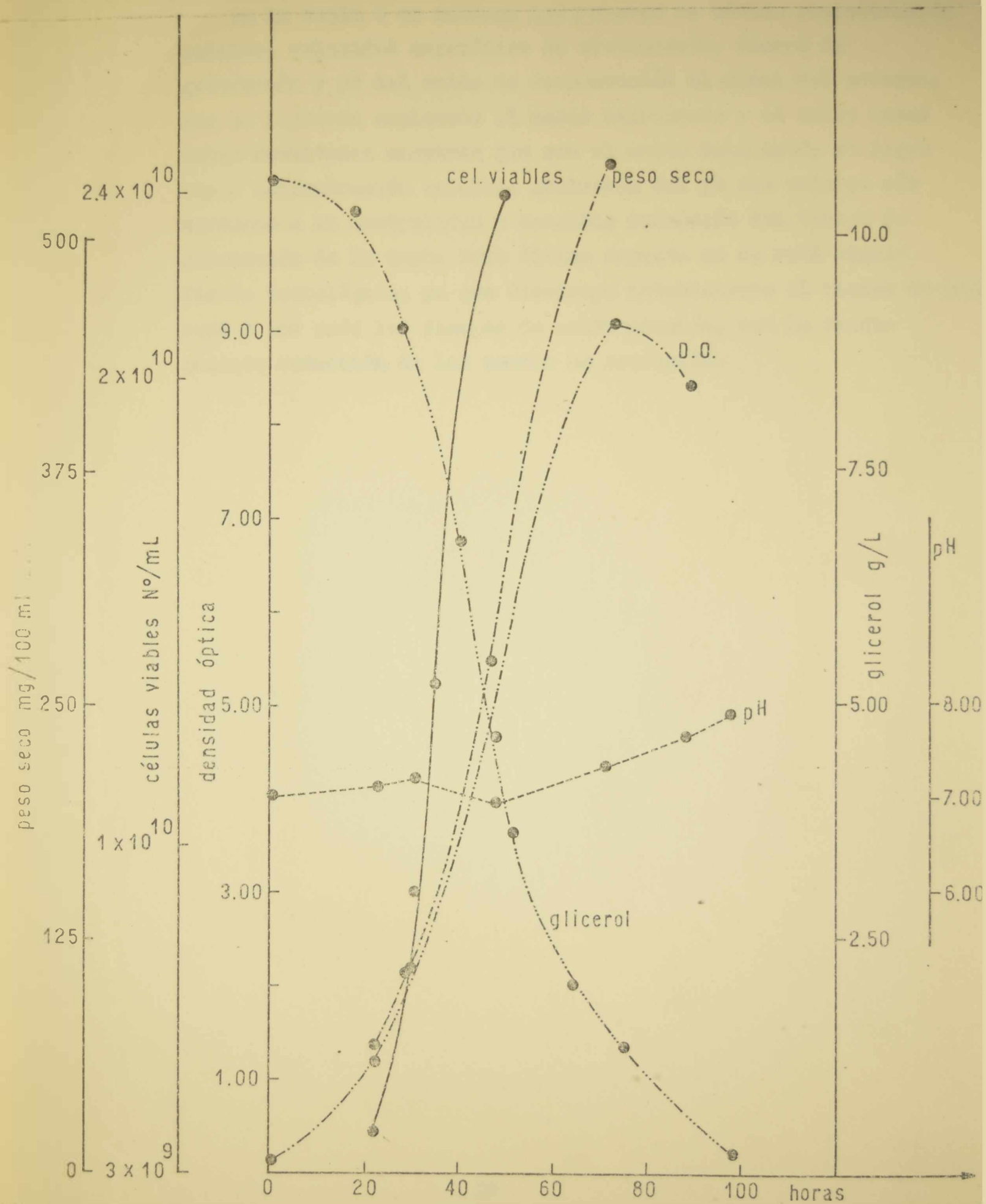


Fig. 9. Curvas de crecimiento celular, pH, y consumo de glicerol empleando el medio balanceado.

En la tabla 6 se indican los valores de máxima concentración celular, velocidad específica de crecimiento, tiempo de generación y pH del caldo de fermentación al final del proceso, que se lograron empleando el medio balanceado y el medio base. Estos resultados muestran que con el medio balanceado se logra mayor concentración celular, evolución del pH con valores más cercanos a la neutralidad y sensible reducción del tiempo de generación de la cepa. Este último aspecto es de real significado tecnológico, ya que disminuye notablemente el tiempo de proceso y por ende los riesgos de contaminación, con la consiguiente reducción de los costos de operación.

Tabla 6

Valores de velocidad específicos de crecimiento, tiempo de generación, concentración celular y pH de procesos empleando el medio base y el medio balanceado.

	<u>M. Base</u>	<u>M. Balanceado</u>
Constante específica de crecimiento, $\mu_{\max}$ ( $h^{-1}$ )	0,044	0,080
Tiempo de generación $\theta_g$ (h)	15,7	8,62
Máxima concentración celular (D.O.)	6,2	9,6
Células viables, 48 hs de proceso (cél/ml)	$4,5 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^{10}$
pH al final del proceso	8,4	7,7



Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios correspondientes a la influencia de las diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento del Rhizobium japonicum, se realizaron nuevas experiencias, en escala de erlenmeyers, en las que se estudió el comportamiento del microorganismo en medios con manitol y glicerol (medios n°2 y 3 - Tabla 4), considerando el aspecto del cultivo, concentración celular, tiempo de generación, número de células viables, tamaño de células, etc. Los resultados obtenidos se indican en la figura 10; se vuelve a confirmar que la velocidad de crecimiento es mayor cuando se utiliza glicerol como fuente de carbono. La observación microscópica reveló que los cultivos obtenidos en medios con glicerol resultaron más homogéneos y con mayor cantidad de microorganismos móviles que los cultivos en medios con manitol. Además, las bacterias desarrolladas en glicerol presentaron menor tamaño que las correspondientes cultivadas en manitol (figuras 11 y 12). También se observó una apreciable diferencia en la viscosidad de los medios; los cultivos en manitol presentaron alta viscosidad debido a la formación de un polisacárido extracelular, característica observada en menor grado en los medios con glicerol.

Paralelamente a las medidas de densidad óptica se hicieron determinaciones de células viables. Los resultados se indican en la tabla 7, donde se observa que empleando glicerol se obtiene ya, a las 30 horas de cultivo, una concentración de  $5 \cdot 10^9$  células/ml, mientras que esa misma concentración celular se obtuvo recién a las 60 horas en medios con manitol.

Se obtuvieron además, micrografías electrónicas, las que revelaron notables diferencias en las células cultivadas con ambas fuentes de carbono (figuras 13 y 14). Las diferencias más notables se observan a nivel de nucleoides. En las bacterias desarrolladas en manitol los cortes ultrafinos presen-

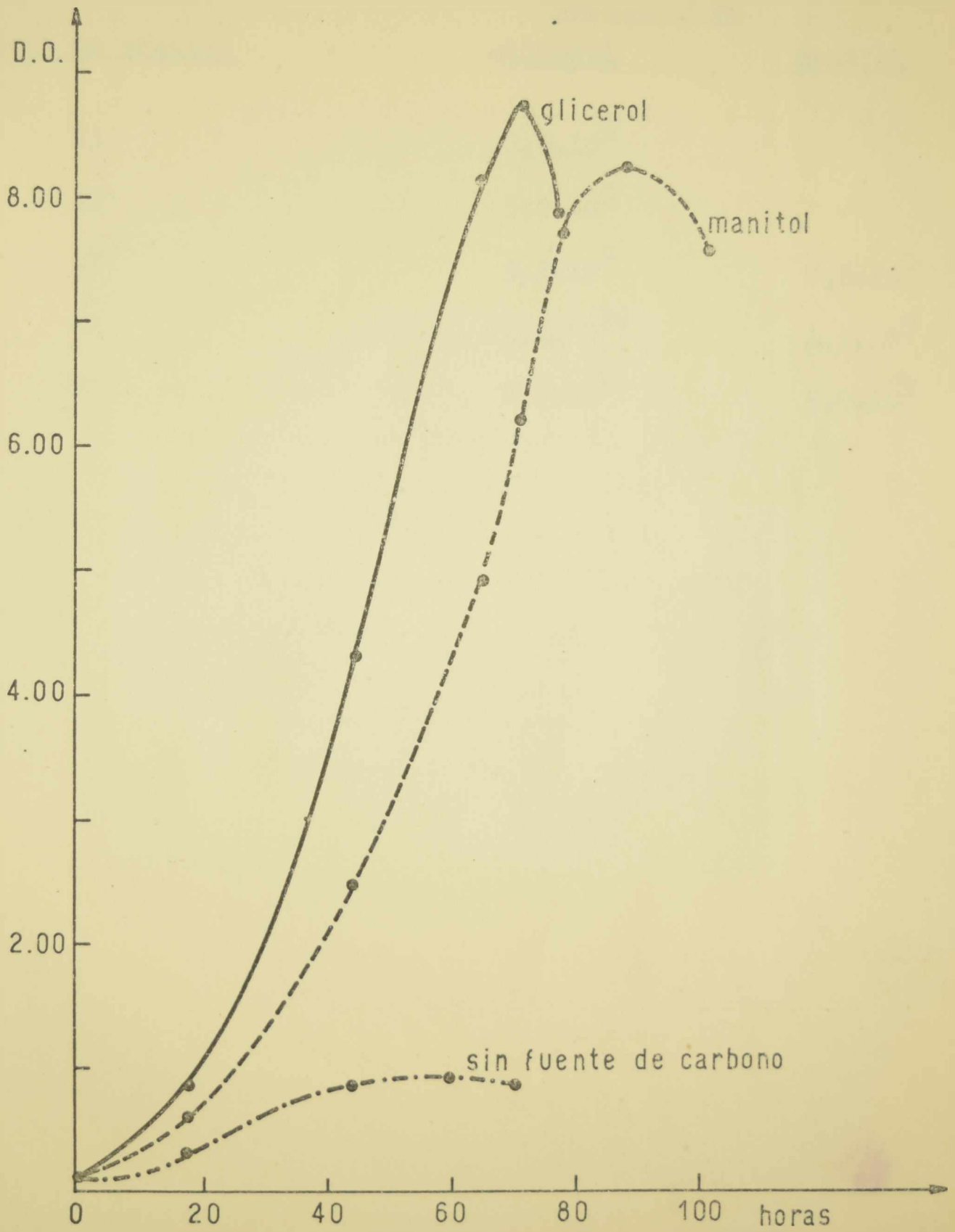
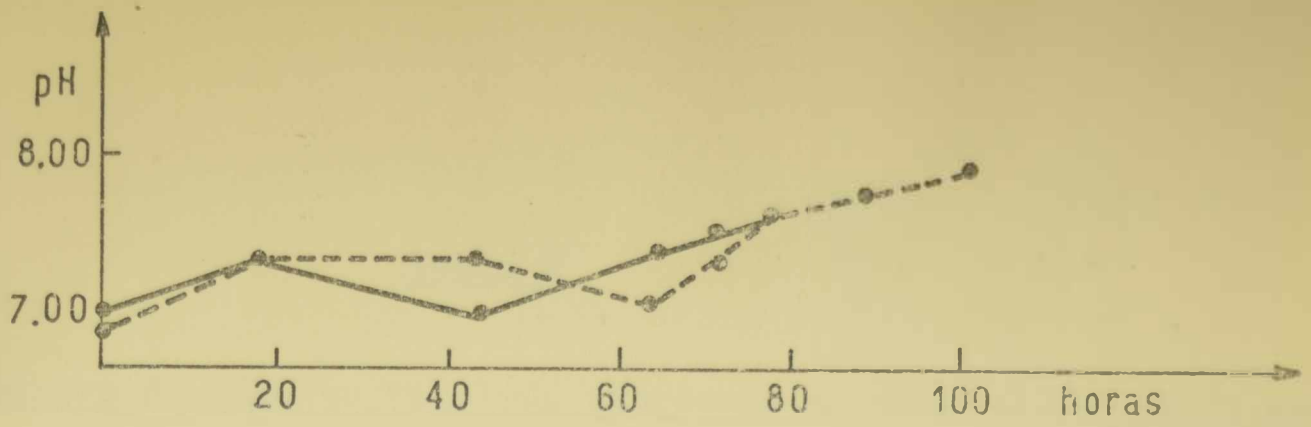


Fig.10. Estudios sobre crecimiento celular del *Rhizobium japonicum* en medios con glicerol y manitol en erlenmeyers agitados (medio balanceado)

Tabla 7

Número de células viables. expresado en células por ml de medio

<u>Hora de proceso</u>	<u>Células / ml</u>	
	<u>glicerol</u>	<u>manitol</u>
23	$2,8 \cdot 10^9$	
30	$5,0 \cdot 10^9$	
37	$9,2 \cdot 10^9$	$0,8 \cdot 10^9$
47	$1,2 \cdot 10^{10}$	$1,5 \cdot 10^9$
60	$2,0 \cdot 10^{10}$	$5,0 \cdot 10^9$



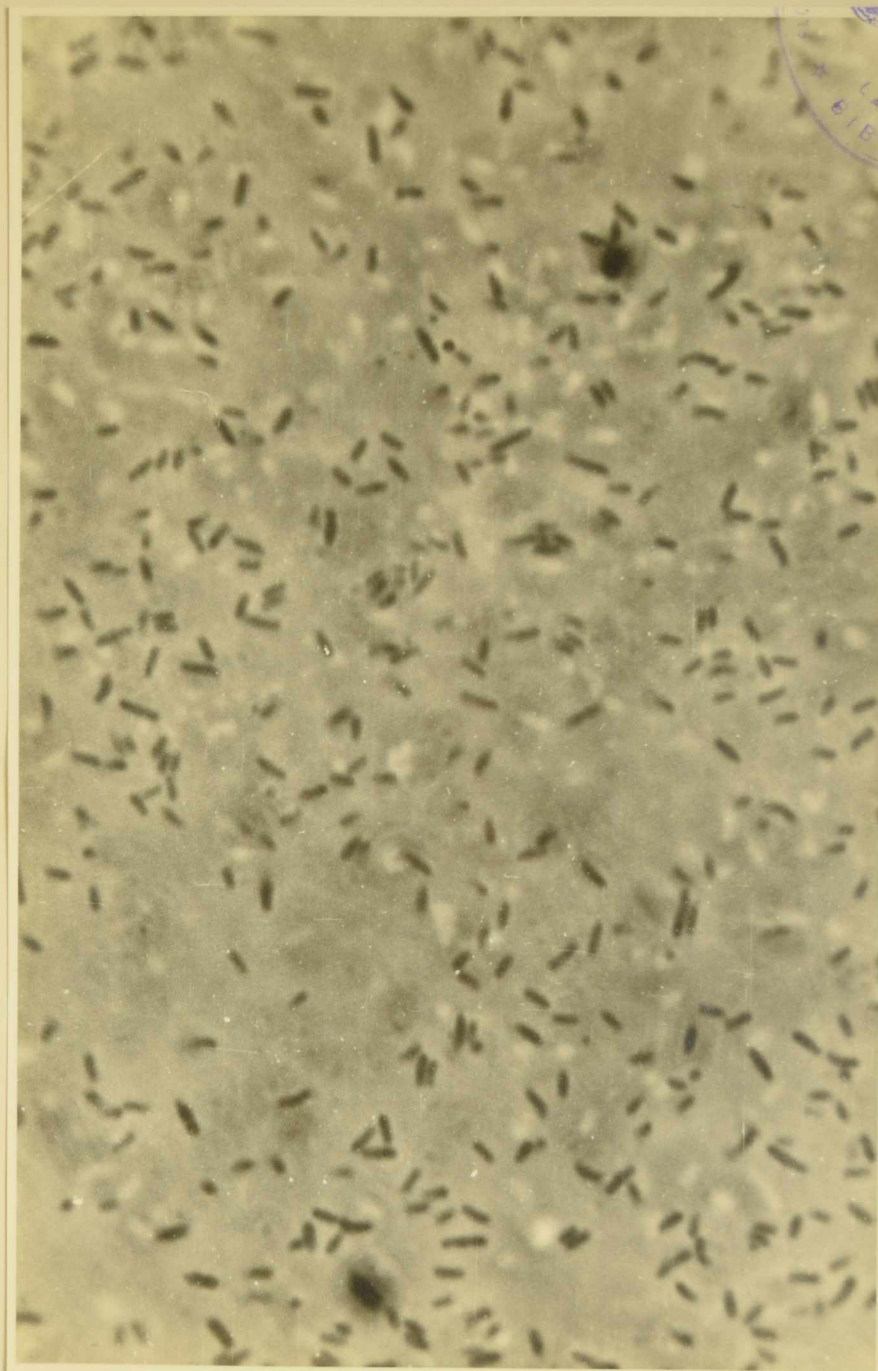


Fig. 11 Cultivo de Rhizobium japonicum de 50 horas de proceso en erlenmeyer agitado, en medio con glicerol(1.600 X)

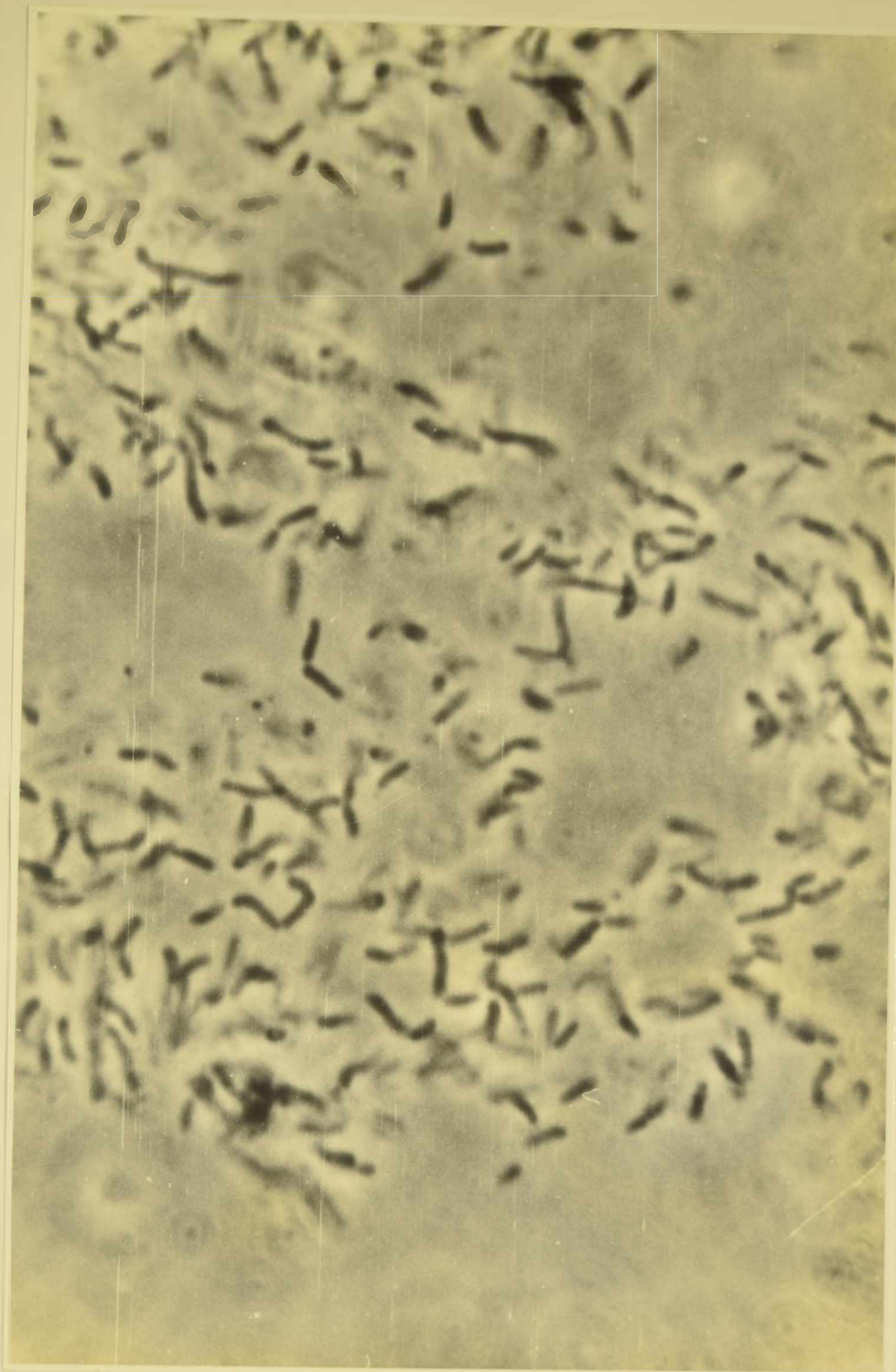


Figura 12 Cultivo de Rhizobium japonicum de 50 horas de proceso en erlenmeyer agitado, en medio con manitol (1.600 X)



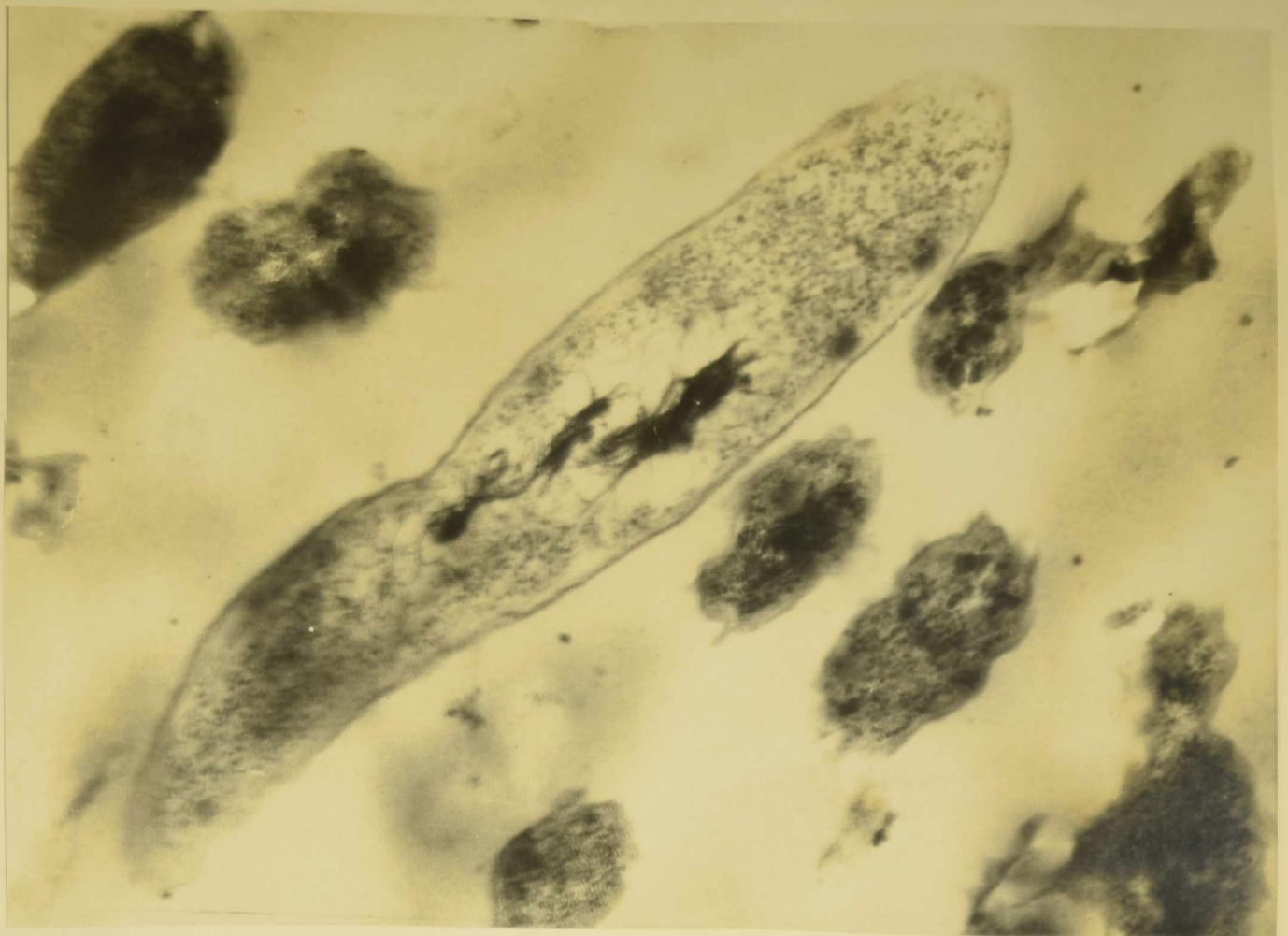


Fig. 13 Micrografía electrónica de células cultivadas en medio con glicerol, de 29 horas de proceso (12.500 X)



Fig.14 Micrografía electrónica de células cultivadas en medio con manitol, de 29 horas de proceso (17.000 X)



taron hasta 6 nucleoides en una misma bacteria. Los filamentos de DNA se presentan como gruesas bandas ramificadas de elevada densidad electrónica. En cambio en las bacterias desarrolladas en medios con glicerol se observó un nucleoide por bacteria, salvo en aquellas en división en las que se vieron dos. En estas células los filamentos de DNA son más delicados y finamente ramificados. Además como modificaciones menos notables, se observó que las células cultivadas en manitol mostraban un mayor desarrollo ribosómico y presentaban cuerpos densos esféricos de tamaño variable no identificados morfológicamente. Las imágenes observadas en estas células sugieren la existencia de una marcada poliploidía.

#### Estudio de las condiciones de operación en fermentadores de laboratorio.

##### Influencia del antiespumante

Como uno de los problemas comunes que se presentan en los procesos fermentativos es la formación de espuma, previo a los ensayos realizados en fermentadores con agitación mecánica se hicieron una serie de experiencias en las que se estudió el comportamiento de un antiespumante en cuanto a su capacidad de controlar la espuma y su influencia sobre el crecimiento del *Rhizobium japonicum*. En estas experiencias se emplearon erlenmeyers lisos y con indentaciones a fin de lograr distintos grados de formación de espuma y poder así determinar con más certeza la eficacia del antiespumante. Se eligió un antiespumante siliconado denominado comercialmente Midla Sil utilizado en dilución acuosa al 20%. En los ensayos se utilizaron erlenmeyers de un litro de capacidad con 200 ml de medio balanceado.

Estos ensayos demostraron que el antiespumante empleado es efectivo en la concentración utilizada (0,075 ml/l) y que su

presencia no afecta, por otra parte, el crecimiento del Rhizobium japonicum E 45, como se observa en la figura 15.

### Procesos de fermentación en tanques agitados

Una vez completados los estudios sobre balance de medio en escala de frascos agitados, se programaron una serie de experiencias en fermentadores de laboratorio con agitación mecánica, a fin de estudiar la influencia de algunas variables de operación sobre el crecimiento celular del Rhizobium japonicum E 45. Las referencias bibliográficas sobre este aspecto son muy escasas y además existe una gran diferencia en el comportamiento de las distintas cepas de Rhizobium japonicum utilizadas por distintos investigadores.

Estos estudios tienen como objetivo determinar las condiciones que permitan optimizar el proceso y la influencia que puedan tener las variables estudiadas sobre las propiedades de la cepa, especialmente en lo que se refiere a invasividad, especificidad y capacidad de fijación de nitrógeno, por lo que estas experiencias se completan con ensayos agronómicos con soja inoculada y cultivada artificialmente.

Los ensayos en fermentadores de laboratorio con agitación mecánica fueron programados para distintas condiciones de aeración, las que fueron seleccionadas en base a los valores de velocidad de absorción de oxígeno (Tabla 8). En las primeras experiencias se utilizó el medio de cultivo balanceado y en experiencias posteriores ese mismo medio modificado. En todos los casos se utilizaron 2.500 ml de medio de cultivo y se mantuvo la temperatura a 30°C.

Los inóculos se prepararon siguiendo el método que se utilizó en las experiencias en frascos agitados, pero empleando erlenmeyers con salida lateral, que facilitan la transferencia de la siembra, de un litro de capacidad con 125 ml de medio de

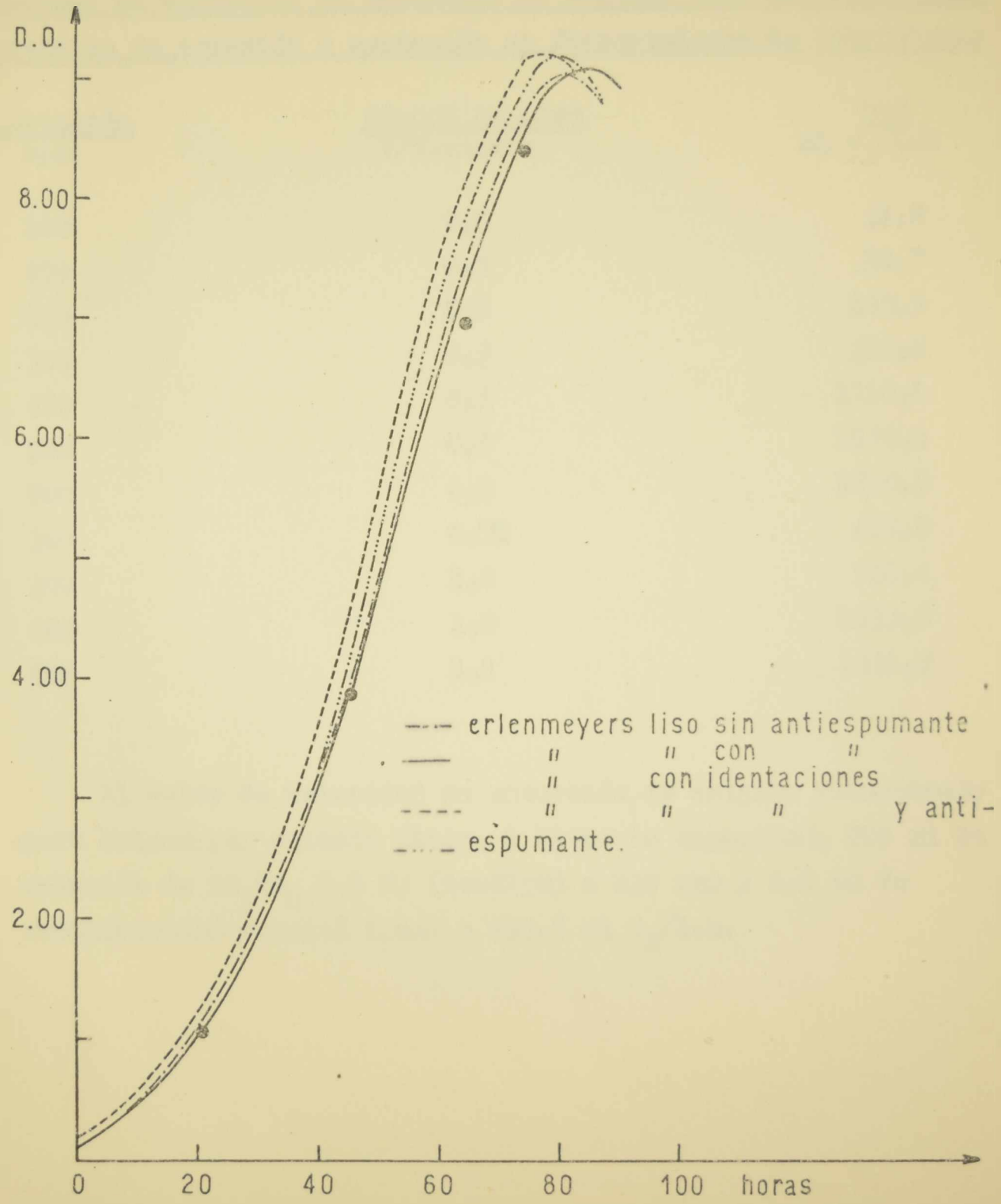
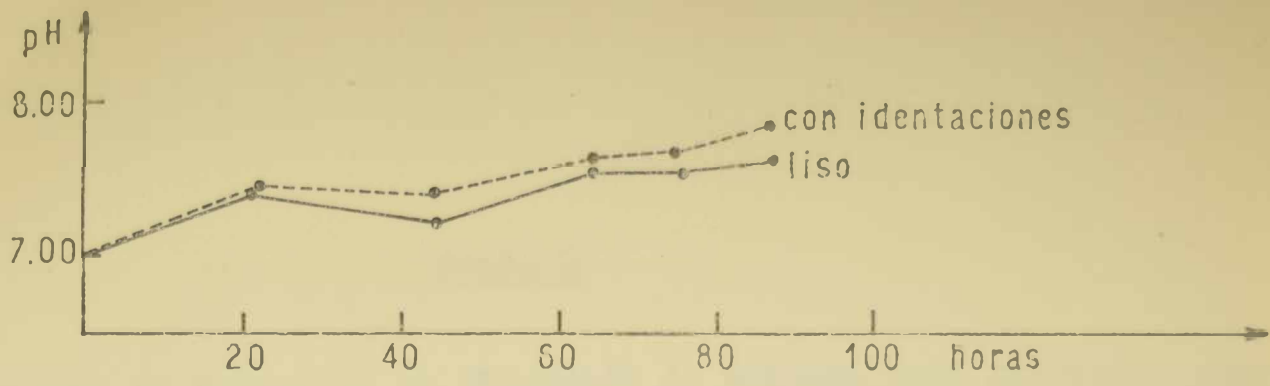


Fig.15. Influencia del antiespumante sobre el crecimiento celular.



Tabla 8

Valores de velocidad de absorción de oxígeno para distintas condiciones de aeración y agitación en fermentadores de laboratorio

<u>Agitación</u> rpm	<u>Caudal de aire</u> V/V.minuto	<u>OAR</u> ml O <sub>2</sub> /l.h
100	0,5	31,2
200	0,5	94,7
250	0,5	149,5
300	0,5	322,2
400	0,5	1110,8
500	0,5	1589,5
700	0,5	1792,9
300	0,75	482,0
300	1,0	595,4
400	1,0	1135,5
500	1,0	1691,2

El valor de velocidad de absorción de oxígeno determinado para erlenmeyer agitado (liso, 1 litro de capacidad, 200 ml de solución de SO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> 0,5 N) (testigo) a 230 rpm y 2,5 cm de excentricidad resultó igual a 259,6 ml O<sub>2</sub>/l.h.

cultivo de igual composición que el medio de fermentación correspondiente, excepto la concentración de extracto de levadura que se mantuvo siempre al 1% en la preparación de medios para inóculos. Se dejaron desarrollar 72 horas y se sembraron en los medios de fermentación volúmenes del orden del 5% (aproximadamente 125 ml para 2.500 ml de medio) tratando de ajustar la concentración inicial a 0,12 unidades de D.O. En todos los casos se sembraron con el mismo inóculo, en igual proporción (5%) dos erlenmeyers testigos, de 1 litro de capacidad, con 200 ml del mismo medio utilizado en el tanque de fermentación, que fueron colocados en agitador rotatorio.

Todos los procesos fueron controlados efectuando siembras periódicas de los cultivos en el medio propuesto por Vincent<sup>(22)</sup> y por observación microscópica directa y por la técnica de Gram. En todos los ensayos realizados el medio fue esterilizado dentro de los fermentadores, a 120°C, en autoclave, durante 20 minutos. Como antiespumante se utilizó silicona antiespumante Midla Sil.

#### Resultados para distintos valores de suministro de oxígeno

En las primeras experiencias realizadas en tanques agitados se estudiaron distintas condiciones de aeración y su influencia sobre la velocidad de crecimiento del Rhizobium japonicum E 45, empleando el medio de cultivo balanceado. En la tabla 9 se indican los valores de velocidad de absorción de oxígeno correspondientes a las condiciones de agitación y aeración empleadas.

Los resultados obtenidos en esta serie de ensayos se pueden observar en las figuras 16, 17, 18, 19, 20 y 21, en las que se ha representado crecimiento celular y valores

Tabla 9

Condiciones de operación utilizadas en las primeras experiencias realizadas en torques agitadas

<u>Agitación</u>	<u>Caudal de aire</u>	<u>QAR</u>
rpm	V/V.minuto	ml O <sub>2</sub> /l.h
100	0,5	31,2
200	0,5	94,7
300	0,5	322,2
400	0,5	1110,8
500	0,5	1589,5
700	0,5	1792,9

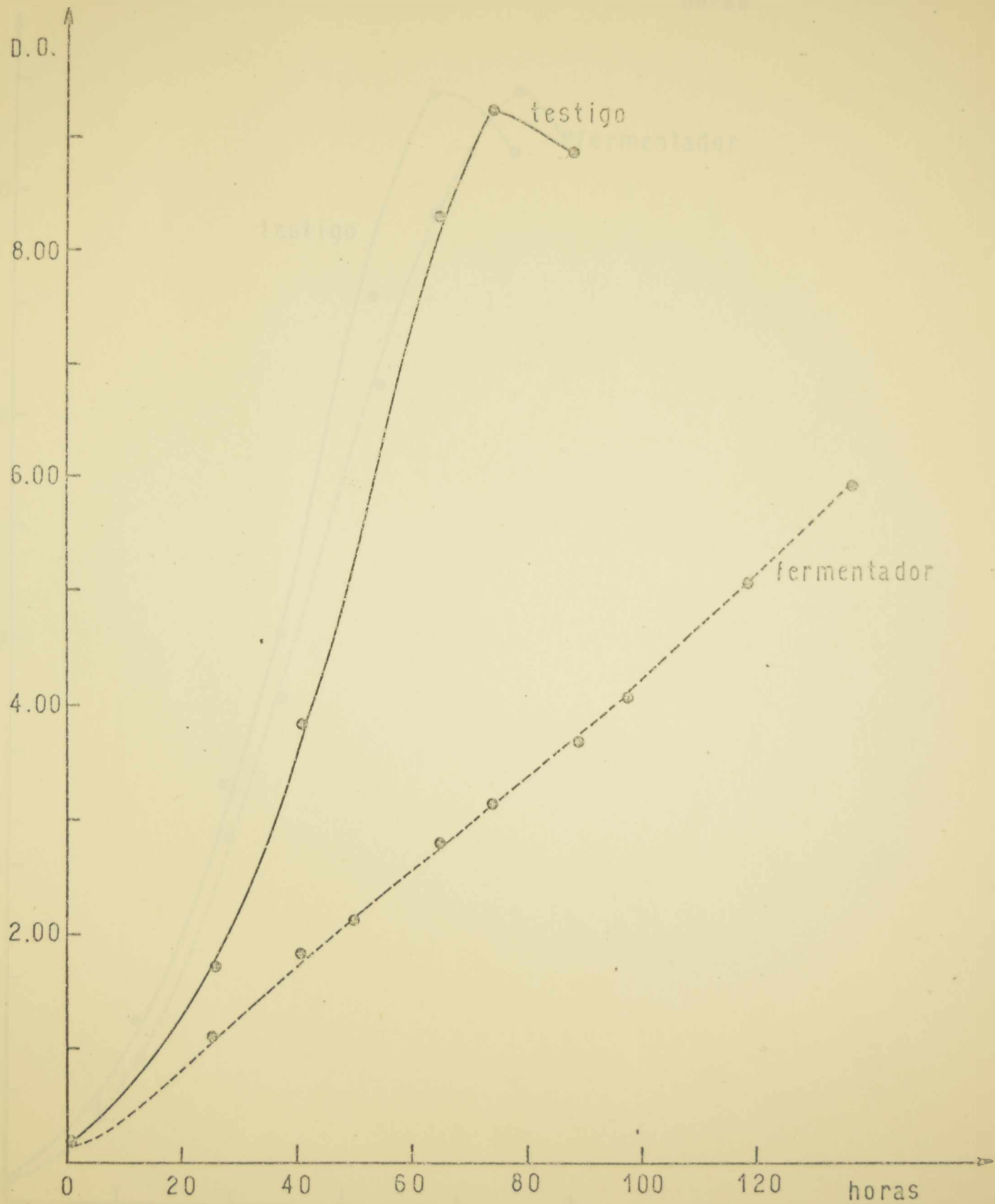
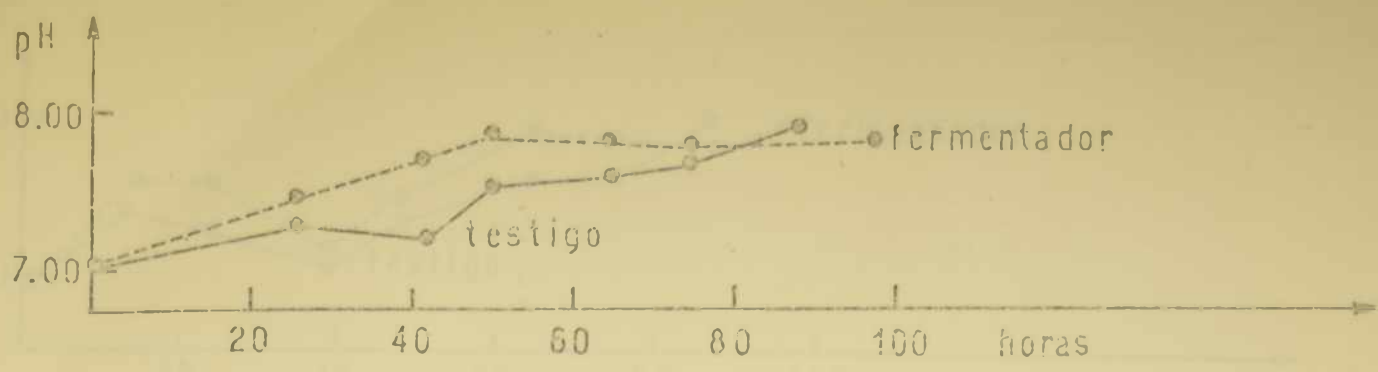


Fig.16. Evolución del crecimiento celular y pH. Desarrollo en fermentador: caudal de aire 0.5 V/V.min. Velocidad de agitación 100 rpm. Desarrollo en erlenmeyer (testigo)



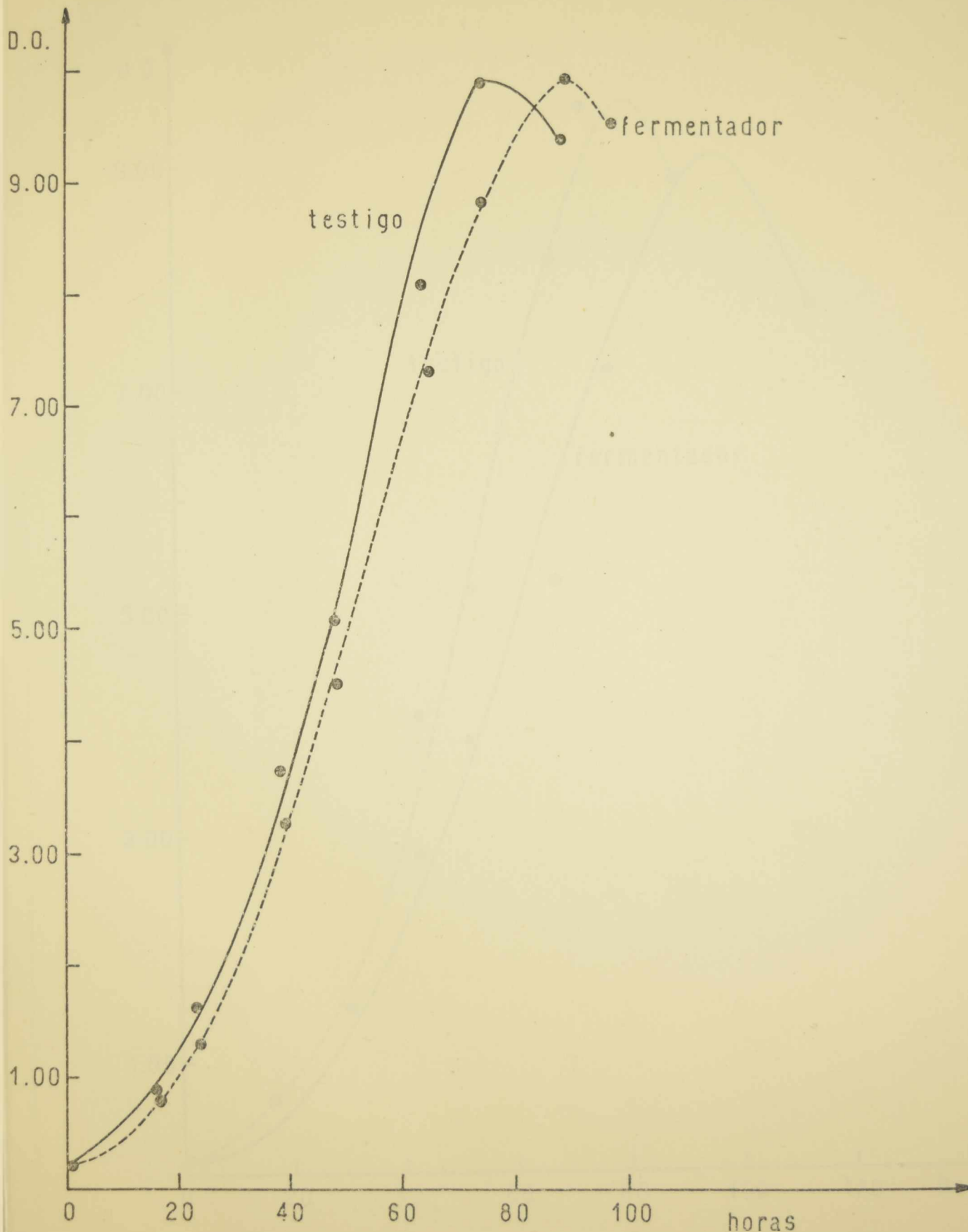
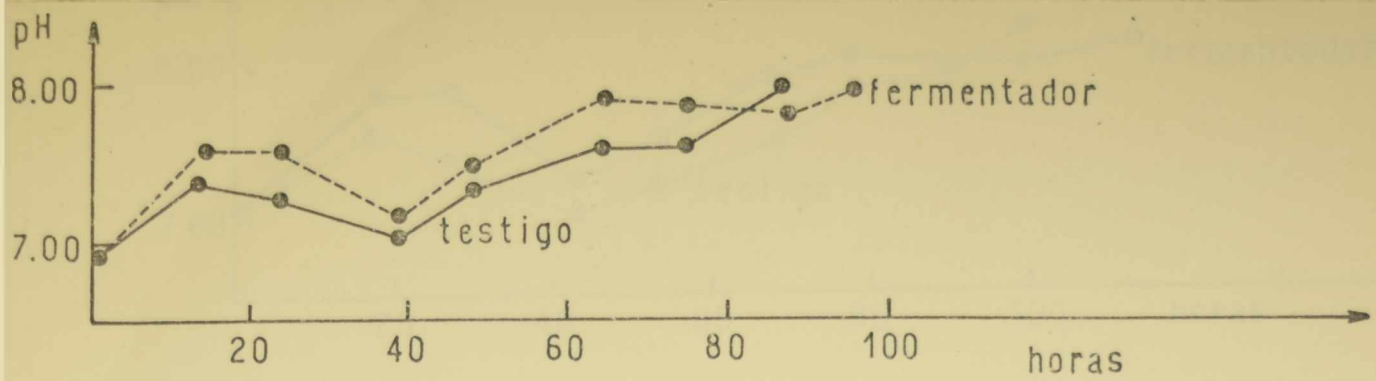


Fig.17. Evolución del crecimiento celular y pH. Desarrollo en fermentador: caudal de aire 0.5 V/V. min; velocidad de agitación 200 rpm. Desarrollo en erlenmeyer agitado (testigo).

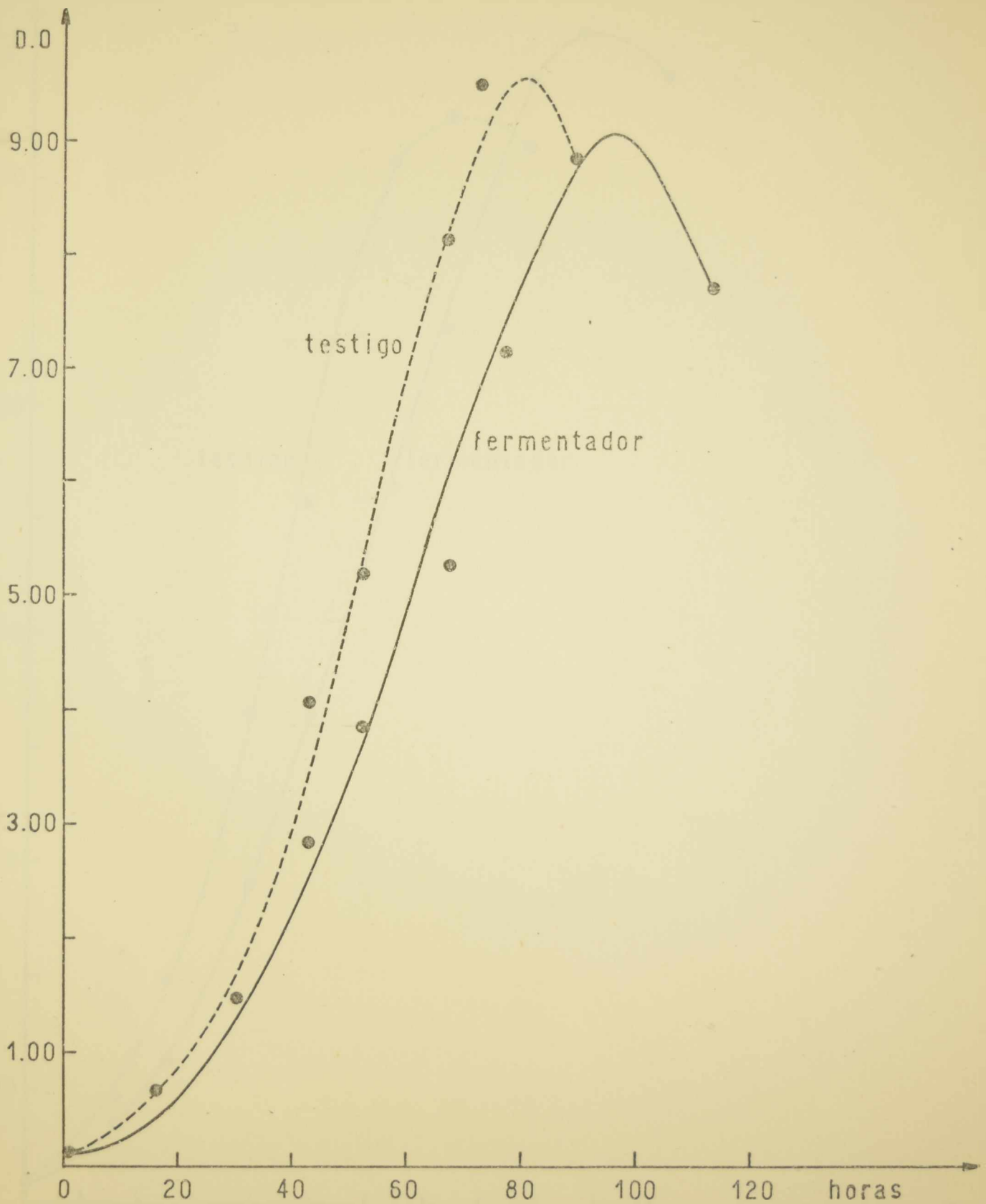
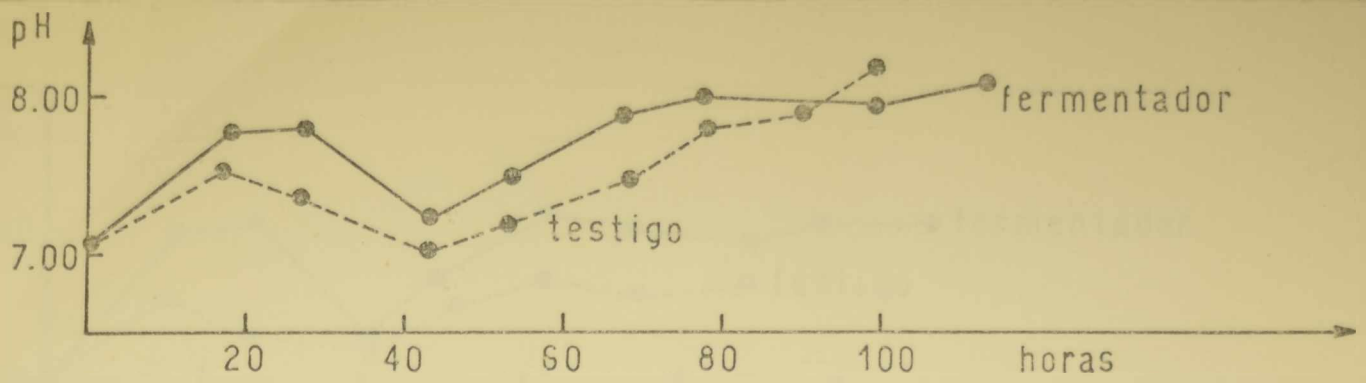


Fig.18. Evolución del crecimiento celular y pH. Desarrollo en fermentador caudal de aire 0.5 V/V. min; velocidad de agitación 300 rpm. Desarrollo en erlenmeyer agitado (testigo)

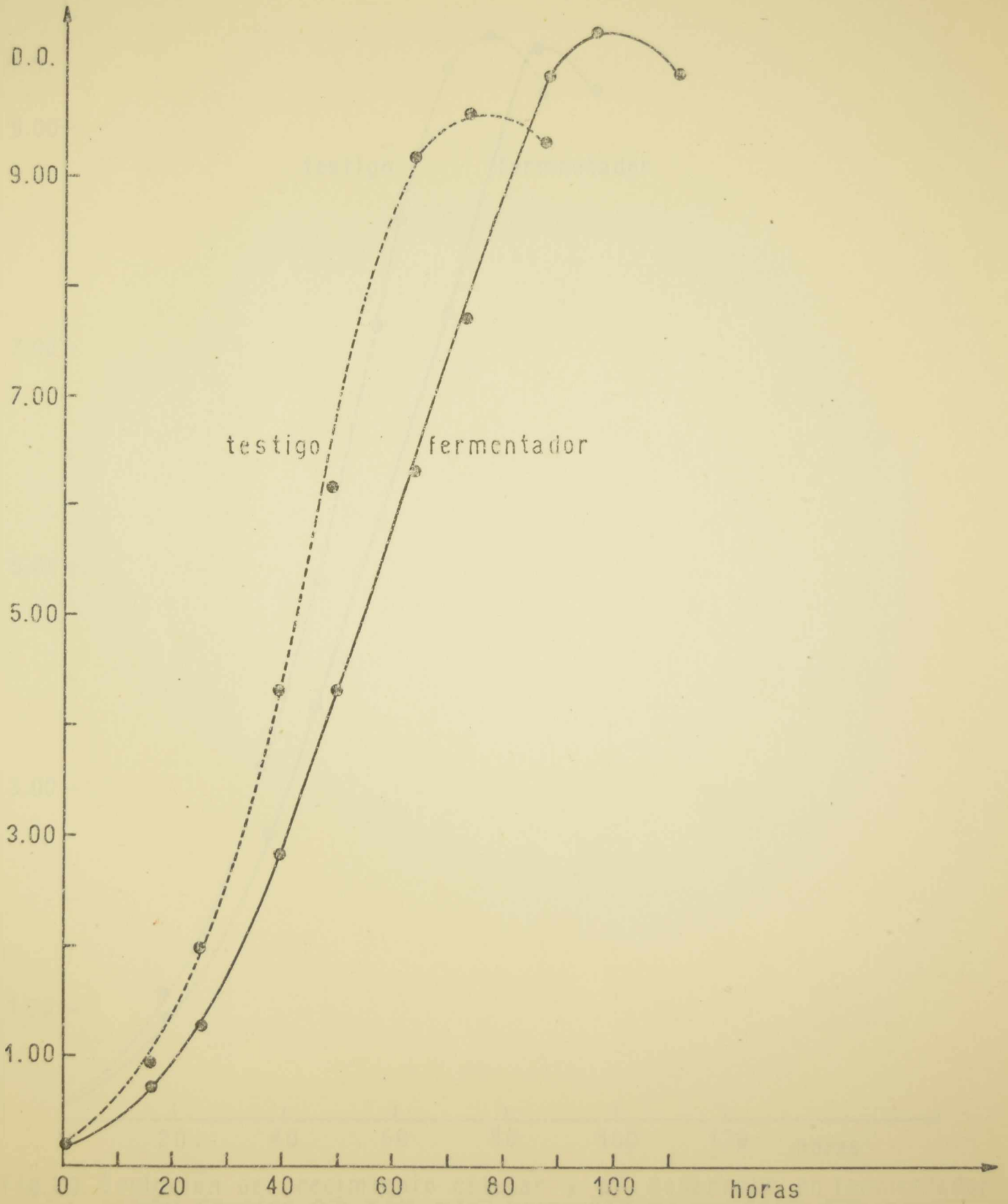
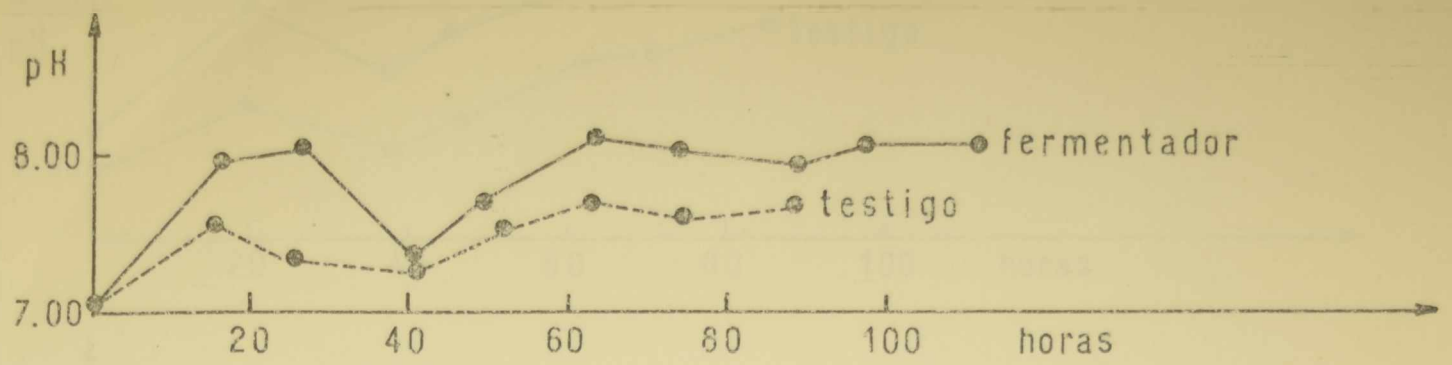


Fig.19. Evolución del crecimiento celular y pH. Desarrollo en fermentador: caudal de aire 0.5 V/V.min; velocidad de agitación 400 rpm. Desarrollo en erlenmeyer agitado (testigo)

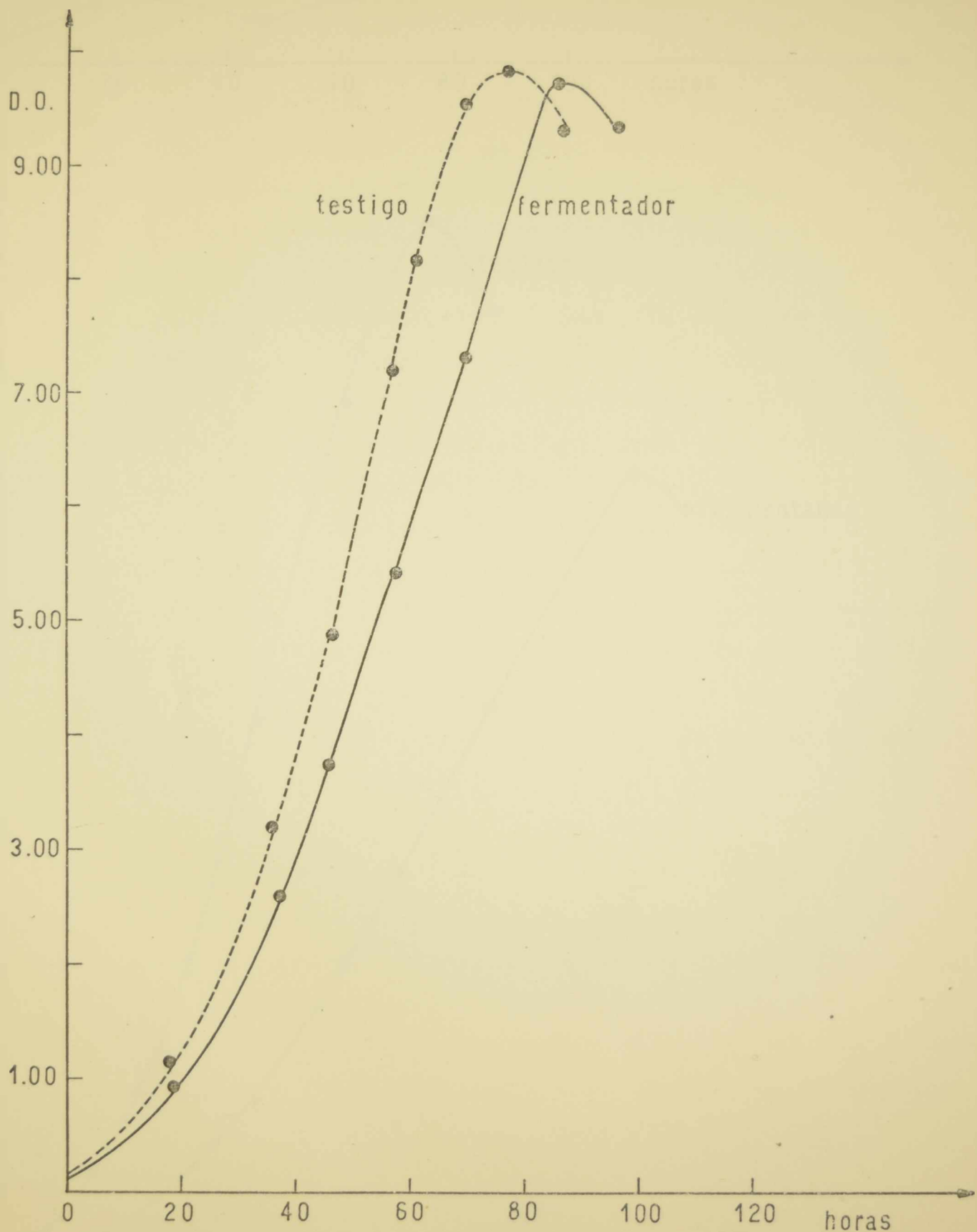
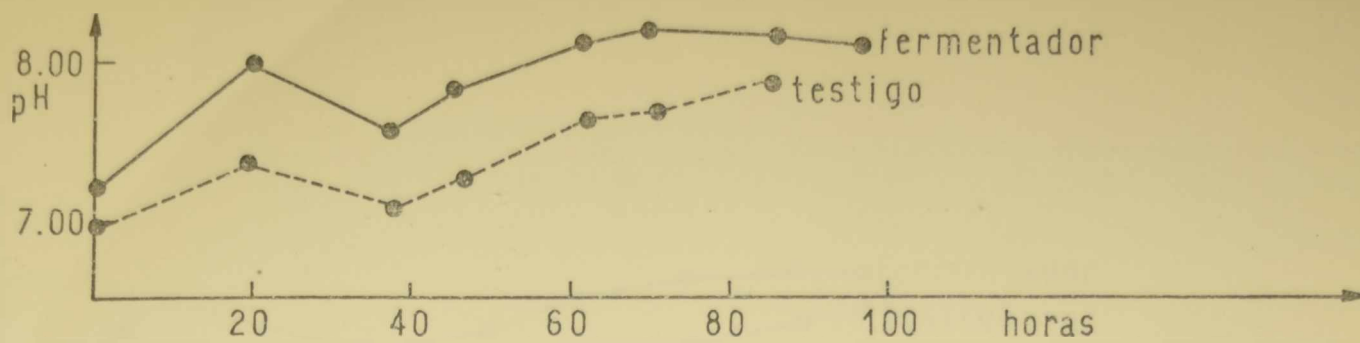


Fig.20. Evolución del crecimiento celular y pH. Desarrollo en fermentador: caudal de aire 0.5 V/V. min; velocidad de agitación 500 rpm. Desarrollo en erlenmeyers agitado (testigo).



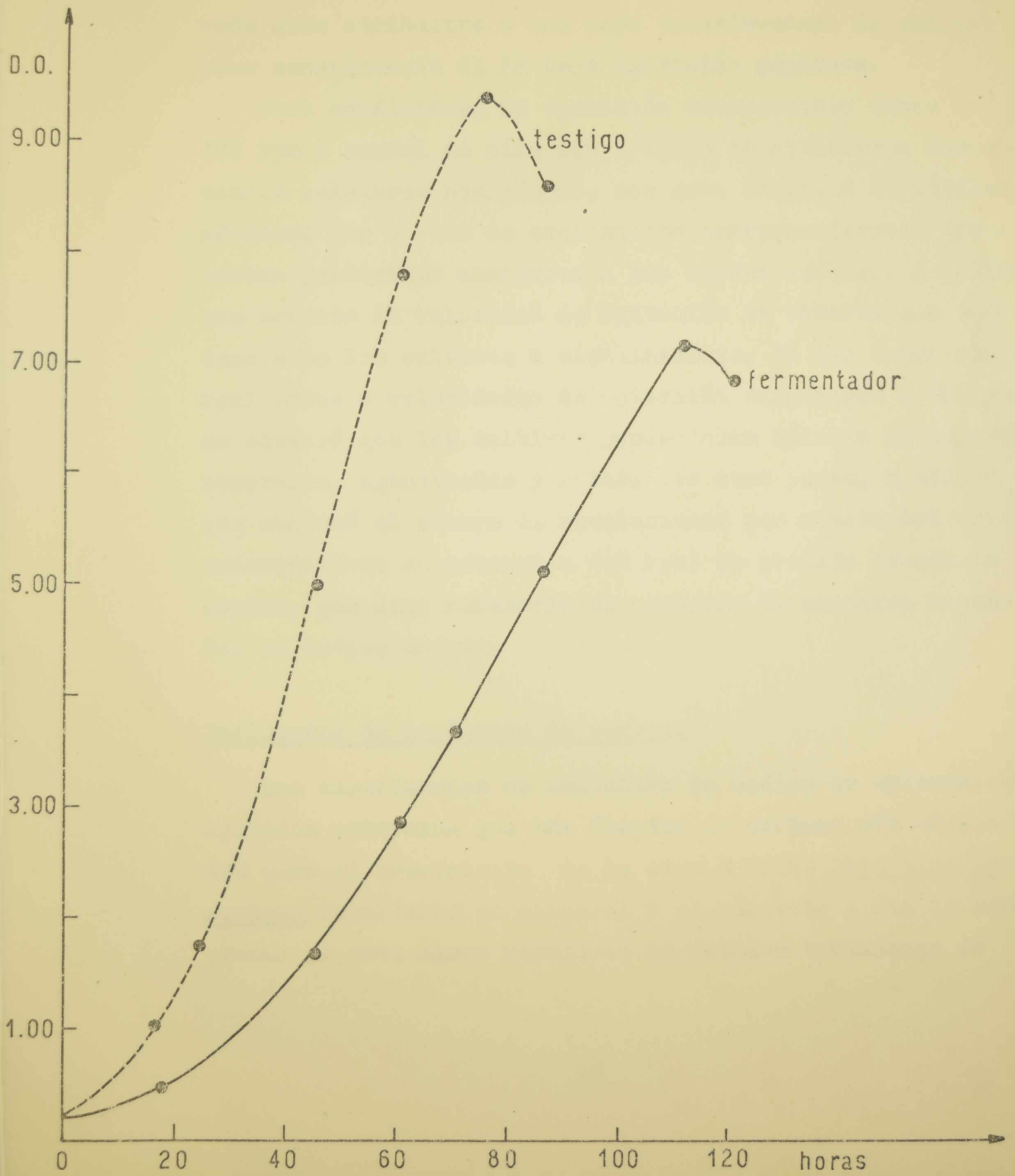
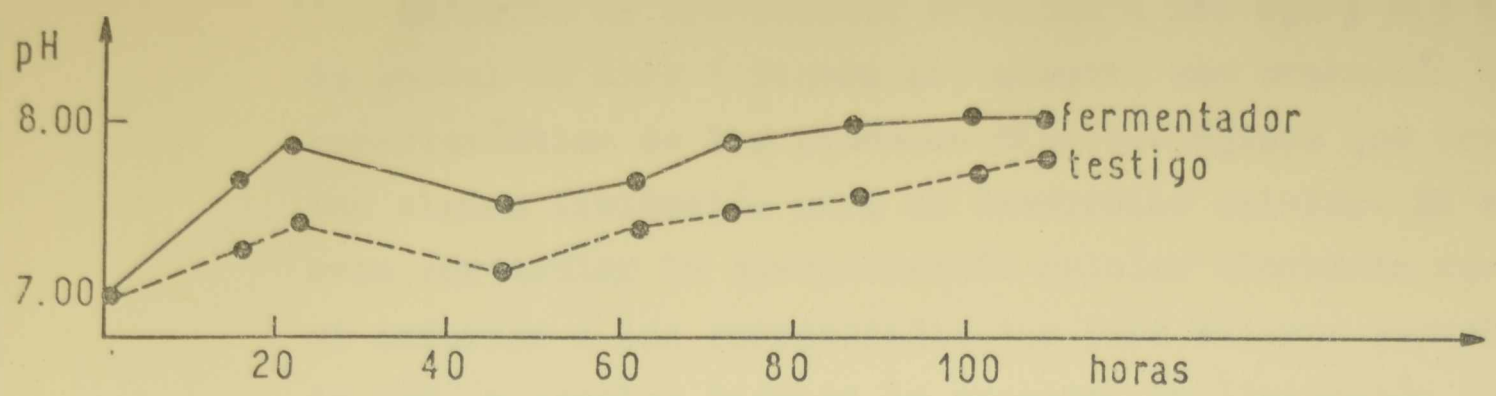


Fig.21. Evolución del crecimiento celular y pH. Desarrollo en fermentador: caudal de aire 0.5 V/V.min; velocidad de agitación 700 rpm. Desarrollo en erlenmeyers agitado. (testigo)

de pH en función de tiempo.

La curva de crecimiento obtenida a 100 rpm y 0,5 V/V.min de caudal de aire ( figura 16) muestra una evolución que es característica de los procesos microbiológicos que presentan alguna limitación para el desarrollo celular. En este caso particular la concentración celular alcanzada resultó inferior a las correspondientes para valores superiores de OAR, a iguales tiempos de proceso. La limitación observada debe atribuirse a una baja transferencia de oxígeno como consecuencia de la baja agitación empleada.

Para condiciones de operación comprendidas entre 200 y 400 rpm y caudal de aire 0,5 V/V.min se obtuvieron suspensiones celulares homogéneas, con gran cantidad de células móviles. Las curvas de crecimiento correspondientes presentan pendientes similares a las curvas testigo. A medida que aumenta la velocidad de agitación se observa una tendencia de los cultivos a alcalinizarse. En las experiencias realizadas a velocidades de agitación superiores a 400 rpm se observó que los cultivos presentaban células de aspecto aberrante, aglutinadas y rotas. Por otra parte, a medida que aumentó el número de revoluciones por minuto del agitador (valores superiores a 400 rpm) se produjo abundante espuma, que hizo necesario el agregado de excesiva cantidad de antiespumante.

#### Influencia de la fuente de carbono

Las experiencias de selección de medios en erlenmeyers agitados mostraron que las fuentes de carbono más adecuadas para el crecimiento de la cepa E 45 de Rhizobium japonicum resultaron el glicerol y el manitol. A fin de comprobar si este mismo resultado se obtiene trabajando en

fermentadores agitados se programaron esas mismas experiencias para las condiciones de operación seleccionadas.

En la figura 22 se observan los resultados obtenidos en procesos desarrollados al mismo tiempo en fermentadores y erlenmeyers testigos. Se vuelven a confirmar los resultados obtenidos anteriormente. Se obtiene en escala de fermentadores de laboratorio curvas de crecimiento que presentan diferencias similares a las observadas en escala de frascos agitados. Por otra parte, se observa nuevamente que los cultivos se diferencian en su aspecto, viscosidad y morfología celular. Las células cultivadas en manitol son de mayor tamaño, menos móviles, aparecen agrupadas y el medio posee mayor viscosidad. En cambio en los cultivos en los que se empleó glicerol el aspecto del cultivo es homogéneo, con gran cantidad de células móviles y el aumento de la viscosidad del medio no es apreciable. En las figuras 23 y 24 se puede apreciar el aspecto de cultivos de 60 horas de proceso, obtenidos en tanques de fermentación a 300 rpm y 0,5 V/V.min de caudal de aire.

#### Estudios sobre la influencia de algunos componentes del medio sobre la evolución del pH y crecimiento celular

Una vez determinadas las condiciones de operación en fermentadores de laboratorio, se programaron una serie de experiencias también en tanques agitados, donde se estudió, para condiciones de operación establecidas, en el rango de 400 rpm y 0,5 V/V.min de caudal de aire, la influencia de algunos componentes del medio sobre el crecimiento celular y evolución del pH. Los ensayos fueron efectuados empleando como medio base el medio balanceado; los componentes ensayados se indi-



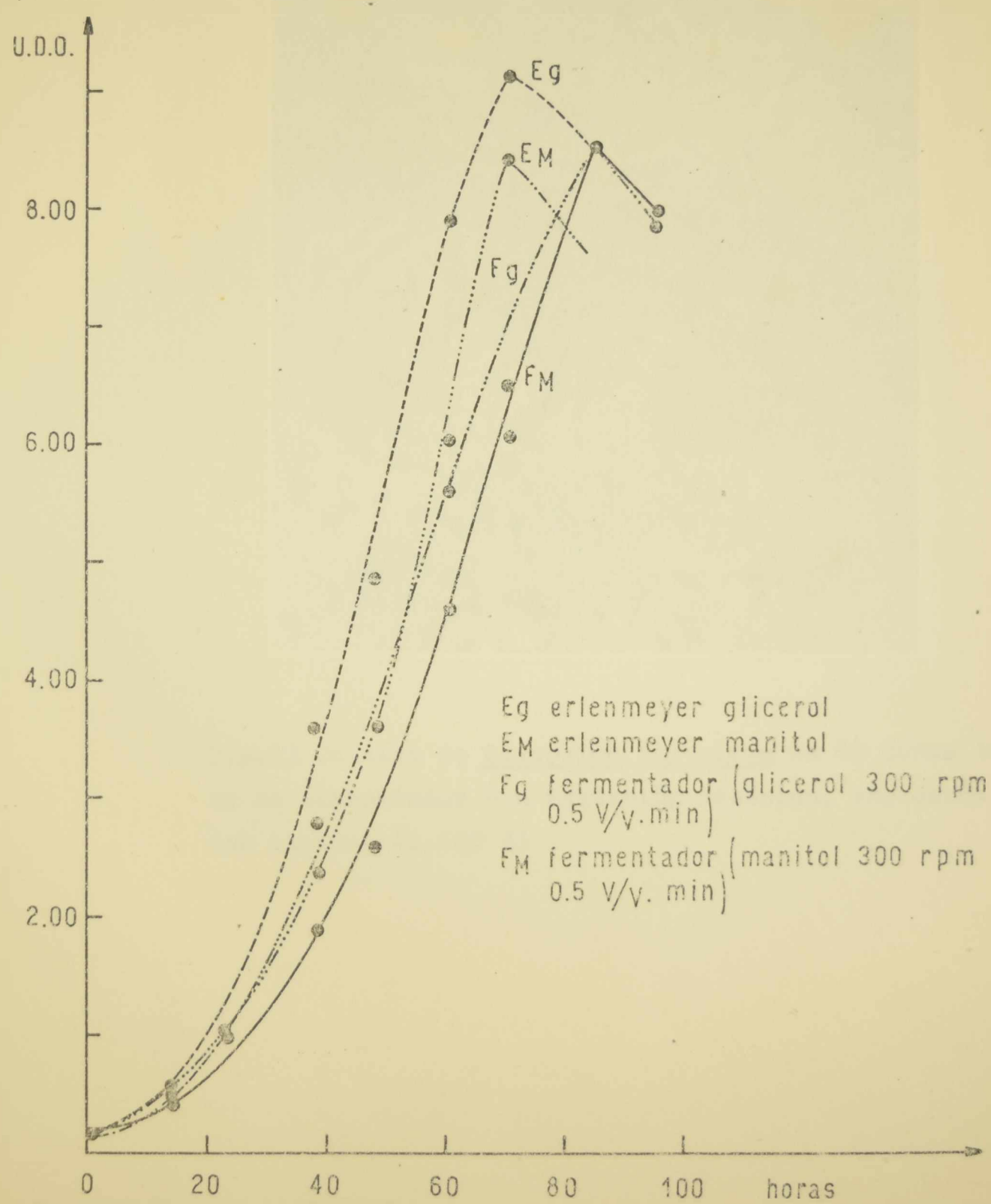
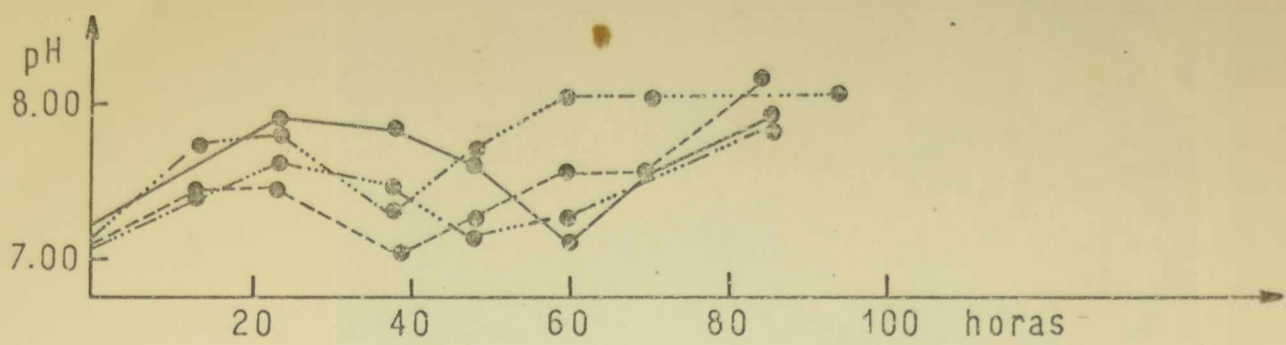


Fig.22. Estudio comparativo del crecimiento celular en erlenmeyers agitados y fermentadores de laboratorio empleando medio con manitol y glicerol.

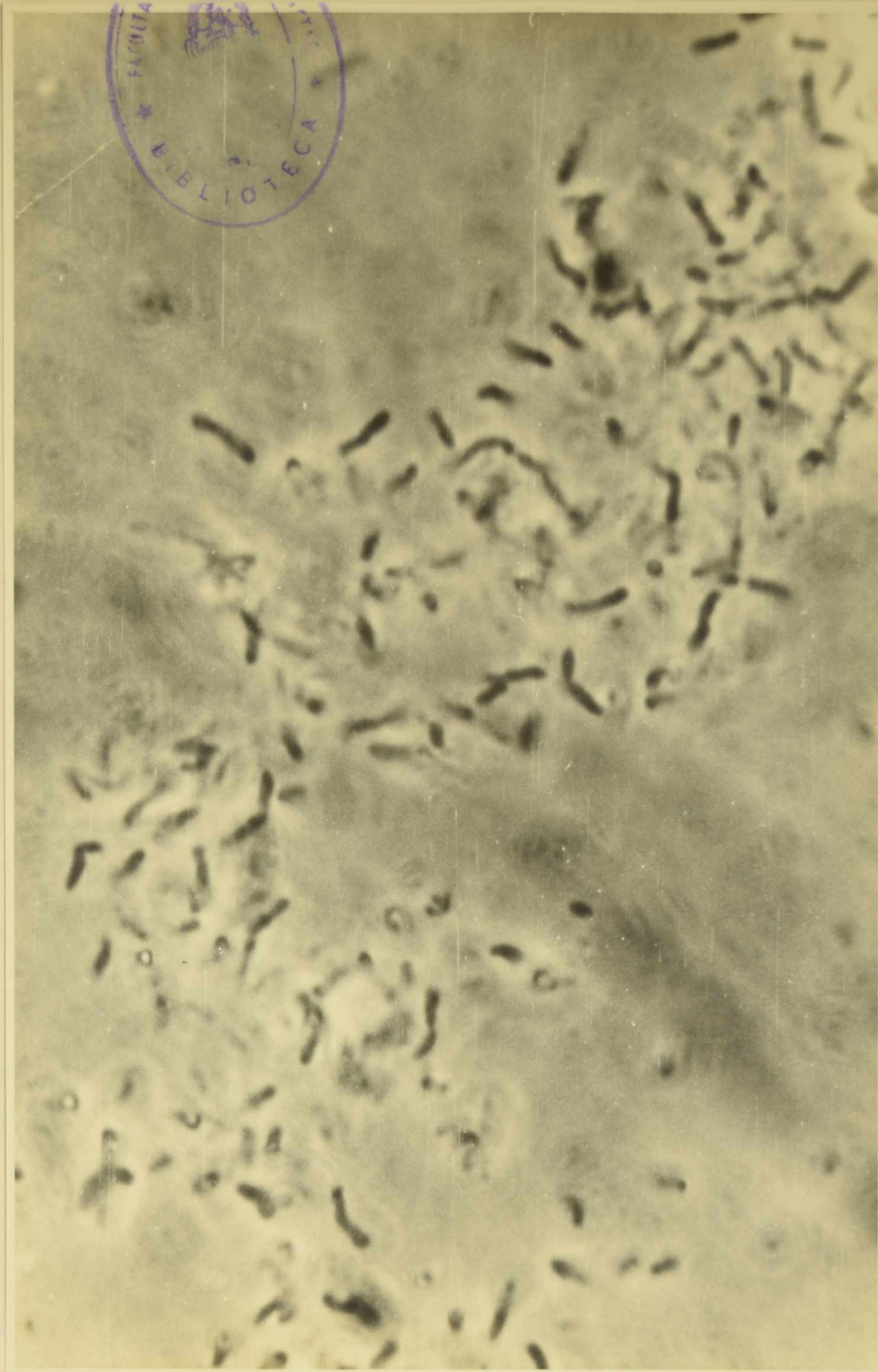


Fig.23 Cultivo de *Rhizobium japonicum* de 60 horas de proceso en fermentador con agitación mecánica, empleando medio con manitol (1.600 X)

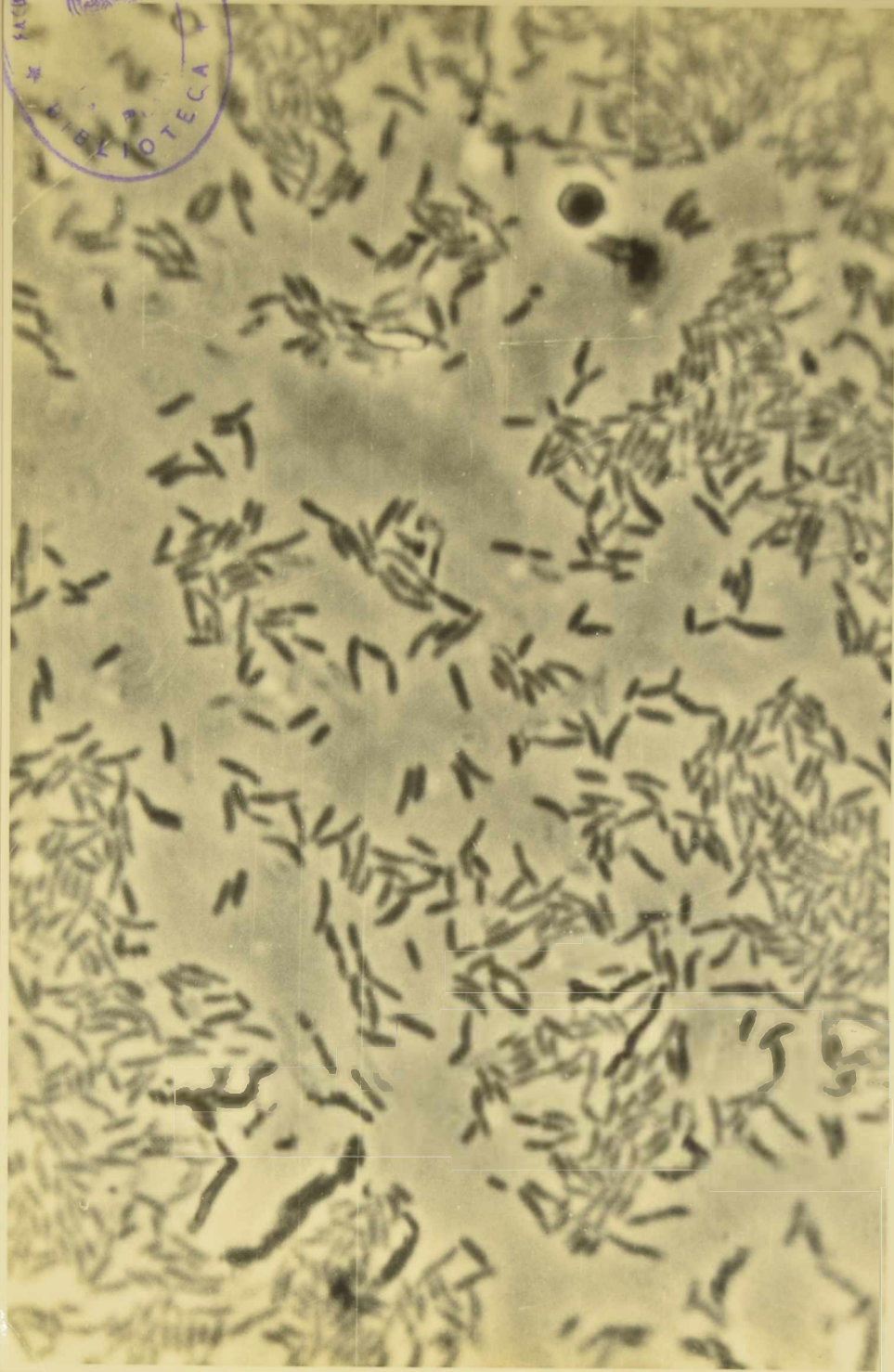


Fig.24 Cultivo de Rhizoglyphus japonicus de 60 horas de proceso en fermentador con agitación mecánica, empleando medio con glicerol. (1.600 X)



can en la tabla 10. Estas experiencias tuvieron como objeto ajustar definitivamente el medio para la obtención de cultivos de Rhizobium japonicum de modo que presenten la mayor concentración celular, menor tiempo de generación y una evolución de pH compatible con la obtención de microorganismos con alto poder de invasividad y alta capacidad de fijación de nitrógeno. En lo que respecta al pH, los caldos destinados a la impregnación de soportes deben presentar valores lo más cercanos posibles a la neutralidad, para asegurar una buena supervivencia del Rhizobium.

Los resultados obtenidos en esta serie de ensayos (figuras 25, 26, 27, 28 y 29) muestran que la modificación de la relación de sales nitrogenadas no produce cambios significativos en cuanto al tiempo de generación de la cepa y concentración celular alcanzada al final del proceso. Sin embargo, las curvas de pH presentan una evolución algo diferente, ya que existe un ligero desplazamiento hacia valores más cercanos a la neutralidad. Las experiencias realizadas con agregado periódico de extracto de levadura no muestran efectos favorables sobre el crecimiento celular, ya que las curvas obtenidas presentan un tiempo de generación mayor que el que corresponde al medio balanceado. En cambio, la curva de pH presenta una evolución semejante a la de los ensayos testigo. Además es interesante indicar que el agregado periódico de extracto de levadura produce abundante cantidad de espuma.

De los ensayos efectuados surge que las modificaciones realizadas no son significativas en cuanto a concentración celular alcanzada, tiempo de generación y evolución de pH.



Tabla 10. Composición de los medios de cultivo y condiciones de operación

Componentes	Fermentador				
	I	II	III	IV	V
$PO_4 HK_2$	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
$MnSO_4$ solución al 10%	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
$FeCl_3$ solución al 10%	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Glicerol	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
extracto de levadura Difco	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
$PO_3 K$	0,8	0,5	0,3	0,8	0,8
$PO_4 H(NH_4)_2$	0,5	0,5	0,3	0,3	0,3
agua destilada	1000	1000	1000	1000	1000
Caudal de aire V/V.minuto	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Agitación rpm	400	400	400	400	400

Fermentador I: la cantidad de nitrógeno proveniente de las sales nitrogenadas es igual a la del medio balanceado.

Fermentador III: se agregó solución de  $PO_4 H(NH_4)_2$  al 1% durante el proceso hasta completar 0,5 g/l

Fermentador IV: la composición del medio corresponde a la del medio balanceado.

Fermentador V: se le agregó extracto de levadura durante el proceso hasta completar 4 g/l

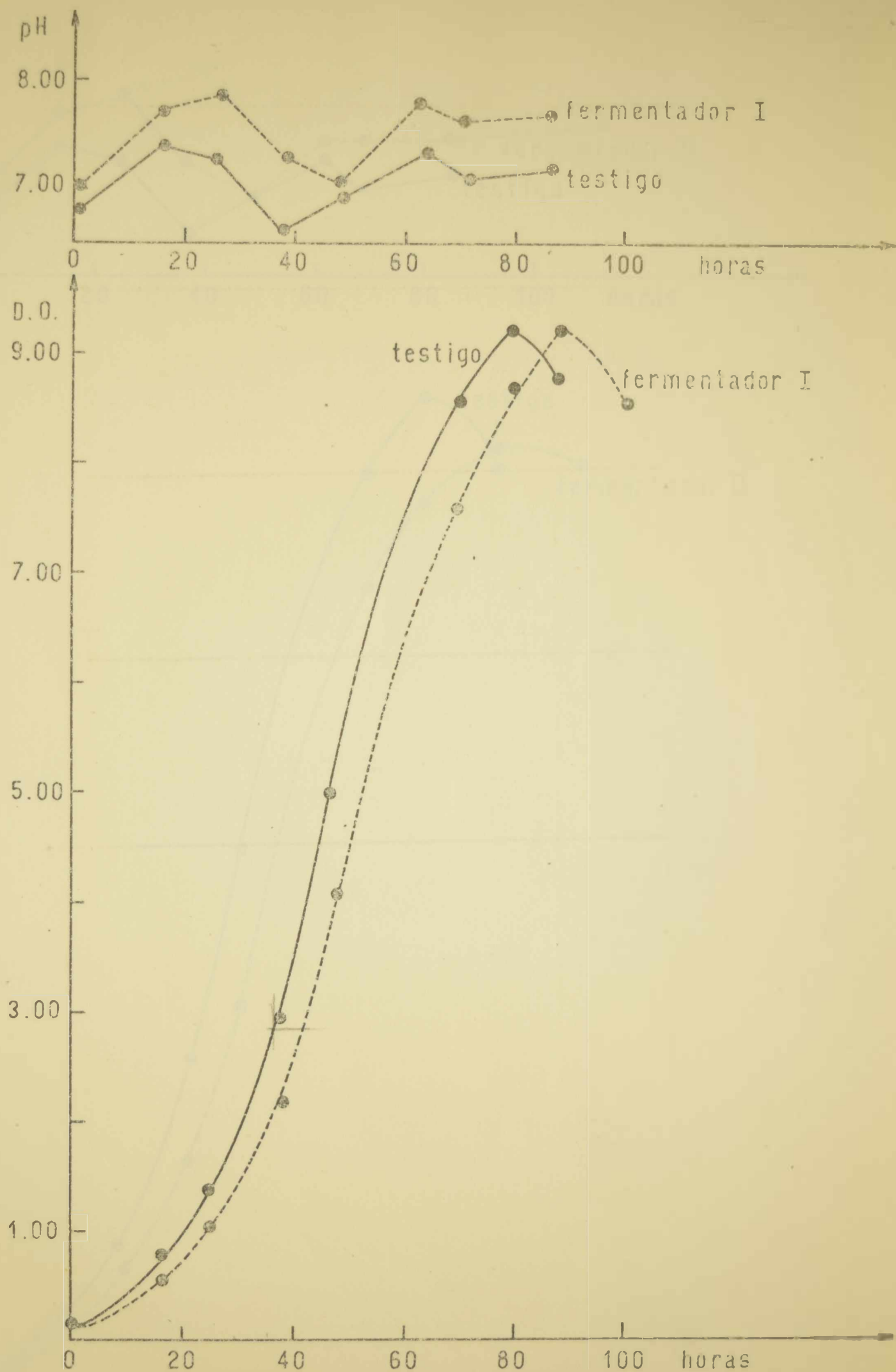


Fig.25. Fermentador I. Influencia de la concentración de fuentes nitrogenadas sobre el desarrollo del *Rhizobium japonicum* en fermentadores agitados mecánicamente.

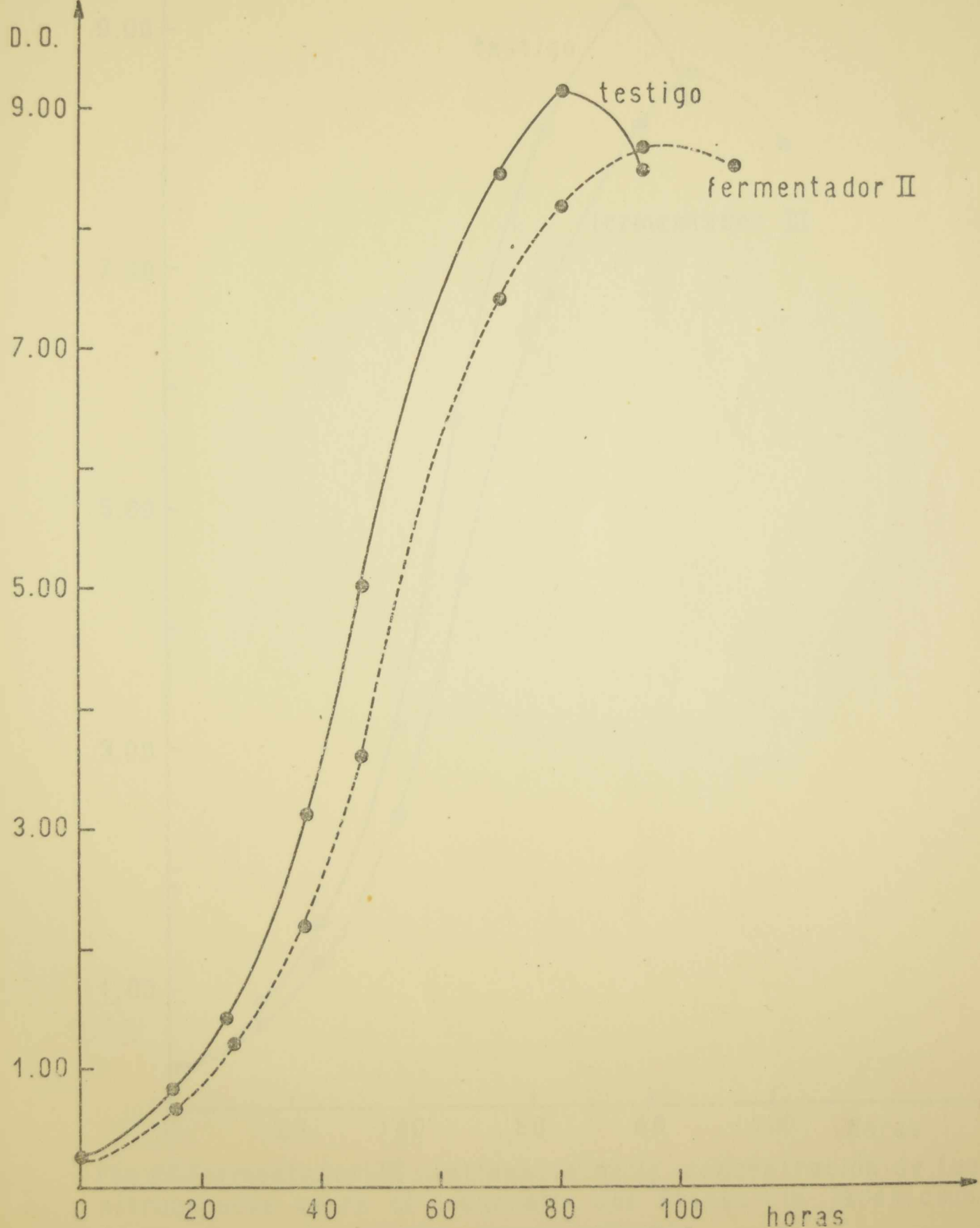
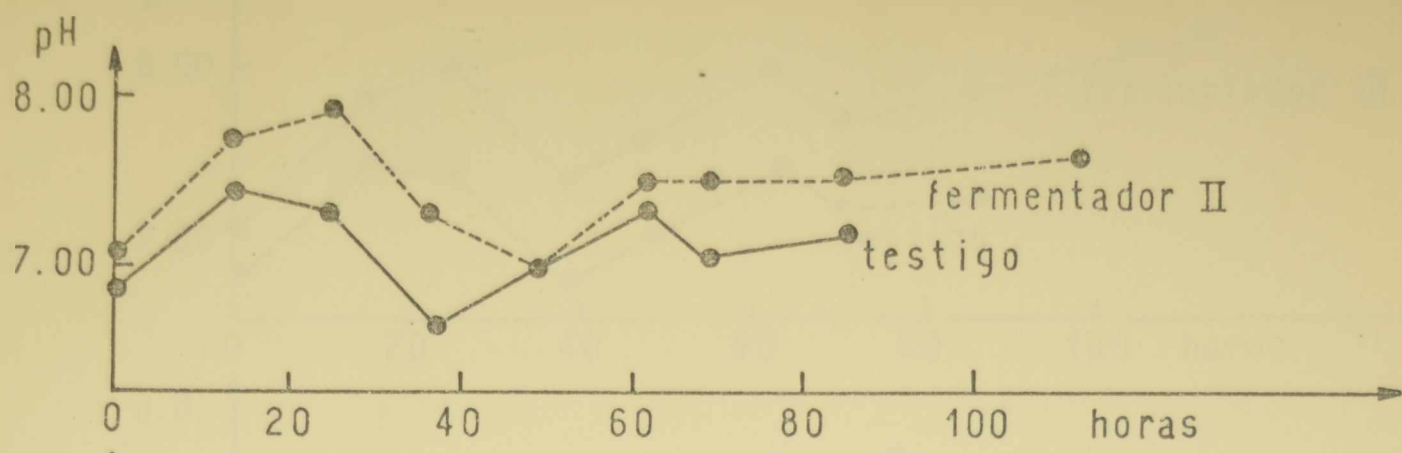


Fig.26. Fermentador II. Influencia de la concentración de fuentes nitrogenadas sobre el desarrollo del *Rhizobium japonicum* en fermentadores agitados mecánicamente.

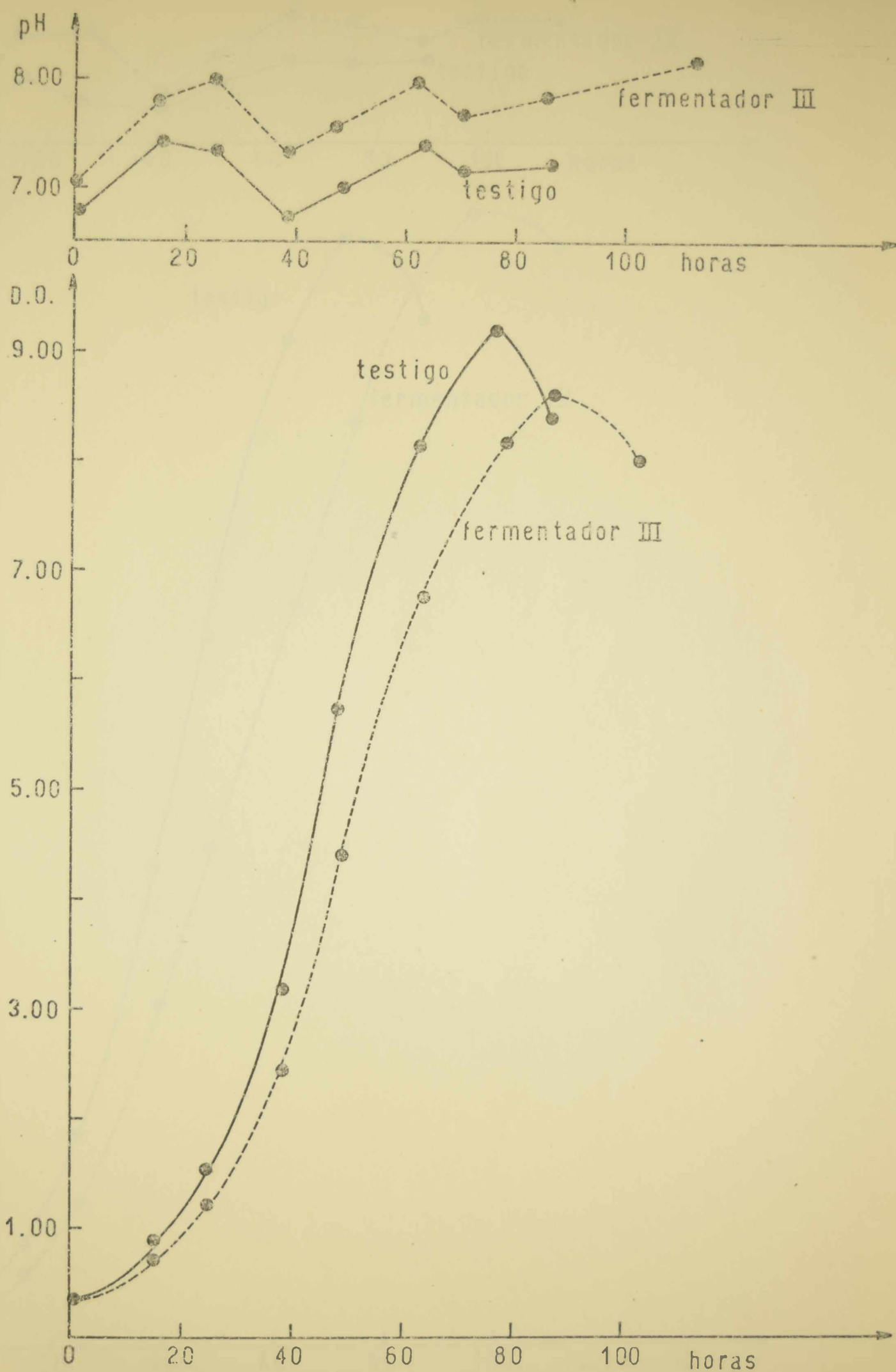


Fig.27.Fermentador III. Influencia de la concentración de fuentes nitrogenadas sobre el desarrollo del *Rhizobium japonicum* en fermentadores agitados mecánicamente.



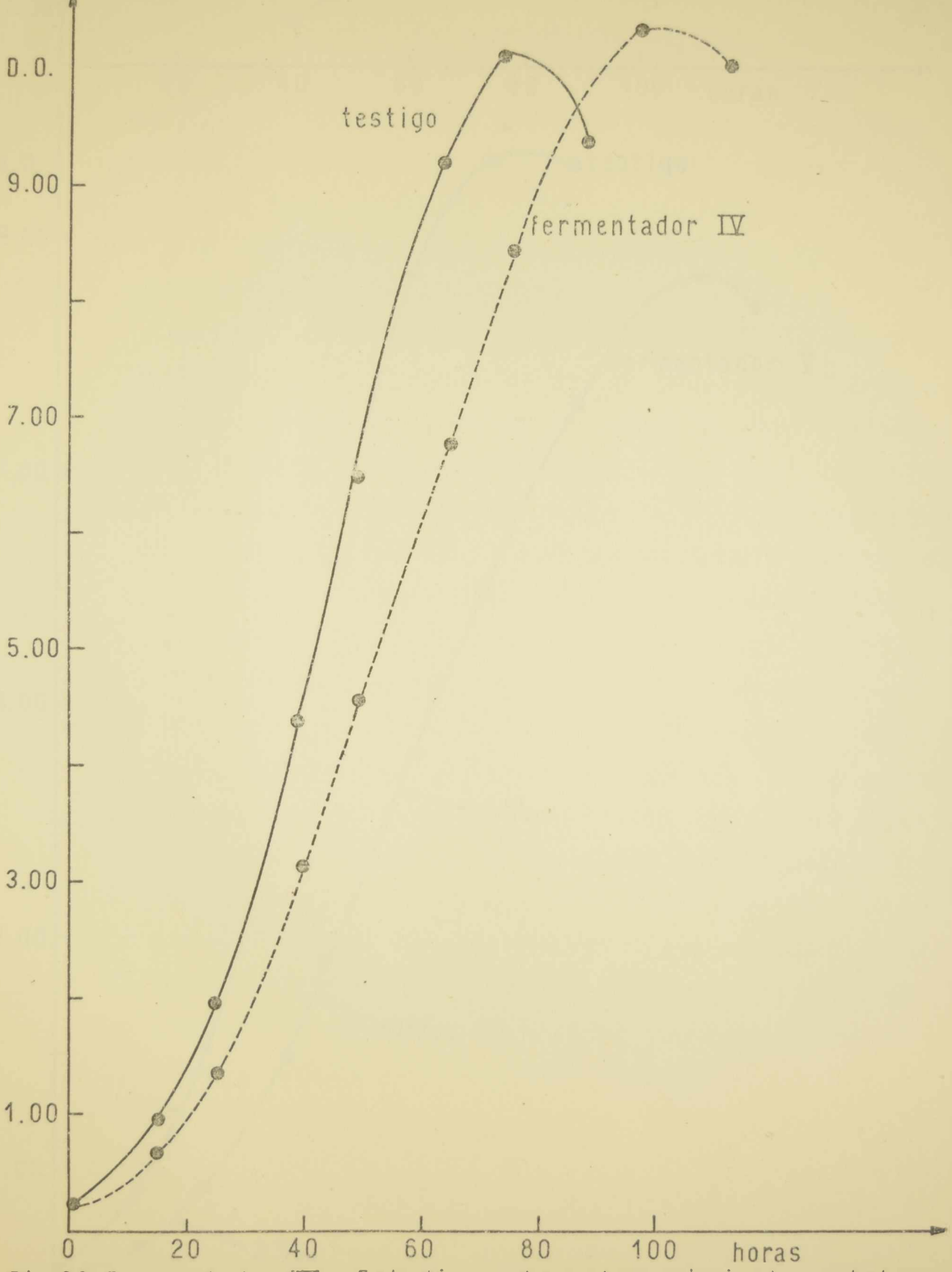
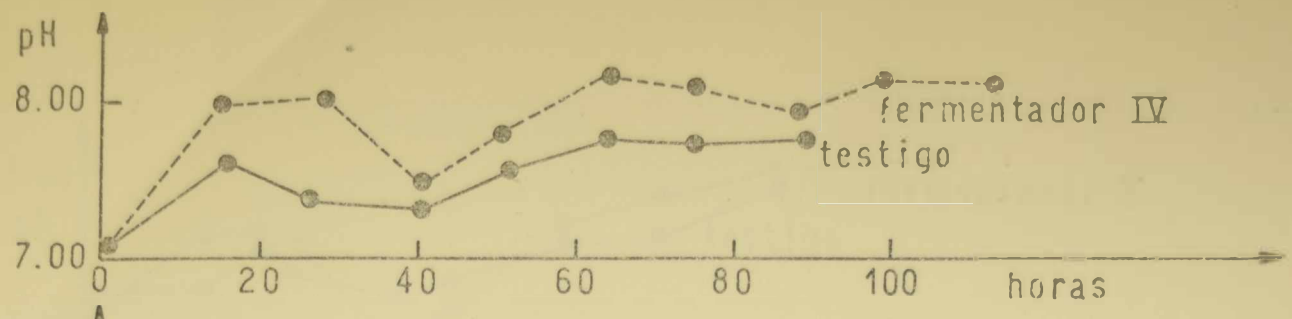


Fig.28.Fermentador IV. Estudios sobre el crecimiento celular en fermentadores agitados empleando el medio balanceado.

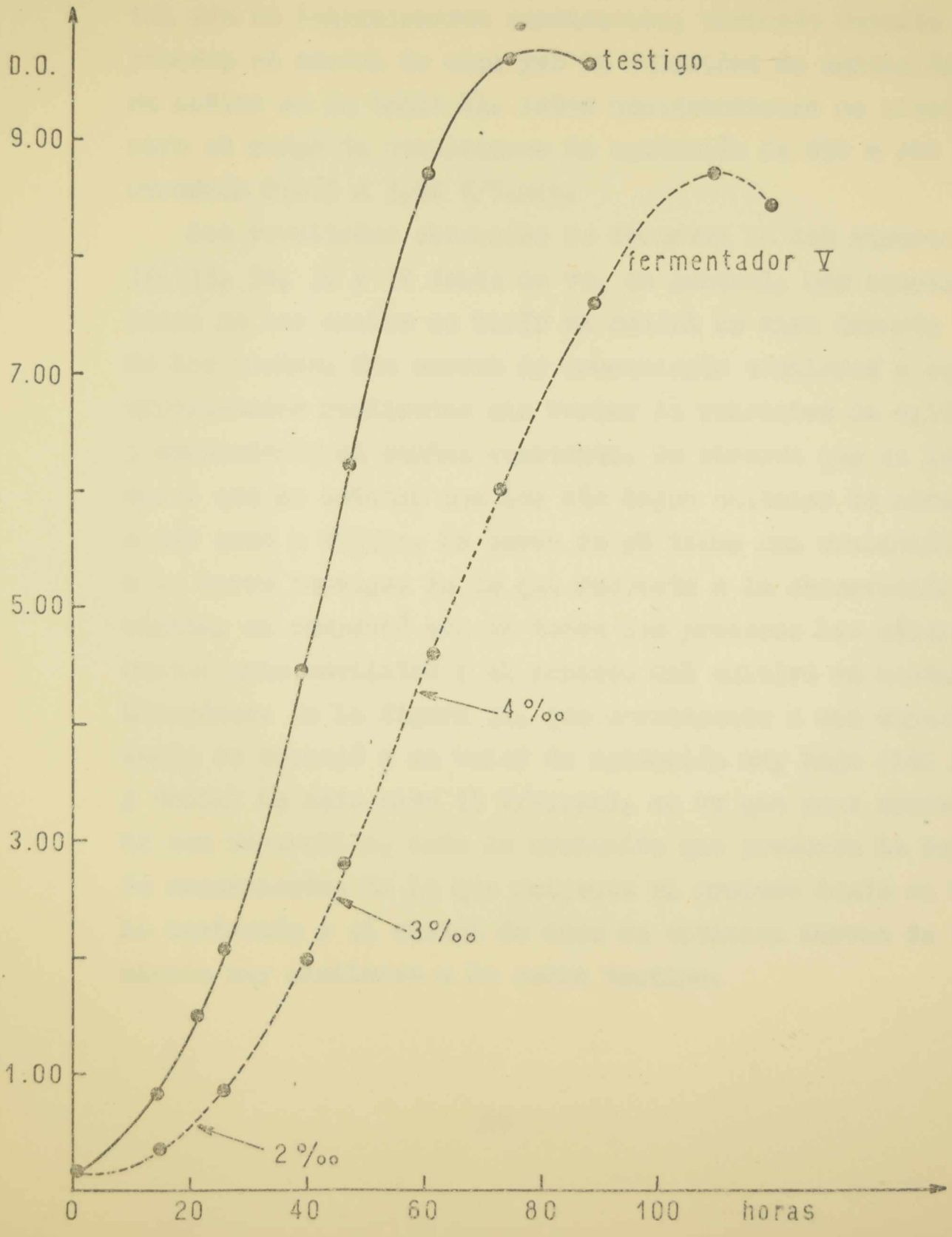
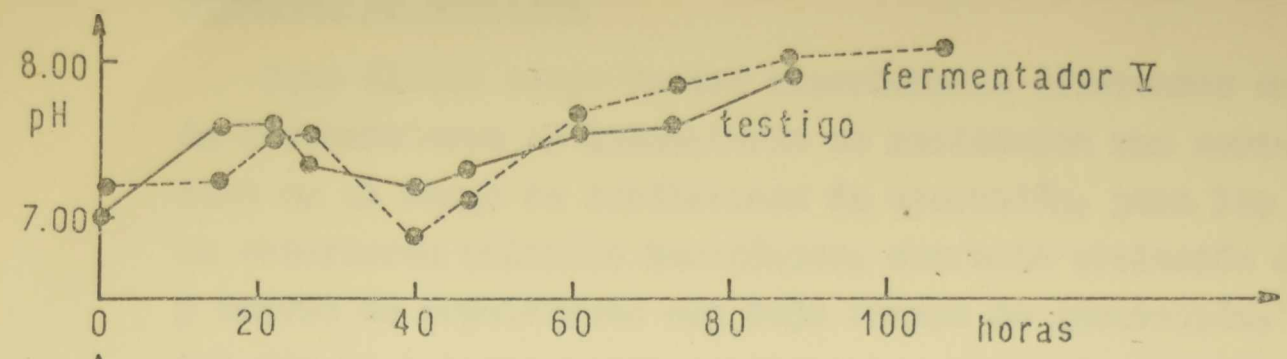


Fig.29. fermentador V. Influencia del agregado gradual de extracto de levadura sobre el crecimiento celular.

## Estudios de aeración

Como última etapa de las experiencias efectuadas en escala de fermentadores de laboratorio se realizaron una serie de experiencias en el rango de condiciones de operación, para las cuales se obtuvieron cultivos homogéneos, correcta evolución del pH y curvas de crecimiento con bajo tiempo de generación. Para tal fin se seleccionaron condiciones, variando durante el proceso el caudal de aire y/o la velocidad de agitación, según se indica en la tabla 11. Estas modificaciones se efectuaron para el rango de condiciones de agitación de 250 a 400 rpm y aeración 0,125 a 3,00 V/V.min.

Los resultados obtenidos se observan en las figuras 30, 31, 32, 33, 34, 35 y 36 donde se ve, en general, que aquellos procesos en los cuales se varía el caudal de aire durante el curso de los mismos, dan curvas de crecimiento similares a aquellas experiencias realizadas sin variar la velocidad de agitación y manteniendo el caudal constante. Se observa que en los procesos que se inician con los más bajos caudales de aire, tanto a 250 como a 275rpm, la curva de pH tiene una evolución similar a la curva testigo. En lo que respecta a la observación microscópica, se comprobó que en todos los procesos las células presentan gran movilidad y el aspecto del cultivo se mantiene homogéneo. En la figura 31, que corresponde a una experiencia donde se trabajó a un valor de agitación muy bajo (140 rpm) y caudal de aire alto (3 V/V.min), se ve que esas condiciones no son favorables, dada la evolución que presenta la curva de crecimiento. En lo que respecta al proceso donde se varía la agitación y el caudal de aire se obtienen curvas de crecimiento muy similares a la curva testigo.

Como corolario de estas investigaciones se puede afirmar que, empleando fermentadores con agitación mecánica es posible variar la velocidad de agitación y los volúmenes de aire durante el proceso, con lo que se llegan a obtener rendimientos celulares y evolución del pH similares a los obtenidos a caudal constante. Estas modificaciones que son posibles de aplicar durante el proceso se traducen, desde el punto de vista tecnológico, en ahorro de energía lo que permite la disminución de los costos de operación.



Tabla 11

Condiciones de operación

Ensayo	Hora de proceso	Agitación rpm	Caudal de aire V/V.min
I	0 - 25	250	0,125
	25 - 40	250	0,250
	40 - fin	250	0,500
II	0 - 25	250	0,250
	25 - 40	250	0,500
	40 - fin	250	0,750
III	0 - fin	250	0,500
IV	0 - 20	275	0,125
	20 - 25	275	0,250
	25 - 35	275	0,500
	35 - fin	275	0,750
V	0 - fin	275	0,500
VI	0 - fin	140	3,000
VII	0 - 25	200	0,250
	25 - fin	400	0,500

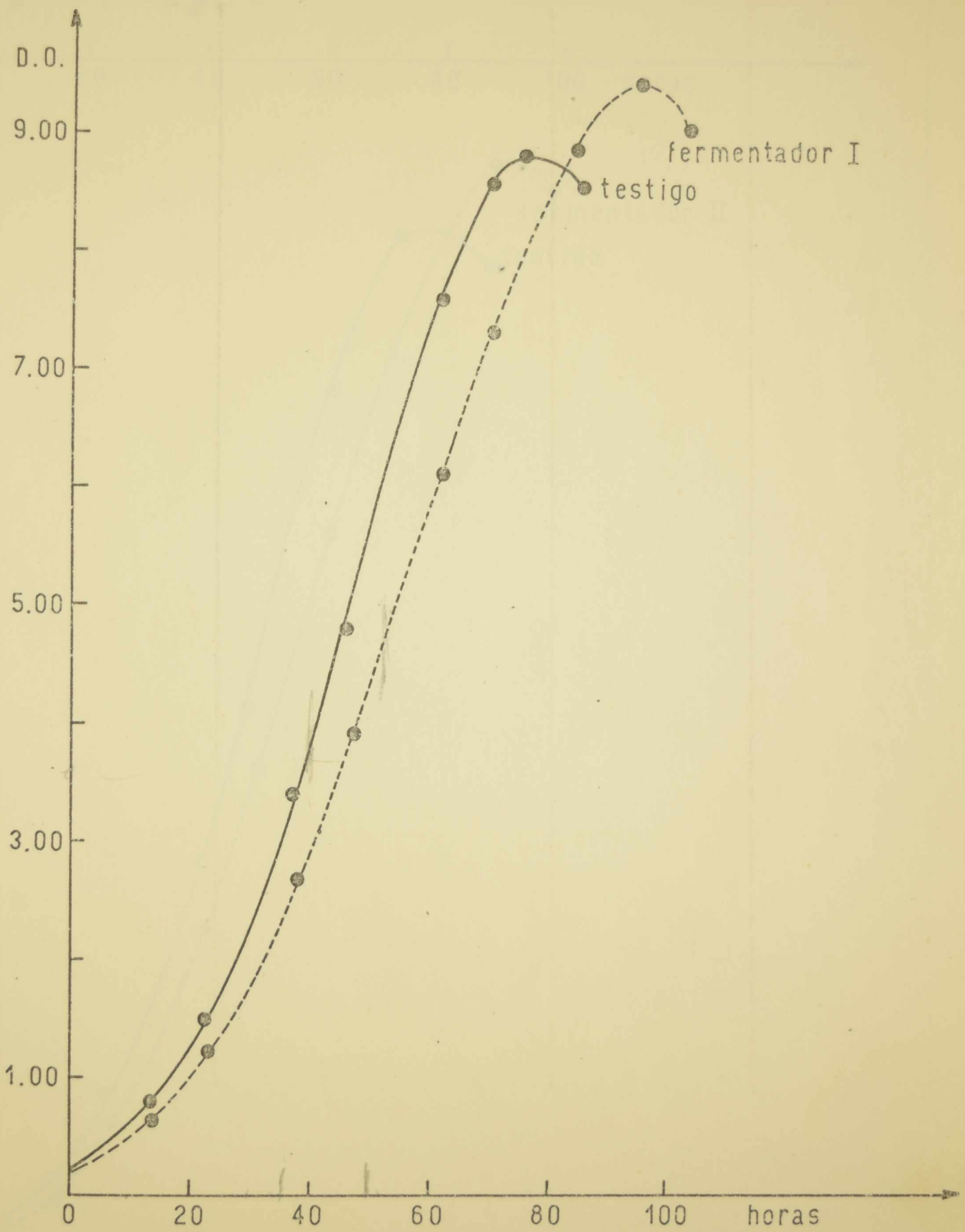
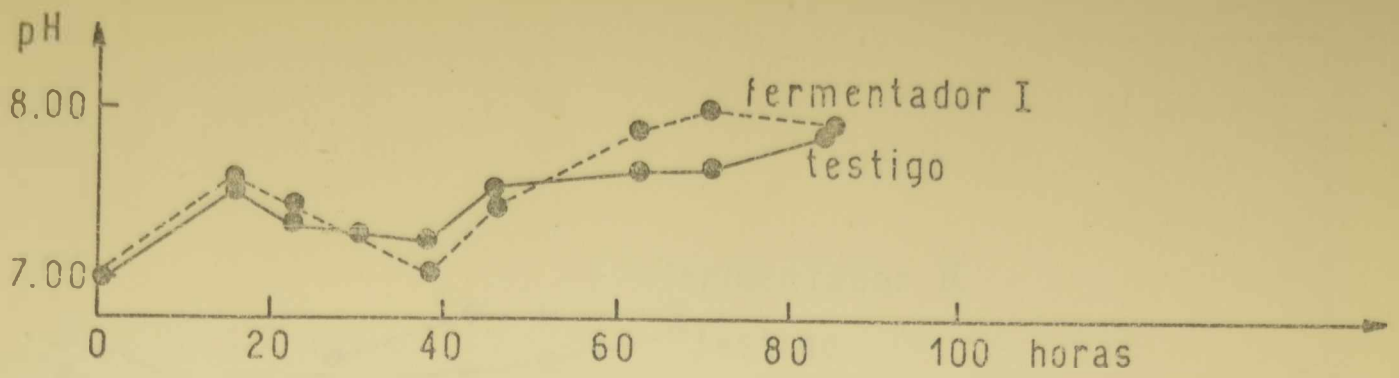


Fig.30. Estudios sobre aeración.

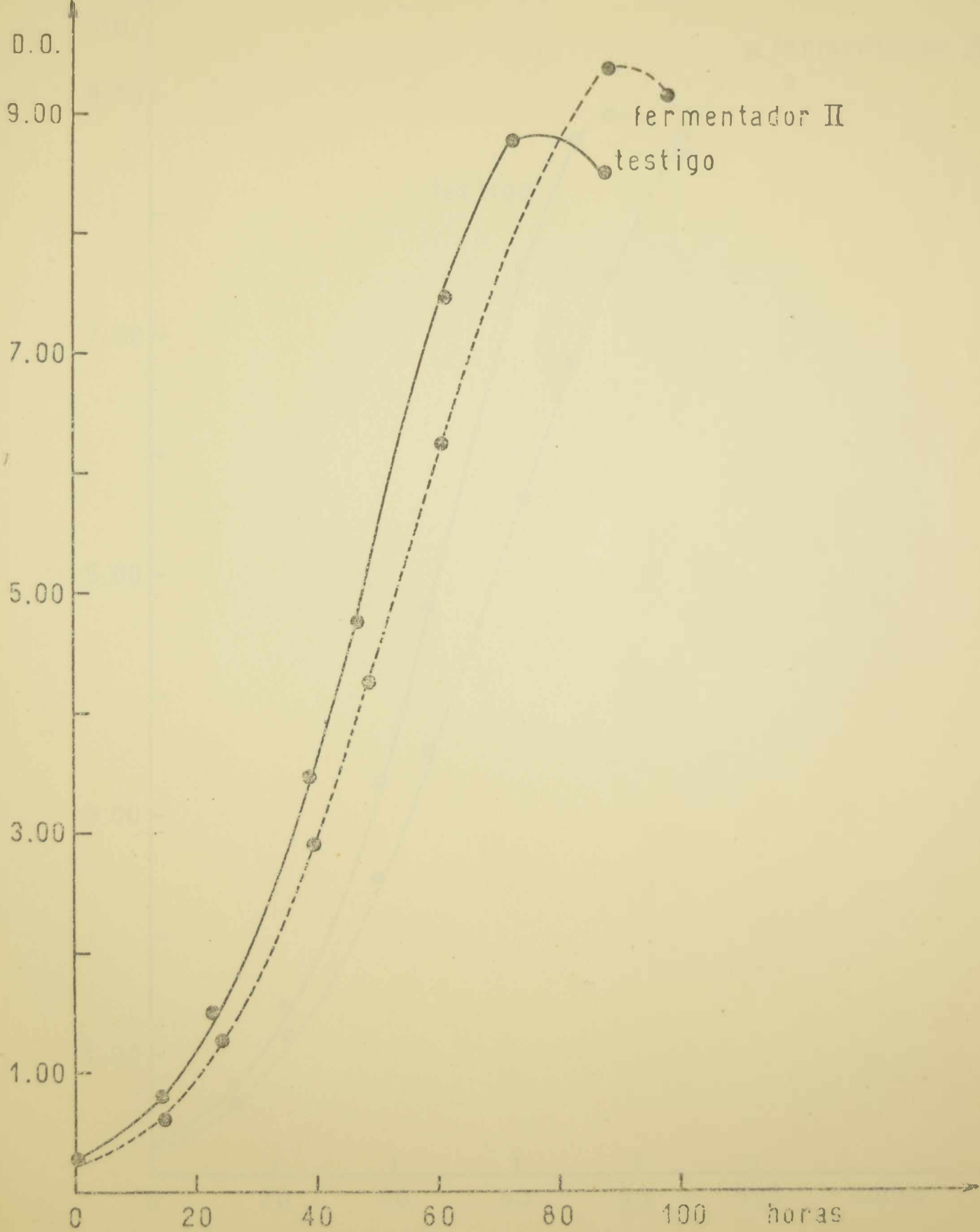
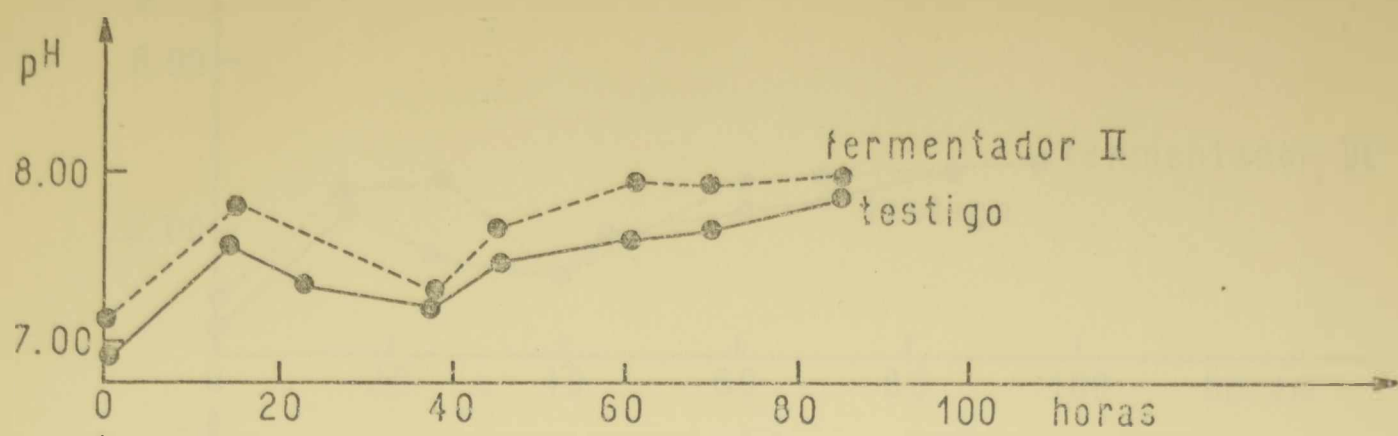


Fig.31. Estudios sobre aeración.

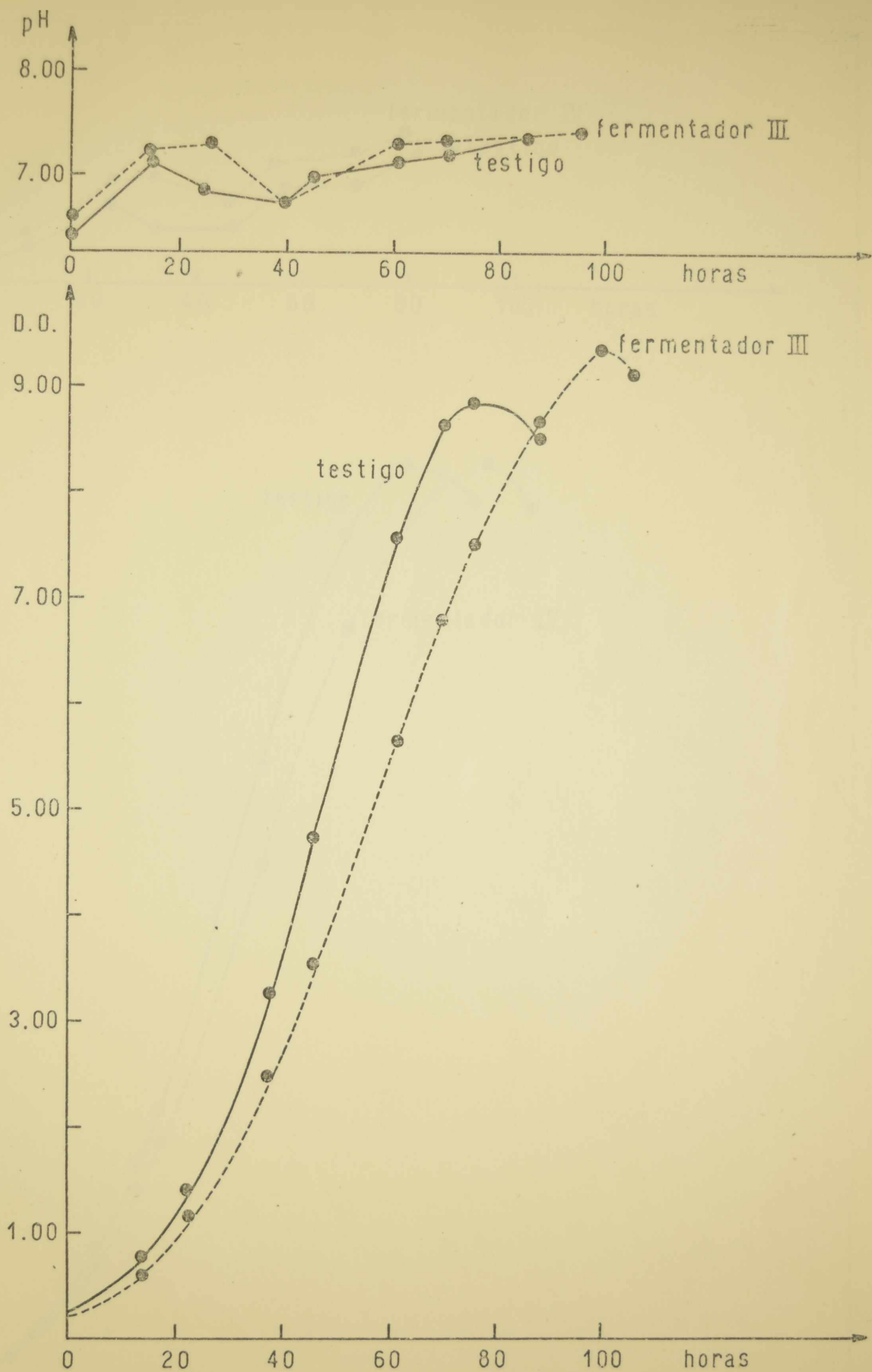


Fig.32. Estudios sobre aeración.



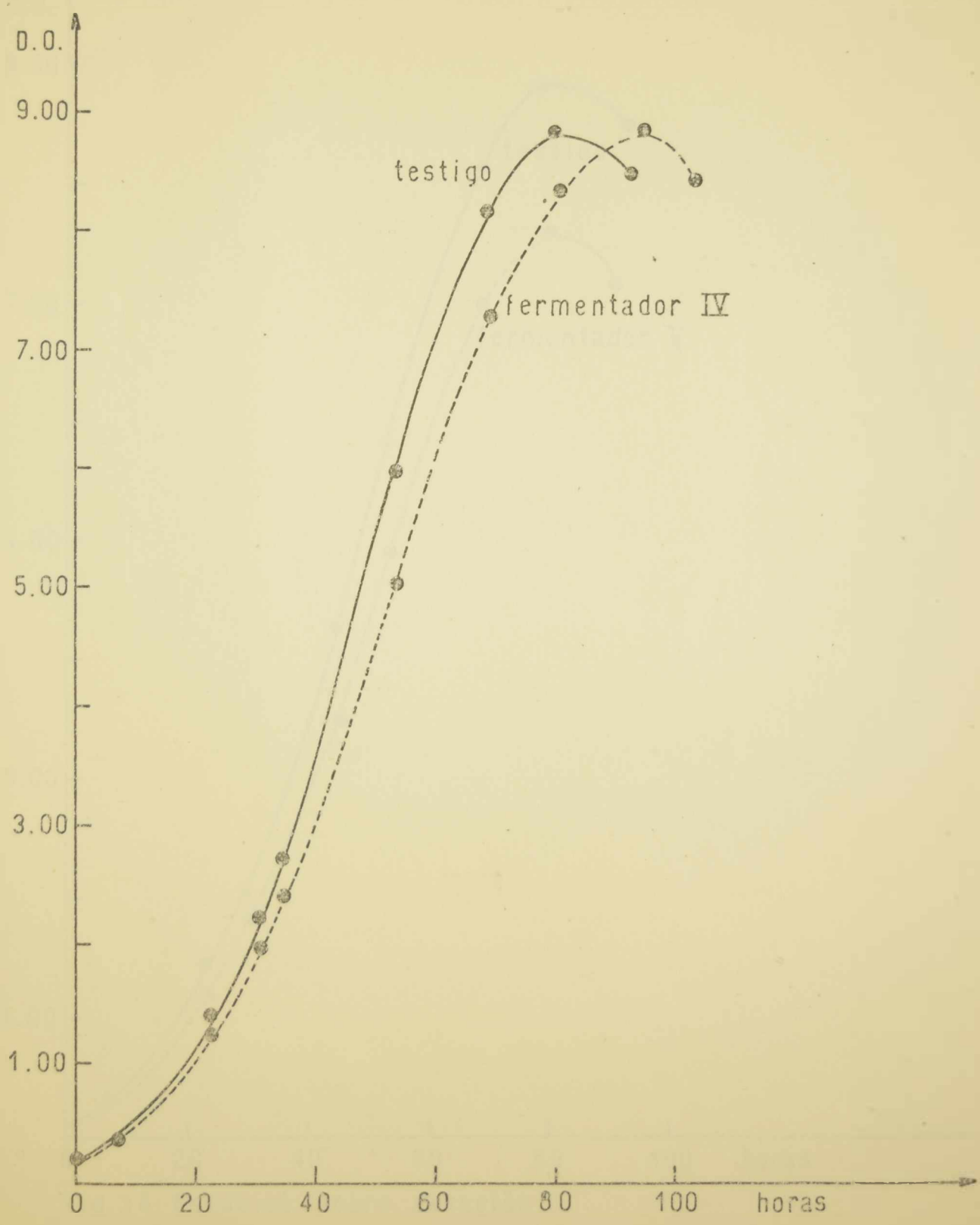
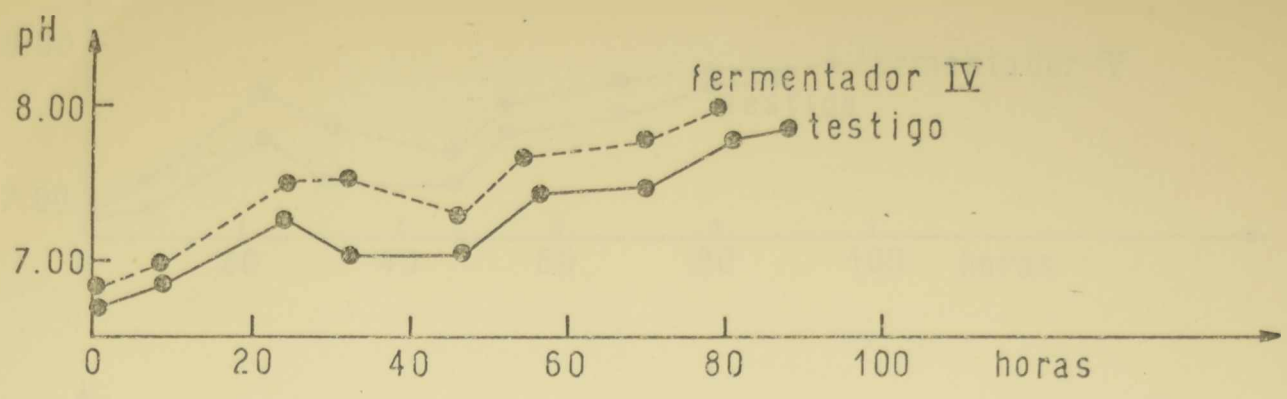


Fig. 33. Estudios sobre aeración.

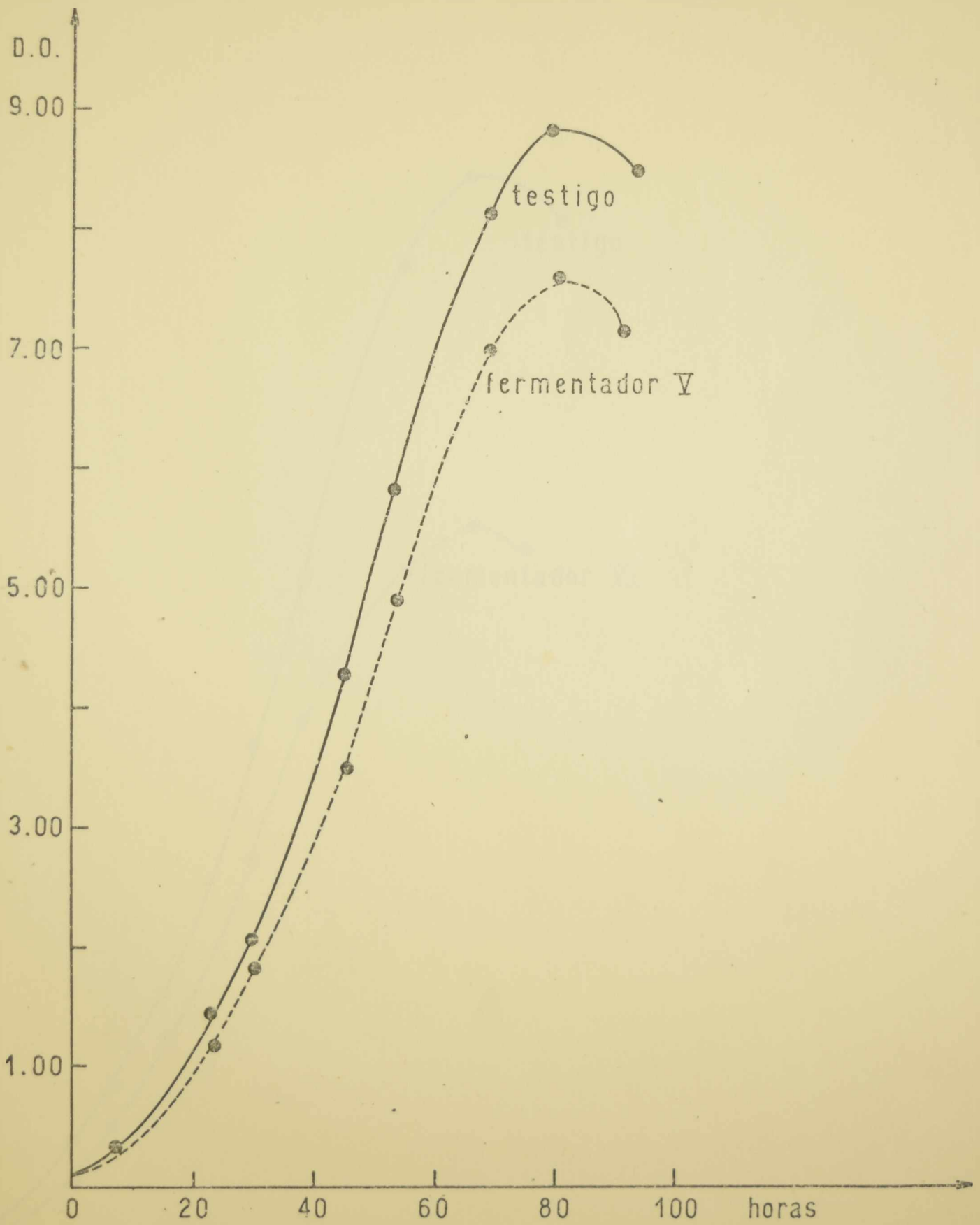
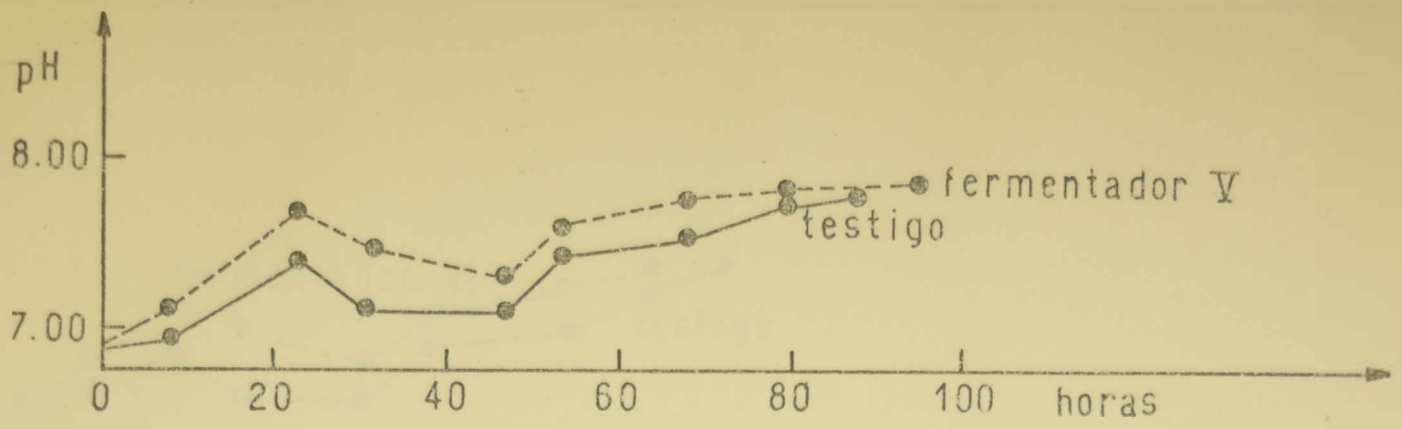


Fig. 34. Estudios sobre aeración.

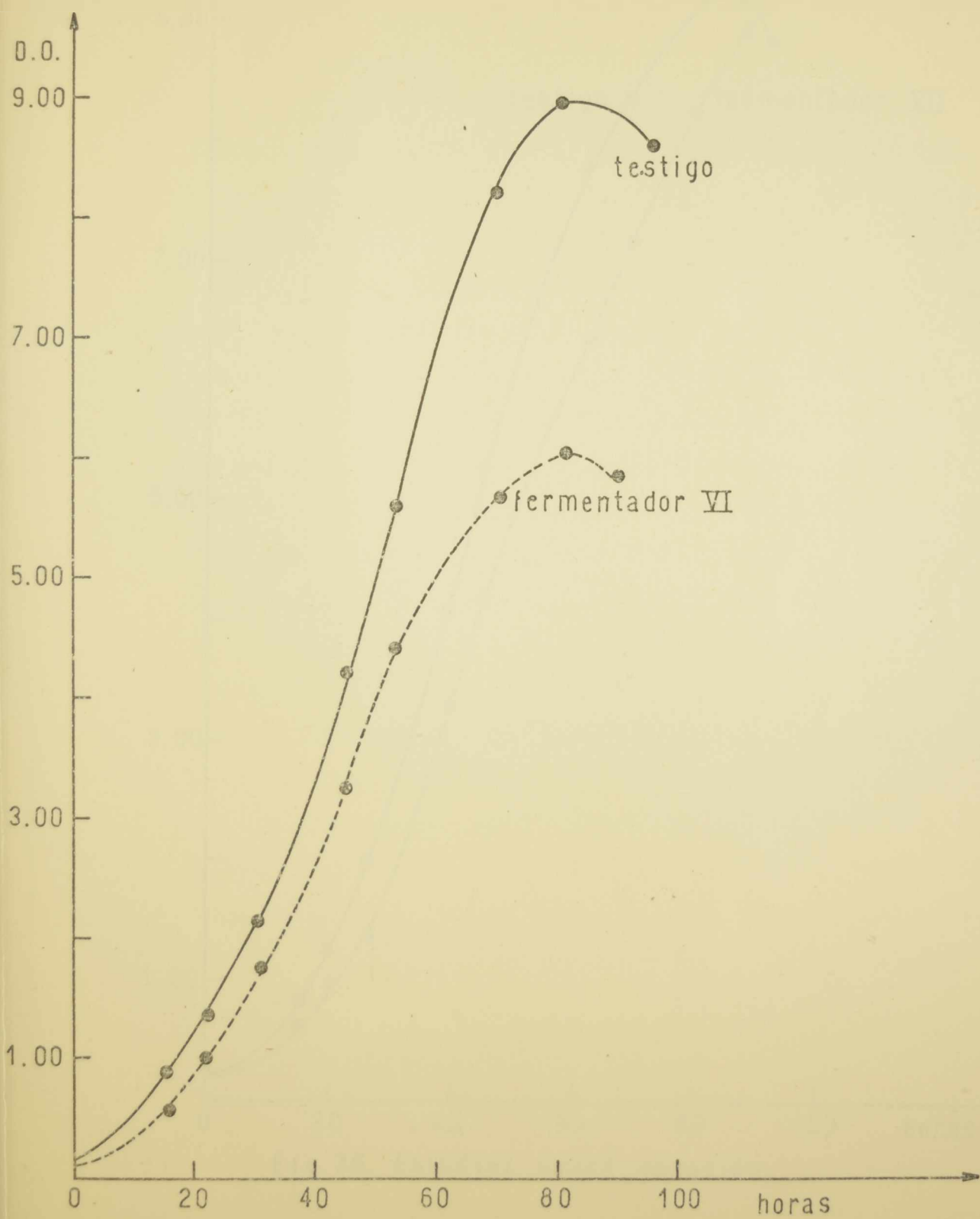
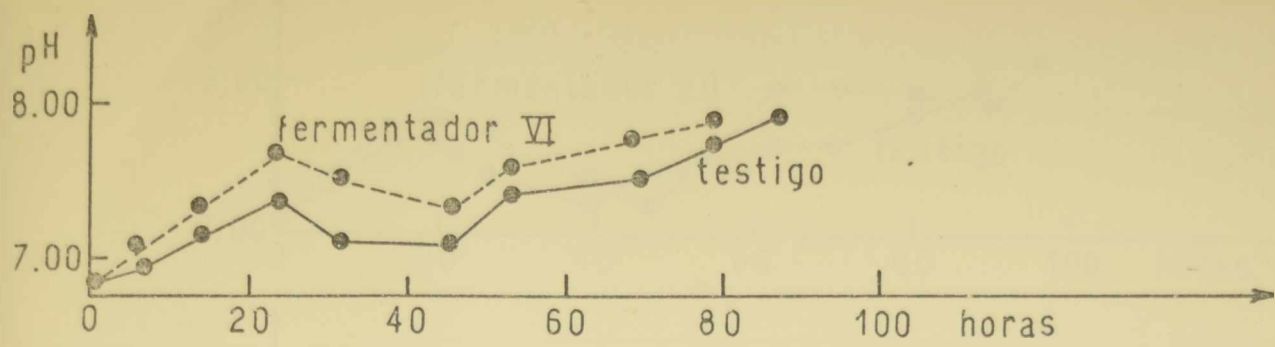


Fig.35. Estudios sobre aeración.

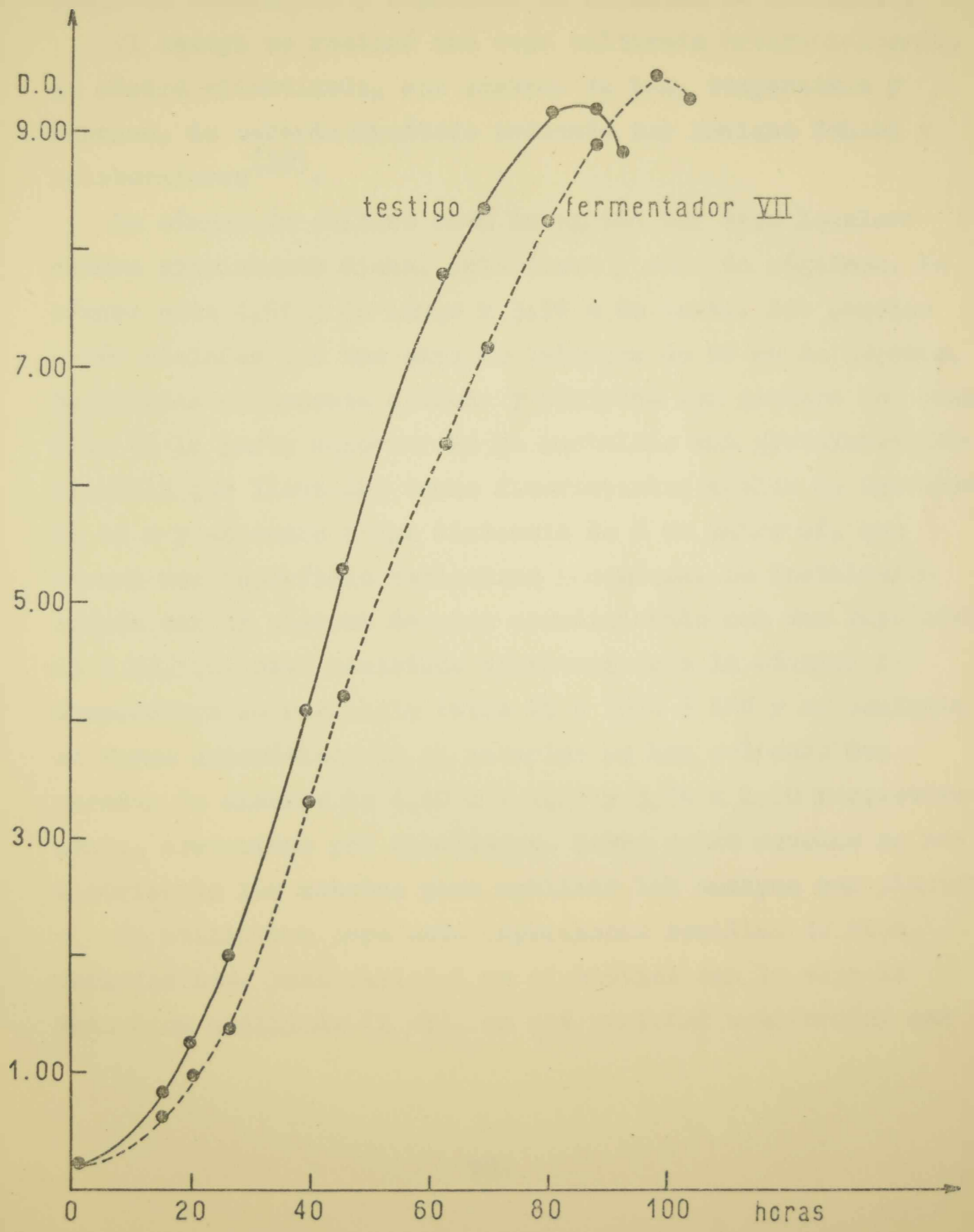
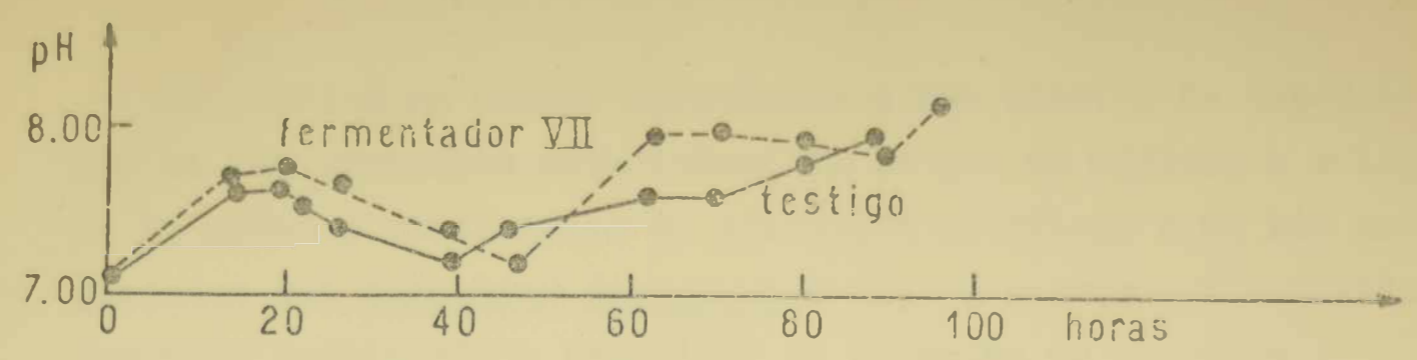


Fig.36. Estudios sobre aeración.



## ENSAYO AGRONÓMICO

Se realizó un ensayo agronómico a los efectos de determinar si las variables estudiadas, en lo que se refiere a balance de medio y condiciones de operación modifican o no las propiedades del Rhizobium japonicum E 45, en cuanto a invasividad, poder de nodulación y capacidad de fijación de nitrógeno.

El ensayo se realizó con soja cultivada artificialmente, en cámara climatizada, con control de luz, temperatura y humedad, de acuerdo al método indicado por Enrique Schiel y colaboradores (39).

La cámara de cultivo está integrada por tres locales: cámara propiamente dicha, antecámara y sala de máquinas. La cámara mide 4,50 m de largo x 3,50 m de ancho. Las paredes están aisladas por una capa de telgopor de 50 mm de espesor, terminadas en cemento alisado y pintadas con pintura de aluminio. En la parte superior se ha instalado una plataforma desplazable que lleva 102 tubos fluorescentes Grolux de Sylvania, de 40 w y ubicados a una distancia de 5 cm entre sí, que forman una superficie reflectora homogénea. La instalación cuenta con un sistema de aire acondicionado con una capacidad de 5 HP, que está conectado directamente a la cámara; la temperatura es regulable entre 15 y 35°C  $\pm$  1°C y se controla en forma automática. En el interior se han colocado dos mesadas de alambre de 4,40 m x 1,20 y 3,70 x 1,20 respectivamente, sostenidas por caballetes. Sobre estas mesadas se han distribuido las macetas para realizar los ensayos con plantas.

Se utilizaron para esta experiencia semillas de soja, variedad Lee. Esta variedad es simbiótica con la cepa de Rhizobium utilizada (E 45), es una variedad semitardía, con

un período de nacimiento - floración aproximadamente de 43 días, si la siembra se realiza en el mes de enero en la provincia de Bs As. (40).

Las condiciones climáticas de la cámara de cultivo se ajustaron de acuerdo al estudio realizado por el Ing. Antonio Pascale y colaboradores (40), para un ensayo de 45 a 50 días de duración, desde la siembra hasta la floración, lo que corresponde a una siembra en el mes de enero (12 -I) y floración en los primeros días de marzo (1 - III) (48 días en total), en la Pcia. de Bs.As.

Se promediaron los datos sobre horas de luz y acumulación de temperaturas para ese período del año en la Pcia. de Bs.As., de acuerdo a los cuales se estableció para el ensayo 13 horas diarias de luz, 28°C de temperatura durante el día y 18°C durante la noche, y una humedad de 70 a 80 % durante el día y 90 a 95 % durante la noche. Una vez fijadas estas variables fueron controladas automáticamente durante todo el ensayo.

El cultivo se realizó en forma hidropónica, utilizando como soporte vermiculita dorada tipo VD 2, lavada, y como recipientes para plantas macetas de barro cocido de 18,5 cm de altura y 7 cm de diámetro interno en el fondo y 9,5 cm en la boca, y orificio basal pequeño. Las macetas se han apoyado en recipientes de plástico, individuales, de 10 cm de diámetro y 5 cm de altura, adecuados al sistema de sub-irrigación. El riego se realizó en forma individual en cada maceta, con el objeto de evitar contaminaciones entre los distintos tratamientos. Durante todo el ensayo se utilizó una solución de riego hidropónico, carente de nitrógeno cuya composición se indica en la tabla 12.

Tabla 12

Composición de la solución utilizada para riego

Micronutrientes

$\text{Cl}_2\text{Co}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,6	g
$\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,4	g
$\text{Cl}_2\text{Mn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16,2	g
$\text{BO}_3\text{H}_3$	12,6	g
$\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3,4	g
$\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	18,0	g
$\text{MoO}_4\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,6	g

Macronutrientes

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	225	g
$\text{CaSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	95	g
$\text{K}_2\text{SO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	155	g
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	125	g

La mezcla de macronutrientes, 600 g en total, se mezclan con 472 mg de la mezcla de micronutrientes. El agua empleada en el riego lleva 2,8 g de la mezcla final de componentes sólidos por litro de agua destilada.

Para preparar la solución de riego se agregaron al agua destilada los macronutrientes en forma de sales sólidas y los micronutrientes a partir de una solución empírica.



Las semillas de soja se desinfectaron con agua de bromo al 1% durante 6 minutos <sup>(41)</sup>, se enjuagaron rápidamente con agua destilada estéril dos veces y se secaron entre papeles de filtro y aire a 35°C. Las semillas antes de ser sembradas fueron sometidas a un ensayo para medir % de germinación. Para ello se colocaron 100 semillas en una bandeja, cubiertas con vermiculita humedecida, se colocaron en una estufa a 30°C y después de 5 días se contó el número de semillas germinadas. En base a este ensayo se calculó el número de semillas a sembrar para asegurar el nacimiento de 4 plantas por maceta.

Esta experiencia se diseñó con criterio estadístico, para analizar los datos por el método de la variancia, confirmando las diferencias entre medios mediante la aplicación de la prueba de Tukey <sup>(42)</sup>. Se realizaron tres tratamientos: 1) Semillas sin inocular; 2) Semillas inoculadas con un inoculante testigo; se eligió como testigo el inoculante preparado por el método que utiliza INTA, con cultivos frescos en agar de Ashby modificado y suspensión de las bacterias en el mismo medio líquido, antes de proceder a la inoculación; 3) Semillas inoculadas con caldo de fermentación obtenido en tanque agitado en las siguientes condiciones de operación: 250 rpm y 0,5 V/V.min, OAR=94,5ml O<sub>2</sub>/l.h, 66 horas de proceso y utilizando como medio de cultivo el medio balanceado (Tabla 5).

Por cada tratamiento se hicieron 5 repeticiones de 20 macetas c/u, lo que corresponde a 80 plantas por repetición y 400 plantas por tratamiento. Además para eliminar los efectos de borde (diferencias de iluminación) fue necesario agregar 40 macetas más. A las repeticiones se las designó con las letras A, B, C, D y E. La distribución de las macetas dentro de la cámara se realizó al azar.

Las plantas se dejaron desarrollar hasta que un alto por-



centaje de plantas presentaron unas pocas flores. Las plantas fueron cosechadas a los 45 días de la siembra, cortando la parte aérea. Además durante todo el tiempo que duró el ensayo se hicieron observaciones diariamente, del aspecto de las plantas, y una vez cortadas, de todas las raíces.

En las plantas no inoculadas se observó una marcada clorosis que comenzó a insinuarse a los 25 días de sembradas. Las plantas inoculadas (tratamientos 2 y 3) presentaron color verde muy intenso durante todo el ensayo. Las raíces de las plantas inoculadas presentaron nodulación en el 100 % de los casos, observándose nódulos coronarios de tamaño considerable. No se observó la presencia de nódulos radicales en las plantas cultivadas sin inocular, en ningún caso. (fig. 38 y 39)

Las plantas fueron cortadas todas el mismo día y distribuidas sobre las mesadas de la misma cámara, separadas por repeticiones y secadas a la temperatura de 30 - 35°C y 20% de humedad durante tres días. Luego se secaron en estufa de tipo industrial, con circulación de aire durante 45 horas a 57°C.

Las plantas de cada repetición fueron molidas con un molino eléctrico Willy, homogeneizadas y envasadas en bolsas de polietileno. Para cada repetición se determinó el peso de material seco y % de nitrógeno. Para extraer las muestras se realizó previamente un cuarteo y las determinaciones se realizaron por duplicado. Para el análisis de nitrógeno se empleó el método de Kjeldahl. Los resultados obtenidos se indican en la tabla 13.



Fig.37 Plantas de soja cultivadas en la cámara climatizada

Tabla 13

Resultados obtenidos en el análisis de nitrógeno y materia seca

<u>Tratamiento</u>	<u>Muestra</u>	<u>Materia seca</u> (g)	<u>% N</u>	<u>N total</u> (g)
1 (Sin Inoculante)	1 A	49,62	1,30	0,64
	1 B	44,44	1,19	0,52
	1 C	52,25	1,27	0,66
	1 D	50,95	1,37	0,69
	1 E	54,58	1,36	0,74
2 (Inoculado con cultivo en Agar de Ashby)	2 A	57,92	3,03	1,75
	2 B	41,86	3,34	1,39
	2 C	57,34	2,95	1,69
	2 D	53,28	3,20	1,70
	2 E	49,52	3,09	1,53
3 (Inoculac. con caldo fermentador 250 rpm y 0,5 V/V.min aire)	3 A	54,66	3,32	1,81
	3 B	53,29	3,26	1,70
	3 C	48,67	3,13	1,52
	3 D	48,10	3,14	1,51
	3 E	49,68	2,99	1,48





Fig. 38 Raíces de plantas de soja sin inocular



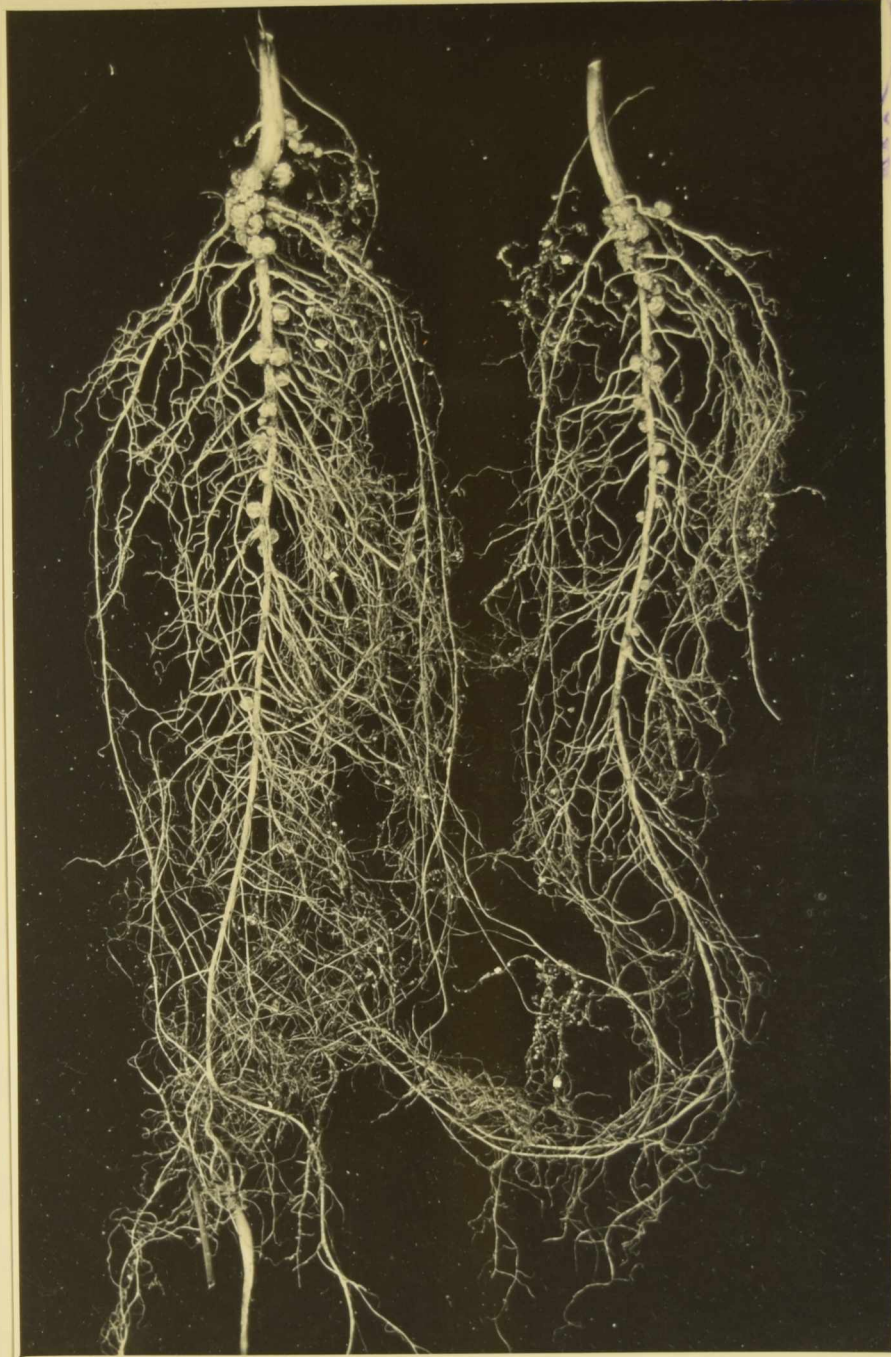


Fig.39 Raíces de plantas de soja inoculadas

## Análisis numéricos

Los % de nitrógeno se analizaron por el método de la variancia, comparando la diferencia entre los promedios mediante la prueba de Tukey.

Tratamiento	Repeticiones					
	A	B	C	D	E	
1	1,30	1,19	1,27	1,37	1,36	$\bar{x} = 6,49$
2	3,03	3,34	2,95	3,20	3,09	$\bar{x} = 15,61$
3	3,32	3,26	3,13	3,14	2,99	$\bar{x} = 15,48$
	$\bar{x} = 7,65$	$\bar{x} = 7,79$	$\bar{x} = 7,35$	$\bar{x} = 7,71$	$\bar{x} = 7,44$	

$$\text{Término de corrección} = \frac{(\text{Total general})^2}{\text{n}^\circ \text{ de trat.} \times \text{n}^\circ \text{ de repet.}}$$

$$\text{Total general: } 7,65 + 7,79 + 7,35 + 7,71 + 7,44 = 37,94$$

$$\text{T.C.} = \frac{(37,94)^2}{3 \times 5} = 95,96$$

T.C. = término de corrección

### Determinación de la suma de cuadrados

$$\begin{aligned} \text{A) Del total: } & (1,30)^2 + (1,19)^2 + (1,27)^2 + (1,37)^2 + (1,36)^2 + \\ & + (3,03)^2 + (3,34)^2 + (2,95)^2 + (3,20)^2 + (3,09)^2 + \\ & + (3,32)^2 + (3,26)^2 + (3,13)^2 + (3,14)^2 + (2,99)^2 - \\ & - \text{T.C.} = 11,57 \end{aligned}$$

$$\text{B) Del tratamiento: } \frac{(6,49)^2 + (15,61)^2 + (15,84)^2}{5} - \text{T.C.} = 11,38$$

C) De repeticiones:

$$\frac{(7,65)^2 + (7,79)^2 + (7,35)^2 + (7,71)^2 + (7,44)^2}{3} - \text{T.C.} = 0,04$$

$$D) \text{ Del error: } A - B = \text{Suma del C.Total} - \text{S.C.de trat.} = 11,57 - 11,38 = 0,19$$

Detrminación del cuadrado medio o variancia

Cuadrado medio:  $\frac{\text{Suma de cuadrados}}{\text{grados de libertad}}$

$$\text{Del error: } \frac{\text{S.C.error}}{12} = \frac{0,19}{12} = 0,016$$

$$\text{Del tratamiento: } \frac{\text{S.C.trat.}}{2} = \frac{11,38}{2} = 5,69$$

$$F = \frac{\text{Cuadrado medio mayor}}{\text{Cuadrado medio menor}} = 355,62$$

F = 3,89 (5% de probabilidades)

F = 6,93 (1% de probabilidades)

Estos valores demuestran que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

Cuadro resumen del análisis de la variancia

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	F tabular
Tratamiento	2	11,38	5,69	355,62	3,89 5%
Error	12	0,19	0,016		6,93 1%
Total	14	11,57			



Se completa la prueba de las diferencias mínimas significativas con la prueba de Tukey.

$$\Delta = q \cdot \frac{s}{\sqrt{r}} \quad s = \sqrt{\text{C.M. error}} \quad r = \text{N}^\circ \text{ de repeticiones}$$

$$q_{0,05} = 3,77 \quad s = 0,1265 \text{ (error standard)}$$

$$q_{0,01} = 5,04 \quad \sqrt{r} = 2,236$$

$$\Delta_{0,05} = 3,77 \frac{\sqrt{0,016}}{\sqrt{5}} = 0,211 \text{ (Diferencia mínima significativa con una probabilidad de error de 5\%)}$$

$$\Delta_{0,01} = 5,04 \frac{\sqrt{0,016}}{\sqrt{5}} = 0,282 \text{ (Diferencia mínima significativa con una probabilidad de error de 1\%)}$$

Valores promedio del % de nitrógeno para cada tratamiento

$$6,49/5 = 1,298$$

$$15,61/5 = 3,122$$

$$15,84/5 = 3,168$$

Coefficiente de variabilidad (C.V.)

$$\text{C.V.} = \frac{5}{\bar{x}_{\text{total}}} \cdot 100 = \frac{0,1265}{2,53} \cdot 100 = 5 \%$$

Cuadro de contrastes

	$\bar{1} = 1,298$	$\bar{2} = 3,122$	$\bar{3} = 3,168$
$\bar{1} = 1,298$	-	1,824	1,870
$\bar{2} = 3,122$	-	-	0,046



Las diferencias entre los tratamientos 2 y 3 no son significativas, en cambio las observadas entre los tratamientos con y sin inoculantes son altamente significativas.

## Conclusiones

Como resultado de los estudios realizados se concluye:

1) En cuanto a los estudios sobre balance de medios, donde se considera la influencia de la naturaleza de la fuente de carbono se comprobó que la cepa en estudio no metaboliza los disacáridos empleados. Se ha demostrado que entre las fuentes utilizadas por el microorganismo existe una notable diferencia en lo que se refiere a su influencia sobre la velocidad de crecimiento de la cepa, dependiendo de la naturaleza de dicha fuente. Se ha comprobado que el glicerol es el compuesto de elección, resultando más efectivo que el manitol que hasta el presente ha sido la fuente de carbono tradicionalmente utilizada.

Con referencia a las fuentes de nitrógeno estudiadas, es de destacar que la incorporación de fosfato diamónico produce un efecto favorable en la evolución del pH a través del proceso.

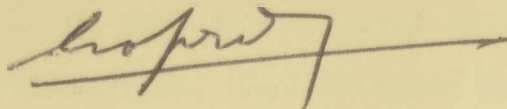
Por otra parte, la modificación introducida en cuanto a los niveles de extracto de levadura empleados, permite fijar un límite máximo ( 4 g/l), ya que concentraciones superiores producen efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular. El medio seleccionado, con una concentración de 10 g/l de glicerol y 4 g/l de extracto de levadura, permite la obtención de cultivos con tiempos de generación de 8 horas.

2) Los ensayos agronómicos realizados en una cámara climatizada empleando suspensiones de Rhizobium japonicum obtenidas con el medio y condiciones de operación optimizadas, permiten predecir el buen comportamiento de la cepa en cuanto a su capacidad simbiótica, ya que los resultados obtenidos, muestran el excelente comportamiento de la misma en cuanto a su capacidad de nodulación, invasividad y poder de fijación de nitrógeno.

3) En cuanto a las experiencias en fermentadores es de destacar que se han optimizado las condiciones de operación

demostrándose que con el medio balanceado y valores de velocidad de suministro de oxígeno (OAR) de 94,7 ml O<sub>2</sub>/l.h se obtienen a las 48 horas de proceso suspensiones con un número de células viables de 1. 10<sup>10</sup> células/ml.

4) Con este trabajo se establecen las condiciones tecnológicas óptimas para la obtención de cultivos de Rhizobium japonicum E 45, factibles de ser trasladadas a escala industrial en la producción de un inoculante para soja, en nuestro país.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'L. P. ...', with a long horizontal line extending to the right from the end of the signature.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) G.Bjalfe: Inoculation of Legume Seed. Uppsala (1948).
- (2) R.O.Dawson: Bacteriol. Rev. 29, 254 (1965).
- (3) P.M.West and P.W.Wilson: J.Bacteriol., 37, 161 (1939).
- (4) G.Fahraeus and Ljunggren: The Ecology of Soil Bacteria, An International Symposium. Liverpool University Press, 1968.
- (5) P.M.West and P.W.Wilson: Enzimologia, 8, 152 (1940).
- (6) E.K.Allen and O.N.Allen: Bacteriol. Rev., 14, 273 (1950).
- (7) J.Kleczkowska, P.S.Nutman and I.A.Skinner and J.M.Vincent: The Identification and Classification of Rhizobium, Identification Methods for Microbiologists, part B, 51-61, Edited by B.M.Gibbs and D.A.Shapton (1968).
- (8) G.H.Elkan and I.Kwik: J.Appl.Bact. 31, 399-404 (1968).
- (9) E.K.Allen and O.N.Allen: Handbuch der Pflanzenphysiologie, W.Rahland (ed) 8, 48, Berlin, Springer-Verlag (1958).
- (10) J.B.Wilson and P.W.Wilson: J.Bacteriol. 43, 329 (1942).
- (11) R.A.Steinberg: J.Agr.Res. 57, 461 (1938).
- (12) D.W.Thorne and R.H.Walker: Soil Sci. 42, 231(1936).
- (13) D.O.Norris: Plant Soil, 22, 143 (1965).
- (14) F.H.Badawy and O.N.Allen: Agron.Abstr. 31, (1963).
- (15) J.M.Vincent and B.A.Humphrey: Nature 149-199(1963).
- (16) R.H.Lowe, H.J.Evans and S.Ahmed: Biochem. and Biophys. Res. Commun 3, 675 (1960).
- (17) R.H.Lowe and H.J.Evans: J.Bacteriol. 83, 210 (1962).
- (18) R.Balassa: Nature 188, 246 (1960).
- (19) P.H.Graham and C.A.Parker: Plant Soil 20, 383 (1964).
- (20) C.E.Georgi and P.W.Wilson: Arch Mikrobiol. 4, 543 (1933).
- (21) P.W.Wilson: The Biochemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation, Madison, University of Wisconsin Press, 1940.
- (22) J.M.Vincent: A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria (1970).
- (23) V.Skrdleta: Somatic Sero-Groups of Rhizobium japonicum. Pl.Soil, 23, 43 (1965).
- (24) F.P.Koontz and J.E.Faber: Soil Sci., 91, 228 (1961).



- (25) G.H.Heberlein, J.de Ley and Tijtgat: Journal of Bacteriology, july 1967, 116- 124.
- (26) J.de Ley and A.Rasell: J.Gen.Microbiol. 41, 85 (1965).
- (27) J.Kleczkowska: Can.J.Microbiol. 3, 171 (1957).
- (28) J.J.Gavin: Microbiological Process Report; Analytical Microbiology, III Turbidimetric Methods. Food Research Laboratories In., Long Island City, New York, November 23, 1956.
- (29) W.W.Umbreit: Modern Microbiology. Edited by Freenen and Company, San Francisco 1962, p.48.
- (30) C.M.Cooper, G.Fernston, S.A.Miller: Ind.Eng.Chem. 36, 504-509 (1944).
- (31) G.H.Bell and M.Gallo. Process Biochemistry, April 1971, V 6, 4.
- (32) Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, 10a.ed.,1965,p.15.
- (33) M.Lambert and A.C.Neish: Can.J.Research B, 28, 83 (1956).
- (34) Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms. Edited by Ivan Malok and Zdenek Fencel, 1966. Academic Press New York. 3, 1.
- (35) R.Laguens, J.Lagrutta, O.Koch and F.Quijano: Am.J.Obst. and Gynec. Vol. 98, n° 6, 773-780, july 15, 1967.
- (36) E.B.Fred, I.L.Baldwin and E.Mc Coy: Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. Madison. University of Wisconsin (1932).
- (37) E.Schiel y A.Ragonesi: Infección de la alfalfa con *Rhizobium meliloti*, en la Pcia. de Santa Fe. Rev.Arg. de Agron. T. 9 (2) 114-169 (1942).
- (38) S.Paladino: A simple Rotary Shaker. Rendiconti Istituto Superiore di Sanità. English Edition. Vol,17, 148-154.
- (39) E.Schiel, E.G. de Olivero y M.Yepes. Revista de Investigaciones Agrícolas, T XIII, n° 3, 257-279.
- (40) A.Pascale, C.Remussi y L.Marzo: Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de Bs.As. 15, 29-54, Dic.1963.

- (41) E. Schiel, E.L.G. de Olivero y J. Pacheco Masuro: *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, INTA, Bs.As., Rep. Arg., Serie 2, Biología y Producción Vegetal, Vol. III, N° 20, 325-340, 1966.
- (42) E. Cortada de Kohan, J.M. Carro: *Estadística Aplicada*, HUNERA, 1968, 284-365.

