

conf

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

OBTENCION DE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS.

ESTUDIOS DE SOPORTES CONSTITUIDOS
FUNDAMENTALMENTE A BASE TURBA

J. P. de la

666(2)

TESIS
RODRIGO GUILLERMO F

1979

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



DEX-49570

605
S
Fecha 15-10-79
COT E. 69140 Inv. B. 4.9570

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

OBTENCION DE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS
Estudios de sonortes constituídos
fundamentalmente a base de turba.

TESIS

ROBERTO GUILLERMO RANDRUP

1979

Por
S.
Fecha 15-10-79
E. 69140 Inv. B. 49570



Padrinos de Tesis:

Prof. Dr. Antonio P. Balatti

Prof. Dr Luis A. Mazza

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas, fue realizado en la Cátedra de Procesos Bioquímicos Fundamentales de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

a mis padres y hermano
a Miriam

Mi reconocimiento:

A los Dres Antonio P. Balatti y Luis A. Mazza, por haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales.

A la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC), al otorgarme una Beca para poder realizar estos estudios.

A la Facultad de Ciencias Exactas de La Plata al permitirme usar sus equipos e instalaciones.

Mi agradecimiento:

A los Drs Luis A. Mazza y Antonio P. Balatti, por su guía y estímulo permanente.

A la Dra Amelia Vasquez; el Dr Manuel C. Escalante; el Ing. Rubén H. Molfino; el Dr Enrique Pereira; el Dr Rodolfo Mascheroni; el Sr Edgardo Soto, por orientarme respecto de la metodología mas adecuada para cada determinación físico-química; por poner equipo y materiales a mi disposición; o por ayudarme en la interpretación de los resultados obtenidos.

Al Ing. Guso, de la Comisión de Energía Atómica, o a los Laboratorios Bagó, de City Bell, que me permitieron experimentar con métodos no tradicionales en la Argentina para la esterilización de soportes.

Al Ing. Alejandro Galinsky, por haberse ocupado de la manutención y control permanente del perfecto funcionamiento de la Cámara Climatizada.

A los Srs Jorge Argemí y Obdulio Gallego, por su asistencia técnica, como así también para el resto del personal del CINDEFI.

INDICE

1. INTRODUCCION	pg	1
II. DESCRIPCION DE LA PLANTA E HISTORIA DEL CULTIVO DE LA SOJA	pg	3
a. Variedades de interes para nuestro país	pg	5
III. LA INOCULACION DE SEMILLAS:		
a. Evolución histórica	pg	7
b. Mecanismo de la infección de las raíces	pg	9
c. Mecanismo de la fijación de N ₂	pg	12
IV. INOCULANTES:		
a. Estimación de la eficiencia de un inoculante	pg	14
b. Yacimientos de Turba en la Argentina. Características y localización	pg	18
2. MICROORGANISMO	pg	20
3. MATERIALES Y METODOS	pg	22
I . RELATIVOS A LA PRODUCCION DE CALDOS MICROBIANOS:		
a. Medios de cultivo empleados	pg	25
b. Preparación de preinóculos e inóculos	pg	27
c. Condiciones de operación:		
1. A nivel de frasco agitado	pg	29
2. A nivel de tanque agitado	pg	30
3. A nivel de Planta Piloto	pg	31
II. RELATIVOS AL ESTUDIO FISICOQUIMICO DE LAS TURBAS	pg	34
III. RELATIVOS A LA PRODUCCION DE INOCULANTES		
a. Pasos anteriores a la impregnación	pg	38
b. Esterilización del soporte	pg	39
c. Metodología usada en la impregnación	pg	42
IV. RELATIVOS A LOS ENSAYOS AGRONOMICOS:		
a. En Cámara climatizada	pg	44
b. En Laboratorio	pg	51
1, Metodología de la Cromatografía gaseosa..	pg	52

///

4. RESULTADOS

I. ESTUDIOS SOBRE EL MEDIO DE CULTIVO:

- a. Sobre los componentes del medio y las condiciones de operación a nivel de Erlenmeyer .. pg 53
- b. Idem a nivel de tanque agitado o Planta Piloto pg 71

II. ESTUDIOS DE DIFERENTES SOPORTES DE ORIGEN NACIONAL, FUNDAMENTALMENTE A BASE DE TURBA:

- a. Físico-químicos pg 76
- b. Botánicos pg 93
- c. De supervivencia del microorganismo sobre turbas de diferente granulometría pg 94

III. INFLUENCIA DE LA TECNICA DE ESTERILIZACION DE LOS SOPORTES SOBRE LA SUPERVIVENCIA DEL RHIZOBIUM pg 96

- b. Influencia de la luz pg 100

IV. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS CON LOS INOCULANTES PREPARADOS:

- a. Ensayos de Cámara pg 101
- b. Ensayos de Laboratorio pg 114

5. DISCUSION

I. DE LOS ESTUDIOS SOBRE CAIDOS:

- a. De los resultados 4.I. a. pg 117
- b. De los resultados 4.I. b. pg 120

II. DE LOS ESTUDIOS DEL SOPORTE:

- a. De los resultados 4.II.a. pg 122
- b. De los resultados 4.II.b. pg 127
- c. De los resultados 4.II.c. pg 128

III. DE LOS METODOS DE ESTERILIZACION:

- a. De los resultados 4.III. pg 129
- b. 4.III.b. pg 130

IV. DE LA EVALUACION AGRONOMICA DE LOS INOCULANTES:

- a. De los resultados 4.IV. pg 131
- b. De los resultados 4.IV.b. pg 136

6. CONCLUSIONES pg 140

7. BIBLIOGRAFIA pg 144

INTRODUCCION

Si estudiásemos la distribución de la soja en distintos países del mundo ^{86,104,124,133,137,143}, y de paso nos detuviésemos a considerar las consecuencias favorables que tiene sobre la economía de los países productores ^{16,123,132,157,177}, así como la contribución sobre el estado nutricional de los habitantes de áreas sojeras en que este cultivo es la principal fuente alimenticia ^{3,111,187}, en seguida comprenderíamos no solo la importancia tremenda que tiene este cultivo industrial ^{75,113,163} sobre el desarrollo futuro de toda la humanidad ^{85,174}, sino también el porqué de la rápida expansión ¹¹⁷ que está sufriendo a nivel internacional ^{146,180, 17,36,119,135,178,193} y nacional.

En efecto. En este momento en que gran parte de la población mundial vive subalimentada, en que día a día disminuye la superficie de las tierras cultivables ante el empobrecimiento paulatino de los suelos; ahora que toda la humanidad tiende a la diversificación en lo que a elección de cultivos se refiere, sembrando girasol cuando necesita aceite, trigo cuando hace falta harina, o heno o alfalfa cuando requiere forrajes para alimentar al ganado, con los gastos en maquinaria especializada, superficie cultivable, y horas/hombre que esa diversificación supone; cuando por fin nos enfrentamos con países de bajo potencial pecuario (con el consiguiente déficit de lácteos y de proteínas cárnicas), o cuando consideramos que existen niños en todos los países del mundo que no toleran la leche vacuna por padecer de una enfermedad congénita denominada "galactosemia", entonces el cultivo de la soja surge como la mejor opción posible ^{37,38}, ya que en un solo vegetal encontramos sustituto a prácticamente todos los otros cultivos tradicionales, y es así que a la soja se la considera oleaginosa ^{12,136,139} (pues su semilla contiene un 19% de aceite, del cual digamos que se destina un 10% a la industria y el resto al consumo humano); es cereal (pues con su harina se pueden elaborar toda suerte de farináceos que van desde las pastas o el pan hasta las galletitas, con la ventaja de tener esta harina no más de un 3% de almidón ⁶⁹, y de no producir ácido úrico en el proceso digestivo, con lo que se hace especialmente indicada para los diabéticos o para los que sufren de gota); sirve de alimento al ganado ^{9,129} o complementa la ración alimenticia en los criaderos de animales ¹²⁵; sus porotos son fuente preciosa de proteínas con casi todos los aminoácidos esenciales ^{155,161}, y que bajo la forma de leche vegetal, obtenida al hervir la harina de soja con agua, filtrando luego, sirve como alimento insustituible para esos niños galactosémicos o

para todos aquellos que tengan alergia o intolerancia a la leche va
cuna. Por último, tiene la enorme virtud de que la práctica de su
cultivo aumenta el contenido de nitrógeno de los suelos^{52,181}, evitando
el desgaste del horizonte edafológico cultivable¹⁰⁵ y permitiendo ade-
más la técnica de rotación de cultivos, esto es, aprovechar con una
cosecha sobre rastrojo de soja, el nitrógeno incorporado al suelo^{24,76}
por las bacterias fijadoras que nodulan en las raíces de esta legu-
minosa.⁴²

Si todas las virtudes enunciadas hasta ahora para este vegetal,
devienen directa o indirectamente de su alto tenor proteico o lipí-
dico, y de pronto tomamos conciencia de que esa inusual cantidad de
proteínas que rinde la soja, se debe a la asociación simbiótica²⁰ con
un microorganismo del suelo, concretamente el Rhizobium japónico,^{28,30,160,166}
qué loas no hacerle a un ser tan diminuto que contribuye al bienes-
tar de la humanidad en forma tan inmensurable?¹⁸²

Como desgraciadamente existen pasturas o terrenos cultivables
donde este microorganismo no se da en forma natural, o si lo hace
es bajo la forma de una cepa mutada, que ha perdido parte de su ca-
pacidad simbiótica original, y que muchas veces muestra una activi-
dad nitrogenásica excesivamente baja, entonces en esos casos se ha
ce casi imprescindible la práctica de inocular las semillas, o sea
incorporar al suelo una cepa seleccionada, específica para el cul-
tivar en cuestión, adaptada al medio hostil que pueda encontrar en
la tierra, y con capacidad comprobada de entregarle nitrógeno asi-
milable al vegetal, permitiendo de esta manera obtener altos rendi-
mientos en las cosechas a muy bajo costo operacional, pues tan so-
lo para ejemplificar puedo indicar que se ha comprobado que una
hectárea de terreno en una zona pobre de nitrógeno, sembrada con
semillas inoculadas, de tal forma que produzca unas 2,8 Ton de so-
ja, rinde hasta 800 Kg de proteína por Ha, en solo 4 a 6 meses de
cultivo; en cambio, de haber utilizado semillas sin inocular, se
hubiese obtenido un rendimiento del orden de las 1,8 Ton, con un
contenido proteico sansiblemente menor.

El objetivo de este trabajo, entonces, es estudiar el comporta-
miento de una cepa de Rhizobium japónico, seleccionada en base a
su capacidad simbiótica y actividad nitrogenásica, para luego in-
corporarla en un soporte inerte a base de turba, estudiando la su-
pervivencia del microorganismo a diferentes temperaturas y ante di-
ferentes condiciones de operación, en un intento por fijar la tec-

nología y los recaudos a adoptar para fabricar industrialmente un inoculante con turbas nacionales, adaptado para ~~nuestra~~ zona sojera.

1.II. Descripción de la planta de soja e Historia de su cultivo: 113

La soja es una planta anual, herbácea, que pertenece a la familia de las Leguminosas, subfamilia Papilionoideas, género *Glycine*, siendo su nombre específico *Glycine max* (L.) Merrill, aunque también se la ha llamado *Dolichos soja* L, *Glycine hispida* (Moench) Max; *Glycine soja* Sieb y Zucc; *Phaseolus max* L, o soja hispida Moench.

Se la supone derivada de *Glycine ussuriensis* Regel y Mack, especie salvaje en el este de Asia. Se encuentran todas las formas intermedias y se estima que *Glycine gracilis* Skvortz sería un tipo intermedio, encontrándose formas cultivadas de esta última en Manchuria. Es interesante desde el punto de vista filogenético, que todas estas especies tienen el mismo número de cromosomas ($2n=40$).

Su origen asiático ancestral queda bien evidente si consideramos que la literatura china la cita en el año 2838 a. C. como uno de los cinco granos sagrados que alimentan a los pueblos asiáticos.

Los exploradores y misioneros europeos destacaron en su correspondencia la importancia de este cultivo, pero recién en 1883 se hacen los primeros ensayos de producción en Francia y en Austria. Ya antes, en 1804, algunos barcos norteamericanos habían llevado soja de Oriente a puertos de California. A fines del siglo XIX se conoció bien la importancia que tenía en el comercio asiático y los europeos y americanos empiezan a interesarse por ella.

La presencia de soja fuera del mercado asiático comienza a notarse a medida que la industria, principalmente en Alemania e Inglaterra, encuentra la forma de extraer el aceite y utilizar el alto valor proteico del residuo.

Manchuria, China, Japón, Corea, fueron los proveedores de esta industria y hasta 1930, aproximadamente, la soja siguió siendo un cultivo menor o exótico, relegado a un papel secundario de abono verde en la agricultura norteamericana y de curiosidad en la agricultura americana y europea.

En nuestro país fue Tonnelier quien introdujo su cultivo en Men- doza, en 1898. Pero no sería hasta el primer cuarto del siglo XX que comienzan a difundirse trabajos relativos a su cultivo e importan- cia, especialmente por el Ing. Mario Estrada, quien publicó en la Re- vista del F. C. Pacífico (1920-1925).

Tendrían que pasar otras 2 décadas para que empresas particulares argentinas encaren programas de producción, o para que el Ministe- rio de Agricultura y Ganadería, en sus estaciones experimentales, conservase ensayos y colecciones, preocupándose desde entonces en introducir un gran número de variedades, mejor adaptadas a nues- tros requerimientos agroclimáticos que sus ancestros asiáticos o europeos.

Recién en los últimos años se han valorado suficientemente las ventajas inherentes al cultivo de la soja, y prueba fehaciente de ello es que si en 1960 teníamos no mas de 1000 has. cultivadas , en 1976-1977 llegamos a casi 700.000 , con una producción total de 1.270.000 Tn, lo que nos coloca como el 7º productor mundial en este rubro.

Mientras tanto, los conocimientos técnicos que consiguieron que sea uno de los cultivos de mayor seguridad de cosecha y rentabili- dad, surgieron a través de 5 Reuniones Técnicas Nacionales (entre los años '68 y '77), mientras que el apoyo a productores e investi- gadores surgió con la formación de la Comisión Permanente para el Fomento del Cultivo de la Soja (1970), o del hecho de haber sido declarado su cultivo como de interés nacional (1972).

En lo que respecta a su descripción botánica, digamos que la so- ja es un vegetal de cultivo estival que tiene hojas trifoliadas (con folíolos aovados o lanceolados, con su borde superior de un verde intenso con nervaduras deprimidas bien marcadas, en tanto que en la cara inferior -con un verde mas claro- las nervaduras son en relieve). Casi todas las variedades son pubescentes (con pelos rojos, casta- ños o grises), aunque las hay también glabras.

El tallo es erguido y la ramificación racimosa. Las especies salvajes son ascendentes, rastreras o trepadoras. La altura de las plantas varía según la variedad y el ciclo, oscilando entre los 30 cm y los 140 cm (en este último caso en algunas razas tardías).

Las flores son pequeñas y poco visibles, hermafroditas, en raci- mos axilares con 3 hasta 15 flores blancas o moradas, muchas de las cuales no fecundan. La flor es completa, con los 5 pétalos tí-

picos de leguminosa y las anteras formando un tubo alrededor del pistilo.

Las chauchas tienen 2, 3 o excepcionalmente hasta 4 granos, los cuales pueden ser amarillo-claro hasta grises o negros (las variedades comerciales son amarillo-claro o amarillo verdoso; las industriales son castañas y las forrajeras son negras). Cien semillas pueden pesar entre 5 y 35 gramos, morfológicamente no muy diferentes del poroto común, aunque las variedades cultivadas no son arriñonadas y en cambio tienen cierta tendencia a ser esféricas.

La raíz es pivotante, con abundantes ramificaciones laterales y con nudosidades producidas por las bacterias fijadoras de nitrógeno.

1.11.a

127

VARIETADES: Gracias a los trabajos del Ing. agrónomo A. J. Pascale, se han clasificado a las variedades de soja en cuatro grupos de precocidad, esto es, precoces (o tempranas), semiprecoces, semitardías, y tardías, tomando como base los días transcurridos para que comience la floración o la caída de las hojas. En Estados Unidos, en cambio, la clasificación determina diez grupos.¹²²

Las siguientes variedades son las que tienen interés para nuestro país:

Tempranas: Blackhawk, Hawkeye, Hill, y las selecciones FAV (Facultad de Agronomía y Veterinaria).

Semitardías: Odgen, Jakson, CNS, Lee, Halesoy.

Tardías: Abura, Misiones.

Entre todas ellas, la variedad Lee, creada por el Dr Hartwig en Stoneville, ha resultado de adaptación ideal a nuestras condiciones, apareciendo como una de las pocas recomendables en todo el país (excepto la región central y sur, donde el otoño húmedo y su ciclo de 120 días pueden comprometer la cosecha). La otra aconsejable es la Halesoy.

Debido a que está demostrado que algunas variedades son más difíciles de inocular que otras^{1,2}, se decidió en este laboratorio utilizar la variedad de mayor difusión en nuestro medio, o sea la Lee, para los ensayos finales con los inoculantes testeados en esta monografía.

DESCRIPCION DE LA VARIETADE LEE: En los ensayos de marras se utilizó Lee-68. Tal vez lo distintivo de este cultivar es su gran plasticidad, apareciendo como más tolerante a la latitud que las otras. Es una planta relativamente alta, erecta y bien ramificada, de tallo

fino y resistente, que puede alcanzar hasta 120 cm de longitud cuando está bien desarrollada. Da chauchas altas, sobre todo si se la siembra de modo que haya una planta cada 5 a 7 cm en la línea, y muy indehiscentes, lo que la hace ideal para la cosecha mecánica.

Se da bien en el norte de Buenos Aires, en Santa Fe y Córdoba y en el Chaco o inclusive en Misiones. Se caracteriza también por la sobresaliente calidad de grano para la industria.

1.III. LA INOCULACION DE SEMILLAS

a.- Evolución histórica: En el año 1895 Krchner notó que sobre 100 especies de leguminosas que crecían en el Jardín Botánico de Hohenheim, la soja era la única especie que no tenía nódulos en sus raíces. En un principio lo atribuyó a problemas con las condiciones del entorno, pero luego obtuvo algo de suelo inoculado desde Japón y mediante experiencias de campo en macetas utilizando dos variedades de soja, pudo demostrar en forma definitiva que las bacterias de la soja eran diferentes de las de las otras leguminosas, y que la soja se podía inocular usando tierra de un terreno donde ya hubiese existido soja nodulada. Por todo esto se considera a Krchner como el primer investigador en haber usado tierra para la inoculación de soja.

La práctica de inocular semillas con un cultivo artificial de Rizobios comenzó con Voelcker en el año 1896. En su versión original el método consistía en hacer crecer bacterias en un medio sólido (agarizado) para luego suspender las células en agua y usar entonces esta suspensión para impregnar tanto el suelo como la semilla.

Resulta interesante destacar que este método todavía se sigue empleando hoy en día en aquellas regiones en que la demanda de un inoculante es tan pequeña que no justifica su producción industrial.

Muy pronto se empezaron a ensayar toda suerte de soportes para los microorganismos, tales como agar, paja, carbón, turba e inclusive mas tarde hasta se probó de utilizar cultivos liofilizados, resultando que en principio todos podían cumplir su cometido, o sea servir de vehículo a los microorganismos y crear un microclima que les garantice una larga sobrevivencia en ese habitat artificial.

En 1903, Hiltner y Störmer publicaron sus trabajos sobre la inoculación de la soja usando cultivos puros. En uno de sus experimentos se usaron cantidades iguales de tierra de Dahlem y de suelos con o sin limo, inoculándolos en enero de ese año con un cultivo puro de bacterias específicas para soja. En mayo utilizaron cantidades variables de esos suelos inoculados para usarlos como inoculantes de soja crecida sobre arena.

Así llegaron a la conclusión de que el suelo con limo, impregnado de los MO, prácticamente garantizaba la inoculación, mientras que sin limo la nodulación era baja. En todos los casos se podía mejorar la inoculación mediante el artificio de agregar ma

yores cantidades de tierra rica en bacterias.

Atwater y Woods fueron los primeros en sugerir el uso de infusiones de suelo para inocular soja que había sido crecida sobre arena. Desgraciadamente sus resultados no fueron muy satisfactorios pues 1/3 de las plantas inoculadas no presentaban nódulos, mientras que el resto mostraba muy pocos nódulos e insignificantes en lo que se refiere a su tamaño.

Munson¹¹⁵ utilizó como inoculante a los nódulos recogidos de una cosecha anterior, introduciéndolos con la semilla de soja. A pesar de que el plantío sufrió las inclemencias de la helada y no pudo obtener resultados cuantitativos, por lo menos alcanzó a notar que las plantas provenientes de semillas inoculadas eran mayores y de color mas oscuro y con muchos mas nódulos que las de las plantas no inoculadas, quienes directamente no presentaban ningún tipo de engrosamiento en sus raíces. Posteriormente el mismo autor¹¹⁴ comparó el uso de cultivos de Nitragin y de nódulos de otras plantas de soja para ser usados en la inoculación, pero casi no obtuvo resultados, tal vez porque los nódulos que usó estaban demasiados secos.

Moore¹¹⁰ consiguió confeccionar una estadística de acuerdo con la cual sobre 129 reportes recibidos por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, el 43% de los tests habían fallado, llegando inclusive a afirmar que en general ocurrían mas decepciones con la soja que con cualquier otro cultivo.

Lipman⁹⁸ realizó experimentos con Farmogerm y con Nitragin, mostrando que en los suelos apropiados, estos inoculantes eran capaces de aumentar los rendimientos en los cultivos de leguminosas.

Kisselbach llegó a la conclusión de que los suelos de la estación experimental de Nebraska ya poseían las bacterias para soja, pues al inocular tanto con cultivo puro de MO como con el empleo de soportes térreos, no pudo aumentar los rendimientos en las cosechas.

Fellers encontró que muchos de los productos comerciales por él testeados, fallaban en producir resultados satisfactorios con la soja. Mas tarde este mismo autor comparó la eficiencia relativa de productos comerciales y de infusiones de nódulos para ser usados en la inoculación de soja, descubriendo que los primeros eran tan efectivos como los extractivos de nódulos.

Kendall, utilizando 4 variedades comerciales de inoculantes, verificó trabajos anteriores según los cuales las plantas inocula-

das mostraban una diferencia remarcable en el color y en el número de nódulos, al compararlas con Testigos sin inocular.

En 1924 Fiske publicó los Tests oficiales realizados con muestras provenientes de inoculantes para leguminosas, encontrando que 5 dieron resultados pobres, mientras que los demás produjeron buena nodulación. Al año siguiente se repitió el experimento pero ahora con 43 muestras, de las cuales una de ellas dió resultado negativo, otra rindió resultados pobres, 5 produjeron una nodulación regular y el resto presentaba buena nodulación.

No fue sino hasta el año 1961, gracias a los trabajos de McLeod y Roughley, en que se llegó a la conclusión que el empleo de turbas como habitat temporario de los microorganismos, presentaba algunas ventajas interesantes si se lo comparaba con otros soportes de menor superficie específica, tales como paja, aserrín, polvos inertes, etc. Entre otras, resulta que es mayor la capacidad de retención de humedad durante el almacenamiento; que es mayor la protección del Rhizobium cuando se coloca al inoculante en contacto con suelos ácidos o fertilizadores ácidos (Vincent, 1958); y que aparece como muy conveniente para la sobrevivencia de los microorganismos sobre las semillas peleteadas con limo (Shipton y Parker, 1967).

Por todas estas razones es que en el presente trabajo el soporte principal está constituido por turbas (de procedencia nacional), y cuya eficiencia se compara además con la utilización de caldos de alta concentración bacteriana en lo que hace a la inoculación de porotos de soja, en ambos casos tomándose como Testigo a las plantas provenientes de semillas no inoculadas.

b.- Mecanismo de la infección por los Rh, que llevará a la producción de nódulos radiculares:

121

Se acepta hoy en día (Nutman) que los Rh. sufren toda una serie de transformaciones morfológicas y metabólicas que contribuyen a incrementar la eficiencia simbiótica con el huésped.

Es así que mientras los Rh normales presentes en los inoculantes o en el suelo, tienen una forma bacilar, poco móvil, de hasta 1 micrón de ancho y 1,5 a 3 micrones de largo, los Rh aislados de la rizosfera (o los cultivados en medio líquido durante su período de crecimiento logarítmico) se presentan no ya como bacilos sino como coco-bacilos, ciliados o flagelados, muchísimo mas móviles que los anteriores (también se ha indicado la importancia de la

fuente de carbono de los caldos de cultivo, en la concreción de una morfología determinada¹⁰⁰. Esta forma reproductiva en la cual se transforma el Rh al alcanzar la rizosfera interactúa con las lectinas del vegetal^{19,153,190} y le permite penetrar en los pelos radiculares, movilizándose dentro de ellos.

Finalmente, tras haberse producido el nódulo con las bacterias fijadoras de N₂ en su interior, se produce una nueva adaptación que permitirá una forma mejor concebida para la fijación de N₂ en un ambiente mas anaerobio. Se supone que ahora el Rhizobio se presenta como una estrella de tres puntas, con bordes redondeados y ya no ciliados como antes.

Si estudiamos el desarrollo del nódulo en sí, ya visible y activo a los 20 días de ocurrida la infección, aprenderíamos que los pelos radiculares ante la presencia del rizobio segregan sustancias estimulantes¹³⁸ de la transformación y multiplicación del agente infeccioso. Luego de la infección los pelos radiculares se encorvan, aceptándose que este es el signo de penetración del Rh. en su forma reproductiva móvil.

Entonces la infección se propaga por el interior de los pelos radiculares, alcanzando las células de la raíz, de tal forma que el filamento o tubo infeccioso vaya avanzando a través de las células radiculares. Es entonces que tal vez como defensa por parte del vegetal y en un intento por localizar la infección, células especializadas comienzan la formación del nódulo. El filamento infeccioso se ramifica y alcanza cada una de las células de la hipertrofia, de tal forma que descarga (mediante ruptura del filamento infeccioso) una cierta cantidad de MO en cada célula, los cuales inmediatamente mutan de la forma ciliada a la forma fijadora de N, poniéndose recién entonces de manifiesto las ventajas mutuas de esta convivencia simbiótica, pues el microorganismo le entrega a su huésped N asimilable que él mismo había incorporado desde el aire, a cambio de productos intermediarios de la actividad fotosintética, que producidos en la parte aérea del vegetal le llegan mediante la profusa red vascular que ha producido la planta tras la infección, y que le sirven al MO como fuente de energía, como alimentación para sus rutas anapleróticas en el metabolismo intermedio, o directamente para sintetizar sustancias de reserva, tal como gránulos de beta-hidroxi-butírico u otros intermediarios del metabolismo lipídico.

Se acepta actualmente que los Rh demoran unas 5 horas en penetrar a través de los pelos radiculares, comenzando a multiplicarse

en seguida. En el suelo son aerobios y se trasladan a razón de 2 a 3 cm por día, mientras que dentro del nódulo son ^{CASI} anaerobios y si son activos (Rotschild, 1963) forman un parénquima bacteriano de color rojizo o rosado, cuyo color depende de la existencia de leg-hemoglobina, y que por su afinidad hacia el O₂ contribuye a mantener la pO₂ intranodular en sus valores óptimos para la actividad nitrogenásica de los MO.

Si las bacterias contenidas en los nódulos no fijasen N₂, es característico que el interior del engrosamiento donde se ubica esta colonia inactiva sea blanco-amarillento, en que este color puede luego mutar hacia el pardo-verdoso por envejecimiento del nódulo, tal como ocurre luego de la floración de la planta.

De cualquier forma, al morir la leguminosa o desprenderse sus nódulos, las bacterias que contienen se esparcen por el terreno, cerrando el ciclo que había comenzado con la infección de las raíces por parte del microorganismo, y que ahora termina con la devolución de esos microorganismos a su cuna térrea, solo que ahora multiplicados en número. (Por lo general persisten en el suelo por varios años después de haberse efectuado un cultivo con semilla inoculada.

1.III.c. Mecanismo de la fijación de N₂ en leguminosas

Lo primero que atrae la atención del profano, es el hecho de que los nódulos que fijan activamente N₂ en las leguminosas, presenten una coloración rosada debida a la existencia de hemoglobina vegetal, también llamada leg-hem. Qué sabemos de ella y qué función cumple?

Existe disuelta en las células, en la concentración de 1 a 5 por 10⁻⁴ M. Los vegetales aportan los genes que codifican a la proteína; las bacterias en cambio son las que producen el hem.

Se sabe también que existen por lo menos dos formas moleculares, que difieren en el peso molecular y en la estructura primaria de la globina.

La leg-hemoglobina serviría para la difusión facilitada de O₂ a los tejidos, quienes por un camino aerobio podrían fabricar ATP, de tal forma de consumir luego esta fuente de energía durante la fijación de nitrógeno atmosférico. Pero sucede que el O₂ también es un inhibidor del complejo de la nitrogenasa, así que lo que haría la hemoglobina es entregar la cantidad de O₂ justa como para que se produzca el ATP, pero sin que se inhiba la nitrogenasa.

La labilidad frente al O₂ de las enzimas encargadas de la fijación del N₂, fue el mayor escollo que hubo que vencer para conseguir extractos libres de células ⁹⁵ donde se pudiese estudiar la reacción in vitro, ya que la estricta anaérobiosis era requerida no solo debido a que el O₂ inactiva la nitrogenasa, sino porque en el nódulo hay muchos fenoles junto a fenoloxidasas, que harían perder las características originales al material en estudio.

Actualmente se hace una extracción mediante un polímero de vinilpirrolidona con buffer ascorbato, exprimiendo en una prensa anaeróbica en un medio de pH 7,0-7,4, centrifugando luego a 40000 xg por 50 minutos, apareciendo entonces un sobrenadante con la actividad nitrogenásica tras el agregado de ATP y ditionato.

Respecto al mecanismo íntimo de la conversión del N₂ atmosférico en nitrógeno orgánico, ⁸² se piensa que los electrones requeridos en la óxido-reducción del N₂ son drenados de la cadena transportadora de electrones a la cual está acoplada la fosforilación oxidativa, por lo cual habría una competencia entre la producción de ATP y la fijación. Estos electrones son desviados hacia la reducción del N₂ por ferroproteínas no hemínicas, que

nes luego los ceden al complejo de la nitrogenasa, siendo primero captados por las proteínas Fe-Mo, de peso molecular 180.000, que justamente tienen estos dos metales, hierro y molibdeno en la relación 1:2 en sus grupos prostéticos; luego actuarían unas enzimas de peso molecular 50.000 con hierro en su centro activo, quienes serían las encargadas de reducir al N_2 , posiblemente incorporando protones del medio y con los electrones drenados de la cadena de transporte, muy posiblemente por intermediarios que permanecen fijos a la enzima (con estructura de di-imino e hidracina), para luego escindirse en 2 amoníacos, que entonces serán introducidos a una molécula de alfa-cetoglutárico del vegetal, para rendir glutámico y luego glutamina, ambos muy activos en la transferencia posterior del grupo amino recién incorporado.

El CO, H₂, N₂O, y el etino se comportan como inhibidores competitivos del sistema de la nitrogenasa (cuyo K_M sería de 0,025 atmósferas).⁹⁴ En esto se fundamenta el empleo del acetileno para dosar la actividad nitrogenásica de los nódulos, pues entonces no interfiere el N_2 atmosférico, mientras que el eteno producido es fácilmente separado del etino y detectado selectivamente.

1.IV. INOCULANTES

1.IV. a. Estimación de la eficiencia de un inoculante:

Sabemos actualmente que la capacidad de fijación de N₂ por parte del *Rhizobium japonicum* depende de factores tan disímiles como ser las características de la cepa en cuestión^{1,2,6,27}; de su genotipo y caracteres antigénicos^{91, 5,29,93}; la existencia de parásitos bacteriolíticos tales como el *Bdellovibrio bacteriovorus*^{168,169}; la competencia saprófita con otros microorganismos del suelo^{35,108}; el cultivar que se utilice en el ensayo⁵³; la presencia simultánea de otras cepas efectivas de *Rhizobium japonicum*^{80,90}, que según que¹⁰⁶ dó demostrado por Mague y Burris, producen mayores índices de reducción del acetileno que cuando se testeaba a cada una de las cepas por separado; la existencia de otras plantas^{47,50}; y la influencia de factores abióticos tales como la Temperatura^{11,63,70,128}; el pH del terreno^{118,130,140,144,145}; la composición mineral del entorno^{7,13}; el pH₂O^{79,126,164}; la luminosidad; la fertilización nitrogenada del terreno; y otros factores^{31,32} tales como que las semillas se hayan pelletado o no; la fijación no simbiótica o anómala^{99, 46,51, 96}; la presencia de tóxicos vegetales⁵⁹; la disponibilidad de oxígeno⁶⁴, etc.

Por todo ello se hace imprescindible tanto el estandarizar las condiciones de trabajo así como elegir convenientemente el método más representativo para estimar la eficiencia de un inoculante, que contemple todas las variables arriba indicadas.

Los parámetros que se han usado hasta el presente para estimar la actividad nitrogenásica de diferentes cepas de *Rhizobium* asociadas con su huésped vegetal son: peso total de la planta^{26,61}; peso seco⁸⁴; nitrógeno total¹⁸²; contenido proteico⁶⁰; rendimiento de granos⁸⁹; número de nódulos^{62,97}; peso seco o húmedo de los mismos; masa individual de los nódulos; incorporación de nitrógeno¹⁵; contenido de leg-hemoglobina^{88,183}; reducción del acetileno a etileno^{83,94}; forma, color o ubicación de los nódulos⁷⁸, etc.

Los parámetros que se basan en el número de nódulos o el peso seco⁴ de los mismos; el contenido de leg-hemoglobina, o la composición proteica de los nódulos, son bastante contradictorios. Es así que algunos estudios hablan de una buena interrelación entre estos parámetros, mientras que otros dicen lo contrario. Por ejemplo Iyer⁸⁸ comparó la variabilidad de tamaño, color y peso de los nódulos formados por cepas activas de *Rhizobium*, sobre dife-

rentes leguminosas, y finalmente llegó a la conclusión que había una relación directa entre el contenido de leg-hem de los mismos y la eficiencia de la fijación. En cambio Schiffman y Lobel¹⁴⁸ en una primera comunicación confirmaron el trabajo de Iyer, para luego en un artículo posterior¹⁴⁹ reconocer que existen fluctuaciones estacionales en el contenido de leg-hem, de tal forma de no poderse demostrar ninguna correlación entre N y leg-hem durante los primeros estadios del crecimiento del vegetal, mientras que en cambio se podía obtener una correlación realmente significativa entre N y pigmento, para los últimos estadios de crecimiento de la leguminosa.

Mahmoud et al¹⁰⁷ compararon la eficiencia del Rhizobium con el contenido de aminoácidos de los nódulos y raíces de leguminosas seleccionadas, y solamente pudieron establecer que los nódulos eficientes generalmente tienen mayor contenido aminoacídico total, en especial de glutámico y aspártico. Otros investigadores que analizaron el tema fueron Shemakhanova y Oleinikov¹⁵², que efectivamente encontraron una gran correlación entre la eficiencia de las cepas de Rhizobium y el contenido proteico de los nódulos de diferentes cultivares, incrementándose el grado de correlación en el período de floración.

Dobereiner et al^{48,55} se dedicaron a estudiar la relación que podría existir entre diferentes parámetros tales como el log. del total de N de la planta, el peso seco de los nódulos, y la masa individual de cada nódulo, encontrando una buena correlación entre ellos, mientras que en otro estudio^{54,56} hablan de una variabilidad en la relación entre el número de nódulos y la eficiencia de la cepa, considerándose entonces a este último parámetro como un indicador muy pobre de la eficiencia de la misma.

Schwinghamer et al¹⁵¹ se propusieron ampliar el espectro de elementos comparativos que pudiesen indicar el grado de simbiosis o de fijación, relacionando el contenido de leg-hem de los nódulos, el peso seco de las plantas, el nitrógeno total, las características visuales de eficiencia, y el ensayo de reducción de acetileno, llegando a la conclusión que este último era el más fiable para medir la eficiencia de la fijación de N₂ por las cepas de Rhizobium.

Thompson et al¹⁷², en ensayos de campo utilizando *Rhizobium trifolii*, llegaron a la conclusión que el dato mas fiable es el de rendimiento de materia seca por unidad de área, mientras que el porcentaje de nódulos, el peso individual de cada planta, o las características visuales de las mismas, eran indicadores muy poco confiables de la eficiencia de las cepas en estudio.

Bergersen¹⁴ estudió en especial la actividad de nódulos obtenidos de soja que había sido crecida en vermiculita regada con una solución nutriente libre de nitrógeno, en condiciones de Cámara. Llegó a la conclusión de que tanto el ensayo de reducción del C_2H_2 como el ensayo total de N de las plantas, podían servir como criterios de eficiencia, y aunque nunca se pudo demostrar la inexactitud de ese enunciado, en cambio se empezaron a reconocer errores en la metodología o la interpretación cuyas causas y posibles soluciones serían luego encaradas por Schwinghamer et al¹⁵¹, que junto a otros autores^{126,165}, hablan del error que se comete al manipular, congelar, almacenar, o modificar la humedad de los nódulos, así como al arrancarlos de la raíz, preparar las muestras, exponerlos a la luz aún antes de separarlos del vegetal, y al modificar la temperatura de incubación de los nódulos.

Si nos atenemos a las conclusiones que surgen de esas experiencias, resulta que todas las operaciones recién mencionadas, tales como congelar nódulos, seccionarlos, separarlos de la raíz, etc, contribuyen a disminuir la producción de etileno en el ensayo. En particular Hardy et al⁸³ mostró la influencia enorme que tiene la luz sobre el grado de fijación de N_2 , al estudiar la diferente actividad presentada por las muestras de nódulos cosechadas en forma diurna o nocturna, o según Bergersen¹⁴, de acuerdo a que el día fuese nublado o con sol radiante, interpretándose el fenómeno como debido a una modificación en la actividad fotosintética del vegetal. También fue Hardy quien en el mismo trabajo recién comentado, explica que la temperatura óptima de incubación de los nódulos y la mezcla gaseosa, está entre los 20 y 30°C aunque se dió cuenta también que los nódulos de plantas crecidos a 30°C tenían solamente el 10-20% de la actividad (medida en el ensayo de reducción del acetileno), que al comparárselos con plantas crecidas a 20°C. Además, pudo explicar que la magnitud de la fijación de N_2 era baja hasta el período de floración, incrementándose entonces la necesidad de nitrógeno atmosférico momentanea

mente, para luego caer rápidamente.

Para agravar la situación, no existe en nuestro país un servicio oficial de contralor para los productos de fábricas parti-culares o de los inoculantes importados ⁸⁷, pues si existiese se podrían utilizar sus normas como criterios de eficiencia. Resulta que por Ley 14.244/953 el contralor es obligatorio, pero el decreto 23.960/953 establece que la comercialización de inoculantes puede efectuarse mediante la certificación de calidades (propiedades, aplicaciones, dosis, nada mas) por un Ing. agrónomo. Las prescripciones del decreto mencionado se aplican y ajustan conforme a la reglamentación dictada por el ministerio de Agri-cultura y Ganadería (resolución 1396/954).

Como vemos, no existe ningún parámetro que sea confiable en un ciento por ciento para medir la eficiencia de un inoculante. En este trabajo se va a comparar la altura de las plantas; su peso húmedo o seco; el tipo de nodulación y la cantidad o el peso de la misma; la fijación de N₂ por la técnica de reducción del acetileno; la distribución de nitrógeno en distintas partes del vegetal, y las características visuales de las plantas, en dis-tintos ensayos realizados con semillas inoculadas con caldos de cultivo de Rhizobium, o inclusive con semillas sin inocular, para que sirvan de Testigos ante otros ensayos en que se pretende demostrar el efecto que han tenido diferentes métodos de preparación, almacenamiento, o manipulación, de sendos inoculantes pre-parados "ad hoc" contemplando esas variables.

1.IV.b. Revisión sobre disponibilidad de turbas argentinas

La turba es una sustancia compuesta de restos vegetales que han sufrido un proceso de lenta descomposición incompleta en ambientes saturados de agua. Su color varía desde el castaño rojizo al negruzco. Una vez seca al aire pesa alrededor de 180 Kgr/m³, quemando entonces facilmente, con un poder calorífico medio de 3500 a 4500 calorías.

Las turberas argentinas son de dos tipos: las de cuencas, que se desarrollan en áreas depresivas o en las márgenes de lagunas, y las de valle, formadas subparalelamente al cauce de ríos o torrentes.

Mientras que las turbas que se desarrollan al norte del paralelo 52 están constituídas esencialmente por restos de gramíneas, las del sur del mencionado paralelo se componen principalmente de restos de musgos y ciperáceas (Sphagnum sp; Carex sp.)

Se supone que las turberas se originaron en la era Cuaternaria, mas exactamente en el Holoceno, y por eso son post-glaciales; algunos investigadores calculan que han comenzado a formarse hace alrededor de 9000 años.²¹

Si bien en nuestro país existen depósitos de turba en casi todas las provincias lindantes con la cordillera de los Andes, a mas de Corrientes y Misiones y las Islas Malvinas, se considera a los depósitos de Tierra del Fuego e islas vecinas como los mas importantes, representando la casi totalidad de las reservas turbíferas conocidas.⁴⁵

Entre los años 1947 y 1957 los técnicos de Combustibles Sólidos exploraron en el territorio de Tierra del Fuego 62 turberas que abarcan una superficie total de unas 23000 hectáreas, con un espesor medio de alrededor de 3 metros, siendo las mas importantes entre ellas las denominadas San Luis, Libertador General San Martín, y El Taruco.

En Mendoza, en la precordillera o aún en la misma cordillera, se encuentran algunos depósitos que se caracterizan por su alto contenido de estéril, sobre todo los yacimientos comprendidos entre Tunuyán y Yauya, habiéndose intentado usarla localmente como aireador y fertilizante.¹⁵⁸

En este trabajo se utilizarán turbas procedentes de Tierra del fuego, debido a que constituyen la mayor reserva natural en nues

tro país, y no existen muchos antecedentes de su uso en la fabricación de soportes para inoculantes de leguminosas.

Internacionalmente no hay un criterio unificado respecto de cual es el soporte óptimo para servir de habitat temporario del Rhizobium. Depende mucho de los materiales disponibles en cada país, y del exacto conocimiento que se tenga de ellos, como para entonces poder estimar a-priori las ventajas o desventajas de cada uno.

En Argentina existen abundantes yacimientos de turba, que tal como se explicó recién, o directamente casi no se explotan industrialmente (Tierra del Fuego), o en todo caso, solo se la utiliza como combustible fósil (Islas Malvinas) o sino como constituyente inerte para adicionar a los suelos (Mendoza).

Es el objetivo de este trabajo, el estudiar a través de parámetros físico-químicos y biológicos, al material extraído de una turbera fueguina, para luego considerar su comportamiento como receptáculo de una población bacteriana, en un intento de dar solución al déficit de conocimientos que se tiene en el área de soportes de inoculantes; Siendo éstos tan imprescindibles para incrementar el potencial agronómico de cualquier país, casi no se explica que hasta el presente no se hayan publicado trabajos en los que partiendo de un microorganismo aislado directamente del área sojera (mediante técnicos del INTA), adaptando la cepa al crecimiento en medio líquido agitado mecánicamente; seleccionando mediante pruebas apropiadas aquellas bacterias que presenten buena infectividad y alta actividad nitrogenásica; estudiando soportes de origen nacional; y por fin analizando las mejores condiciones de almacenamiento del material impregnado, no se haya podido concluir la metodología mas apropiada para la preparación de inoculantes.

Aquí no solamente se pretende hacer todo eso, sino también complementarlo con ensayos agronómicos donde se pueda testear a cada lote de inoculantes preparados bajo diferentes condiciones, y poder por fin concluir cual es el modus-operanti mas conveniente para poder maximizar las bondades de estos "fertilizantes biológicos".

2. MICROORGANISMO

El género *Rhizobium* comprende dos grupos bien diferenciados en lo que respecta a su velocidad de crecimiento: especies de crecimiento lento y especies de crecimiento rápido. Entre las primeras nos interesa el *Rhizobium japonicum*, bacteria gram negativa que tiene entre 1 y 3 micrones de largo y de 0,5 a 0,8 micrones de ancho. Parecería que algunas cepas pueden modificar su morfología pasando de la forma bacilar a la de coco-bacilo, de acuerdo a que se transfieran de un medio de cultivo con manitol a otro con glic¹⁰⁰erol como fuente de carbono.

Se sabe que el *Rhizobium japonicum* puede almacenar gránulos de beta-hidroxibutirato, que le servirían como reserva energética, y que el microorganismo puede sintetizar un polisacárido extracelular, que según H. Bray (1944)²³ sería un polímero de glucosa y ácido glu⁵⁷curónico con uniones alternadas 1,3 y 1,4, cuyo polímero le serviría como defensa contra protozoos del suelo u hongos.

La cepa E-45 que se utilizó en estas experiencias, fue aislada del área sojera argentina por técnicos del INTA, y se caracteriza por nodular muy bien sobre *Glycine max* (entre otras, las variedades Lee y Halesoy) y pobremente sobre algunos *Phaseolus*.

Todavía no se sabe bien porqué algunos *Rhizobium* fallan en nodular algunas especies, y en cambio son tan efectivos sobre otras.

D. Hubbell y H. Elkan (1966) trataron de correlacionar las características fisiológicas del microorganismo con la habilidad de nodular del *Rhizobium japonicum*, encontrando que aquellos mutantes que forman una gran cantidad de polímero capsular, que no metabolizan nitrito, o que no reducen al 2,3,5-trifeniltetrazolium (un aceptor electrónico artificial), pueden nodular sobre soja mejor que aquellos microorganismos que aún conservan intacto el sistema de las deshidrogenasas y por lo tanto reducen al aceptor electrónico o metabolizan nitrito.

Cuando un *Rhizobium japonicum* invade las raíces de la soja, origina la aparición de leg-hemoglobina en el interior del nódulo. Actualmente se sabe que la planta contribuye con el genoma para producir ese pigmento respiratorio que controla la tensión de oxígeno intranodular, mientras que el microorganismo aportaría además los genes NIF, de cuya desrepresión resultaría el sistema de la Nitrogenasa, cuya regulación va a depender en forma directa del sistema de la glutamino-sintetasa bacterial, y en forma indirecta

de la glutamato sintetasa'. Entre ambas se conseguirá regular la actividad fijadora de nitrógeno del microorganismo, de tal forma de asegurar el suministro de intermediarios nitrogenados para su propio uso y para el de la planta de soja, que así podrá contar con materia prima para sintetizar proteínas vegetales.

También se sabe que el reconocimiento mutuo de ambos simbiontes (el microorganismo y el vegetal) está controlado por las lectinas de la planta,¹⁹ que reaccionarían con uno de los extremos de la bacteria, reconociéndola a través de su polisacárido extracelular, según Dudman⁵⁸, o a través de la cubierta lipopolisacárida, según Wolpert y Albersheim¹⁹⁰.

Algunos exudados de las raíces de soja contribuirían a incrementar la velocidad de crecimiento del Rhizobium,^{41,131,142} inclusive in vitro¹⁵⁴, mientras que el catión sodio o la glicocola, entre otros, contribuirían a actuar como factores tóxicos para el microorganismo.

Cuando joven el Rhizobium es móvil, aunque al envejecer pierde la capacidad de traslación.

Tiene una baja demanda de oxígeno,¹⁰² razón por la cual puede llegar a desarrollar muy bien en fermentadores de gran volumen, con buena agitación.

3.I. MATERIALES Y METODOS

3.I.1. Medidas de la concentración celular

- a) Técnicas Turbidimétricas: La densidad óptica de las suspensiones celulares fue determinada utilizando un fotocolorímetro espectrofotómetro "Spectronic 20" a 625 nm. Como diluyente se utilizó agua destilada, agitando bien para homogeneizar el posible polisacárido.
- b) Técnicas de recuento de microorganismos viables: El recuento de células viables se efectuó por el método de dilución y siembra en cajas de Petri conteniendo agar Rhizobium. Como diluyente se utilizó solución fisiológica (al 8,5% de ClNa). Una vez sembradas las placas se incuban invertidas a 30°C y por unas 140-160 horas, cubiertas con papel de diario para evitar la luz y conservar mejor la humedad natural de los medios.

3.I.2. Medida de pH

El control de pH en los medios de cultivo se efectuó utilizando un peachimetro Metrohm E 396 B, calibrándolo con buffer fosfato (pH=6,75) antes de cada tanda de medidas.

3.I.3. Control de contaminantes

Como control de pureza de los medios de cultivo, se efectuaron observaciones microscópicas directas de preparados en contraste de fases y coloreadas por la técnica de Gram aconsejada para Rhizobium (Tchan, citado por Vincent, 1970). Se efectuaron además siembras de los caldos en tubos inclinados con agar-Glucosa-Peptona, un medio de cultivo mínimo donde al cabo de 48 horas casi no crece el Rhizobium, aunque sí producen abundante desarrollo los contaminantes más comunes. Ocasionalmente se enfrentaba al microorganismo en estudio con semillas de soja seleccionadas, verificando que no se había aislado una especie no deseable, pues estos ensayos son específicos para el par leguminosa-especie microbiana infectante.

3.I.4. Determinación del tiempo de generación

El tiempo de generación fue calculado en la fase de crecimiento logarítmico en base a la siguiente ecuación:

$$g = \frac{\ln 2 (t - t_0)}{\ln x - \ln x_0}$$

en que g = tiempo promedio necesario para que se duplique la masa celular, o sea el tiempo de generación
 $x-x_0$ = aumento de la masa celular en el tiempo $t-t_0$.

3.I.5. Determinación de la velocidad específica máxima de crecimiento

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\ln x - \ln x_0}{t - t_0}$$

(Viene dado en unidades de h^{-1} . Aquí x , x_0 , t , t_0 , tienen el mismo significado que en el apartado anterior).

3.I.6. Humedad en las turbas inoculadas

Trabajando en condiciones estériles se efectuaba un corte en diagonal sobre una de las esquinas de la bolsa con inoculante, utilizando una tijera desinfectada con alcohol de 75°. Se echaban unos dos gramos del contenido de la bolsa en un pesafiltro previamente tarado.. Por diferencia se obtenía la cantidad exacta de inoculante, y luego de colocar en estufa a 105 grados centígrados durante 48 horas o hasta pesada constante, se calculaba la humedad en base a la pérdida de peso sufrida, expresándose el resultado en porcentaje de humedad retenida. (sobre peso húmedo).

3.I.7. Acidez de intercambio de las turbas inoculadas

Se colocaron 2 gr⁺ o,1 del inoculante en cuestión sobre 99 ml de solución fisiológica (al 8,5‰ antes de esterilizar), agitándose por 1 hora en un shaker rotatorio de 2,5 cm de excentricidad. Se hizo uso de un peachímetro Metrohm E396B.

3.I.8. Determinación del contenido de nitrógeno total, en plantas de soja.

- a) Se utilizó el método de macro-Kjeldahl modificado por Bremner (1965)²⁴ y posteriormente adaptado por Peterson y Chesters para muestras de origen vegetal.
- b) Se ensayó el método enzimático con ureasa para determinar amonio en el producto de la digestión sulfúrica de Kjeldahl. La técnica en sí es fotolorimétrica por formación de Azul de Indofenol (Fawcett and Scott modificada por Searcy y col., 1963) Se utilizaron reactivos estabilizados Wiener lab..

3.I.a. Medio de cultivo empleado en el caldo de producción:

En base a la bibliografía consultada, se optó finalmente por trabajar con una formulación modificada del medio citado por Lopreto y Balatti.¹⁰³ Fundamentalmente se incrementó la concentración de $\text{PO}_4(\text{NH}_4)_2\text{H}$, disminuyéndose la de ClNa . Se optó también por el agregado de Ca^{++} , pues la pequeña turbiedad que pudiere causar al reaccionar con algunos componentes del entorno, no es óbice para descartarlo de la composición del medio. La fórmula del medio utilizado en los caldos de producción se muestra en la tabla 3.I.

Para utilizar harina de soja como aditivo de los medios de cultivo, se pesaron 7 gr. de aquella que pasase tamiz 100, echándose o bien sobre 150 ml de una sol. 0.1 N de HCl; o 0,1 N de NaOH; o si no directamente sobre ese volumen de agua destilada, procediéndose entonces a calentar durante 1 hora en autoclave con espita abierta, de tal forma de facilitar la hidrólisis, ácida, alcalina o neutra, respectiva.

Tras enfriar, se determinó el pH, encontrándose que era de 1,3 para el matraz donde se había realizado la hidrólisis ácida, mientras que en aquel donde se había utilizado sólo agua el pH era de 6.5, y donde se produjo una saponificación, de 11,5.

Los olores y colores respectivos de cada solución fueron: aceitoso - sulfuroso y blanco sucio; olor a soja y color blanco; u amoniacal y amarillo-pardo.

Cuando se utilizó harina gruesa, esto es, el producto originado en la molienda sin tamización previa, se pesaron 40 gr del material grosero ("harina"), colocándolos sobre 400 ml de ácido clorhídrico 0,1 N; o NaOH 0,1 N, o H_2O destilada, calentándose en todos los casos por dos horas a vapor fluente.

Los pH respectivos fueron de 4,5; 10,3 y 8,3, gastándose 2,2ml de HCl 1N para dejar el pH final en 6,8, detectándose al mismo tiempo la liberación de sulfhídrico.

Se agregó al medio de cultivo 10 ml de cualquiera de estas soluciones llevadas a pH 6,8 y centrifugadas con la Centrífuga Chriss a 4500 rpm por 10 minutos (donde solamente el hidrolizado ácido quedó límpido; los otros dos presentaban

una turbiedad manifiesta, tal vez debida a la presencia de micelas de jabón o de grasas no completamente hidrolizadas).

O sea que debido a que no se habían eliminado los lípidos de los porotos con los que se fabricó la harina, continuamente existía una capa oleosa flotando en los caldos, que se fue haciendo cada vez menos evidente a medida que avanzaba el proceso o que aumentaba la producción de polisacárido debido a los microorganismos.

En lo que respecta a los surfactantes, se encontró que tras esterilizarlos junto al medio de cultivo, en el caso de utilizarse Tritón-100 aparecían gotas; con el Tween-80, una turbiedad generalizada; y de haberse utilizado el oleato de sodio como tensioactivo, aparecía en los caldos un color amarillo bastante marcado, bien diferente del originado por el hierro (férrico) o el extracto de levadura que entran en la composición de los medios de cultivo.

Los problemas del tritón de tender a formar otra fase, o del Tween que tiene un "punto nube" característico, ocurren sólo en caliente, desapareciendo al enfriarse los erlenmeyers, sobre todo después de agitarlos durante unos minutos.

El inconveniente del oleato es que el aumento del color amarillo, originado posiblemente por la emulsificación del ácido oleico, dificulta las lecturas iniciales de la D.O., y por eso existe cierta incertidumbre para los primeros puntos de la curva. Además se verificó la precipitación de jabones insolubles, lo que también juega en detrimento del proceso.

3.I.b. Preparación del preinóculo:

Partiendo de cepas liofilizadas provenientes de experiencias anteriores, o de repiques en medio sólido cedidos originalmente por el INTA de Castelar, se sembraron erlenmeyers de 200 ml de capacidad conteniendo 40 ml de caldo líquido, cuya composición se indica en la Table 3.I.

A las 70/80 horas (en que la DO_{625} era cercana a 1,00 y el pH por lo general estaba en el intervalo 7,2 - 7,4), se sembraba el medio de inóculo, al 10%.

Preparación del inóculo:

Se trabajó en erlenmeyers de 1000 ml de capacidad con 200 ml de medio líquido de igual composición que el anterior.

El inóculo se agitó e incubó en las mismas condiciones operativas que el preinóculo. Por trabajar con volúmenes mayores se disponía de una cantidad también mayor de caldo, obtenido en condiciones estandarizadas y con composición homogénea, cosa que no se hubiese logrado de haberse tenido que iniciar cada proceso con el inóculo proveniente de varios erlenmeyers.

Tabla 3.I.

Composición de los medios de cultivo utilizados:

(Modificado del medio Lopreto)

Medio base:

PO_4HK_2	0,5 gr
$SO_4Mg.7H_2O$	0,2 gr
ClNa	0,05 gr
SO_4Mn 10%	2 gotas
Cl_3Fe 10%	2 gotas
Cl_2Ca 10%	1 gota
NO_3K	0,8 gr.
$PO_4H(NH_4)_2$	0,5 gr
Agua c.s.p.	1 litro

Medio pre-inóculo o inóculo:

Al medio base se agrega:

Extracto de levadura (polvo seco)	1,0 gr
Glicerol	10,0 gr

Medio de producción:

Al medio base se agrega:

Extracto de levadura (polvo seco),	4,0 gr
Glicerol o Manitol,	10,0 gr.

Segunda etapa con medio de producción:

Al medio base se agrega:

Extracto de levadura (polvo seco),	6,0 gr
Glicerol	20,0 gr

Medio sólido de mantenimiento, o de placas para recuento:

Al medio base agregar:

Extracto de levadura (seco)	1,0 gr
Manitol	10,0 gr
Rojo Congo 1:400	10 ml/litro.

NOTA: en todos los casos el pH se ajusta a 6,9 antes de esterilizar.

3.I.c. 1) Ajuste de las condiciones operativas, utilizándose erlenmeyers con medio de producción:

Se trabajó en escala de erlenmeyers agitados, de 1000 ml de capacidad con 200 ml. de caldo, a 250 rpm en un shaker de 2,5 cm de excentricidad, incubándose a 30°C y sacándose en condiciones de esterilidad las muestras de caldo sembrado para estudiar el desarrollo del microorganismo.

✓ Todo el manipuleo se realizó con tansa de Pt esterilizada a la llama, y para el caso de líquidos, con pipetas de capacidad apropiada, esterilizadas en autoclave a 121°C durante 20'. Todos los erlenmeyers utilizados en este trabajo (Preinóculo- Inóculo - Medio de Producción) se taparon con tapones de algodón recubiertos con gasa.

La esterilización se realizó sobre el medio completo (sin separar sus componentes) autoclavando a 125°C durante 15', verificándose que este acortamiento en el tiempo de retención, no perjudicaba la esterilidad requerida.

Se hizo un estudio sobre la conveniencia o no de modificar la relación " vol. de medio contenido/vol. del continente", trabajando con agitación constante. Se colocaban diferentes volúmenes de medio líquido, en frascos de capacidad adecuada, siguiéndose luego la evolución del proceso a través de la DO y el pH.

Se determinó la temperatura óptima de crecimiento en medio líquido para la cepa E-45 en estudio (utilizándose tanto caldos con Manitol como con Glicerol) para lo cual simplemente se varió la temperatura del cuarto-estufa tras cada tanda de procesos. Se trabajó en el rango de 26-31°C.

Se estudió la influencia de la luz (proveniente de un tubo fluorescente de 40W, a 2 m de distancia), incidiendo en forma aproximadamente perpendicular sobre las paredes del erlenmeyer. Para recubrir los testigos se utilizaron "cucuruchos" de papel opaco que se fijaba con cinta adhesiva a la parte anterior del fondo de los anchacos, evitando así que estos cueros de papel se caigan con el vaivén del shaker.

3.I.c. 1') Estudio de la disminución de viables en Erlenmeyers luego de entrar el proceso en la etapa de decaimiento logarítmico.

X Utilizando medio de producción y manteniendo las condiciones operativas mencionadas en 3.I.c.1) se siguió la evolución del pH, DO₆₂₅ y viables/ml.

Un lote de matraces se dejó todo el tiempo en el shaker, mientras que otro grupo se dejó en reposo, a temperatura ambiente. Cuando había que sacar muestra de este último, para recuentos o controles, se agitaba manualmente unos minutos para resuspender las células.

3.I.c. 2) Procesos a nivel de tanques agitados: (VER Fig. 3.I.)

Las condiciones operativas se fijaron en base a trabajos anteriores , y luego se ajustaron las variables tomando como referencia el comportamiento de testigos en Erlenmeyers sembrados con la cantidad conveniente del mismo inóculo que se hubiera utilizado para sembrar los tanques, operándolos en las condiciones óptimas encontradas anteriormente, y que fueron citadas en 3.I.c.1.

Los datos finales con los que se obtuvieron los inóculos para la Planta Pilotó son los siguientes:

Unidad de fermentación New Brunswick integrada por 3 fermentadores de 7,5 l. de capacidad, provista de accesorios para el control de la temperatura, velocidad de agitación, presión y caudal del aire. En todos los casos se emplearon 3 l. de medio de cultivo con la composición indicada en 3.I.1. La relación entre la altura del líquido y el diámetro del fermentador fue de 1.

El aire de entrada, suministrado por un compresor auxiliar, se hacía pasar por una trampa de aceite, un prefiltro de algodón y un filtro de material fibroso (lana de vidrio) esterilizable a 121° y por 30' y secado a 110°C por 3-4 horas. El aire de salida del equipo se hacía burbujear en una solución débil de formol, a la que se había agregado antiespumante hasta una concentración del 5% de SAG 471, actuando simultáneamente como trampa de espuma y tapón hidráulico para evitar la transferencia de sustancias no deseables entre el

exterior y el interior de los tanques de fermentación.

La temperatura se fijó en 30°C.

El regulador de la presión de aire del equipo de fermentación se ajustó a un valor de 10 libras y el caudal de aire se fijó mediante el caudalímetro en 1,5 litros / minuto.

No se realizó control automático del pH de los caldos por cuanto el medio de cultivo base tiene capacidad buffer debida a los fosfatos. Al igual que en los erlenmeyers, el pH inicial antes de esterilizar se ajustaba a 6,8, de tal forma que a las 70/80 horas de proceso estuviese comprendido en el rango de 7,6 / 7,8.

Si bien el *Rhizobium japonicum* no se caracteriza por espumar los caldos, se utilizó un sistema manual de control de espuma, cayendo por gravedad desde el recipiente colector, graduado en ml, hasta el tanque de fermentación al cual está conectado. Como antiespumante se utilizó SAG 471 al 5% en agua destilada, esterilizada junto al tanque de fermentación 15' a 120°C.

El sistema de agitación (4 paletas planas unidas a un eje vertical) se ajustó para que girase a 275 rpm.

En todos los casos se utilizaron inóculos de 70 / 80 horas, sembrados al 8 / 10 %, previa constatación de la no existencia de contaminantes o formas aberrantes, mediante las técnicas descritas en 3.I.3.

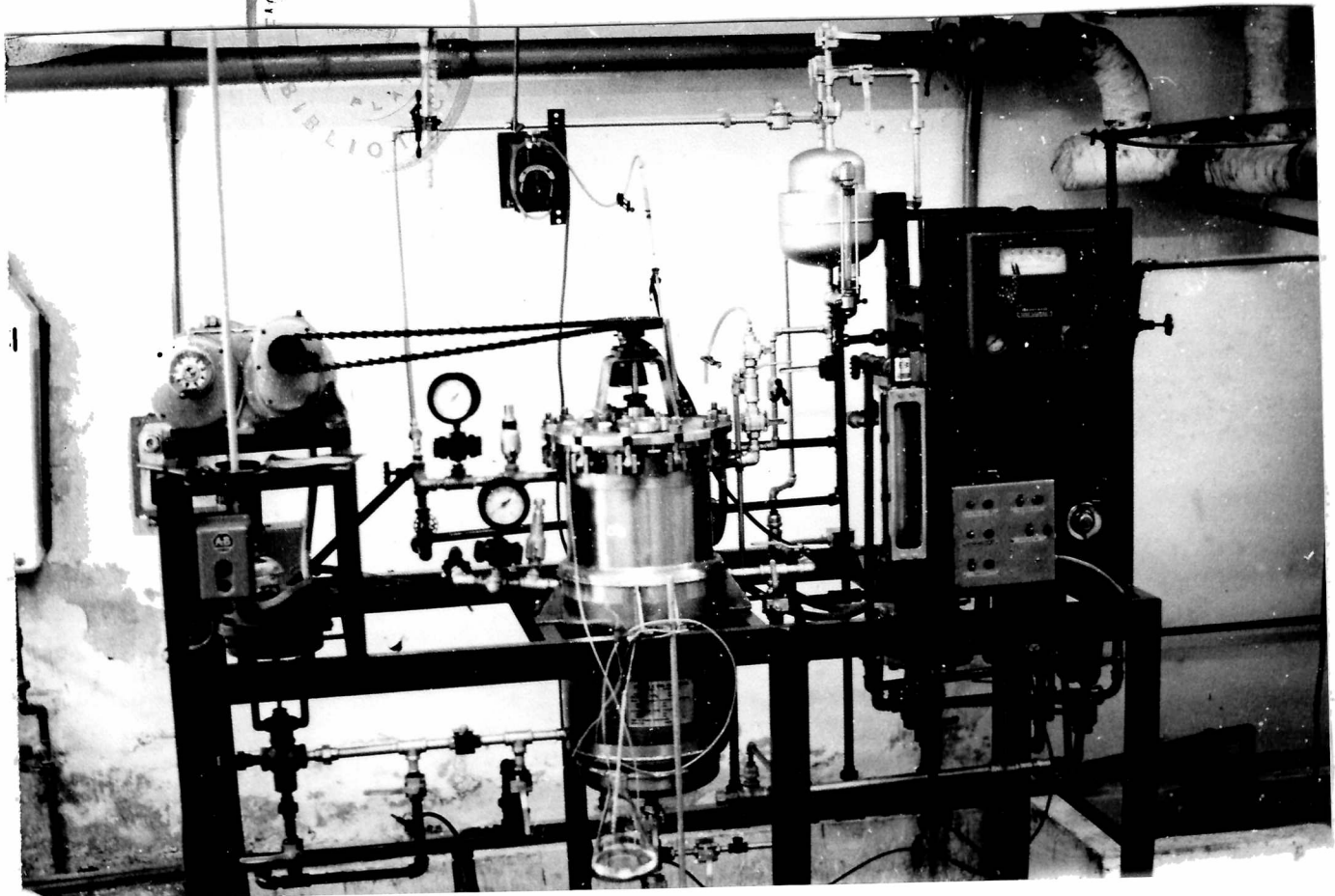
A algunos tanques se los siguió operando aún después de haberse obtenido los picos de DO o de viables, con el objeto de estudiar la supervivencia del microorganismo. Una parte de las alícuotas del medio líquido se guardó en frascos de Mariotte estériles y estáticos, a T° ambiente; el resto permaneció agitando, aireándose y a 30°C , como se venía haciendo en el proceso.

3.I.c. 3) Trabajos en la Planta Piloto:

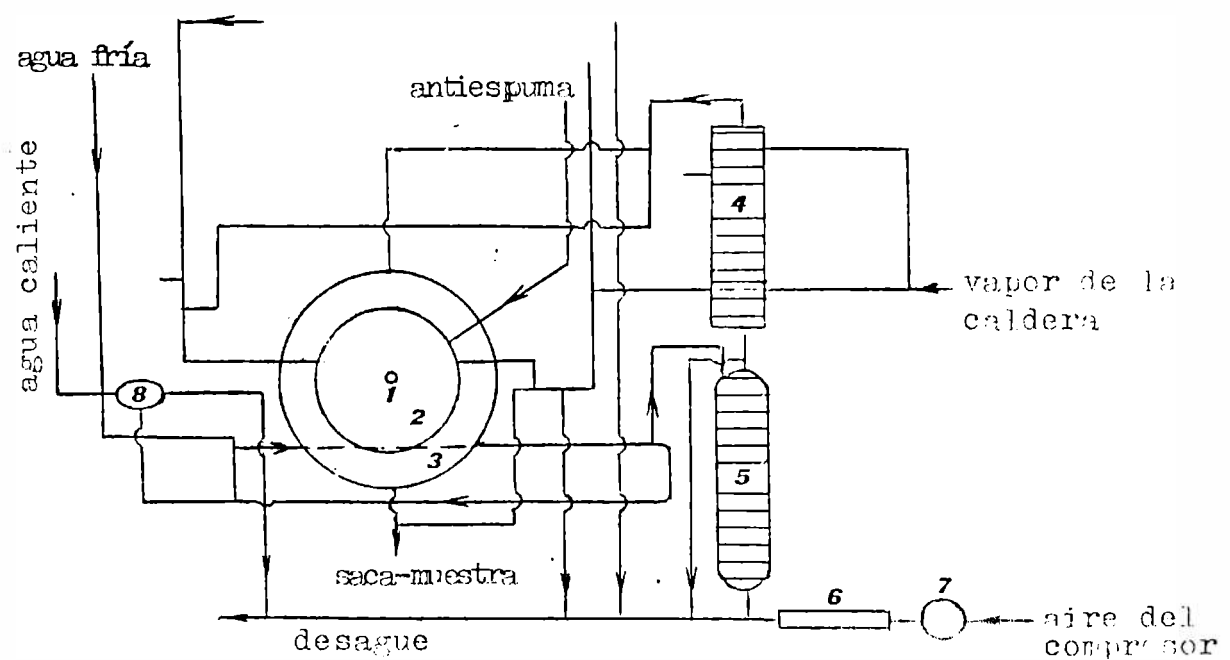
Se utilizó el medio de producción previamente indicado para tanques agitados que sirvieron de inóculo a este proceso, sembrándose al 10 % cuando tenían 30 horas de edad.

La temperatura estaba ajustada a 30°C, y las relaciones de agitación y aereación equivalentes a lo que se venía haciendo antes del cambio de escala, se obtuvieron de gráficos y tablas 'ad hoc' que son provistas como: Manual de Operación de Planta Piloto. (VER un esquema de la misma en la Fig 3.I.c)

Figura 3.I.c.



1. Arbol de agitación; 2. Fermentador; 3. Camisa; 4. filtro de aire; 5. humidificador; 6. flotómetro; 7. manómetro; 8. válvula mezcladora (de agua fría y caliente).

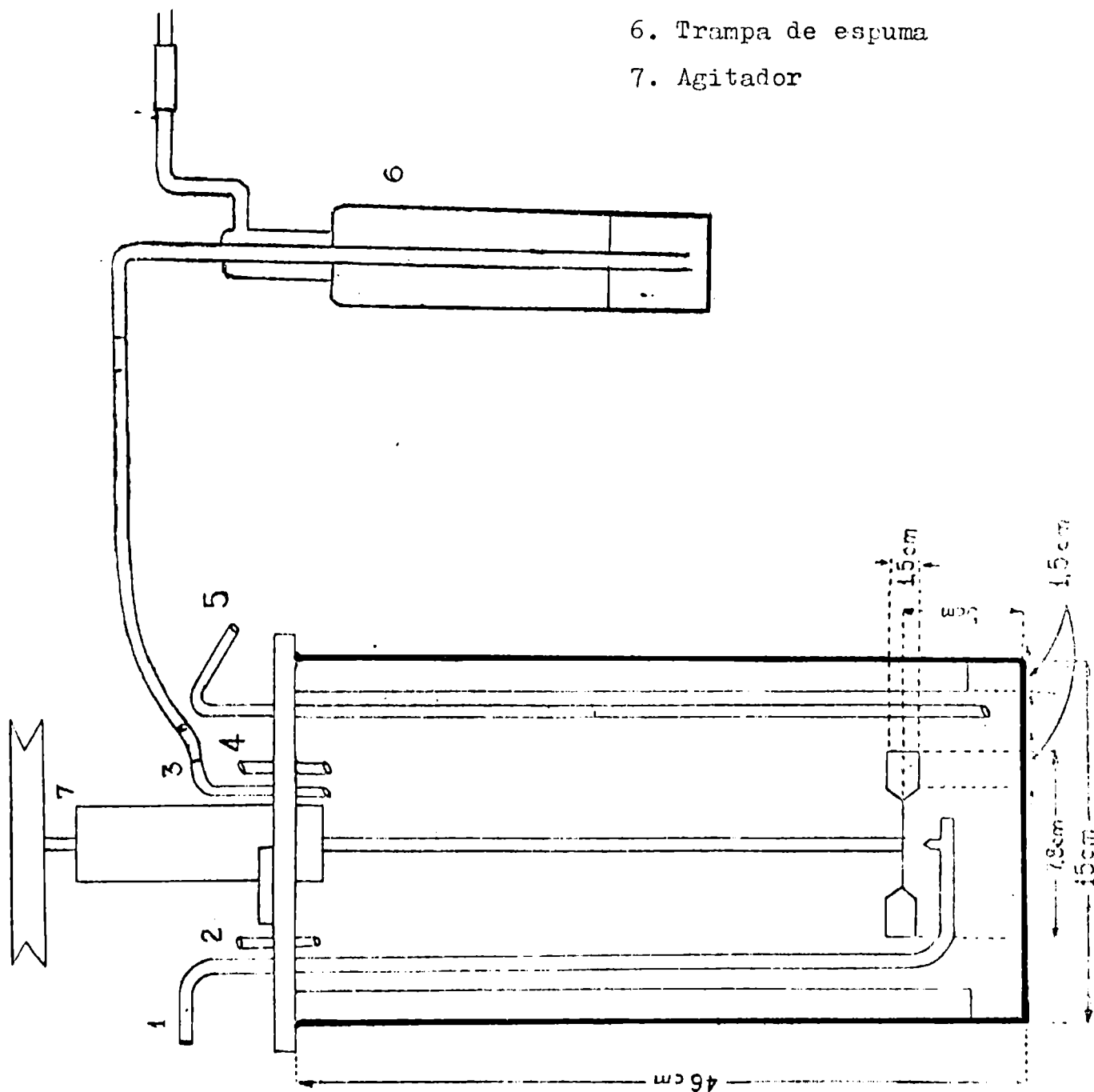


ESQUEMA DE LA PLANTA PILOTO (sin respetar proporciones)

Figura 3.1.

ESQUEMA DEL SISTEMA DE OPERACION PARA EL DESARROLLO DE RHIZOBIUM JAPONICUM EN TANQUE AGITADO:

1. Entrada de aire
2. Entrada de inóculo
3. Salida de gases
4. Entrada de antiespumante
5. Toma de muestra
6. Trampa de espuma
7. Agitador



3. II. ANALISIS FISICOQUIMICO DE LAS TURBAS

1. Humedad: Se determinó por diferencia de pesada entre la muestra en estudio y la misma muestra tras 48 horas a 105° C.
2. Acidez : Para las turbas sin inocular se midió tanto la acidez total como la de hidrólisis o de intercambio . Para las inoculadas, sólo esta última. Primeramente se buscó de estandarizar la metodología, para luego optar por colocar 2,0±0,1 gr de la muestra en 99 ml de diluyente (agua bidestilada para determinar la acidez total; solución al 8,5% de ClNa para el caso de querer determinar la acidez de intercambio). Se agitó en un agitador rotatorio por 60 minutos, utilizándose Erlenmeyers de 250 ml tapados con algodón, y luego de dejar decantar se procedía a efectuar la determinación por un método potenciométrico, utilizándose un peachímetro Metrohm E 396 B.
3. Alquitranes volátiles: La misma técnica que para determinar humedad, solo que trabajando con una muestra ya desecada y colocándola entonces a 250° C por 20 horas, permitiendo que el crisol tome la Temperatura ambiente en desecador.
4. Inertes y cenizas: Se determinaron en mufla a 600 y 1000° C respectivamente, en ambos casos por diferencia de pesada respecto del material desecado, y que en este caso se había precalcinado a temperaturas menores, para evitar la volatilización de parte de la muestra (recordemos que la Turba se utiliza en algunas partes de nuestro país como combustible). Antes de introducirse en el desecador, los crisoles se dejaban enfriar hasta unos 200°C, apoyados sobre material refractario.
5. Determinación de arena, limo, arcilla, y componentes del humus:
170

A 10 gr. de turba (pesados con su humedad natural) se les extraen sus componentes coloreados hasta que las aguas de extracción pasen límpidas, mediante agua destilada tibia acidulada con HCl.

Al residuo se lo filtra, seca y pesa, redisolviéndolo en solución acuosa amoniacal. El material insoluble está constituido por arena, quedando en la solución amoniacal la arcilla y humus. Con sol 1 N se precipitó

la arcilla, y con gotas de NO_3H concentrado se consiguió flocular al humus, que a su vez se subdividió en dos fracciones de acuerdo a su solubilidad en alcohol etílico de 96° . A la fracción húmica soluble en la fase alcohólica se la denominó ácido fúlvico e himatomelánico.

6. Detección o determinación del Fe^{+++} , Ca^{++} , y otros cationes: Se utilizó el método rápido de Zafanella^{191,192} sobre la solución extractiva primitiva (clorhídrica).
7. Poder buffer de las turbas: Disolviendo 5 gr del material pulverento en 100 ml de agua bidestilada, y tras agitar por 10 minutos, se tomó el pH inicial y luego el resultante de agregar 2, 4, 6, 8, o 10 ml de soluciones 0,1 N de HCl o 0,1 N de NaOH, agitándose hasta obtener un valor estable de pH en cada caso. El agregado de ácido o hidróxido se efectuaba sobre porciones de turba diferentes, completándose siempre hasta el volumen de 30 ml.
8. Materia orgánica y relación C/N: Se usó la técnica de Dumas para medir el Nitrógeno total de la turba, prefiriéndose un método semi-micro para la determinación del C e H. A partir del dato del porcentaje de C contenido en la muestra, se calculó la materia orgánica presente utilizando el factor 1,32. Todas las determinaciones se hicieron por cuadruplicado.
9. Determinación del diámetro de poro y de la superficie específica: Se utilizó un porosímetro a intrusión de mercurio marca "Aminco" (hasta 60000 psi), realizándose en cambio la determinación de la superficie específica por un método geométrico, en base al radio de partícula equivalente⁶⁸.
10. Granulometría: La turba que se utilizó para estas experiencias se molió groseramente en un molino de bolas, agregándose luego CO_3Ca finamente molido hasta conseguir un pH de 7,0-7,2. Este material se pasó por una zaranda vibratoria marca Shulman, con retículos de 10, 30, 50, 80, 100, 200, y nuevamente 200, hilos/pulgada².

Se repitieron los ensayos granulométricos, trabajando en escalas macro y semi-micro, para poder comparar luego los resultados.

11. Determinación del coeficiente de transmisión del calor: Una masa conocida de turba fue colocada en un recipiente de vidrio térmico de gran capacidad, poniéndose una termocupla en el centro del material pulverento, para luego compararse la T° indicada por la soldadura del elemento sensible colocada en la turba, con otra de referencia que se había calibrado previamente. La repetición sucesiva de esta experiencia, trabajando sobre una misma muestra a la que se iba humectando periódicamente (haciéndose luego una determinación de humedad en cada caso, y siempre previo a una buena homogenización), permitió medir el incremento de la conductibilidad térmica debido al aumento de humedad. Trabajando luego con volúmenes de turba diferente, se pudo determinar la forma en que se ve influenciado el avance del frente térmico en función de la distancia a través de la cual debe realizarse la transferencia de energía. Todas las medidas se hicieron por duplicado.

12. Determinación de la capacidad calorífica: Se utilizó turba sin haber separado cada una de sus fracciones granulométricas, con un 14% de humedad total, encerrada en un recipiente de aluminio de paredes delgadas y masa conocida. Se calentaba el cilindro de Al cargado con la turba hasta una temperatura uniforme de 100°C , en una caldera de tubos, a aire caliente. Inmediatamente se lo retiraba y colocaba en un calorímetro, donde se medía el incremento de temperatura de una masa conocida de agua contenida en él. Previamente se había realizado la "Marcha del Calorímetro", midiendo las pérdidas de calor del aparato para poder así corregir el resultado obtenido al considerar las pérdidas por radiación o convección.

La determinación completa de la capacidad calorífica se repitió 5 veces para luego promediarse los valores, asegurándose siempre que el cilindro no quedase flotando en la superficie del agua contenida en el calorímetro, para lo cual se lo mantenía continuamente sumergido mediante el agitador manual que forma parte del aparato.

13. Determinación de la densidad aparente y la real, para cada granulometría: Se utilizaron picnómetros de diferentes capacidades (hasta 100 ml), haciéndose cada determinación sobre porciones diferentes del mismo material, con varias repeticiones para cada una. Para rellenar el espacio entre partículas, al pretenderse determinar la densidad real de este material pulverento, se utilizó tanto agua destilada como mercurio.
14. Determinación de la capacidad hídrica de la turba, para diferentes granulometrías: Se utilizó el método de Richards , con extractores de platos, a las presiones de 1/10, 1/3, 1, y 15 bar. También se realizaron determinaciones de humedad equivalente de centrífuga .
15. Relación volumétrica Turba-aire-agua, para diferentes granulometrías: Se calculó con los datos de peso específico aparente de la turba; el volumen real de la misma y de ahí el volumen por ciento contenido en la totalidad de la muestra; el volumen de los poros, y el vol porcentual del agua y del aire contenidos en el material en estudio.
16. Determinación de tóxicos que pudiesen inhibir el crecimiento del *Rhizobium japonicum*: Se utilizó un extractivo, obtenido al colocar 10 gr de turba en 100 ml de agua, agitando por una hora, filtrando por papel, esterilizando en autoclave a 120°C por 15 minutos, y agregando entonces 10 ml a un caldo recién inoculado, siguiéndose la evolución del desarrollo microbiano a través de los parámetros clásicos de Densidad Optica, pH y recuento de viables en placa, tomándose como patrón de comparación sendos duplicados a los que no se había agregado el extracto acuoso de turba.

3.III.a. Preparación del material a ser impregnado

A la turba procedente de Tierra del Fuego, tras descabrarla de elementos macroscópicos no deseables (piedras, palitos, etc.), se procedió a homogeneizarla, consiguiendo que porciones del material de la superficie del recipiente pasase a planos inferiores, y viceversa. Entonces se procedió a neutralizar la acidez propia de este material, mediante el agregado de CO_3Ca molido muy fino y agregado hasta un pH final de 7,3 - 7,5.

Se determinó la granulometría del material, denominándose "Turba tal Cual" al material original, designándose a las otras fracciones de acuerdo a la malla con la que eran retenidas; así por ejemplo "malla 30" significa que pasó la malla 10 pero no atravesó la 30, etc. A cada uno de estos lotes diferenciados en principio por su granulometría se procedió a efectuarles determinaciones fisicoquímicas.

En particular se analizó la humedad que presentaba cada fracción (para luego poder calcular el volumen de agua requerido para llevarlo a la humedad estandarizada e idéntica para todas las muestras) así como la no existencia de efectos tóxicos sobre el microorganismo en estudio, tal como se describe en 3.II.16.

La turba se fraccionó en las bolsitas respectivas, sellándose los bordes de la abertura mediante un equipo eléctrico "Poly Sach".-

3.IIIb Métodos de esterilización del material que constituirá el soporte de los inoculantes:

Para obtener una turba estéril, sobre la que se pudiese luego colocar un cultivo puro de *Rhizobium* para constituir el inoculante, se efectuó la esterilización del soporte turboso por las siguientes técnicas:

- a) Con vapor húmedo: Se trabajó en un autoclave grande, con la turba colocada en frascos Pirex de 7 litros de capacidad y tapados con papel de diario debajo del cual había un sandwich de gasa-algodón-gasa, atado alrededor de la boca de cada recipiente. Con ese dispositivo se consigue un buen intercambio gaseoso, con la consiguiente penetración del vapor, al mismo tiempo que se impide la entrada de contaminantes una vez retirado el frasco del autoclave.

El tiempo de retención total se calculó por dos métodos diferentes: Uno de ellos biológico, para lo cual se prepararon sendos tubos de ensayo Pirex de 30 cm de largo y 1 pulgada de diámetro, con paredes de unos 15 mm de espesor, que se llenaron de turba y taparon con diario y el ya citado sandwich gasa-algodón-gasa, reproduciendo lo que se había hecho con los frascos de 7 litros de capacidad donde se esterilizaría la turba a granel.

Tras cada ciclo de esterilización de 15 minutos a 121°C, se abría el autoclave y se extraían 2 de esos tubos, procediéndose entonces a determinar la humedad existente a diferentes profundidades, así como un recuento de viables en placas de Petri, utilizándose tanto el medio típico de *Rhizobium*, como aquel que fue citado en 3.I.3. como medio de control de contaminantes. A medida que disminuía la probabilidad de encontrar algún microorganismo sobreviviente, se iba incrementando la cantidad de turba (hasta llegar a 4 gr) que se suspenden luego en 99 ml de solución al 9‰ de ClNa, constituyendo la primer dilución de una serie en que todos los Er-

lenmeyers tienen 99 ml (de tal forma de obtener una dilución 10^{-2} en cada uno), y tras lo cual se plaquearía por triplicado.

El otro método para determinar el tiempo de retención total en el autoclave a 121°C , consiste en calcularlo teóricamente a partir de los datos de la densidad del material, la capacidad térmica, y el coeficiente de conductibilidad térmica, sabiendo además como varía cada uno de estos parámetros con el incremento de la humedad, resultante de las condensaciones habidas en las compresiones-descompresiones que se originan en cada ciclo de esterilización.

Como control accesorio, se colocó una termocupa en el interior de uno de los vasos de 7 litros, para verificar que efectivamente se había alcanzado la T° deseada.

b) Con Oxido de Etileno: Aquí la esterilización se efectuó de dos formas distintas, utilizándose en ambos casos como control de efectividad de la operación, el viraje del color de unos papeles Testigos que se venden para ese propósito, marca "Gas-Chex".

b_I) Turba envasada en bolsitas de polietileno: De 15 micrones de espesor, conteniendo 250 gr del soporte convenientemente acondicionado (o sea ya molido y neutralizado con CO_3Ca).

En este caso se utilizó una cámara con la temperatura regulada entre los 30 y los 40°C , que tras cargarse con las bolsitas que se querían esterilizar, se descomprimía hasta una presión de 100 mm de mercurio, llenándose entonces la cámara con una mezcla de Oxido de Etileno y Freón (9+1) hasta una sobrepresión final de 0,5 atmósfera. Tras un tiempo de retención de una hora se purga el aparato, eliminando los gases utilizados para esterilizar, haciendo vacío nuevamente a 100 mm de mercurio y repitiendo dos veces esta operación. También se esterilizaban aquí bolsas vacías de diferentes espesores, para luego envasar la turba que se hubiere esterilizado por vapor, o aquella que no se había este-

rilizado en absoluto.

b_{II}) A granel: Se trabajó en cilindros de aluminio con baffles, de 40 l de capacidad pero cuidando de no llenarlos con mas de la mitad de su volumen con el polvo de turba que se quería esterilizar.

La operación es muy similar en cuanto a condiciones operativas, que lo dicho para el caso anterior, recomendándose aquí también una concentración de Oxido de Etileno de 500/900 mg/ml como la mas efectiva. Tal vez la única diferencia resida en que aquí el sistema se mantuvo en agitación sobre rodillo durante cinco horas a 25° C.

c) Con radiaciones gamma: Se utilizaron bolsas de 80 micrones de espesor, conteniendo 100 gr de turba cada una.

También se agregaron algunos paquetes de bolsas vacías, de 80 micrones de espesor, para servir posteriormente como continente de turbas esterilizadas por otros procedimientos.

El material recibió una dosis de $4,5 \times 10^6$ rads, siendo procesado en la Comisión de Energía Atómica de Ezeiza.

Como control suplementario, se hizo en este caso una determinación de radiactividad residual, utilizándose un contador Geiger perteneciente al Departamento de Física Atómica de la UNLP.

d) Una parte de la turba ya procesada, se envasó e impregnó sin haberla esterilizado previamente, para servir como control comparativo de los otros métodos de esterilización,

3.III.c. Impregnación de los soportes turbosos

Con los caldos obtenidos en 3.I.c.2. y 3.I.c.3 (previa determinación de viables y controles), se impregnaron en total 48 paquetes de Turba, (reservándose el resto de líquido para las experiencias descritas en 3.I.c.2.).

Se utilizó una jeringa de 30 ml de capacidad con aguja N°8, (previamente esterilizadas a 121°C por 30') con la cual se pinchaba una manguera estéril (que se iba desinfectando exteriormente con alcohol 75 % antes de cada serie de impregnado), y que provenía de un frasco de Mariotte preesterilizado donde se iba colocando el caldo de impregnación.

Se daban tantas inyecciones a las bolsas como fuese necesario para alcanzar la humedad final requerida.

(Previamente se habían dado inyecciones con agua estéril para equiparar el tenor de humedad en todas las turbas y además evitar que el calor de hidratación pudiese perjudicar a los Rhizobium. En otros casos se reemplazó el agua o una solución salina débil, por caldos de cultivo del tipo de los usados como preinóculo, a los fines de humectar a priori las turbas).

Inmediatamente de colocadas las inyecciones de caldo (tratando de no rasgar las bolsas y de hacer coincidir cada pinchazo sobre el precedente, para evitar los riesgos de una contaminación prematura), se malaxaba entre los dedos el sistema bifásico de cada bolsa formado por "barro" de turba y caldo de impregnación, hasta que pareciese visualmente homogéneo. Entonces se dejaba reposar cada bolsa por una hora repitiéndose la operación de manipuleo de las bolsas para terminar de homogeneizar.

Hasta este momento todavía se venía haciendo las operaciones bajo flujo laminar horizontal de aire estéril, con una velocidad de 90 pies/minuto \pm 2; se aprovechó para tomar la muestra de la hora cero.

Para estudiar el efecto del espesor de pared de las bolsas en el control de la pérdida de humedad y el consecuente decaimiento de viables, en algunos casos se colocaba

sobre la primera bolsa una segunda (no estéril, opaca o no), recubriéndose el conjunto con doble capa de papel de diario seco cuando se quería que el almacenamiento de la turba impregnada fuese en la oscuridad.

El conjunto de bolsas se colocó a temperatura ambiente en una caja de cartón suficientemente grande, tapada con un nylon, donde permanecieron por 5 días, tras los cuales se realizó una nueva toma de muestra, procediéndose recién entonces a separarlos en dos grandes grupos: aquellos que se almacenarían en la heladera, a granel, en una caja de cartón con un plástico suelto encima para evitar el goteo del congelador; y el lote de las turbas conservadas en cuarto estufa a 30°C, colocándose cada bolsa sobre una mesada azulejada, a 2 metros y al costado del tubo fluorescente de 40 W mencionado en 3.1.c.1, evitándose especialmente el solapamiento entre las turbas o la interferencia de la radiación luminosa para aquellas que debían recibir luz a través del polietileno que componía las bolsas.

Cada 15 días se procedía a homogeneizar los paquetes (tanto de la heladera como del cuarto estufa) para mover su contenido y evitar la existencia de gradientes térmicos, consiguiendo así mayor uniformidad en los resultados.

3.IV. METODOLOGIA EMPLEADA EN LOS ENSAYOS AGRONOMICOS

3.IV.a. En cámara climatizada

Se utilizó una cámara de mampostería, de planta rectangular, de 300 por 460 cm efectivos y 212 cm de altura hasta un ciclorraso deslizable hacia arriba o abajo, conteniendo una rejilla metálica sobre la que se colocan tubos "Gro-Lux" de 40 W c/u, ubicados a 10 cm uno del otro.

Esta cámara tiene una habitación auxiliar, con techo de losa, de planta rectangular de 180 cm por 240 cm, que funciona como "Cuarto de Máquinas", pues en ella se ubican los equipos de refrigeración o calefacción, el panel de reactancias de los tubos fluorescentes, los ventiladores y humectadores, y el panel de control de los ciclos de T, luz y humedad que se fijan para el día y la noche recreadas artificialmente. En este caso se hicieron todos los ensayos con ciclos de 28-13°C de Temperatura (diurna y nocturna), con humedades respectivas de 60 y 90 %, utilizandose como control sistemático un registrador gráfico a tambor giratorio con dos agujas impresoras, unidas a sendos sensores de temperatura y humedad.

La fotoperiodicidad (ciclos de luz de 14 horas seguidos de 10 horas de oscuridad) se controlaba automáticamente mediante relojes con switches calibrados, abriendo o cerrando en cada caso los circuitos eléctricos respectivos.

Dentro de la Cámara propiamente dicha, de paredes pintadas con dos capas de pintura reflectante de aluminio, había sendas mesadas metálicas, sobre las que se acomodaban luego las macetas previamente esterilizadas en autoclave a 121°C por 30', rellenas con vermiculita calcinada y molida, con una malla promedio de 30/30, y lavada en fábrica.

Cada maceta apoyaba sobre un pote plástico que serviría para contener la solución de riego que se administraba día por medio. La composición del nutriente vegetal figura en la tabla 3.IV..(página 50)

Se cuidó de tener un espaciado uniforme entre las hileras de macetas, manteniéndose 15 cms. entre ejes, con 10 cm entre pote y pote de cada maceta.

Normalmente las semillas que se irían a sembrar, habían sido previamente seleccionadas, evitando aquellas partidas o deterioradas, habiéndose entonces procedido a su esterilización superficial mediante la técnica que se indica en cada caso, y colocando un promedio de 7 semillas (ya inoculadas) en cada maceta, aunque este número se modificaba en base a los índices de germinación que se obtenían para cada lote de semillas.

La inoculación se efectuaba tras la desinfección y el posterior lavado de las semillas, sumergiéndose entonces los porotos directamente en los erlenmeyers con los cultivos bacterianos, para luego pescarlos con una cucharita estéril, con la cual se los iba colocando en cada maceta a 1 cm de profundidad, en la cantidad ya mencionada anteriormente. Se inoculaba directamente con los caldos principalmente cuando se ensayaba el poder simbiótico del microorganismo. En cambio cuando se quería testear la efectividad de un inoculante, se procedía a mojar ligeramente con agua destilada estéril la superficie de los porotos ya desinfectados y lavados, mezclándolos luego con una cantidad tal de inoculante que quedasen pelleteados por sí mismo, presentando una superficie externa negruzca sin poderse siquiera apreciar el tegumento externo de la semilla. Evidentemente se pretendía maximizar la relación "g. de inoculante/semilla", para aumentar las probabilidades de una nodulación efectiva. Las semillas no se trataron con antifungicidas ni con insecticidas, para evitar cualquier efecto deletéreo posterior sobre el *Rhizobium japonicum*.

Una vez que las plántulas habían alcanzado unos 20 cm de altura, se decapitaban con una tijera aquellas que fuesen más cortas o más débiles, de tal forma de dejar las mejores 4 plantas en cada una de las macetas.

Cuando habían crecido lo suficiente, se plantaba en cada maceta un tutor de madera que había sido esterilizado, procediéndose a atar al tutor a cada grupo de plantas de cada maceta mediante un hilo de algodón.

A medida que aumentaba la altura alcanzada por los vegetales se iba subiendo consecuentemente el nivel de la parrilla de tubos fluorescentes, no sólo para evitar que las plantas se enreden en ellos (algunas alcanzan un porte de 1,20 cm) sino también para evitar el efecto nocivo que podría tener una fuente térmica y luminosa, desde tan corta distancia.

Ocasionalmente se arrancaba alguna planta, para seguir la evolución de la nodulación y verificar mediante cortes efectuados a los nódulos, que éstos presentasen el color rosado típico de la leg-hemoglobina.

Cuando se querían efectuar medidas cuantitativas a un lote de plantas, no se las regaba por 1 día, para que el inerte sobre el que se desarrollaban los vegetales no estuviese ni tan húmedo que resultase pastoso, ni tan seco que hiciese peligrar la posterior efectividad de la fijación de N_2 .

Todas las recolecciones se hicieron en horarios diurnos.

Primero se invertía la maceta (tras haber separado el tutor) y mediante golpes suaves en su culata se conseguía desprender el terrón con las plantas, del cual se eliminaba con cuidado el grueso del material retenido por las raíces, cuidando de no desprender los nódulos. A continuación se iba separando cada planta completa, procediéndose a medir la longitud de la parte aérea, entendiéndose por tal a lo que va desde el cuello a la raíz, o en su defecto desde donde comienza la zona clorótica subterránea, hasta el extremo superior del tallo. Luego se contaban los nódulos de la raíz, indicándose la posición (aquí se llaman "principales" a los nódulos que estén sobre la raíz principal, a cualquier altura de ella; y "secundarios" a los que se sitúen sobre cualquier raíz que no sea la más gruesa o pivotante); su forma de agrupamiento (se denomina

"aro" a una agrupación compacta de nódulos que cubren el perímetro de la raíz principal en un punto dado. Si el "aro" se ubica casi a flor de tierra, o sea en la parte más alta de la raíz, se lo denominará "corona". Cuando no se aclare nada, se sobreentenderá que se trata de nódulos aislados); su tamaño relativo, agrupándolos en las categorías de "chicos" (diámetro menor de 1,5 mm, peso individual menor de 4 mgr), "medianos" (diámetro entre 1,5 y 2,5 mm, con un peso promedio de 8 mgr), "grandes" (entre 2,5 y 3,5 mm de diámetro mayor en caso de no ser perfectamente esféricos), o "gigantes" (>10 mgr) o "supergigantes", cuando su diámetro mayor excedía los 4 mm o sino cuando se habían fusionado varios nódulos muy próximos, constituyendo una unidad compacta.

Además de lo mencionado sobre la altura de la parte aérea y el tipo y características de la nodulación, se procedió también a determinar con precisión del centésimo de gramo el peso fresco de la parte aérea y de la raíz, en este último caso sin lavarla, o sea arrastrando vermiculita con ella, retenida o adherida por la cabellera radicular, o si no lavada, escurrida y secada durante unos segundos entre papeles de filtro. También se pesaban los nódulos totales de cada lote, y si los hubiere aún, los cotiledones que se hubieran recogido.

Las partes recién comentadas en las que se había subdividido al vegetal (parte aérea, subterránea, y nódulos; en algunos casos distinguiendo además entre tallo y hojas), y cuyo peso fresco conocíamos, eran luego mantenidos a 105 °C por 48 horas, volviéndose luego a pesar con precisión de décima de miligramo o miligramo, de acuerdo a la magnitud de lo pesado, rotulándose como el "peso seco" de la porción respectiva.

A otras plantas del mismo lote en estudio se les separaban aquellas raíces que tuviesen nódulos, y apenas sacudiéndolas para eliminar el exceso de vermiculita, inmediatamente se colectaban en un frasquito de los del tipo de Penicilina, de unos 30 ml de capacidad y con tapón de goma especial para inyectables. Luego se procedía a desalojar el aire contenido en el frasco, para lo cual se hacía un vacío parcial mediante una aguja hipodérmica que estaba conectada a una bomba de vacío.

En seguida se restituía la presión primitiva en el frasquito, mediante la inyección con jeringas Hamilton calibradas o con agujas hipodérmicas conectadas al aparato que se muestra en la Figura 3.IV (parte a)), inyectándose en todos los casos una mezcla de incubación constituida por un 20% de Oxígeno, un 20% de acetileno y un 60% de argón.¹⁵ Esta mezcla de gases se había efectuado en forma cuantitativa mediante la técnica descrita en 3.IV.b.1.

Los nódulos con su mezcla de incubación se colocaban en estufa a 28°C, retirándose a los 5, 10, 15 y 60 minutos para extraer una alícuota que se inyectaba en el Cromatógrafo gaseoso mediante una Jeringa Hamilton de 100 microlitros.

Luego de unos sesenta minutos de incubación, se daba por concluida la determinación de la actividad nitrogenásica, no sin antes haber lavado, secado entre papeles de filtro, y pesado, a los nódulos contenidos en cada botellita. Posteriormente se colocarían a 105° C por 24 horas, repitiéndose entonces la pesada pero expresándola como "peso seco de nódulos". Con este último dato, y analizando las "cuentas de eteno" que registró el aparato en función del total de "cuentas de eteno + etino", se graficaba versus el tiempo de incubación, comparándose entonces las pendientes de las tangentes a las curvas obtenidas para cada muestra de nódulos.

Figura 3.IV.

SECUENCIA DE LOS PASOS PREVIOS A LA DETERMINACION DE LA CAPACIDAD FIJADORA DE LOS NODULOS, MEDIANTE CROMATOGRAFIA GASEOSA:

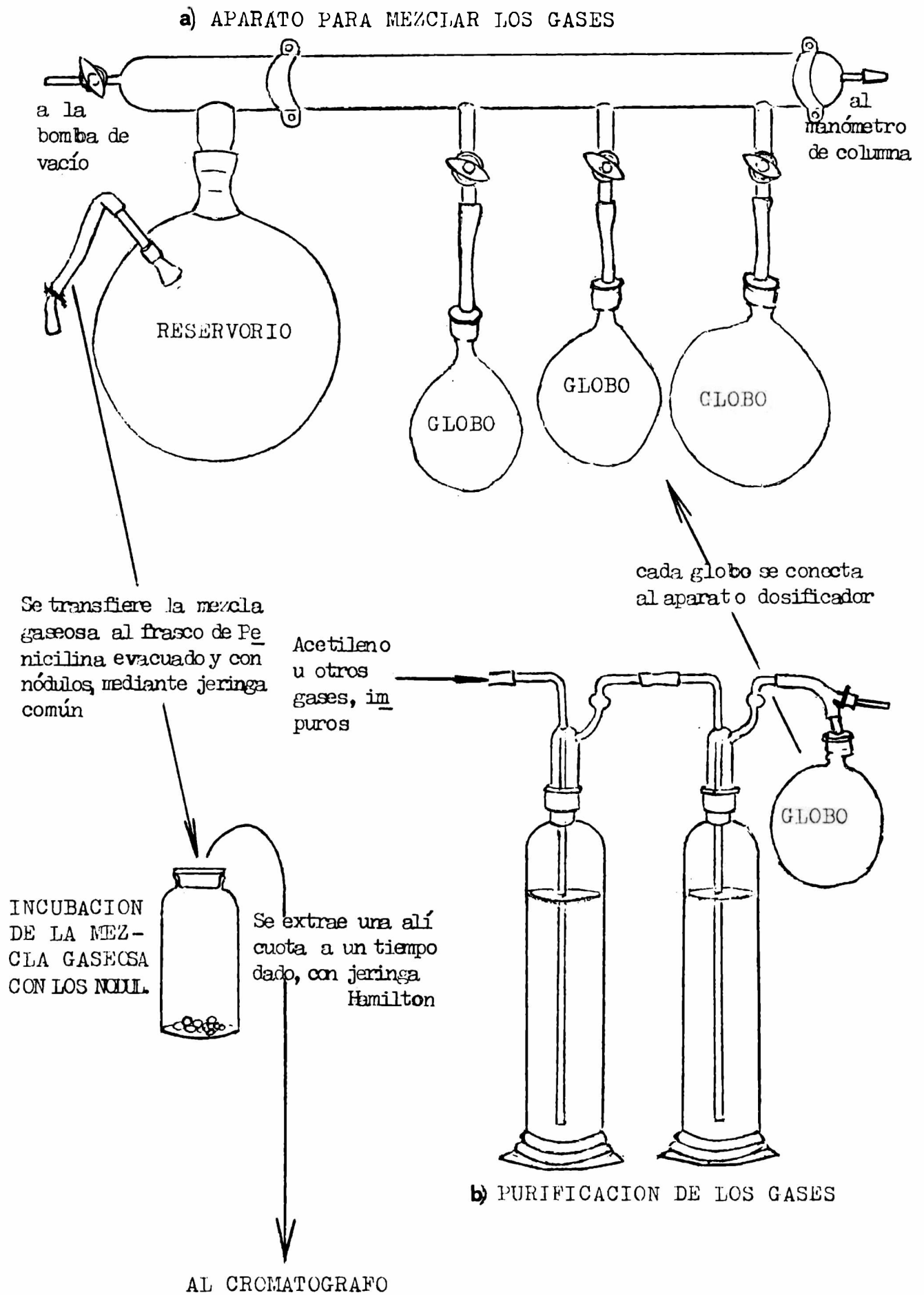


Tabla 3.IV.

SOLUCION DE RIEGO PARA SOJA EN MACETA CON VERMICULITA:

Micronutrientes:

$\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,6 gr
$\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,4 gr
$\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16,2 gr
BO_3H_3	12,6 gr
$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5,4 gr
$\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	18,0 gr
$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,6 gr

Macronutrientes:

$(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$	225 gr
$\text{SO}_4\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	95 gr
SO_4K_2	155 gr
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	125 gr

Preparación:

Los 600 gr de macronutrientes se mezclan con 472 mg de la mezcla de micronutrientes. A su vez, de esta mezcla final se disuelven 2,8 gr en un litro de agua destilada, con un pH final de 6,5-7,0.

3.IV.b. Ensayos agronómicos realizados en el Laboratorio:

- Cálculo de la velocidad de evaporación de agua en distintos órganos de Glicine max recién seccionados:

Los tallos, las hojas, o las raíces recién arrancadas, se colocaban en el platillo de una balanza analítica sensible a la décima de miligramo, haciéndose un registro de la pérdida de peso a lo largo de un tiempo dado, con lecturas cada 15 segundos al principio y cada 30 segundos al final de los 10 minutos que duraba cada determinación. Se repetía el ensayo 4 o cinco veces con porciones nuevas de muestra, verificándose la constancia de los resultados y expresándose a éste como el valor promedio de todas las determinaciones que correspondiesen a cada uno de los órganos estudiados.

- Cálculo de la retención de turba de diferentes granulometrías, por porotos de soja humedecidos:

Se seleccionaba un lote grande de porotos de tamaño uniforme, separándolo entonces en tres grandes grupos, a cada uno de los cuales se lo sumergía en agua por 10 minutos, dejando orear durante 20-30 minutos, y luego de pesado el lote de semillas húmedas, se las metía en una bolsita plástica conteniendo una granulometría de turba diferente en cada caso para cada lote, procediéndose a pesar nuevamente los porotos que ahora llevaban adherido algo del polvo de turba. Los resultados se expresaron sobre peso seco de los porotos.



3.IV.b.1. Metodología utilizada en la Cromatografía Gaseosa:

Se utilizó un equipo Carlo Erba con Registrador de la misma marca.

Las condiciones en que se operó para conseguir una buena separación de eteno y etino, fueron las siguientes:

Características de la columna:

largo: 100 cm

diámetro: 0,8 cm

material: Aluminio (boquillas de bronce)

Relleno : Porapak R

Condiciones operativas:

T° del horno (donde está la columna) : 50°C

T° de inyección de muestra : 109°C

T° del detector de ionización : 120°C

Flujo del combustible de llama (H₂) : 0,9

Flujo del comburente (aire) : 1,5

Flujo del carrier de la muestra (N₂) : 0,5

Atenuación para el eteno : 8

para el etino : 16

Tiempo de retención eteno : 2,2 minutos

Tiempo de retención etino : 3,0 minutos

Los gases utilizados (H₂, O₂, N₂, acetileno) provenían de tubos de acero provistos de robinete y manómetro de diafragma. El aire para la llama era provisto por un compresor con filtro de lana de vidrio a la salida. Debido a que el C₂H₂ no reunía las condiciones de pureza cromatográfica requeridas, se lo depuraba haciéndolo burbujear en sendas soluciones conteniendo SO₄Cu, NaOH, y SO₄H₂, tal como se resume en la figura 3.IV, parte b). En esa misma figura aparece el aparato utilizado para mezclar los gases en proporciones bien definidas (parte a)). Para ello se transvasaba cada uno de los componentes (ya purificado) mediante un globo de caucho al aparato dosificador donde previamente se había eliminado el aire de su interior, y en el que el contenido del globo se iba vertiendo lentamente hasta alcanzar una presión pre-calculada. Se repetía la operación con los otros componentes gaseosos de la mezcla de incubación, verificándose siempre que la presión parcial del componente fuese la correcta, y que la presión total tras el mezclado de todos los gases fuese de 1 bar.

Al operar con el cromatógrafo, se descartaban aquellos picos que difiriesen en mas de un 5% de la composición del gas de partida.

4. RESULTADOS

4.I.a. Relativos a las condiciones operativas a nivel de Erlenmeyers con que deben desarrollarse tanto los inóculos como los caldos destinados a servir de semilla para los procesos en otra escala:

A continuación se indican los resultados obtenidos al trabajar con la cepa E-45 y un medio base aconsejado por Lopreto-Balatti, donde se estudia la importancia de la temperatura de almacenamiento del extracto de levadura; la influencia que ejerce el volumen del inóculo o su historia previa sobre el desarrollo posterior a nivel de producción; el uso de tensioactivos agregados a los caldos; la forma de maximizar su efecto, modificando las condiciones de aereación-agitación; la influencia de la luz y la determinación de la temperatura óptima de crecimiento para la cepa en estudio; y por fin, el decaimiento de viables a nivel de Erlenmeyers en un intento de comparar a posteriori la supervivencia del microorganismo en el soporte, versus la que hubiera tenido de haberse empleado directamente el caldo.

En forma global, se pretendió ajustar las variables operativas de tal forma que dado un medio de cultivo, se pudiese conocer la máxima concentración celular alcanzable, así como los factores que pudiesen influir en los resultados, todo esto a nivel de Erlenmeyers.

Además, en un intento por adecuar el medio de cultivo a una composición tal que rindiese el máximo posible de viables, se probó de reemplazar total o parcialmente el extracto de levadura por hidrolizados ácidos, neutros, o alcalinos, de harinas de soja con diferentes grados de molienda.

Igualmente se probó de aumentar el tenor de la fuente de Carbono de los medios de cultivo (junto a un incremento concomitante en la concentración de extracto de levadura), utilizándose en este caso como semilla, un inóculo de 70 horas que había sido crecido en el medio de producción habitual. Su influencia sobre el desarrollo del microorganismo, se midió tanto a través del incremento de la Densidad Óptica₆₂₅, como mediante el recuento de viables en placa, utilizándose la técnica descrita en 3.I.b.

En lo que respecta a los surfactantes, se encontró que tras esterilizarlos junto al medio de cultivo, de haberse utilizado Tritón-100 aparecían gotas; con el Tween-80, una turbiedad generalizada; y de haberse utilizado el oleato de sodio como tensioactivo, aparecía en los caldos un color amarillo bastante marcado, bien diferente del originado por el hierro (férrico) o el extracto de levadura que entran en la composición de los medios de cultivo.

Los problemas del tritón de tender a formar otra fase, o del Tween que tiene un "punto nuebe" característico, ocurren solo en caliente, desapareciendo al enfriarse los Erlenmeyers, sobre todo después de agitarlos durante unos minutos.

El inconveniente del oleato es que el aumento del color amarillo, originado posiblemente por la emulsificación del ácido oleico, dificulta las lecturas iniciales de la D.O., y por eso existe cierta incertidumbre para los primeros puntos de la curva. Además se verificó la precipitación de jabones insolubles, lo que también juega en detrimento del proceso.

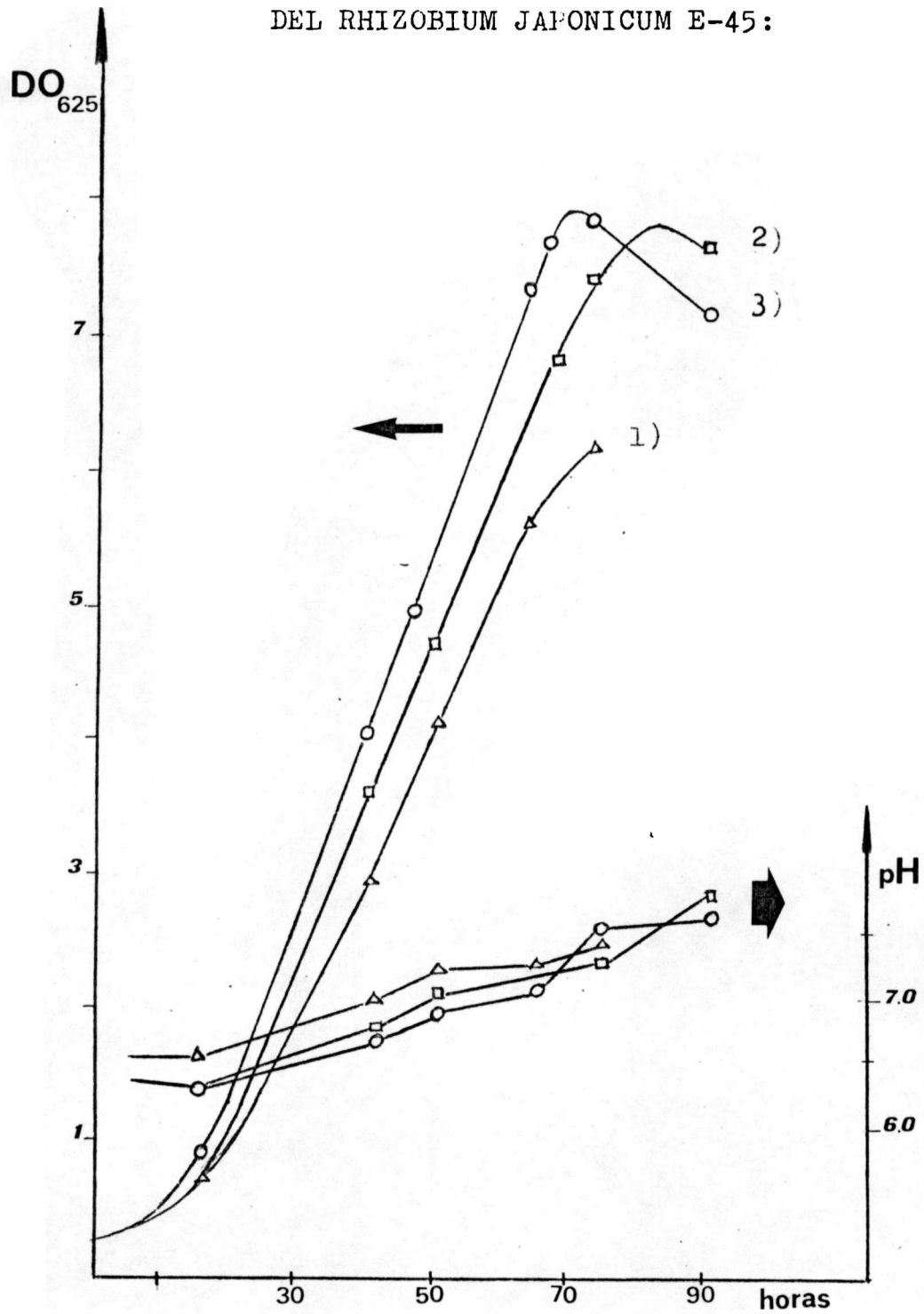
Como complemento, se estudió el efecto que podría tener el sequestrar iones divalentes mediante el agregado de EDTA, siendo que a algunos se los indica como perjudiciales y a otros se discute si son imprescindibles.

En las experiencias en las que se había substituído el extracto de levadura por harina de soja con dos granulometrías, también se dió el caso de que los sólidos en suspensión interferían en las lecturas de la Densidad óptica, a pesar de dejarse decantar en la pipeta saca-muestra aquellos fragmentos mas groseros, en el caso de utilizarse esta granulometría. Esa es la razón por la que los primeros puntos de la curva aparecen mas dispersos, en una configuración en zig-zag que dependía de la cantidad de polvo fino que se hubiese aspirado con la pipeta al sacar la muestra.

Debido a que no se habían eliminado los lípidos de los porotos con los que se fabricó la harina, continuamente existía una capa oleosa flotando en los caldos, que se fue haciendo cada vez menos evidente a medida que avanzaba el proceso y que aumentaba la producción de polisacárido debido a los microorganismos.

Gráfico 4.I.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO DEL EXTRACTO DE LEVADURA SOBRE EL DESARROLLO DEL RHIZOBIUM JAPONICUM E-45:



- 1) Extracto de Levadura marca "Calsa", conservado por tres meses a temperatura ambiente.
- 2) Extracto de Levadura en polvo marca "Oxoid", conservado I-dem que el 1).
- 3) El mismo Extracto de Levadura en pasta (marca "CALSA") que en 1), pero esta fracción conservada siempre en heladera.

Gráfico 4.II.

INFLUENCIA DEL VOLUMEN DE SEMBRADO

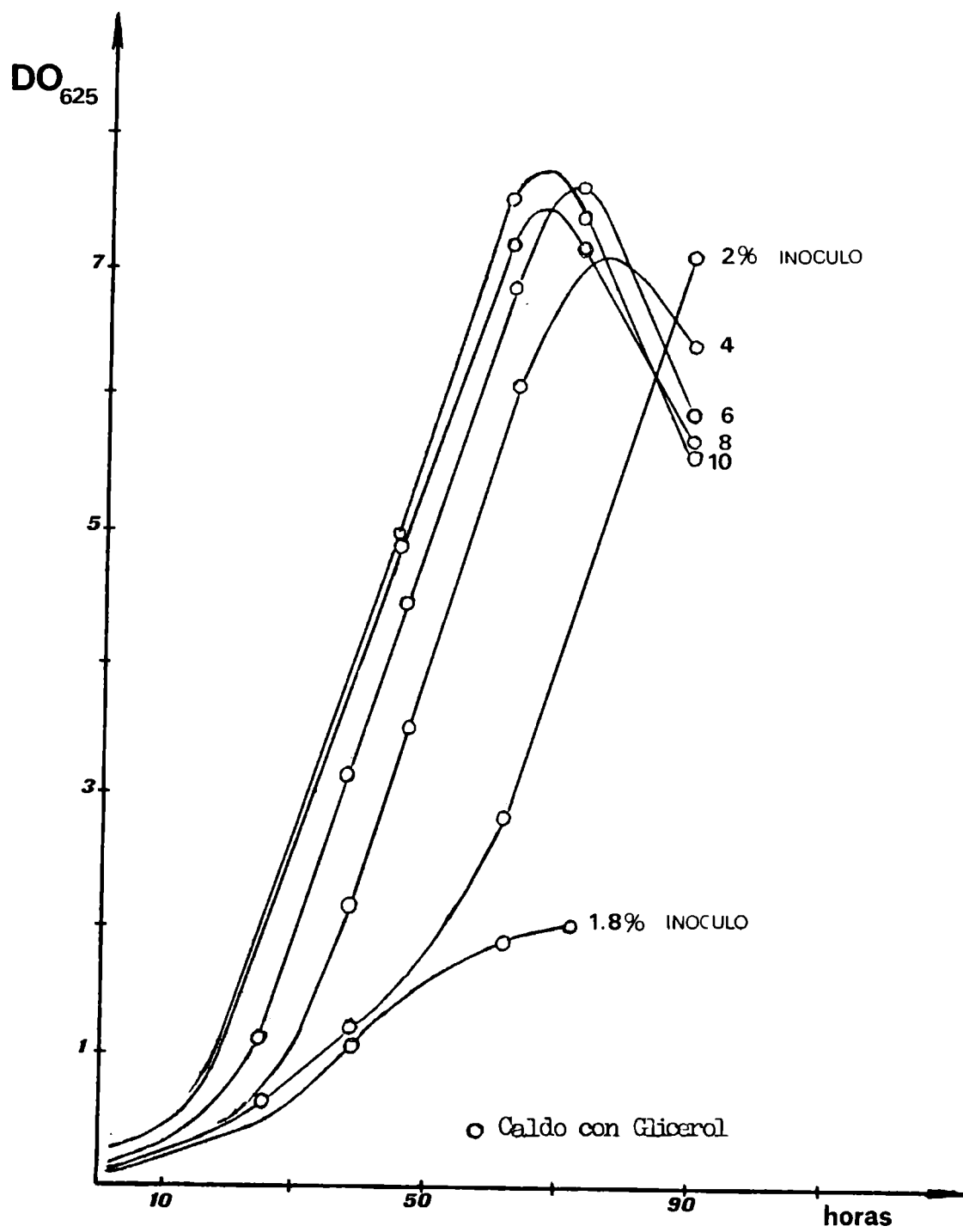
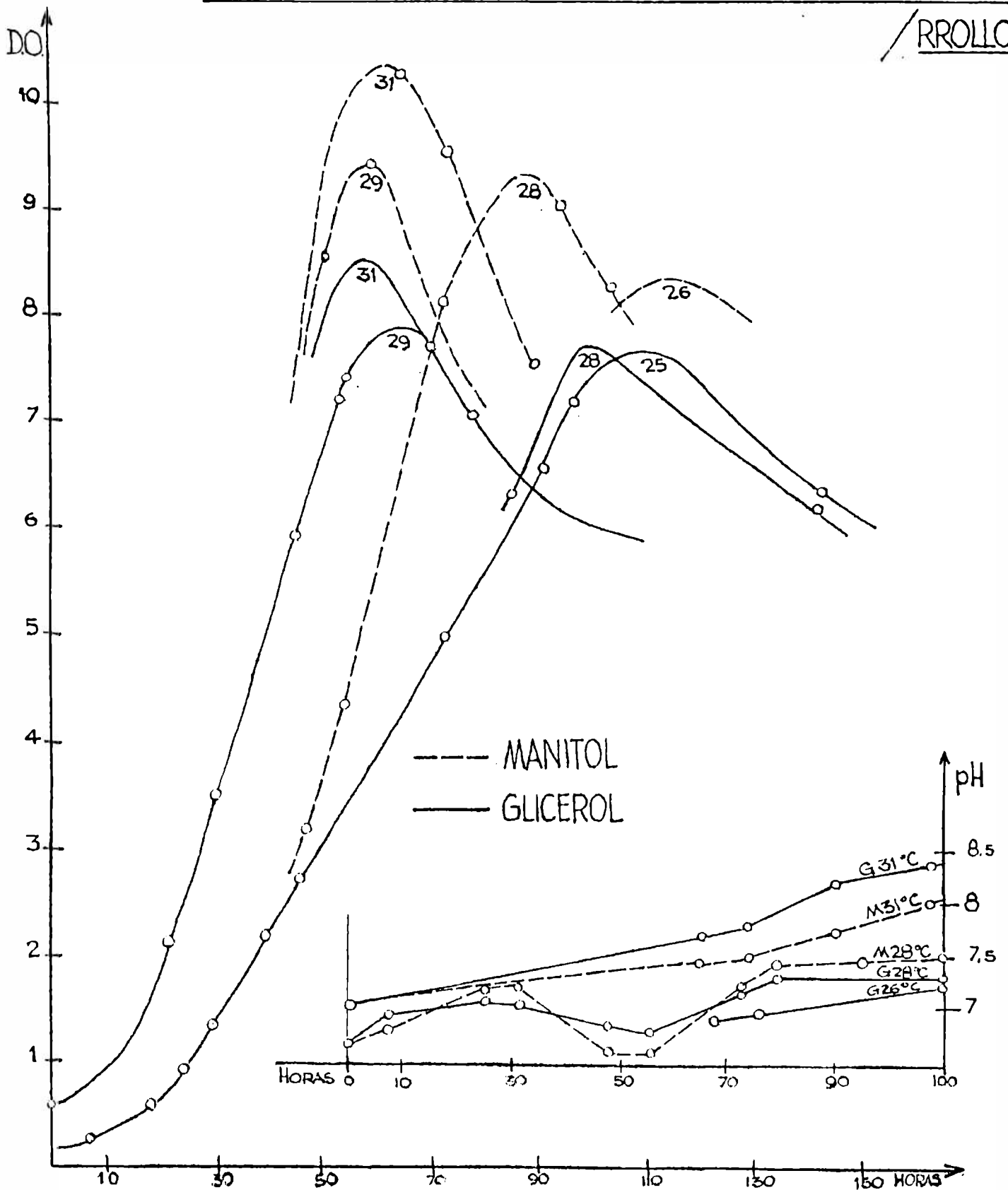


Gráfico 4.III.

COMPORTAMIENTO DE UNA CEPA DE RHIZOBIUM JAPONICUM
E-45 FRENTE A DIFERENTES TEMPERATURAS DE DESA-
RROLLO.



En el Gráfico 4.I se observa que los medios de cultivo preparados con Extractos de Levadura pastosos (30% de humedad) conservados a temperatura ambiente, dan peor resultado que aquellos conservados en la heladera, o que los pulvurentos.

En los ensayos preliminares en que se pretendía estandarizar la formulación de los medios de cultivo, nunca se obtuvieron resultados tan buenos al trabajar con extractos de levadura pastosos conservados a temperatura ambiente, como cuando se utilizaban aquellos guardados bien tapados en heladera.

Para los muy desecados, como el OXCID, no había diferencias apreciables en el rendimiento celular para ambas formas de almacenamiento del extracto.

El agua incorporada en los Extractos de Levadura pastosos, unido a una temperatura apropiada, permitían (a pesar de la alta presión osmótica) el desarrollo de una flora microbiológica que se encontró constituida tanto por bacterias como por hongos, y cuyos efectos macroscópicos se evidenciaban en la aparición de un olor desagradable y un oscurecimiento gradual del producto (que había sido conservado en frascos de vidrio transparente).

En el Gráfico 4.II. se nota que una siembra con el 8% de inóculo es suficiente para obtener buenos resultados en lo que hace a desarrollo bacteriano en el medio de producción. Un porcentaje mayor de inóculo sembrado ejerce poca influencia en el crecimiento bacteriano posterior, mientras que con volúmenes menores de siembra se nota una inhibición en el desarrollo, que se podría deber a la mayor proporción de NH_4^+ de estos caldos, respecto de algunos medios citados en la bibliografía. (En esos trabajos generalmente se habla de un 4% de volumen de siembra).

En el Gráfico 4.III resulta evidente el acortamiento del tiempo necesario para alcanzar el pico de Densidad Óptica, a medida que crece la temperatura a la que se desarrolló el microorganismo.

En el Gráfico 4.IV. se observa la conveniencia de trabajar con poco volumen de caldo en el Erlenmeyer.

En la misma experiencia (Gráf. 4.IV) se comprobó que la luz proveniente de tubos fluorescentes puede afectar el crecimiento

Gráfico 4.IV.

INFLUENCIA DE LA RELACION "VOL. MEDIO CULTIVO/VOL. RECIPIENTE"

INFLUENCIA DE LA LUZ SOBRE EL DESARROLLO EN CALDO CON GLICEROL

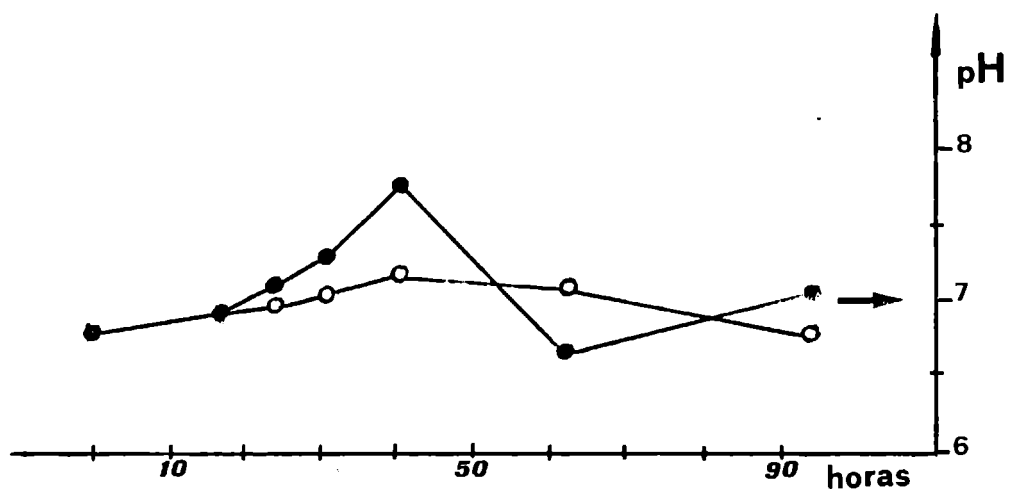
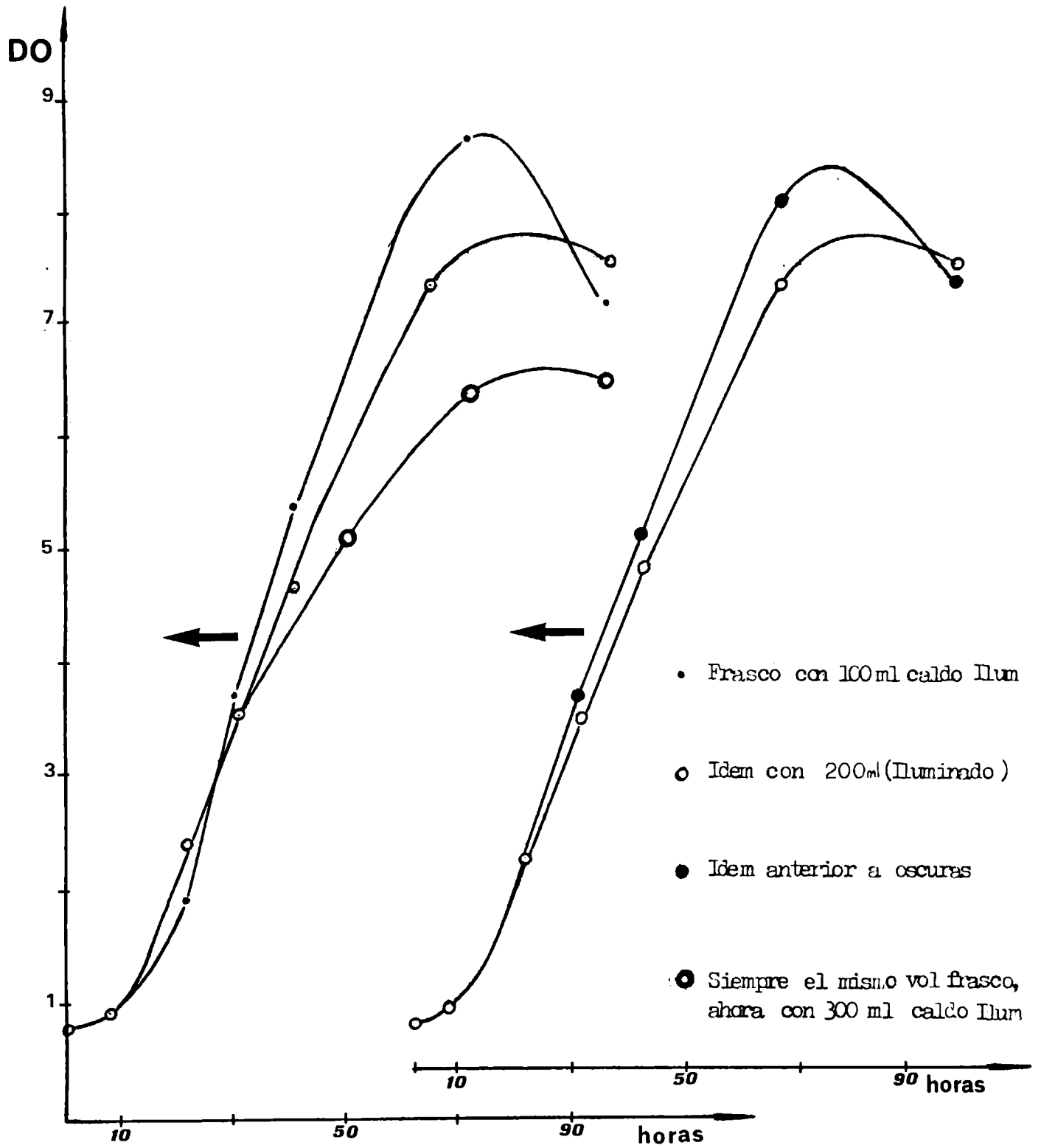


Gráfico 4.V.

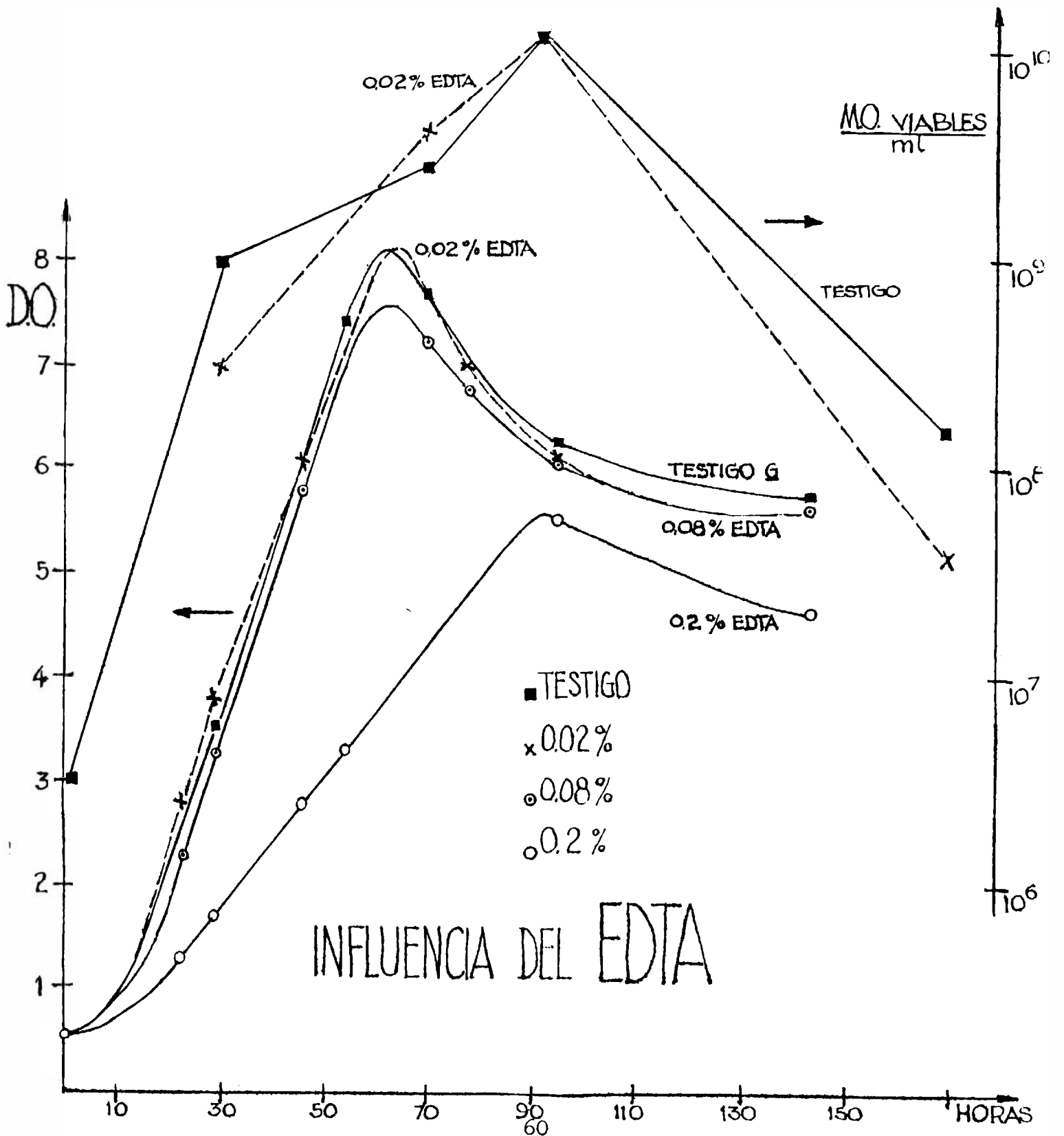
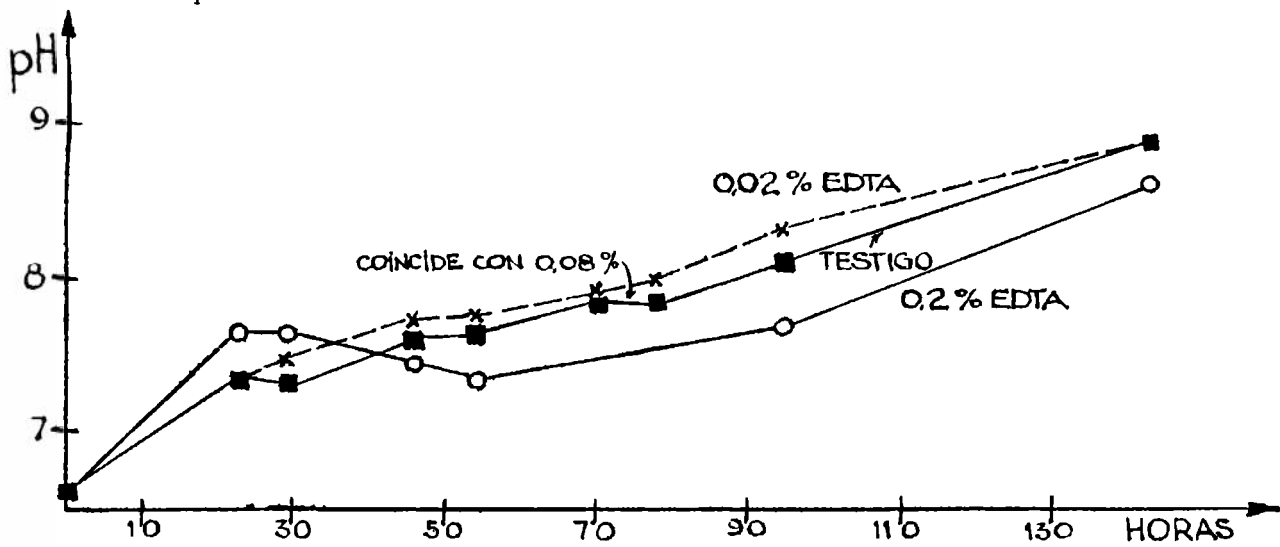


Gráfico 4.VI.

SURFACTANTES: TWEEN Y SDS A DOS CONCENTRACIONES

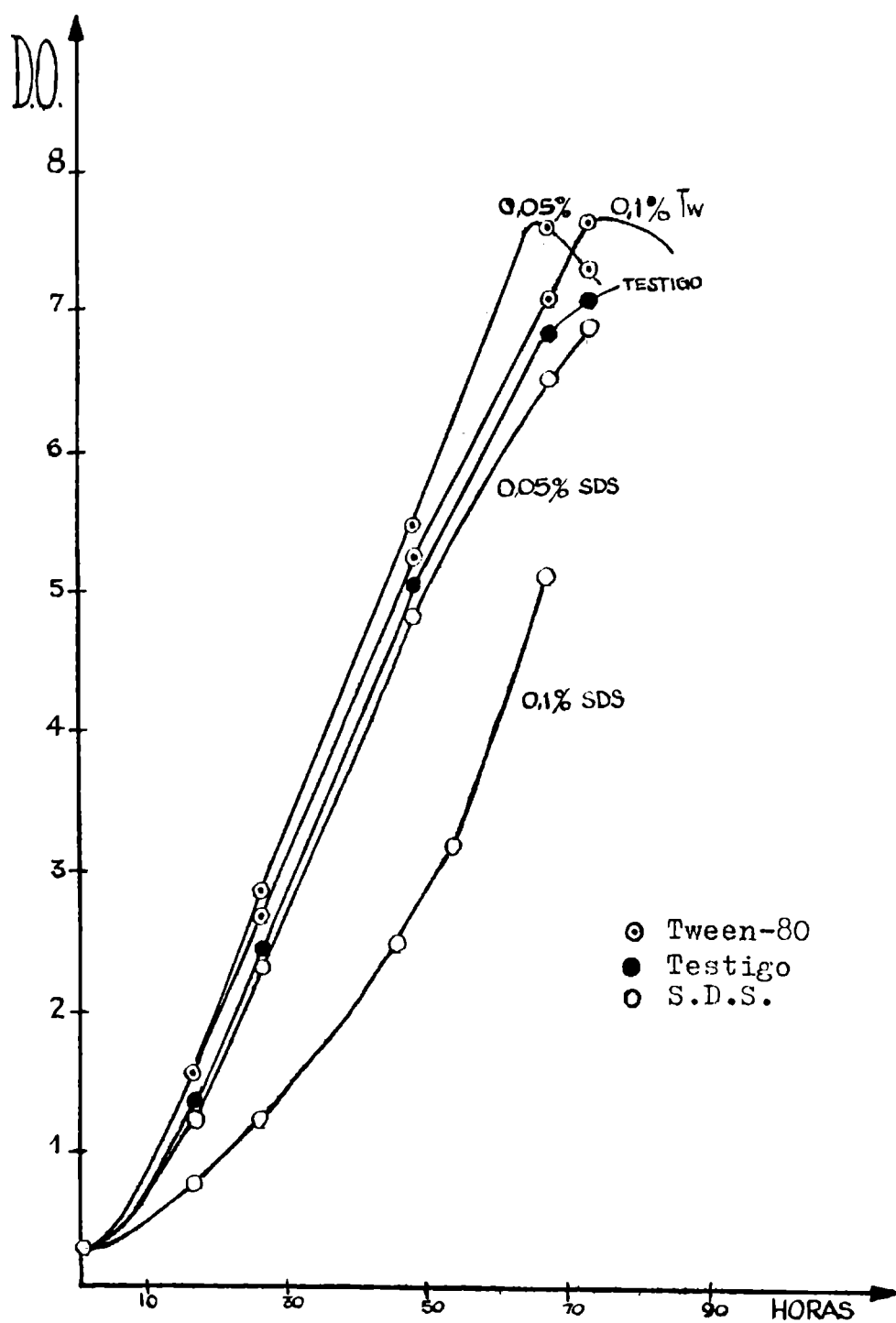


Gráfico 4.VII.

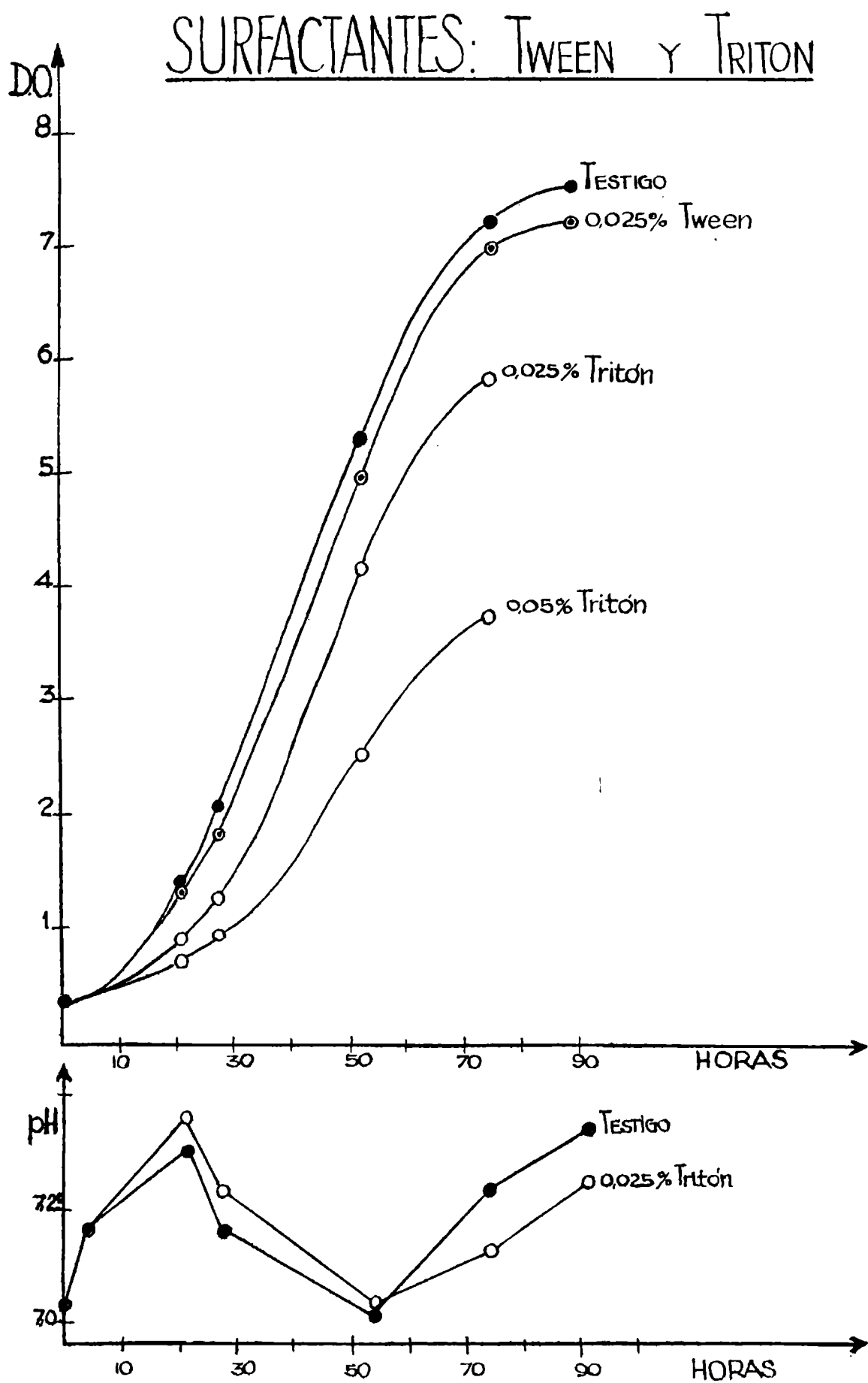
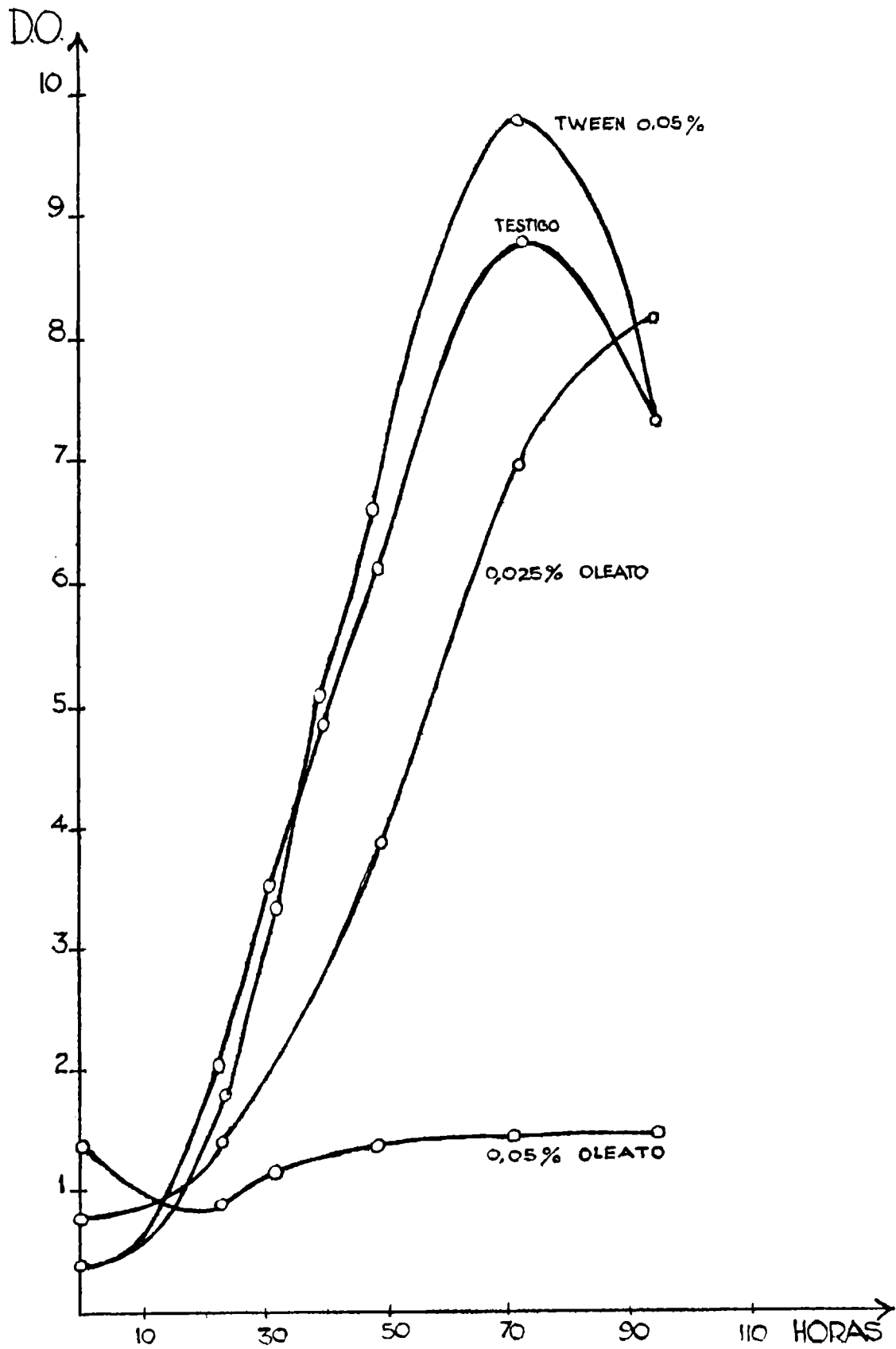


Gráfico 4.VIII.

SURFACTANTES: TWEEN-80 Y OLEATO



del microorganismo en el medio líquido. A partir de entonces se trató de evitar la exposición del *Rhizobium* a radiaciones luminosas intensas por períodos de tiempo prolongados. Todavía quedaba por ver si la luz afectaría igualmente el crecimiento en medio sólido, o sino tal vez la supervivencia de la cepa sobre un soporte.

En las placas de Petri recubiertas con papel opaco, se notaron diferencias respecto a aquellas expuestas libremente a la radiación de los tubos fluorescentes. En lo que respecta a los resultados del efecto de la luz sobre la supervivencia del microorganismo soportado sobre turba, los resultados están consignados en el Gráfico 4.III.b.

En el Gráfico 4.V. se muestran los resultados de las experiencias en las que se trabajó con diferentes concentraciones de EDTA tetrasódico (que es la abreviatura del complejante "etilen diaminotetracetato sódico").

No se pudo demostrar que mediante su empleo se pudiesen secuestrar cationes perjudiciales para el crecimiento del *Rhizobium*.

En los gráficos 4.VI., 4.VII., y 4.VIII., se muestran los resultados del empleo (para varias concentraciones) de los surfactantes Tween-80 (Tw); Dodecil Sulfato de Sodio (SDS); Tritón-100 (Tr); y Oleato de sodio.

Del análisis de todo ello surge que el único tensioactivo realmente útil entre los ensayados, es el Tw, siendo la concentración óptima de 0,05%.

En ensayos preliminares se habían confirmado los trabajos de Lopreto, según los cuales altas concentraciones de Extracto de levadura (en adelante, YE) inhiben al *Rhizobium* (justamente por esa razón el medio inóculo tiene un cuarto de la cantidad que lleva el medio de producción).

Faltaba ver por un lado si se podría substituir total o parcialmente al YE por otro material que aportase los factores de crecimiento necesarios; y por el otro lado, si se podría trabajar con una etapa mas en el proceso de obtención de masa celular, en que luego de obtenida una alta concentración bacteriana por la secuencia clásica de pasos (pre-inóculo, inóculo, me

ENSAYO DE HIDROLIZADOS DE HARINA DE SOJA

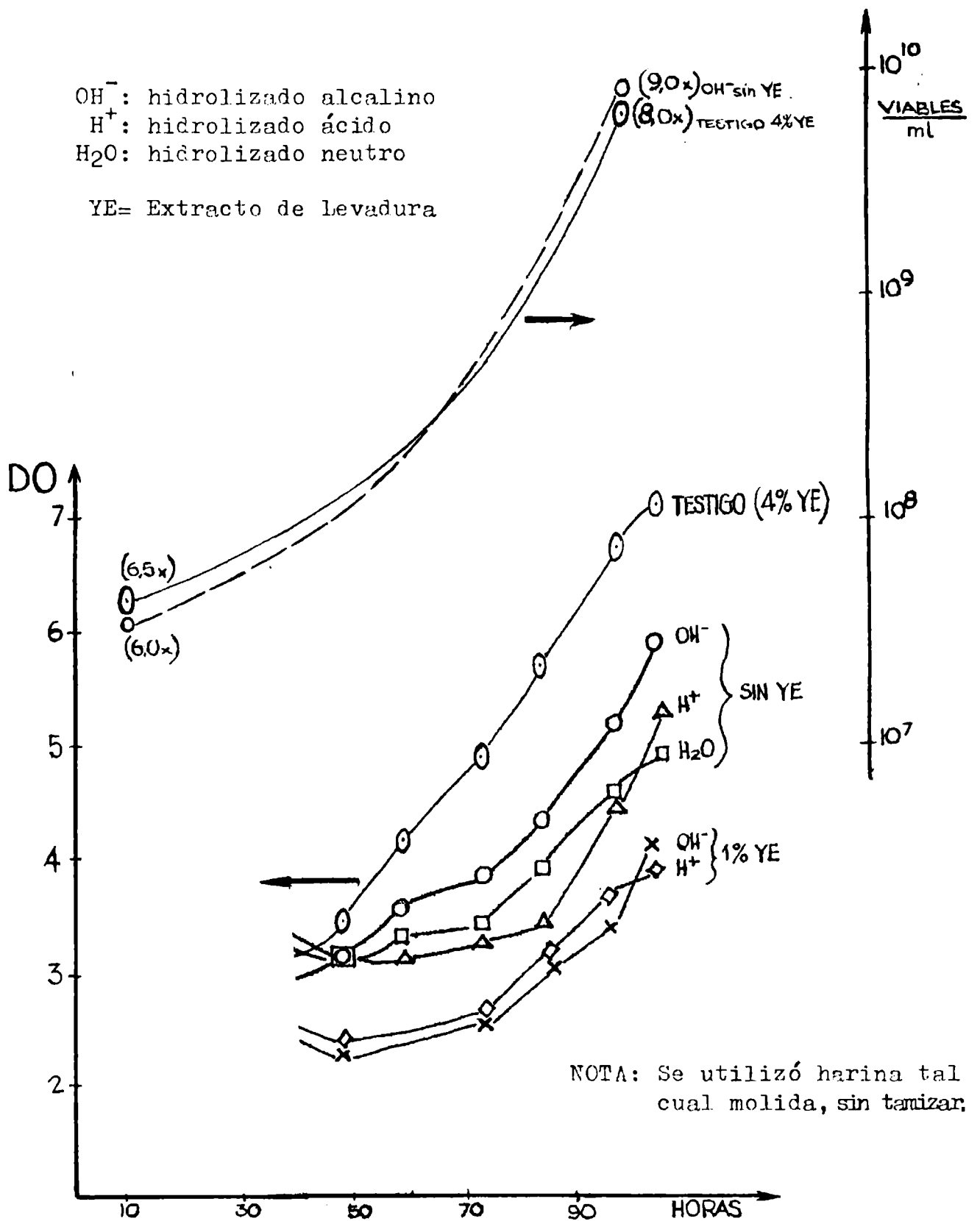
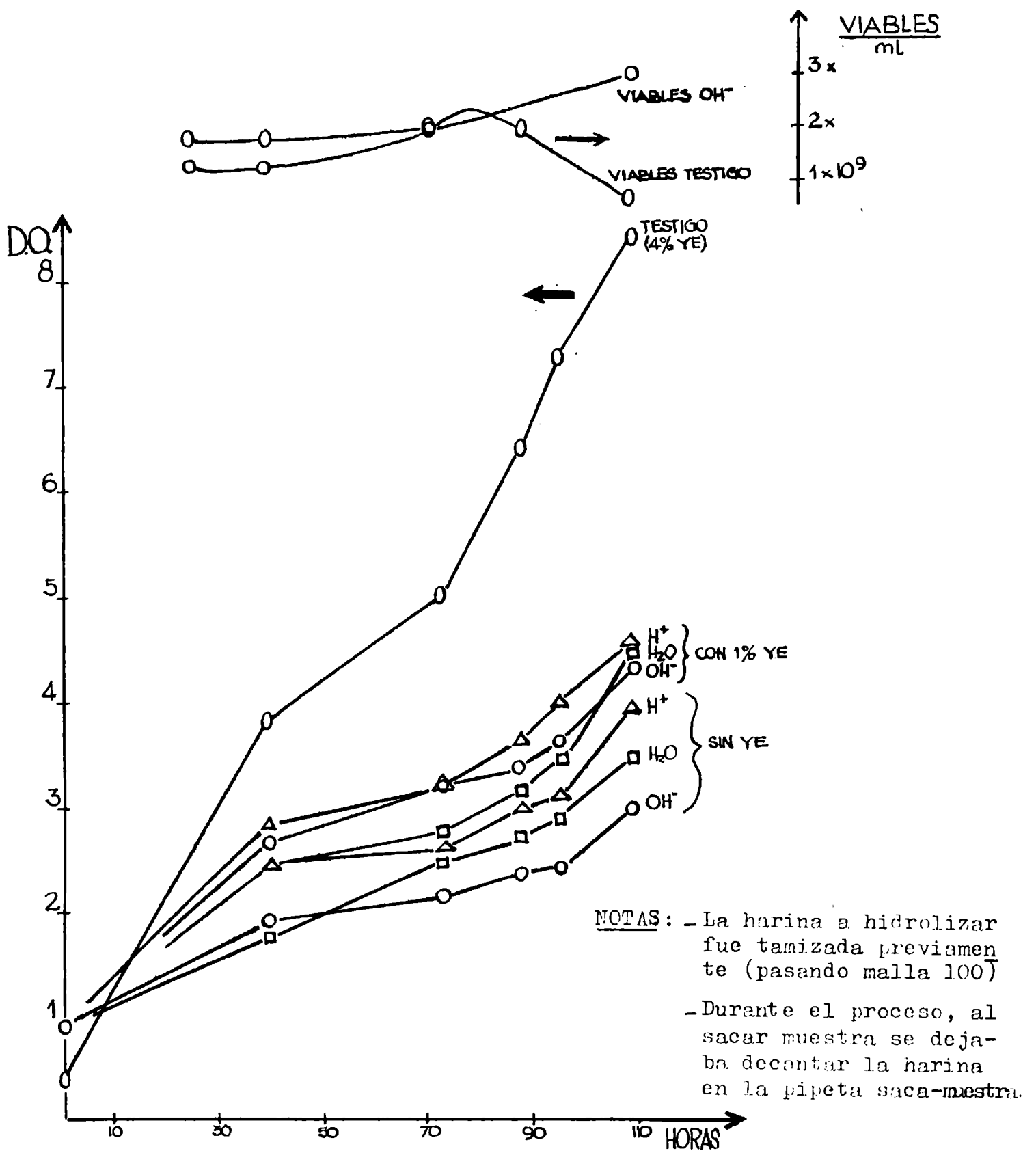


Gráfico 4.IX.

ENSAYO DE HIDROLIZADOS DE SOJA



NOTAS: - La harina a hidrolizar fue tamizada previamente (pasando malla 100)
 - Durante el proceso, al sacar muestra se dejaba decantar la harina en la pipeta saca-muestra.

Gráfico 4.X.

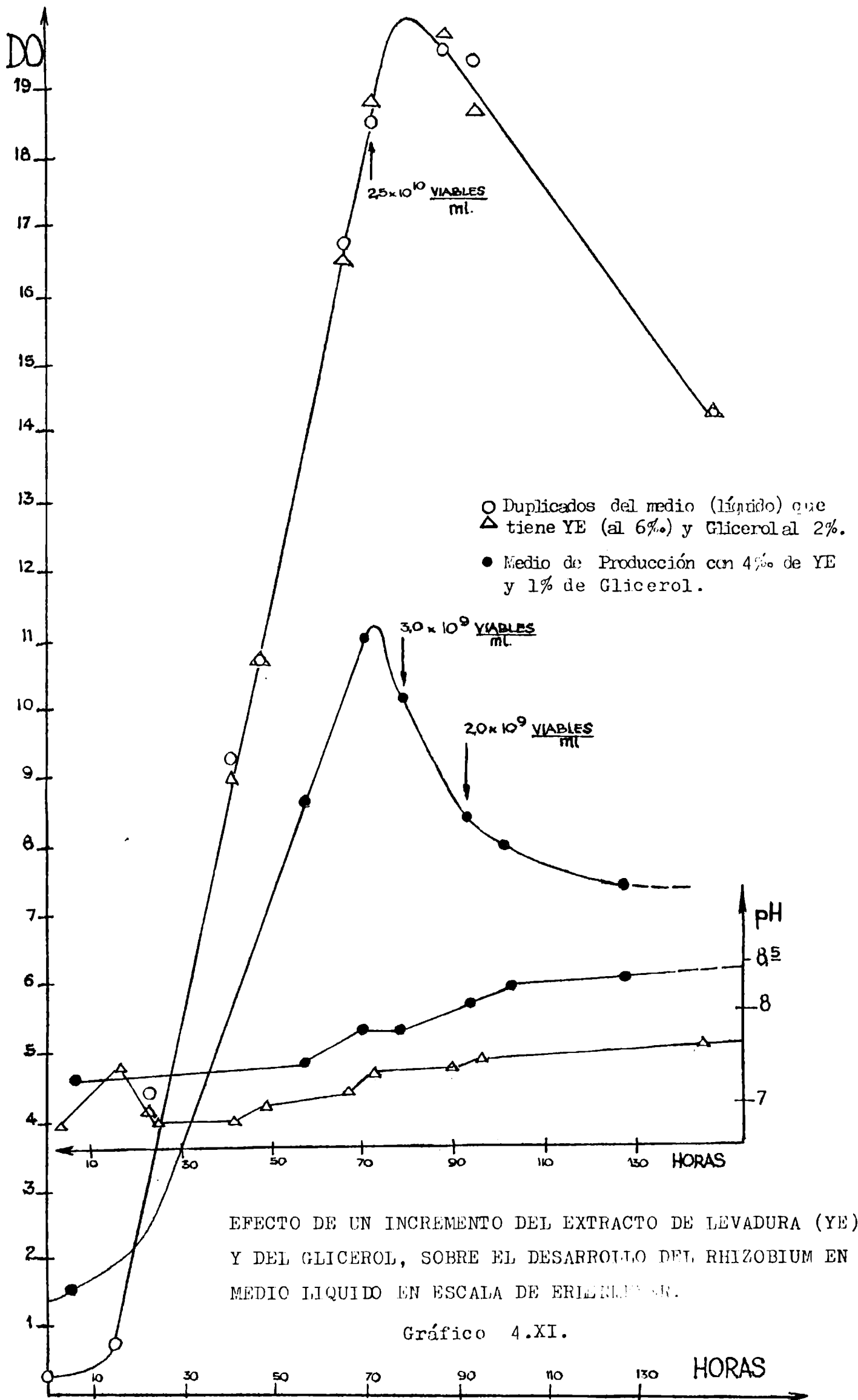
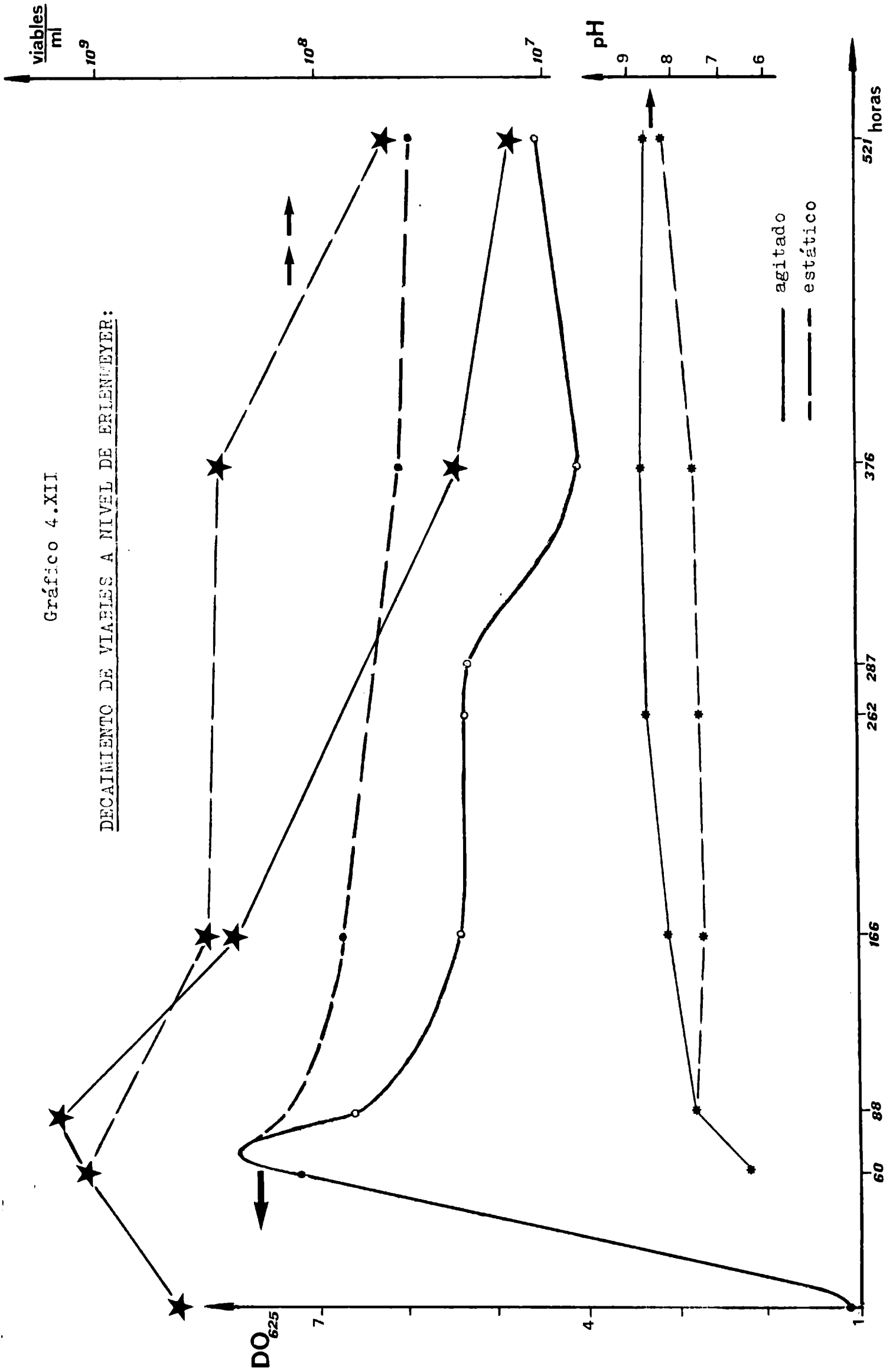


Gráfico 4.XII

DECAIMIENTO DE VIABLES A NIVEL DE ERLENMEYER:



dio de producción), se utilizase a este último como inóculo de un proceso donde estuviesen incrementados tanto la concentración de los factores de crecimiento como la de los nutrientes, y en cuyo caso se esperaba que para entonces se atenuasen los efectos inhibitorios, prevaleciendo en cambio el beneficio de una mayor disponibilidad de nutrientes.

En los Gráficos 4.IX. y 4.X. se muestran los resultados de haber sustituido total o parcialmente el YE por una cantidad equivalente de hidrolizado ácido, neutro, o alcalino de harina de soja; en un caso (representado en el Gráfico 4.IX.) utilizándose el producto de la molienda en bruto, o sea sin una previa separación de tegumentos o elementos particulados groseros; en el otro (Gráfico 4.X.), utilizándose solamente el hidrolizado de harina fina.

Se nota que a pesar de los bajos valores de la DO_{625} , los resultados de los recuentos en placa indican que se pueden obtener condiciones finales equivalentes, tanto usando YE exclusivamente como substituyéndolo por hidrolizados alcalinos de soja.

Respecto de la otra posibilidad que se había planteado, de alargar en una etapa el proceso, utilizando en ese caso una concentración mayor de YE y de Glicerol, se observa en el Gráfico 4.XI. que si bien se produce un incremento formidable (hasta del 100%) en los valores de la DO_{625} , el aumento que se produce a nivel de viables es mucho mas modesto.

En el Gráfico 4.XII. se muestra la evolución del pH, Densidad Optica y Viables en un proceso que se siguió por 3 semanas consecutivas, en que a partir de las 70 horas aproximadamente, a una parte de los Erlenmeyers del lote en estudio se los retiró del shaker (permaneciendo desde entonces estáticos, sin agitación), y al resto se lo continuó trabajando tal como se venía haciendo hasta entonces.

Se nota que aquí como en los procesos anteriores, el pico de DO_{625} está desplazado hacia la izquierda del de viables, o sea que a pesar de que el máximo de DO se localiza a las 70-74 horas, el máximo de viables/ml lo obtendremos recién a las 80-90 horas, cuando la DO está en franco decaimiento.

En la Tabla 3.I. se resumen para algunos procesos, los parámetros biotecnológicos de interés para un análisis posterior.

Tabla 3.1.

PARAMETROS BIO-TECNOLOGICOS DE LOS PROCESOS MAS REPRESENTATIVOS :

Medio de Producción
con 1% de Glicerol:

	en Erlenmeyer con 200ml caldo	en Tanque con 3 litros	en Planta
Promedio del recuento de Viables/ml a las 75-80 horas	5×10^9	9×10^9	8×10^9
Valores máximos de recuentos obtenidos	4×10^{10}	10^{11}	4×10^{10}
Tiempo de generación	9,6	9,6	9,5
μ_{max} (en h^{-1})	.071	.071	.073
DO ₆₂₅ promedio a 75-80hs	7,7	8,8	8,6
pH promedio a las 75-80h	7,5	7,6	7,8

Medio de Producción
con 0,05% de Tween:

	en Erlenmeyer con 200ml caldo
Promedio del recuento de Viables/ml a las 75-80 horas	9×10^9
Tiempo de generación	8,6
μ_{max} (en h^{-1})	.08
DO ₆₂₅ promedio a 75-80hs	8,1
pH promedio a las 75-80hs	7,5

Medio de Producción
con 2% de Glicerol:

	en Erlenmeyer con 200ml caldo	en Tanque con 3 litros
Promedio del recuento de Viables/ml a las 75-80 horas	9×10^9	2×10^{10}
Tiempo de generac (en h)	7,69	7,7
μ_{max} (en h^{-1})	.10	.098
DO ₆₂₅ promedio a 75-80hs	17	16
pH promedio a las 75-80hs	7,5	7,5

NOTAS-El θ_g y μ_{max} de los procesos en oscuridad, coincide con el de los procesos iluminados.

-No se dan valores para los ensayos con hidrolizados de harina de soja por la incertidumbre de los valores iniciales.

4.I.b. Relativos a los trabajos a nivel de Tanque agitado o de Planta Piloto, con los que finalmente se inocularían los soportes

La producción de un lote grande de inoculantes, para efectuar estudios de supervivencia y otros, exigía un volumen apreciable de caldos microbianos de alta concentración celular.

Se optó entonces por estudiar la forma de obtener cantidades masivas del caldo con Rhizobiums, con la que se pudieran impregnar los soportes en estudio.

Se requería homogeneidad en la composición del caldo de impregnación, para descartar variables que entorpecerían la interpretación de los resultados del comportamiento de los soportes, y por lo tanto se hacía imprescindible obtener el cultivo en un proceso único, trabajándose a nivel de tanques agitados o de Planta Piloto.

Se buscó de fijar condiciones operativas, de tal forma de igualar o superar los rendimientos habidos en cada etapa precedente. Para ello se hicieron desarrollos con un mismo medio, simultáneamente en escala de Erlenmeyers, tanque agitado y Planta Piloto, hasta conseguir resultados equivalentes en lo que hace a viables/ml y evolución del pH en los caldos.

Simultáneamente se correlacionó el incremento de la D.O.⁶²⁵ con el aumento de viables, para aquellos tanques o matraces donde se había incrementado la concentración de la fuente de carbono.

Estudiando la evolución del pH y la D.O. en las alícuotas de un litro separadas del propio caldo con el que finalmente se impregnaron las bolsas de turba, se comparó el beneficio del soporte en la constitución del inoculante, con el caldo sin soportar.

En el gráfico 4.XIII se muestran los resultados que se obtuvieron al comparar el crecimiento del Rhizobium en Tanque agitado y en Erlenmeyer de 1000 mls (que servía como Testigo), tanto al utilizarse Manitol como Glicerol en la composición de los medios.

Ya Lopreto-Balatti-Mazza¹⁰¹ habían indicado la conveniencia de utilizar Glicerol en lugar del Manitol como fuente de Carbono en los medios líquidos, así que en la parte a) del gráfico 3.XIII se nota la inclusión del Manitol exclusivamente para corroborar esa

afirmación, razón por la cual a partir de entonces se decide trabajar a este nivel exclusivamente con Glicerol como fuente de C. En el mismo gráfico 4.XIII.a) se nota que se reprodujeron a nivel de Tanque los mismos resultados que se habían obtenido trabajando con Erlenmeyers, cuando se había incrementado el tenor de YE y de Glicerol.

En la parte b) del gráfico 4.XIII se hace una correlación entre DO_{625} y viables, entre las 70 y las 90 horas (en que los valores son máximos), y se concluye que tras el cambio de escala se pudieron ajustar las variables tecnológicas de tal forma de obtener igual número de viables/ml que cuando se trabajaba en Erlenmeyers.

En el gráfico 4.XIV.a) se muestra la evolución del proceso que sirvió de inóculo a aquel con el que se impregnaron las turbas, siempre tomando como referencia al desarrollo en matraz. Nótese que para entonces se dominaba lo suficiente al proceso como para aventajar los resultados obtenidos en la escala inmediata inferior, tanto en lo que hace a las lecturas de DO_{625} como al número de viables/ml. En la parte b) del mismo gráfico se correlaciona viables y pH en un medio con dos concentraciones de Glicerol, tanto en Erlenmeyer como en Tanque agitado. Se nota que el pH permaneció dentro de límites razonables durante todo el proceso, lo que nos habla de un correcto equilibrio en la formulación del medio de cultivo, al mismo tiempo que los altos valores de viables/ml alcanzados nos hablan a las claras de un correcto dominio de las variables tecnológicas, al mismo tiempo que de una cepa bien acondicionada a las condiciones de trabajo impuestas.

En el gráfico 4.XV. se muestran los procesos con los que se produjeron los caldos con que finalmente se impregnaron las bolsas con el soporte de turba, para constituir los inoculantes que posteriormente serían ensayados en Cámara climatizada, sobre soja.

Se indica también, tanto para el proceso principal como para el que sirvió de duplicado a posteriori, de qué forma se vieron afectados el pH, la DO o los viables/ml, cuando se separaba una alícuota de un litro y se la dejaba estática en un Erlenmeyer de capacidad apropiada. Obsérvese que se reproducen los resultados obtenidos en escala de Erlenmeyers, en el sentido de que en esas alícuotas cae la DO a una velocidad mucho menor, y en este caso incluso llegan a aumentar ligeramente los viables/ml., al mismo tiempo que los valores de pH tienden a permanecer acotados durante mas tiempo.

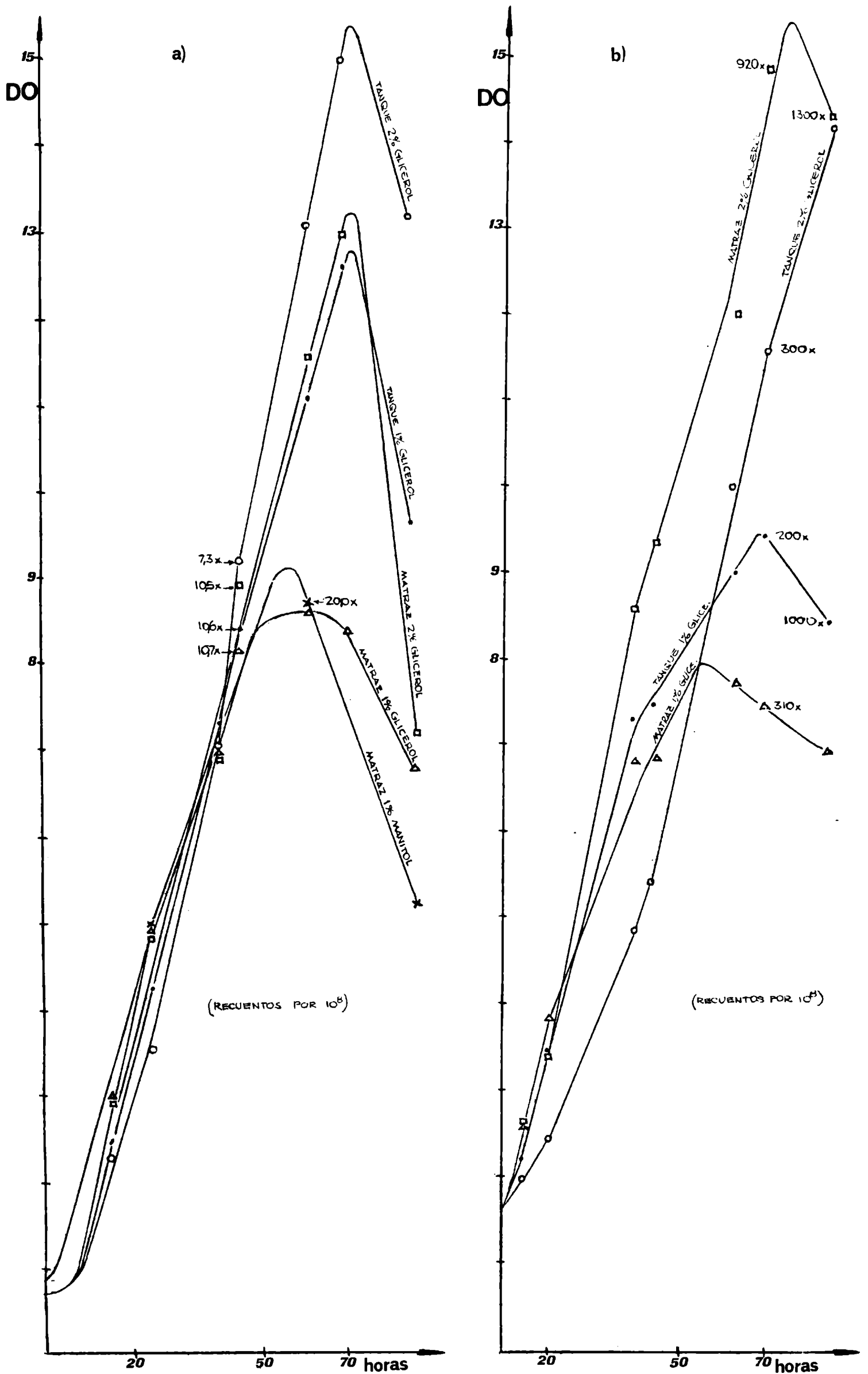


Gráfico 4.XIII: MATRAZ Y TANQUE AGITADO, CON DOS CONCENTRACIONES DE FUENTE DE CARBONO.

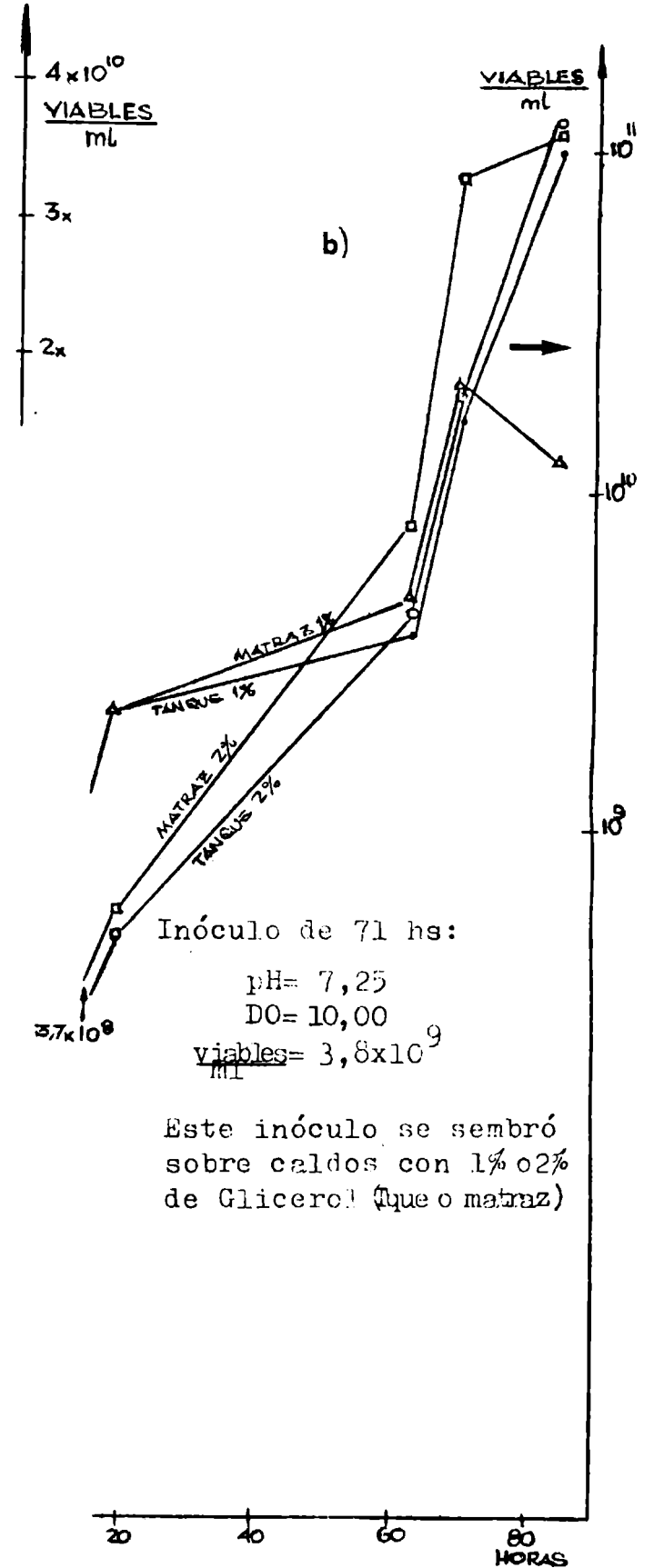
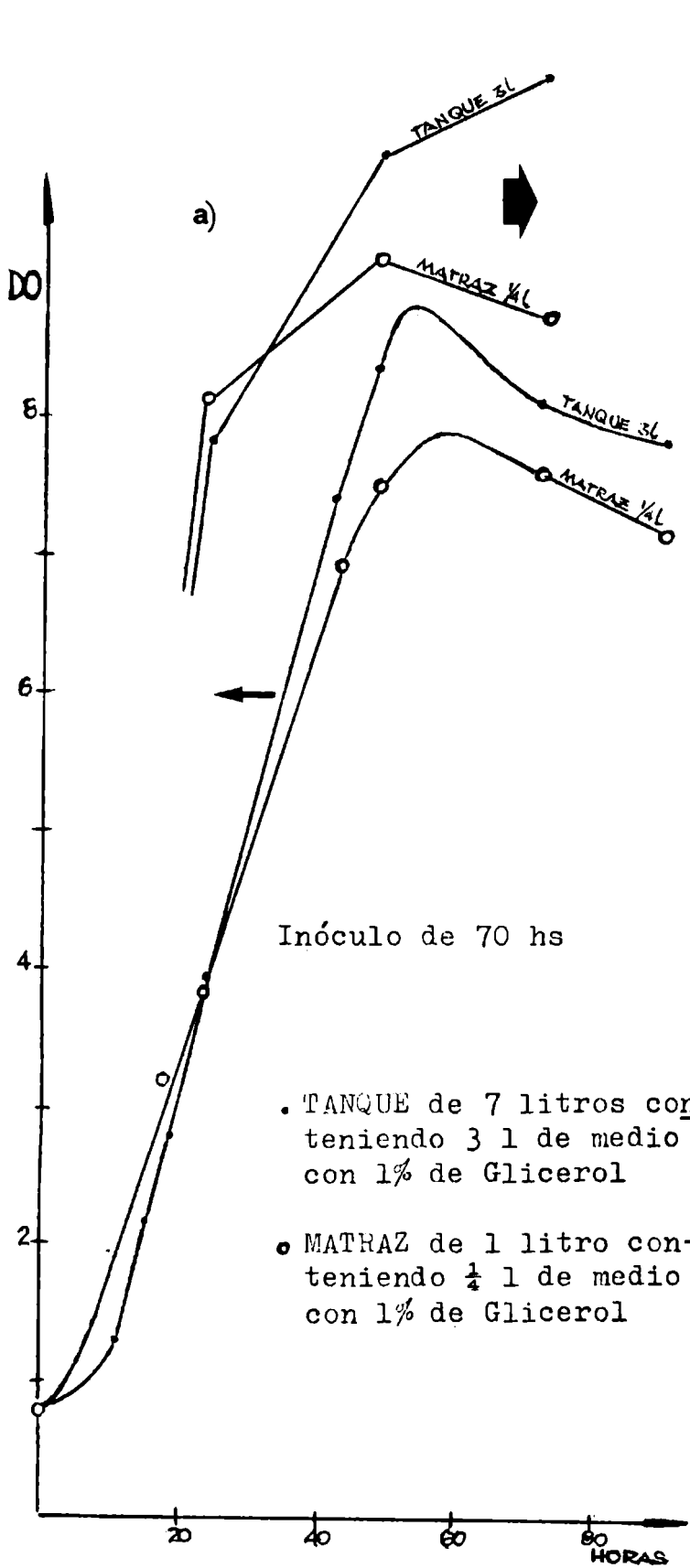
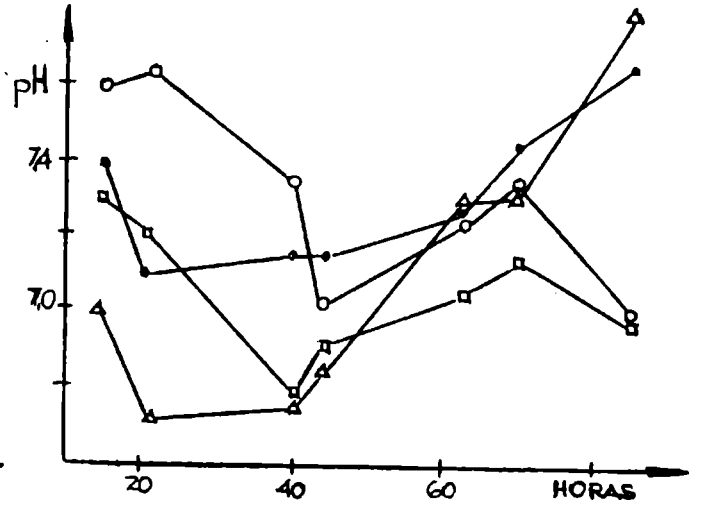
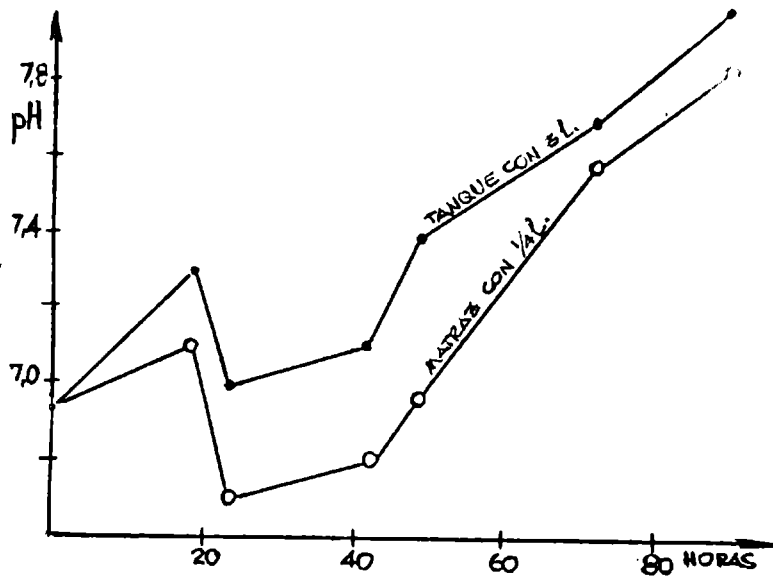
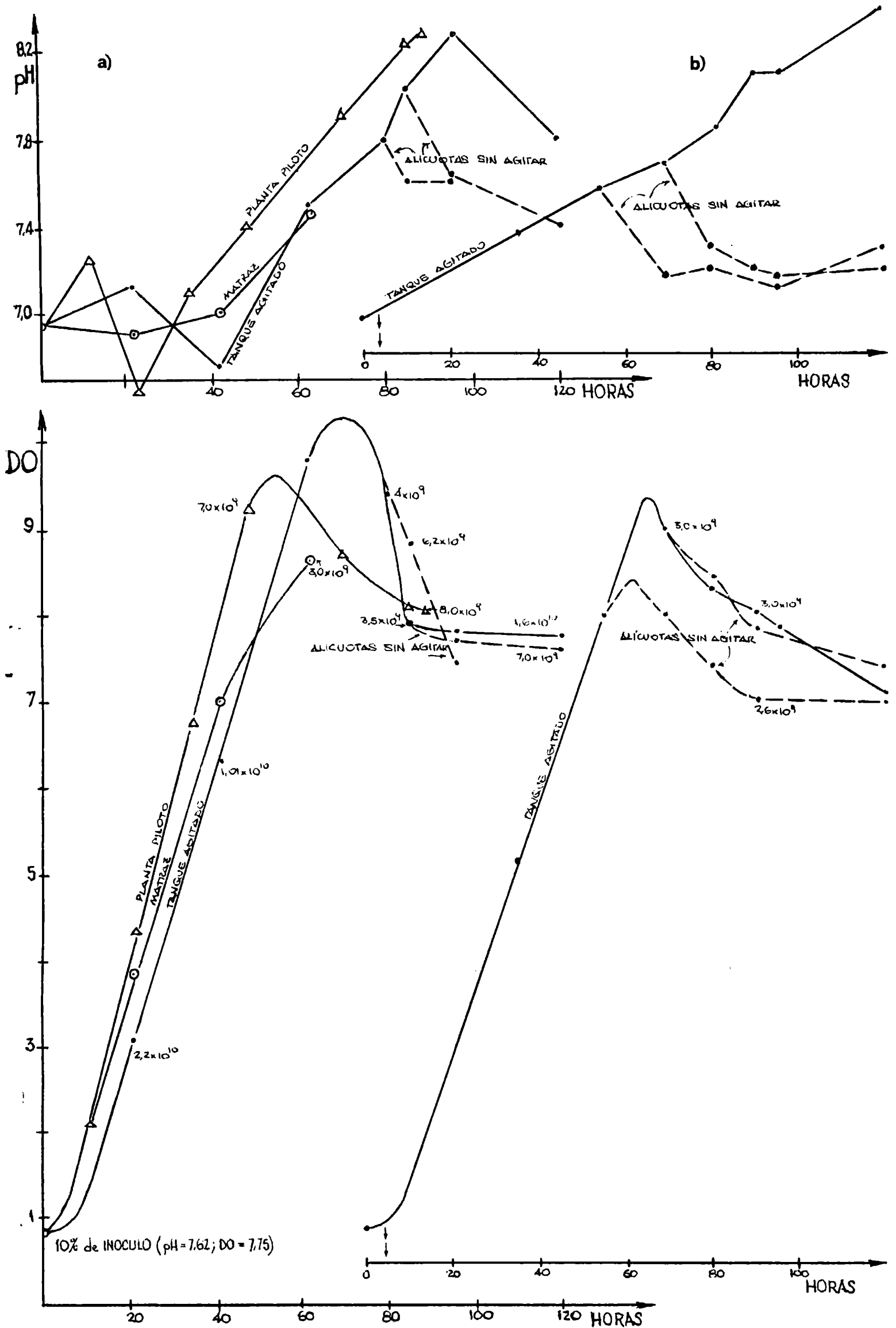


Gráfico 4.XIV: ENSAYOS DE OBTENCION DEL INOCULO DE LA PLANTA PILOTO. SE COMPARARON TANQUES AGITADOS Y ERLENMEYERS, PARA DOS CONCENTRACIONES DE FUENTE DE CARBONO.

Gráfico 4.XV. PROCESOS CON LOS QUE SE ELABORARON LOS CALDOS PARA IMPREGNAR SOPORTES



4.II.a RESULTADOS de las determinaciones fisicoquímicas

Con el fin de caracterizar el material y luego poder correlacionar su comportamiento como soporte de una población bacteriana con sus caracteres intrínsecos determinados físico-químicamente, se realizaron toda una serie de ensayos, componiendo un amplio espectro entre la composición química, por un lado, hasta la determinación de diferentes constantes físicas, por el otro, que fueron necesarias para con su conocimiento ajustar la metodología empleada en la elaboración del soporte. Así por ejemplo se determinaron las características de superficie (poros, superficie específica, agua extraíble) para discernir sobre cual es el grado de molienda óptimo; así también con el conocimiento de la capacidad calorífica y con la densidad aparente, y la variación de estos parámetros con la humedad, se pudo calcular el coeficiente de conductividad del material en función del contenido de humedad.

En la Tabla 4.II.1, se hace un resumen de estos resultados, procediéndose luego a desarrollar los pormenores de aquellos para los cuales no existen antecedentes anteriores.

Tabla 4.II.

TURBA NEUTRALIZADA CON CO₂Ca, UTILIZADA COMO SOPORTE DE LOS INOCULANTES:

PARAMETRO MEDIDO	Resultado en "Turba Tal Cual"			Mallas 30/50	Mallas 200 o
Color		PARDO OSCURO, CON ELEMENTOS PARTICULADOS MAS CLAROS	IDEM	IDEM	IDEM
Humedad a 105°C (%)	14		11,56		15,26
Capacidad hídrica (a 1 bar) (gr%/grseco)	72,5		59,9		118,8
Densidad aparente (gr/cm ³)	0,33		0,26		0,36
Densidad real (gr/cm ³)	0,35		0,33		0,42
Materia Orgánica total (Cxl,32) (%)	55,44		53,59		59,13
relación C/N	55-60		55-60		55-60
	14,88		20,3		20,83
análisis elemental cuali-cuanti:					
C gr %	42		40,6		45,2
H gr %	6,7		5,1		7,26
N gr %	1,68		2,0		2,17
P mgr %	0,8		0,7		1,0
Ca gr %	2		1	(mallas 80/200)	3
K mgr %	80		67		91
Fe	poco		sí		no
Superficie específica (método geométrico) m ²	~2		<< 2		2-2,8
Porosimetría (por intrusión de Hg)	Macroporos		Macroporos		Macroporos
Capacidad buffer (para los pH que se indican)	6,0 y 8,2		6,0 y 8,2		6,0 y 8,2
Alquitranes o pirógenos a 250°C (%)	54 - 70		58		62
Inertes (especialmente arenilla y CO ₃ Ca) %	25 - 29		23		38

continuación Tabla 4.II.

PARAMETRO MEDIDO	Resultado en "Turba Tal Cual"	Mallas 30/50	Malla 200
Cenizas a 1000°C (% de turba a 105°C)	26	26	36
Arena e insolubles en NH ₄ OH (%)	24	25	30
Arcilla (soluble en NH ₄ OH que precipita con CLK)	2	1	6
Acido fúlvico	poco	poco	poco
Acido himatomelánico	poco	poco	poco
Acido húmico	poco	poco	poco
Relación Turba-aire-agua (%)	66,83+32,80+0,90	62,50+36,75+0,75	70,7+28,0+1,30
Poder adsorbente (frente al Cu ⁺⁺)	poco	poco	poco
Capacidad calorífica (cal/gr x °C)	0,146	--	--
Coefficiente de transmisión del calor (cal/cm.seg.°C)	2 x 10 ⁻⁴	--	--
Radiactividad residual (contador Geiger)	NO TIENE	NO TIENE	NO TIENE
pH (2 gr turba en 100 ml agua destilada x 1 h)	7,40	7,35	7,55
Acidez de intercambio (Idem con solución C ₁ Na 9%)	7,70	7,55	7,80
Toxicidad del extracto acuoso sobre el Rhizobium	DESPRECIABLE	DESPRECIABLE	DESPRECIABLE

Tabla 4.II.1.

Distribución granulométrica en la turba utilizada:

a) Determinación a partir de 10 gr de muestra:

MALLA	Peso en gr de lo retenido	%
10	--	0,00
30	1,5612	15,90
50	0,8356	8,51
80	2,2432	22,85
100	0,9665	9,85
200	1,1167	11,37
200 _{bis}	1,5864	16,16
Pasó	<u>1,5077</u>	<u>15,35</u>
	9,8173	99,99

b) Determinación a partir de casi un kilogramo de muestra:

MALLA	Peso en gr de lo retenido	%
10	--	0,00
30	171	17,66
50	86	8,88
80	232,1	23,97
100	80,3	8,29
200	193,5	19,98
200 _{bis}	44,2	4,56
Pasó	<u>161,2</u>	<u>16,65</u>
	968,3	99,99

c) Determinación a partir de mas de dos Kg de muestra:

MALLA	Peso en gr de lo retenido	%
10	--	0,00
30	432,8	18,63
50	217,1	9,34
80	560,2	24,10
100	215,2	9,26
200	484,0	20,83
200 _{Bis}	127,0	5,46
Pasó	<u>287,6</u>	<u>12,37</u>
	2323,9	99,99

Tabla 4.II.2.

Determinación de la Capacidad hídrica, a distintas tensiones, en una muestra fraccionada de turba:

(Resultados expresados en $\frac{\% \text{ de gr de agua}}{\text{gr de turba seca a } 105^{\circ}\text{C}}$)

MUESTRA	TENSION APLICADA, medida en bar			
	1/10	1/3	1	15
"Tal Cual"	108,6	81,5	72,5	69,5
Mallas 30/50	78,9	72,1	59,9	46,5
Malla 100	108,0	74,7	69,1	61,7
Malla 200	173,9	118,8	95,2	87,7

Tabla 4.II.3.

RESULTADOS en la determinación cuantitativa de C,H,N,
para varias muestras de turba:

M U E S T R A	C	H	N
Turba "Tal Cual"	42,0	6,48	1,70
	43,2	7,00	1,66
Turba Malla 30	41,6	6,15	1,84
	39,7	4,13	2,29
Turba Malla 200	44,5	7,25	2,25
	46,0	7,28	2,09
Turba "TC" inoculada lavada x 1 semana y filtrada	41,8	3,67	2,09
	42,8	5,35	1,49
Turba holandesa	46,5	7,30	0,0
	49,5	5,94	0,0
	48,5	7,10	--
Turba de Mendoza, Superficie de turbera	38,8	5,65	0,73
	38,0	5,50	0,79
Turba de Mendoza, Interior de la turbera	28,4	4,62	0,70
	26,4	3,51	0,64
Turba "Tal Cual", o- tro lote	30,40	3,42	3,34
	40,80	5,38	2,62
	34,10	5,30	--

CALCULO GEOMETRICO DE LA SUPERFICIE ESPECIFICA

mallá: 'PASO' 200'

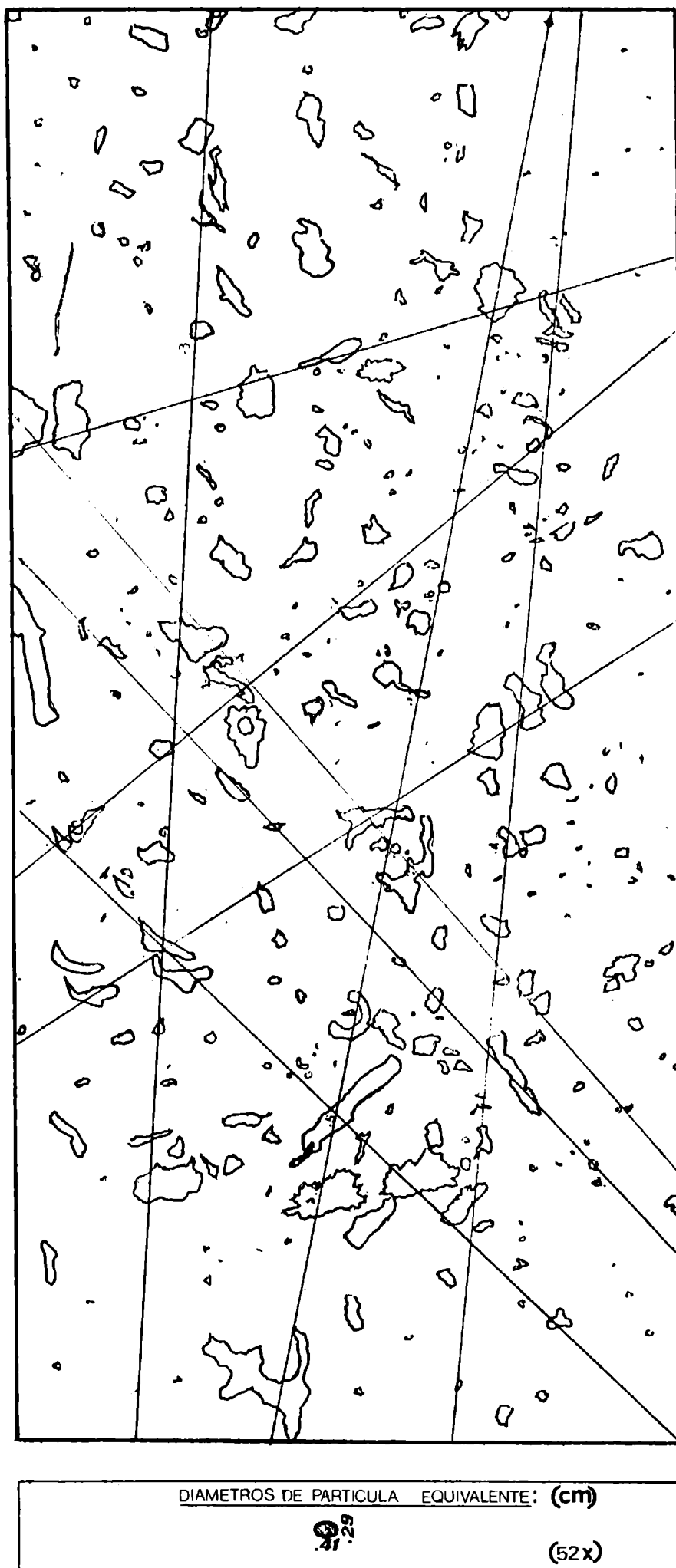
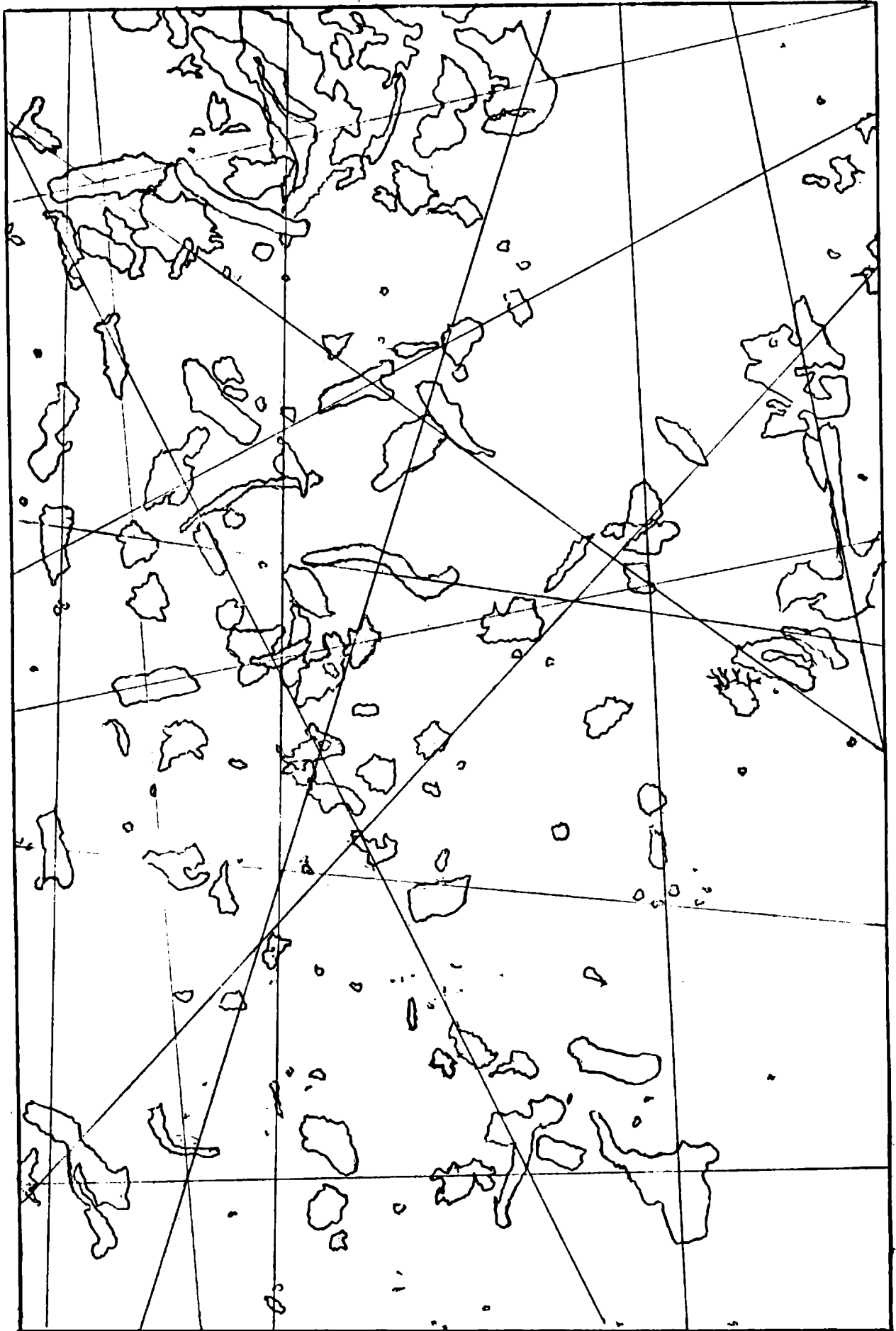


Figura 4.II.

(52x)

malla: "RETENIDO 200"



DIAMETROS DE PARTICULA EQUIVALENTE, en cm:



Figura 4.II.1

(52x)

malla 30 a)

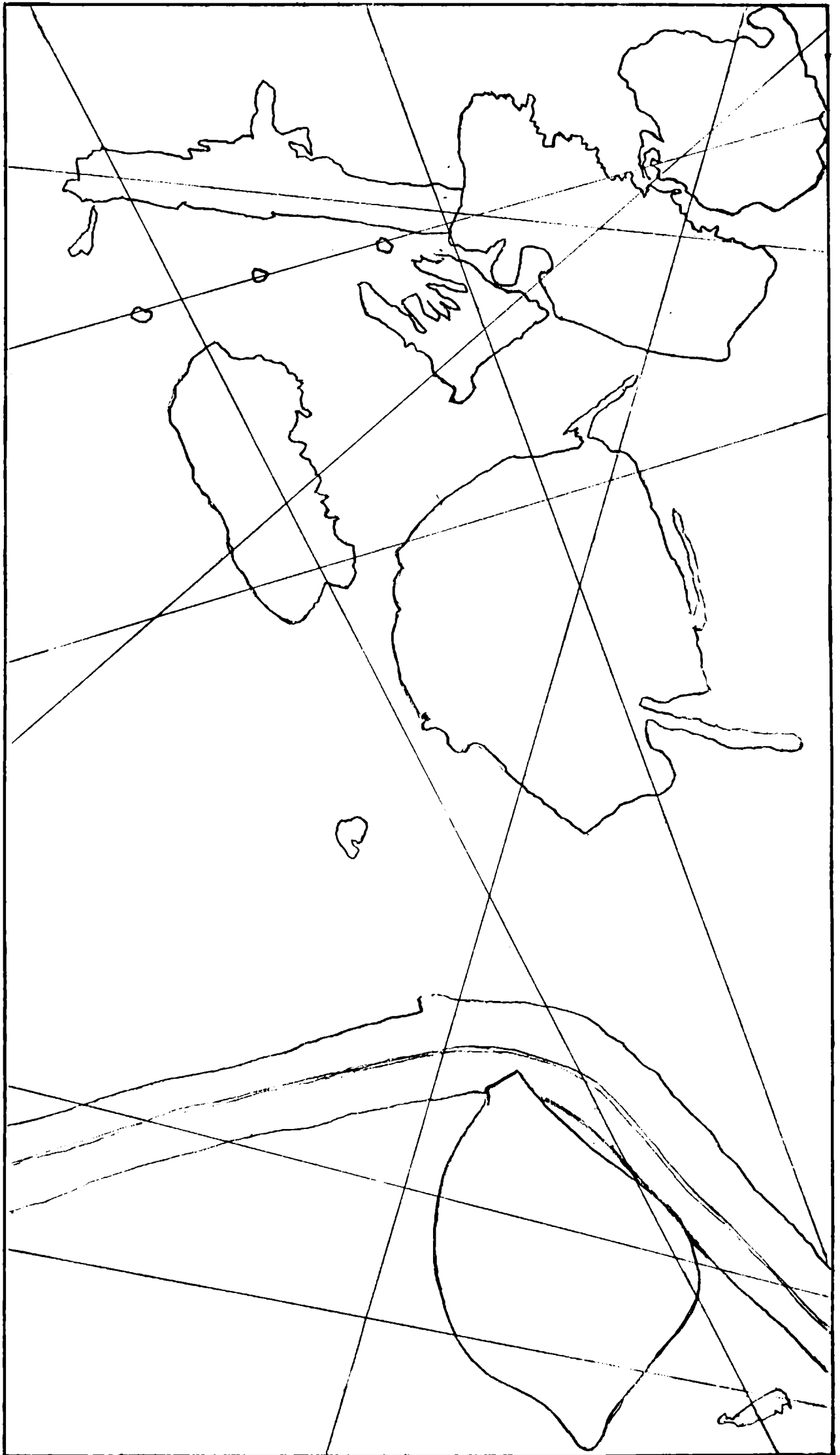
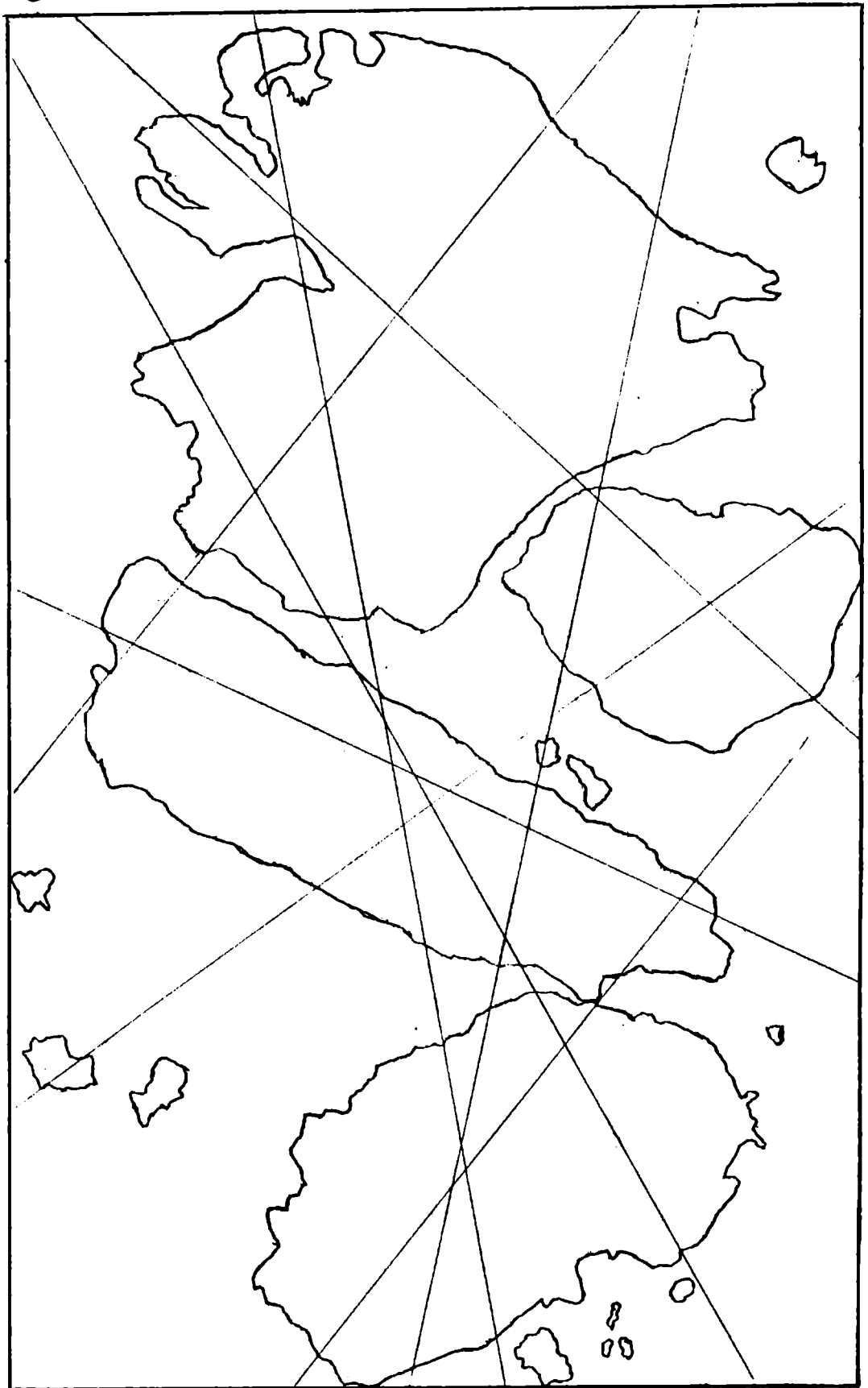


Figura 4.II.3

(52x)

"malla 30" b)



PROMEDIOS **a)** Y **b)** DE DIAMETROS DE PARTICULA EQUIVALENTE, en cm :

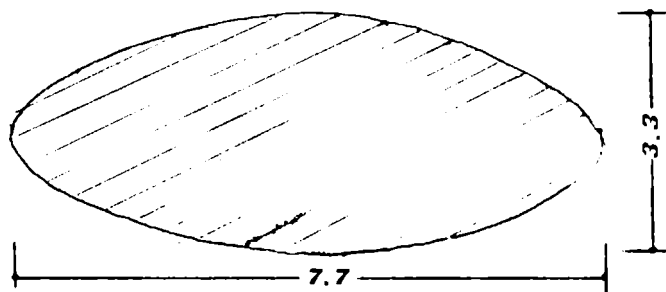


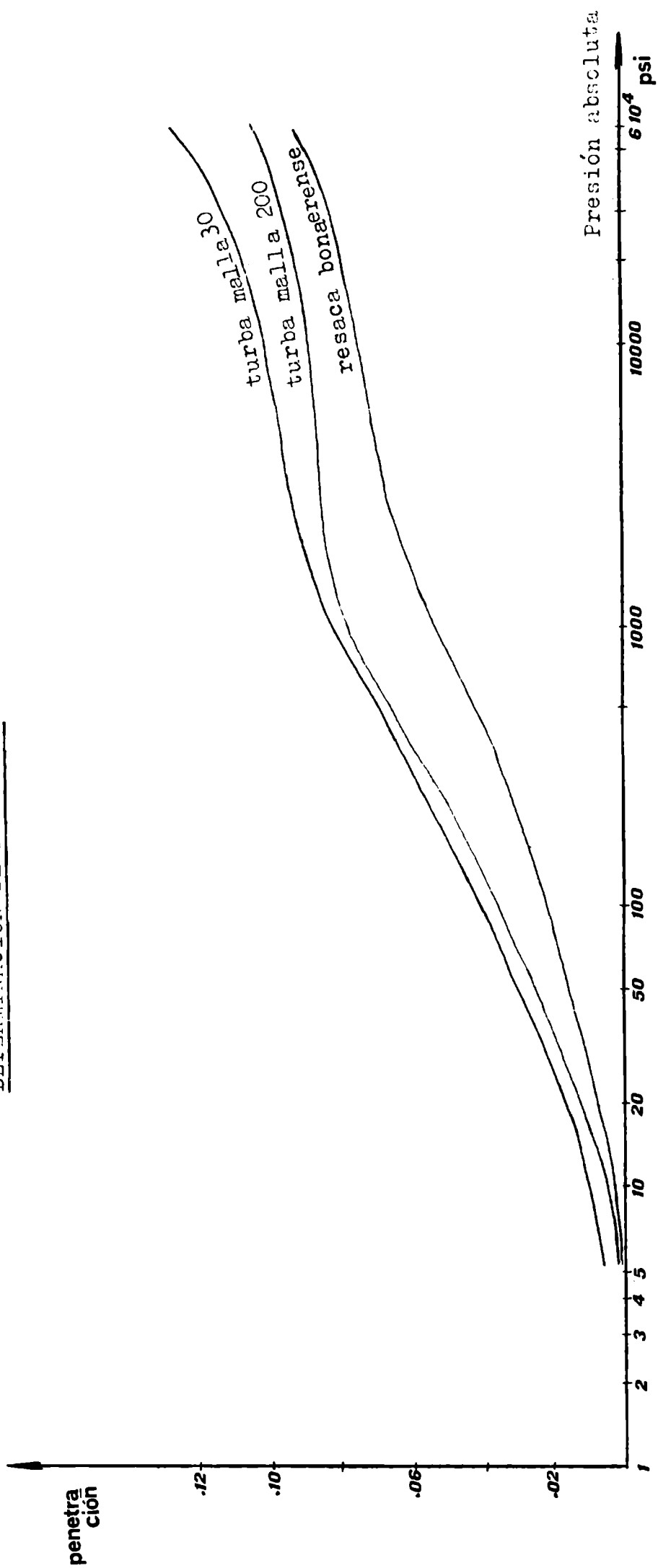
Tabla 4.II.4.

DETERMINACION DE DENSIDAD Y POROSIDAD

	"MALLA 30"	"MALLA 200"	"TAL CUAL"	"RESACA"
A.-Peso del penetrometro	73,5638	71,4664	73,5449	71,4618
B.-Peso del penetrometro lleno con mercurio				
C.-Peso del mercurio (A-B).....				
D.-Temperatura ambiente °C,Densidad del mercurio	13,5462	13,5512	13,5536	13,5512
E.-Volumen del penetrometro C/D	6,448	6,811	6,448	6,811
F.-Peso del penetrometro y muestra	74,7133	72,3137	73,6685	72,7191
G.-Peso de la muestra (F-A).....	1,1495	0,8473	0,1236	1,2573
H.-Peso del penetrometro con muestra y lleno con mercurio	152,7092	156,049	159,9215	155,4557
I.-Peso del mercurio(H-F).....	77,9959	83,7353	86,253	82,7366
J.-Volumen del mercurio (I/D).....	5,758	6,179	6,364	6,105
K.-volumen de mercurio desplazado en el vástago... a la presión de *	0,127	0,105	0,015	0,095
L.-Volumen aparente de la muestra (E-J).....	0,69	0,632	0,084	0,705
M.-Densidad aparente (G/L).....	1,66	1,34	1,47	1,78
N.-Densidad real	2,04	1,61	1,79	2,06
O.-Volumen real de la muestra (G/N).....	0,563	0,527	0,069	0,61
P.-Volumen total de poros de la muestra(L-N).....	0,127	0,105	0,015	0,095
P.-Porosidad total de la muestra (O/L x 100).....	18,4	16,6	17,7	13,5
Q.-Porosidad debida a poros mayores de micrones 100 x (L-K)/L	macroporos	macroporos	macroporos	macroporos
R.-Porosidad debida a poros menores de micrones 100 x K/L	--	--	--	--

Gráfico 4.II.

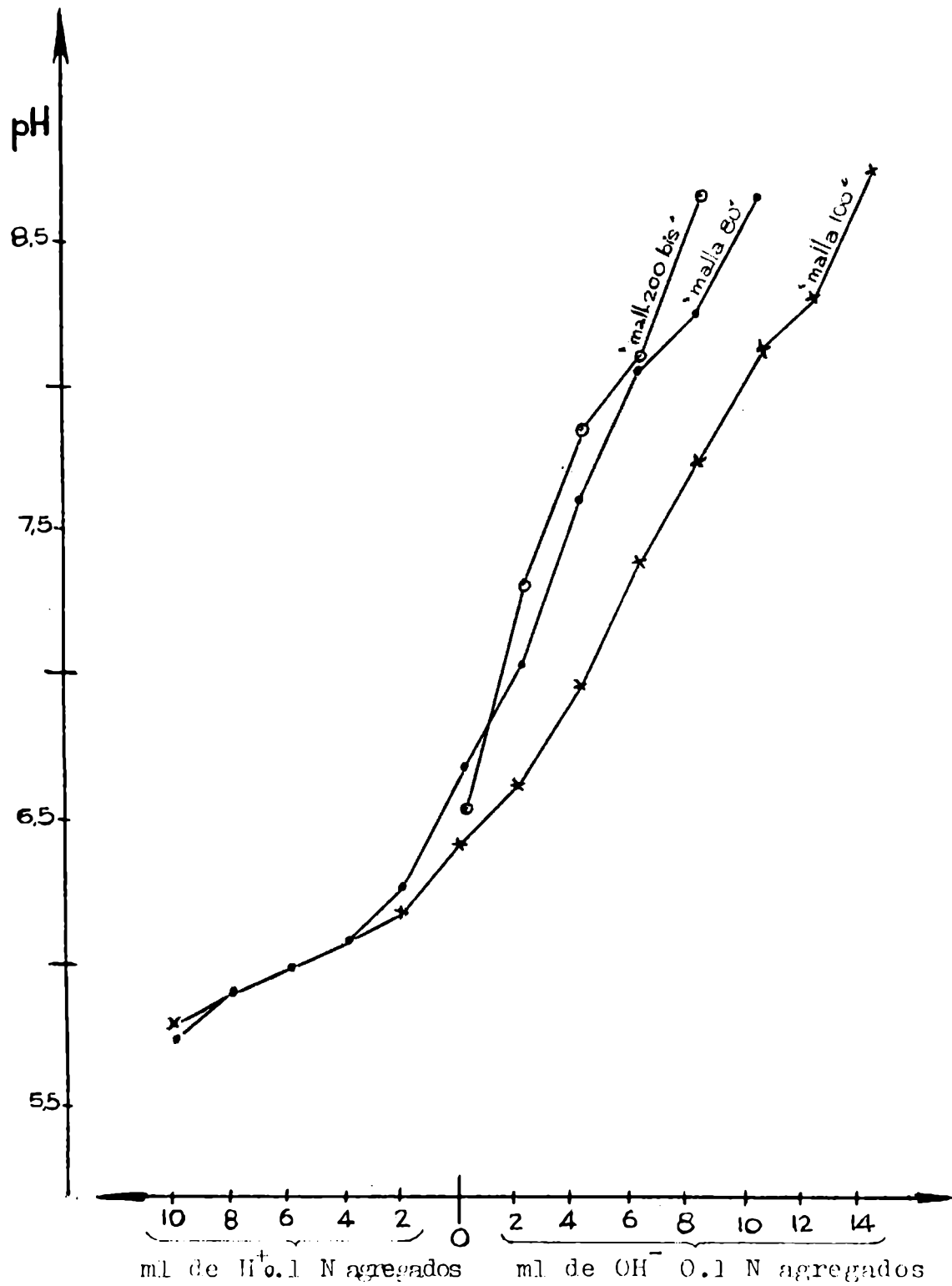
DETERMINACION DE POROSIDAD



Forosímetro Aminco-Winslow 5-71C8. Pastillas a 15000 libras. Vacío de 50 micrones.

Gráfico 4.II.1

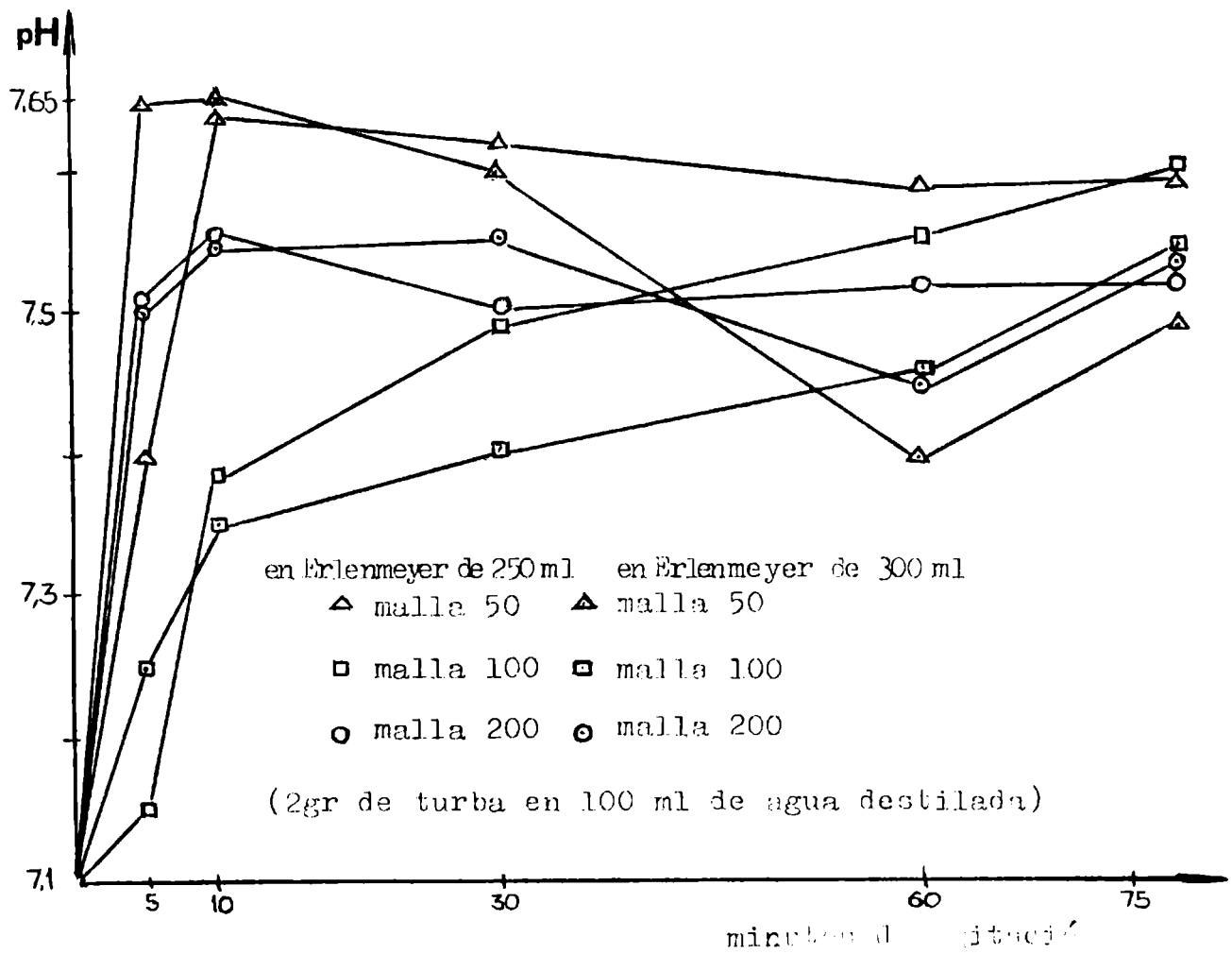
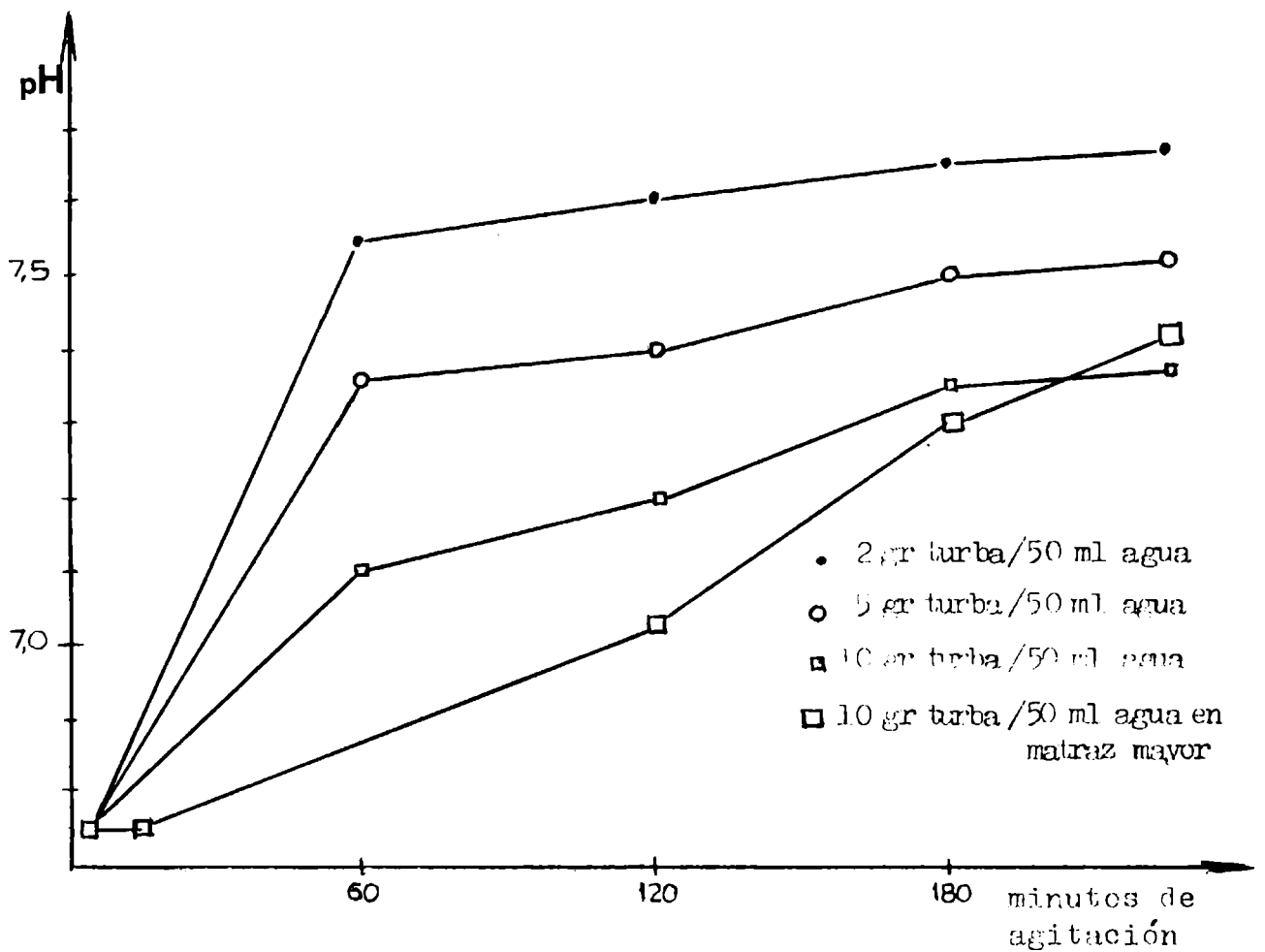
PODER BUFFER DE LA TURBA



NOTA: Cada determinación se hizo en forma independiente, trabajando con 5 gr de turba y completando vol. a 30 ml.

Gráfico 1.11.2.

a) EVOLUCION DEL pH DE UNA MUESTRA DE TURBA, EN FUNCION DE LA RELACION: MASA DE LA MUESTRA/VOL DE MOJADO



b) EVOLUCION DEL pH EN FUNCION DE LA GRANULOMETRIA DE LA TURBA

Cálculo del coeficiente de conductividad térmica (k) de un soporte turboso malla "Tal Cual". Estimación de la forma en que se ve afectado el k por el contenido de humedad del soporte:

DATOS EXPERIMENTALES DE LA TURBA				DATOS BIBLIOGRAFICOS	
Humedad % (H)	Densidad Aparente ρ	Capacidad Calorífica (Cp)	Granulometría	Coeficientes de conductividad térmica (k)	Coeficiente de transferencia (h)
14	0,33	0,146	Turba "Tal Cual"	$k_{\text{pirex}} = 0,05 \text{ HFU / hora.}^\circ\text{F. pie}^2$	
70	0,82	--		De la turba: DESCONOCIDO	De la turba: DESCONOCIDO
75 ^{agua} _{libre}	0,88	--			
100 ^{agua} _{pura}	1,00	0,140		$k_{\text{agua}} = 1,35 \times 10^{-3}$	$h_{\text{agua}} = \text{circulante} > 100$

Debido a que la capacidad calorífica, la densidad aparente, o el coeficiente de conductividad térmica, varían en función del porcentaje de humedad presente en el material de estudio, había que determinar los valores reales de esos parámetros, para una humedad dada. Lo mas simple era suponer que todos ellos variaban linealmente con el contenido de humedad, así que para el caso de la capacidad calorífica se pudo plantear:

$$C_p = Hx C_{p_{H_2O}} + (1-H) C_{p_{\text{Turba}}}$$

de donde

$$C_{p_{\text{Turba}}} = \frac{C_p - Hx C_{p_{H_2O}}}{1 - H} = \frac{0,146 - 0,14}{0,86} \cong 0,007 \frac{\text{cal}}{\text{gr } ^\circ\text{C}}$$

así que reemplazando en la ecuación original, surge que $C_p \cong H$, o sea que la capacidad calorífica del material es aproximadamente igual a su contenido de humedad.

Para el coeficiente de transferencia total podríamos escribir:

$$1/h_T = 1/h_{\text{pirex}} + 1/h_{\text{agua}} + 1/h_{\text{turba}}$$

O sea que la resistencia total a la transferencia de energía es realmente una suma de resistencias parciales. Pero como la del agua circulante es mayor que 100, comparando valores se ve que en

la resistencia en serie conviene considerar solamente el primer término:

$$h \cong \frac{k_{\text{pirex}}}{\text{espesor de pared del tubo}} = \frac{0,05 \times 30,48 \text{ cm/pié}}{0,08 \text{ cm}} \cong 18,5 \frac{\text{BTU}}{\text{k } ^\circ\text{F pie}^2}$$

Cuando hubo que calcular la forma en que varía la densidad aparente de la turba, en función de su contenido de humedad, la primera aproximación viene de suponer que al aumentar el contenido de agua, aumentan concomitantemente la masa y el volumen de cada partícula, así que se planteó:

$$\rho = \rho_{\text{agua}} \times H + \rho_{\text{turba}} (1-H)$$

de donde:

$$\rho_{\text{Turba}} = \frac{\rho - \rho_{\text{agua}} H}{1 - H}$$

para H=14%	$\frac{0,33-0,14}{0,86} = 0,24 \text{ gr/cm}^3$
para H=70%	$\frac{0,82-0,70}{0,30} = 0,40 \text{ gr/cm}^3$
para H=75%	$\frac{0,88-0,75}{0,25} = 0,52 \text{ gr/cm}^3$

Se puede observar que se obtuvieron valores muy discordantes. Se decidió entonces cambiar el modelo, suponiendo uno en que no se modifique el volumen al variar el contenido de humedad, tal como sucede con una esponja que al absorber agua va rellenando poros, sin que se modifique el volumen total. Entonces:

1 cm³ de Turba con humedad H pesa..... ρ gr

1 cm³ de Turba seca debería pesar..... $\rho - H$ gr

para 14% de H	→ 0,19 gr
para 70% de H	→ 0,12 gr
para 75% de H	→ 0,13 gr

Se tomó como el valor de la densidad de la turba seca: 0,2 $\frac{\text{gr}}{\text{cm}^3}$ pues la suposición de que no se modifica el vol al variar

la humedad, es tanto mas cierta cuanto menor sea este valor de humedad, y por eso se extrapoló hasta obtener el valor indicado.

Recién cuando la humedad aumente bastante, se puede utilizar la ecuación primero ensayada, en que reemplazando valores:

$$\rho = H + 0,2(1-H) = 0,2 + 0,8H$$

Se habían confeccionado experimentalmente gráficos donde se mostrase la variación de la Temperatura con el tiempo, para turba a granel calentada en vasos cilíndricos de fermentación de

7,3 cm de radio y $1,12 \text{ cm}/2 = 0,56 \text{ cm}$ de espesor de pared de vidrio pirex. En la bibliografía existían tablas que correlacionaban tiempo adimensional con el número de Biot ($h.L/k$, en que L es la longitud característica, en este caso el radio del vaso). Se quería determinar el valor de k , para lo cual se transformó al tiempo en adimensional mediante la ecuación:

$$\tau_{\text{(adimensional)}} = \frac{\alpha \cdot t}{L^2} \quad ; \quad \text{en que } \alpha = \frac{k}{\rho \cdot C_p}$$

t = tiempo en segundos

L = espesor característico a través del cual ocurre la transferencia

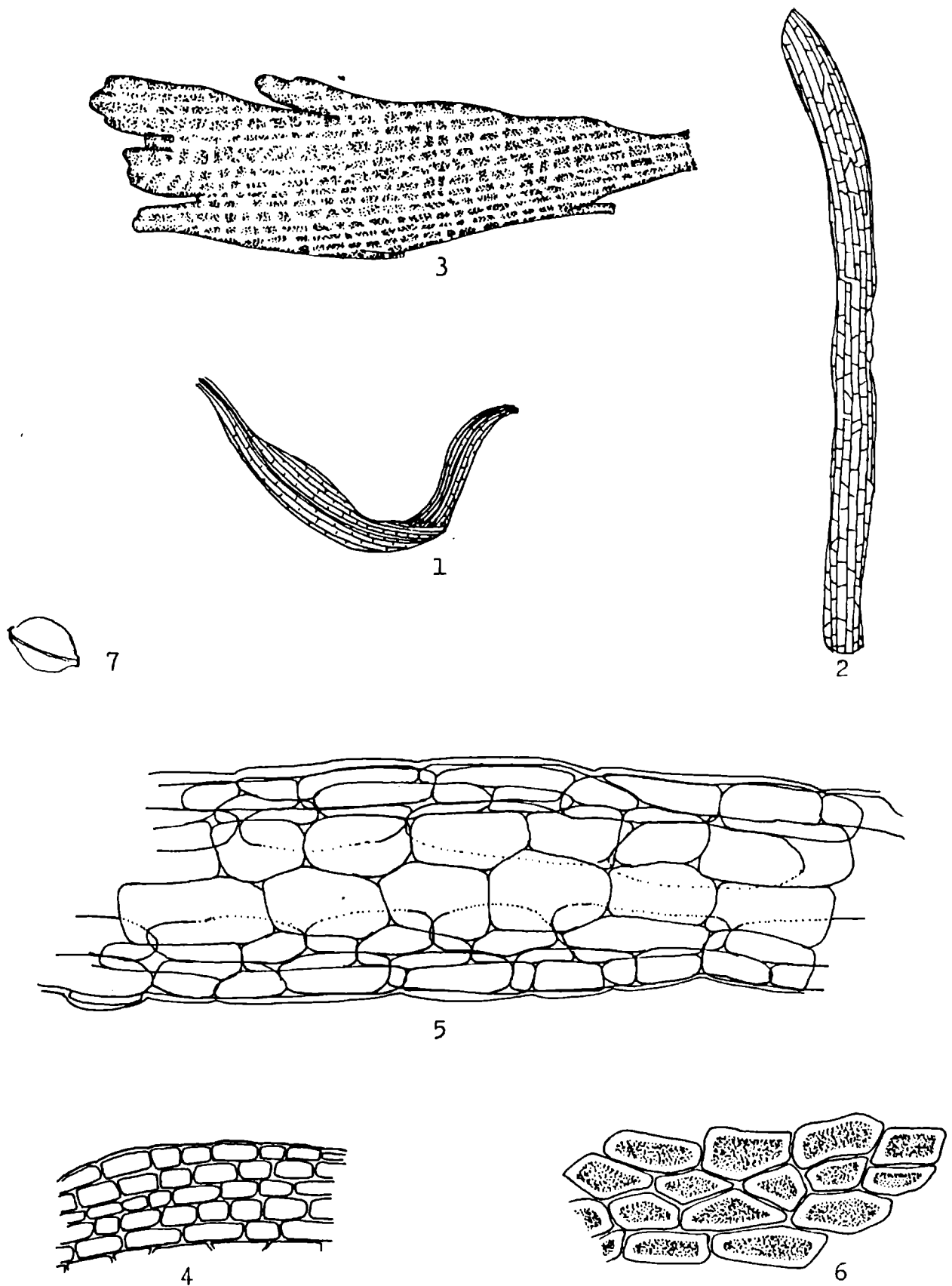
Se le fueron dando diferentes valores a k , tales que reemplazando en tau (tiempo adimensional) y en el Biot, se entrase en una curva coincidente con la obtenida experimentalmente, para la cual también se habían adimensionalizado sus parámetros.

Así se encontró que

$$k_{\text{turba con 14\% agua}} \approx 2 \times 10^{-4} \frac{\text{cal}}{\text{cm seg } ^\circ\text{C}}$$

Una aproximación grosera sería poner el k_{turba} en función del contenido de humedad, así:

$$k_{\text{turba}} = 0,2 \times 10^{-3} + 1,35 \times 10^{-3} \times H$$

ESTUDIO BOTANICO DE LOS FRAGMENTOS MAS REPRESENTATIVOS DE LA TURBA:

Observaciones realizadas en la turba pulverizada y diafanizada con solución de hidrato de cloral, vistas con microscopio y dibujadas con Cámara Clara:

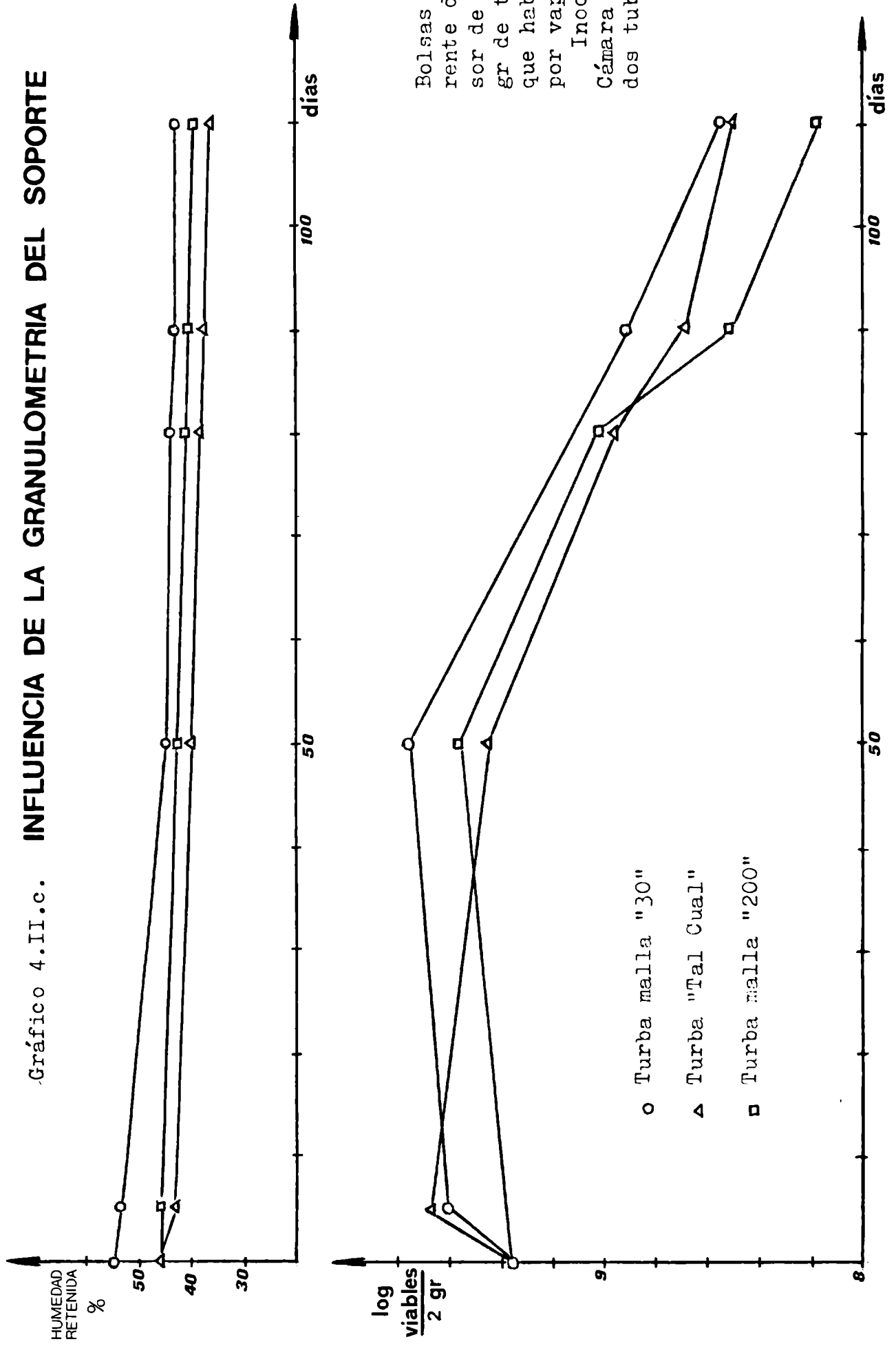
1. Hojuela entera de *Sphagnum* sp (x52); 2. Fragmento de la columnela (x52); 3. Fragmento del esporangio (la columnela y el esporangio pertenecen a la fase esporofito) (x52); 4. Fragmento de la hojuela (x300); 5. Fragmento de la columnela (x300); 6. Fragmento del esporangio (x300); 7 Esporo. (x300).

4.II.c RESULTADOS de la supervivencia del microorganismo sobre turbas de diferente granulometría

Simultáneamente con las determinaciones de la supervivencia del Rhizobium sobre turba esterilizada o no, se repitió la metodología expuesta en 3.III.c. para las determinaciones que se hicieron con diferentes granulometrías del soporte, en este caso todas ellas esterilizadas por vapor, con las bolsas de plástico esterilizadas por radiación gamma.

Se observa en el Gráfico 4.II.c. que el grado de división del soporte turboso modifica la retención de humedad en los inoculantes, verificándose que aquellos de granulometría mayor (v.g. "malla 30") son los que mas facilmente pierden su humedad. También se nota que la supervivencia en los paquetes rellenos con turba de malla gruesa, fue aún mejor que en aquellos otros que contenían Turba muy fina. La malla "Tal Cual" (que es una mezcla de todas las granulometrías) tuvo un buen desempeño en lo que hace a sobrevivencia del microorganismo.

Gráfico 4.II.c. INFLUENCIA DE LA GRANULOMETRIA DEL SOPORTE



Bolsas de polietileno transparente de 80 micrones de espesor de pared, rellenas con 150 gr de turba de varias granulometrías, que había sido esterilizada por vapor.

Inoculante almacenado en Cámara a 30°C, a 3 metros de dos tubos fluorescentes de 40W

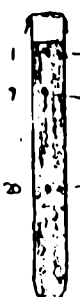



4.III. Determinación del tiempo de retención en autoclave, para la turba esterilizada por vapor

Con el k estimado en 4.II.a, conociendo su variación con el por ciento de agua, se estaba en condiciones de calcular teóricamente el tiempo de retención que debía tener un material constituido a base de turba, para que en el centro del mismo se alcance una temperatura prefijada, suponiendo simetría cilíndrica.

Mediante ensayos previos se logró determinar que partiendo de un material con un 8 % de humedad, tras cada ciclo de esterilización de 15 minutos a 121°C el valor final de humedad se incrementaba aproximadamente en un 1%, con lo que se facilitaba la transmisión del calor en el ciclo de esterilización siguiente, debido al agua condensada en el ciclo anterior. No se tomaron en cuenta los gradientes de humedad, pero en cambio al tiempo total de retención, obtenido por cálculo y que resultó ser de unos 100 minutos para las condiciones operativas empleadas, se lo incrementó en un 20% como factor de seguridad, con lo que el tiempo total de esterilización se llevó a dos horas a temperatura de 121°C.

Se verificó la esterilidad mediante ensayos biológicos de plaqueo en cajas de Petri con dos medios de cultivo diferentes.

Tabla 4.III. .

tiempo de ESTERILIZACION total	Profundidad a la que se extrajo la muestra (cm)	Toma de muestra para recuento (gr)	RECUENTOS VIABLES/gr		Humedad total%
			Medio 1 •	Medio 2 ★	
0	turba a granel	1	$>10^7$	$>10^7$	8,65
15		2	estéril	estéril	9,65
		1	estéril	1×10^4	9,00
		1	estéril	8×10^4	9,03
30		2	estéril	estéril	13,02
		1,2	estéril	8×10^3	8,91
		1,1	--	--	8,35
55		4	estéril	estéril	11,88
		--	--	--	10,09
		2	2×10^2	17×10^2	9,29
		2	1×10^2	11×10^2	--
120		4	estéril	estéril	18,50
		4	estéril	estéril	14,50

DECAIMIENTO DE VIABLES Y AUMENTO DE HUMEDAD EN FUNCION DEL TIEMPO TOTAL DE ESTERILIZACION POR VAPOR A 121°C.

- Medio de contaminantes, con Glucosa-Peptona (3.3) Sección
- ★ Medio sólido de Rhizobium (Tabla 3.I.a)

4.III.a. Resultados de la Supervivencia de los microorganismos sobre turba esterilizada por diferentes métodos:

A la turba molida, neutralizada con CO_3Ca , envasada en bolsitas de plástico, e impregnada tal como se indicó en 3.III.c., se la dejó madurar y luego se conservó a dos temperaturas (30°C y 5°C) durante su almacenamiento. Se habían utilizado diferentes métodos para esterilizar el soporte turboso y las bolsitas de polietileno, en especial las radiaciones gamma, el óxido de etileno, y el vapor sobrecalentado, midiendo luego la supervivencia en el soporte.

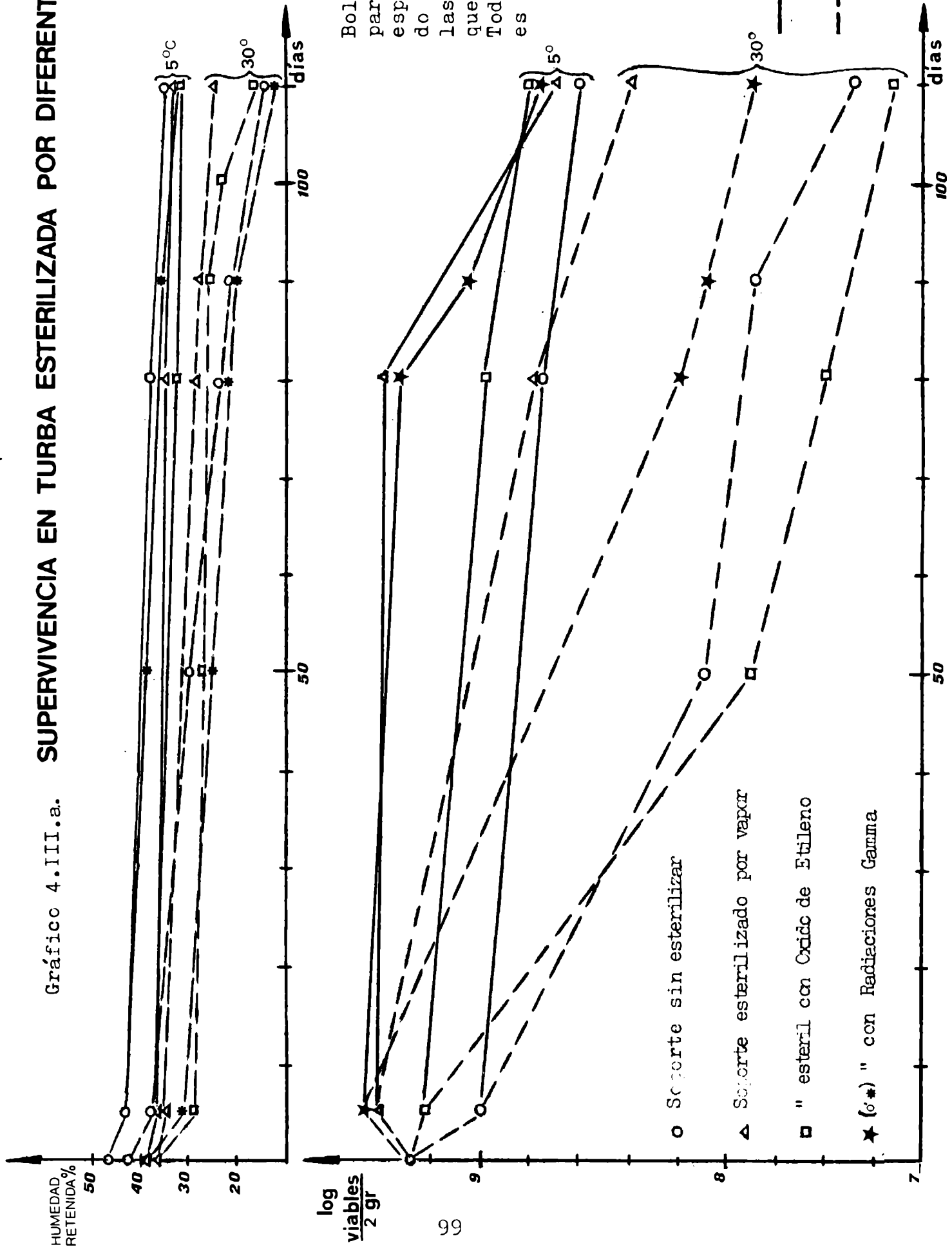
Además, cada vez que se utilizaba una partida de medio sólido nuevo, esto es, con el nutriente recién preparado, se contaban con este medio nuevo los viables de varias bolsas de inoculante cuya población se conocía bien por determinaciones anteriores (realizadas con un medio de cultivo ya verificado). En los pocos casos en que aparecían diferencias en los recuentos respecto de lo esperado (diferencias atribuibles a partidas de drogas diferentes, errores en la pesada o la preparación del medio, desecación prematura de las placas, etc), se determinaba un coeficiente que cuantificase la diferencia obtenida (por ejemplo si se esperaba 150x, y solamente se obtuvo 100x, el coeficiente valdría 1,5). Luego se corregían todos los valores que surgiesen de esa serie de placas con medio nuevo, al trabajar con el inoculante ensayado, utilizando ese mismo coeficiente.

Simultáneamente con las determinaciones de la supervivencia del microorganismo en estudio, aplicado sobre turba esterilizada o no, se repitió la metodología recién expuesta para las determinaciones que se hicieron con diferentes granulometrías de turba, en este caso todas ellas esterilizadas por vapor, con las bolsas de plástico esterilizadas por radiación gamma.

Se pudo apreciar la influencia que tenía la pérdida de humedad, trabajando con varios espesores de bolsas plásticas.

También se puso bien de manifiesto la influencia que tiene la luz de un tubo fluorescente, sobre el decaimiento de viables en las bolsas de material transparente. Este dato se necesitaba para luego poder apreciar en su verdadera magnitud las ventajas del almacenamiento en cámara fría de los inoculantes, pues como se encuentran casi todo el tiempo a oscuras, se suele sobre-estimar las ventajas de la refrigeración, al confundírsela con el consecuente aumento de oscuridad.

Gráfico 4.III.a. SUPERVIVENCIA EN TURBA ESTERILIZADA POR DIFERENTES METODOS



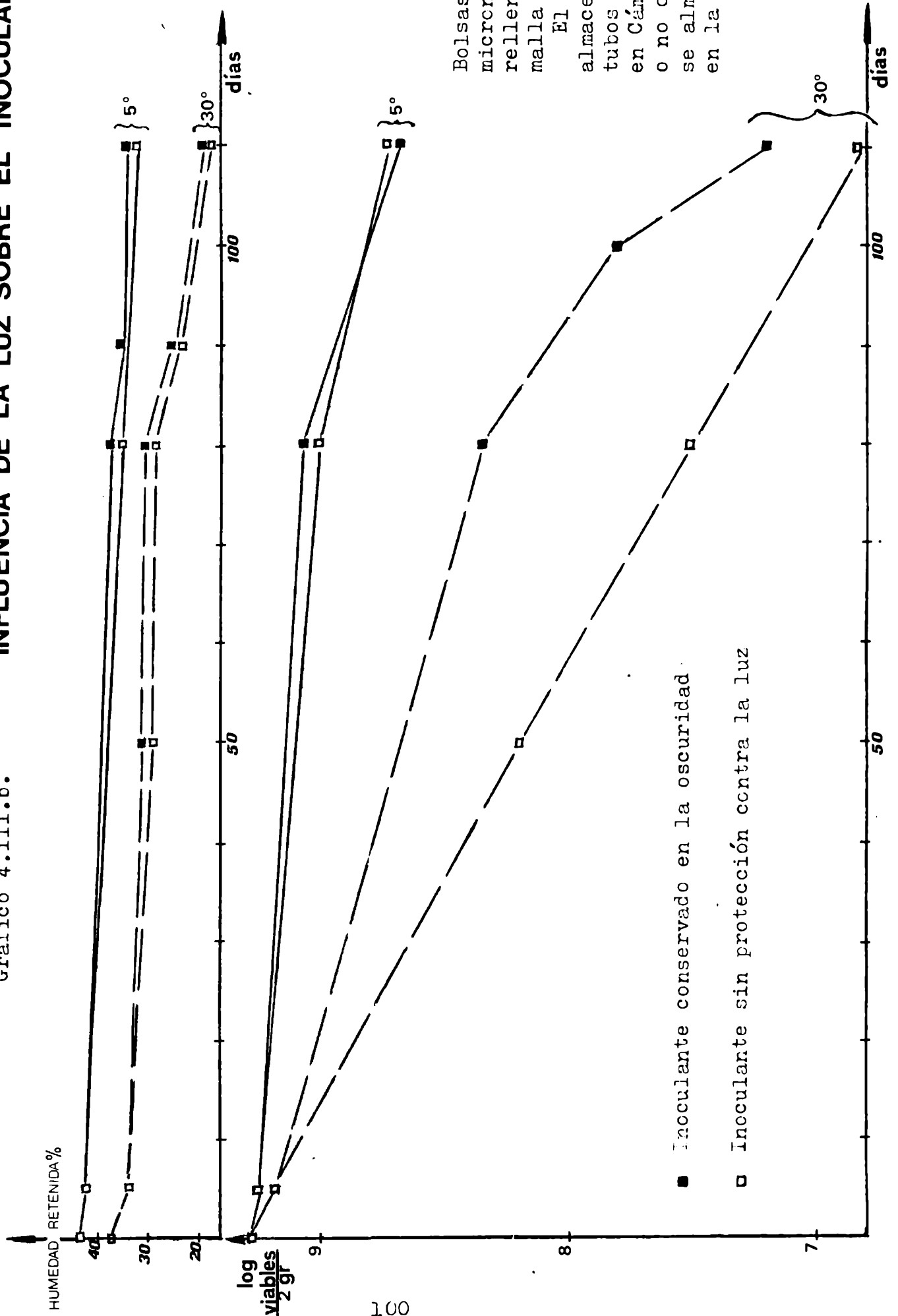
Bolsas de polietileno transparente, de 15 micrones de espesor de pared, contienen 150 gr de turba excepto las esterilizadas con RAY γ que solo contenían 100 gr. Toda la turba utilizada aquí es malla "Tal Cual".

— Inoculante conservado en la heladera (5°C)
 - - - Inoculante almacenado a 30°C.

○ Soporte sin esterilizar
 △ Soporte esterilizado por vapor
 □ " esteril con Oxidc de Etileno
 ★ (*) " con Radiaciones Gamma

INFLUENCIA DE LA LUZ SOBRE EL INOCULANTE

Gráfico 4.III.b.



Bolsas de polietileno de 15 micrones de espesor de pared, rellenas con 150 gr de turba malla "Tal cual".

El material impregnado se almacenó a 2 m de un par de tubos fluorescentes de 40 W, en Cámara a 30°C, recubierto o no con papel opaco; o sino se almacenó en heladera (5°C) en la oscuridad.

■ Inoculante conservado en la oscuridad

□ Inoculante sin protección contra la luz



4.IV.a. Resultados de los ensayos agronómicos. (en Cámara)

Lo primero que había que poner a punto, era el método de la ureasa, para poderlo hacer comparativo con el de Kjeldahl.

Se hicieron ensayos por duplicado utilizando ambas técnicas para medir el por ciento de N incorporado, testéandose de paso la influencia que puede tener la fuente de C del caldo de impregnación, en que ensayos previos (comparándose otros parámetros) habían dado resultados controvertidos, y por lo tanto se suponía que si realmente existía alguna diferencia, ésta iba a ser sutil, y se trataba de determinar qué criterio de eficiencia se podría utilizar para poner de manifiesto esas diferencias.

Se hicieron determinaciones en hojas y tallos por separado, realizándose un muestreo analítico entre una población de 15 o mas plantas en cada determinación.

Como parámetros suplementarios, se midieron los pesos fresco y seco de cada órgano, así como la altura de las plantas o la capacidad de las raíces de retener vermiculita, empleándose entonces este dato como una medida del grado de ramificación de las raíces. Además se estudió la cantidad y características de la nodulación, y la forma en que podría influir sobre el rendimiento en peso seco, o nitrógeno incorporado.

Se encontró que duplicados de un mismo lote daban valores dispares, tanto por Kjeldahl como por ureasa, atribuyéndoselo a que a medida que el vegetal va creciendo, moviliza sustancias, cationes, etc, de la parte inferior hacia la superior, donde están activos los meristemas de crecimiento, por lo que las partes nuevas de esta leguminosa son mas ricas en Nitrógeno o sales que las porciones mas cercanas a la raíz. Se hicieron a veces hasta cuadruplicados, de un mismo lote, para poder promediar los resultados parciales. La dispersión de valores era tal que iba desde casi un cero % de N en la parte inferior de algunos tallos, hasta valores cercanos a los de las hojas, cuando el tallo provenía de los tejidos mas jóvenes y por ende menos diferenciados.

Por ello se decidió que el ensayo final de los métodos de esterilización de soportes, se realizase sobre pequeños lotes de plantas, haciéndose la digestión en forma simultánea de toda la parte aérea del vegetal, en vez de realizar muestreos de un lote

grande para luego expresar el N de hojas y tallo por separado.

El beneficio que brindaba cada inoculante no se reflejaba solamente con el total de nódulos en las raíces de las plantas noduladas, decidiéndose entonces incluir su distribución (de acuerdo a que estuviesen localizados en la raíz principal o en cualquier otra), y su tamaño relativo, esto es, que fuesen chicos, medianos, o grandes. (Ver figs. 4.IV.1. y 4.IV.2).

Para el test final donde se ensayaron diferentes tipos de esterilización de soportes, se comparó la eficiencia del inoculante almacenado por 4 meses a 30°C, con aquellos que se habían conservado a 5°C; con las plantas que no habían sido inoculadas; o con aquellas en que se habían remojado sus semillas en un caldo de Rhizobiums, de concentración celular superior a 10^8 MO/ml, y con un pH de 7,65 y una DO_{625} de 8,25.

Se sacaron muestras de plantas para su análisis, a las 2, 3, 4, y 7 semanas de sembradas las semillas.

Cuando en una población de plantas que habían recibido inoculante, aparecían algunas sin nodular, se las computaba aparte, utilizándose esos datos como autocontrol del lote, para luego compararse con aquellas que ex-profeso se quiso que no nodulasen, al no inocularlas.

Los valores del % de nitrógeno que figuran en los Cuadros respectivos, son el resultado del promedio de dos titulaciones, para el caso de Kjeldahl; o de 3 a 4 determinaciones, para el caso de la ureasa.

La determinación cuantitativa de la fijación, a través del ensayo de reducción del acetileno, sirvió como un aporte que contribuyese a aclarar el panorama sobre las bondades de una u otra técnica de esterilización de soportes, o de una u otra fuente de Carbono en los caldos de impregnación.

En efecto, primero había que demostrar que la substitución del Manitol por el Glicerol en los caldos de producción facilitaba el crecimiento bacteriano pero sin influir negativamente sobre la fijación que ocurriría después de la infección.

Los criterios que se utilizaron fueron el recuento y la localización de nódulos como una medida de la retención del poder simbiótico, en el primer caso, y en el otro, cuando los nódulos se localizacen especialmente en la raíz principal, de que la infección había ocurrido en los primeros estadios del desarrollo radicular.

Mediante la cromatografía gaseosa se evaluaba cuantitativamente al Complejo de la Nitrogenasa; con la determinación del nitrógeno orgánico, se veían las consecuencias de la fijación; y con el estudio del rendimiento del cultivo, expresado como peso fresco o seco; de la altura promedio de las plantas, bajo condiciones estrictamente controladas; del desarrollo de la parte radicular; del peso fresco o seco de los nódulos, etc, se tenía un panorama bastante completo de algunos parámetros de interés agronómico que pudiesen modificarse ante la introducción de cada variable en estudio.

Al medir la cantidad de vermiculita retenida por cada raíz, surgió la duda de si convendría expresarla por unidad de peso o por unidad de planta. Tras varias decenas de determinaciones en que se comparó una y otra forma de expresar los resultados, se vió que las diferencias entre poblaciones se ponían mejor de manifiesto al expresarse los resultados por unidad de peso fresco de raíz, pues así se interrelacionaba no solamente el grado de ramificación, sino también el desarrollo total de la raíz, que para un tenor controlado de humedad del suelo y una fotosíntesis comparable para la parte aérea, dependía del aporte de N que hubiese habido, para fabricar ese tejido subterráneo.

Cuando hubo que correlacionar los datos de peso fresco o seco con las características de la nodulación, se vió que el primero es válido para lotes muy grandes de plantas, donde además sería incómodo secar todos esos kilos de material. En cambio para muestras con pocas decenas de plantas, se impone trabajar con el peso seco.

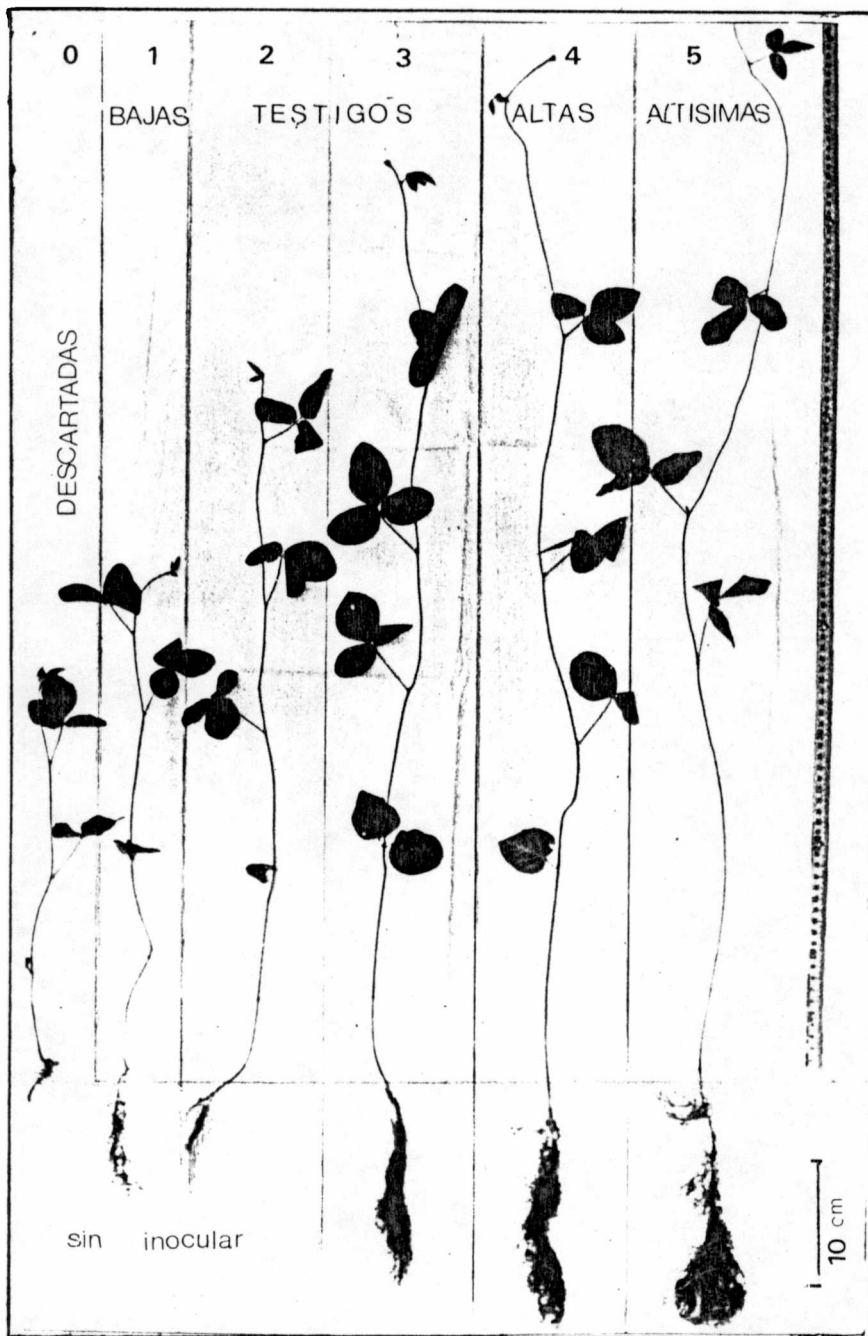
Para tener una idea del error que se cometía si el lote de plantas no era inmediatamente pesado tras arrancarlo de la maceta, se determinó la velocidad inicial de evaporación de agua para distintas partes del vegetal. (Tabla 4.IV.b.2)

En lo que respecta al peso seco de nódulos, solo tendría importancia cuando se juntasen los de 10 o más plantas, pues sino el error en la pesada tiene mas peso que la propia pesada (Nótese que a los 30 días de la inoculación, el peso seco promedio de cada nódulo es de 35-40 décimas de miligramo).

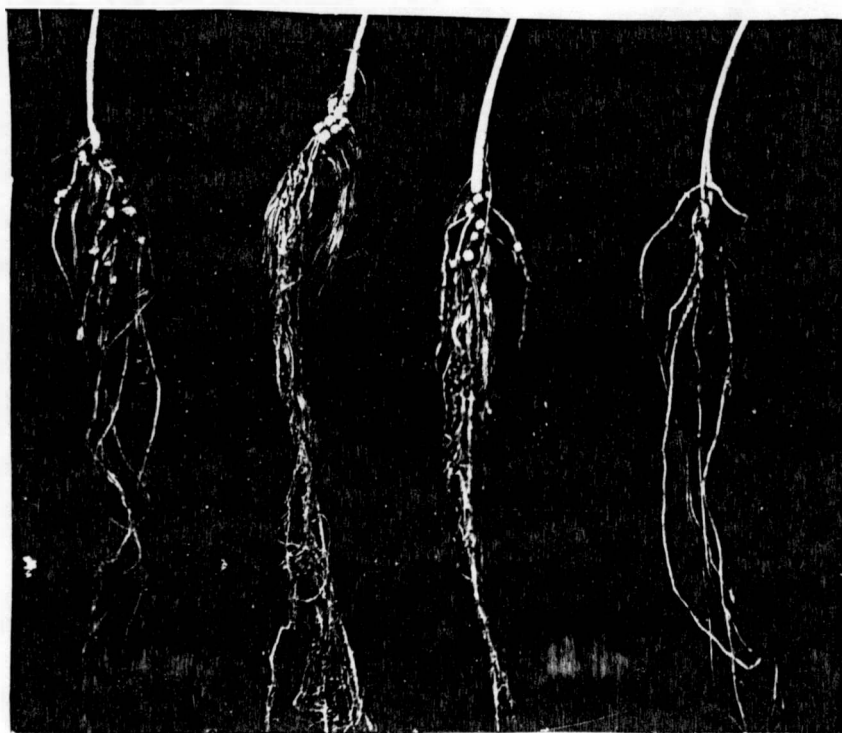
En el Gráfico 4.IV.b.1 se resumen algunas determinaciones de la capacidad fijadora de N_2 de los nódulos cosechados de plantas que habían sido inoculadas o con caldos o con inoculantes comerciales o "caseros". Se pretendía analizar la confiabilidad del método, para luego utilizarlo para testear (indirectamente) los soportes.

Figura 4.IV.1

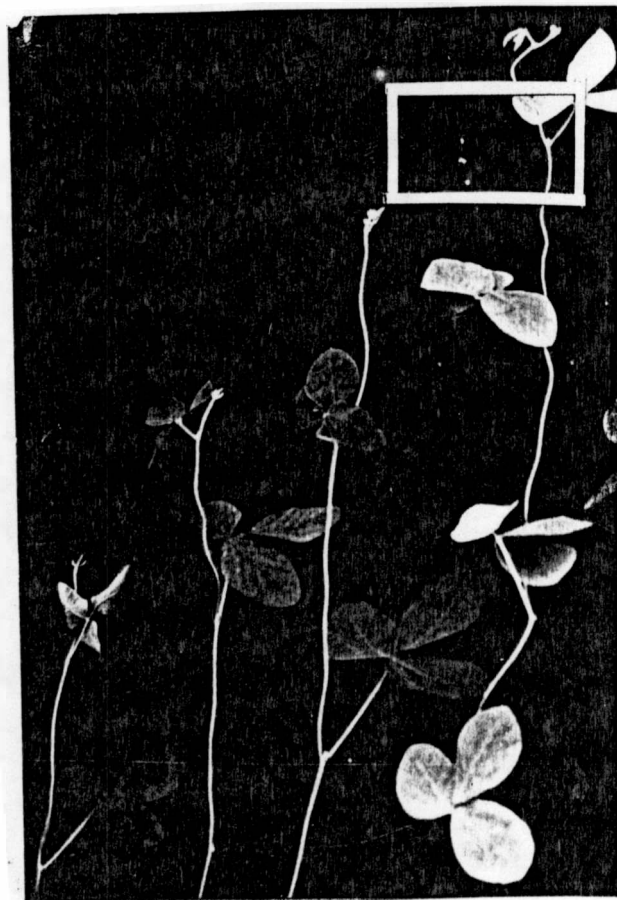
i). Distintos lotes en que se agrupó a las plantas por su altura:



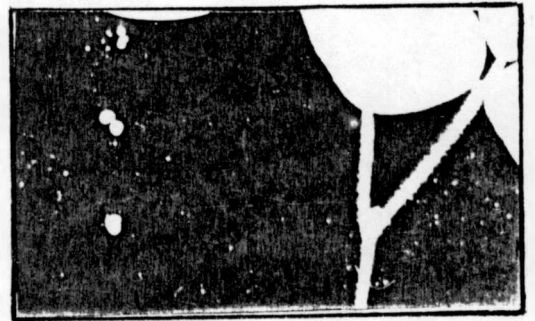
Nótese el desarrollo radicular en las plantas provenientes de semillas inoculadas. La retención de vermiculita sería bajísima para los lotes 0, 1, y 2; y alta para los lotes 3 y 4.



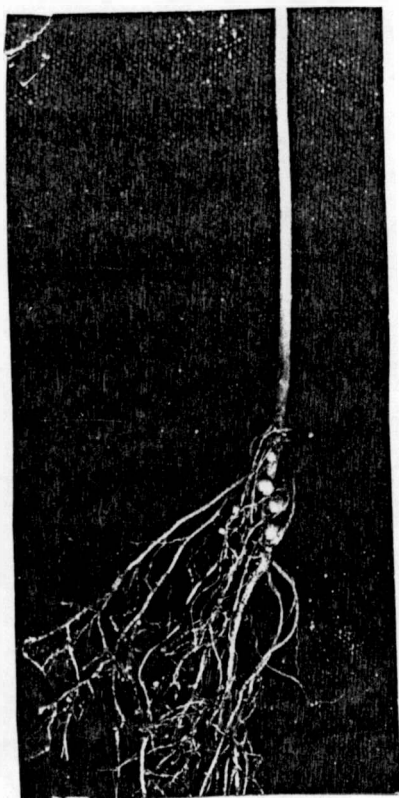
ii) Aclaración de algunos términos utilizados en el texto



Referente al Cuadro 4.IV.a, se muestran los 4 grupos en que se dividió a las plantas, difiriendo entre sí en un módulo de 25cm

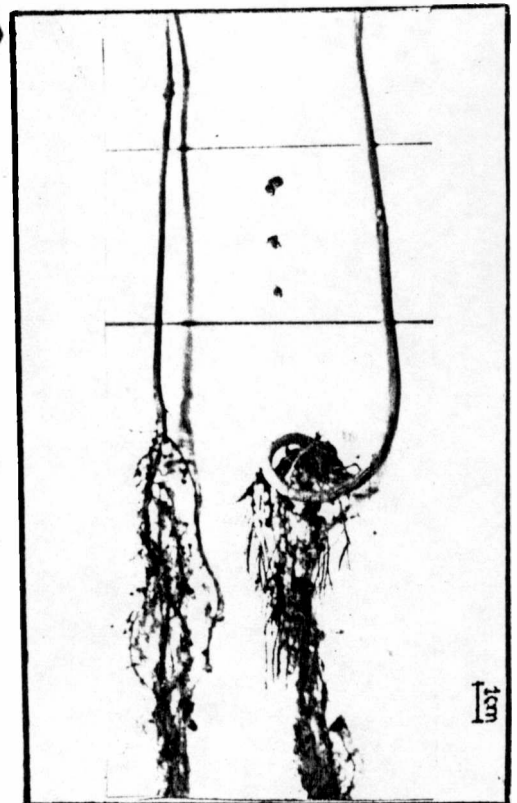


En esta ampliación de la foto de la izquierda, se muestra la relación de tamaños para los nódulos chicos, medianos o grandes (tamaño 11)



Planta de soja con una buena nodulación en la raíz principal. Nótese que no hay nódulos en las raíces secundarias.

La planta de la izquierda presenta nódulos ineficientes. La de la derecha muestra el tallo con un "rulo", cuyo desarrollo se incluía en la altura total del vegetal.



Los nódulos mayores obtenidos en este ensayo, se corresponden con los medianos del ensayo anterior.

Cuadro 4.1V.a.

ENSAYO DE CAMARA: Resultados de diferentes métodos de esterilización de soportes. Comparación con inoculantes comerciales

MUESTRA	DISTRIBUCION DE NUDULOS						NODU LOS TOTAL	PLAN TAS	PROMEDIO DE NUDULOS/PLANTA			Nº DE HAN- TAS CON ALTURAS ^a			
	Principales			Secundarios					Princi	Secun	Total	1	2	3	4
	Gra	Med	Chi	Gra	Med	Chi									
INOCULANTE COMERCIAL I	44			12			56	16	2,75	0,75	3,5				
INOCULANTE COMERCIAL II	24			7			31	9	2,66	0,77	3,44	8	1	-	-
	0	14	10	0	4	3									
SOPORTE ESTERILIZADO POR VAPOR	64			12			76	14	4,57	0,85	5,42				
	50	0	14	2	0	10									
SOPORTE ESTE- RILIZADO CON OXIDO DE ETIE	59			9			68	14	4,21	0,64	4,85	10	-	4	-
	15	18	26	1	2	6									
SOPORTE SIN ESTERILIZAR	0			0			0	17	0	0	0	17	-	-	-
TESTIGOS NO INOCULADOS PERO INFECTA- DOS POR CONTAM	42			19			61	18	2,33	1,05	3,35	6	-	7	5
	23	18	1	9	2	8									
TESTIGOS SIN NODULAR	0			0			0	7	0	0	0	2	5	-	-

Porotos esterilizados antes de inocularse. Se utilizó una sol de ClO_2 al 30% durante 1 minuto.

^a Se tomó como unidad de longitud para medir la altura de las plantas, un módulo de 25 cm, separándose la población total de leguminosas de cada lote en cuatro grupos, de acuerdo a su altura:

- 1 - Menores que 4 módulos
- 2 - 4 módulos de altura
- 3 - Mayores que 4 módulos
- 4 - Altísimas

ENSAYO DE CAMARA: Comparación de Manitol y Glicerol como Fuente de carbono de los caldos de impregnación

Fuente de C en los caldos de inoculación	Nº de plantas en cada lote	ALTURA promedio	P			E			S			O	Vermiculita retenida/gr. raíz	N O D U L O S	NITROGENO % por UREASA	
			fresco parte aérea (gr)	fresco promedio diario	seco de parte aérea (gr)	seco promedio diario	fresco de raíz (gr)	fresco promedio diario raíz	Raíz a 28°C Promed	Raíz a 105°C Promed	MODUL TOTAL					Princi Securi
MANITOL	19	67,4	41,25	2,17	6,51	.343	26,2	1,38	0,100	.088	.270				TALLO 2,05 HOJA 4,33	
MANIT II	20	72,5	46,50	2,32	7,13	.356	24,7	1,23	0,120	.094	.200	71	55	3,55	2,75	TALLO 2,33 HOJA 5,20
MANIT III	26	72,3	38,83	1,49	10,21	.393	8,7	0,33	0,146	.137	.019					TALLO 2,16 HOJA 8,34
MANIT IV	23	70,4	49,60	2,15	7,96	.346	33,9	1,47	0,247	.233	.145	103	50	4,48	2,17	TALLO 0,86 HOJA 5,30
GLICEROL	16	69,4	40,90	2,55	6,81	.426	18,95	1,18	0,136	.103	.236					TALLO 2,70 HOJA 5,00
GLICER II	19	59,5	37,50	1,97	5,65	.297	20,02	1,05	0,121	.087	.315	75	29	3,94	1,52	TALLO 1,00 HOJA 6,00
GLICER III	35	73,1	64,60	1,84	13,69	.391	19,21	0,54	0,159	.177	.071					TALLO 0,01 HOJA 5,48
GLICER IV	20	76,5	53,55	2,65	8,69	.434	27,04	1,35	0,215	.198	.134	113	17	5,65	0,85	TALLO 0,39 HOJA 1,61
PROMEDIOS:																
MANITOL	88	70,6	176,18	2,00	31,81	.36	93,5	1,06	0,157	.142	.147	174	105	4,01	2,46	TALLO 1,85 HOJA 5,91
GLICEROL	90	69,6	196,55	2,18	34,84	.387	85,2	0,94	0,159	.149	.166	188	46	4,79	1,18	TALLO 1,02 HOJA 4,52

NOTA: Porotos esterilizados superficialmente con 0.2%HgCl₂ x 3'.

ENSAYO DE CAMARA: Test final de Inoculantes

Días des pres de la siem bra	MUESTRA	Nº de plan tas	A L T U R A		P E S O		P E S O		P E S O		Retención promedio de vermic	NITROGENO %	
			total del lote (cm)	promedio de 9/planta	fresco de parte aérea	seco de parte aérea	fresco de raíz (gr)	seco prom	fresco de fresco raíz (gr)	seco raíz promedio		UREASA x duplic	KJEDAL
13	INOCULANTE ALMACENADO EN HELADERA	10	200	20	7,1	0,71	0,65	0,06				5,71 5,16	4,4
19	INOCULANTE ALMACENADO A 30°C	10	200	20	7,75	0,77	0,73	0,07				2,60 8,39	3,99
19	INOCULADA CON CALDO DE RHIZOBIUM	3	90	30	2,70	0,90	0,29	0,09				15,4 22,5	19,41
25	SORTE SIN ESTERILIZAR INOCULANTE EN HELADERA	4	190	47,5	6,30	1,57	0,81	0,20	2,85	0,71	0,58	3,7 2,54	3,64
25	SORTE ES- TERIL CON VAPOR INOCULANTE EN HELADERA	4	175	43,7	5,00	1,12	0,62	0,15	2,35	0,40	0,19	4,83 3,87	4,60
29	INOCULADA CON CALDO DE RHIZOBIUM	4	195	48,7	5,90	1,47	0,87	0,22	3,3	0,82	0,27	4,31 2,85	3,13
29	LOTE SIN INOCULAR	4	150	37,5	4,90	1,22	0,65	0,16	1,6	0,40	0,35	4,44 3,51	4,03
29	SORTE SIN ESTERILIZAR INOCULANTE CONSERVADO 30°	3	130	43,3	3,05	1,01	0,44	0,15	1,75	0,58	0,11	9,0 7,07	8,54

(sigue Test final de Inoculantes)

DÍAS DE SEMBRADO	LOTE	Nº de Plantas	ALTURA		PESO DE PARTE AEREA		PESO DE R A I Z		Promedio de vermiculita retenida	PESO DE NODULOS		NITRO GENO % Ureasa			
			Total (cm) dio	(cm) dio	Fresco (gr) dio	Seco (gr) dio	Fresco (gr) dio	Seco (gr) dio		Fresco (gr) dio	Seco (gr) dio				
33	PLANTAS PROVENIENTES DE SEMILLAS SIN INOCULAR	con 7	615	19,4	2,15	3,26	362	9,3	1,32	0,78 pl	0,4	0,06	0,044	0,006	
		sin 2 nodul						1,3	0,65	0,45 pl	--	--	--	--	
								sin nodulos			0,69 gr				
33	TURBA ESTERILIZADA POR RAMOS GAMMA	8	455	13,2	1,65	2,15	269	7,0	0,87	0,38 pl	0,2	0,03	0,025	0,003	
								con nodulos			0,44 gr				3,5
								9,1	1,30	0,38 pl	0,15	0,02	0,016	0,002	3,0
33	TURBA ESTERILIZADA POR OXIDO DE ETILENO	con 7	720	20,1	1,83	3,46	314	2,3	0,58	0,29 gr	--	--	--	--	
		sin 4						sin nodulos			0,38 pl				1,5
								con nodulos			0,66 gr				
33	TURBA ESTERILIZADA POR VAPOR	con 7	760	23,0	2,09	3,63	330	4,8	0,68	0,56 pl	0,5	0,07	0,042	0,006	
		sin 4						sin nodulos			0,81 gr				
								3,7	0,92	0,57 pl	--	--	--	--	3,6

■ aquí pl significa "gr de vermiculita retenidos en promedio por cada planta"
 ■ aquí gr significa "gr de vermiculita retenidos en promedio por cada gr de raíz"

VALORES PROMEDIOS:

33	PLANTAS TOTALES	29	67,24	1,93	318	1,04	0,54	0,52 pl	0,05	0,004
	PLANTAS SIN NODULAR	10	60,00			0,72	0,41	0,47 pl	--	--

DIAS DESDE LA SIEMBRA	L O T E	Nº de plantas	ALTURA		P E S O			P E S O			P E S O			Promedio re-tención venmic	NIURO GENO% Ureasa	N O D U L A C I O N								
			Total (cm)	Plomo (cm)	parte aérea (gr)	Plomo (gr)	parte aérea (gr)	Plomo (gr)	parte aérea (gr)	PRINCIPAL	SECUNDARIA	TOTAL												
			Reiz (gr)	Plomo (gr)	parte aérea (gr)	Reiz (gr)	Plomo (gr)	parte aérea (gr)	Chi Med Gra	Chi Med Gra	Chi Med Gra													
32	SOPORTE SIN ESTERILIZAR. INOCULANTE EN HELADERA A 5°C	12	785	65,4	23,5	1,96	9,5	0,79	0,5	0,04	3,52	0,29	0,05	0,003		44	17	23	4	18	11	3	4	62
32	SOPORTE ESTERILIZADO CON VAPOR INOCULANTE EN HELADERA A 5°C	may nod 10 15 poco nod	795	79,5	29,8	1,99	may nodulada 5,9	0,59	0,4	0,04	5,08	0,34	0,02	0,004	3,8	39	12	12	15	36	33	1	2	75
36	SOPORTE SIN ESTERILIZAR. INOCULANTE CONSERVADO A 30°C	10	700	70,0	18,7	1,87	6,2	0,62	0,3	0,03	3,61	0,36	0,04	0,004	3,2	16	1	6	9	17	10	4	3	33
36	SEMILLA SIN INOCULAR	con nod 13 sin nod	330	82,5	8,3	2,08	14,3	1,10	0,1	0,02	1,43	0,36	--	--		0	0	0	0	10	3	2	5	10
36	SOPORTE ESTERILIZADO CON VAPOR. INOCULANTE CONSERVADO A 30°C	con nod 7 12 sin nod	535	76,4	17,4	2,48	11,4	0,95	0,3	0,04	3,07	0,43	0,06	0,003		27	1	14	12	13	10	3	0	40

VALORES PROMEDIOS:

34	PLANTAS NODULADAS	43	79,5	2,28	0,83	0,39	0,55 gr	0,0035	0,07	0,39	0,26	0,0035	0,07	0,0035		25	6	11	8	18	13	3	2	44
	HANT SIN NODUL.	62	65,7	1,01	0,83	0,26	0,48 pl	0,0035	0,07	0,26	0,26	0,0035	0,07	0,0035		25	6	11	8	18	13	3	2	44

Cuadro 4.IV. a.5
(sigue Test final de Inoculantes)

Días después de sembrado	Lotes de plantas inoculadas, en que el soporte del inoculante había sido ESTERILIZADO CON VAPOR	Nº de plantas	Altura promedio de las plantas (cm)	PESO FRESCO			PESO SECO (gr)			N O D U L A C I O N			NITRO GENO%											
				Promedio de parte aérea (gr)	Promedio de raíz (gr)	Promedio de raíz de los nódulos (gr)	Promedio de parte aérea	Promedio de raíz de los nódulos	PRINCIPAL	SECUNDARIA	TOTAL	TOTAL de nódulos		TOTAL de nódulos ineficaces										
53	I	16	93,1	2,60	1,29	.078	0,63	0,18	.024	44 4 14 8 19	82 19 34 23 6	126	0	Ureasa										
															2,54	1,10	.080	0,58	0,10	.016	92 4 20 22 46	60 17 26 7 10	152	0
49	Inoculante almacenado en heladera (5°C)	18 25	121,9	3,03	1,13	.092	0,64	0,10	.021	88 0 15 21 52	57 0 34 18 5	145	7	3,20										
															Idem anterior, plantas sin nodular	7	100,0	1,68	0,48	---	0,33	0,03	---	---

PROMEDIOS:

53	INOCULANTE ALMACENADO A 30° C	50	104,6	2,69	1,23	.081	0,63	0,13	.020	73	53,3	126,3	6
49	INOCULANTE ALMACENADO A 5° C	18	121,9	3,03	1,13	.092	0,64	0,10	.021	88	57	145	7

(sigue Test final de Inoculantes)

días des pues de sembrado	Soporte NO ES TERILIZADO del inoculante. Lotes de plan- tas:	Nº de plan- tas	ALTURA Promedio (cm)	P E S O F R E S C O		P E S O S E C O (gr)			N O D U L A C I O N				NIERO GENO % Ureasa	
				Promedio de par- te aérea	Promedio de raíz (gr)	Promedio de raíz de nódul- los (gr)	Promedio de parte de raíz de nódul- los	P R I N C I P A L Chico Med Gran Gig	S E C U N D A R I A Chico Med Gran Gig	TOTAL nódul eficien irrefic	TOTAL nódul			
												0 26 6 18		0 10 0 3
53	I (Nodulado)	4	121,2	3,67	1,90	.225	0,95	0,22	.042	50 0 26 6 18	13 0 10 0 3	63	0	
	II (Nodulado)	13	121,5	3,63	1,15	.111	0,74	0,11	.023	49 0 3 7 39	34 0 11 9 14	83	19	
	III (Nodulado)	12	117,1	3,22	1,34	.146	0,78	0,13	.033	88 0 8 65 15	34 0 11 16 7	122	29	
	I (Sin nodul)	3	95,0	1,70	0,47	--	0,39	0,03	--	--	--	--	2	
	II (Sin nodul)	3	83,3	2,17	0,73	--	0,53	0,05	--	--	--	--	--	
	III (Sin nodul)	3	100,0	2,07	0,47	--	0,37	0,03	--	--	--	--	--	
49	INOCULANTE AL- MACENADO A 5°C	20	121,5	3,38	1,19	.082	0,81	0,17	.022	95 3 46 31 15	82 9 41 23 9	177	22	
	TEM ANTERIOR, pero plantas sin nodular	5	94,2	1,68	0,68	--	0,27	0,04	--	--	--	--	--	

PROMEDIOS:

53	ALMACEN. 30°C	29	119,9	3,50	1,46	.160	0,82	0,15	.032	62,3	27	89,3	16	
49	ALMACEN. 5°C	9	92,8	1,98	0,56	--	0,43	0,04	--	--	--	--	2	
		20	121,5	3,38	1,19	.082	0,81	0,17	.022	95	82	177	22	
		5	94,2	1,68	0,68	--	0,27	0,04	--	--	--	--	--	

Días des- pues de sen- brado	Lotes de plantas inoculadas, en que el so- porte del inoculante había sido ESTERILI- ZADO como se indica en cada caso:	Nº de plan- tas	ALTURA		P E S O F R E S C O				P E S O S E C O (Gr)				N O D U L A C I O N				NITRO- GENO% Ureasa
			Promedio (cm)	Promedio de parte aérea	Promedio de raíz (gr)	Promedio de raíz de parte aérea	Promedio de raíz de nódulos (gr)	Promedio de parte aérea	Promedio de raíz de nódulos	PRINCIPAL Chic Med Gran Gig	SECUNDARIA Chic Med Gran Gig	TOTAL nódul. eficaz	TOTAL nódul. irrefic				
53	con OXIDO DE ETILENO I	5	94,0	2,95	1,4	.112	0,66	0,15	.017	2 2 1	11 20 7	25	3				
	con OXIDO DE ETILENO II	12	112,7	2,51	1,41	.067	0,67	0,16	.014	38 4 6 11 17	31 5 18 8 -	69	27				
	con OXIDO DE ETILENO III	12	115,4	2,25	0,72	.060	0,61	0,20	.019	83 9 43 26 5	28 21 3 4 -	111	-				
	con OXIDO DE ETILENO sin nodular	7	80,7	1,30	0,40	--	0,22	0,03	--	- - - -	- - - -	--	-				
	con RAYOS GAMMA I	16	107,2	2,56	0,88	.078	0,73	0,18	.024	39 1 7 7 24	70 19 27 8 16	109	31				
	con RAYOS GAMMA II	23	104,6	2,06	0,86	.059	0,60	0,21	.017	143 20 63 39 21	29 10 15 3 1	172	-				
	con RAYOS GAMMA III	23	109,8	2,44	0,70	.054	0,62	0,19	.015	89 31 19 19 20	64 19 39 6 -	153	13				

PROMEDIOS: (Inoculante almacenado a 30°C)

53	con OXIDO DE ETILENO	29	107,4	2,57	1,17	.079	0,65	0,17	.017	42	26,3	68,3	10	
	con RAYOS GAMMA	62	107,2	2,35	0,81	.064	0,65	0,19	.019	90,3	54,3	144,7	14,7	

Tabla 4.IV.b.2

Retención de turba de diferentes granulometrías,
por porotos previamente humedecidos:

En promedio, 20 semillas de las usadas en este ensayo, con su humedad natural (14%), pesan 2,9 gr

En promedio, 20 semillas sumergidas en agua durante 10 minutos, dejando escurrir el agua libre, pesan 3,5 gr

Los mismos 20 porotos, tras crearse al aire durante 20 minutos, pesan 3,4 gr

51 porotos recién humedecidos, pesaron 10,0 gr. Se les espolvoreó con turba "malla 200", encontrándose que para recubrirse en un 100 %, se necesitó que se adheriesen, en total, 0,1 gr de la turba de granulometría mas fina.

51 porotos Idem anterior, pesaron en promedio 9,9 gr. Trabajando igual que antes, pero con turba "malla 80", no se pudieron recubrir mas que en un 90%, conservando adheridos 0,2 gr de turba en total.

51 porotos Idem anterior, pesaron en promedio 10,4 gr. Trabajando con turba "malla 30", apenas se adhirieron unas pocas partículas (no se alcanzó a recubrir ni el 10% de la superficie de los porotos), encontrándose que el peso del lote de 51 porotos había aumentado en 0,5 gr.

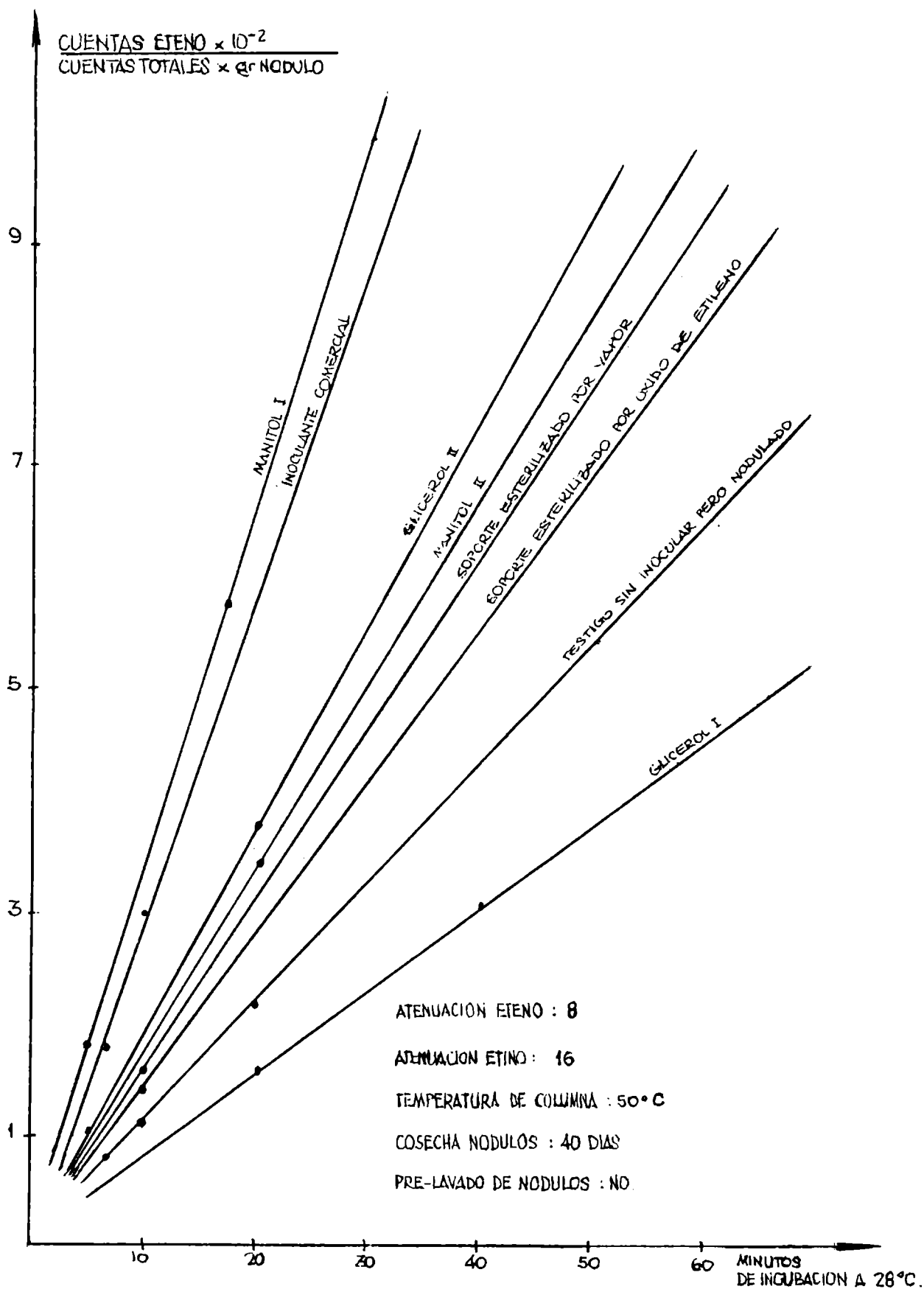
NOTA: Recubrimiento del 100% significa que no se ve para nada el tegumento blanco del poroto.

Recubrimiento del 90% significa que quedan pequeños puntos donde se puede observar el color del tegumento.

Recubrimiento menor del 10% significa que apenas se adhirieron algunas partículas.

Gráfico 4.IV.b.1.

DETERMINACION DE LA CAPACIDAD FIJADORA:
TECNICA DE REDUCCION DEL ACETILENO



Glicerol I y II o Manitol I y II indican dos ensayos diferentes de nódulos provenientes de bacterias que habían sido crecidas sobre G o M respectivamente.

5. DISCUSION

5.I.a. De los resultados a nivel de frasco agitado:

⁷²
Graham, al estudiar los requerimientos vitamínicos de las bacterias nodulantes de las raíces, llamó la atención sobre la probable existencia de un factor de crecimiento desconocido, pero que ocasionalmente podría ser aportado por hongos contaminantes. Evidentemente este no es el caso para la experiencia representada en el Gráfico 4.I., pues los microorganismos estarían aquí substrayendo ese (u otros) factores de crecimiento del extracto de levadura, razón por la cual donde hubo mayor desarrollo celular contaminante, esto es en el YE pastoso conservado a temperatura ambiente, los rendimientos en el proceso correspondiente luego fueron inferiores.

Hunter y Rose señalan la importancia de la temperatura de crecimiento en la magnitud de la excreción (in vitro) de polisacárido de parte de los microorganismos del suelo, explicando que son las temperaturas mas bajas las que mejor inducen la formación de cultivos viscosos a causa de ese polisacárido.

Como la producción de ese material extracelular por parte del microorganismo lo obliga a consumir nutrientes, resultando por ende en una merma en el rendimiento global del proceso, se imponía estudiar el comportamiento de una cepa B-45 de *Rhizobium japonicum* frente a diferentes temperaturas de desarrollo.

El análisis de las curvas de la figura 3.III parecería indicar que el microorganismo crecido en Manitol desarrolla mejor que aquel sembrado en Glicerol, en el rango de Temperaturas estudiado. Lo que realmente sucede es que la cepa crecida en Manitol produce mucho mas polisacárido que su igual con la otra fuente de Carbono, así que a partir de las 40-50 horas las lecturas de la DO_{625} no representan necesariamente la cinética de crecimiento del microorganismo, tal como lo demuestran los recuentos de viables que se hicieron a posteriori.

Se ve que tanto para Manitol como para Glicerol conviene desarrollar las bacterias en el rango de 29-31°C, que se adoptó como temperatura de trabajo a partir de entonces.

La determinación de la relación óptima "volumen del medio de cultivo/vol. del recipiente que lo contiene" es importante ya que este cociente tiene influencia sobre la aereación que ocurre al agitarse mecánicamente el caldo. Se sabe que dentro de ciertos límites, cuanto menor sea el volumen de medio de cultivo, y mayor el recipiente, tan

to mas se va a incrementar el área de intercambio en la interfase líquido-gas del volumen de revolución generado al agitar el contenido del Erlenmeyer en un shaker rotatorio.

La duda era si se justificaba tener en cuenta todo esto, dado que el Rhizobium tiene una demanda de oxígeno (DO) muy baja , así que existía la posibilidad de aprovechar al máximo el volumen útil de los Erlenmeyers, sin que resultase en detrimento del rendimiento.

Se pudieron explicar los resultados obtenidos debido a que la agitación no solo incrementa el area de transferencia a los gases, sino que también origina movimientos en las venas líquidas del fluido,, que a su vez determinan una mejor difusión tanto de los residuos metabólicos del microorganismo, como de sus nutrientes.

A raíz de estos resultados, se decidió estandarizar el volumen del medio de producción en escala de Erlenmeyers, en 200 ml medio/ Erlenmeyer de 1000 ml (o sea una relación de 1/5), reservándose solo para la fabricación de algunos inóculos, la relación 1/10 (100 ml de caldo en Erlenmeyers de 1000ml).

Al tratar de reproducir los resultados del Gráfico 3.IV. en medio sólido agarizado, se notaron diferencias entre los controles i luminados y las cajas de Petri recubiertas con papel opaco, pero que se pudieron explicar por la menor pérdida de humedad de los medios en el caso de Placas envueltas, cuya diferencia en el contenido de humedad ya se hace notoria visualmente al comparar las cajas tras una semana de incubación a 30°C.

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron al trabajar con EDTA, se deduce que si es que realmente secuestraba algún catión inhibidor, también hacía lo mismo con aquellos necesarios para el normal crecimiento de la bacteria, así que en definitiva su uso en cantidades ínfimas casi no mejoraba en nada el rendimiento del proceso, y en cambio para concentraciones superiores al 0,1% ya tenía un efecto netamente inhibidor.

Analizando la curva de viables del Gráfico 3.V., se ve que el pico máximo está desplazado a tiempos mayores respecto del pico de DO₆₂₅, lo que confirma la suposición de que a partir de las 50 horas no hay una buena correlación entre la DO₆₂₅ y los viables.

El desempeño tan malo que tuvo el oleato de sodio (y que aparece consignado en el Gráfico 4.VIII) se podría deber a que precipita con cationes divalentes, en particular Ca^{++} y Mg^{++} , y que según algunos autores, uno, otro, o ambos, son necesarios para el desarrollo del *Rhizobium*.

El único problema de los surfactantes cuando se usan en escala de Tanque agitado o de Planta, es que producen bastante espuma debido a la agitación por paletas, y por esa causa no se usaron en los ensayos posteriores, cuando hubo que producir el caldo para impregnar.

En los Gráficos 4.IX y 4.X. aparecieron los resultados de haber trabajado con harinas de soja como complemento de los medios líquidos y en los que el mejor comportamiento se obtuvo con el hidrolizado alcalino de la harina de soja.

A pesar de que al hidrolizar en medio alcalino se están saponificando los lípidos presentes, formándose jabones, el relativamente buen desempeño del hidrolizado se debería más a los productos mismos que resultan de la hidrólisis alcalina (aminoácidos -excepto aquellos destruidos por el exceso de alcalinidad-; derivados enólicos o ácidos -aquí como sales- derivados de los glúcidos; glicerol que resulta de la saponificación de los glicéridos, etc) que a la actividad tensioactiva de los jabones formados, pues ya se vió en el Gráfico 3.VIII que el oleato de sodio, un jabón, actúa más como inhibidor que como promotor del crecimiento del *Rhizobium japonicum*.

Respecto de la supervivencia en medio líquido del *Rhizobium japonicum* tras entrar en la etapa de decaimiento logarítmico (Gráfico 3. XII), resulta evidente que si a partir de las 100 horas se mantiene al Erlenmeyer en el shaker, el decaimiento de viables y de DO_{625} es muchísimo más rápido que si el caldo quedó estático, en cuyo caso se mantiene la misma concentración de microorganismos viables por un largo tiempo. Esta experiencia preliminar permitirá predecir el decaimiento de viables en una población bacteriana que se va a soportar para constituir un inoculante, en el tiempo que transcurre entre que se detiene el proceso y cuando efectivamente se empieza a impregnar.

En la Tabla 3.I. se ve la evolución que han tenido los parámetros biotecnológicos apuntados, al introducirse el Tween o incrementarse la concentración de la fuente de carbono y de YE, superándose en algunos casos la concentración de 10^{11} viables/ml.

5.I.b. DISCUSION de los resultados a nivel de tanque agitado o de Planta Piloto:

Ya Lopreto-Mazza-Balatti habían indicado la conveniencia de utilizar Glicerol en lugar del Manitol como nutriente en los medios líquidos, así que en la parte a) del Gráfico 3.XIII se nota la inclusión del Manitol exclusivamente para verificarlo. Por corroborarse esa afirmación, se decide trabajar a este nivel exclusivamente con Glicerol como fuente de carbono.

Al hablar de los resultados a nivel de frasco agitado, ya se dijo que al suplementar el medio base con Extracto de Levadura y Glicerol, se obtenía un gran incremento en las lecturas de DO_{625} pero proporcionalmente un aumento pequeño en lo que hace a viables.

Antes de decidir sobre la ventaja o no de esta modificación en la formulación de los medios, faltaba ensayarla a nivel de Tanque agitado, pues podría suceder que controlando variables tecnológicas (aereación, agitación, temperatura) se pudiese llegar a un punto intermedio en que hubiese un buen incremento de viables, pero sin los inconvenientes derivados de la alta viscosidad originada por el polisacárido.

Los resultados se resumen en 3.XIII y 3.XIV. Evidentemente se han conseguido algunos progresos respecto de la etapa de frasco agitado, pero aún así se está ante un medio reológicamente desfavorable y económicamente oneroso, que no justifican la modificación.

Por todo ello la impregnación de los soportes se realizó con el medio de producción utilizado desde el comienzo (Tabla 3.I.).

Es importante hacer notar que los rendimientos finales (en lo que hace a viables/ml) de los procesos con los que se impregnó soportes, habían sido superados a veces en algunos procesos anteriores, y que deberían ser considerados como excepcionales, pues en las condiciones de trabajo el rendimiento medio calculado a partir de unas decenas de procesos, fue del orden de 10^9-10^{10} viables/ml, y solamente cuando se utilizó alguna cepa de crecimiento excepcional (normalmente aislada de algún proceso anterior), se pudo superar el techo de 10^{11} microorganismos viables/ml. En este último caso pronto había una regresión a la forma salvaje, y a

partir de entonces se estabilizaba el rendimiento de células en el valor primero indicado.

Se ha observado también que cuando en un proceso se consiguen rendimientos tan altos como 10^{10} o mayores, ello es así durante un tiempo efímero, de tal forma que el proceso en seguida entra en la etapa de decaimiento, con una gran pendiente negativa, lo que nos habla a las claras de la necesidad de no dejar agitándose o aereándose innecesariamente a un tanque o el contenido del fermentador de una Planta Piloto, cuando se haya alcanzado la concentración celular deseada para impregnar. Ante esta eventualidad habría que aumentar el volumen de impregnación, pues con seguridad habrían disminuido bastante los viables/ml.

5.II.a. DISCUSION de los resultados del análisis físico-químico

Al analizar meticulosamente la Tabla 4.II, lo primero que surge es que la Turba "Tal Cual" (o sea aquella que no se había tamizado, y que por lo tanto presentaba tanto partículas pequeñas como grandes) tiene un comportamiento intermedio entre las dos granulometrías extremas, tal vez acercándose un poco mas a los valores correspondientes a la "malla 200".

La heterogeneidad en el color (esto es, que el material se presente de un color oscuro pero mechado de partículas claras), nos habla de una heterogeneidad en la composición, cosa que se pone de manifiesto al clasificar las muestras de acuerdo a su granulometría. En el material procedente de los tamices de mallas 30/50 predominan los restos vegetales claros, que pueden alcanzar algunos milímetros de largo; mientras que en la turba mas fina, con el auxilio de una lupa se notan partículas oscuras y otras en cambio blancas, de aspecto cristalino, o sino mineral. Estos últimos "cristales" se deduce que son de areniscas, o sino del carbonato de calcio agregado para neutralizar la acidez natural de la turba. Como el agente neutralizante se había pasado por malla 200 antes de adicionarlo, resulta que por su grado de división pudo cubrir bastante bien los elementos particulados que componen cada muestra, aunque luego al tamizar se distribuyó en forma desigual entre una y otra, concentrándose como es lógico en las porciones de malla menor. Tan solo con observar el Gráfico 4.II.1 se comprueba que las tres muestras consignadas en este análisis presentan capacidad buffer al pH 8,2 (característico de los tampones de carbonato), pero ateniéndonos a los resultados del análisis elemental para el Ca^{++} , o a los inertes que resultan de la calcinación del material a $600^{\circ}C$, constituidos especialmente por el carbonato agregado, se verifica lo recién adelantado de que el neutralizante no está uniformemente distribuido luego de la tamización.

Si tomamos la cantidad de alquitranes o de pirógenos a $250^{\circ}C$, como una medida del grado de descomposición que ha sufrido la turba, vemos que la turba malla 30/50 (que presentaba mayor número de "fibras" blanquecinas) es la que está menos descompuesta, o dicho de otra forma, la que posiblemente provenía de la superficie de la turbera, donde se daban peor las condiciones de anegación y anae-

robiosis necesarias para la conversión del vegetal en turba.

Vienen en apoyo de esta aseveración, los resultados presentados en la Tabla 4.II.2, donde se han consignado los valores del análisis elemental orgánico (C,H,N) de Turbas de diferente procedencia, entre las que se destacan las originales de Mendoza, donde se alcanza un 10% de diferencia en el valor de % de C entre la muestra extraída de la superficie de la turbera y aquella obtenida del seno de la misma.

La dispersión de valores nos vuelve a confirmar la heterogeneidad en la composición, para todas las muestras.

Resulta interesante destacar que cuando se pretendió estudiar la distribución granulométrica en la turba utilizada (Tabla 4.II.1) se encontró que la toma de muestra que se suele hacer en estos casos, y que consiste en tomar pequeñas muestras de un gran número de partes del lote para que el análisis resulte representativo, producían resultados tanto mas erróneos cuanto menores eran las cantidades totales analizadas. Por ello a partir de entonces se utilizó la técnica del cuarteo sobre cantidades grandes, cada vez que había que extraer muestra para hacer alguna determinación.

El contenido total de humedad de una muestra, no solamente nos interesa para corregir los resultados del análisis y expresar los (si así se desea) por peso seco. Químicamente nos dice que si una porción de turba está en equilibrio a una cierta temperatura con una cierta cantidad de humedad, ello se debe a que las partículas tienen una composición o un estado de división tal que favorecen la retención de esa cantidad de agua. Biológicamente en cambio, significa que si el material de que se trate puede almacenar una cierta cantidad de agua, y esa agua puede luego ser extraíble, ese material es apto para soportar una población bacteriana, asegurándole mayor supervivencia.

En la tabla 4.II.3 figuran los resultados de la determinación de la Capacidad hídrica de las distintas muestras de turba, y se nota que es función de la granulometría, aumentando a medida que disminuye el tamaño de partícula. Las distintas tensiones aplicadas nos hablan de la fuerza que hay que realizar para extraer cada fracción de agua retenida, aceptándose generalmente que aquella extraíble a 1/10 es un agua muy debilmente atraída por el so

porte, mientras que aquella que aún se retiene a presiones superiores a la atmosférica no puede ser utilizada por un microorganismo que se haya soportado sobre el material.

Nótese que la "malla 200" es la que da los valores mas altos de humedad extraíble, siguiéndole luego la turba "tal Cual" o la "malla 100".

Continuando con el análisis sobre el agua retenida por la turba, deberíamos detenernos a considerar si la turba que se encuentre cubierta de agua en la turbera, va a tener el mismo comportamiento biológico que aquella que se presente sin agua libre.

Al efecto podríamos volver sobre la Tabla 4.II.2, y comparar la composición elemental de una turba "Tal Cual" inoculada con caldo bacteriano y luego lavada, versus un Testigo de "Turba tal Cual" que no se lavó. A pesar de haberse introducido una gran cantidad de metabolitos ricos en C, H, y N junto al caldo, se nota que la muestra lavada tiene menos C e H que aquella que no se lavó, aunque retuvo mas el N.

Extrapolando estos resultados a lo que podría suceder en una turbera, se entiende que aquel material que tenga contacto con agua se lavaría de elementos solubles de forma tal de afectar la supervivencia que se quisiese ensayar a posteriori.

La retención del N (en particular el NH_4^+) en un material enfrentado con agua, se puede explicar facilmente por el contenido de coloides de la muestra, que según surge de la Tabla 4.II, en nuestro caso vendría representado por una pequeña cantidad de coloide orgánico (ácidos fúlvico, húmico, y otros componentes del humus), y una proporción equivalente de coloide inorgánico, en particular arcilla. Se sabe que un suelo rico en estos coloides adsorbe selectivamente el amonio o el cobre II, entre otros cationes que se podrían citar, y en la misma Tabla 4.II figura el poder adsorbente medido a través de la disminución de absorbancia a 625 nm frente a una solución de sulfato cúprico. A pesar de que la adsorción no fue muy grande, se podría deber al alto pH que daban las turbas por hidrólisis de su carbonato de calcio, o por intercambio iónico con el reactivo sulfato cúprico.

Esto último se corrobora al comparar los valores de acidez de intercambio (2 gr de turba en 99 ml de sol 9‰ de ClNa neutro) con los correspondientes valores de pH (2 gr de turba en 99 ml de agua

destilada), que figuran en la Tabla 4.II. A pesar de que los productos de la disociación del ClNa (Cl^- y Na^+) por ellos mismos no modifican el pH de la solución, se intercambian con el coloide de la turba, que actúa como una resina intercambiadora, y por ende modifican la concentración de hidrogeniones en la solución.

En el Gráfico 4.II.2 se resumen las experiencias que se realizaron para estandarizar las determinaciones de pH de turbas. La práctica usual, en el caso de los ensayos edafológicos, es colocar una parte de suelo y otra de agua, y medir potenciométricamente el pH en la papilla resultante, a los 60 segundos. Pero aquí se estaba ante el problema que la turba tarda mucho en mojarse, en que algunas fracciones tienden a flotar, etc, así que había que modificar la metodología. En la parte a) del Gráfico se nota como el pH medido depende de la masa de turba considerada, del volumen de agua, y del tamaño del Erlenmeyer, para una agitación constante. Evidentemente la relación "vol líquido/vol continente" afectan las transferencias de gases o de materia en general (tal como se demostró para los caldos, en 5.I.a), y en este caso concreto resulta importante la disolución del anhídrido carbónico, pues se obtuvieron pHs menores cuando la relación aludida era menor (o sea cuando los coeficientes de transferencia son mayores, y se facilita entonces la disolución del CO_2). Se decidió realizar las determinaciones a los 60 minutos de agitado en shaker.

En la parte b) del mismo gráfico, se ve que el pH es función de la granulometría de la muestra (nuevamente nos indica heterogeneidad en la composición química), y se re-verifica que el valor se modifica al realizar la determinación en otro recipiente de volumen diferente.

Respecto de las determinaciones de densidad real de la turba, resulta inmediato que no debería modificarse el valor al variar la granulometría. Que así ocurra, como se ve en la Tabla 4.II, solo puede significar que el material no es homogéneo.

La densidad aparente, en cambio, sí es función de la granulometría, y nos da una idea de la magnitud del "volumen vacío" que queda entre partículas al acomodarse en un empaquetamiento determinado. Estos valores se pueden comparar con los de porosidad o los de "Relación Turba-aire-agua", viéndose que son coherentes en

señalar la predominancia de macroporos, que por su magnitud solo pueden corresponder a espacios de acomodación entre partículas, y que pueden determinar un habitat aceptable para las bacterias.

El cálculo de la superficie específica exigió resolver problemas especiales, pues no se podía usar un sortómetro mecánico como los utilizados en el estudio de soportes de catalizadores inorgánicos (ya que normalmente estos están calibrados para valores superiores a los 2,5 metros²), y además los resultados precedentes indicaban heterogeneidad física y química en el soporte estudiado. Se optó entonces por realizar determinaciones microscópicas y dibujar los campos más representativos de la muestra total, valiéndose para ello del artificio de una cámara clara, para después calcular la superficie de las partículas a partir de la determinación de un "radio equivalente de partícula", o sea el (o los) radios que surgen como promedio de una centena de partículas medidas, y que se supone que determinan una "partícula promedio" a partir de la cual se puede conocer su volumen por fórmulas geométricas simples. Observando las figuras 4.II.2 y 4.II.3, por ejemplo, salta a la vista que el desarrollo superficial de estos pedazos de musgo va a ser muy superior al que pueda surgir del cálculo a partir del supuesto de una superficie lisa, sin evaginaciones o invaginaciones, y justamente por ello no se trató de ajustar el resultado con varias cifras significativas. De cualquier forma aparece la "malla 200" como la de mayor superficie específica, siguiéndole de cerca la malla "Tal Cual", probablemente debido a que cuando hay partículas muy diferentes en diámetro, se pueden empaquetar en forma bastante compacta debido a que los cuerpos menores ocupan los espacios interpartícula que han originado los cuerpos grandes al ubicarse juntos.

En la misma Tabla 4.II. se consigna la forma en que se calculó el coeficiente de conductividad térmica en función de la humedad contenida en cualquier muestra de turba, suponiendo la transferencia de calor a través de una superficie cilíndrica. Luego con este dato se calcularía el tiempo de retención que debe tener el material dentro de la autoclave, al esterilizarlo por vapor.

5.II.b. DISCUSION de los estudios botánicos

Los estudios botánicos fueron importantes por dos razones: la primera, que permitieron visualizar la morfología verdadera de las partículas por primera vez, observándose de paso el predominio relativo de arena, minerales, etc, entre las muestras provenientes de distintas mallas, y que después originarían estudios mas precisos a nivel físico-químico de la proporción de inertes, carbonato, arcillas; o la problemática que habría que enfrentar cuando se determinase la superficie específica por un método gráfico.

La otra razón por la que estos estudios fueron de tanta utilidad, es que a través del estudio de los esporos que aparecían en los preparados microscópicos, se pudo llegar a la conclusión que las dos especies vegetales que componían la muestra de turba eran el *Sphagnum fimbriatum* y el *Sphagnum magallanicum*, siendo que solamente existen coasociadas a 15 Km de la ciudad de Ushuaia, y por lo tanto se pudo ubicar con gran exactitud la procedencia geográfica de la turba utilizada, y entonces compararse los análisis de origen con los obtenidos en este laboratorio para la parte físico-química.

Además, al hacer un análisis tan prolijo del campo ocular, se descubrieron algunos esporos de hongos, en particular de basideo-micetos, que podría explicar en parte porqué las turbas no esterilizadas no eran tan buenas para permitir el desarrollo del *Rhizobium* en los inoculantes.

5.II.c. DISCUSION de la supervivencia del microorganismo en función de la granulometría de la Turba

Al realizar ensayos de supervivencia versus diferentes granulometrías del soporte, se suponía que irían a aparecer diferencias en lo que hace a la retención de agua y a la sobrevivencia de los microorganismos. Eso se confirmó plenamente, tal como se puede ver en el Gráfico 4.II.c, donde surge que el mejor comportamiento en lo que hace a supervivencia se obtuvo para la granulometría mas gruesa, siendo que ésta es la que mas facilmente pierde su humedad, tal como se nota al analizar el gráfico de humedad retenida en función del tiempo de almacenamiento del inoculante.

Este comportamiento de los soportes, tan bueno para los de granulometría mayor y realmente pobre para aquellos constituidos por partículas pequeñas (vg. "malla 200"), estaba en franca contradicción con los resultados obtenidos en otros países, donde se recomienda moler muy bien los soportes.

Recurriendo nuevamente a los datos del análisis físico-químico botánico de la turba, se encontró que no solo diferían en el tamaño de partícula, sino también en la calidad y composición de las mismas. Así por ejemplo, consultando la Tabla 4.II, verificamos que en las bolsas cargadas con "malla 200" hay una proporción grande de arenillas, limo, carbonato, etc, y donde el análisis microscópico muestra además mayor proporción de esporos del musgo, rizoides, y otras superficies poco aptas para la supervivencia. Para la "malla 30", en cambio, se ve que hay fragmentos completos de sphagnum, con esporangio, hojuelas, columnela o pié, con pocos esporos libres y poco inerte mineral, pues éste por ser tan pequeño ha pasado por la malla que nos ocupa.

Estos resultados se pueden verificar también al analizar el poder buffer de las turbas y la determinación de cenizas entre los 600° y los 1000°C.

En definitiva el desempeño tan pobre del soporte molido tan fino no se debería a que está constituido por una proporción muy grande de inerte, que sabemos que no contribuye a la supervivencia del microorganismo, aunque en este caso no modificó la retención de humedad respecto de lo que se podría extrapolar del comportamiento de las otras mallas.

Para la "malla 30", en cambio, a pesar de tener menor superficie específica y menor capacidad de retención de agua, permite brindar un sustrato orgánico como habitat de las bacterias, del cual evidentemente extraen nutrientes que le permiten seguir creciendo un tiempo.

5.III.a. DISCUSIÓN de la influencia de la técnica de esterilización sobre la supervivencia del Rhizobium

Tal como se puede observar en el Gráfico 4.III.a., donde se indica la sobrevivencia del Rhizobium en Turba esterilizada por diferentes métodos, resulta que tanto los paquetes esterilizados por Oxido de Etileno (OE) como los No Esterilizados muestran ya a los 5 días un descenso de microorganismos, mientras que para igual tiempo los paquetes esterilizados por rayos gamma o por vapor han aumentado el recuento de viables, conservandose luego esos recuentos elevados durante casi tres meses de haberse guardado el material en la heladera, o bajando rápidamente de haberse almacenado a la T° de 30°C y cerca de una luz fluorescente de 40W, donde la bolsa de polietileno de 15 micrones de espesor se muestra insuficiente para evitar la desecación o para actuar como filtro de radiaciones perjudiciales. Es interesante que al cabo de 4 meses de observaciones, todos los inoculantes conservados en heladera hayan convergido en un rango muy estrecho de viables, independientemente del método de esterilización que se haya usado, en que se superan las lecturas de 6×10^8 viables/2 gr de turba. Este valor está en consonancia con los obtenidos en otros países del mundo, ^{67,77,80,141,175,176} donde normalmente no se esteriliza en absoluto al soporte, y por lo tanto los recuentos son menores en por lo menos un orden de magnitud, para la misma edad.

Es muy sugestivo el hecho de que la turba esterilizada por vapor y conservada a 30°C, haya tenido un desempeño casi equiparable al de las turbas almacenadas en heladera. Ello se podría deber a que al calentar a tan alta temperatura el material para esterilizarlo con vapor sobrecalentado, se consigue la volatilización de algunos aceites o sustancias complejas que actuarían como inhibidores del crecimiento a largo plazo, pero que por su naturaleza hidrofóbica no serían extraíbles en los extractos acuosos normales y por lo tanto su presencia no se pone de manifiesto con los ensayos del poder tóxico de los extractivos donde el disolvente es el agua.

5.III.b DISCUSION del efecto de la luz sobre los inoculantes esterilizados

En el Gráfico 4.III.b aparecen consignados los resultados de la acción de la luz sobre la supervivencia del Rhizobium. Se advierte que resultó realmente perjudicial en aquellas bolsas que se conservaron a 30°C, y en cambio ejerció poca influencia para las guardadas en heladera. Esto está en perfecta consonancia con el hecho de que en la heladera no hay ninguna radiación de corta longitud de onda que los pueda afectar, y el mayor recuento que se obtiene por los testigos recubiertos de papel opaco en la heladera, se debe a que con el recubrimiento se evitó una evaporación prematura de la humedad, tal como se puede verificar en las curvas pertinentes.

Las bolsas de inoculante (cuyo soporte había sido esterilizado con Oxido de Etileno) muestran una diferencia notable en la supervivencia del Rhizobium de acuerdo a que hubiesen sido iluminadas o no y conservadas en heladera o no. El bajón tan notable en los recuentos de bolsas iluminadas y conservadas a 30°C, se podría deber a que la luz cataliza alguna reacción fotoquímica entre los vestigios de OE retenidos por el material, y alguna parte del mismo esencial para una larga longevidad de las bacterias. La alta temperatura contribuiría a facilitar esas reacciones indeseables.

Se interpretan los cambios de pendiente en las curvas de evaporación de humedad de los inoculantes, como consecuencia de las distintas fuerzas que actúan en la retención del agua, que dependen de los diámetros de partícula, de poro, de la naturaleza química del soporte y de la cantidad de sustancias polares que contenga, etc, tal como se explicó en la Tabla 4.II.

Debido al alto poder buffer de las turbas inoculadas, las determinaciones de pH o de acidez de intercambio no mostraron prácticamente ninguna diferencia entre los distintos lotes de bolsas, a excepción de las no esterilizadas donde se pudo apreciar una bajada del pH no muy pronunciada.

5.IV.a. DISCUSION de los ensayos en Cámara Climatizada, donde finalmente se ensayaron los inoculantes preparados:

Para comenzar a ajustar la metodología que se emplearía en los ensayos finales que servirían para testear los soportes, se comenzó por preparar sendas bolsas de inoculante cuyo soporte había sido esterilizado por vapor, o por óxido de etileno, o no había sido esterilizado para nada.

Una vez preparados los inoculantes, se procedió a inocular semillas, tanto con esos como con otros inoculantes adquiridos en el comercio, para luego mediante un ensayo de cámara climatizada poder estudiar la distribución de nódulos y de altura de plantas. Los resultados se muestran en el Cuadro 4.IV.a. Surge de su análisis que entre los inoculantes ensayados, los obtenidos en el comercio presentaban menor número de nódulos/planta que los preparados en este Laboratorio, lo que nos indicaba que la cepa que se estaba utilizando aquí tenía un buen poder infectivo. Así y todo se notó que cuando se utilizaban soportes esterilizados con Oxido de etileno (OE), a pesar de la alta nodulación las plantas no se habían desarrollado gran cosa (se ubicaban casi todas en el menor intervalo de altura, en la moda correspondiente a los testigos sin nodular). Evidentemente los microorganismos habían sido afectados por el método de esterilización del soporte, perdiendo entonces eficiencia en la fijación de N_2 . Se sospechó que podría deberse a que hubiesen quedado vestigios del gas esterilizante, y por esa razón se decidió que a partir de entonces se realizasen varias descompresiones cuidadosas (y no una sola como en este caso), cada vez que se esterilizase turba por este método.

En el Cuadro 4.IV.a.1 se muestran los resultados de una primer batería de elementos estudiados, que pudiesen servir luego para cuantificar los efectos de los inoculantes preparados. Se nota que en general existe buena correlación y reproductibilidad entre los valores. En particular se puso a punto el método de la ureasa, con el cual se dosó el N contenido en tallos o sino en hojas del vegetal. Se decidió seguir usando estos mismos parámetros de comparación para los ensayos posteriores, dado que se habían mostrado eficientes en marcar algunas diferencias, minimizando otras menos importantes.

Así por ejemplo, nótese que existe una buena correlación entre

el peso fresco promedio y el peso seco promedio, aunque no se puede decir lo mismo de los distintos pesos promedio de raíz. La única razón por la que se consignan los valores del peso de raíz, es para dejar sin efecto la posibilidad de que la planta haya derrochado nitrógeno incorporado del aire, en desarrollar la raíz en vez de hacerlo sobre la parte aérea. La misma intención tiene el índice de "vermiculita retenida/gr de raíz", pues se supuso (y luego corroboró) que podría ser función del grado de ramificación de la parte subterránea (cuanto mas fasciolada tanto mas compacta la red de raicillas que retendrán la vermiculita húmeda). Sucede que si se podía demostrar que utilizándose tal o cual inoculante o tal o cual caldo se conseguía modificar la forma de ramificación de la raíz, ello luego podría tener interés para inducir el fenómeno en aquellas áreas del territorio argentino en que por tener un manto rocoso muy cercano de un horizonte fértil de poca profundidad, sería óptimo contar con ese desarrollo superficial y ramificado de las raíces.

Nótese que de acuerdo a los promedios consignados en el Cuadro 4.IV.a.1, el manitol o el glicerol producen efectos similares sobre el vegetal, cuando componen caldos de cultivo donde se desarrolla el microorganismo infectante.

A partir del Cuadro 4.IV.a.2 se van consignando los resultados obtenidos al inocular semillas con el material que se indica en cada caso, y luego estudiar como fueron afectadas diferentes variables que se habían preseleccionado.

A los 13 días todavía no hay un desarrollo de la raíz que justifique su análisis. Lo mismo a los 19 días, y por eso se han dejado en blanco esos casilleros.

Solamente se pueden comparar entre sí aquellos lotes de plantas que tengan la misma edad, pues sobre todo en los primeros tiempos ocurren cambios muy significativos en muy corto plazo y la comparación no tiene entonces sentido. Hecha la salvedad, se notará que en este o los Cuadros siguientes, correspondientes a etapas posteriores del desarrollo del vegetal, siempre se obtienen los valores pico para las plantas que fueron inoculadas directamente con caldo, y los valores inferiores para aquellas plantas que directamente no fueron inoculadas y tampoco se contaminaron luego. Estas son entonces las cotas superior e inferior entre las cuales tienen que encuadrarse los datos de cada uno de los inoculantes ensayados. Se notará al seguir la evolución del crecimiento, que los inoculantes con-

servados en heladera producen mejoras sobre el vegetal mas notables que cuando se almacenaron los inoculantes a 30°C, debido no solamente a que en el primer caso sobrevivieron mas viables y por ende aumentó la posibilidad de nodulación (notar los resultados de la nodulación total que aparecen en el Cuadro 4.IV.a.4) sino que ademas se dió el caso de plantas con relativamente pocos nódulos, pero por provenir de un inoculante almacenado a baja temperatura, se presentaban muy activos en lo que hace a rendimiento, altura, o N%.

A partir de los treintitantos días se comienza a estudiar la distribución de los nódulos y su peso fresco o seco, no habiéndose comenzado antes con ello pues aún no estaban bien desarrollados. También se comienzan a dejar de lado a aquellas plantas que no han nodulado o solo presentaban uno o dos nodulitos insignificantes, computándose las como un subgrupo que sirviese de autocontrol del lote (todos los valores en cada grupo deberían ser superiores que el del autocontrol, pues este no tiene forma de adueñarse del nitrógeno atmosférico y no dispone de otra fuente de N). Tod esto se puede observar en el Cuadro 4.IV.a.3 , donde además se hizo un resumen de los valores promedios entre las plantas noduladas y las no noduladas, para mostrar que también aquí la altura o los pesos de cada parte son inferiores para el caso de que la soja no hubiese nodulado.

En el Cuadro 4.IV.a.4 se repite todo lo anterior pero unos días después. Nótese al comparar los valores promedios, como se ha incrementado la altura o el peso en tan poco tiempo.

A partir del Cuadro 4.IV.a.5, correspondiente a las 7 semanas después de sembradas las semillas inoculadas, ya hay un desarrollo nodular lo suficientemente acentuado como para poder distinguir visualmente a los nódulos que serán eficientes, de aquellos que no lo son, pues estos últimos no son tan blancos ni tienen la superficie tan arrugada como los efectivos, mientras que estos presentan su interior con leg-hemoglobina y los otros no. Además se va a considerar a partir de entonces un número mucho mayor de lotes de plantas originadas de semillas inoculadas por uno solo de los métodos ya mencionados.

En los Cuadros 4.IV.a.5 y 4.IV.a.6 se promedian los valores obtenidos de plantas que habían sido inoculadas con material almacenado a 5°C o a 30°C, donde se vuelve a manifestar el beneficio del almacenamiento a bajas temperaturas.

En el Cuadro 4.IV.a.7 , por último, se comparan los métodos de

esterilización de soportes en base a Oxido de Etileno y Rayos gamma. La turba tratada con radiaciones presenta mayor nodulación (expresada en número de nódulos o en su peso seco); igual altura promedio de plantas o igual peso seco promedio de las mismas, que cuando la turba se esterilizó por OE, razón por la cual podríamos decir que es indistinto el uso de una u otra forma de esterilización para el caso particular que nos ocupa, si no fuere que hay una gran cantidad de plantas que fueron inoculadas con material esterilizado con OE y que no nodularon, tal como figura en ese Cuadro.

Es importante al llegar a este punto del Análisis, recalcar que cuando se diseñó la experiencia se cuidó de dejar un espaciado cons^{33,117,189} tante entre hileras de macetas (colocadas éstas a una distancia prudencial de las paredes reflectantes) para evitar "efectos de borde" y prevenir modificaciones en lo que hace al rendimiento o altura de las plantas mas externas de cada lote.

Además la vermiculita que se usó de soporte en las macetas provenía de una misma partida, y se humecataban todos los pots el mismo día con una misma solución madre, así que si hubo diferencias en el desarrollo radicular, no se debieron a defectos operativos, o al me nos de los considerados influyentes en esta experiencia y que por ende se estandarizaron previamente.

Si el desarrollo radicular y foliar estaban rigurosamente contro lados, deberíamos suponer entonces que el aspecto final de las plan tas de cada lote, considerado en conjunto, puede servir de referencia también respecto de las bondades de cada variable introducida. Así, si comparamos las plantas provenientes de soportes de inoculan te no esterilizados, con los testigos sin nodular, se nota que las primeras han desarrollado individualmente baste bien. En cambio des cubrimos que la población de plantas en cada maceta es baja, o sea que estas semillas inoculadas con turba sin esterilizar han tenido un índice de germinación muy bajo, y eso se podría deber a que los hongos que hay en la turba, o sus esporos (VER 5.II.b.) por no haberse destruído con la esterilización se muestran activos y destruyen muchas semillas aún antes de germinar. Ello quedó probado cuando se vió a los pocos días de sembradas las semillas de este lote, que aparecían gran cantidad de micelios de hongos, mientras que en las otras macetas no había novedades en lo que respecta a la aparición de fito-patógenos u otras especies infestantes macroscópicas.

En los ensayos de campo esto se suele contrarrestar mediante la

utilización de fungicidas "ad-hoc", que aquí no se usaron para no introducir una variable de influencia desconocida sobre el desarrollo del Rhizobium.

Cuando se utilizó turba sin esterilizar pero conservada en la heladera, se consiguió mantener un nivel aceptable de Rhizobiums viables, que pudiesen competir con los contaminantes naturales y entonces hacer sentir sus efectos benéficos sobre el vegetal. Por eso es que en este lote las diferencias no son tan marcadas (en lo que hace a raleo de plantas) que con el lote anterior.

Igualmente comparando las plantas inoculadas con los testigos no nodulados, se nota inmediatamente el beneficio de la inoculación, tal como se puede apreciar en la figura 5.IV.

Es interesante destacar que cuando se utilizó un inoculante cuyo soporte había sido esterilizado por radiaciones gamma, no se pudieron apreciar diferencias morfológicas en los vegetales, tal como se hubiera esperado de haber quedado alguna radiactividad residual en la Turba, que pudiese influir sobre el desarrollo de las plantas.¹³⁴

5.IV.b. DISCUSION de los ensayos agronómicos en el laboratorio:

Los ensayos de supervivencia del microorganismo en estudio, sobre turba de diferentes granulometrías, indicaban como de muy buen desempeño a aquella que correspondiese a una granulometría "malla 30", siendo que existe un concenso casi universal (de acuerdo a la bibliografía ^{10,141,175}) de utilizar soportes molidos tan finos como para que sus partículas puedan pasar una malla 200 (0,0074 cm). Cuál es el inconveniente de utilizar inoculantes preparados con una granulometría tan gruesa?

Para contestar esa pregunta, se hicieron ensayos en los que se midió la retención del polvo de turba de diferente tamaño de partículas, indicándose la cantidad de material que se adhería a los porotos remojados en agua, húmedos, y estimándose además la máxima superficie cubierta por el polvo de turba en esas condiciones. Los resultados se muestran en la Tabla 4.IV.b.2).

Resulta muy evidente que en condiciones similares a las que utilizaría un productor agrario al disponerse a inocular sus semillas de soja (casi todos los inoculantes comerciales aconsejan entre sus instrucciones, el humedecer ligeramente las semillas para incrementar la adherencia del inoculante), con apenas 0,1 gr de la turba mas fina (la que pasó malla 200) ya se consiguió recubrir en un 100% la superficie de todos los porotos que componían el lote estudiado, mientras que trabajando en condiciones similares a las descritas, pero con una granulometría mayor ("malla 30"), no se alcanzó a recubrir mas que un 7-8% de la superficie total, y en ese caso se necesitó nada menos que de medio gramo de polvo de turba, comparados con el 0,1 gr anterior.

Los resultados de utilizar turba "malla 80" no difieren demasiado de los obtenidos con la malla "pasó 200".

Otro de los ensayos que se realizó en el laboratorio, fueron pruebas de la capacidad fijadora de los nódulos provenientes de plantas inoculadas con productos comerciales, con inoculantes "ca seros" como los recién descritos, o directamente con caldos bacterianos sin soportar, en cuya composición entraba o el Glicerol o el Manitol como fuente de carbono. Analizando el Gráfico 4.IV.b se nota que estos resultados no estaban en consonancia con aquellos consignados en el Cuadro 4.IV.a, donde por ejemplo decía que el Inoculante Comercial nº II había tenido un bajo promedio de nódulos/planta, y que estas plantas se habían desarrollado muy poco, mientras

Que aquí aparecía como uno de los de mas alta actividad nitrogenásica, mas alta aún que la de los nódulos provenientes de inocular directamente las semillas con los caldos bacterianos. Además, determinaciones realizadas con la misma cepa pero en diferentes oportunidades, no reproducían resultados al compararse el desempeño del Manitol y del Glicérol.

Todo ello se podría deber a dos causas:

- 1) La sensibilidad del método es tan grande que cualquier pequeñísima modificación operativa involuntaria resultase en una gran variación de los resultados.
- 2) La fijación dependía de factores que directamente no se habían tenido en cuenta, y al no estandarizárselos ocurrían esas diferencias tan significativas.

Tal como se adelantó en la Introducción, son muy numerosas las causas reconocidas por las que puede fallar el método de reducción del acetileno, y tal vez también sean muchas las causas que originan diferencias en los resultados y que normalmente no son consideradas, tal como el estado fisiológico del microorganismo al momento de realizar el examen o al impregnar, la biodisponibilidad de oligoelementos, etc.

Se consideró que el objeto de este Trabajo no es poner a punto un método para medir la actividad de una enzima microbiana, sino en cambio medir los beneficios globales que origina el microorganismo que ha sido soportado sobre turba; beneficios que se podrán apreciar directamente sobre el vegetal, de tal forma de medir las consecuencias de la fijación, en vez de medir la fijación misma del nitrógeno atmosférico.

Si al trabajar en condiciones cuidadosamente controladas aparecían diferencias significativas en los vegetales, habría que acharcarlas a las variables introducidas en el experimento; verbigracia, las características de los inoculantes, que habían sido impregnados todos con una misma población bacteriana, pero cuyos soportes habían sufrido diferentes métodos de esterilización o presentaban diferentes granulometrías o habían sido almacenados bajo condiciones diferentes de Temperatura o luz.

Por todo esto en los ensayos finales para testear los inoculantes producidos en este Laboratorio, no se incluyeron los ensayos de reducción del acetileno, prefiriéndose en cambio concentrar los esfuerzos en la búsqueda de otros parámetros mas directos.

Entre esos parámetros figuraba el peso fresco de diferentes órganos vegetales, e inmediatamente surgió la duda de la confiabilidad que tendrían esos datos, pues ya se conocía de antemano que *Glicine max* era considerada por los agrónomos como "muy transpiradora", o sea que perdía agua a una velocidad bastante grande, y tanto es así que a los pocos minutos de arrancada una planta, ya se notaba un marchitamiento gradual del vegetal.

Fue así que se decidió medir esa velocidad de evaporación, para las condiciones con las que se trabajaría en el Laboratorio.

Los resultados, que ya fueron presentados en la Tabla 4.IV.b.1, determinaron la necesidad de efectuar las pesadas inmediatamente después de decapitadas las plantas, y por eso es que se trabajó con lotes de plantas no muy grandes, para que no transcurriese mucho tiempo entre la muerte del vegetal y la determinación de su peso.

6. CONCLUSIONES

Tras los estudios realizados con el *Rhizobium japonicum* E-45, a nivel de Erlenmeyer, se concluye que para obtener una alta concentración celular, se puede adicionar Tween-80 como surfactante, al 0,05%; sobre un medio conteniendo Glicerol antes que Manitol; con extracto de levadura como fuente vitamínica; con poco Na^+ u otros cationes monovalentes, y en cambio con mas Ca^{++} o Mg^{++} . (Recordemos que cuando se trabajó con oleato, que precipita a estos cationes divalentes, o con EDTA, que los secuestra, se obtuvieron resultados muy pobres).

Convendría que los inóculos de los tanques agitados se desarrollen guardando la relación de 1/10 a 1/5 de vol de medio líquido/vol del frasco, y que la Temperatura de trabajo no se aparte mucho de los 29-31 grados centígrados.

No solamente se aconseja preservar de la luz al extracto de levadura que se vaya a usar (o conservarlo en la heladera cuando sea pastoso), sino también evitar la exposición del microorganismo a la acción de radiaciones nocivas, sea cuando se está manipulando para sembrar o repicar la cepa, sea cuando se está desarrollando en medio líquido.

Así y todo, cuando se tenga que seguir la marcha de un proceso en medio líquido, se aconseja que luego del segundo día de crecimiento, se siga la evolución a través del número de viables antes que a partir de los datos de DO y pH, pues se ha visto que esta bacteria tiende a producir polisacárido, y que la magnitud de su excreción está condicionada por toda una suerte de factores, tales como la T° , la aereación, la fuente de Carbono, la disponibilidad de nutrientes.

Al menos para la cepa estudiada, la curva de viables tenía su pico a las 80/90 horas de proceso, contra las 70/72 horas a las que se producía el pico de DO_{625} .

Respecto de los trabajos realizados a nivel de tanque agitado o de Planta Piloto, quedó claro que al suplementar el medio de cultivo con mayor proporción de Glicerol y de YE, se consiguen grandes cantidades de polisacárido, pero proporcionalmente poco incremento

de los viables/ml. Modificando las condiciones operativas se notó que se podía controlar en parte la alta viscosidad que presentaban los medios en las horas pico, así que queda abierta la posibilidad de que cuando se conozca mejor las vías metabólicas de producción del polisacárido, y sus controles, se pueda operar sobre ellos para obligar al microorganismo a no desperdiciar nutrientes en la síntesis de un producto de excreción. Igualmente se podría buscar una cepa poco productora de polisacárido, e intentar con ella el desarrollo en un medio suplementado.

El hecho de que en el Tanque agitado o la Planta, se pudiesen ajustar muy rápidamente las condiciones para el cambio de escala, trasladando los resultados de la etapa de frascos agitados, permiten concluir que este microorganismo podría ser desarrollado en tanques o fermentadores aún mayores que los usados, sin grandes problemas de aereación, porque tiene una demanda pequeña, y sin grandes problemas en lo que hace a la modificación del medio de cultivo al adaptarlo a un medio económico, ya que no es un microorganismo "fastidioso".

En lo que hace al soporte en sí, se vió que no es necesario una molienda completa del mismo, aunque en ese caso se impone asegurarse que se está ante un material mas o menos homogéneo, pues la inclusión de minerales, inertes, etc, pueden modificar grandemente la supervivencia posterior.

En general la malla "Tal Cual", o sea el producto de la molienda en bruto de la turba, donde coexisten partículas grandes y chicas, minerales y musgo, ha dado un desempeño lo suficientemente bueno como para recomendarla para una producción masiva de inoculantes, donde se procure minimizar costos sin perder demasiado la aptitud de gran retención de humedad, superficie específica, poder buffer, o disponibilidad de sustrato orgánico.

Se aconseja como práctica de rutina en una Industria de Inoculantes, el examen microscópico de cada partida de turba, pues ya se dijo que permite apreciar la morfología de las partículas, su origen botánico, la existencia de minerales o de esporos de hongos, y la presencia de elementos extraños al material, como insectos u otros restos vegetales.

No se ha podido correlacionar la constitución química del soporte (v.g. relación C/N, iones, constituyentes del humus) con los ensayos de supervivencia, notándose solamente que la turba con muchos pirógenos podría tener un comportamiento mas deficiente en ese sentido.

Figura 5.

COMPARACION VISUAL ENTRE PLANTAS DE SOJA ESTERILIZADAS POR VAICR
Y AQUELLAS NO ESTERILIZADAS



Se ha visto la conveniencia de utilizar turba esterilizada antes que sin esterilizar; almacenada a 5°C antes que a 30°C; envasada en bolsas de 80 micrones antes que en las de 15; y conservadas en la oscuridad antes que iluminadas. Al respecto ya se hizo notar que por lo menos para algunos métodos de esterilización de soportes, los beneficios de conservar en la heladera un inoculante se debe ríanno solamente a que la baja T° evita un decaimiento prematuro de los viables por inhibición del metabolismo celular, sino a que en la heladera se lo protege de la luz y por ende no se producen o bien reacciones fotoquímicas perjudicales, o sino absorción de radiación (pues la turba es negra) con el consiguiente aumento de temperatura superficial.

Respecto del método a recomendar para la esterilización del soporte, se puede agregar que siempre que la bolsa se conserve en heladera, es indistinto uno u otro, sea desde el punto de vista de la supervivencia como de sus efectos agronómicos. En cambio cuando el inoculante se vaya a almacenar a 30°C o T° similar, se recomienda no utilizar turba sin esterilizar o esterilizada por OE. En cambio la esterilizada por radiaciones gamma, o aquella esterilizada por vapor, tuvieron un muy buen desempeño, aunque con criterio mas selectivo se podría recomendar la esterilización por calor húmedo antes que por radiaciones, pues la sobrevivencia al cabo de cuatro meses fue mayor, en el caso de EV, y sus efectos sobre los vegetales (número total de nódulos, peso de los mismos, rendimiento, etc) también influyen en la decisión. (Fig. 5.)

Después de haber estudiado condiciones para la obtención de caldos de alta concentración celular; después de haber estudiado físico-químico-biológicamente un material extraído del Sur argentino; después de haber analizado la conveniencia de uno u otro método de esterilización de ese soporte, así como de la evaluación agronómica de cada técnica aplicada, sinceramente se espera que con este trabajo se sienten las bases que permitan la concreción de una Industria Nacional dedicada a la elaboración de Soportes para Inoculantes.

R. G. Rendón

7. BIBLIOGRAFIA

- 1
Abel, G.H. and Lewis, W.E., Response of Lee soybeans to different strains of Rhizobium japonicum. Agronomy Journal (Madison, Wis.) 56 (4): 423-424, 1964.
- 2
Abel, G.H. and Erdman, L.W., 1964. Response of Lee soybeans to different strains of Rhizobium japonicum. Agron. J. 56: 423-4.
- 3
Agosar, R.J.G. Soja. Cap. XX de la Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, Vol. II, 1964.
- 4
Allen, E.K. & Allen, O.N. Nitrogen fixation. The scope of nodulation in the Leguminosae. Toronto. University of Toronto, 1961. (Recent advances in botany).
- 5
Araújo, S.C. de, Stammer, E.F., Küster, J.C. Determinação sorológica da ocorrência de três estirpes de Rhizobium japonicum em nódulos de oito variedades de soja (Glycine max Merrill) Rev. Inst. Biol. Pesqui. Tecnol. 16: 49-51, 1971.
- 6
Araújo, S.C. de & Küster, J.C. Comportamento de sete estirpes de Rhizobium japonicum frente a uma variedade de soja (Glycine max Merrill). Arq. Biol. Tecnol. Curitiba, 13: 93-100, 1970.
- 7
Arruda, N.B. de, Döbereiner, J.; Germer, C.M. Inoculação, adubação nitrogenada e revestimento calcário em três variedades de soja (Glycine max (L) Merrill). Pesqui. Agropec. Bras. 3: 201-5, 1968.
- 8
Ash, C.G. & Allen, O.N. (1948) A comparison of methods recommended for the surface sterilization of leguminous seed. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 13, 279-283.

9
Australia. Division of Tropical Pastures, CSIRO, ed.- A review of nitrogen in the tropics with particular reference to pastures; a symposium. Commonwealth bureau of pastures and field crops. Bulletin 46, 1962.

10
Balatti, Antonio Pedro
Estudio sobre la Obtención de inoculantes para leguminosas
Trabajo presentado en el 7º Congreso Latinoam. de Microb. Abril 1977.

11
Barrios, S., Raggio, N. & Raggio, M. (1963). Effect of temperature on infection of isolated bean roots by rhizobia. Plant Phys. 38, 171-177

12
Berg, E.R. Structure of the soybean oil export market. Univ. of Illinois Agric. Exp. St. Bull. 674. 1961.

13
Bergallo N. de Arruda, Döbereinen J. e Germer C.(1968): Inoculação Adubação nitrogenada e revestimento calcário em três variedades de soja (Glycine max L.) Pesq. agropec. bras. 3:201-205.

14
Bergersen, F.J., 1970. The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene-reduction assay. Aust. J. Biol. Sci. 23: 1015-25.

15
Bergersen, F.J., (1971)
Symbiotic Fixation of N₂ in Leguminosarum
CSIRO, Australia

16
Billard, J.J. 1943. La soja. Estudio económico. Inst. de Economía y Legislación Rural. Tomo IV, Fasc. 5. Fac. de Agronomía y Veterinaria de Buenos Aires.

17
Billard, J.J. 1943. La soja. Estudio económico. Posibilidades de su cultivo en la Argentina. Fac.Agr. y Vet. IV, Fasc. 5, Univ. Nac. de Buenos Aires.

- 18
Bohlool, B.B. and Schmidt, E.L. 1973. Persistence and competition aspects of Rhizobium japonicum observed in soil by immuno-fluorescence microscopy. Soil Sci.Soc.Amer.Proc. 37: 561-4
- 19
Bohlool, B.B. and Schmidt, E.L. 1974. Lectins: a possible basis for specificity in the Rhizobium-Legume root nodule symbiosis. Science. 185: 269-71.
- 20
Bonnier, C. Symbiose Rhizobium-Légumineuses en région équatoriale. Inst. National pour l'Etude Agronomique du Congo Belge. Série scientifique, n°72, 1957.
- 21
Borrello, A.V.: Recursos minerales de la República Argentina, III. Combustibles Sólidos Minerales, rev. Inst. Nac. Inv. Cienc. Nat., Mus. Arg. Cienc. Nat. Bernardino Rivadavia, T.V, Buenos Aires, 1956.
- 22
Borst, H.L. and Thatcher, L.E. (1931): Life history and composition of the soybean plant. Ohio Agr. Expt. Sta. Bul. 494, 96 pp.
- 23
Bray, H.
(1944)
Polysacharid formation by Rhizobium radicum strains
- 24
Bremner, J.M. (1960): Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. J.agric.Sci. 55, 1-23.
- 25
Burk, D., Lineweaver, H., Horner, C.K. The specific influence of acidity on the mechanism of nitrogen fixation by Azotobacter. J.Bacteriol., Baltimore, 27: 325-40, 1934.
- 26
Burris, R.H. & Wilson, P.H. Methods for measurement of nitrogen fixation. In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. de. Methods in Enzymology New York, Academic Press. 1957, V.4, p.355.
- 27
Caldwell, B.E., Hinson, K. and Johnson, H.W. 1966. A strain-specific ineffective nodulation reaction in the soybean Glycine max (L) Merril Crop. Sci. 6:495-6.

28
Caldwell, B.E. and Grant, V.: Effects of Rhizobium japonicum strains on soybean yields. Crop Science (Madison, Wis.) 10 (1): 19-21, 1970.

29
Caldwell, B.E. and Hartwig, E.E., 1970. Serological distribution of soybean root nodule bacteria in soils of southeastern USA. Agron. J. 62: 621-2.

30
Caldwell, B.E. and Vest, G. 1970. Effects of Rhizobium japonicum strains of soybean yields. Crop.Sci. 10: 19-21

31
Carnahan, J.E. & Castle, J.E. Some requirements of biological nitrogen fixation. J.Bacteriol., Baltimore, 75 (2): 121-4, 1958.

32
Cartter, J.L. y T.H. Hopper. Influence of variety, Environment and Fertility Level on the Chemical Composition of Soybean Seed. U.S.D.A. Tech.Bull. 787, 1942.

33
Caviness, C.E.: Spacing studies with Lee soybeans. Arkansas Agricultural Experiment Station, 1966. Bulletin 713.

34
Chatel, D.L. and C.A. Parker. 1973. The colonization of host-root and soil by rhizobia - I. Species and strain differences in the field. Soil Biol. Biochem. 5: 425-32.

35
Chatel, D.L. and Parker, C.A., 1973. Survival of field-grown rhizobia over the dry summer period in western Australia. Soil Biol. Biochem. 5: 415-23

36
Coscia, Adolfo. Soja. Sus perspectivas económicas en la República Argentina. Est.Exp.Agropec. de Pergamino, INTA. Informe Técnico 26.

37
Coscia, A. y Bracco de Torígino, S. Soja. Est.ExpAgropec. Pergamino. Inf.Téc. 26, 1964.

38
Coscia, A.A. La soja. Evolución reciente y perspectivas. Est. Exp. Reg. Agropec. Pergamino. Informe Técnico N°124, INTA, 1974.

39
Cottrell, H.M., Otis, D.H. and Haney, J.G. (1900): Soil inoculation for Soybeans. Bul.KanAgr.Exp.Sta 96.

40

Danso, S.K.A. and Alexander, M. (1974). Survival of two strains of Rhizobium in soil. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 38: 86-9.

41

Dart, P.J. 1974. The infection process. In: The Biology of Nitrogen Fixation (ed. A Quispel) North-Holland Research Monographs. Frontiera of Biology. 33:381-429.

42

Date, R.A. 1970. Microbiological problems in the inoculation and nodulation of legumes. Plant and Soil. 32: 703-25.

43

Date, R.A. 1963. Problems of inoculation. Anuario de la Sociedad Mejoramiento de Praderas. 7: 93-8. Montevideo, Uruguay.

44

Deimundo, M.E. y Dubois, C.A. (1970): "La inoculación de rizobios en soja" Trabajo presentado a la Fac. de Agronomía de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

45

Del Campo, G.E.: Los yacimientos de turba en la región central atlántica en el territorio de Tierra del Fuego, Comb. Sól. Buenos Aires, 1954.

46

Delwiche, C.C. & Wijler, J. Non-symbiotic nitrogen fixation in soil. Plant Sci. 7: 113-29, 1956.

47

Dilz, K. & Mulder, E.G. Effect of associated growth on yield and nitrogen content of legume and grass plants. Plant Soil. The Hague, 16: 229-37, 1962.

48

Dobereiner, J. N.B. Arruda, and Penteado, A.F. 1966. Avaliação da fixação do nitrogênio em leguminosas pela regressão do nitrogênio total das plantas sobre o peso dos nódulos. Pesq. Agropec. Bras. 1: 233-6

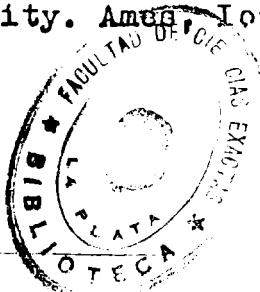
49

Döbereiner, J., Arruda, N.B. de, Penteado, A.F. Problemas da inoculação de soja em solos ácidos. Inst. Pesqui. Exp. Agrop. Centro-Sul. Boletim nº6:1 153-7, 1966.

- ⁵⁰
Döbereiner, J. & Arruda, N.B. de. Inter-relações entre variedades e nutrição na nodulação e simbiose da soja (*Glycine max* (L) Merrill) Pesqui. Agrop. Bras. 2: 475-87, 1967.
- ⁵¹
Döbereiner, J. Non-symbiotic nitrogen fixation in tropical soils. Pesqui. Agrop. Bras., 3: 1-6, 1968.
- ⁵²
Döbereiner, J. Fixação do nitrogênio atmosférico em solos tropicais. Revisão de trabalhos realizados no Brasil. Inst. Pesqui. Exp. Agrop. Centro-Sul. ISimpósio Latino-Americano de Biología do Solo. Bahía Blanca, Argentina, 1965.
- ⁵³
Döbereiner, J., Arruda, N.B. de, Penteado, A.F. Especificidade hospedeira em variedades de soja na simbiose com Rhizobium. Pesqui. Agrop. Bras. 1: 207-10, 1966.
- ⁵⁴
Döbereiner, J., Franco, A.A., Guzmán, I. Estirpes de Rhizobium japonicum de excepcional eficiência. Pesqui. Agrop. Bras. 5: 155-61, 1966.
- ⁵⁵
Döbereiner, J., Arruda, N.B. de, Penteado, A.F. Avaliação da fixação do nitrogênio em leguminosas, pela regressão do nitrogênio total das plantas sobre o peso dos nódulos. Pesqui. Agrop. Bras. 1: 233-7, 1966.
- ⁵⁶
Döbereiner, J., Franco, A.A. and Guzmán, I., 1970. Estirpes de Rhizobium japonicum de excepcional eficiência. Pesq. Agropec. Bras. 5: 155-62.
- ⁵⁷
Dudman W F
Growth and extracellular polysaccharid production by Rh. meliloti. Journal of Bacteriology 88, 640-645 (1964).
- ⁵⁸
Dudman, W.F., 1976. The extracellular polysaccharides of Rhizobium japonicum compositional studies. Carbohydrate Research 46: 97-110.
- ⁵⁹
Elkan, G.H. A nodulation-inhibiting root excretion from a non nodulating soybean strain. Can. J. Microbiol. Ottawa, 7: 851-6, 1961.
- ⁶⁰
Erdman, L.W. & Means Ura M. (1952); Use of total yield for predicting nitrogen content of inoculated legumes grown in mixed cultures. Soil Sci. 73, 231-235.

- 61
Erdman, Lewis W. 1928. Soybean inoculation studies. Agric. Exp. Stat. Iowa Stat. College of Agriculture and Mec. Arts. Res. Bull N°11
- 62
Fellers, C.R. (1918): The effect of inoculation, fertilizer treatment and certain minerals on the yield, composition and nodule formation of soybean. Soil Sci. 6: 81-129.
- 63
Ferrari, E., Souto, S.M., Döbereiner, J. Efeito da temperatura do solo na nodulacao e no desenvolvimento da soja perene (Glycine javanica) Pesqui. Agrop. Bras. 2: 461-466, 1967.
- 64
Fife, J.M. The effect of different oxygen concentrations on the rate of respiration of azobacter in relation to the energy involved in nitrogen fixation and assimilation. J. Agr. Res. Washington, 66: 421-40, 1943.
- 65
Freire, J.R.J. and Vidor, C. 1970. A inoculação da soja com Rhizobium. I. Simpósio Brasileiro da soja, Campinas, S.P., Brazil.
- 66
Freire, J.R.J. and Vidor, C., 1971. Fatores limitantes dos solos ácidos na simbiose de Rhizobium e as leguminosas. In: As leguminosas na agricultura tropical (ed. J. Döbereiner), 211-47, Pesq. Agropec. Bras., Rio de Janeiro, Brazil.
- 67
Freire, J.R.J. A inoculação artificial das leguminosas com bactéria radicícolas. Secret. Estado Negoc. Agric. Ind. Comer. (R.G.S.). Sér. divulgação, n° 5: 3-9, 1953.
- 68
Fulrath, R.M. and Pask, J. Ceramic Microstructures: their analysis significance and production. 1966. Congress Catalog Card Number: 68-18484.
- 69
Gabby, J.L. 1945. La química de la múltiple soya. La Hacienda, 40 (8):389. New York.

- ⁷⁰
Gibson, A.H. (1963). Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of root temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* L. plants. *Austral.J.Biol.Sci.* 16, 28-42.
- ⁷¹
Gilberg, B.O. 1968. Heat resistance in Rhizobium. *Arch.Microbiol.* 62: 328-35.
- ⁷²
Graham, P., Vitamin requirements of root nodule bacteria. *J. General Microbiology* (1963) 30, 245-248.
- ⁷³
Graves, J.E. Some factors influencing nitrogen fixation. *Soil Sci.*, Baltimore, 36: 267-80, 1933.
- ⁷⁴
Gullöve, F.H., Quinn, L.R. (1963): The collection and evaluation of tropical and subtropical legumes of indigenous and world origin. *IBR Res.Inst* (114), Matao, S.Paulo, p.10
- ⁷⁵
Hachleman, J.C. 1938. La soja y sus múltiples usos. *La Hacienda*, Año N°2, pp.53-55, New York.
- ⁷⁶
Halbinger, R.E. The microbiological utilization of atmospheric nitrogen. *Ann. Inst. Pasteur. Supp. au n°3*, Paris, 161-6, 1965.
- ⁷⁷
Hamatová, E. & Vintikova, H. (1963): The production of legume inoculants in C.S.S.R. (Czechoslovakia) and its checking. *Institute for Scientific and Technical Information, Prague*, 12, 265-280.
- ⁷⁸
Hamdi, Y.A., Abd-el-Samea, M.E. and Lofti, M. 1974. Nodulation of soybean under field conditions. *Soil and Fertilizers Abstract.* 38:50
- ⁷⁹
Hamdi, Y.A., 1971. Soil water tension and the movement of rhizobia. *Soil Biol. Biochem.* 3: 121-6.
- ⁸⁰
Ham, G.E., Cardwell, V.B. and Johnson, H.W., 1971. Evaluation on Rhizobium japonicum inoculants in soils containing naturalized populations of rhizobia. *Agron. J.* 63:301-3.
- ⁸¹
Hanway, John J. y Thompson, Harvey E. How a soybean plant develops. *Special Report 53. Iowa St. University. Ames, Iowa*, 1967.



- 82
Hardy, R.W.F. and Knight, E. Jr, 1968. The biochemistry and postulated mechanisms of N_2 fixation. In: Progress in Phytochemistry (ed. L. Reinhold), John Wiley and Sons, Ltd., Sussex, England. pp.387-469.
- 83
Hardy, R.W.F., Holsten? R.D., Jackson, E.K., and Burns, R.C. 1968. The acetylene-ethylone assay for N_2 fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43:1185-1207.
- 84
Haydock, K.P. & Norris, D.O. (1967). Opposed curves for nitrogen per cent on dry weight given by Rhizobium dependent and nitrate dependent legumes. *Aust.J.Sci.* 29, 426-427.
- 85
Ibarra, D. y Placenza, E.E. Soja: Un producto maravilloso. *Agro Nuestro*. III (20): 6-13 Bs.As., 1962.
- 86
Industrie de soja. *Oleagineux*, 14(5):298, Paris, 1959.
- 87
Inoculación y peleteado de semillas de leguminosas. Circular de Divulgac. N°2, 3ra. Edición. Junio de 1967. Centro Nac. de Inv. Agrop. Villa Udaondo, Castelar, Prov. de Buenos Aires.
- 88
Iyer, N.R. 1976. Nodule formation and haemoglobin content in some species of Papilionaceae. *Plant and Soil.* 44: 451-4 (Short Communication)
- 89
Johnson, H.S. and Hume, D.J. 1973. Comparisons of nitrogen fixation estimates in soybeans by nodule weight, leghemoglobin content, and acetylene reduction. *Can.J.Microbiol.* 19:1165-8.
- 90
Johnson, H.W., Means, U.M. and Weber, C.R., 1965. Competition for nodule sites between strains of Rhizobium japonicum applied as inoculum and strains in the soil. *Agron.J.* 57: 179-85.
- 91
Johnson, H.W. and Means, U.M., 1960. Interaction between genotypes of soybean and genotypes of nodulation bacteria. *Agron. J.* 52: 651-4.

92

Jordan, D.C. & Garrard, E.H. (1951): Studies on the legume root nodule bacteria. 1. Detection of effective and ineffective strains. *Can.J.Bot.* 29, 360-372.

93

Kapusta, G. and Rowenhorst, D.L. 1973. Influence of inoculum size on Rhizobium japonicum serogroup distribution frequency in soybean nodules. *Agron. J.* 65: 916-9.

94

Koch, B. and Evans, H.J. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. *Plant Physiol.* 41: 1748-50. (Short Communication)

95

Koch, B. Evans, H.J. & Russell, S. (1967 b): Properties of the nitrogenase system in cell-free extracts of bacteroids from soybean root nodules. *Proc. natn.Acad.Sci., U.S.A.* 58, 1343-1350.

96

Lango, R.T. & Alexander, M. Anomalous infections by Rhizobium. *Can. J. Microbiol., Ottawa*, 7: 959-91, 1961.

97

Leonard, L.T. (1916): Variation in Nodule Formation. *J.An.Soc.Agron.* 8: 116-118.

98

Lipman, J.G. and Blair, A.W. (1916): Factors influencing the protein content of soybean. *Soil Science* 1: 171-178.

99

Loneragan, J.F., Meyer, D., Fawcett, R.G. & Anderson, A.J. (1955) Lime pelleted clover seeds for nodulation on acid soils. *J.Austral. Inst.Agric.Sci.* 21, 264-265.

100

Lopreto, C.R., Mazza, L.A., Balatti, A.P., 1972: Influencia de los componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de generación de una cepa de Rhizobium japonicum. *Anales de la Comisión de Investigaciones Científicas*, T.CXCIII, 1-II, p.35-47.

101

— 1973: Estudio comparativo de crecimiento celular y capacidad de fijación de nitrógeno de una cepa de Rhizobium japonicum. *Revista de la Facultad de Agronomía de La Plata* (3ra. época), T.XIIX (entrega 2da.), D. 2-1-212.

- 102
Lopreto C; Mazza Luis; Balatti Pedro.
Influencia del suministro de O₂ sobre la vel. de crecimiento del Rhizob.
Rev. Asoc Arg. Micr. Vol 5; N° 3 ; 1973.
- 103
Lopreto, C.R., Mazza, L.A. y Balatti, A.P.: Producción de inoculantes
para soja. Estudios sobre soportes obtenidos con materiales de
origen nacional. Revista de la Facultad de Agronomía de La Plata,
3ra. época, t.LI, entrega Ira., La Plata, Argentina.
- 104
Los usos múltiples de la soja. Parte II. Descripción de las prácticas
para su cultivo. Agricultura de las Américas, 5(5): 32-38 Missouri, 1956.
- 105
Lyon, T.L. y Buckman, H.O. (1952): Edafología. Acme Agency, Buenos Aires.
Argentina.
- 106
Mague, T.H., Burris, R.H. 1972. Reduction of acetylene and nitrogen
by field-group soybeans. New Phytol. 71: 275-86.
- 107
Mahmoud, S.A.Z., Taha, S.M. and Salem, S.H. 1970. Investigations on
the relationships between the efficiency of Rhizobium strains and the
amino acid contents of nodules and roots of some legumes. Soil and
Fertilizers Abstract. 35: 50, 1972.
- 108
Marshal, K.C., Mulcahy, M.J. and Chowdhury. 1963. Second year clover
mortality in western Australia—a microbiological problem. J.Aust.Inst.
Agric.Sci. 29: 160-4.
- 109
Miears, R.J. y Staten, R.D., 1967: El cultivo de frijoles soja se
aumenta en las Américas. La Hacienda (New York) 62 (10): 42-47.
- 110
Moore, G.T. (1905): Soil Inoculation for Legumes. Bul. USDA Bur. Plant
Industry 71.
- 111
Morrison, F.B., 1943. Feeds and Feeding. Morrison Publ. Company,
New York.

- 112
Morse, W.J. and Carter, J.L. (1939): Soybeans: culture and varieties. U.S. Dept. Agr. Farmer's Bul. 1520, 39 pp..
- 113
Morse, W.J., 1950: History of soybean production. In soybean and soybean products. Edited by Markley, New York, Interscience Publisher, Vol. I.
- 114
Munson, W.M. (1898): The Acquisition of Atmospheric Nitrogen. Soil inoculation. Me. Agr. Exp. Sta. Ann. Rpt. 208-212.
- 115
Munson, W.M. (1897): The Acquisition of Atmospheric Nitrogen. Ann. Rpt. Me. Agr. Exp. Sta. 114-140.
- 116
Nash, S.M. and Moerman, O.: Inoculum potential of introduced Rhizobium japonicum in certain Rhodesian field soils. Rhodesia Zamb. Bul. Journal Agric. Research 5 (3): 215-220, 1967.
- 117
Nelson, C.E. y Roberts, S. Effect of plant spacing and planting date on six varieties of soybeans. Wash Agric. Exp. Stat., Bull. 639, 1962.
- 118
Nelson, C.E., Roberts, S. and Nelson, G.D. Yields and plant responses of six soybean varieties to nitrogen and zinc fertilization. Wash Agric. Exp. St. Bull. 642. 1962.
- 119
Nieves, R. Mercado interno e internacional para una producción argentina de soja. Rev. Soc. Venado Tuerto XII (134): 6135-6139, Venado Tuerto 1948.
- 120
Norris, D.O. (1958a) Rhizobium needs magnesium, not calcium. Nature (Lond.), 182, 734-735.
- 121
Nutman, P.S. The relation between nodule bacteria and the legume host in the rhizosphere and in the process of infection. In: Baker, K.F. & Snyder, W.C.- Ecology of soil-borne plant pathogens. Berkeley, University of California Press, 1970, p. 231-247.
- 122
Orlando, T.A, y Celero E.H. La inoculación de la soja. Una práctica para obtener altos rendimientos a bajo costo. Bol. Divulgativo N°51. Est. Exp. "Bolicho" Ins. Nac. de Invest. Agropec. Ecuador, 1972.

- 123
Osman, N., Morrison, W.R. and Bender, L.D. Factors affecting the estimated future foreign demand for soybean. Arkansas Agricultural Experiment Station, 1966, Bull 712.
- 124
Páez Clivio, Jorge. La soja en el Perú. La Vida Agrícola (Lima) 29 (347), 909-915, 1952.
- 125
Palafox, A.L. y Rosenberg, M.M. A comparison of Hawaii meat and bone meal, soybean oil meal, and herring meal in chick starter rations. Hawaii Agric. Exp. St. Univ. of Hawaii. Tech. Bull 28. 1955.
- 126
Pankhurst, C.E. and Sprent, J.I. 1975. Some effects of water stress and the respiratory and N_2 -fixing activity of soybean root nodules. 5th Australian Legume Nodulation Conference, Brisbane, Australia. p.82-5
- 127
Pascale, A.J. (1969): "Tipos agroclimáticos para el cultivo de la soja en Argentina". Rev. de la Fac. de Agronomía, U.B.A., Buenos Aires, Argentina.
- 128
Pate, J.S. (1961): Temperature characteristics of bacterial variation in legume symbiosis. Nature (Lond.), 192, 637-639.
- 129
Peixoto, A.M., Moraes, C.L. y Próspero, A.O., 1964: Contribuição ao estudo da composição química e digestibilidade do feno de soja perone. An. IX Congr. Int. Pastageno. S. Paulo, 1:791-795.
- 130
Perkins, A.T. (1924): The effect of several mineral fertilizers upon the nodulation of Virginia soybeans. Soil Science 17:439-447.
- 131
Peters, R.J. and Alexander, M. 1966. Effect of legume exudates on the root nodule bacteria. Soil Sci. 102: 380-87.
- 132
Pizarro, J.B. Rentabilidad de la soja frente a cultivos competitivos en el área maicera tradicional. Est. Exp. Reg. Agropec. Pergamino. Informe Técnico N°121. INTA, Pergamino, 1973.

- 133
Ratray, A., The soybean in Rhodesia. Rhodesia Agricultural Journal 157(3): 179-185, 1960.
- 134
Rawling, J.O., Hanway, D.G. and Gerner, C.L. Variation characters of soybean after seed irradiation. Agronomy Journal (Madison, Wis.) 50 (9):524-528, 1958.
- 135
Remusi, C. La soja; cultivo, mejoramiento, comercialización, usos. Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería. 1977. Fasc. 12-4.
- 136
Remus, C. y Pascale, A.J., El cultivo de la soja en la Argentina. Informaciones sobre grasas y aceites (Bs.As.) 3(7): 81-83, 1965.
- 137
Rodríguez, J.C., La soya, cultivo y aplicaciones. La Paz, Bolivia. Servicio Agrícola Interamericano, 1956. Bol.Exper.B.
- 138
Romanow, I. Recherches sur la synthèse de l'acide indole-3-acétique par les Azotobacter. Ann. Inst. Pasteur. Suppl. au n°3, Paris, 280-92, 1965.
- 139
Rosas, G.S. Soja, Irradiación con cobalto. Informaciones sobre grasas y aceites (Buenos Aires) 6 (5-8): 120-123, 1968.
- 140
Roughley, R.J., Date, R.A. & Walker, M.H. (1966): Inoculating and lime pelleting clover seed. Agric.Gaz. N.S.W. 77, 142-146.
- 141
Roughley, R.J. and Vincent, J. (1967) Growth and Survival of Rhizobium spp. in Peat Culture. J. of Applied Bacteriology, Vol.30, 362-376.
- 142
Rovira, A.D. 1965. Plant root exudates and their influence upon soil microorganisms. In: Ecology of soil-borne plant pathogens (K.F. Baker and W.C. Snyder, ed.) University of California Press, Berkeley, Los Angeles, pp. 170-186.
- 143
Ruiz-Fornells, R. La soja: aspecto técnico y económico de su cultivo en España. Madrid, Ministerio de Agricultura, 1961. Hojas divulgadoras.

- 144
Ruschel, A.P., Britto, D.P.P.S., Carvelho, L.F. de - Efeito do boro, molibdenio e zinco quando aplicados ao revestimento da semente na fixacao simbiótica do nitrogênio atmosférico da soja (*Glycine max* (L) Merrill). *Pesqui. Agrop. Bras.* 4: 29-37, 1969.
- 145
Ruschel, A.P. & Eira, P.A. da - Fixacao simbiótica do nitrogênio na soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Influencia da adição de calcio no solo e molibdenio ao revestimento da semente. *Inst. Pesqui. Exp. Agrop. Centro-Sul. Boletim técnico*, 81: 103-7, 1969.
- 146
Scudder, W.T. 1974. Rhizobium inoculation of soybeans for subtropical and tropical soils. I. Initial field trials. *Soil and Crop Science Society of Florida Proceedings*. 34: 79-82.
- 147
Schiel, E. y col. (1967): Inoculación y peleteado de semillas leguminosas. INTA, Buenos Aires, Argentina.
- 148
Schiffman, J. and Lobel, R. 1970. Haemoglobin determination and its value as an early indication of peanut Rhizobium efficiency. *Plant and Soil*. 33: 501-12.
- 149
Schiffman, J. and R. Lobel. 1973. Seasonal changes in symbiotic nitrogen fixation and haemoglobin content in nodules of peanuts. *Plant and Soil*. 39: 329-40.
- 150
Schoolhorn, R. and Burris, R.H. 1967. Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 53: 213-6.
- 151
Schwinghamer, E.A., Evans, H.J. and Dawson, M.D. 1970. Evaluation of effectiveness in mutant strains of Rhizobium by acetylene reduction relative to other criteria of N₂ fixation. *Plant and Soil*. 33: 192-212.

Shamalchanova, N.M. and Oleinikov, R.R. 1971. Protein of nodule bacteria as an index of their nitrogen-fixing activity. Soil and Fertilizers Abstract. 35: 50, 1972.

153
Sharon, N. 1977. Lectins. Scientific American. 236(6): 108-19

154
Sherwood, M. Inhibition of Rhizobium trifolii by YE or Glycine, prevented by Ca⁺⁺. Journal of General Microbiology (1972) 71, 351-358.

155
Shrewsbury, Ch.L. and Bratzler, J.W. 1933. Cystine deficiency of soybean protein at various levels in a purified ration as supplement to corn. J.Ap.Res. Vol. 47, No.11, pp.889-895, Washington.

156
Silva, J. Gomes Da, Estudos sobre a inoculação da soja. Rev. de Agricultura, 23 (11/12): 365-378. Piracicaba, S.Paulo, Brasil, 1948

157
Simon, M.S., Soybeans, economic analyses relating to processing. Washington, Department of Agriculture, 1953. Marketing Research Report 39

158
Siragusa, A.: Contribución al conocimiento de los turbales de Mendoza, Inst. Suelos y Agrotecnia, publ. 36, Buenos Aires, 1955.

159
Skinner, K.J. 1976. Nitrogen fixation. Chemical & Engineering. Oct.

160
Sloger, C. 1969. Symbiotic effectiveness and N₂ fixation in nodulated soybeans. Plant Physiol. 44: 1666-8

161
Smirnova, M.I. and Lavrova M.N. (1934): Variation of the chemical composition in different soybean varieties. Trudy Prikl. Bot, Genet, Selek (Bul. Appl. Bot., Genet, and Plant Breeding). Ser. III No5 pp.1-103,

162
Smith, R.S. and Miller, R.H. 1974. Interactions between Rhizobium japonicum and soybean rhizosphere bacteria. Agron. J. 66:564-7.

163
Soja: el grano maravilloso. La Hacienda (10):52-53. 11. New York, 1952.

164

Souto, S.M. e Döbereiner Johsua (1968): Efeito do fósforo, temperatura e umidade do solo na nodulação e no desenvolvimento de duas variedades de soja perene. *Pesq. agropec. bras.* 3:215-221.

165

Sprent, J. 1969. Prolonged reduction of acetylene by detached soybean nodules. *Planta (Berl.)*. 88: 372-5 (Short Communications).

166

Stark, R.W. (1924); Environmental factors affecting the protein and the oil content of soybeans and the iodine number of soybean oil. *Amer.Soc.Agron.Jour.* 16: 636-645

167

Stewart, W.D.P. Nitrogen fixation in plants. London. Athlone Press. 1966. 168 p.

168

Stolp, H. and Starr, M.P. 1963. Bdellovibrio bacteriovorus gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 29: 217-48.

169

Sullivan, C.W. and Casida, L.E., Jr. 1968. Parasitism of Azotobacter and Rhizobium species by Bdellovibrio bacteriovorus. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 34: 188-96.

170

Tames Alarcón: Métodos físicos y químicos para el estudio de los suelos. *Inst. Nac. Inv. Agronom. (Madrid)*.

171

Thompson, J.A. & Vincent, J.M. (1967). Methods of detection and estimation of rhizobia in soil. *Plant and Soil*, 26, 72-84.

172

Thompson, J.A., Roughley, R.J. and Herridge, D.F. 1974. Criteria and methods for comparing the effectiveness of Rhizobium strains for pasture legumes under field conditions. *Plant and Soil.* 40: 511-24.

173

Thompson, J.A. and Pongsakul, P. 1976. "Soil" inoculation for soybeans investigated. *Arkansas Farm Research.* 25: 15.

174
Tonnelier, A.C., 1912. La soja hispida y sus aplicaciones. *Mrio. Agr.*
Nac. 16, p. 13.

175
Van Schreven, D.A., Otzen, D. & Lindenberg, D.J. (1954): On the
production of legume inoculants in a mixture of peat and soil.
Antonio v. Loeuwenhoek, 20, 33-57.

176
Van Schreven, D.A. 1970: Some factor affecting growth and survival
of *Rhizobium* spp. in soil-peat cultures. *Plant and Soil* 32, p.113-130.

177
Vandenborre, R.J. An econometric analysis of the market for soybean
oil and soybean meal. Univ. of Illinois. Coll. of Agric. Exp. St.
Bull. 723. Urbana, Illinois, 1967.

178
Vásquez, H.R.: Bibliografía sobre soja. Contribución de biblioteca
a la cátedra de Cultivos Industriales de la Univ. Nac. de Tucumán,
Tucumán, 1970, 35 p.

179
West, G. 1970. RJ3—A gene conditioning ineffective nodulation in
soybean. *Crop Sci.* 10: 34-5.

180
Vidor, C. and Freire, J.R.J. Novas perspectivas a agricultura.
Informativo da UFRGS 2 (9): 6-7, Porto Alegre, RS, Brazil.

181
Vidor, C. Fontes de disponibilidade de nitrogenio para as culturas.
Instituto Andre Voisin, Publicacao N°. 1:65-94, 1972. Porto Alegre,
RS, Brazil.

182
Vincent, J.M. 1974. Root-nodule symbioses with *Rhizobium*. In:
The Biology of Nitrogen Fixation (ed. A. Quispel). North-Holland
Research Monographs, *Frontiers of Biology.* 33: 265-341.

183
Virtanen, A.I., Jorma, J. Linkola, H. & Linnasalmi A. (1947).
On the relation between nitrogen fixation and leghaemoglobin content
of leguminous root nodules. *Acta. Chem. Scan.* 1, 90-111.

184
Weaver, R.W. 1970. Population of *Rhizobium japonicum* in Iowa soils
and inoculum level needed for nodulation of *Glycine max* (L) Merril.
Unpublished Ph.D. Dissertation. Library, Iowa State University of
Science and Technology, Ames, Iowa. pp.168.

- 185
Weaver, R.W. and Frederick, L.R. 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of Glycine max (L) Merrill. II. Field Studies. Agron.J. 66:233-6.
- 186
Weaver, R.W. and Frederick, L.R. 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of Glycine max (L) Merrill. I. Greenhouse studies. Agron.J. 66:229-32.
- 187
Wells, C.W. Jr. The expanding soybean meal market. How changes in feeding practices and growth of the formula feed industry have affected demand. Bull. 620. Univ. of Illinois. Agric. Exp. Station. 1957.
- 188
Wieringa, K.R. & Bakhuizen Janny A. (1957). Chromatography as a means of selecting effective strains of rhizobia. Plant and Soil, 8, 254-262.
- 189
Wiggans, R.G. 1939. The influence of space and arrangement on the production of soybean plants. Journal Amer. Soc. of Agron. Vol.31, No.4, pp.314-321. Geneva, N.Y.
- 190
Wolfert, J.S. and P. Albersheim. 1976. Host-symbiont interactions. I. The lectins of legumes interact with the O-antigen-containing lipopolysaccharides of their symbiont rhizobia. Bioch. Bioph. Res. Comm. 70:729-37
- 191
Zaffanella, M.J.R. 1956: Técnicas rápidas para el análisis de suelo. Revista de Investigaciones Agrícolas No.1.
- 192
Zaffanella, J.J.: Técnicas rápidas para el análisis de suelos. Rev. Inv. Agr. 10 (2) o Inst. Suelos Agrot. Publ. 46, Buenos Aires 1956
- 193
Zeni, E., La importancia del cultivo de la soja en el futuro agrícola argentino. Informaciones sobre grasas y aceites (Bs.As.) 4 (5): 194-199, 1966.

ALGUNAS ABBREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO:

pO_2 = Presión parcial de oxígeno

pH_2O = Presión parcial del agua

DO_{625} ó DO = Densidad óptica de la solución, medida a 625 nanómetros

h^{-1} = Unidad de la vel. especif. máxima de crecimiento, expresada en horas a la menos uno (o sea inverso de horas)

EV = Esterilizado por Vapor

MO = micorgermismo

Rh. = Rhizobium

Plantas "esterilizadas por vapor" o "no esterilizadas", significa que se trata de plantas provenientes de semillas inoculadas con un soporte que había o no sido esterilizado.

