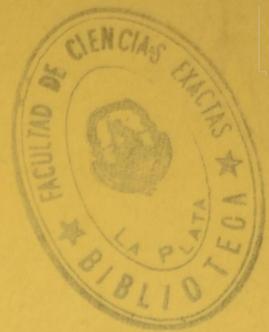


ORIGINAL
[Handwritten signature]

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



**Fijación Simbiótica de Nitrógeno:
Obtención y Evaluación de
Inoculantes para Phaseolus vulgaris**



José Luis Boiardi



TESIS
1984

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



DEX-56263

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



**Fijación Simbiótica de Nitrógeno:
Obtención y Evaluación de
Inoculantes para Phaseolus vulgaris**



*tesis
SEP*

José Luis Boiardi



TESIS FONACION

1984

6-7-99

1984

56.263

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Profesor Doctor Luis A. Mazza.

a mis padres

Mi reconocimiento:

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

A la Facultad de Ciencias Exactas de La Plata por permitirme el uso de sus equipos e instalaciones.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de sucesivas becas que permitieron la realización de estos estudios.

Mi agradecimiento:

Al Dr. Luis A. Mazza por su guía y estímulo permanente.

Al Instituto Biológico de la Provincia de Buenos Aires por permitirnos el uso de su bioterio, así como el cuidado de los animales.

Al personal de la Estación Experimental Salta (Cerrillos) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por la colaboración prestada para la realización de los ensayos a campo y por la discusión y análisis de los resultados obtenidos en los mismos.

Al Ing. Agr. Eliseo A. Arrarás por su colaboración en los ensayos agronómicos, ya sea en cámara de clima controlado o a campo.

Al Sr. Obdulio C. Gallego por su inestimable asistencia técnica, a la Sra. Diana M. Venturini por el trabajo dactilográfico, y al resto del personal del CINDEFI.

INDICE

	Página
1. <u>INTRODUCCION</u>	1
1.1. IMPORTANCIA DEL SISTEMA SIMBIOTICO RHIZOBIUM - LEGUMINOSAS.	3
1.2. CARACTERISTICAS TAXONOMICAS DE LOS SIMBIONTES.	5
1.2.1. La Planta	5
1.2.2. La Bacteria	5
1.3. INICIACION DE LAS INTERACCIONES ENTRE RHIZOBIUM Y LAS RAICES DE LAS LEGUMINOSAS.	6
1.3.1. Crecimiento de Rhizobium en la rizosfera.	6
1.3.2. Mecanismos de reconocimiento entre bacterias y superficie radicular.	7
1.3.3. Curvatura de los pelos radiculares.	8
1.3.4. Iniciación y desarrollo del hilo de infección.	8
1.3.5. Desarrollo del nódulo.	10
1.3.6. Fijación de Nitrógeno en el nódulo.	11
1.3.7. La Nitrogenasa.	11
1.3.8. Papel de la leg-hemoglobina en la fijación de Nitrógeno	13
1.4. ELABORACION DE INOCULANTES	14
1.4.1. Selección de cepas de Rhizobium: Criterios empleados.	14
1.4.2. Eficiencia de la fijación de Nitrógeno por cepas de Rhizobium y parámetros utilizados para su evaluación.	15
1.4.3. Poder competitivo específico y métodos empleados para su estudio.	18
1.4.4. Poder competitivo saprofítico y métodos empleados para su estudio.	20
1.4.5. Metodología empleada en la selección de cepas.	22
1.4.6. Producción de caldos de Rhizobium para la preparación de inoculantes.	23
1.4.7. Tipos y preparación de inoculantes.	24
2. <u>MICROORGANISMO</u>	30
2.1. REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS DEL GENERO RHIZOBIUM.	31
2.1.1. Fuentes de Carbono.	32
2.1.2. Fuentes nitrogenadas.	34
2.1.3. Requerimientos vitamínicos.	35
2.1.4. Requerimientos de elementos minerales.	36
2.1.5. Efecto del pH sobre el desarrollo celular.	37
2.1.6. Requerimientos de oxígeno.	37
2.2. CEPAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO	37
3. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	39
3.1. PRODUCCION DE CELULAS.	40
3.1.1. Sistemas de cultivo utilizados.	40
3.1.2. Esterilización.	45
3.1.3. Inóculos.	45
3.1.4. Mantenimiento de las cepas.	45
3.1.5. Medidas de la concentración celular.	47
3.1.6. Medidas del pH.	47
3.1.7. Medida de la velocidad de absorción de oxígeno (VAO)	47
3.1.8. Medida del porcentaje de Oxígeno disuelto.	47
3.1.9. Control de espuma.	48
3.1.10. Determinación de la presión osmótica	48
3.1.11. Medida del consumo de sacarosa.	48
3.1.12. Medida del consumo de nitrógeno	48

	Página
3.1.13. Control de contaminantes.	48
3.1.14. Porcentaje de O ₂ en gases.	48
3.1.15. Demanda de Oxígeno.	48
3.1.16. Consumo de Oxígeno.	48
3.2. ELABORACION Y ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA DE INOCULANTES PARA PHASEOLUS VULGARIS.	49
3.2.1. Microorganismo	49
3.2.2. Soporte.	49
3.2.3. Preparación de la turba.	49
3.2.4. Impregnación.	50
3.2.5. Conservación.	51
3.2.6. Recuentos.	52
3.2.7. Análisis de los resultados.	53
3.3. SELECCION DE CEPAS DE RHIZOBIUM PHASEOLI FRENTE A LA LEGUMINOSA HUESPED (Phaseolus vulgaris).	53
3.3.1. Cepas.	53
3.3.2. Semillas.	53
3.3.3. Esterilización de las semillas.	53
3.3.4. Obtención de las suspensiones de Rhizobium.	53
3.3.5. Obtención de los antisueros específicos.	53
3.3.6. Determinación serológica de las cepas formadoras de nódulos.	55
3.3.7. Peso seco.	55
3.3.8. Análisis de los resultados. EN CAMARA DE CLIMA CONTROLADO	55
3.3.9. Diseño de la experiencia.	55
3.3.10. Condiciones de trabajo.	56
3.3.11. Unidades experimentales.	56
3.3.12. Soporte.	56
3.3.13. Esterilización de las jarras.	56
3.3.14. Siembra.	56
3.3.15. Inoculación.	58
3.3.16. Riego.	58
3.3.17. Recolección de las plantas. A CAMPO	58
3.3.18. Diseño.	59
3.3.19. Unidades experimentales	59
3.3.20. Obtención de inoculantes.	60
3.3.21. Inoculación.	60
3.3.22. Siembra.	60
3.3.23. Aplicación del fertilizante.	60
3.3.24. Manejo cultural.	60
3.3.25. Recolección de las plantas.	60
3.3.26. Determinación de Nitrógeno.	61
3.4. INFLUENCIA DEL "ESTADO FISIOLÓGICO" DE LAS BACTERIAS EN LA FORMACION DE NODULOS.	61
3.4.1. Cepa.	61
3.4.2. Semillas.	61
3.4.3. Obtención de las suspensiones de Rhizobium.	61
3.4.4. Diseño de la experiencia.	62
3.4.5. Inoculación.	62
3.4.6. Agregado de antibiótico.	62
3.4.7. Recolección de las plantas.	62
3.4.8. Análisis de los resultados.	62

4. <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	63
4.1. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LA CEPA F 45 DE RHIZOBIUM PHASEOLI. BALANCE DE UN MEDIO DE CULTIVO.	64
4.1.1. Fuente de Carbono.	64
4.1.2. Factores de crecimiento.	64
4.1.3. Fuentes nitrogenadas	67
4.1.4. pH inicial: su efecto sobre la evolución del cultivo.	70
4.1.5. Diferentes relaciones de concentraciones de extracto de levadura y peptona.	71
4.1.6. Concentración inicial de microorganismos.	73
4.2. INFLUENCIA DE LA AERACION SOBRE EL CRECIMIENTO.	73
4.3. CRECIMIENTO EN CULTIVOS DISCONTINUOS ALIMENTADOS (FED BATCH)	78
4.3.1. Influencia de las concentraciones de nutrientes sobre el crecimiento.	78
4.3.2. Cultivos en sistema discontinuo alimentado.	83
4.4. OBTENCION DE RHIZOBIUM PHASEOLI EN SISTEMA CONTINUO.	87
4.4.1. Cultivos continuos empleando el medio balanceado en sistema discontinuo.	87
4.4.2. Balance del medio de cultivo en sistema continuo.	90
4.4.3. Utilización del medio de cultivo esterilizado por filtración.	93
4.4.4. Resultados obtenidos empleando el medio rebalanceado.	95
4.4.5. Comparación de los sistemas batch, fed-batch y continuo en la producción de células de Rhizobium phaseoli.	100
4.5. ELABORACION Y ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA DE INOCULANTES PARA PHASEOLUS VULGARIS.	100
4.6. SELECCION DE CEPAS DE RHIZOBIUM PHASEOLI FRENTE A LA LEGUMINOSA HUESPED.	110
4.6.1. Resultados obtenidos en cámara de clima controlado.	110
4.6.2. Resultados obtenidos en la primera experiencia a campo (Cerrillos, Salta).	113
4.6.3. Resultados obtenidos en el segundo experimento a campo (Cerrillos y Horcones, Salta)	116
4.7. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS EN LA FORMACION DE NODULOS.	120
4.7.1. Estudios previos.	121
4.7.2. Estudios de capacidad de nodulación utilizando células obtenidas de un cultivo continuo a diferentes velocidades de dilución.	123
5. <u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	127
5.1. BALANCE DE UN MEDIO DE CULTIVO Y PRODUCCION DE CELULAS EN SISTEMA BATCH.	128
5.2. PRODUCCION DE CELULAS EN SISTEMAS NO TRADICIONALES: DISCONTINUO ALIMENTADO (FED BATCH) Y CONTINUO (QUIMIOSTATO).	128
5.3. OBTENCION Y CONSERVACION DE INOCULANTES A BASE DE TURBA.	128
5.4. ESTUDIOS AGRONOMICOS, EN CAMARA CLIMATIZADA Y A CAMPO, DE SELECCION DE CEPAS.	129
5.5. INFLUENCIA DEL "ESTADO FISIOLOGICO" DE LAS BACTERIAS EN LA CAPACIDAD DE FORMACION DE NODULOS.	129
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	131

1. INTRODUCCION

El nitrógeno es componente de proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas esenciales para los seres vivos, constituyéndose en un elemento indispensable para la vida en el planeta. Se lo encuentra en los tres grandes compartimientos de la biosfera: suelos, mares y atmósfera, siendo en esta última donde se lo halla en mayor proporción. Entre estos tres compartimientos existe una interrelación entre los compuestos nitrogenados debido a procesos naturales que se los conoce en su conjunto como "ciclo del Nitrógeno". Cuando un ecosistema se encuentra en equilibrio, este ciclo, por sí solo, abastece al suelo del nitrógeno necesario para el desarrollo de los seres vivos. Este equilibrio se altera en la mayoría de las explotaciones agrícolas, donde gran cantidad del nitrógeno fijado no retorna al suelo, traduciéndose en un empobrecimiento del mismo en desmedro de los rendimientos, situación que se va agravando con las cosechas sucesivas y la aplicación de nuevas técnicas dirigidas a incrementar la producción por área. Por lo tanto, para mantener la fertilidad de los suelos, es necesario el aporte de nitrógeno mediante el uso de fertilizantes químicos. Una alternativa a este empleo es aumentar la fijación biológica de nitrógeno, que naturalmente es realizada por un grupo de microorganismos procariotas quienes poseen un sistema enzimático (la nitrogenasa) que cataliza la reducción del nitrógeno molecular a amonio, el cual es luego utilizado por diferentes rutas metabólicas y transferido a cadenas hidrocarbonadas para dar lugar a los compuestos que contienen este elemento. El principio en que se basa la práctica de fertilización mediante microorganismos es utilizar aquellos que normalmente llevan a cabo estas transformaciones, pero seleccionando los más capaces y de esta forma incrementar la producción vegetal y reducir el consumo de fertilizantes de elevado precio y, a largo plazo, contaminantes de los ecosistemas.

En el siguiente esquema se muestran las asociaciones simbióticas más importantes capaces de fijar nitrógeno atmosférico.

SISTEMAS SIMBIOTICOS

- Leguminosas con bacterias del género *Rhizobium*
- Arboles y arbustos (Angiospermas no leguminosas) con actinomicetes del género *Frankia*. (1)
- Gimnospermas con cianobacterias del género *Nostoc* (2)

- Helechos acuáticos del género Azolla con algas del género Anabaena⁽³⁾.

Es de hacer notar que existen otros sistemas de fijación biológica de nitrógeno donde no se presenta la organización del sistema simbiótico, tales como la Rizocoenosis existente entre pasturas tropicales y bacterias del género Azotobacter y Azospirillum, pero debido a las diferencias observadas entre ensayos "in vitro" y en su habitat natural estos sistemas han perdido en la actualidad confiabilidad como fertilizantes biológicos aunque se siguen realizando estudios con el objeto de que pueda ser explotada en el futuro la potencialidad de los mismos.

Tenemos además un gran número de microorganismos aerobios, facultativos y anaerobios capaces de fijar N_2 atmosférico en vida libre, pero la importancia cuantitativa de estos sistemas es escasa debido a su gran dependencia de sustratos carbonados en el suelo para poder llevar a cabo la fijación.

1.1. IMPORTANCIA DEL SISTEMA SIMBIOTICO RHIZOBIUM-LEGUMINOSAS

De lo expuesto surge que los sistemas simbióticos son los más eficientes en fijar nitrógeno y de entre ellos la asociación leguminosa-Rhizobium es tal vez la más importante debido a que la explotación agropecuaria de las leguminosas está distribuida en todo el mundo ya sea como forrajeras o fuentes de granos ricos en proteínas. Burris y Hardy⁽⁴⁾ sugieren la cantidad de 175 millones de toneladas de nitrógeno anuales fijados biológicamente y según Hardy y Havelka⁽⁵⁾ casi la mitad de esta cifra (alrededor de 80 millones de toneladas) corresponden a la fijación simbiótica Rhizobium-Leguminosas. La intercalación de las leguminosas bien noduladas en las rotaciones, o el empleo de éstas como abono verde permiten mantener un nivel adecuado de nitrógeno asimilable en el suelo.

La utilización tecnológica de este sistema simbiótico se realiza por medio de la práctica de la inoculación, que consiste en agregar a las semillas, o al suelo, en el momento de la siembra, una dosis de bacterias de la especie de Rhizobium específico para la leguminosa de que se trate. Los microorganismos pueden ser agregados en suspensiones líquidas (caldos de cultivo) o en polvos de materiales que sirven de soporte

a los mismos (inoculantes). Las cepas utilizadas deben reunir una serie de requisitos, siendo el más importante el de ser probadamente eficientes en la fijación de nitrógeno, y esta cualidad es conocida a través de adecuados estudios de selección de estirpes.

El éxito de la inoculación depende, entre otros factores, de la calidad del inoculante empleado, la que a su vez está relacionada con el número de células viables por unidad de peso o volumen de producto, con el tipo de cepa de *Rhizobium* utilizada, y con el comportamiento de la cepa utilizada en el ecosistema donde es implantada. Todos estos factores dependen de la posibilidad de obtener caldos de *Rhizobium*, por procesos fermentativos, con una aceptable riqueza en células viables, de una adecuada elaboración y conservación del inoculante obtenido, de la forma en que se realice la inoculación de las semillas y de utilizar las cepas recomendadas por los organismos pertinentes que sean probadamente eficaces en el área donde se va a utilizar ese inoculante. Para que lo mencionado anteriormente se cumpla es fundamental proceder a un control de los inoculantes que circulan en el mercado que no se limite sólo a medir la riqueza en células viables sino también que aconseje y/u obligue el uso de determinadas cepas de *Rhizobium* que hayan sido seleccionadas por los institutos de investigación que llevan a cabo este tipo de estudios.

Debido a lo expuesto surge el objetivo de este trabajo que consiste en un estudio de obtención, conservación y comportamiento de un inoculante para poroto (*Phaseolus vulgaris*). Dicho cultivo en nuestro país abarca una superficie de 230.000 hectáreas con una producción anual de 250.000 ton. siendo la provincia de Salta la mayor productora con el 60% del total⁽⁶⁾. El 70% de lo producido se exporta.

En este trabajo se estudian en primer término los requerimientos nutricionales de una cepa de *Rhizobium phaseoli* (F-45) a partir de los cuales surge un medio de cultivo con el que se realizan estudios de obtención de caldos, en tres sistemas diferentes, para la impregnación de soportes. Como tal se utilizó turba, que es el recomendado internacionalmente, y se estudian distintas variables que afectan la supervivencia de las bacterias en el mismo. Posteriormente se realiza un estudio de selección de cepas de *Rhizobium phaseoli*. Estos ensayos se cumplen en dos etapas: a) en cámara de

clima controlado como preselección, y b) a campo como estudio definitivo del comportamiento de los inoculantes en dos campañas agrícolas sucesivas. Por último se indican los primeros resultados sobre la influencia del "estado fisiológico" de la bacteria en la formación de nódulos utilizando, para este fin, células obtenidas en un sistema de cultivo continuo (quimios-tato) a diferentes velocidades específicas de crecimiento.

1.2. CARACTERISTICAS TAXONOMICAS DE LOS SIMBIONTES

1.2.1. La Planta.

Los miembros de la familia de las Leguminosas son los involucrados en la simbiosis con *Rhizobium*. Esta familia se encuentra dividida en tres subfamilias: Mimosoideae, Caesalpinoideae y Papilionoideae. A esta última pertenecen la mayoría de las tribus de interés económico.

La leguminosa usada en este trabajo pertenece a la tribu Phaseoleae y dentro de ésta al género *Phaseolus*. Este género comprende una gran cantidad de variedades y la "alubia" utilizada estaría comprendida en la variedad *compressus* DC⁽⁷⁾.

Si bien la simbiosis resulta de la asociación entre el *Rhizobium* y una leguminosa, ha sido informada la existencia de asociación simbiótica entre un *Rhizobium* sp y una no leguminosa que en principio se creyó que era *Trema aspera* pero estudios posteriores demostraron que era un miembro de las Ulmaceae denominada *Parasponia* sp (*Parasponia* y *Trema* fueron confundidas frecuentemente en el pasado)⁽⁸⁾. Este es el único caso conocido de simbiosis fijadora de Nitrógeno con *Rhizobium* donde el macrosimbionte es una no leguminosa.

1.2.2. La Bacteria.

El microorganismo que interviene en la simbiosis pertenece al género *Rhizobium*, que junto con el género *Agrobacterium* forman la familia Rhizobiaceae. Esta es una de las cinco familias en que el Manual Bergeys divide a los cocos y bacilos aerobios gram (-)⁽⁹⁾. Morfológicamente son bacilos, que miden entre 0,5-0,9 x 1,2-3 micrones, móviles en cultivos jóvenes. La observación microscópica por contraste de fases muestra la presencia de bandas cruzadas refringentes de poli-B-hidroxibutirato.

El género *Rhizobium* se divide en seis especies de acuerdo

a los vegetales más significativos que éstos pueden infectar (grupos de inoculación). Las especies son: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. lupini* y *R. japonicum*. En esta clasificación no se incluyen cepas consideradas promiscuas (que poseen un amplio rango de infección) tales como los grupos de inoculación de caupi y lotus. Esta clasificación es controvertida ya que se sabe que *Rhizobium* específicos para una determinada planta pueden diferir en sus propiedades morfológicas, inmunológicas y/o bioquímicas y por el contrario *Rhizobium* considerados de diferentes especies pueden tener características similares. Por tanto algunos autores consideran que dicha clasificación no es suficiente para dividir el género en seis especies y lo dividen en dos grupos de acuerdo a sus características culturales: a) de crecimiento rápido y b) de crecimiento lento. El primer grupo, constituido por *R. trifolii*, *R. meliloti*, *R. leguminosarum* y *R. phaseoli*, tienen un tiempo de generación entre 2 y 4 horas, tienden a acidificar el medio de cultivo y producen gran cantidad de goma en cultivos en medio líquido. Son móviles en cultivos jóvenes, debido a que poseen de 2 a 6 flagelos peritricos. El segundo grupo constituido por *R. lupini*, *R. japonicum* y *R. sp.* (Caupi), tienen un tiempo de generación entre 6 y 8 horas, alcalinizan el medio de cultivo, y producen menos goma que los del grupo de crecimiento rápido. Son móviles por la presencia de un flagelo polar o subpolar.

Las bacterias del género *Rhizobium* son aeróbicas, quimiorgánótroficas y la temperatura a la cual su desarrollo es óptimo está comprendida entre 28 y 30°C.

1.3. INICIACION DE LAS INTERACCIONES ENTRE RHIZOBIUM Y LAS RAICES DE LAS LEGUMINOSAS

1.3.1. Crecimiento de *Rhizobium* en la rizosfera.

El primer nivel de interacción entre la raíz y la bacteria ocurre en la rizosfera, donde se presenta una estimulación al desarrollo de los microorganismos. Este estímulo fue descrito por Nutman (12), quien propuso que "una leguminosa dada tiende a promover la multiplicación de las bacterias capaces de infectarla más que a las restantes". Este enunciado puede ser considerado como una teoría de "estimulación

específica" pero pocas experiencias corroboran esta afirmación (14). Actualmente se acepta que existe una estimulación selectiva pero no específica del desarrollo de *Rhizobium*, ya que diferentes especies de este género son estimuladas a crecer tanto por su leguminosa huésped como por macrosimbiontes a los que no pueden infectar (15). En base a los resultados informados hasta el momento Deverall (citado por Schmidt (14)) concluyó que no hay evidencia de un estímulo específico como un mecanismo diferencial de la interacción simbiótica. Recientemente Schmidt y col. (51) muestran evidencias de que para el caso de la simbiosis *R. phaseoli-Phaseolus vulgaris* no existe un estímulo rizosférico para el aumento de la población bacteriana, especialmente de los *Rhizobium* específicos.

Estudios recientes han demostrado que las respuestas del huésped a la inoculación con el *Rhizobium* tienen lugar en las primeras 2 a 4 horas siguientes a la misma. Además se ha informado que la planta exuda sustancias, todavía desconocidas, que producen modificaciones en la bacteria que favorecen una más rápida infección y nodulación (54).

1.3.2. Mecanismos de reconocimiento entre bacterias y superficie radicular.

El segundo paso en la interacción entre los simbioses es la adhesión del *Rhizobium* a la superficie radicular. El reconocimiento entre ellos es considerado como el evento inicial que resulta en una respuesta bioquímica, morfológica o fisiológica que sería responsable de la interacción específica microorganismo-planta. Existe en la actualidad evidencia experimental de que las lectinas (glucoproteínas vegetales) presentes en las raíces de las leguminosas serían las moléculas responsables del reconocimiento mutuo al actuar como un puente entre ambos simbioses. Además se postula que en este punto de las interacciones es donde se manifiesta la especificidad existente en los grupos de inoculación cruzada y por tanto estas moléculas serían las responsables del delicado mecanismo de reconocer los huéspedes específicos (16) (17). El rol de las lectinas fue propuesto ya en 1974 por Bohlool y Schmidt (18) al encontrar que las lectinas de la soja se combinaban específicamente con 22 de 25 cepas de *Rhizobium japonicum* y no se unieron con otras 23 de *Rhizobium* sp. incapaces de nodular esta leguminosa.

Si bien existen estudios con resultados contrarios a la teoría de las lectinas (19) (20) (21), en la actualidad se cuenta con una amplia bibliografía a su favor que se menciona en

los trabajos de revisión de Dart 1977⁽²²⁾; Schmidt 1979⁽¹⁴⁾; Broughton 1978⁽²³⁾ y Dazzo 1982⁽¹⁷⁾ entre otros. Según esta teoría, las lectinas, moléculas de tipo multivalente que se encuentran situadas en determinados sitios ("sitios de infección") del pelo radical, interaccionan a manera de un sistema inmunológico de antígeno-anticuerpo con determinantes de tipo lipopolisacáridos presentes en la pared de la bacteria⁽²⁴⁾ o con polisacáridos capsulares de la misma⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾. De esta forma se produciría la adhesión del *Rhizobium* a la raíz y esta unión siempre ocurre con el eje mayor de la bacteria perpendicular a la superficie de la rizoplana. Parecería que los determinantes capaces de unirse a las lectinas son de carácter transitorio y su presencia en la pared o cápsula bacteriana sería función del "estado fisiológico" de la bacteria⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾.

1.3.3. Curvatura de los pelos radicales.

La primera respuesta visible de la planta a la unión de la célula de *Rhizobium* es la deformación del pelo radical. Hay varias categorías de deformación⁽³⁰⁾⁽³¹⁾: deformación moderada, ramificación y deformación extrema. La primera de ellas no es específica y puede ser causada por *Rhizobium* heterólogos y también por filtrados del medio donde se desarrolla la bacteria. En la misma parecen intervenir hormonas de crecimiento sintetizadas por el microorganismo. La ramificación de los pelos radicales parece ser producida por un polipéptido pequeño (PM 5000). Este tipo de deformación, si bien es más específico que el primero, también suele ser observado en combinaciones no homólogas. El tercer tipo de deformación es producido únicamente por el *Rhizobium* homólogo y consiste en el torcimiento en 180 grados de la punta del pelo radical ("cayado de Pastor"). La sustancia que produce tal deformación parece estar unida a la superficie bacteriana⁽³⁰⁾.

1.3.4. Iniciación y desarrollo del hilo de infección.

Los "sitios de infección" no tienen la misma distribución en las raíces de diferentes leguminosas. Por ejemplo, en soja la infección tiene lugar en la base de la emergencia del pelo radical y en alfalfa y Caupi, la misma ocurre más frecuentemente en la zona de la raíz que está creciendo a mayor velo-

cidad⁽³¹⁾.

El mecanismo de entrada del *Rhizobium* es aún discutido. Se consideraba acertada la hipótesis de Nutman⁽³²⁾, quien decía que este proceso ocurría debido a una invaginación de la pared del pelo mediante un mecanismo no conocido, y esta invaginación originaría el "hilo de infección". Estudios posteriores de Nápoli y Hubbel⁽³³⁾ utilizando microscopía electrónica soportaban esta teoría, pero posteriormente nuevas investigaciones, que demostraron la producción por *Rhizobium* de enzimas capaces de hidrolizar polisacáridos⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾, hicieron reinvestigar este proceso y Callaham (citado por Hubbel⁽³⁶⁾) demostró, por nuevos estudios de microscopía electrónica, la evidencia de que las células de *Rhizobium* invaden los pelos radicales por penetración directa luego de degradar la pared celular. De esta forma reaparece la teoría de Fahraeus y Ljungren⁽³⁷⁾ de que las enzimas pectolíticas juegan un importante papel en el proceso de infección, pero estos autores proponían que las enzimas eran producidas por la planta como consecuencia de la inducción por *Rhizobium*.

Hubbell⁽³⁶⁾ en base a los resultados enunciados hasta el momento propuso una hipótesis que él denomina "de unificación" ya que comprende la idea de la unión por las lectinas⁽¹⁵⁾, la hipótesis de infección por enzimas pectolíticas (poligalacturonasa) de Fahraeus y Ljungren⁽³⁷⁾ y los estudios sobre enzimas extracelulares de *Rhizobium* (pectinasas, hemicelulasas y celulasas)⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾. Esta hipótesis comprende los siguientes puntos: a) Las lectinas de las células radicales son similares en estructura y/o función a las enzimas extracelulares de *Rhizobium*. A este sistema (lectinas y enzimas) lo denomina componente LE. b) El sistema LE puede ser inducible o constitutivo. c) La posibilidad de que se produzca la unión de las lectinas del macrosimbionte con la bacteria o las enzimas del microsimbionte con la raíz dependerá de la existencia del sustrato adecuado en cada uno de ellos o de una adecuada afinidad enzima-sustrato. La actividad hidrolítica puede o no ocurrir luego de la unión. d) El sistema LE podría ser pectolítico aunque no se descarta la posibilidad de que otras hidrolasas (celulasas, hemicelulasas, etc.) puedan estar incluidas. e) Los componentes de la pared celular de un simbiote que es reconocido por el otro (sistema tipo antígeno-

anticuerpo) pueden ser polisacáridos capsulares extracelulares, lipopolisacáridos, pectinas o cualquier componente de naturaleza polisacárida que esté asociado a la pared. Si bien esta hipótesis contempla la mayoría de los resultados experimentales logrados hasta el presente y es muy "tentadora", todavía faltan estudios que la aseveren y además es necesario hacer coincidir con ella otros resultados muy recientes como los de Abe et al.⁽³⁸⁾ quienes encontraron que un glucano cíclico compuesto por restos de glucosa con uniones B 1-2 y que se hallan en el espacio periplasmático de células de *Rhizobium trifolii* promueven la formación de nódulos. La presencia de este tipo de glucanos cíclicos en células de *Rhizobium* ya había sido informada⁽³⁹⁾ y también se había puesto de manifiesto la presencia en el espacio periplasmático de *Rhizobium* de sustancias de naturaleza glucídica que promueven la formación del "hilo de infección"⁽⁴⁰⁾.

El "hilo de infección" es una estructura tubular cuya superficie interna está formada por celulosa y se encuentra rodeado por la membrana plasmática de la célula huésped. Este tubo encapsula a las células de *Rhizobium*, las que se encuentran ordenadas linealmente extremo a extremo. Las bacterias en este estadio son similares a las observadas en los cultivos "in vitro" y presentan prominentes gránulos de poli B hidroxibutirato⁽⁵²⁾.

Al crecimiento del hilo lo preceden modificaciones en el tejido cortical de la raíz como son un incremento del tamaño de las células externas y mayor división de las células corticales internas. Probablemente debido a que el *Rhizobium* ha degradado la pared del hilo, las bacterias se ponen en contacto con la célula huésped y son liberadas en el interior de la misma⁽²²⁾. En este momento las bacterias son similares a las que se observan en el hilo de infección pero presentan la particularidad de estar envueltas por una membrana y además contienen menor cantidad de gránulos de Poli B hidroxibutirato. Cabe señalar que no todos los hilos de infección dan lugar a nódulos y que alrededor de 1 cada 70 hilos llegan a dicho estado.

1.3.5. Desarrollo del nódulo.

Las bacterias liberadas en el interior de las células vegetales son encerradas por estructuras membranosas producidas

por la planta y allí se multiplican activamente.

Las células vegetales invadidas detienen su crecimiento y se engrosan (alcanzando hasta 10 veces su tamaño original) debido a un gran incremento en el número de mitocondrias y plástidos. Estas células se encuentran rodeadas por otras no infectadas que pueden dividirse y ambas dan lugar al tejido central del nódulo que es donde se producirá la fijación de nitrógeno.

Las células corticales que comenzaron a multiplicarse activamente, como una consecuencia del canal de infección, darán lugar a tejidos no infectados que forman la corteza y los cordones vasculares por medio de los cuales el tejido central del nódulo se comunicará con el sistema vascular de la raíz.

De esta forma el tejido central maduro queda constituido por grandes células llenas de bacterias modificadas (bacteroides) observándose la presencia de leg hemoglobina y gránulos de almidón rodeando a los microorganismos, y células vegetales no infectadas^{(22) (41) (42)}.

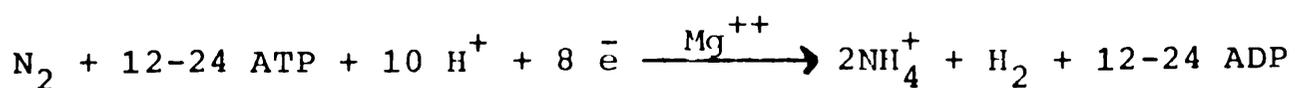
1.3.6. Fijación de Nitrógeno en el Nódulo.

La fisiología y bioquímica del proceso de fijación han sido muy estudiadas y existe gran cantidad de bibliografía de revisión entre la que podemos mencionar a Pate 1977⁽⁴⁵⁾, Bergersen 1975⁽⁴⁶⁾, Orme-Johnson 1977⁽⁴⁷⁾ y Evans et al. 1977⁽⁴⁸⁾.

Los procesos más importantes que tienen lugar durante la fijación de Nitrógeno atmosférico se muestran en la figura 1. En la misma están esquematizadas las relaciones existentes entre los bacteroides y la Nitrogenasa de los mismos con los diferentes compartimientos del vegetal como son el citoplasma de la célula huésped y los vasos del floema y xilema de la raíz de la planta, con los cuales se establece un activo intercambio de metabolitos.

1.3.7. La Nitrogenasa

Este sistema enzimático se encuentra presente en los bacteroides del nódulo y la reacción que cataliza se puede esquematizar de la siguiente manera:



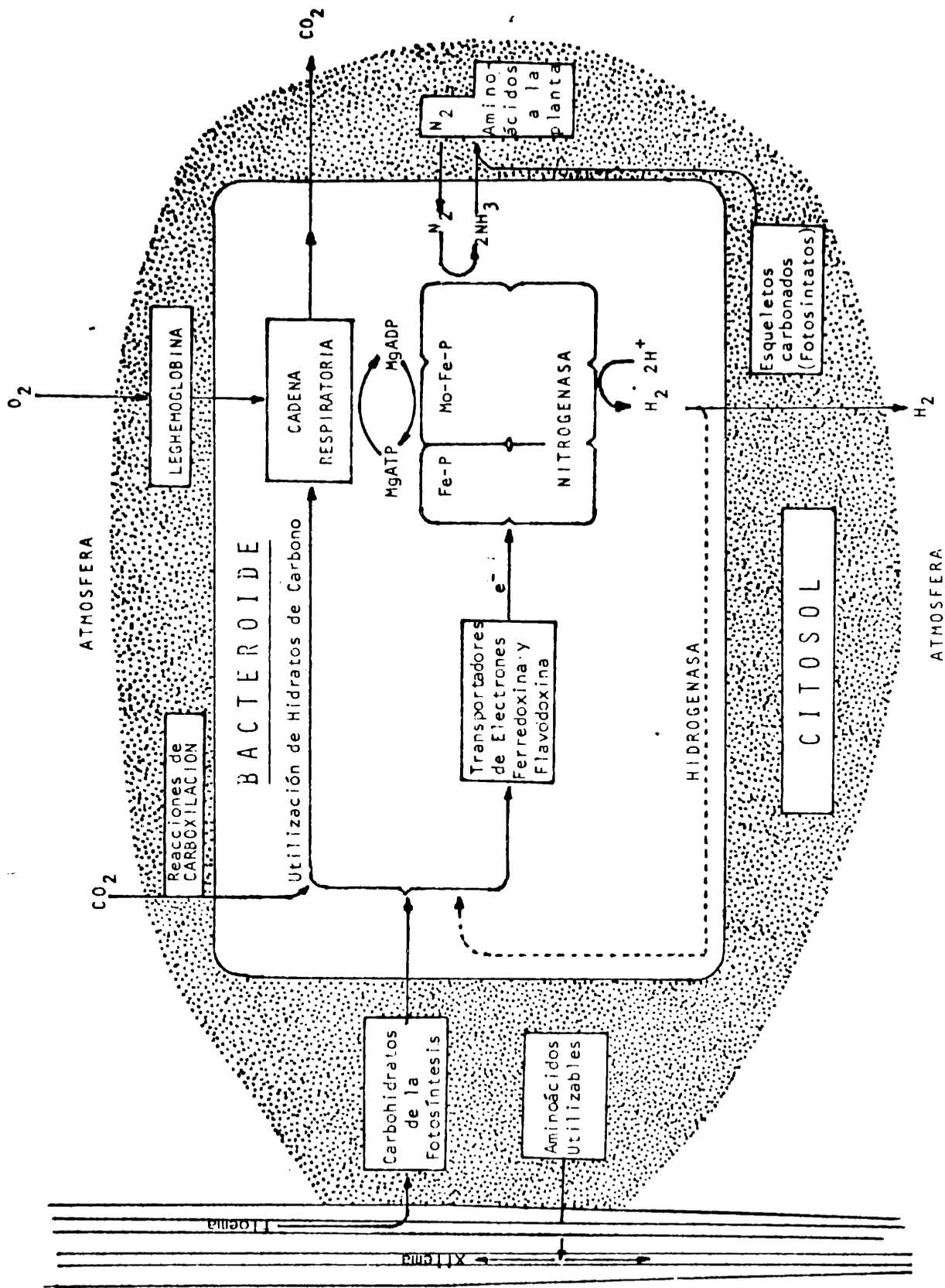


Figura 1

Esta ecuación nos muestra claramente que la fijación de Nitrógeno es un proceso caro energéticamente por la necesidad de un alto poder reductor y de energía bajo la forma de ATP.

La nitrogenasa es similar en todos los organismos fijadores de Nitrógeno y está constituida por dos tipos de proteínas:

1) La molibdo-ferro-proteína (Mo-Fe-Prot) llamada también dinitrogenasa y 2) la ferro-proteína (Fe-Prot) o dinitrogenasa-reductasa. Este segundo componente es muy sensible al O_2 .

El mecanismo de reacción se puede resumir de la siguiente manera: la energía del ATP y los electrones de los reductores modifican la conformación de la Fe-Prot y ésta adquiere un elevado poder reductor (-400 mV). Esta transfiere electrones a la Fe-Mo-Prot, la cual a su vez se los transfiere al N_2 reduciéndolo.

Además de N_2 este sistema enzimático puede llevar a cabo la reducción de otros sustratos, y entre ellos los iones H^+ . La reducción de H^+ a H_2 es llevada a cabo por esta enzima paralelamente a la reducción del N_2 y esto hace que se gaste entre 0 y 50% del poder reductor en la producción de H_2 , dependiendo este valor de la estirpe de Rhizobium de que se trate. Las cepas que no consumen electrones en esta reacción simultánea son las que poseen una hidrogenasa que es capaz de recuperar el poder reductor "desperdiciado" (47) (48).

1.3.8. Papel de la leg hemoglobina en la fijación de Nitrógeno.

Los preparados purificados de nitrogenasa son extremadamente sensibles al oxígeno y el proceso "in vivo" se realiza en microaerobiosis. Esta condición es lograda por la leg hemoglobina de los nódulos que regula la concentración de O_2 libre en la superficie del bacteroide. Estas hemoproteínas son el producto de la acción de ambos simbioses ya que el bacteroide biosintetiza el grupo hemo mientras que la proteína es sintetizada por la planta (49). La ubicación de la leghemoglobina en el nódulo aún es discutida pero se sabe que está fuera de los bacteroides y según Verma et al. (50) se encontraría en el citoplasma de la célula infectada.

1.4. ELABORACION DE INOCULANTES

La inoculación de las leguminosas es una práctica habitual en los países de agricultura bien desarrollada que se está expandiendo a los países menos desarrollados que realizan este tipo de cultivos. Es una técnica sumamente apropiada para un país en vías de desarrollo ya que las fuentes alternativas de nitrógeno, o bien obligan a una dependencia estrecha de países industrializados o a montar industrias sumamente costosas cuyo insumo fundamental es un recurso no renovable (los hidrocarburos).

La inoculación consiste en tratar las semillas de las leguminosas, o el suelo donde éstas van a ser implantadas, con bacterias del género *Rhizobium* de forma tal que se establezca la asociación simbiótica que permita al vegetal utilizar el nitrógeno atmosférico incorporándolo a esqueletos hidrocarbonados transformándolos en compuestos biológicos nitrogenados.

La elaboración de inoculantes comienza con la selección de las cepas de *Rhizobium* que serán luego incorporadas a los mismos.

1.4.1. Selección de cepas de *Rhizobium*: Criterios empleados.

Según Vincent⁽⁵⁵⁾ una cepa debe ser seleccionada por su capacidad de formar nódulos efectivos en un amplio espectro de huéspedes y condiciones ambientales. Si bien este criterio se sigue manteniendo en la actualidad hay una serie de otras exigencias para que una cepa pueda ser seleccionada de entre muchas y recomendada para la preparación de inoculantes.

En consecuencia los criterios más importantes son:⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾

1. La principal característica es que la cepa sea efectiva en la fijación de Nitrógeno en un amplio espectro de huéspedes y condiciones ambientales. Si no cumple este requisito no es necesario considerar los subsiguientes.
2. El poder competitivo específico, que se refiere a la competencia de las cepas de *Rhizobium* introducidas en el inoculante con las poblaciones de su misma especie ya existentes en ese suelo.
3. La competitividad saprofítica⁽⁵⁸⁾ que es una característica que les permite a las cepas de *Rhizobium* sobrevivir y multiplicarse en los suelos en presencia o no de la planta huésped.

Algunos autores utilizan el "poder competitivo" o "poder competitivo global" para referirse conjuntamente a las propiedades 2 y 3.

4. Características que se exigen en circunstancias especiales que pueden ser tomadas como criterios adicionales tales como: tolerancia a bajos o altos valores de pH y a pesticidas, capacidad de fijar nitrógeno aún en suelos con alto contenido de minerales de este elemento, mantener la capacidad de fijación de Nitrógeno en condiciones extremas de temperatura (bajas o altas), tener buena supervivencia en las semillas, etc..

5. Proporcionar buenos recuentos celulares en caldos y soportes para inoculantes.

Esta lista, a la luz de nuevos conocimientos en aspectos básicos de la simbiosis se irá ampliando y tal vez aparezcan criterios más definitorios respecto de la calidad de una cepa determinada respecto de su comportamiento frente a la leguminosa huésped. Tal cual fue mencionado en el ítem 1.3.7. del presente trabajo una nueva propiedad a ser exigida a una cepa con el fin de ser considerada adecuada para la inoculación es que posea un sistema de hidrogenasa (cepas hidrogenasa +) con el objeto de incrementar la eficiencia energética de la simbiosis. Ya se han informado métodos que permiten la determinación de este complejo enzimático en nódulos de leguminosas⁽⁵⁹⁾.

1.4.2. Eficiencia de la fijación de Nitrógeno por cepas de Rhizobium y parámetros utilizados para su evaluación.

El término "eficiencia" tiene muy poca validez si no se tiene en cuenta la leguminosa huésped, ya que si bien la capacidad de fijar nitrógeno depende de la constitución genética de la bacteria involucra también al genotipo de la planta y hay por tanto dos fuentes de variación (de la planta y de la bacteria) que deben ser tenidos en cuenta en un programa racional de selección de cepas. Por lo general el microbiólogo trabaja con un genotipo del huésped y diferentes estirpes de Rhizobium, pero lo más adecuado es una tarea de selección conjunta que de por resultado un sistema simbiótico y de hecho se han logrado excelentes resultados en estudios de esta índole tal como lo informado por Mc Ferson y col.⁽⁶⁰⁾ y los resultados obtenidos en el CIAT donde se han obtenido líneas de poroto con una capacidad fijadora 100% superior a las líneas originales.

La necesidad de la selección conjunta micro-macrosimbionte surge como consecuencia de las variaciones existentes en la especificidad de una cepa de *Rhizobium* frente a diferentes cultivares de la misma leguminosa. Se ha observado la influencia del genotipo de la planta huésped sobre la eficiencia en la fijación de Nitrógeno con diferentes cepas de la misma especie de *Rhizobium* para variedades de soja⁽⁶¹⁾⁽⁶²⁾, tréboles y alfalfa⁽⁵⁶⁾. Debido a estas variaciones de especificidad entre variedades de leguminosas y cepas de *Rhizobium* es que se critica el uso de los grupos de inoculación cruzada⁽⁶³⁾, concepto que se basa en clasificar a una determinada cepa de *Rhizobium* dentro de la especie definida por la leguminosa a la que pueden infectar.

Estas variaciones de especificidad dentro de los grupos de inoculación cruzada crean el dilema de qué tipo de inoculante se produce, dando tres alternativas⁽⁵⁷⁾:

1. Muchos inoculantes diferentes conteniendo cada uno cepas altamente efectivas dirigidos a un huésped particular.
2. Un solo inoculante con una cepa de amplio espectro cuyo comportamiento varíe de bueno a excelente frente a diferentes huéspedes.
3. Un solo inoculante conteniendo varias cepas siendo cada una de ellas la mejor para cada una de las especies recomendadas.

Estas tres alternativas crean el problema de decidir entre aspectos prácticos de la producción de inoculantes y comercialización de los mismos y aspectos científicos destinados a lograr el mejor material para el máximo aprovechamiento del sistema simbiótico. La opción 3 sería tal vez la menos viable debido a los posibles antagonismos y efectos competitivos entre cepas en los cultivos y la posibilidad de que la cepa menos efectiva para un determinado huésped sea la más competitiva en la formación de nódulos. La opción 2 sería la más conveniente desde el punto de vista del producto y en general es la utilizada por lo que continuamente se realizan estudios de selección de estirpes de forma tal de proveer el mejor material para la producción de inoculantes. En los países con mayor desarrollo en lo que se refiere a la inoculación de leguminosas, como es el caso de Australia, es también utilizada la opción 1. Sin embargo, crear límites tan definidos como las

opciones 1, 2 y 3 obligan a utilizar planes de trabajo largos y engorrosos o a superar problemas tecnológicos de producción. Es posible adoptar una actitud más flexible para lograr resultados en forma rápida si combinamos los distintos criterios. Por ejemplo la fabricación de un inoculante con 2 o 3 cepas de amplio espectro y altamente eficientes para las variedades vegetales más difundidas.

Respecto de los parámetros utilizados para medir la eficiencia de una cepa de *Rhizobium* frente a la leguminosa huésped podemos mencionar: peso total de la planta (seco o fresco), peso seco de parte aérea, Nitrógeno total, contenido en proteínas, rendimiento en granos, número de nódulos, peso de nódulos (seco o fresco), peso individual de nódulos, incorporación de ^{15}N , contenido de leg-hemoglobina y reducción de acetileno a etileno por las raíces noduladas. El uso del número y/o peso de nódulos, contenido de leghemoglobina e incluso la concentración de aminoácidos de los nódulos como parámetros relacionados con la eficiencia de una cepa de *Rhizobium* son controvertidos y existen resultados donde los mismos presentaron buena relación con la eficiencia de la cepa, mientras otros estudios informaron que no existe correspondencia entre estos datos y la eficiencia⁽⁶⁴⁾.

La medida de la reducción de acetileno a etileno fue un parámetro considerado a partir de su advenimiento como el más importante en la evaluación de la efectividad de una cepa⁽⁶⁵⁾. Estudios posteriores demostraron la gran variabilidad del método con factores tales como manipuleo y muestreo de los nódulos, conservación de los mismos antes de la incubación, instante del fotoperíodo donde las plantas son colectadas, intensidad de luz, temperatura de incubación, estado fisiológico de la planta, humedad del sistema radicular previo a la determinación, etc.⁽⁶⁶⁾⁽⁶⁷⁾. A pesar de estos resultados se ha trabajado mucho con este método y se lo ha perfeccionado y normalizado de forma tal que los valores obtenidos por diferentes autores sean comparables. De cualquier manera en la actualidad es considerado como una medida más y no el parámetro definitorio de la eficiencia de una cepa ya que es un valor para un momento determinado de la experiencia y no una estimación global de la misma. El método es muy útil para estudios bioquímicos y fisiológicos de la nitrogenasa. Los pará-

metros clásicos y más importantes que se tienen en cuenta para la evaluación de la eficiencia son: en primer lugar el contenido total de Nitrógeno de la planta nodulada (parte aérea) y luego el peso seco de parte aérea y rendimiento en granos⁽⁶⁸⁾. Estos 3 parámetros presentan un buen coeficiente de correlación aunque puede existir una pequeña desviación (en defecto) cuando se utiliza peso seco debido a la mayor acumulación de Nitrógeno en los tejidos de las plantas en que se ha establecido una adecuada simbiosis⁽⁶⁹⁾. Nuevamente debemos adoptar una actitud flexible, y evaluar no sólo un parámetro, sino un conjunto de ellos que involucren al huésped y a la nodulación para seleccionar las cepas con un criterio más racional. Otro método de gran utilidad para estudiar la eficiencia en la fijación de nitrógeno es la incorporación de ¹⁵N. El mismo ya fue utilizado por Raggio et al. en 1959⁽⁷⁰⁾, pero no es de gran difusión en la rutina de selección de cepas de Rhizobium debido a lo costoso del material requerido. Este método fue utilizado también para discriminar el porcentaje de nitrógeno fijado simbióticamente y el correspondiente tomado del suelo fertilizado con $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para este tipo de estudio se debe determinar conjuntamente el valor de Nitrógeno total del vegetal. Además se han realizado esfuerzos con el objeto de vincular parámetros fisiológicos o serológicos con la eficiencia de una cepa pero los mismos no han tenido éxito.

1.4.3. Poder competitivo específico y métodos empleados para su estudio.

La habilidad de una determinada cepa de Rhizobium para competir por los sitios de infección de la leguminosa huésped y formar un alto porcentaje de nódulos frente a otras cepas, es una característica importante de una buena estirpe. Este parámetro aislado puede ser considerado de poco valor ya que un alto porcentaje no implica una alta tasa de fijación de nitrógeno (eficiencia). Por tanto un alto valor de competitividad debe ser exigido a una cepa luego de demostrar la eficiencia de la misma.

Existe una vasta bibliografía que muestra diferencias en competitividad entre diferentes cepas de una misma especie de Rhizobium frente a la leguminosa que pueden infectar. Además

no hay correlación entre los parámetros eficiencia y competencia específica ya que por ejemplo se han informado resultados donde las cepas más eficientes forman mayor porcentaje de nódulos mientras que en otras publicaciones (más numerosas) se muestran resultados inversos⁽⁷²⁾⁽⁷³⁾⁽⁷⁴⁾⁽⁸⁰⁾.

Se han informado diferencias de competitividad entre cepas de *Rhizobium* frente a diferentes especies de leguminosas y variedades de las mismas. La bibliografía más abundante se refiere a soja donde se encuentran gran número de trabajos al respecto⁽⁷⁵⁾⁽⁷⁶⁾⁽⁷⁷⁾ pero también hay información sobre tréboles⁽⁷³⁾⁽⁷⁴⁾, alfalfa⁽⁷⁸⁾, porotos⁽⁷⁹⁾ y arvejas⁽⁸⁰⁾.

La competitividad entre cepas de *Rhizobium* en la formación de nódulos es afectada por diversos factores. Entre ellos podemos mencionar las condiciones ambientales ya que el porcentaje de nódulos formado por una cepa frente a otra/s depende de la época de siembra⁽⁸¹⁾, el pH del suelo⁽⁷³⁾, el tenor de nitrógeno del ambiente donde crece la planta (como se muestra en el presente trabajo) etc.. Además este valor varía con la introducción al inoculante de nuevas cepas y con la existencia de población natural o naturalizada en el sitio del ensayo. Hay evidencia de que es muy difícil para algunas leguminosas el éxito de la inoculación en suelos con una elevada población natural. Los estudios de Weaver y Frederick⁽⁸²⁾⁽⁸³⁾ demostraron que, para el caso particular de soja, en suelos con una población natural mayor a 10^3 *Rhizobium*/g de suelo seco las dosis de inoculante recomendadas por los fabricantes no lograban aumentar la nodulación y que para lograr un 50% de nódulos formados por las cepas introducidas la dosis de inoculación (por semilla) debía ser 1000 veces mayor que la población natural de *Rhizobium* (por g de suelo). Resultados similares fueron obtenidos para el caso de tréboles⁽⁸⁴⁾ donde la dosis de inoculante utilizada para formar un alto porcentaje de nódulos frente a las cepas nativas debió ser 4 veces superior a la recomendada por los fabricantes.

Respecto a los métodos utilizados para estudiar la competitividad específica, los más comunes son los serológicos. Clásicamente se utilizan los anticuerpos aglutinantes en base a la metodología propuesta por Vincent⁽⁸⁵⁾⁽⁸⁶⁾. Posteriormente fueron utilizados otros métodos serológicos y el más importante de ellos es la inmunofluorescencia introducida por Schmidt

y col. en 1968⁽⁸⁷⁾. También se han utilizado cepas que inducen la clorosis de la planta huésped⁽⁷⁵⁾ y últimamente se han propuesto nuevos métodos que utilizan la adición de antibióticos para inhibir el proceso de infección⁽⁸⁸⁾ o midiendo, durante las interacciones tempranas entre ambos simbioses, la adhesividad de las bacterias a la raíz⁽⁸⁹⁾⁽⁹⁰⁾.

1.4.4. Poder competitivo saprofítico y métodos empleados para su estudio.

Cuando se ha determinado que una cepa de *Rhizobium* es capaz de formar nódulos sobre un amplio espectro de variedades del huésped y que tiene un alto poder competitivo, entonces, sería deseable que esta cepa colonice el suelo donde es introducida, ya que es de esperar que si puede sobrevivir y competir con la flora presente forme nódulos eficientes cuando se implante el macrosimbionte específico en ese lugar. El éxito de la colonización por *Rhizobium* depende de un adecuado conocimiento de la triple interacción suelo-planta-bacteria. Los mecanismos por los cuales las cepas introducidas de *Rhizobium* en las semillas o en el suelo reducen considerablemente su número en función del tiempo y las razones por las que determinadas estirpes tienen la capacidad de sobrevivir no están aún aclaradas⁽⁹¹⁾⁽⁹²⁾.

La capacidad de un microorganismo de sobrevivir bajo condiciones de déficit de fuente hidrocarbonada es consecuencia de uno de estos 3 factores: a) la formación de estructuras de resistencia, b) mantenimiento de una muy baja tasa respiratoria endógena y c) acumulación de polímeros de reserva que pueden ser luego metabolizados⁽⁹³⁾. Las células de *Rhizobium* durante su crecimiento sintetizan poli B hidroxibutirato (PHB) formando gránulos que ocupan una gran proporción de la misma y además, la mayoría de las estirpes de *Rhizobium* sintetizan grandes cantidades de polisacáridos extracelulares (PE) que pueden servir como materiales de reserva endógenos⁽⁹⁴⁾. Según Chen y Alexander⁽⁹³⁾ la capacidad de sobrevivir de las bacterias del género *Rhizobium* no se debe al contenido de glicógeno de las mismas o a una baja tasa de respiración endógena. Estos autores demostraron que a mayor contenido de PHB mayor era la supervivencia y que las bacterias más resistentes presentaban una alta tasa de respiración endógena. Los autores sugieren que los microorganismos deben poseer más de un mecanismo de provisión de energía que les permita sobrevivir.

Patel y Gerson⁽⁹⁵⁾ estudiaron la formación y utilización de PHB y PE por *Rhizobium*. Su estudio demostró que en ausencia de fuentes hidrocarbonadas y nitrogenadas el PE producido por

las bacterias es transformado en PHB, pero en presencia de fuentes nitrogenadas el PE es utilizado como fuente hidrocarbonada para el desarrollo celular.

Aparte de los mecanismos propios que las células utilizan para sobrevivir existen factores externos a las mismas que afectan la supervivencia. A estos los podemos dividir en dos grandes grupos: 1) factores abióticos

2) factores bióticos

Entre los primeros encontramos los inherentes al ambiente como son: temperatura, aeración, pH, y disponibilidad de nutrientes. El pH tiene un efecto primario que es la concentración de H_3O^+ y un efecto secundario que es la disponibilidad de Calcio, Fósforo y Molibdeno y la toxicidad por Aluminio y Manganeso a valores extremos de pH^{(96) (97)}. Todos estos valores, apartados de los considerados normales, influyen negativamente sobre la supervivencia de las bacterias, pero se ha informado la existencia de cepas de Rhizobium tolerantes a valores anormales de estos elementos⁽⁹⁷⁾. Los factores bióticos están relacionados con la interacción de los Rhizobium con la flora y fauna presente en el suelo. La antibiosis, la predación y el parasitismo juegan un importante rol en la colonización del suelo o de la raíz de la planta huésped. Es sabido que miembros de los géneros Arthrobacter, Enterobacter y Micrococcus inhiben el desarrollo de Rhizobium. Además se ha visto el efecto antimicrobiano de especies de actinomicetes y a diversos protozoarios. La predación ejercida sobre los Rhizobium por Bdellovibrio ha sido informada también por diversos autores. Otros agentes biológicos que afectan la supervivencia en el suelo son los bacteriófagos y bacteriocinas producidas por las mismas cepas de Rhizobium^{(91) (99)}.

En virtud de la gran cantidad de factores que tienen incidencia sobre la competencia saprofítica se considera a esta propiedad como una característica específica del sitio donde la misma está siendo estudiada⁽⁹⁶⁾.

Los métodos utilizados para el estudio de la competencia saprofítica son de dos tipos, siendo los más utilizados los indirectos que se basan en la formación de nódulos en el huésped adecuado. Entre los métodos más difundidos merecen citarse la dilución de suelos y la subsiguiente inoculación en el huésped (número más probable) y serología de los nódulos.

Estos métodos presentan la desventaja de que se deben formar los nódulos antes de poder realizar la evaluación, lo que implica que se debe esperar un tiempo adecuado, además de la desventaja debida a la especificidad por el huésped y competencia entre cepas lo que afecta el porcentaje de nódulos formados por las distintas estirpes. Por este motivo una cepa de *Rhizobium* que está presente en alto número en el suelo puede ser subestimada como una consecuencia del método empleado para su evaluación.

Los métodos directos de estudios de supervivencia se basan en medir directamente la población en el suelo. Se han tratado de desarrollar medios de cultivo selectivos para *Rhizobium* con el objeto de realizar conteos directos por plaqueo, pero los mismos no han tenido éxito. Los más utilizados en consecuencia son la inmunofluorescencia y las cepas resistentes a antibióticos. Este último se utiliza como una situación de compromiso al no poder contar con un medio selectivo y además porque se ha demostrado que las cepas resistentes a uno o más antibióticos no pierden sus propiedades de infectividad y eficiencia (78) (100).

En cuanto a la inmunofluorescencia, la misma fue introducida por Schmidt y col. (87) y puede ser utilizada para estudios de competitividad específica y saprofítica (101).

1.4.5. Metodología empleada en la selección de cepas.

La evaluación de los parámetros antes descritos debe ser realizada en una serie de etapas. Lo recomendado por Date (56) es la utilización de dos o tres fases. La primera de ellas consiste en un estudio en cámara de clima controlado o en invernáculo donde se ensayan varias cepas seleccionando de entre ellas las más aptas en lo que se refiere a eficiencia y competitividad. Lo común en este tipo de ensayo es utilizar jarras Leonard (102) con arena, vermiculita o suelo. Luego se deben realizar experiencias a campo, con las cepas preseleccionadas en la etapa previa, a fin de estudiar eficiencia, competitividad específica y capacidad de persistir y colonizar el suelo. En una tercera etapa se estudiarán las características especiales que deben reunir las cepas para el caso particular del sitio donde se realice la selección, como ser: tolerancia a pH y pesticidas, supervivencia en la semilla, dosis

de inoculante a utilizar, etc.. Lo que este autor y otros⁽⁶⁹⁾ remarcan es la necesidad de que la selección de cepas tenga como fase última y definitiva la experimentación a campo ya que las etapas realizadas en condiciones controladas (cámara climatizada o invernadero) facilitan la tarea ya que se pueden utilizar un elevado número de cepas a preseleccionar pero no se deben extrapolar los resultados obtenidos a lo que va a ocurrir en las condiciones reales a campo. Este concepto es totalmente lógico en función de la gran cantidad de factores ambientales que afectan la eficiencia y competitividad específica y saprofítica como ya se ha descrito en los puntos anteriores.

1.4.6. Producción de caldos de Rhizobium para la preparación de inoculantes.

Para la obtención de caldos de Rhizobium la industria, en general, utiliza los medios de cultivo tradicionales descritos en la bibliografía tales como los de Wright (1925); Bond (1940) Van Schreven (1953) Date (1976) y Burton (1967)⁽¹⁰³⁾. Según lo indicado por este último autor, y por Subba Rao en un reciente trabajo⁽¹⁰⁴⁾, utilizando estos medios de cultivo se pueden obtener caldos de Rhizobium japonicum con una riqueza celular de 5×10^9 cel/ml en 96 horas de proceso con una fase lag de 48 horas y para el caso de Rhizobium meliloti idéntica concentración celular pero en un proceso de 72 horas con un período de retardo de 24 horas. Estas productividades informadas son muy bajas y es posible lograr recuentos celulares mayores de 1.10^{10} cel/ml en tiempos de proceso menores.

Para ello se deben tener en cuenta dos aspectos fundamentales: 1º Los medios de cultivos empleados, ya que es conocida la gran variación de requerimientos nutricionales entre cepas de la misma especie por tanto no es conveniente aconsejar un medio de cultivo universal para la producción de caldos de Rhizobium⁽¹⁰⁵⁾, y 2º la adecuación de parámetros de los procesos fermentativos como son: aeración, agitación, nivel de inóculo, pH inicial, etc.. Estudiando estos dos aspectos particularmente para cada cepa de Rhizobium a ser empleada en la industria se mejora notablemente la productividad de los procesos de obtención de caldos, como se demuestra claramente en una serie de publicaciones⁽¹⁰⁶⁾⁽¹⁰⁷⁾⁽¹⁰⁸⁾ y en el presente trabajo.

En el punto 2 se tratarán particularmente las diferencias entre especies y/o cepas de *Rhizobium* en cuanto a sus capacidades y necesidades metabólicas.

Para la producción de los caldos se parte de las cepas. Las mismas deberían ser provistas a los fabricantes por las instituciones que hacen selección de cepas según los criterios descritos en los puntos precedentes. En nuestro país esta tarea es desarrollada fundamentalmente por el INTA que cuenta con un completo cepario, como así también por diversas cátedras de Universidades nacionales y otros institutos de investigación. Las cepas deben ser conservadas y para ello los métodos más convenientes son: liofilización para períodos largos de tiempo o cultivos en medios agarizados mantenidos a bajas temperaturas (2-4°C) para períodos de hasta 6 meses. A partir de estos cultivos madre se realiza la multiplicación que llevará a obtener las suspensiones bacterianas a ser utilizadas en la impregnación de soportes. La práctica común consiste en pasar del medio agarizado a medios líquidos contenidos en frascos que se colocan en agitadores para su crecimiento. Estos cultivos son luego utilizados como inóculos para reactores de mayor capacidad. Se utilizan de diverso volumen dependiendo el mismo de la producción de la fábrica, llegándose a utilizar fermentadores de hasta 9000 litros. En estos casos los inóculos son cultivos en reactores más pequeños. El nivel de inóculo utilizado es variable yendo del 0,5 al 5% en volumen. Este parámetro es de gran importancia en cuanto a la duración del proceso debido a la naturaleza autocatalítica de la cinética de crecimiento microbiana.

Los reactores utilizados son los comunes de la industria fermentativa aunque, debido a que las bacterias del género *Rhizobium* no tienen grandes demandas de oxígeno, suelen utilizarse fermentadores sin agitación ya que la misma se realiza conjuntamente con la aeración. Los reactores tipo "air-lift" pueden ser utilizados con resultados similares a los obtenidos con los fermentadores tradicionales⁽¹⁰⁸⁾.

1.4.7. Tipos y preparación de inoculantes.

Existen distintas formas de presentación de los inoculantes. Entre ellas podemos mencionar:

a. Caldos de *Rhizobium*: estos inoculantes líquidos consisten en envasar directamente las suspensiones celulares obtenidas

según lo indicado en el punto anterior. Este tipo de inoculantes no son comunes en el mercado debido a varias razones: a) son sensibles a una rápida contaminación, b) deberían ser mantenidos y transportados a bajas temperaturas (4°C) y esto no es siempre posible, c) su período de vida útil es muy corto y d) una vez agregado sobre las semillas la supervivencia de las células de *Rhizobium* en las mismas es muy pobre. Por todo ello son usados casi únicamente en etapas experimentales.

b. Pasta de *Rhizobium* congelada: este tipo de inoculante es utilizado sólo en el sudeste de EE.UU. Consiste en un caldo de *Rhizobium* centrifugado que brinda una pasta con una concentración del orden de $1 \cdot 10^{12}$ cel/ml. Este producto se envasa y se le aplica un proceso rápido de congelamiento. Luego se lo transporta y comercializa en recipientes plásticos con hielo seco. De esta forma se evitan la mayoría de los problemas indicados para los inoculantes líquidos.

c. Cultivos liofilizados soportados en talco: Este tipo de inoculante es utilizado en Australia. Si bien permiten la supervivencia de las bacterias por largos períodos de tiempo no ocurre lo mismo una vez que han sido agregados a las semillas, y por ello no han tenido gran difusión.

d. Cultivos desecados en aceite: Este tipo de inoculantes fue introducido en Estados Unidos (US Patent N° 3.034.968). El procedimiento de obtención consiste en hacer una emulsión del caldo de cultivo en aceite vegetal o mineral. A esa suspensión se le hace pasar aire a temperaturas de hasta 73°C. De esta forma se desecan las células a un nivel de humedad del 1 al 10%. Luego las células se centrifugan o filtran y se las resuspende en aceite o se las mezcla con vermiculita finamente molida. Las suspensiones aceitosas por lo general contienen sales de Molibdeno como aditivo o algún fungicida. Los mezclados con vermiculita poseen una alta capacidad de adherencia a las semillas debido a la presencia del aceite que queda en el centrifugado o filtrado de bacterias.

Los resultados obtenidos con estos inoculantes no son claros y se encuentran en la bibliografía observaciones contradictorias.

e. Cultivos en frascos sobre medios agarizados: Este tipo de inoculantes consisten en cultivos en medios sólidos, tal cual los utilizados para conservar las cepas de *Rhizobium*.

Este producto tiene en la actualidad sólo una importancia histórica ya que en los inicios de la práctica de inoculación fueron muy empleados. Con el advenimiento de los inoculantes en polvo se dejaron de utilizar ya que presentaban una serie de inconvenientes, entre los que podemos mencionar: a) la desecación del medio de cultivo con la consecuente muerte de los microorganismos, b) las dificultades prácticas en el proceso de inoculación debidas a la dificultad de resuspender las bacterias y lograr una suspensión homogénea y c) la baja protección de las bacterias una vez mezcladas con las semillas. En la actualidad sólo son utilizados, como en el caso de los inoculantes líquidos, en etapas experimentales.

f. Inoculantes en polvo o granulados: Este tipo de inoculantes es el más difundido en todo el mundo. Su preparación consiste en mezclar caldos de *Rhizobium* con soportes adecuados. El soporte más utilizado y con mejores resultados es la turba. Otras sustancias que son y han sido usadas con éxito diverso son: carbón vegetal, lignito, suelos ricos en materia orgánica, bagazo de caña de azúcar, residuos de cereales, aserrín, tierras de infusorios, bentonita y otra gran cantidad de productos, incluso últimamente se han probado geles sintéticos, tales como los de poliacrilamida⁽¹⁰⁹⁾.

Hasta el momento no se han encontrado soportes que den los excelentes resultados obtenidos con la turba. Por ello y debido a que en este trabajo se ha utilizado este soporte es que veremos los pasos a seguir en la obtención de este tipo de inoculantes. El primer paso es la preparación del soporte. La turba debe ser secada hasta alrededor de un 10% de humedad final. Para ello se utilizan diferentes sistemas y el empleado en Estados Unidos por The Nitrogen Co. es tal vez el más adecuado, ya que además provoca una esterilización parcial del soporte. Consiste en hacer pasar a través de la turba aire a 650-700°C en forma instantánea. De esta forma no se produce carbonización del material y se obtiene el secado deseado. Otra forma de secar muy utilizada en los países subdesarrollados es por exposición directa al sol. Luego el material debe ser molido y para ello se utilizan por lo general molinos a martillo, aunque también pueden utilizarse molinos a bolas. El soporte molido se debe tamizar para recoger la fracción que interese. Para los inoculantes de semillas (en polvo)

se utilizan las fracciones finas, por lo general por debajo de tamiz 100, aunque son preferibles las de tamiz 200. En el caso de la obtención de inoculantes de suelos, se recogen las fracciones más gruesas (tamiz 20-50) por lo que a este producto se lo conoce como inoculante granulado. En el caso de que se deseen inoculantes estériles se debe proceder luego a la esterilización del material. Para ello se utilizan el vapor y el óxido de etileno, también las radiaciones gamma, pero en este caso, con el soporte ya colocado en el envase final del producto. Los inoculantes estériles son utilizados únicamente para mercados reducidos por la complejidad operativa que representa su preparación ya que deben ser impregnados unidad por unidad, lo que además lleva implícito un difícil control de calidad. De los métodos empleados, el tratamiento por radiaciones gamma es el más práctico, aunque las dosis utilizadas (5 megaradios) no logran la completa esterilidad del material y dosis mayores presentan efectos residuales sobre las bacterias probablemente debido a la formación de radicales libres. El tratamiento con óxido de etileno presenta resultados variables, principalmente debidos al posible efecto residual del gas, aunque el mismo puede ser superado con un correcto proceso post esterilización y dar excelentes resultados⁽¹¹⁰⁾. La esterilización por vapor da buenos resultados aunque es, tal vez, el proceso más engorroso desde el punto de vista tecnológico. Tanto en el secado como en la esterilización se debe tener cuidado de no producir la calcinación parcial de la turba ya que se modifica el material de forma tal que afecta la supervivencia de las bacterias.

Posteriormente la turba debe ser neutralizada ya que naturalmente este producto presenta valores de pH ácidos. Para ello se utilizan diferentes sustancias y la más utilizada es el carbonato de calcio. Este se agrega directamente al soporte o se hace una suspensión del mismo en el caldo de cultivo de forma tal de tener un pH final en el producto entre 6,5 y 7,0. Posteriormente se debe proceder a la impregnación del soporte con el caldo de cultivo. Se debe tener cuidado con la humedad de la turba antes de la impregnación, ya que si la misma está muy seca el calor de humectación producido puede ser de tal magnitud que extermine gran porcentaje de las bacterias del inóculo. Para evitar este fenómeno el soporte

debe tener una humedad residual del orden del 10%.

La forma de impregnación depende del tipo de producto y existen básicamente dos técnicas: 1) Conocida como "Método Europeo" que consiste en sembrar turba esterilizada, generalmente por vapor, con un caldo de Rhizobium y mantener la misma en condiciones de asepsia en cámaras de cultivo hasta que se alcance una concentración aproximada de 1.10^9 cel/g. Por tanto éste puede ser considerado un proceso de crecimiento en fase sólida y concluido el mismo el producto es envasado. Este tipo de proceso de obtención se realiza en algunos países europeos, Nueva Zelanda y parcialmente en Australia.

2) Conocida como "Método Americano", que consiste en mezclar la turba, por lo general no esterilizada, con caldos de Rhizobium de alta concentración de forma de tener un recuento inicial entre 3 y 10.10^8 cel/g. Posteriormente se hace una maduración del producto a granel durante una o dos semanas, período en el cual ocurre un proceso de multiplicación microbiana y luego se procede al envasado. Este método es el más difundido universalmente y es empleado por las grandes fábricas estadounidenses, brasileras e incluso por los fabricantes argentinos.

Podríamos mencionar un tercer tipo de impregnación que es el utilizado con soportes esterilizados por radiación gamma. En este caso como el soporte es esterilizado envasado se debe impregnar cada unidad. En este caso la concentración inicial de bacterias es baja, al igual que en el "Método Europeo", ocurriendo una fermentación en estado sólido dentro del envase.

En la impregnación se llega a una humedad entre el 35 y 45% para los inoculantes no estériles y hasta el 55-60% en los estériles..

Posteriormente el producto es envasado, aunque previamente es conveniente romper los grumos, formados durante la impregnación, pasando el inoculante por un molino. El envase en general es una bolsa de polietileno, usándose una película del mismo de baja densidad, con un espesor comprendido entre 38 y 55 micrones. Este film permite la difusión de oxígeno a través del mismo y evita la pérdida de agua que llevaría a la desecación del inoculante. Así se completa la producción y el

producto obtenido es conservado hasta su venta en cámaras frías (4°C). Si bien la conservación a estas temperaturas es aconsejable, el producto puede ser mantenido a temperatura ambiente siempre que ésta no llegue a valores extremos, por ejemplo superiores a 25-30°C como se verá en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo^{(57) (103) (104) (111) (112) (113) (114) (115)}.

2. MICROORGANISMOS

La fijación simbiótica de Nitrógeno por el sistema Rhizobium-leguminosas fue aprovechada en beneficio para el hombre mucho tiempo antes de que se descubrieran las bacterias y se conociera el proceso en sí mismo. Ya los agricultores romanos conocían que los cultivos de las leguminosas aumentaban la fertilidad de la tierra y sin saber el porqué ellos practicaban la inoculación artificial de los suelos llevando tierras de campos donde se había cultivado una determinada leguminosa a otros donde se iba a realizar la siembra de la misma.

El descubrimiento de la bacteria Rhizobium ocurrió en 1888 y fue realizado por dos investigadores alemanes: H. Hellriegel y H. Wilfarth. Poco tiempo después, a principios del actual siglo, se utilizaba la inoculación de los suelos con cultivos de Rhizobium como una práctica agrícola. Los cultivos de Rhizobium para su utilización como inoculante fueron en un principio en medios agarizados y luego se comenzaron a utilizar los medios líquidos. Ya en 1925 Wright informó un medio de cultivo para el crecimiento de Rhizobium, conocido como Medio N°79 de Fred y Waskman, aún de amplio uso⁽¹⁰³⁾.

Los conocimientos actuales sobre las necesidades nutritivas de las bacterias del género Rhizobium permiten el diseño de medios de cultivo que brinden altas concentraciones celulares con el objeto de obtener inoculantes de buena calidad en lo que se refiere a contenido en viables.

2.1. REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS DEL GENERO RHIZOBIUM

Tal como fue indicado ya en el punto 1.4.6. existen diferencias entre especies y/o cepas de Rhizobium en cuanto a sus necesidades nutricionales. Si bien este género no está incluido dentro del grupo de microorganismos denominados "fastidiosos" y crecen en los medios recomendados universalmente, existen grandes diferencias entre especies y/o cepas en lo que se refiere a concentración celular alcanzada en los caldos y tiempo de fermentación necesario para alcanzar esa riqueza celular. Estos aspectos son importantes desde el punto de vista tecnológico en lo relativo a costos de producción y diseño de una planta de fabricación de inoculantes. Veremos separadamente diferentes aspectos nutritivos del género Rhizobium:

2.1.1. Fuentes de Carbono.

Las bacterias de este género pueden utilizar una gran diversidad de fuentes hidrocarbonadas. Entre ellas podemos mencionar mono y disacáridos, polialcoholes y ácidos orgánicos y en menor medida oligo y polisacáridos. La capacidad de utilización de diferentes fuentes de carbono se muestra en el cuadro 1⁽¹¹⁶⁾, a partir del cual vemos que se pueden marcar ciertas diferencias generales entre los dos grupos de este género: los de crecimiento lento prefieren pentosas tales como xilosa y arabinosa y en general no pueden metabolizar sacarosa, ramnosa, trealosa y dulcitol, mientras que los de crecimiento rápido pueden utilizar la mayoría de los mono y disacáridos así como los polioles y ácidos orgánicos^{(57) (116) (117)}. Una fuente de carbono no mostrada en el cuadro 1 pero que puede ser utilizada en general por los dos grupos con buenos resultados es el glicerol⁽¹⁰⁶⁾.

Se debe tener en cuenta que la capacidad de las bacterias de utilizar un determinado carbohidrato depende en parte de la composición total del medio de cultivo ya que con diferentes medios basales puede cambiar el comportamiento de una cepa frente a una fuente de carbono⁽¹¹⁸⁾. Cuando se balancea un medio de cultivo para su uso industrial se debe tener en cuenta que para una determinada cepa que puede utilizar varias fuentes de carbono la velocidad de crecimiento no será la misma para todas ellas^{(106) (118)} y por tanto el diseño de un medio de cultivo debe partir de la elección de la fuente hidrocarbonada con la que el microorganismo crezca a mayor velocidad.

Las diferencias en velocidad y capacidad de utilización entre fuentes hidrocarbonadas son debidas a las rutas metabólicas seguidas en su catabolismo como así también el sitio de las mismas donde se inserta el sustrato en cuestión. Las especies de *Rhizobium* de crecimiento rápido presentan las enzimas de las vías de Embden-Meyerhoff-Parnas, fosfatos de pentosas y Entner-Doudoroff, aunque existe una deficiencia general en la presencia del enzima aldolasa (fructosa 1-6 difosfato aldolasa) de gran importancia en la primera de las rutas enunciadas. En los *Rhizobium* de crecimiento lento, debido a la ausencia del enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa, que vincula las rutas de los fosfatos de pentosa y Entner-

Cuadro N° 1

Utilización de fuente de carbono: % de cepas que responden a una fuente de carbono

FUENTE DE CARBONO / N° DE CEPAS	CAPACIDAD DE UTILIZACION				
	CRECIMIENTO RAPIDO		CRECIMIENTO LENTO		
	40 (I)	36 (II)	14 (III)	5 (IV)	36 (V)
GLUCOSA	100	67	70	60	70-89
GALACTOSA	100	72	79	60	67-92
FRUCTOSA	100	86	100	100	47-53
ARABINOSA	100	98	100	100	56-75
XYLOSA	100	92	100	80	23-36
RHAMNOSA	100	0	7	0	
MALTOSA	98	14	17	0	17-81
SUCROSA	100	0	0	0	0
LACTOSA	90	6	17	0	0-36
TREHALOSA	100	0	0	0	
RAFFINOSA	88	8	0	0	
MANITOL	93	80	79	60	58-69
DULCITOL	90	0	0	0	
FUMARATO	93	11	100	0	
MALATO	93	30	28	0	0
SUCCINATO	85	14	7	0	6-44
CITRATO	95	56	64	60	0
PIRUVATO	80	30	64	20	17

Datos correspondientes a:

(I) *R. trifolii* (16); *R. leguminosarum* (14); *R. phaseoli* (5);
R. meliloti (5).

(II) *R. cowpea*.

(III) *R. lupini*.

(IV) y (V) *R. japonicum*.

Doudoroff se crea una dependencia por esta última vía metabólica, aunque se debe tener en cuenta que la importancia relativa de las vías catabólicas seguidas depende de la constitución de la sustancia hidrocarbonada y de su inserción en las mismas⁽¹¹⁶⁾.

2.1.2. Fuentes nitrogenadas.

Las bacterias de este género en general pueden utilizar nitratos o sales de amonio e incluso en algunos casos nitritos como fuentes de Nitrógeno. En estos casos es necesario que el medio presente una apreciable capacidad buffer para que la captación selectiva de la fuente aniónica o catiónica no modifique el pH del medio de forma tal que pueda inhibir el crecimiento celular. Según De Hollander y colaboradores⁽¹¹⁹⁾ las cepas de *Rhizobium trifolii* no pueden utilizar fuentes de Nitrógeno inorgánicas a menos que se suplemente a los medios con fuentes nitrogenadas orgánicas. Estos autores concluyen, coincidiendo con la acepción general, que *Rhizobium trifolii* prefiere Nitrógeno orgánico y que sólo si esta fuente es insuficiente utilizan Nitrógeno inorgánico.

Los mejores desarrollos celulares se obtienen con fuentes nitrogenadas orgánicas complejas que a su vez son aportadoras de factores de crecimiento. Las fuentes a utilizar deben poseer un adecuado balance de aminoácidos y el que aparece como más importante es el ácido glutámico, aunque hay cepas que dependen de otros aminoácidos. Las fuentes que contienen apreciables concentraciones de glicina, cisteína y alanina y ciertas formas D de algunos aminoácidos son tóxicas y producen la aparición de formas aberrantes de bacterias o la inhibición del desarrollo celular. Este efecto puede ser superado por selección aumentando la concentración de estos aminoácidos progresivamente en los medios de cultivo, pero esta adaptación lleva consecuentemente a la pérdida de la capacidad simbiótica, especialmente en lo que se refiere a eficiencia en la fijación de Nitrógeno⁽¹¹⁶⁾.

Las fuentes nitrogenadas complejas que no presentan los problemas mencionados y que son universalmente utilizadas son el extracto y autolisado o agua de levaduras, aunque otros productos pueden suplir total o parcialmente a éstos con excelentes resultados, entre los que podemos mencionar agua de

macerado de maíz, hidrolizado de caseína, ciertas peptonas y otros subproductos industriales^{(116) (120)}.

2.1.3. Requerimientos vitamínicos.

Los requerimientos de factores de crecimiento tales como biotina y tiamina fueron informados en los inicios de los estudios sobre la microbiología del género *Rhizobium*⁽¹²¹⁾. El grupo constituido por *Rhizobium leguminosarum*, *trifolii* y *phaseoli* es el que más comunmente depende de la presencia de factores en los medios de cultivo para desarrollar. Biotina, tiamina y pantotenato de calcio individualmente o combinados son las vitaminas más comunmente requeridas por las cepas de este grupo^{(105) (122)}. También, aunque inusualmente, se encuentran dentro de este grupo estirpes que responden favorablemente al agregado de riboflavina, piridoxina o colina.

El grupo constituido por *Rhizobium meliloti*, *japonicum* y *lupini* en general no requiere el agregado de vitaminas y la biotina en algunos casos y el pantotenato de calcio en otros pueden ser indispensables para alguna cepa en particular.

Estos factores son provistos a los medios industriales con las fuentes nitrogenadas complejas ya mencionadas. El autolisado o agua de levaduras es la fuente que presenta la más alta concentración de biotina, pantotenato de calcio y tiamina mientras que el extracto de levaduras es rico en la primera de ellas pero es deficiente en las otras dos. Parece haber en las dos fuentes mencionadas algún factor aún desconocido que favorece el desarrollo de las bacterias de este género. Cuando se suplementan los medios de cultivo con estas fuentes se debe estudiar la concentración de las mismas a utilizar ya que por lo general un exceso de las mismas provoca la aparición de formas aberrantes o la inhibición del crecimiento. Este hecho probablemente sea debido a la concentración alcanzada de los aminoácidos inhibidores ya mencionados o a que éstos en general forman quelatos con cationes divalentes como Ca^{++} y Mg^{++} indispensables para la división celular. Una comprobación de esta última alternativa fue informada por Sherwood⁽¹²³⁾ quien superó este efecto inhibitor enriqueciendo a los medios con Ca^{++} ⁽¹¹⁶⁾.

2.1.4. Requerimientos de elementos minerales.

El género *Rhizobium* presenta los requerimientos generales de las bacterias gram negativas en lo que se refiere a Fósforo, Magnesio y Potasio. El Fósforo es aportado a los medios de cultivo en general bajo la forma de fosfatos solubles y representa alrededor del 1,5% del peso seco de la célula, pero este valor varía con la velocidad de crecimiento ya que es proporcional al contenido de RNA de las mismas. Se acepta que la relación Mg:K:RNA:P es de 1:4:5:8 para las bacterias gram negativas, siendo esta relación independiente de la velocidad de crecimiento⁽¹²⁴⁾. Además de estos requerimientos generales, el género *Rhizobium* tiene necesidades especiales y requiere en los medios la presencia de Fe, Ca, Mn, Zn y Co. En el cuadro 2 se indican las necesidades por estos elementos⁽¹¹⁷⁾.

Cuadro 2
Elementos minerales requeridos por *Rhizobium*

Elemento	Fe	Mg	Ca	Mg + Ca	Co	Zn	Mn	K
Requerimientos (mM)	0,005 a 0,2	0,1	0,025	0,5	1×10^{-5}	1×10^{-4} a 10^{-3}	1×10^{-4} a 10^{-2}	0,06

El Ca es un elemento que se ha demostrado tiene una importancia fundamental en la nutrición del género *Rhizobium*. El grupo de crecimiento rápido necesita relativamente más Ca que el de crecimiento lento. La deficiencia de este elemento en las células provoca la aparición de formas irregulares, lo que sugiere que este elemento juega un importante rol en la constitución de la pared celular. Esta deficiencia no puede ser suplida por Mg.

Las necesidades de Co se deben a que los *Rhizobium* llevan a cabo la síntesis de vitamina B-12.

La mayoría de los elementos trazas (Co, Zn, Mn, Fe), debido a la baja concentración en que son requeridos, son agregados a los medios de cultivo con el extracto y/o agua de levaduras ya que estas fuentes poseen cantidades apreciables de los mismos, que en general son suficientes para el normal desarrollo celular^{(116) (117)}.

2.1.5. Efecto del pH sobre el desarrollo celular.

Todas las cepas de *Rhizobium* estudiadas crecen en un rango de pH entre 5 y 7,5 y la tolerancia a valores extremos varía con la cepa. Generalmente cuando se trabaja con cepas de crecimiento rápido éstas bajan el pH marcadamente, por lo que es necesario que el medio de cultivo esté adecuadamente tamponado ya que de no ser así se puede llegar a valores de pH inferiores a 5 donde se produce la inhibición del crecimiento celular. Un aspecto particular a tener en cuenta respecto del pH es que cada cepa en particular crece a velocidad máxima en un estrecho rango del mismo, por lo que en el diseño de cultivos industriales se debe estudiar el pH inicial del medio de cultivo para obtener los menores tiempos de proceso.

2.1.6. Requerimientos de oxígeno.

La bibliografía muestra que los *Rhizobium* en general no son muy exigentes en cuanto a sus necesidades de oxígeno, aunque es común que respondan a un incremento en la aeración⁽¹¹⁶⁾. Se debe tener en cuenta que si bien estos microorganismos pueden crecer con suministros bajos de oxígeno, la demanda por este elemento será dependiente del medio de cultivo, ya que como se sabe, la fisiología de un cultivo microbiano es función de la composición cuali y cuantitativa del ambiente donde se están desarrollando las bacterias⁽¹²⁵⁾ y por tanto el consumo de oxígeno variará con el medio de cultivo empleado⁽¹²⁶⁾. En base a esto no se puede hablar de un determinado requerimiento de oxígeno como un parámetro metabólico fijo para un cierto microorganismo.

2.2. CEPAS UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO

Las estirpes bacterianas utilizadas para los estudios realizados fueron:

1. Cepa F 45 procedente del Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Castelar) con esa denominación y aislada de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculado con producto de origen norteamericano.
2. Cepa F 48 procedente del Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Castelar) con esa denominación y aislada de poroto (*Phaseolus vulgaris* L.) en la localidad de Timbolar (Tucumán).
3. Cepa 492 procedente del MIRCEN (Microbiological Resources

Center) Porto Alegre, Brasil, con esa denominación y seleccionada por su comportamiento frente a cultivares de poroto negro. (*Phaseolus vulgaris*L.)

4. Cepa 4012 procedente del MIRCEN (Microbiological Resources Center) Porto Alegre Brasil, con esa denominación y seleccionada por su comportamiento frente a cultivares de poroto negro (*Phaseolus vulgaris*L.).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. PRODUCCION DE CELULAS

3.1.1. Sistemas de cultivo utilizados.

- a. Los ensayos preliminares destinados al estudio de los requerimientos nutricionales, y efecto de la concentración de nutrientes sobre el crecimiento de la cepa en estudio, se realizaron utilizando como reactores frascos tipo erlenmeyers de 250 o 1000 ml de capacidad (según el caso) con una relación de volumen de medio de cultivo a volumen de frascos de 1: 5. Los frascos se colocaron en un agitador rotatorio de 2,5 cm de excentricidad y se agitaron a 200 rpm en cuarto estufa a 30°C. En todos los casos los tratamientos se realizaron por duplicado.
- b. Los estudios de condiciones de operación se llevaron a cabo empleando una unidad de fermentación New Brunswick integrada por 3 fermentadores de 7,5 l de capacidad, provista de accesorios para el control de temperatura, velocidad de agitación y caudal de aire. El volumen de medio empleado fue de 3 litros. En todos los casos los tratamientos se realizaron por duplicado. Las experiencias en esta escala se realizaron variando la velocidad de agitación (rpm) y manteniendo constante el caudal de aire en 1 l de aire/l de medio x minuto.
- c. Los ensayos de cultivo discontinuos alimentados (Fed Batch) fueron realizados en el equipo descrito en el punto 3.1.b. más los accesorios necesarios que se muestran en la Fig. 2. En dicha figura se detallan además las condiciones empleadas. El tipo de alimentación obtenido empleando el dispositivo indicado resultó lineal (127). Este tipo de alimentación se caracteriza por que la concentración de nutrientes que ingresan al fermentador aumenta linealmente en el tiempo. Este tipo de gradientes es utilizado en técnicas cromatográficas. Los dos reservorios (Rc y Rd) están conectados entre sí y a la atmósfera (vasos comunicantes), el primero (Rc) contiene medio de cultivo más concentrado que el segundo (Rd) el cual está agitado y conectado a una bomba que envía medio de cultivo al fermentador (127). A medida que la bomba envía medio del Rd al fermentador, pasa medio concentrado del reservorio Rc al Rd y de esta forma la concentración de nutrientes en Rd aumenta en el tiempo. Para que este

aumento sea lineal es necesario que no exista difusión entre los reservorios (concentración de nutrientes en $R_c = \text{constante}$), y que la densidad de ambas soluciones sea similar. El diseño de las experiencias se realizó de acuerdo al modelo matemático descrito por Mignone⁽¹²⁸⁾, en el cual ambos frascos son geoméricamente idénticos.

Las ecuaciones fundamentales del mismo son:

a. Concentración celular:

$$X = \frac{X_0 V_0 + YF \left(S_0 + \frac{V_0 K}{F} \right) t + Kt^2}{V_0 + Ft} \quad (1) \text{ para crecimiento res-} \\ \text{tricto.}$$

$$\text{y } X = \frac{X_0 e^{ut}}{V} \quad (1') \text{ para crecimiento irrestricto}$$

b. Volumen de cultivo:

$$V = V_0 + Ft \quad (2)$$

c. Concentración de sustrato limitante:

$$S = 0 \quad (3) \text{ para crecimiento restringido}$$

$$S = \frac{S_0 V_0}{V} + \frac{F}{V} \left(S_0 + \frac{V_0 K}{F} \right) + 2 Kt - \frac{XV - X_0 V_0}{Vy} \quad (3')$$

para crecimiento irrestricto.

d. El parámetro K se relaciona con los inherentes al cultivo según la ecuación:

$$K = \frac{u_0 X_0}{y} - \frac{FS_0}{V_0} \quad (4)$$

y con los relativos a las variables tecnológicas de la alimentación con las ecuaciones

$$S_{Do} = S_0 + \frac{V_0 K}{F} \quad (5)$$

$$S_c = S_{Do} + \frac{4 V_{OD} K}{F} \quad (6)$$

Por tanto el parámetro K está relacionado con el gradiente de alimentación: a mayor diferencia de concentración entre los reservorios mayor es K .

e. Diseño del cultivo discontinuo alimentado.

El diseño del cultivo discontinuo alimentado requiere el conocimiento de los siguientes parámetros: u_0 ; X_0 ; V_0 ; y ; S_0 los que se conocen a partir de experiencias previas en cultivos en sistema batch.

Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Se fija primero un valor de F y con los datos antes mencionados se calcula el valor de K (ec. (4)).
2. De acuerdo a las posibilidades del fermentador a utilizar se fija un valor de V_{OD} (el volumen total a adicionar es $2 V_{OD}$) y con éste y el valor de K anteriormente calculado se determina S_{DO} por la ecuación (5) y luego S_C por la (6). De este modo se puede estimar "a priori" la concentración en cada reservorio y obtener una alimentación apropiada con respecto a los requerimientos de nutrientes del cultivo.

Nomenclatura:

X = concentración celular (cél/l)

X_0 = concentración celular (cél/l) al inicio de la alimentación

y = rendimiento celular ($\frac{\text{cel. producidas}}{\text{gramo de sustrato consumido}}$)

F = caudal de alimentación ($\frac{l}{h}$)

S = concentración de sustrato limitante durante la alimentación (g/l)

S_0 = concentración de sustrato limitante al inicio de la alimentación (g/l)

V_0 = volumen del cultivo en etapa de batch (l)

t = tiempo de alimentación (min)

u = velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) durante la alimentación

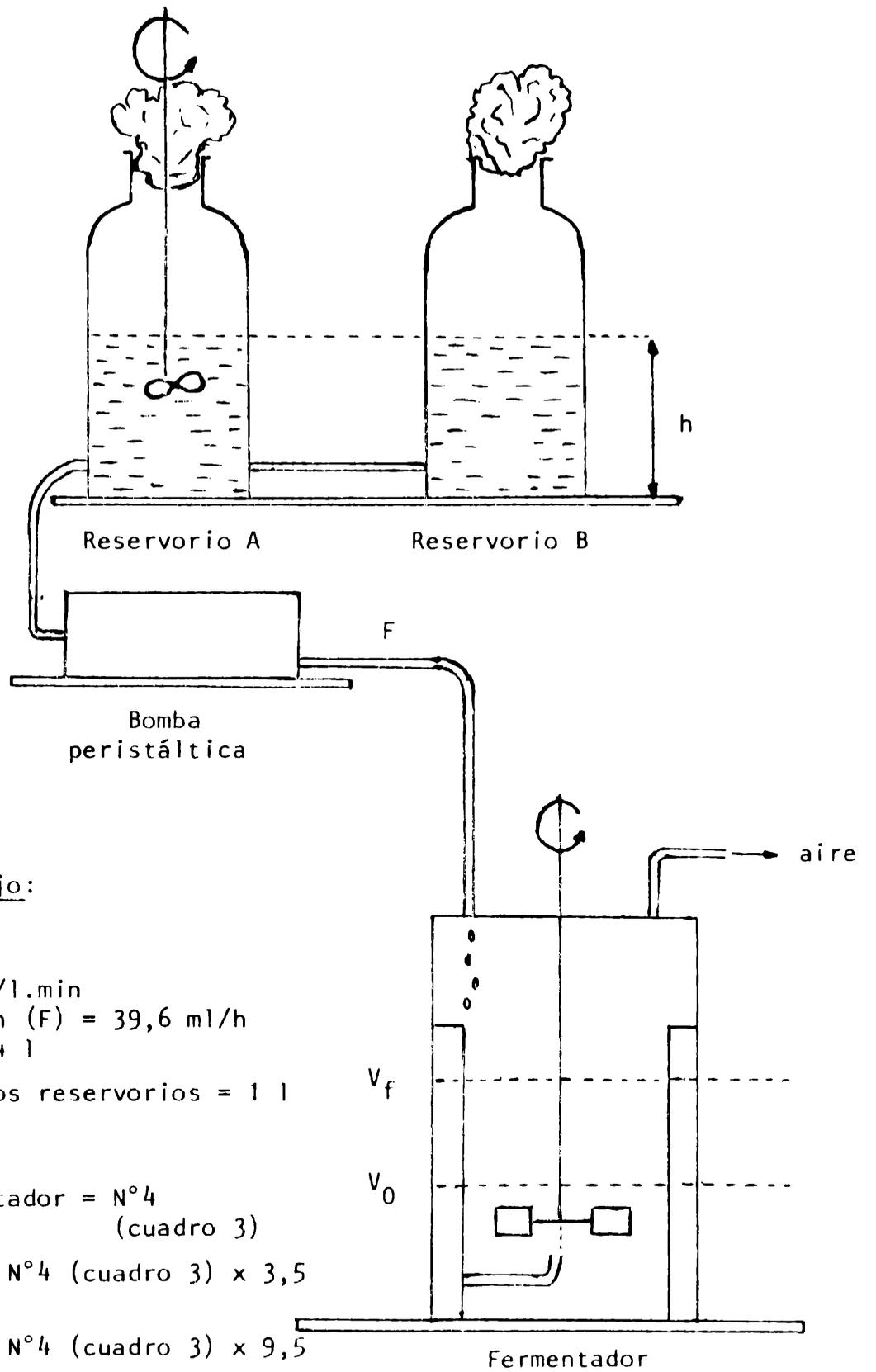
V = volumen del cultivo (l) durante la alimentación

u_0 = velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) que presenta el cultivo en el momento de inicio de la alimentación.

S_{DO} = concentración de sustrato limitante (g/l) en el reservorio diluido en el momento de iniciar la alimentación.

S_C = concentración de sustrato limitante (g/l) en todo instante

V_{OD} = volumen de medio en el reservorio diluido en el momento de iniciar la alimentación.



Condiciones de trabajo:

Temperatura = 30°C
 Agitación = 400 rpm
 Caudal de aire = 1 l/l.min
 Flujo de alimentación (F) = 39,6 ml/h
 $V_0 = 2 \text{ l}$ $V_f = 4 \text{ l}$
 Volumen inicial de los reservorios = 1 l

Medios de cultivo:

Inicial en el fermentador = N°4
 (cuadro 3)
 En el reservorio A = N°4 (cuadro 3) x 3,5
 En el Reservorio B = N°4 (cuadro 3) x 9,5

Figura 2. Equipo y condiciones utilizadas en los cultivos discontinuos alimentados (Fed Batch)

d. Cultivos continuos: Se realizaron experiencias utilizando una planta de fermentación LKB Bromma modelo 1001 ultroferm. La misma consta de los accesorios necesarios para la realización de este tipo de cultivos. En la figura 3 se muestra un esquema del equipo utilizado. El agregado de medio nutriente fresco al fermentador se realizó a través de una bomba peristáltica y el vaciado de caldo del fermentador por un tubo de rebalse de manera tal que el volumen del fermentador es constante en el tiempo. Se realizaron las experiencias con un volumen (V) de 3 l y se fue modificando el flujo de entrada (F) de medio nutriente de manera tal que la velocidad de dilución ($D = F / V$), que en este caso es igual a la velocidad específica de crecimiento (μ), se varió en un rango que fue desde un valor muy bajo hasta otro cercano al D crítico ($D \text{ crítico} \approx \mu \text{ máximo}$).

Para cada velocidad de dilución estudiada se dejó que el cultivo llegara a estado estacionario. El establecimiento del mismo se verificó por constancia en el tiempo de los siguientes parámetros = pH, recuento celular, porcentaje de O_2 disuelto, porcentaje de O_2 en los gases de salida del fermentador y concentración de la fuente hidrocarbonada (sacarosa). Los valores indicados en los cuadros de resultados son los obtenidos en cada estado estacionario mencionado.

En estas experiencias se utilizó una velocidad de agitación de 400 rpm y un caudal de aire de 0,3 l/l.min. La temperatura fue de 30°C.

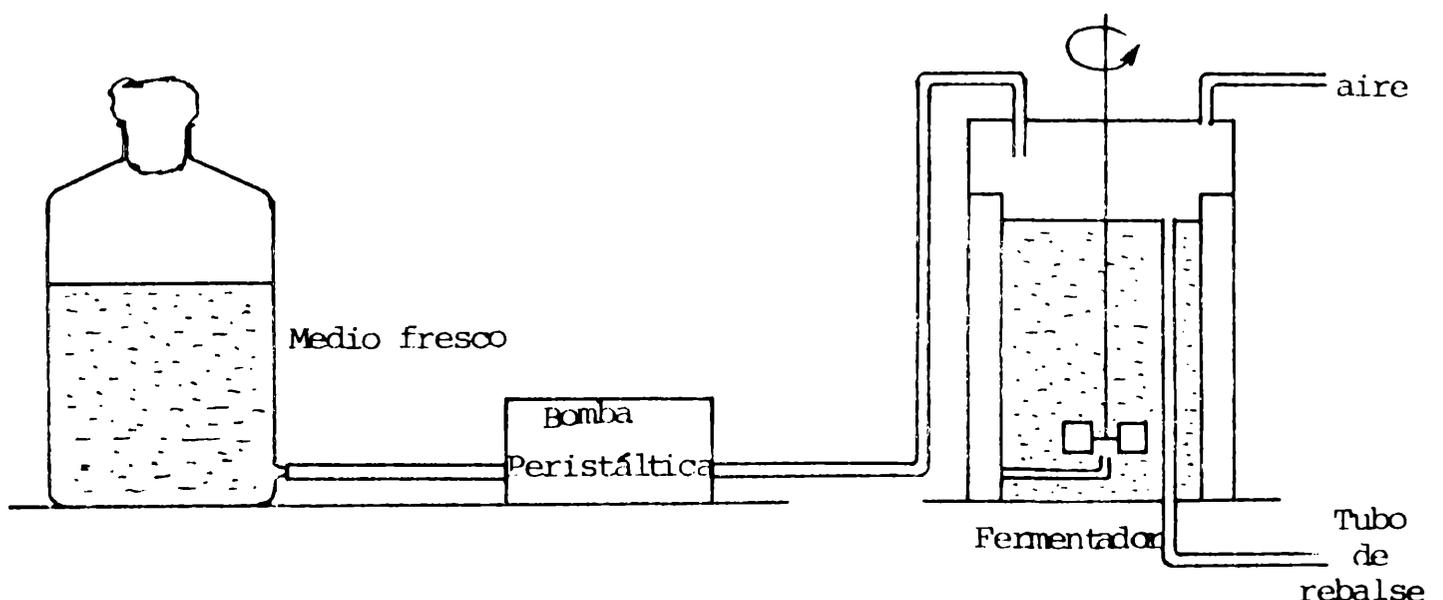


Fig. 3. Esquema del equipo utilizado para los cultivos continuos

3.1.2. Esterilización: Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos. En todos los casos la fuente de carbono fue esterilizada por separado y reconstituidos los medios antes de ser inoculados.

En el caso de las experiencias de cultivos discontinuos alimentados los medios contenidos en los reservorios no pudieron ser esterilizados en autoclave porque debido a su alta concentración se producían reacciones entre los componentes que conducían a la formación de precipitados. Estos medios completos fueron esterilizados por filtración utilizando una unidad filtrante Millipore equipada con un prefiltro y un filtro absoluto de 0,45 y 0,2 micrones de diámetro de poro respectivamente. El filtro completo fue esterilizado a 119°C durante una hora en autoclave. Las soluciones de vitaminas fueron esterilizadas por filtración a través de una membrana de 2,5 cm de diámetro y 0,2 u de tamaño de poro.

3.1.3. Inóculos:

Para la obtención de inóculos se partió de un cultivo en agar inclinado conservado en heladera (4°C) crecido en medio N°1 (cuadro 3). Con 3 ansadas de este cultivo se sembraron 50 ml del medio N°2 contenidos en erlenmeyers de 250 ml. (preinóculo) (cuadro 3). Los erlenmeyers sembrados se colocaron en agitador rotatorio en cuarto estufa a 30°C. El desarrollo así obtenido se utiliza para inocular frascos de 1000 ml conteniendo 200 ml del medio N°3 (salvo indicación en contrario). El desarrollo obtenido luego de la incubación de estos frascos en agitador rotatorio fue utilizado para la siembra de los fermentadores.

En todos los casos se transfirió el volumen necesario para lograr una concentración inicial de bacterias de $3 - 4 \times 10^8$ células/ml.

3.1.4. Mantenimiento de las cepas:

Las cepas empleadas fueron mantenidas liofilizadas para períodos largos de tiempo. A partir de los liofilizados se sembraron tubos con agar inclinado del medio N°1 (cuadro 3) y estos se conservaron en heladera (4°C). Este método de conservación fue empleado para períodos cortos de tiempo (6 meses) y a partir de ellos se sembraron los medios líquidos (inóculos).

Cuadro N°3

Composición de los medios de cultivo

Componente (g/l)	Medio N°1 Mantenimiento	Medio N°2 Inóculo	Medio N°3 Base	Medio N°4 Balanceado
Fuente de Carbono	--	--	10,0	--
Sacarosa	5,0	5,0	--	10,0
Ext. de Levadura *	1,0	1,0	1,0	2,0
Peptona **	--	--	--	1,0
PO ₄ HK ₂	0,5	0,75	0,75	0,75
PO ₄ H ₂ K	--	0,6	0,6	0,6
SO ₄ Mg.7H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1
FeCl ₃ 6H ₂ O (Sol.10%)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
MnSO ₄ (Sol. 10%)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Agar	14	--	--	--
Biotina (mg/l) (Merck)	--	0,2	--	--
CaCO ₃	3,0	--	--	--
pH	7,0	6,5	7,0	6,5

* Oxoid

** INORP (MC8)

3.1.5. Medidas de la concentración celular

a. Turbidimetría: La densidad óptica de las suspensiones bacterianas fue determinada utilizando un fotocolorímetro Turner "330" a 625 nm. Como diluyente se utilizó agua destilada. La dilución se realizó de manera tal que la densidad óptica leída estuviera comprendida entre 0,2 y 0,4 unidades de D.O.. El valor de biomasa se expresa en unidades de densidad óptica (UDO) que surge del producto de la DO leída por la dilución efectuada.

b. Recuento de microorganismos viables: El recuento de células viables se efectuó por el método de dilución en solución salina 0,85% del cultivo y siembra en cajas de Petri conteniendo el medio N°1 (cuadro 1). Las cajas fueron incubadas invertidas en cuarto estufa a 30°C. Se utilizaron 4 repeticiones por cada dilución a evaluar. Luego de un período de incubación adecuado se contaron las unidades formadoras de colonias (ufc).

c. Determinación del número de microorganismos totales: la misma fue efectuada sobre diluciones apropiadas de la suspensión celular en solución salina al 0,85% utilizando una cámara de recuento celular Petroff Hauser.

3.1.6. Medida de pH:

La misma fue efectuada utilizando un peachímetro Metrohm E. 396. B.

3.1.7. Medida de la velocidad de absorción de oxígeno (VAO):

El valor de VAO de los fermentadores con agitación mecánica se calculó en base al método de Cooper y colaboradores⁽¹²⁹⁾.

3.1.8. Medida del porcentaje de oxígeno disuelto: La misma fue efectuada utilizando un electrodo galvánico marca Biotec.

3.1.9. Control de espuma.

Se realizó por agregado del agente antiespumante marca DARMEX SAG (471) en solución acuosa al 5%. En las unidades de fermentación New Brunswick el agregado se realizó, cuando el cultivo así lo requería, en forma manual. En el caso de la unidad de fermentación LKB ésta viene equipada con un electrodo antiespuma, por lo que en las fermentaciones realizadas

en la misma (cultivos continuos) el agregado de antiespumante fue automático.

3.1.10. Determinación de la presión osmótica:

Las medidas fueron realizadas utilizando un osmómetro manual marca Fiske modelo G 66.

3.1.11. Medida del consumo de sacarosa:

Fueron efectuadas sobre los sobrenadantes de las suspensiones celulares centrifugadas empleando el método de Hyvarinen y Nikkila (130), previa hidrólisis con HCl 2,5 % v/v en baño María durante 10 minutos.

3.1.12. Medida del consumo de nitrógeno:

Las determinaciones fueron efectuadas sobre los sobrenadantes de suspensiones celulares centrifugadas por el método de micro Kjeldahl⁽¹³¹⁾. Antes de efectuar la digestión de las muestras se evaporó el H₂O por lo que la determinación se realizó sobre el extracto seco de los sobrenadantes.

3.1.13. Control de contaminantes:

Como control de asepsia de los cultivos se efectuaron observaciones microscópicas directas de preparados en contraste de fases.

3.1.14. El porcentaje de O₂ en los gases de entrada y salida del fermentador fue determinado utilizando un analizador de O₂ Beckman modelo OM.14.

3.1.15. Demanda de Oxígeno:

Fue determinada por el método directo⁽¹³²⁾ utilizando un respirómetro Gilson a presión constante.

3.1.16. Consumo de O₂:

El mismo se calculó en base a la siguiente expresión:⁽¹³³⁾

$$VCO = \frac{FN_2}{V} \left(\frac{p_{O_2 I}}{p - p_{O_2 I} - p_{C_2 I}} - \frac{p_{O_2}}{p - p_{O_2} - p_{C_2}} \right)$$

donde: VCO = velocidad de consumo de O₂ ($\frac{ml}{l \times h}$)

FN_2 = Caudal de gas inerte ($\frac{ml}{h}$)

p = presión total

V = volumen del cultivo (l)

po_1 = presión parcial de O_2 en el gas que ingresa al fermentador

pc_1 = presión parcial de CO_2 en el gas que ingresa al fermentador

po_2 = presión parcial de O_2 en el gas que sale del fermentador

pc_2 = presión parcial de CO_2 en el gas que sale del fermentador

No se incluye en la determinación de VCO la presión de vapor de agua porque los gases de salida del fermentador, antes de analizarlos, se hicieron pasar por silicagel con el objeto de secarlos y evitar interferencias en las determinaciones.

La presión parcial de O_2 en los gases de entrada y salida del fermentador se midió en un analizador Beckman modelo 0 M-14 mientras que la de CO_2 con un analizador infrarrojo marca Hilger SB1K₂.

3.2. ELABORACION Y ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA DE INOCULANTES PARA Phaseolus vulgaris.

3.2.1. Microorganismo: En estos estudios se utilizó la cepa F-45 de Rhizobium phaseoli de la colección del INTA Castelar.

3.2.2. Soporte: El soporte utilizado fue turba proveniente de Ushuaia (Tierra del Fuego).

3.2.3. Preparación de la turba. La turba para ser empleada como soporte debe ser sometida a una serie de operaciones para su acondicionamiento de acuerdo a lo indicado en el punto 1.4.7. del presente trabajo.

a. Secado: La turba comercial contiene alrededor de 50% de humedad; para proceder a su molienda es necesario secarla hasta un tenor de 10-12 % de humedad. El secado se realizó en estufa con circulación de aire a temperatura de 65°C.

b. Molienda. La turba fue molida en un molino a muelas (tipo molino de café).

c. Tamizado. El producto molido fue clasificado por tamaño de partícula. Para ello se lo tamizó a través de una serie de tamices (N°30, 50, 100 y 200). Los mismos fueron colocados en un vibrador para facilitar la operación. Las fracciones recogidas fueron: 1) Partículas que pasan el tamiz N°30 y

y retenidas por el N°50 con un diámetro mínimo de partícula de 400 micrones y 2) Partículas que pasan el tamiz 200, con un diámetro máximo de partícula de 70 micrones. Ambas fracciones fueron utilizadas para preparar inoculantes. La fracción 1) sirvió para obtener inoculantes tipo granulado que se aplica directamente al suelo (TAMI 2) y la 2) para inoculante tradicional o en polvo que se aplica a la semilla (TAMI 1).

d. Neutralización. Debido a que el pH de la turba es alrededor de 3, es necesaria su neutralización. Ambas fracciones fueron llevadas a pH comprendidos entre 6,5 y 7 por agregado de 10% p/p de Carbonato de Calcio en polvo.

e. Humectación. Para evitar (durante la etapa de impregnación) la muerte de las bacterias por el calor liberado en la humectación de la turba se elevó el tenor de humedad al valor del 10% con H₂O destilada.

f. Envasado. El material soporte (turba), preparado en la forma indicada, fue envasado (cada fracción por separado) en bolsas de polietileno de 50 micrones de espesor a razón de 75 g de material por unidad y finalmente cerradas (selladas por calor).

g. Esterilización. Las bolsas conteniendo el material soporte fueron esterilizadas con radiaciones gamma en la Comisión Nacional de Energía Atómica (Ezeiza). La dosis empleada fue de 5 Mrad. El producto obtenido si bien no resulta totalmente estéril presenta muy baja contaminación residual.

3.2.4. Impregnación.

a. Preparación de las suspensiones bacterianas: Los desarrollos bacterianos utilizados en la impregnación del material soporte fueron obtenidos en erlenmeyers de 1.000 ml, conteniendo 200 ml del medio N°4 (Cuadro 3) en agitador rotatorio y a la temperatura de 30°C. Se realizaron cuatro tratamientos para cada una de las fracciones de turba.

1. Bacterias centrifugadas y resuspendidas en las sales del medio N°4 (Cuadro 3) (MEDI 1).

2. Bacterias centrifugadas y resuspendidas en medio completo (N°4 cuadro 3) (MEDI 2).

Y dos concentraciones celulares para cada una de las suspensiones descriptas.

3. Concentración celular de 4×10^8 cel/ml (CONC 1).

4. Concentración celular de 80×10^8 cel/ml (CONC 2).

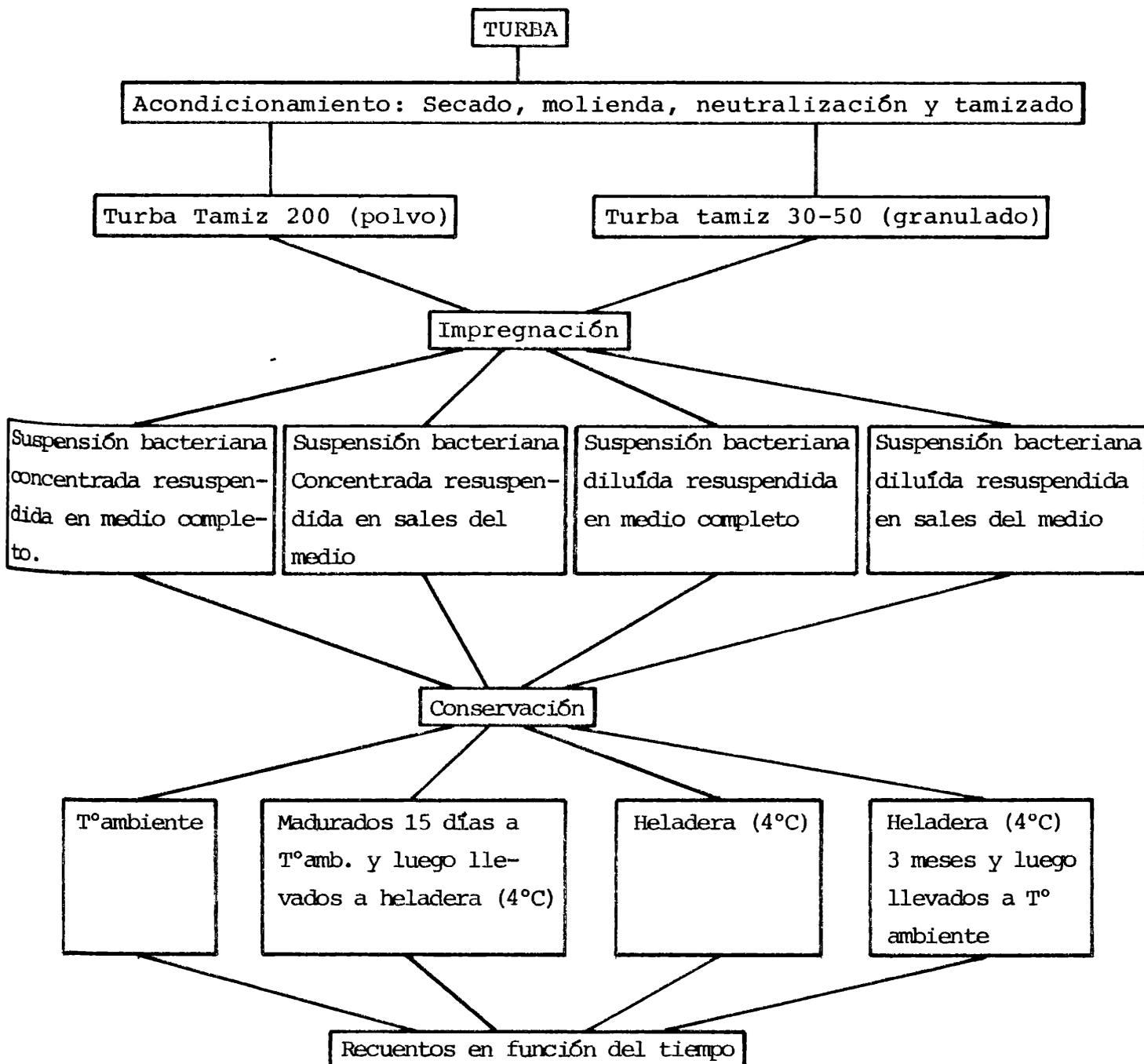
b. Con cada una de las suspensiones celulares descritas se impregnaron con jeringa 16 bolsas conteniendo turba estéril (8 de cada granulometría del soporte). Se inyectaron 75 ml en cada unidad obteniéndose 55% p/p de humedad en el producto terminado.

3.2.5. Conservación. El inoculante así obtenido fue sometido a 4 tratamientos diferentes de conservación:

1. Maduración (temperatura ambiente) durante 10 días y posterior conservación en heladera a 4°C (ALMA 1).
2. Temperatura ambiente todo el tiempo de la experiencia (ALMA 2).
3. Conservación en heladera durante 3 meses y luego a temperatura ambiente el resto del tiempo que duró el ensayo (ALMA 3).
4. Conservación en heladera durante toda la experiencia (ALMA 4).

De esta forma la experiencia quedó constituida como un diseño factorial completo con 2 repeticiones de 5x4x2x2x2. Donde 5 indica los tiempos de la experiencia en que se realizaron las determinaciones; 4 las formas de conservación; 2 el nivel inicial de bacterias en el inoculante; 2 el tipo de medio donde fueron resuspendidas las bacterias, y 2 los tipos de turba (fino y granulado) utilizados.

Esquema de la experiencia



3.2.6. Recuentos.

Se realizaron recuentos de viables a lo largo de la experiencia a los siguientes tiempos, 0, 20, 50, 115, 190, 270 y 380 días.

Los recuentos fueron realizados tomando 10 g de cada una de las dos bolsas de cada tratamiento y se suspendieron por separado en 90 ml de solución salina 0,85%. Estas suspensiones

fueron colocadas 30 minutos en agitador rotatorio y a partir de las mismas se realizaron las diluciones necesarias en solución salina, con las que se sembraron 4 cajas de Petri conteniendo 15 ml del medio N°1 (Cuadro 3). Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias (ufc).

3.2.7. Análisis de los resultados:

Los resultados fueron sometidos al análisis de la variancia y determinación de las diferencias mínimas significativas entre medias por el test de Tuckey⁽¹³⁴⁾. Se utilizaron para el mismo los recuentos de los días 50, 115, 190, 270 y 380

3.3. SELECCIÓN DE CEPAS DE RHIZOBIUM PHASEOLI FRENTE A LA LEGUMINOSA HUESPED (Phaseolus vulgaris).

3.3.1. Cepas: Las cepas empleadas en estos ensayos fueron:

F-45 Proveniente del INTA Castelar

F-48 Proveniente del INTA Castelar

492 Proveniente del Mircen (Microbiological Resources Center)
Porto Alegre - Brasil

4012 Proveniente del Mircen (Microbiological Resources Center)
Porto Alegre Brasil.

3.3.2. Semillas: Las semillas de Phaseolus vulgaris, tipo blanco, variedad "alubia" fueron suministrados por la estación experimental del INTA de Cerrillos (Salta). Se empleó la selección "Cooperadora" de dicha variedad que es la más difundida en el Noroeste Argentina.

3.3.3. Esterilización de las semillas: Las semillas fueron esterilizadas en superficie por tratamiento con Hg Cl₂ 0,1 % p/v 1,5 minutos, pasaje por alcohol 96° y varios lavados posteriores con agua destilada estéril⁽¹⁰²⁾

3.3.4. Obtención de las suspensiones de Rhizobium: Estos fueron obtenidos como se indica en el punto 3.1.3.

3.3.5. Obtención de los antisueros específicos para cada una de las cepas: Suspensiones celulares de cada una de las cepas obtenidas como se indica en el punto 3.1.3. fueron centrifugadas y lavadas 2 veces con solución salina 0,85 % estéril. Se resuspendieron en el mismo diluyente hasta una concentración

de 1×10^9 cel/ml. Esta suspensión fue utilizada para inmunizar conejos. La inoculación se realizó en la vena marginal de la oreja. Se emplearon animales albinos, machos de 2,5 Kg de peso (2 conejos por cepa). El esquema de inmunización utilizado fue el propuesto por Schmidt y col.⁽⁸⁷⁾ que se muestra en el siguiente esquema.

Días	Inoculación (ml de suspensión de antígeno)
1	0,5
2	1,0
3	1,5
4, 5 y 6	descanso
7	1,5
8	2,0
9	2,5

Luego de 10 días se realizó punción cardíaca o extracción de vena marginal de la oreja para obtener entre 5 y 10 ml de sangre. Esta se dejó 1 h a 37°C (formación de coágulo) luego una noche en heladera (retracción del coágulo) y del sobrenadante se tomó suero para la determinación de su título. El método empleado para la determinación del título de los antisueros fue el propuesto por Vincent⁽¹⁰²⁾. Consiste en enfrentar 0,5 ml de diluciones crecientes del suero en solución fisiológica con 0,5 ml de la suspensión bacteriana (idéntica a la utilizada para inyectar los conejos) en baño termostático a 52°C. El tiempo de incubación depende de las concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo y varía entre 2 y 4 horas. En todos los casos se enfrentó 0,5 ml de solución fisiológica contra 0,5 ml de la suspensión bacteriana para tener un testigo de autoaglutinación. El título está dado por la inversa de la última dilución de antisuero que aglutina. Debido a que en todos los casos el título fue adecuado (superior a 800) no fue necesario dar una dosis de refuerzo por lo que se procedió a sacrificar a los animales.

Se realizó una sangría de los animales "a blanco" por la vena yugular. La sangre obtenida (120-150 ml por cada lote de 2 animales) se recolectó en frascos enjuagados con solución fisiológica para evitar hemólisis, luego se incubó 1 hora a 37°C, se lo dejó una noche en heladera, se cortó el coágulo y

se separó el sobrenadante, y se obtuvo el antisuero al que se le determinó el título. Los valores obtenidos fueron en todos los casos de 1800 a 3600. Estos antisueros fueron dispensados en ampollas de 2 ml conteniendo 1 ml del mismo y conservados en congelador a -14°C .

3.3.6. Determinación serológica de las cepas formadoras de los nódulos.

Esta determinación fue realizada sobre una suspensión obtenida por maceración de cada nódulo en 3 ml de solución fisiológica; 0,5 ml del sobrenadante de esta suspensión (previa decantación de los restos del nódulo) se enfrentaron con 0,5 ml de una dilución 1:25 de cada uno de los antisueros de las cepas empleadas en la experiencia. Los tubos conteniendo las soluciones de antígeno y anticuerpo se incubaron a 52°C durante 3 a 4 horas, luego de las cuales se leyeron los resultados. En todos los casos se incluyeron testigos de autoaglutinación. Se emplearon para su identificación 400 nódulos en la experiencia realizada en cámara de clima controlado y 300 nódulos en la experiencia a campo.

3.3.7. Peso seco:

El peso seco de la parte aérea y de los nódulos de las plantas fue realizado en estufa con muestras mantenidas a 65°C hasta peso constante.

3.3.8. Análisis de los resultados:

Se realizó un análisis de variancia y de diferencias mínimas significativas entre las medias por los tests de Tuckey y, o Duncan⁽¹³⁴⁾.

EXPERIENCIA EN CAMARA DE CLIMA CONTROLADO

3.3.9. Diseño de la experiencia:

Se realizó un diseño de tipo enteramente al azar con cinco repeticiones de los siguientes tratamientos.

1. Jarras inoculadas con la cepa F-45 (F45)
2. Jarras inoculadas con la cepa F-48 (F48)
3. Jarras inoculadas con la cepa 4012 (4012)
4. Jarras inoculadas con la cepa 492 (492)
5. Jarras inoculadas con la mezcla de cepas (Mezcla)

6. Jarras inoculadas con la mezcla de cepas + 50 partes por millón de KNO_3 (M + KNO_3)
7. Testigos. Jarras sin inocular (Testigo).

3.3.10. Condiciones de trabajo:

Los parámetros controlados fueron: T°diurna 28°C, T°nocturna 14°C y fotoperíodo 13,5 h. Estas condiciones fueron elegidas tomando como base las T°medias mínima y máxima promedio de los últimos 30 años de la zona de Salta donde posteriormente se realizaron las experiencias a campo (Datos suministrados por la Estación Experimental de Cerrillos del INTA). La humedad relativa del ambiente se mantuvo siempre superior a 60%. La luz fue suministrada por tubos tipo gro-lux pensylvania de 40 W.

3.3.11. Unidades experimentales:

Se utilizaron como unidades de experimentación Jarras Leonard modificadas ⁽¹⁰²⁾. Las mismas contenían aproximadamente 1 Kg. de soporte. En la figura 4 se muestra un esquema de estas unidades.

3.3.12. Soporte:

El soporte inerte elegido para llenar las jarras fue una mezcla de arena (95%) y carbón de leña (carbonilla) (5%). La arena utilizada fue la tipo oriental (o de Río) que es de grano grueso y antes de su uso fue tratada con HCl al 10% v/v durante 24 horas y luego lavada repetidas veces con H_2O . El agregado de carbón tiene por finalidad evitar la posible toxicidad por Manganeso de la arena debido a que este catión es adsorbido por el carbón.

3.3.13. Esterilización de las Jarras:

Las jarras conteniendo el soporte fueron esterilizadas durante 1 h. a 121°C y posteriormente secadas. Antes del tratamiento con vapor se hizo vacío dentro del autoclave de forma tal de lograr una adecuada penetración del mismo en el material contenido en las jarras.

3.3.14. Siembra:

Semillas estériles obtenidas según el punto 3.3.3 fueron pregerminadas en cajas de Petri en estufa a 30°C. Las plántulas obtenidas fueron sembradas a razón de 4 por maceta y raleadas posteriormente a 2. Cada jarra fue recubierta con papel de aluminio con el objeto de evitar la proliferación de algas en la parte

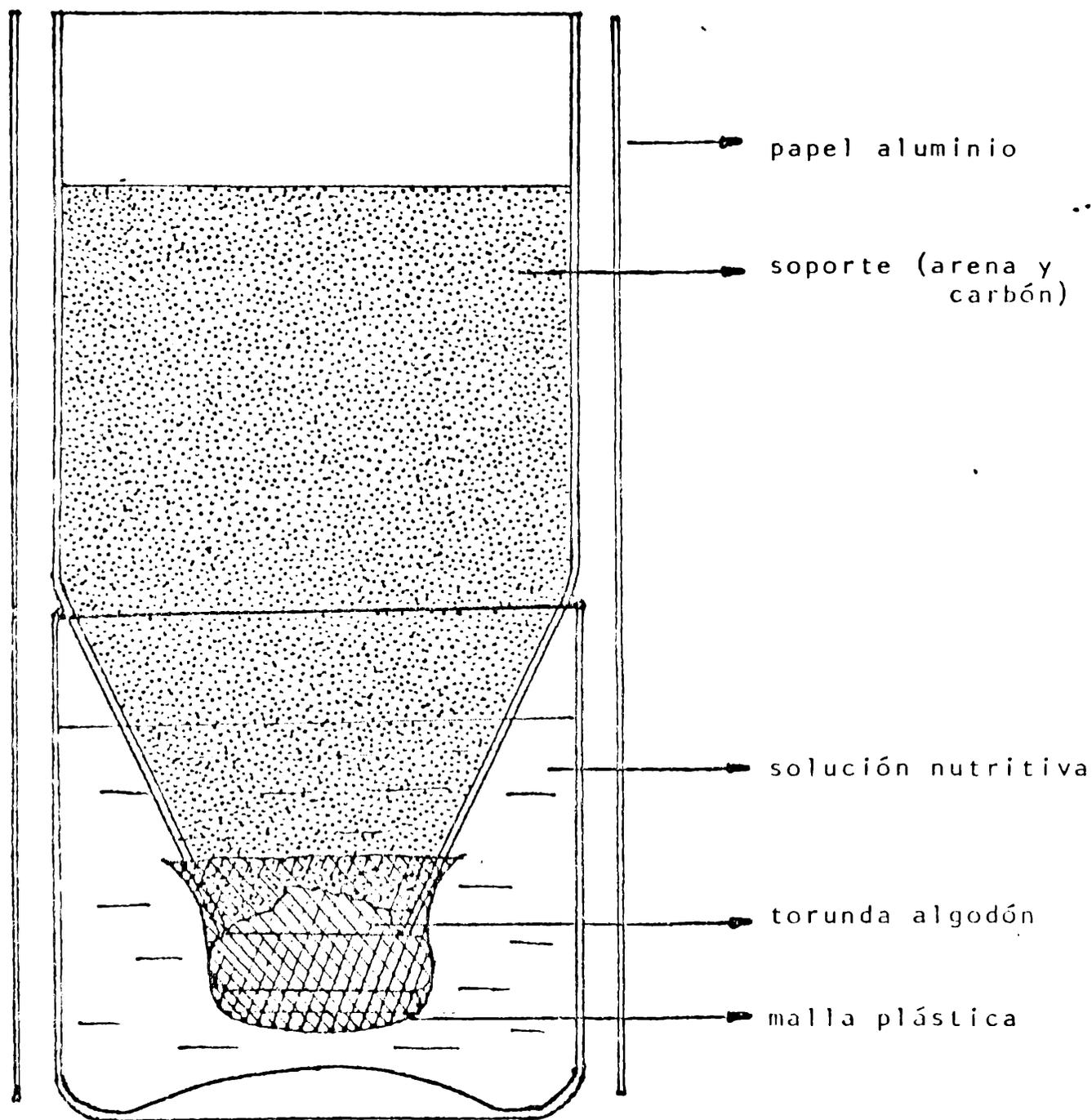


Figura 4. Esquema jarra Leonard.

inferior y para aumentar la cantidad de luz incidente sobre las hojas por reflexión.

3.3.15. Inoculación:

La inoculación de las raíces de las plantas fue efectuada en el momento de la siembra por agregado de 1 ml de una suspensión de bacterias. La misma fue obtenida según se indica en el punto 3.1.3., centrifugadas y resuspendidas hasta una concentración de 1×10^9 cel/ml. en solución salina. Esta última operación se realizó para evitar el agregado de nutrientes del medio de cultivo (no metabolizados por las bacterias) y que pudieran ser utilizados por las plantas.

En el caso de los tratamientos inoculados con mezcla de cepas, la suspensión utilizada (1 ml) fue obtenida por mezcla en partes iguales de las suspensiones de cada una de las estirpes individuales.

3.3.16. Riego:

Las macetas fueron regadas 2 veces durante la experiencia con la solución nutritiva de Norris⁽¹³⁵⁾. Los otros riegos (realizados cada vez que fue necesario) se hicieron con agua destilada. En el caso del tratamiento con KNO_3 el mismo fue agregado a las jarras por riego con una solución de esta sal al inicio del experimento. La cantidad agregada fue tal de proveer 50 ppm de Nitrógeno en las jarras.

3.3.17. Recolección de las plantas:

Cuando las plantas llegaron al estadio de floración fueron cosechadas para la determinación de peso seco de parte aérea, peso seco de nódulo y evaluación serológica de éstos para identificar la cepa que les dio origen.

EXPERIMENTOS A CAMPO

Los mismos fueron realizados en áreas con diferentes tipos de suelos: el primero en el Valle de Lerma (Cerrillos) con suelo de textura franca, Nitrógeno total 0,11 g%, materia orgánica 1,9%, relación C/N = 10, Fósforo disponible 10 ppm, pH 6,5 y capacidad hídrica de saturación 27 g%. El segundo ensayo fue realizado en dos localidades. Uno de ellos en el mismo sitio que el primer experimento y el segundo en Rosario de la Frontera (Horcones), con suelo de textura Franco-arcillosa, Nitrógeno 0,19 g%, materia orgánica 4,36 %, relación C/N 13, Fósforo disponible 10 ppm,

pH 6,6 y capacidad hídrica de saturación 50%

3.3.18. Diseño:

a) La primera experiencia fue realizada en parcelas distribuidas bajo un diseño en bloques casualizados con 4 repeticiones de los siguientes tratamientos.

1. Inoculante en polvo de la cepa F 45 + 60 kg/ha de P_2O_5 (F 45-P)
2. Inoculante en polvo de la cepa F 48 + 60 kg/ha de P_2O_5 (F 48-P)
3. Inoculante en polvo de la cepa 492 + 60 kg de P_2O_5 (492-P)
4. Inoculante en polvo de la mezcla en partes iguales de las tres cepas mencionadas en los puntos 1, 2 y 3 + 60 kg/ha de P_2O_5 (M-P)
5. Inoculante en polvo de la mezcla en partes iguales de las tres cepas mencionadas en los puntos 1, 2 y 3 + 60 kg/ha de P_2O_5 + 60 kg/ha de Nitrógeno como Sulfato de Amonio (M-P-N)
6. Inoculante granulado de la mezcla en partes iguales de las 3 cepas + 60 kg/ha de P_2O_5 (MG-P)
7. Inoculante en polvo de la mezcla de las 3 cepas (M)
8. Testigo sin inocular + 60 kg/ha de P_2O_5 (T-P)

b) En el segundo experimento se realizaron 3 tratamientos básicos: Parcelas inoculadas, Parcelas no inoculadas, y Parcelas no inoculadas y fertilizadas con Nitrógeno en dos niveles de fertilidad, fertilidad de campo y fertilidad óptima. Por lo tanto los tratamientos fueron:

1. Parcelas no inoculadas (T)
2. Parcelas inoculadas con inoculante de la cepa F 45 (I)
3. Parcelas no inoculadas fertilizadas con 60 kg/ha de Nitrógeno (como urea) (N)
4. Parcelas no inoculadas fertilizadas con 60 kg/ha de P_2O_5 (como Superfosfato triple de Calcio) y 100 kg/ha de K_2O (como Sulfato de Potasio) (PK).
5. Parcelas inoculadas con inoculante de la cepa F 45 fertilizada con 60 kg/ha de P_2O_5 y 100 kg/ha de K_2O (IPK).
6. Parcelas no inoculadas fertilizadas con 60 kg/ha de Nitrógeno (como urea), 60 kg/ha de P_2O_5 y 100 kg/ha de K_2O (NPK)

3.3.19. Unidades experimentales: a) Las parcelas del primer ensayo estaban constituidas por 6 surcos distanciados a 70 cm. de 3 m de largo, la separación entre parcelas fue de 1,4 m y de 2 m. entre bloques distribuidos de forma tal de evitar el 1% de pendiente local b) Las del segundo experimento estaban constituidas por

4 surcos, distanciados a 70 cm, de 7,5 m de largo. Sobre la parte delantera se realizó la evaluación temprana y sobre la trasera la tardía.

3.3.20. Obtención de inoculantes:

Estos fueron obtenidos en la forma indicada en el punto 3.2. incisos 1, 2, 3 y 4.

3.3.21. Inoculación:

a) En el primer ensayo las semillas fueron inoculadas con el inoculante en polvo según el método propuesto en el sistema internacional de Ensayos de Inoculación de leguminosas elaborado por el proyecto Niftal. El mismo consiste en mezclar 100 g de semillas con 8 g de inoculante y 2,5 ml de una solución de goma arábiga 40 % p/v. Este método permite que sea aplicada una gran cantidad de Rhizobium por semilla⁽¹³⁶⁾.

En el caso del inoculante granulado, éste se distribuyó sobre un surco quedando éste, luego, bajo la línea de siembra. La dosis empleada fue aproximadamente de 5 g por metro de surco.

b) En el segundo ensayo la inoculación se efectuó empleando dosis doble a la aconsejada normalmente al agricultor en los inoculantes comerciales y se utilizó como adherente una solución de goma arábiga 40% p/v.

3.3.22. Siembra:

Se realizó a mano, de manera de obtener, luego de raleo, un "stand" de 14 plantas por m lineal de surco, equivalente a 200.000 plantas por hectárea.

3.3.23. Aplicación del fertilizante:

Este se aplicó en la emergencia de las plantas, a mano, sobre un surco realizado al borde y hacia ambos lados de la línea de plantas.

3.3.24. Manejo cultural:

Se realizó el recomendado para esta especie vegetal consistente en carpidas, desyuyados, aplicación de insecticidas y herbicidas.

3.3.25. Recolección de las plantas:

A los 45 días de la siembra en prefloración, sobre 16 plantas tomadas del 2° y 5° surco se determinó el número de nódulos, la identificación por serología de la cepa que le dió origen, peso

seco de parte aérea y Nitrógeno total de parte aérea.

Posteriormente, en la época de cosecha, se determinó el rendimiento en grano (kg/ha) en los dos surcos centrales (dejando 25 cm de bordura hacia ambos extremos), % de Nitrógeno en grano y stand de plantas.

3.3.26. Determinación de nitrógeno:

Esta determinación se realizó sobre una muestra obtenida por la molienda total de la parte aérea seca de cada planta. Se utilizó el método de micro Kjeldahl⁽¹³¹⁾.

3.4. INFLUENCIA DEL "ESTADO FISIOLÓGICO" DE LAS BACTERIAS EN LA FORMACION DE NODULOS.

3.4.1. La cepa utilizada fue la F 45 de *Rhizobium phaseoli*.

3.4.2. Las semillas utilizadas, su esterilización, así como condiciones de trabajo, unidades experimentales (en cámara), siembra y riego son las mismas que las indicadas en el punto 3.3. de Materiales y Métodos.

3.4.3. Obtención de las suspensiones de *Rhizobium*:

Estas fueron obtenidas de los diferentes estados estacionarios de un cultivo continuo como se indica en 3.1.1.d. Para cada velocidad de dilución se tomaron algunos ml. de suspensión, se centrifugaron inmediatamente a 4°C y se lavaron 2 veces. Se resuspendieron en solución fisiológica estéril. Esta suspensión fue mezclada con una suspensión, en solución fisiológica, de una cepa de *Rhizobium meliloti* (cepa 323 INTA Castelar) de forma tal que la mezcla tenía un título de 1×10^5 cel/ml de *Rhizobium phaseoli* y alrededor de 1×10^{10} de *Rhizobium meliloti*. Esta última cepa no produce infección de *Phaseolus vulgaris*.

La suspensión así obtenida tiene una gran cantidad de células no infectivas respecto de las potencialmente infectivas de *Rhizobium phaseoli*.

3.4.4. Diseño de la experiencia:

Se realizó un diseño de tipo enteramente al azar con 8 repeticiones de los siguientes tratamientos (en algunos de ellos se perdieron una o dos repeticiones).

- 1.- Jarras inoculadas con bacterias crecidas a una velocidad de dilución de $0,027 \text{ h}^{-1}$.
2. Jarras inoculadas con bacterias crecidas a una velocidad de

dilución de $0,067 \text{ h}^{-1}$.

3. Jarras inoculadas con bacterias crecidas a una velocidad de dilución de $0,108 \text{ h}^{-1}$.

4. Jarras inoculadas con bacterias crecidas a una velocidad de dilución de $0,150 \text{ h}^{-1}$.

5. Jarras inoculadas con bacterias crecidas a una velocidad de dilución de $0,186 \text{ h}^{-1}$.

Todos estos tratamientos fueron luego sometidos al agregado de una solución de tetraciclina (como se incida más adelante)

Además se realizaron otros 4 tratamientos con 4 repeticiones idénticas a los 2, 3, 4 y 5 indicados anteriormente pero que no fueron adicionados de antibiótico.

3.4.5. Inoculación:

Esta fue realizada cuando las plantas tenían un apreciable desarrollo radicular (aproximadamente 2 semanas posteriores a la siembra) por agregado de 2 ml por jarra de las suspensiones indicadas en el punto 3-4-3 de forma de tener 1×10^5 células/raíz. En ese mismo momento se inundaron las macetas con agua destilada de forma de tener la mayor homogeneidad que este sistema de trabajo pueda proporcionar en cuanto a la distribución de las bacterias en la jarra.

3.4.6. Agregado de antibiótico:

A las 48 horas después de la inoculación se inundaron nuevamente las macetas con una solución de tetraciclina con una concentración de 15 ug/ml. Esta concentración fue probada previamente y resultó apta para inhibir totalmente el crecimiento microbiano y no afectar a la planta.

3.4.7. Recolección de las plantas:

Estas fueron recogidas en etapa de prefloración y se determinó el número de nódulos por jarra.

3.4.8. Análisis de los resultados:

Estos fueron sometidos al análisis de la variancia y determinación de las diferencias mínimas significativas entre medias por el test de Tuckey y Duncan⁽¹³⁴⁾.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LA CEPA F 45 DE RHIZOBIUM PHASEOLI. BALANCE DE UN MEDIO DE CULTIVO.

4.1.1. Fuente de Carbono:

Empleando el medio N°3 (Cuadro 3), como medio base se estudió la capacidad de metabolizar diferentes fuentes de carbono por la cepa F 45. Este medio es una modificación del conocido como Fred Waksman (Medio N°79) descrito por Wright⁽¹⁰³⁾. Las modificaciones introducidas fueron: a) el agregado de $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ y $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ en soluciones al 10%. b) La sustitución de la fuente de Carbono original Manitol por sacarosa (en el medio sólido) de acuerdo a Vincent⁽¹⁰²⁾. c) El agregado de KH_2PO_4 para aumentar la capacidad buffer en el medio líquido debido a la disminución de pH que produce en su desarrollo la cepa en estudio (en medio sólido esta función la cumple el CaCO_3).

Los sustratos hidrocarbonados empleados en concentración de 10 g/l fueron: galactosa, glucosa, glicerol, lactosa, manitol, y sacarosa. Tal cual lo indica la bibliografía⁽¹¹⁶⁾ esta cepa de crecimiento rápido fue capaz de utilizar todas las fuentes ensayadas, pero, como se muestra en la figura 5, con la sacarosa, lactosa y glicerol se lograron los mayores valores de densidad óptica que se corresponden con los más altos recuentos celulares. Estos fueron, a las 45 horas de proceso, de 5×10^9 cel/ml para sacarosa, 4×10^9 cel/ml para lactosa y glicerol y del orden de 2×10^9 cel/ml para los restantes hidratos de carbono. En base a estos resultados en las posteriores experiencias se utilizó sacarosa como sustrato hidrocarbonado por ser el de menor costo.

4.1.2. Factores de crecimiento:

Se realizaron experiencias donde se estudiaron las necesidades de esta cepa de Rhizobium phaseoli del agregado al medio de cultivo de las vitaminas más comunmente requeridas por esta especie de Rhizobium⁽¹⁰⁵⁾⁽¹²²⁾. Las vitaminas ensayadas fueron: biotina, pantotenato de calcio y tiamina, agregadas a los medios de cultivo solas o en mezclas. Los medios utilizados y los resultados obtenidos se muestran en la figura 6. En la misma se ve la dependencia de esta cepa del agregado de biotina a los medios de cultivo. Es de hacer notar que los medios utilizados en todos los casos (a excepción de esta experiencia) contienen Extracto de

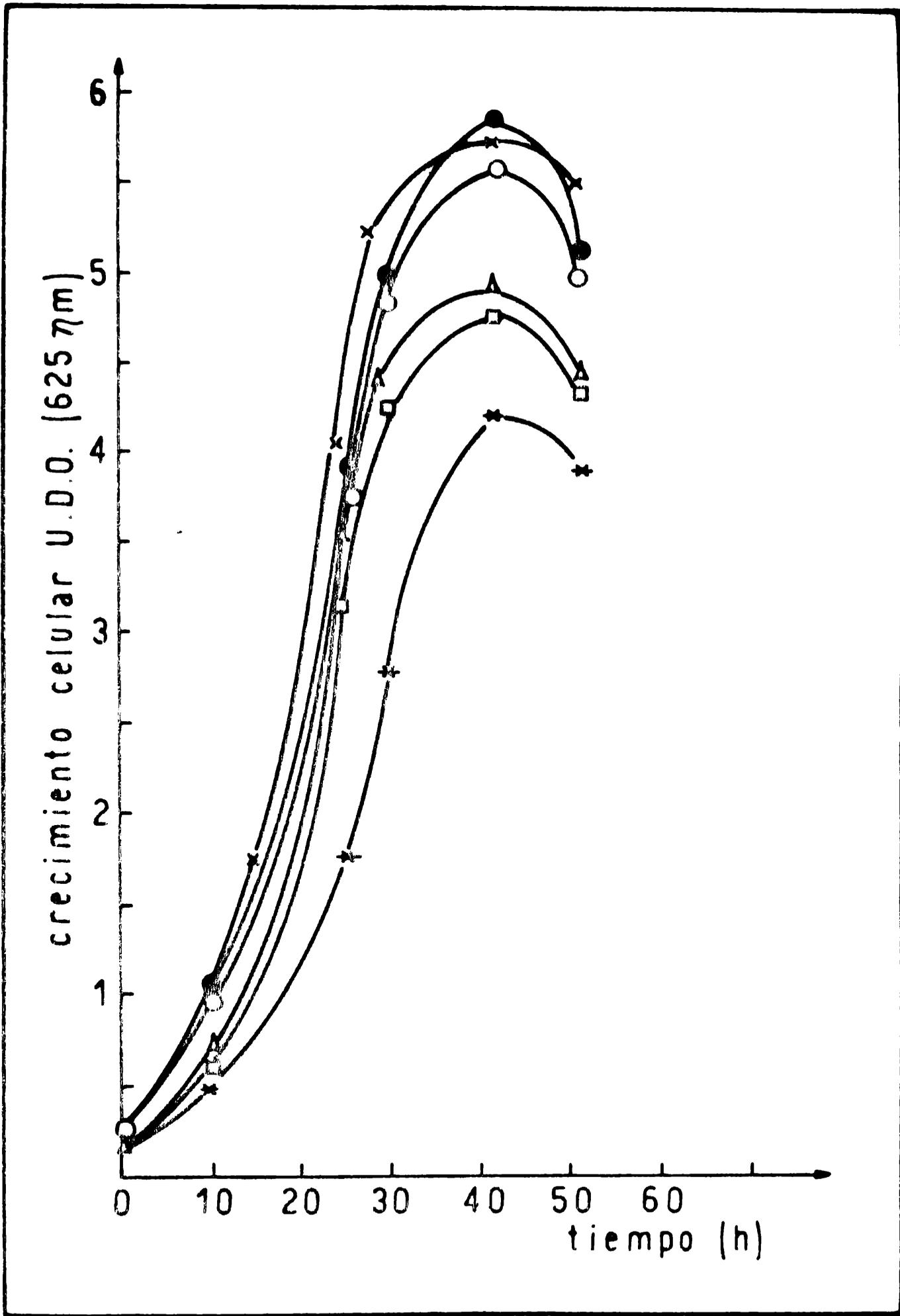


Figura 5. Utilización de diferentes fuentes de Carbono por la cepa F 45 de *Rhizobium phaseoli*. Medio base N°3 (Cuadro N°3).

- | | | |
|-------------|------------|------------|
| □ galactosa | * manitol | △ glucosa |
| ● lactosa | ○ glicerol | × sacarosa |

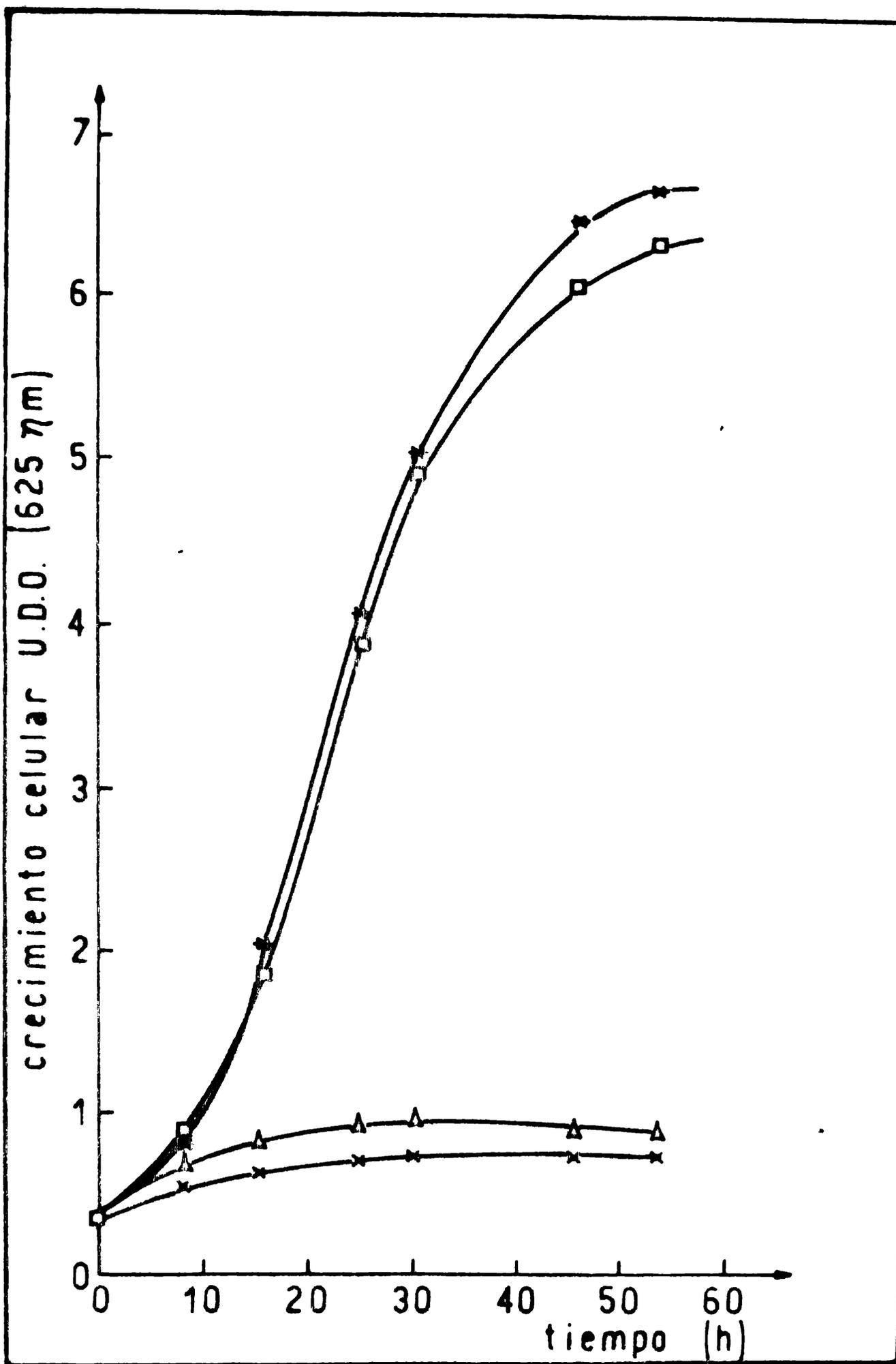


Figura 6: Efecto del agregado de vitaminas sobre el crecimiento de la cepa F 45 de *Rhizobium phaseoli*. Medio N°3 (cuadro 3) con sacarosa como fuente de carbono, sin extracto de levaduras y:

- * 0,2; 0,4 y 1,0 mg/l de Biotina
- 0,2 mg/l de Biotina + 10 mg/l de Pantotenato de Calcio y 0,5 mg/l de Biotina + 10 mg/l de Pantotenato de Calcio.
- ▲ 4,0; 10 y 20 mg/l de Pantotenato de Calcio.
- × 2,5 y 10 mg/l de Tiamina.

levaduras en concentración de 1 g/l o superiores. Este componente contiene biotina, por lo que las necesidades de esta cepa por la vitamina se suplirían en parte, pero además aprovechando la capacidad de las células de acumular biotina⁽¹³⁷⁾ se le agregó al medio N°2 (Cuadro 3) (utilizado como preinóculo o inóculo) 0,2 mg/l de este factor. Procediendo de esta forma, en la transferencia de volumen que se realiza en las siembras se incorpora además de bacterias que han acumulado la vitamina, biotina residual, que suplementa la aportada por el extracto de levaduras, de forma tal que este factor de crecimiento no sea el sustrato limitante de las etapas posteriores de un proceso.

4.1.3. Fuentes nitrogenadas:

En la primera etapa se realizaron ensayos orientativos en cajas de Petri utilizando el medio N°1 (Cuadro 3) sin extracto de levaduras. Estos ensayos fueron similares a los descritos por Chakrabarti y colaboradores⁽¹⁰⁵⁾ y consisten en el agregado a diferentes sectores de la caja de Petri de gotas de soluciones de las fuentes a estudiar. Se eligen aquellas que producen los más abundantes y tempranos desarrollos de las colonias en el sector de la caja de Petri donde fueron agregadas.

Las fuentes probadas fueron: Extracto de levaduras, una peptona que resulta de la hidrólisis pepsínica de estómago de cerdo, extracto de carne, agua de macerado de maíz, urea, Nitrato de potasio, Extracto de malta y Fosfato diamónico.

De estos ensayos surgió que la peptona, el agua de macerado de maíz y el extracto de carne favorecieron notablemente el desarrollo de las colonias en el medio sólido respecto de las otras fuentes y del medio base. En base a ello se realizaron experiencias en erlenmeyers de 1000 ml, empleando el medio base con 10 g/l de sacarosa, y se agregaron separadamente las tres fuentes mencionadas en concentraciones de 3 g/l. En la figura 7 se muestran las curvas de crecimiento celular donde se ve que la peptona produce los mayores desarrollos bacterianos.

Posteriormente se hicieron nuevas experiencias variando la concentración de peptona: se ensayaron 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 y 4,5 g/l. Los resultados de esta experiencia (fig.8) demostraron que concentraciones de peptona superiores a 3,5 g/l inhiben el crecimiento celular. Este hecho probablemente sea debido a que la utilización de la peptona por la bacteria provoca una disminución del pH tal

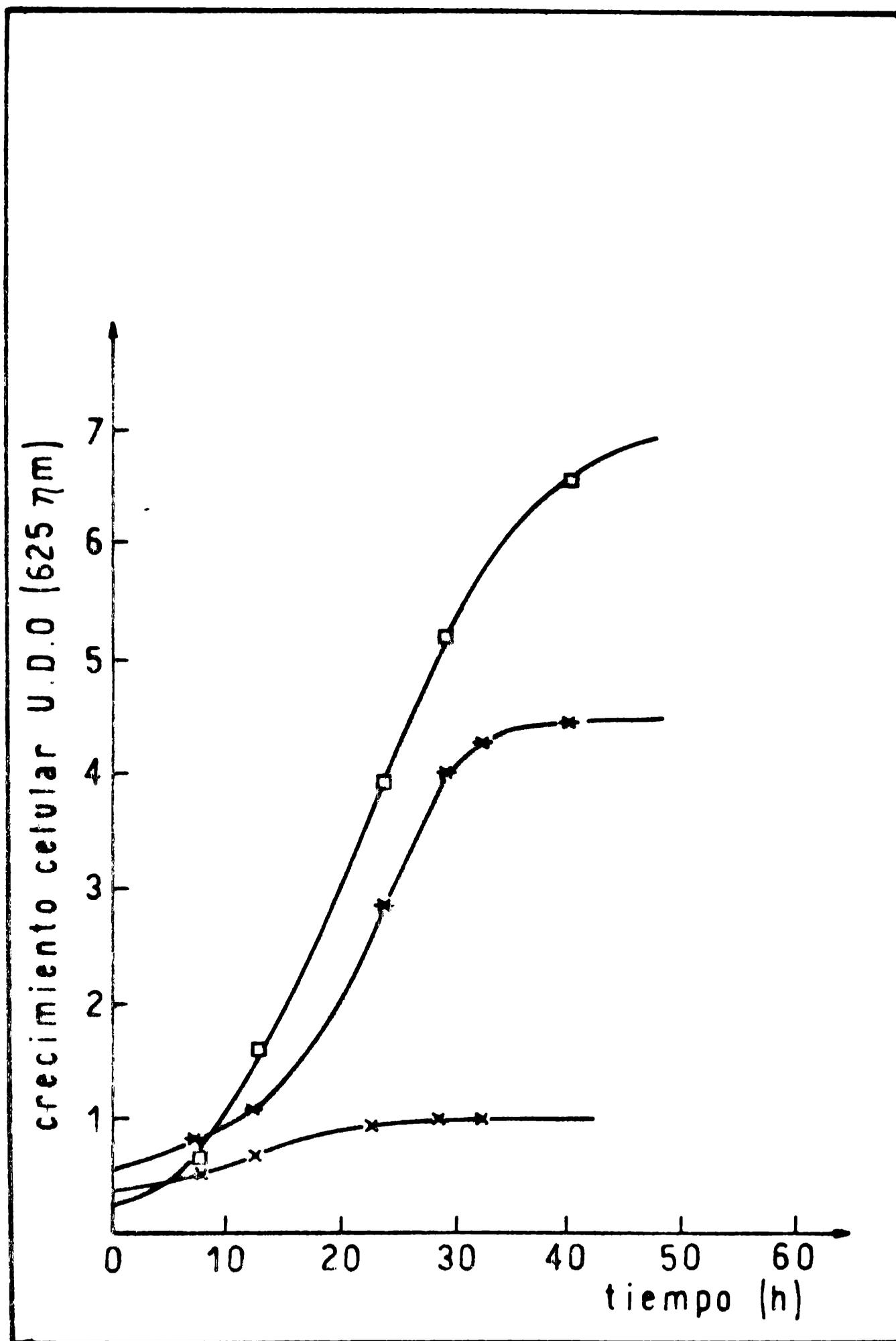


Figura 7. Efecto de: extracto de carne, agua de macerado de maíz y peptona sobre el crecimiento de la cepa F 45 de *Rhizobium phaseoli*. Medio base N°3 (Cuadro N°3) con 10 g/l de sacarosa y 3 g/l de:

□ peptona

x extracto de carne

* agua de macerado de maíz

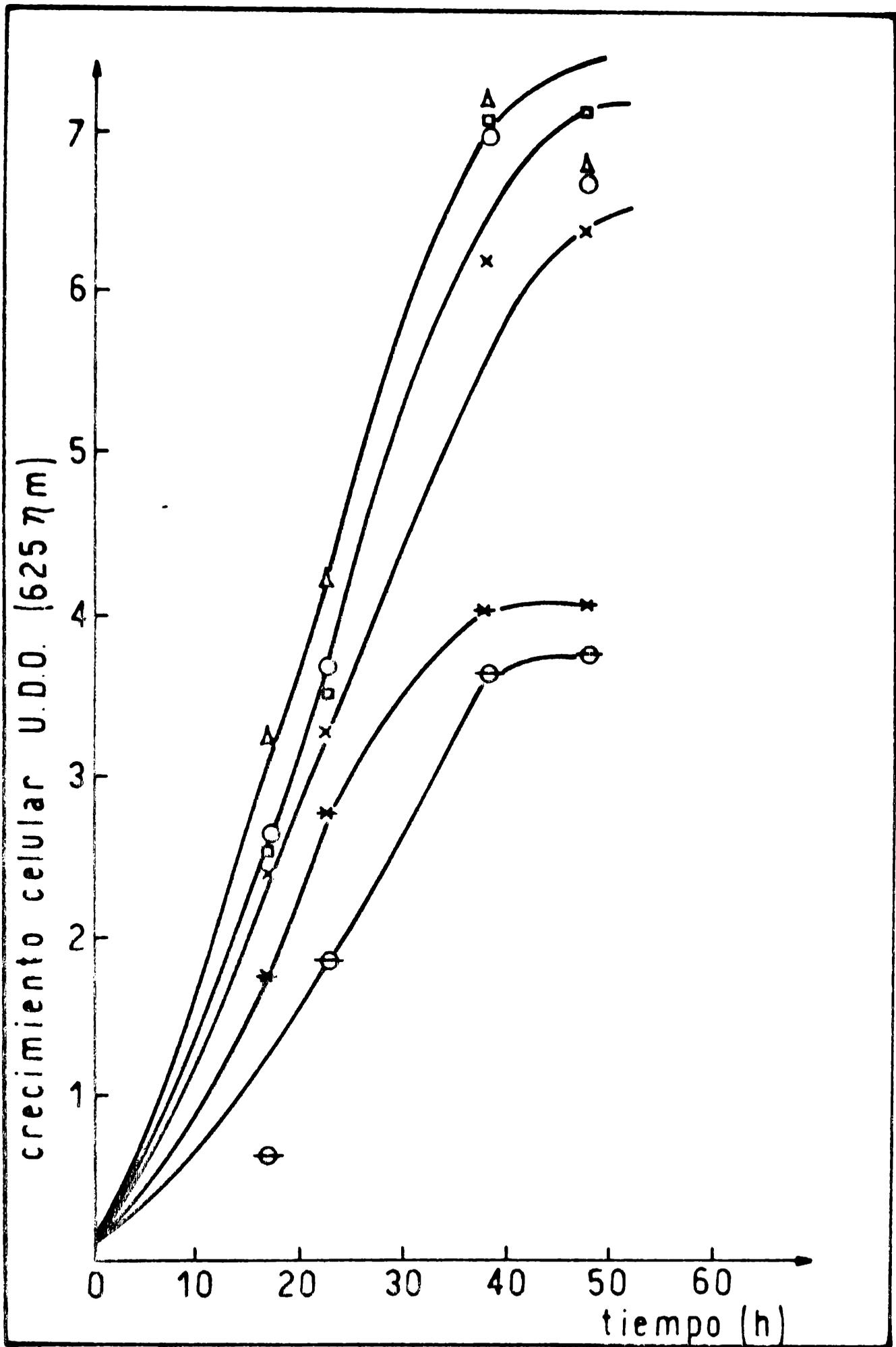


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de peptona sobre el crecimiento de la cepa F 45 de *Rhizobium phaseoli* Medio base N°3 (Cuadro N°3) con sacarosa (10 g/l) como fuente de Carbono y los siguientes g/l de peptona:
 ○ 2,0 □ 2,5 ▲ 3,0
 × 3,5 ∗ 4,0 ⊕ 4,5

que éste sea el factor que altera el normal desarrollo del cultivo, ya que el pH desciende desde 7,0 a la hora cero de proceso hasta 4,5 - 4,8 a las 30 horas.

4.1.4. pH inicial: su efecto sobre la evolución del cultivo.

Con el medio base, adicionado de sacarosa (10 g/l) y 3 % de peptona se observaba que un cultivo iniciado a pH = 7,0 presentaba un prolongado período de retardo (aproximadamente 8 - 9 hs). El crecimiento celular se hacía máximo cuando el valor de pH descendía hasta 6,5. En razón de este comportamiento se realizó un ensayo donde se iniciaron los cultivos con diferentes valores de pH (5,5; 6,0; 6,5 y 7,0). Los resultados (figura 9) mostraron la conveniencia de iniciar los procesos a pH 6,5, ya que con este valor inicial, la fase de retardo se reducía a aproximadamente 2 horas. Además el valor de pH al término del proceso fue de 5,7, valor éste adecuado para la impregnación de soportes en la obtención de inoculantes.

Este hecho es de importancia en el orden tecnológico, ya que con la sola modificación del valor de pH inicial, se reduce el proceso alrededor de 7 horas, que significa una disminución de los costos operativos.

4.1.5. Diferentes relaciones de concentraciones de extracto de levadura y peptona.

Después de ajustar el medio en su pH inicial se realizaron nuevas experiencias variando la relación de concentraciones de las fuentes nitrogenadas. Los medios utilizados y los resultados obtenidos se indican en la figura 10, donde se destaca que los medios titulados B (medio base N°3 adicionado de 2,0 g/l de peptona y 2,0 g/l extracto de levaduras) y C (medio base N°2 adicionado de 1,0 g/l de peptona y 3,0 g/l de extracto de levaduras) son los que permitieron alcanzar mayores valores de densidad óptica, 9,5 y 8,5 respectivamente que corresponden a $1,2 \times 10^{10}$ cel/ml y $1,1 \times 10^{10}$ cel/ml respectivamente.

Se muestra además que a medida que aumenta la concentración de peptona en los medios de cultivo es más notoria la disminución del pH del mismo. Lo inverso ocurre a medida que aumenta la concentración de Extracto de levaduras. Los pH finales obtenidos con los medios B y C están comprendidos entre 5,5 y 6,0 los que son aptos para la impregnación de soportes.

La respuesta favorable de este microorganismo a las fuentes

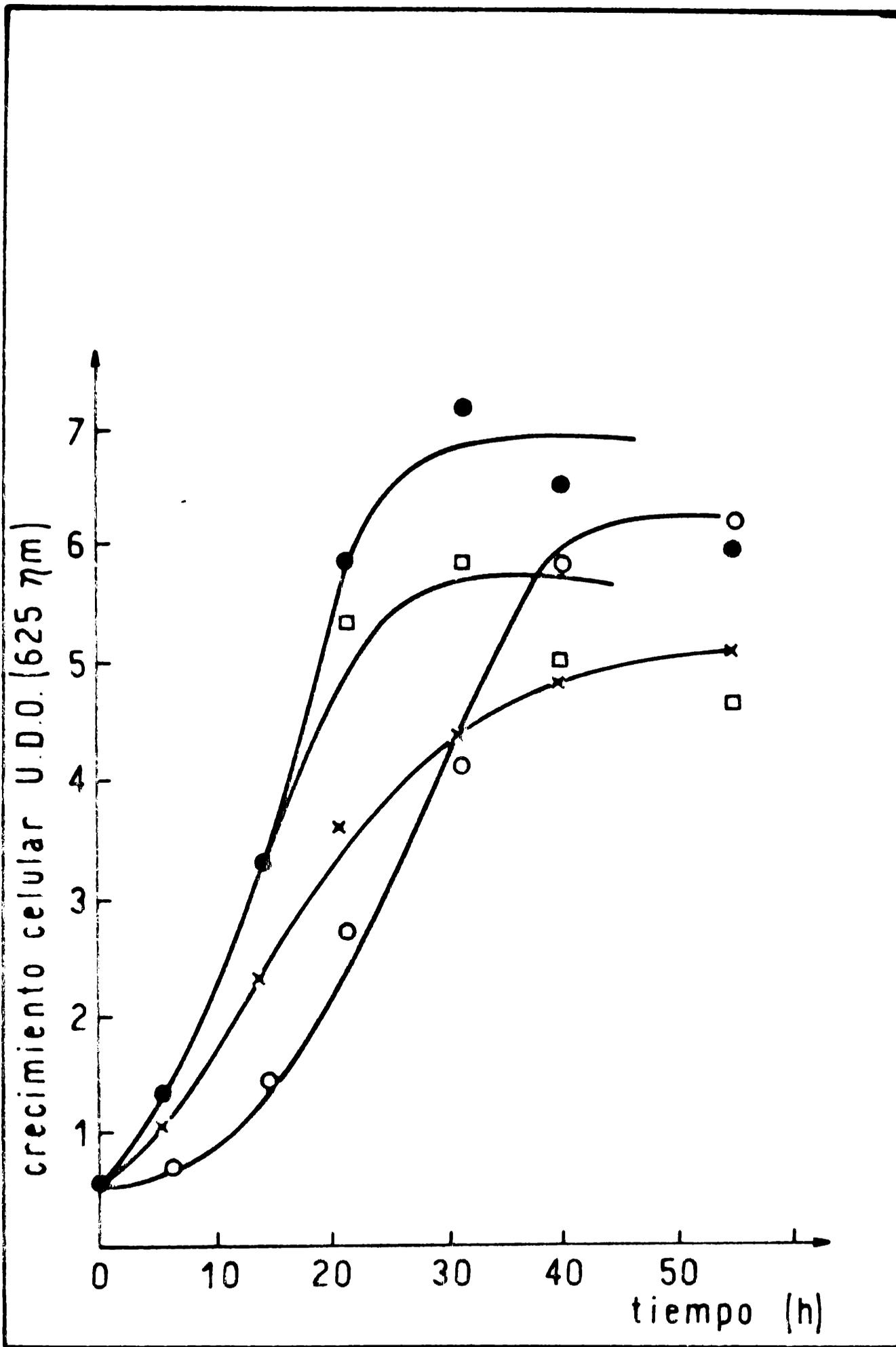


Figura 9. Influencia del pH inicial del medio de cultivo sobre el crecimiento de la cepa F 45 de Rhizobium phaseoli. Medio base N° 3 (cuadro N° 3) con 3 g/l de peptona y 10 g/l de sacarosa con los siguientes valores de pH inicial:

x 5,5 □ 6,0 ● 6,5 ○ 7,0

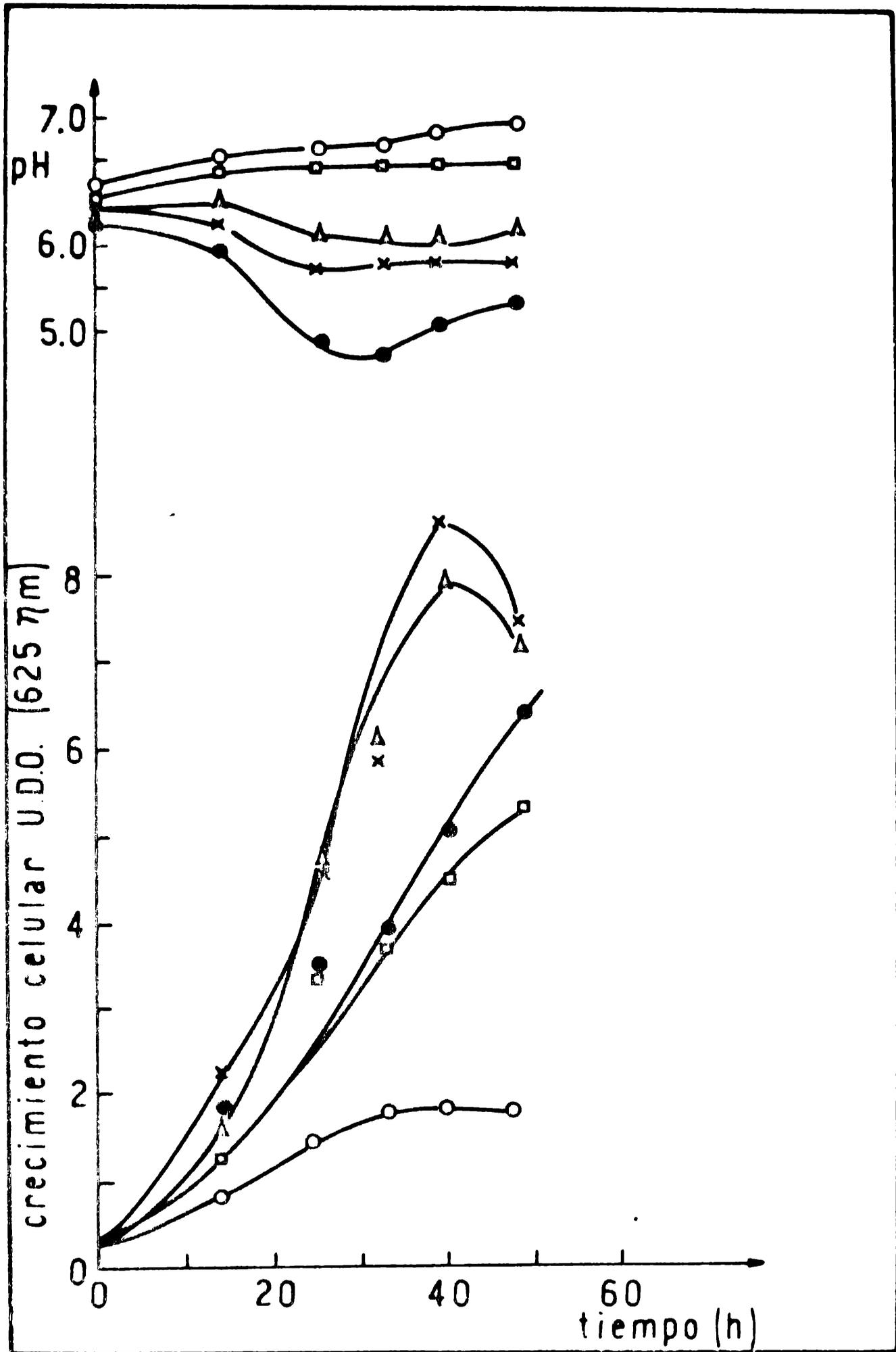


Figura 10. Diferentes relaciones de concentraciones de extracto de levaduras y peptona y su efecto sobre el crecimiento de la cepa F 45 de Rhizobium phaseoli. Medio base N° 3 (cuadro N° 3) con 10 g/l de sacarosa y:

	A(●)	B(×)	C(▲)	D(□)	E(O)
peptona (g/l)	3,0	2,0	1,0	0	0
extracto de levadura(g/l)	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0

nitrogenadas mencionadas, se corresponde con los datos de otros autores⁽¹¹⁶⁾ que atribuyen este comportamiento al suministro, por la peptona y el extracto de levaduras, de fracciones nitrogenadas tales como aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular, como así también de vitaminas y otros factores de crecimiento.

Que estas fuentes son además de fuentes de Nitrógeno aporte de factores de crecimiento se puede ver en la Fig. 12, donde se grafica N residual en los medios de cultivo a lo largo de un proceso. Se ve que se consume sólo aproximadamente 50% de Nitrógeno inicial, pero si se reducen las concentraciones de Extracto de levaduras o peptonas se limita el crecimiento, de donde se deduce que estas fuentes aportan otros metabolitos, además del Nitrógeno, que este microorganismo necesita.

La inhibición que se produce del crecimiento celular con concentraciones de Extracto de levaduras superiores a 3 g/l (fig. 6) es atribuible al efecto inhibitorio de ciertos componentes presentes en el extracto⁽¹²³⁾.

4.1.6. Concentración inicial de microorganismos. Su efecto sobre la fase de retardo.

Antes de iniciar las experiencias en fermentadores se realizaron una serie de ensayos a fin de optimizar el crecimiento de forma tal que éste presente una corta fase de retardo. Se emplearon concentraciones iniciales de microorganismos en el ámbito de 1×10^4 a 1×10^8 cel/ml. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11 donde se observa que por debajo de 1×10^8 cel/ml, para las condiciones ensayadas, se presenta una fase de retardo demasiado prolongada. Este hecho es atribuible no sólo a la cinética autocatalítica que las bacterias siguen en su crecimiento, sino también al hecho de que al ser mayor la transferencia de volumen se suministran también factores estimulantes del crecimiento que provienen del inóculo, debidos en parte a la autólisis celular además de la biotina ya mencionada. Este factor, al igual que el pH inicial (item 4.1.4.) son de importancia en la optimización de un proceso industrial ya que están directamente relacionados con los tiempos de operación.

4.2. INFLUENCIA DE LA AERACION SOBRE EL CRECIMIENTO

Para el estudio de las condiciones operativas se empleó el medio balanceado que se obtuvo de las experiencias indicadas anteriormente (medio N°4, Cuadro 3).

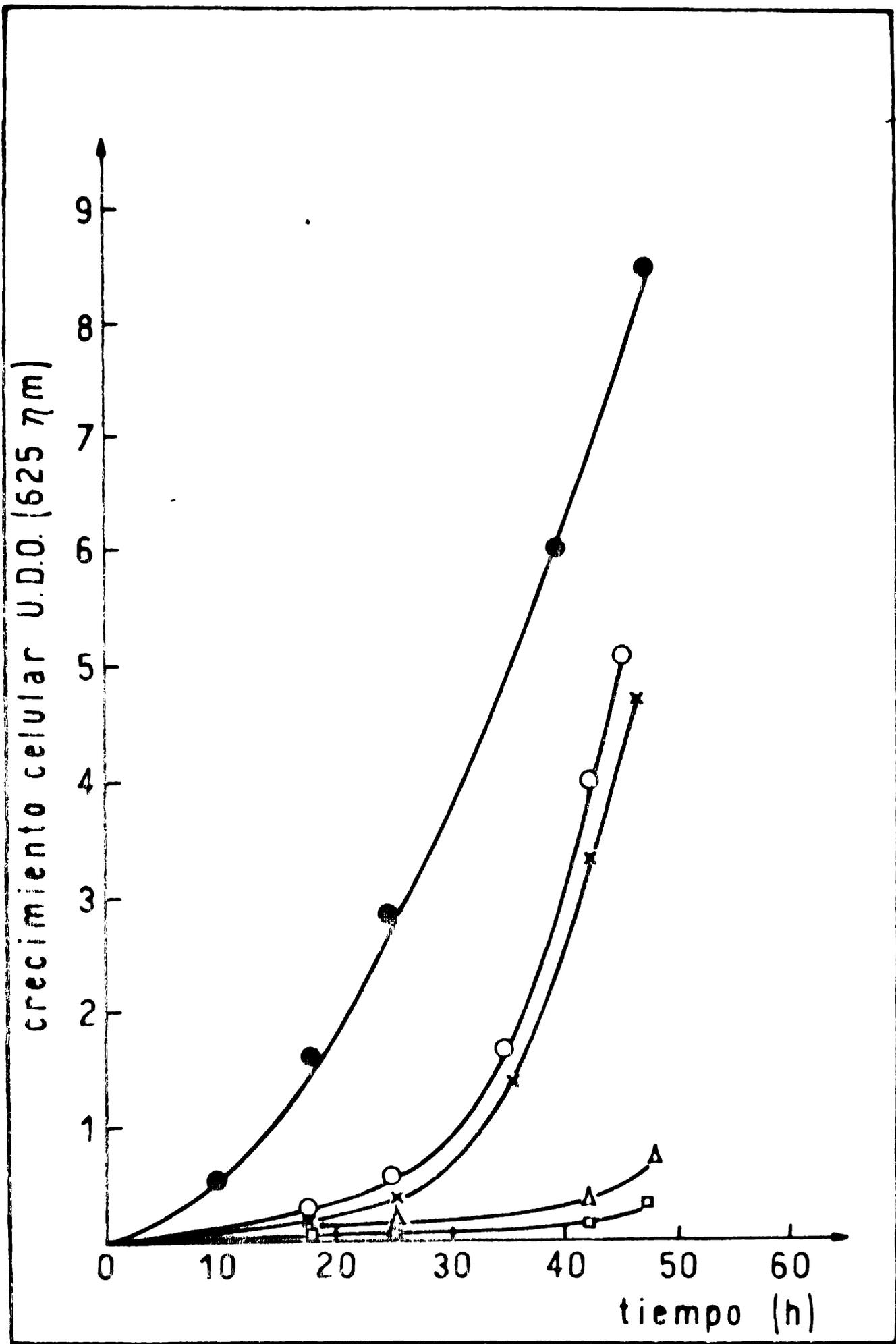


Figura 11. Influencia de la concentración inicial de bacterias sobre el crecimiento de la cepa F 45 de *Rhizobium phaseoli*. Medio N°4 (cuadro N°3).

- | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| □ 1×10^4 cel/ml | △ 1×10^5 cel/ml | × 1×10^6 cel/ml |
| ○ 1×10^7 cel/ml | ● 1×10^8 cel/ml | |

Las condiciones empleadas y los resultados obtenidos se indican en el Cuadro 4, se ve que a medida que se aumentó la velocidad de agitación y consecuentemente el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, se incrementa la velocidad específica de crecimiento (ver nota) y el número máximo de células/ml obtenidas. Este comportamiento se manifiesta hasta un valor de Kla de 162 h^{-1} donde se logra una concentración celular de $1,25 \cdot 10^{10}$ cel/ml en 32 h de proceso, lo que corresponde a una productividad de $3,75 \cdot 10^8$ cel /ml x h. Un posterior incremento en el suministro de oxígeno ($Kla = 275 \text{ h}^{-1}$) no se traduce en aumentos de la velocidad específica de crecimiento o de concentración celular.

La respuesta a un incremento en la aeración por esta cepa de *Rhizobium* coincide con otros estudios realizados^{(107) (126)} y se contradice con los resultados informados por Dudman⁽¹³⁸⁾. En el Cuadro N°5 se muestran los valores de tensión de oxígeno disuelto, consumo y demanda de oxígeno para este microorganismo en las condiciones donde se obtuvo máxima productividad.

Cuadro N°5

t. (h)	Recuento x 10^{-8} (cél/ml)	Oxígeno disuelto %	Consumo de oxígeno ml O_2 /lxh	Demanda de oxígeno ml O_2 /lxh
0	4,5	98		
5	9,5	93		
16	30	82	201	182
25	95	44	238	207
30	112	30	204	195
36	125	35	189	158

El suministro de O_2 máximo para estas condiciones es de $812 \text{ ml } O_2/\text{lxh}$ calculando a partir de $VAO = Kla C^*$ ⁽¹²⁹⁾. Vemos que el cultivo en estas condiciones está adecuadamente aereado ya que el O_2 disuelto no desciende por debajo de 30%, valores que no son críticos. Además el consumo y la demanda de oxígeno son comparables y el valor de suministro es

Cuadro N°4

Influencia de la aeración sobre el crecimiento de Rhizobium phaseoli F-45

Velocidad de agitación (rpm)	100	150	200	300	400	500
Velocidad de absorción de O ₂ (ml.O ₂ /l.h (VAO)	25	90	180	410	812	1375
Tiempo de proceso (h)	50	48	42	35	32	32
Máxima conc. celular (células/ml)	6 x 10 ⁹	10,4 x 10 ⁹	11 x 10 ⁹	11,6 x 10 ⁹	12,0 x 10 ⁹	11,8 x 10 ⁹
Máxima productividad (células/ml.h)	1,2 x 10 ⁸	2,18 x 10 ⁸	2,8 x 10 ⁸	3,3 x 10 ⁸	3,75 x 10 ⁸	3,7 x 10 ⁸
Velocidad específica de crecimiento (u) (h ⁻¹)	0,053	0,066	0,085	0,100	0,106	0,105

En todas las experiencias fue empleado: el medio balanceado (N°4) Cuadro 3, la concentración inicial de microorganismos fue ajustada a 1,5 x 10⁸ cel/ml y el caudal de aire fue de 1 v/v.min..

3 veces el valor de máximo consumo de acuerdo a lo recomendado⁽¹²⁹⁾.

Las diferencias entre los valores de consumo y demanda de O₂ pueden ser atribuidas a errores de medida ya que las diferencias (O₂ y CO₂) a la entrada y salida del fermentador son pequeñas y los aparatos utilizados para su determinación, no son lo suficientemente sensibles.

En la figura 12 se presentan las curvas de evolución de pH, densidad óptica, recuento celular, porcentaje de oxígeno disuelto y consumo de sacarosa y nitrógeno del proceso de crecimiento de la cepa F 45 de *Rhizobium phaseoli* para la condición de máxima productividad. Vemos que se obtiene un adecuado crecimiento (muy por encima de los valores recomendados para la impregnación de soportes en la obtención de inoculantes⁽¹⁰²⁾) con un consumo casi total de la fuente hidrocarbonada.

NOTA: La velocidad específica de crecimiento se calculó en todas las experiencias en batch a partir de la pendiente de la gráfica $\ln x$ vs tiempo ($\ln x = \ln X_0 + ut$). Este valor fue tomado en las horas del proceso (entre las 5 y 25 hs aproximadamente) donde se obtiene una recta. Pero, no necesariamente, el valor obtenido es la velocidad específica de crecimiento máxima para este microorganismo en cada una de las condiciones ensayadas. Esto es debido al hecho de que, al ser el medio empleado muy complejo, lo que se obtiene en realidad es una sucesión de velocidades específicas de crecimiento decrecientes⁽¹²⁵⁾ y el valor calculado según este método es un promedio de los mismos ya que las determinaciones de concentración celular fueron realizadas cada 4 a 6 h. Por tanto esta constante sólo puede ser utilizada como dato comparativo entre las diferentes experiencias y no como un parámetro fisiológico típico de este microorganismo.

4.3. CRECIMIENTO EN CULTIVOS DISCONTINUOS ALIMENTADOS (FED BATCH)

4.3.1. Influencia de las concentraciones de nutrientes sobre el crecimiento.

Luego de obtener un medio de cultivo (N°4 Cuadro 3) donde se lograba una adecuada concentración celular se realizó una experiencia para ver cómo se modificaba el crecimiento celular con diferentes concentraciones de nutrientes pero en la misma relación que las presentes en el medio balanceado.

Los medios ensayados se muestran en el cuadro N°6. Los resultados obtenidos se ven en ese mismo cuadro y en el gráfico N°13. Vemos que la concentración celular aumenta con el incremento de la concentración de sustrato hasta 10 g/l de sacarosa (Medio N°3). La velocidad específica de crecimiento es igual para los medios 1, 2, 3 y la diferencia en la cantidad de biomasa formada está en relación a la concentración de sustrato que contienen los medios.

Concentraciones superiores a las del medio N°3 afectan el crecimiento y en consecuencia disminuyen el máximo número de células obtenidas como así también la velocidad específica de crecimiento. Para concentraciones de sacarosa superiores a 20 g/l no se obtuvo crecimiento. La inhibición del crecimiento que se observa en los medios N°4, 5, 6 y 7 puede atribuirse a diversos factores. Entre ellos podemos mencionar el efecto inhibidor de algún metabolito tal como se vió en el punto 4-1-5 con el aumento de concentración de extracto de levaduras o peptona y también debemos tener en cuenta la modificación de tonicidad del medio (o actividad del agua)⁽¹²⁴⁾ que se produce cuando incrementamos la concentración de nutrientes. En la figura 14 se ve cómo varía la velocidad específica de crecimiento en función de la presión osmótica (y de los medios de cultivo empleados). Vemos que valores de tonicidad superiores a 80 miliosmoles disminuyen tanto la velocidad específica de crecimiento así como la máxima concentración celular obtenida y para valores de 240 miliosmoles no se observa crecimiento. Por tanto, para el desarrollo de esta cepa en sistema batch el medio N°3 (Cuadro 6) es el que nos permite obtener la mayor concentración celular. Si se desea superar esta concentración bacteriana es necesario el empleo de otro sistema de cultivo y es por ello que se realizaron las experiencias en cultivo discontinuo alimentado (CDA).

Es de destacar que debido a que la tonicidad del medio es fácilmente cuantificable, se utilizó este parámetro como índice de la inhibición del crecimiento celular. Esto no implica que el mismo sea el causante de tal inhibición, pero indudablemente, debido a los resultados obtenidos, la inhibición del crecimiento es debida a la tonicidad o a algún otro factor directamente relacionado con ella. Por ejemplo, si la causa de la inhibición del crecimiento hubiera sido un metabolito inhibidor presente en el

Cuadro N°6

Medios utilizados para estudiar el crecimiento de Rhizobium phaseoli
en sistema Batch

Componentes (g/l)	Medios						
	1	2	3	4	5	6	7
Sacarosa	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	30,0
PO ₄ H ₂ K	0,37	0,55	0,75	0,92	1,10	1,50	2,20
PO ₄ HK ₂	0,30	0,45	0,60	0,75	0,90	1,20	1,80
ClNa	0,05	0,07	0,10	0,12	0,15	0,20	0,30
SO ₄ Mg.7H ₂ O	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,40	0,60
Cl ₃ Fe.6H ₂ O sol 10%	0,05	0,07	0,10	0,12	0,15	0,20	0,30
SO ₄ Mn.4H ₂ O sol 10%	0,05	0,075	0,10	0,12	0,15	0,20	0,30
Peptona	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	6,0
Extracto Levaduras	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	6,0
Tonicidad (Miliosmoles)	40	60	80	100	120	160	240
u _{max} (h ⁻¹)	0,106	0,106	0,106	0,07	0,05	0,02	-
N° células/ml (Máx.)	55 x 10 ⁸	75 x 10 ⁸	125 x 10 ⁸	70 x 10 ⁸	30 x 10 ⁸	--	--

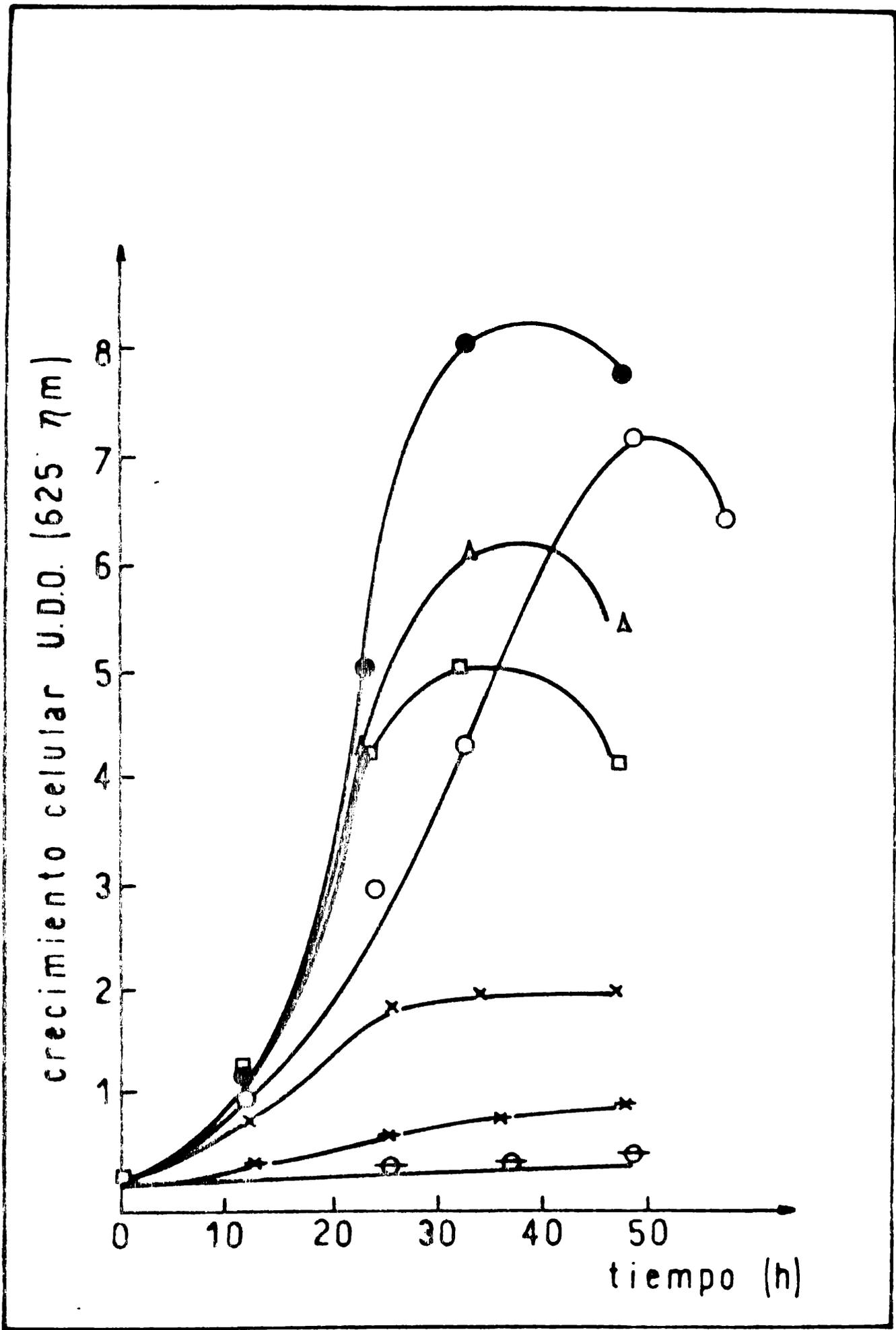


Figura 13. Crecimiento de la cepa F 45 de Rhizobium phaseoli en medios con diferentes concentraciones de nutrientes. Medios N°:

- | | |
|-----|-----|
| □ 1 | × 5 |
| △ 2 | ★ 6 |
| ● 3 | ⊙ 7 |
| ○ 4 | |

La numeración de los medios de cultivo empleados se corresponde con el orden de los mismos en el cuadro N°6

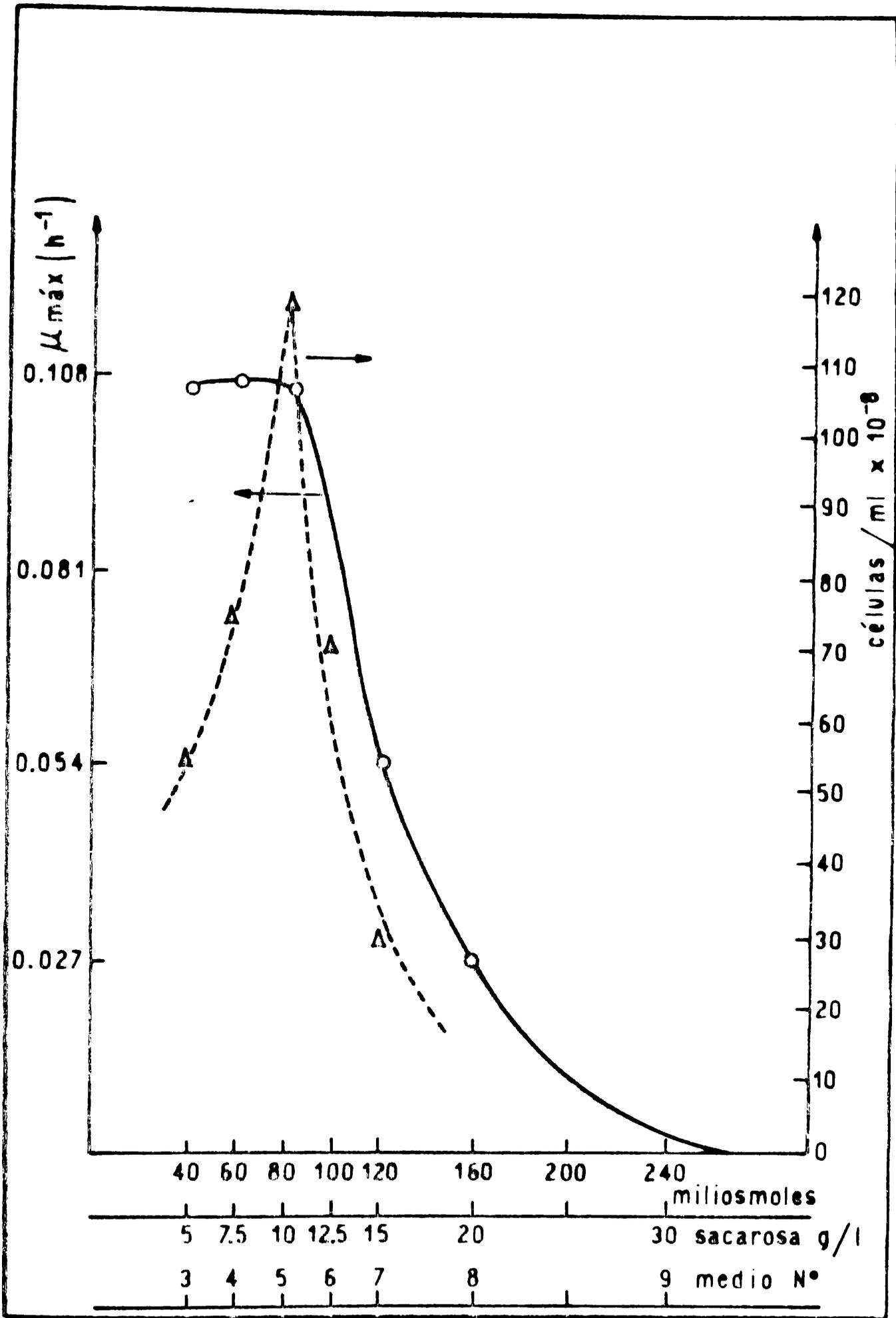


Figura 14. Efecto de la presión osmótica del medio de cultivo sobre la velocidad de crecimiento y máxima concentración celular de la cepa f 45 de *Rhizobium phaseoli*.

- velocidad de crecimiento (h^{-1})
- △ máxima concentración celular (cel/ml $\times 10^{-8}$)

medio de cultivo, al aumentar la concentración de nutrientes aumentaría la concentración del inhibidor y paralelamente la tonicidad del medio, por tanto se consideró de validez relacionar la inhibición del crecimiento midiendo la presión osmótica.

4.3.2. Cultivos en sistema discontinuo alimentado.

El esquema de este tipo de cultivos se mostró en el punto 3.1.1 y en la figura 2, al igual que las condiciones de alimentación y concentración de nutrientes en los reservorios que surgen del modelo matemático propuesto por Mignone⁽¹²⁸⁾ y descrito en ese mismo punto. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15 donde se lo compara con un cultivo en sistema batch que es el mostrado en la figura 12. Vemos que se supera la concentración celular máxima del sistema batch llegándose a una concentración de $4,9 \cdot 10^{10}$ cel/ml en 66 horas de proceso. Se muestra además la productividad del sistema que fue de $7,42 \cdot 10^8$ cel/ml.h, que es aproximadamente el doble de la lograda en batch. La evolución de la concentración de sacarosa en el cultivo se corresponde con la ecuación 1 del ítem 3.1.1. de Materiales y Métodos. Según el modelo matemático empleado en este experimento, cuando se inicia la alimentación del cultivo las células siguen creciendo a velocidad máxima (μ_{max}) mientras el cultivo sea irrestricto y se comporte según las ecuaciones propias del tratamiento matemático a partir del momento en que aparezca un sustrato limitante. En este caso en particular el cultivo evolucionó de acuerdo al modelo matemático a partir del tiempo cero de la etapa de alimentación, lo que nos hace pensar que en ese momento ya el cultivo presentaba una restricción al crecimiento por algún sustrato diferente a la fuente de carbono. En base a lo visto en los puntos anteriores de requerimientos metabólicos de esta cepa de *Rhizobium phaseoli* y de acuerdo con los resultados obtenidos en el balance de medio de cultivo para el sistema continuo, como se verá más adelante, tenemos casi la certeza que ese sustrato limitante es la biotina y como esta vitamina fue alimentada al cultivo de acuerdo a un incremento lineal en el tiempo es que el cultivo respondió de la forma esperada para un Fed-batch restricto en un sustrato.

Operando este sistema se logró incorporar 38 g/l de sacarosa

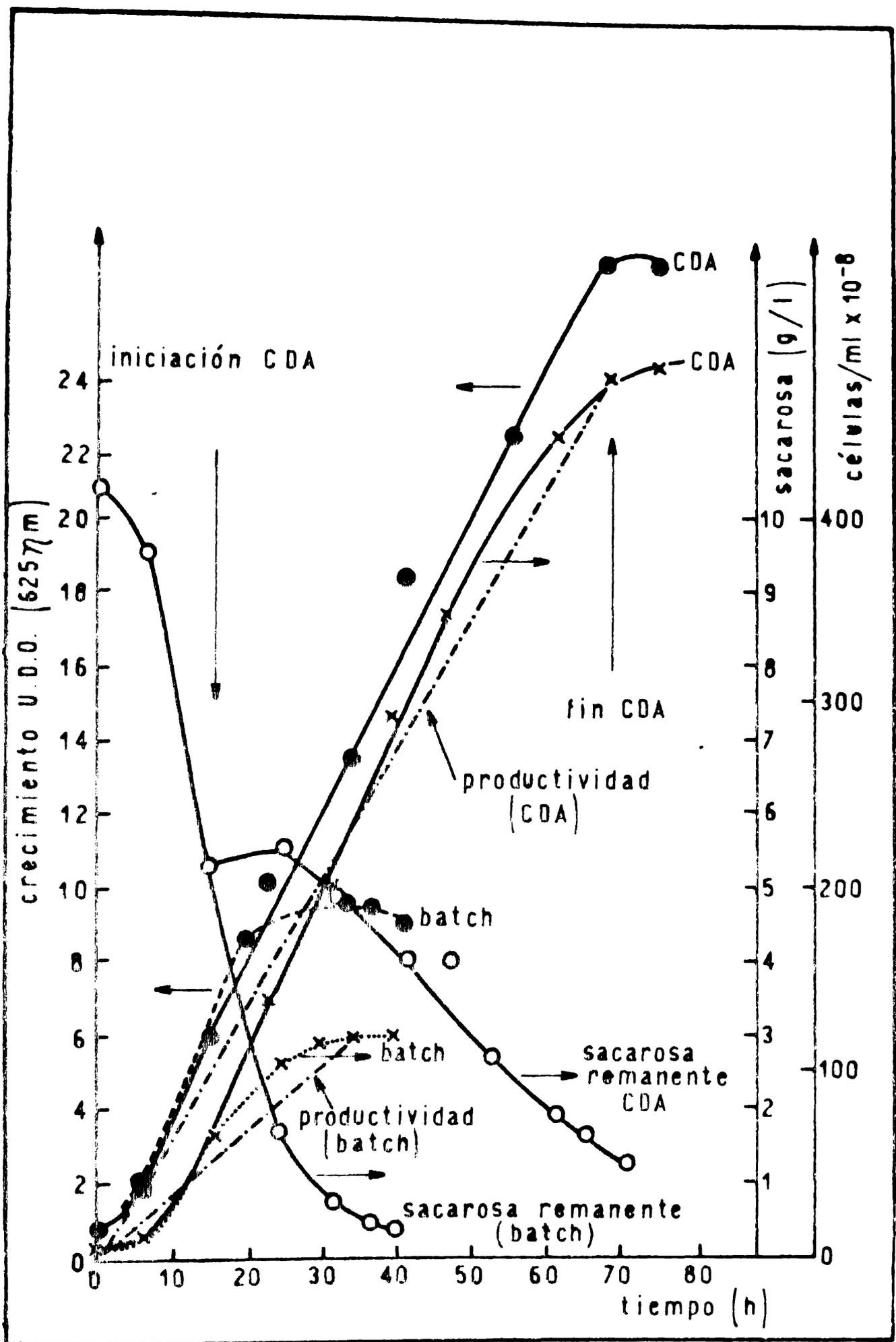


Figura 15. Crecimiento y consumo de sacarosa de la cepa F 45 de *Rhizobium phaseoli* en cultivos en sistema "batch" y discontinuo alimentado ("Fed Batch")

● UDO x cel/mlx10⁻⁸ ○ sacarosa remanente (g/l)

(y los demás componentes del medio de cultivo proporcionalmente), concentración que según vimos en la figura 10 limita totalmente el crecimiento celular.

En la figura 16 se muestra la evolución de la presión osmótica en el cultivo en comparación con lo que se hubiera obtenido empleando un sistema similar pero sin crecimiento microbiano. Vemos cómo, debido al consumo de nutrientes por el microorganismo se reduce la presión osmótica respecto del control. En esta misma gráfica se muestra en ordenadas cómo fue variando la velocidad específica de crecimiento (μ) a lo largo de la experiencia (calculada en base al modelo matemático). Vemos que la misma varía desde $0,108 \text{ h}^{-1}$ en el inicio de la alimentación hasta $0,025 \text{ h}^{-1}$ al final del proceso. Se compara este valor con μ^* que es la velocidad de crecimiento "permitido" para cada valor de tonicidad del cultivo (de acuerdo a la gráfica 10) y vemos que en ningún momento la misma pudo afectar el normal desarrollo celular ya que los valores de μ^* son siempre superiores a los reales del cultivo (μ). De acuerdo a estos resultados vemos que este sistema ofrece evidente importancia tecnológica en virtud de las concentraciones celulares y la productividad alcanzada, además de su fácil concepción, lo que lo hace muy adecuado para la obtención de caldos de *Rhizobium* para la elaboración de inoculantes. Mas si tenemos en cuenta lo propuesto por Somasegaran y Halliday⁽¹³⁹⁾ quienes muestran la posibilidad de diluir los caldos de *Rhizobium* para aumentar la producción de las plantas de elaboración de inoculantes. En caso de que una planta utilice este sistema, la dilución que se podría hacer del caldo de cultivo sería 4 veces superior a la que podríamos efectuar a partir de un cultivo en batch de acuerdo al número máximo de células alcanzado en ambos sistemas. Este punto tiene una gran ventaja en cuanto al diseño de una planta, ya que se reduciría el tamaño de la misma, para una determinada producción, si se utilizara este sistema y no el batch clásico.

Además, como vimos, otra ventaja que ofrece este sistema es que se puede aplicar para el desarrollo de células cuyo crecimiento se vea afectado por altas concentraciones del medio empleado, debido a la alta tonicidad del mismo o a una excesiva concentración de alguna sustancia inhibidora.

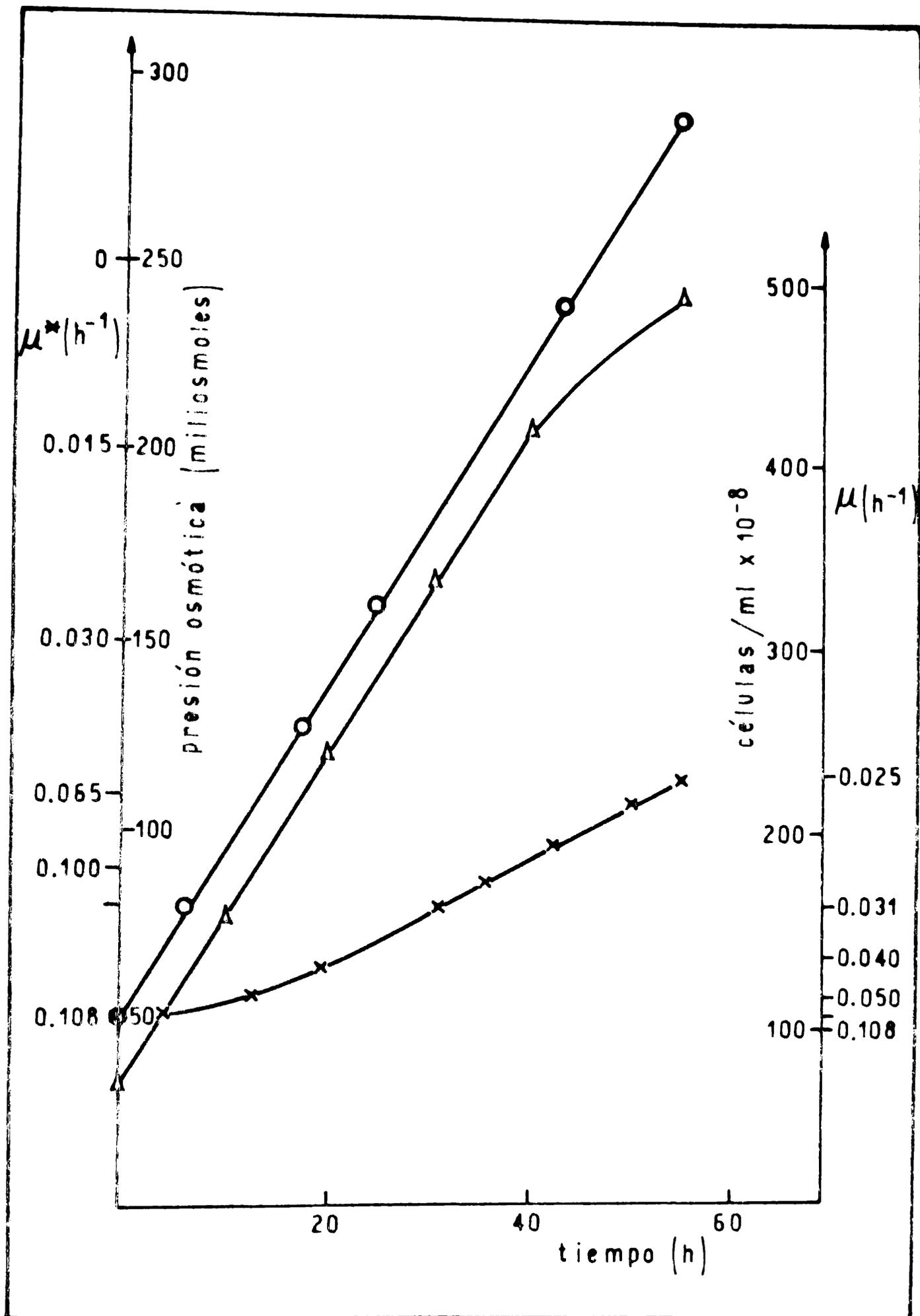


Figura 16. Evolución de la presión osmótica y crecimiento celular durante el cultivo discontinuo alimentado de la cepa F 45 de Rhizobium phaseoli

△ cel/ml $\times 10^{-8}$

○ presión osmótica (miliosmoles) durante el CDA sin crecimiento microbiano.

x presión osmótica (miliosmoles) durante el CDA con crecimiento microbiano.

μ^* velocidad específica de crecimiento durante el CDA (h^{-1}) calculada

μ^* : velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) que es posible alcanzar para diferentes valores de presión osmótica.

4.4. OBTENCION DE RHIZOBIUM PHASEOLI EN SISTEMA CONTINUO

El último paso para la producción de células de *Rhizobium* se realizó en un quimiostato. Este sistema de cultivo, si bien ha sido muy estudiado y se conoce su mayor productividad respecto del batch clásico⁽¹⁴⁰⁾ no es empleado para la producción de inoculantes. Por este motivo se realizaron estos estudios tendientes a establecer el comportamiento de las células de *Rhizobium phaseoli* en cultivos continuos y además comprobar si los medios empleados en batch son adecuados para este sistema.

4.4.1. Cultivos continuos empleando el medio balanceado en sistema discontinuo.

En estos experimentos se utilizó el medio de cultivo obtenido en los estudios sobre requerimientos nutricionales indicados en el ítem 4.1. del presente trabajo. Los resultados obtenidos se indican en el cuadro 7 y el gráfico 17. Los valores indicados en los mismos se obtuvieron luego de lograr la condición de estado estacionario para cada velocidad de dilución utilizada. Los parámetros indicadores del estado de régimen fueron: porcentaje de oxígeno disuelto, concentración de oxígeno en los gases de salida del fermentador, recuento celular, pH, y concentración de sacarosa residual.

Observando el cuadro 7 y el gráfico 17 vemos que utilizando este medio de cultivo se consume sólo parte de la fuente de carbono que ingresa al fermentador, desperdiciándose casi el 50% de la misma para las condiciones de máxima productividad. Por tanto la sacarosa no es el sustrato limitante del crecimiento como se había supuesto "a priori" en virtud de los estudios previos en cultivos discontinuos.

En cultivos en batch la sacarosa es totalmente consumida debido a que el o los sustratos "limitantes" (sustratos no indispensables pero aceleradores del crecimiento) van disminuyendo su concentración en función del tiempo y como consecuencia de ello la célula crece a menor velocidad obteniéndose una sucesión de velocidades específicas de crecimiento decrecientes, pero de cualquier manera la bacteria puede seguir desarrollándose. En cambio en los cultivos continuos la fuente hidrocarbonada no puede ser consumida totalmente debido a que el o los sustratos "limitantes" se encuentran en concentraciones tales que permiten un determinado ritmo metabólico, inferior al impuesto a la célula por la velocidad de dilución y por tanto el sistema se va lavando gradualmente, siendo mayor el exceso de fuente de carbono a medida que disminuye el tiempo de retención.

Cuadro N° 7

Cultivo continuo de Rhizobium phaseoli (Medio de cultivo balanceado en batch)

$D(h^{-1})$	$\bar{x}(cel.ml^{-1}) \times 10^{-8}$	Sacarosa (g.l ⁻¹) flujo de salida	% O ₂ disuelto	Productividad (cel.ml ⁻¹ .h ⁻¹) $\times 10^{-8}$	Sacarosa consumida (g.l ⁻¹)	Y = constante de rendimiento células producidas g sacarosa consumida $\times 10^{12}$
0,027	88	1,3	55	2,38	8,7	1,01
0,067	74	3,1	47	4,96	6,9	1,07
0,108	71	4,2	40	7,67	5,8	1,22
0,150	71	4,8	35	10,65	5,2	1,36
0,186	30	7,3	42	5,58	2,7	1,11

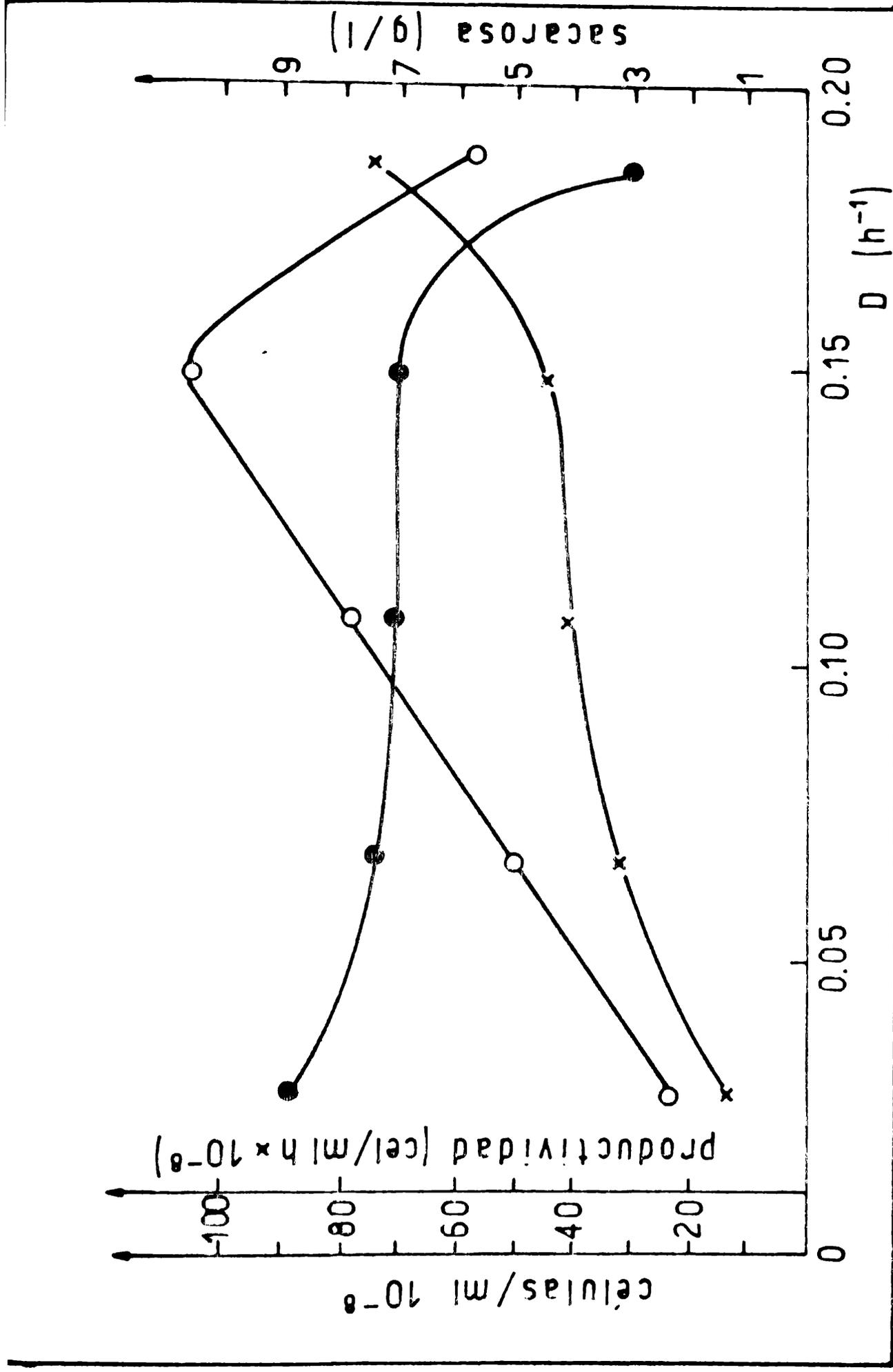


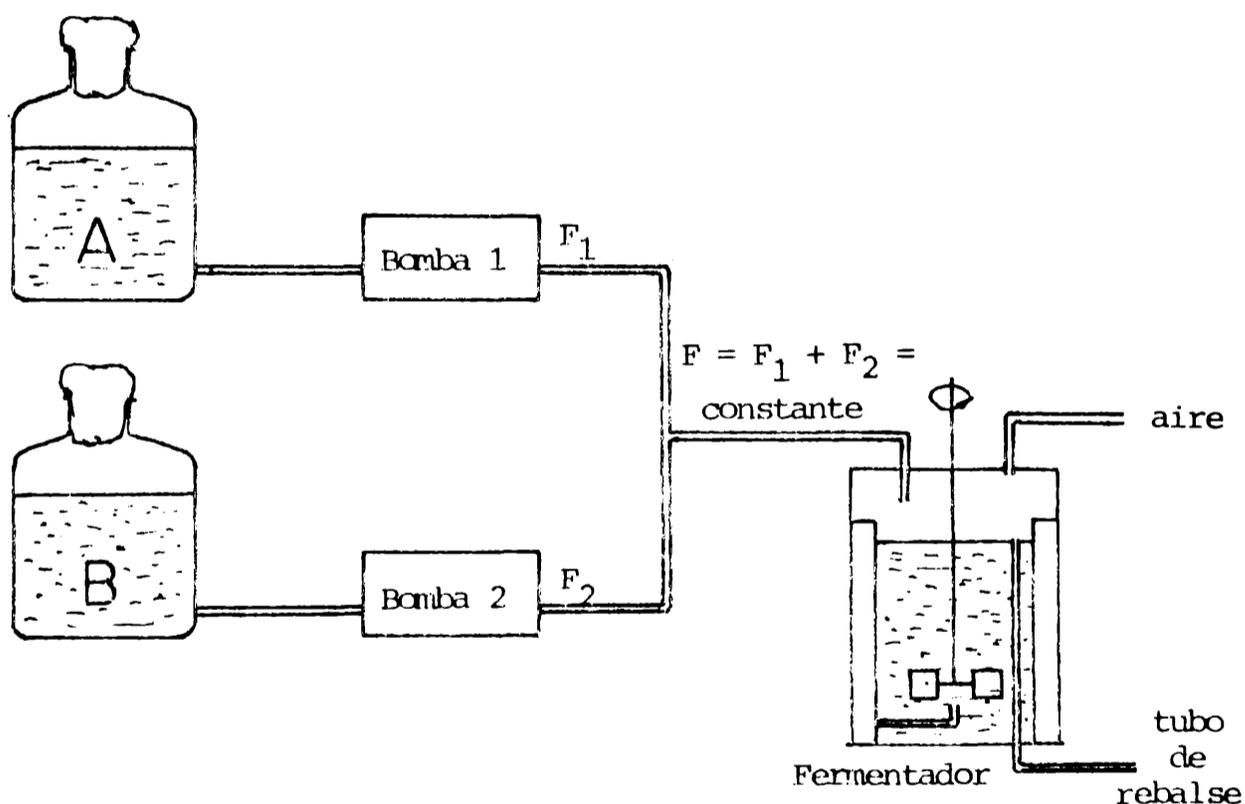
Figura 17. Crecimiento de la cepa F 45 de *Rhizobium phaseoli* a diferentes velocidades de dilución (D) en sistema continuo. Medio balanceado en sistema batch.

● cel/ml x 10⁻⁸ x sacarosa remanente (g/l) ○ productividad (cel/ml.h x 10⁻⁸)

4.4.2. Balance del medio de cultivo en sistema continuo.

Tomando como base los resultados obtenidos en el punto 4-1 referido a los requerimientos nutritivos de esta cepa de *Rhizobium phaseoli* se supuso que el o los factores "limitantes" del crecimiento deben ser componentes de la peptona o el extracto de levaduras, fundamentalmente alguna vitamina como la biotina que como fuera demostrado la cepa utilizada es dependiente de la presencia de dicho factor en los medios de cultivo para el desarrollo celular.

Por tanto, se diseñó un experimento similar al propuesto por Mateles y Batat⁽¹⁴¹⁾ pero donde en lugar de utilizar pulsos instantáneos de los constituyentes del medio de cultivo se trabajó con 2 reservorios conteniendo medio nutriente con concentraciones distintas de uno de sus componentes y que se bombean simultáneamente al fermentador a través de dos bombas peristálticas. En el esquema siguiente se muestra el dispositivo experimental utilizado.



El reservorio A contiene el medio de cultivo utilizado en la experiencia previa y el B contiene un medio de cultivo similar al que se le modificó alternativamente la concentración de extracto de levaduras y peptona llevando a ambas a 6 g/l. Se trabajó siempre a flujo constante ($D = \text{constante}$) y se fue modificando, en el tiempo, la relación de flujos de las 2 bombas. Para cada relación se esperó el establecimiento del estado estacionario por constancia en el tiempo de los parámetros

enunciados en el ítem 4.4.1. Una medida "a priori" del efecto que sobre el cultivo tendría cada modificación efectuada la constituyó la lectura del oxígeno disuelto. Este parámetro evolucionó en cada caso rápidamente luego de introducido el cambio en la relación de flujos de las bombas de forma tal que se podía prever si el cultivo reaccionaba positiva o negativamente a la modificación introducida en el medio de cultivo que ingresaba al sistema.

Operando de esta forma se varió la concentración de peptona y extracto de levaduras de 2 a 6 g/l. Utilizando este método, además de comprobar si se modifica el estado estacionario del que se parte, se obtiene el valor óptimo de concentración del componente del medio de cultivo en estudio.

En el cuadro 8a observamos que a medida que se aumentó la concentración de peptona en el medio que entraba al fermentador, se modificaba negativamente el estado estacionario de partida ya que el cultivo comenzó a lavarse y por tanto fue incrementándose el porcentaje de sacarosa no consumido. Probablemente este comportamiento sea debido a que a medida que se aumentó la concentración de peptona disminuyó el valor de pH afectando el normal desarrollo celular. En consecuencia, la inhibición del crecimiento sería atribuible al efecto secundario de la modificación del pH y no a un efecto primario de algún componente de la peptona que actúe como inhibidor.

En el cuadro 8b observamos que a medida que se aumentó la concentración de extracto de levaduras fue creciendo paulatinamente la población bacteriana hasta que la concentración del extracto fue de 5 g/l. Un aumento posterior a 6 g/l perjudicó el desarrollo celular, probablemente debido a la alta concentración de sustancias inhibitoras tal como fue discutido en el punto 4.1.5. Además la concentración de 5 g/l, a pesar de ser aquella con la que se obtuvieron los mejores resultados, tiene una elevada concentración de estas sustancias (inhibidoras), ya que se observó que para iniciar un cultivo continuo con el medio conteniendo esta concentración, era necesario que el recuento celular del batch original fuera superior a $50 \cdot 10^3$ cel/ml porque sino el sistema se lavaba. En todas las experiencias presentadas en este trabajo los cultivos continuos fueron iniciados a partir de caldos en sistema batch con concentraciones celulares del orden de $1 \cdot 10^{10}$ cel/ml.

BALANCE DEL MEDIO DE CULTIVO EN SISTEMA CONTINUO

Cuadro 8 a

Fuente de variación = peptona (INORP tipo MC8)

Sr = g/l de peptona en el flujo de entrada al fermentador.

Sr(g.l ⁻¹)	$\bar{x}(\text{cel.ml}^{-1}) \times 10^{-8}$	Sacarosa (g.l ⁻¹) (flujo de salida)	pH	% O ₂ disuelto
2	60	4,9	5,8	56
2,6	50	6,0	5,05	74
3,5	38	7,5	4,85	80

D = 0,1 h⁻¹ (constante para todos los valores de Sr).

Cuadro 8 b

Fuente de variación = Extracto de levaduras (Oxoid)
esterilizado por calor.

Sr = g/l de Extracto de Levaduras en el flujo de
entrada el fermentador.

Sr(g.l ⁻¹)	$\bar{x}(\text{cel.ml}^{-1}) \times 10^{-8}$	Sacarosa (g.l ⁻¹) (flujo de salida)	% O ₂ disuelto	% O ₂ gases de salida	pH
2	54	4,9	70	19,6	5,50
2,4	64	4,4	65	19,5	5,40
3,0	70	4,0	65	19,4	5,50
3,6	72	3,9	60	19,4	5,60
4,1	75	3,8	55	19,3	5,50
5,0	115	1,2	32	18,0	5,70
6,0	50	5,2	60	19,5	6,75

D = 0,1 h⁻¹ (constante para todos los valores de Sr)

Cuadro 8 c

Fuente de variación = Extracto de levaduras (Oxoid)
esterilizado por filtración.

Sr = g/l de extracto de levaduras en el flujo de entrada
del fermentador.

Sr(g.l ⁻¹)	$\bar{x}(\text{cel.ml}^{-1}) \times 10^{-8}$	Sacarosa (g.l ⁻¹) (flujo de salida)	% O ₂ disuelto	% O ₂ gases de salida	pH
2,0	60	4,7	68	19,5	5,50
2,55	65	4,2	63	19,5	5,60
3,55	70	3,7	64	19,6	5,60
4,0	70	3,8	58	19,6	5,65
5,0	118	1,0	30	18,0	5,70
6,0	60	4,9	65	19,6	6,60

D = 0,1 h⁻¹ (constante para todos los valores de Sr)

Como resultado de este estudio surgió que el o los factores "limitantes" del crecimiento estaban parcial o totalmente contenidos en el extracto de levaduras y que con concentraciones del mismo de 5 g/l se aumentaba sensiblemente el azúcar consumido.

4.4.3. Utilización del medio de cultivo esterilizado por filtración.

A fin de estudiar con más detenimiento la naturaleza de las sustancias presentes en el extracto de levaduras que aceleran el desarrollo de las células de *Rhizobium* se utilizó un diseño experimental idéntico al indicado en el punto anterior, pero los medios contenidos en los reservorios fueron esterilizados por filtración. De esta forma, comparando los resultados del cuadro 8b con los obtenidos en este experimento se podría distinguir entre sustancias termolábiles y termoestables. De acuerdo con la bibliografía^{(116) (117) (122)} los factores de crecimiento comunmente requeridos por las especies de *Rhizobium* de crecimiento rápido son: biotina, pantotenato de calcio y tiamina. Las dos últimas son consideradas termolábiles, mientras que la biotina es considerada termoestable^{(137) (142)}.

En virtud de los resultados obtenidos en este nuevo ensayo (cuadro 8c) vemos que no existen diferencias utilizando medios esterilizados por filtración o por autoclavado, por lo que se concluyó que el o los factores "limitantes" encontrados en el punto 4.4.1. son de naturaleza termoestable. Por tanto se podrá pensar que la biotina sería uno de los factores limitantes más importantes. Para tener mayor certeza sobre esta presunción se realizó una nueva experiencia que consistió en agregarle a un cultivo continuo en estado estacionario obtenido con el medio balanceado para batch (Medio N°4 cuadro 3), un pulso de una solución de biotina (esterilizada por filtración) de forma tal que la concentración de la vitamina fuera de 200 ug/ml en el momento del agregado y se siguió la modificación del estado estacionario. Se vio un aumento de la concentración celular hasta un valor similar al obtenido con el medio que contiene 5 g/l de extracto de levaduras (figura 18). De esta forma se puede asegurar con mayor precisión que el principal sustrato limitante del crecimiento microbiano mencionado en el punto 4.4.1., contenido en el extracto de levaduras, es la biotina. Es de hacer notar que el pulso de biotina produjo en las primeras 30 horas

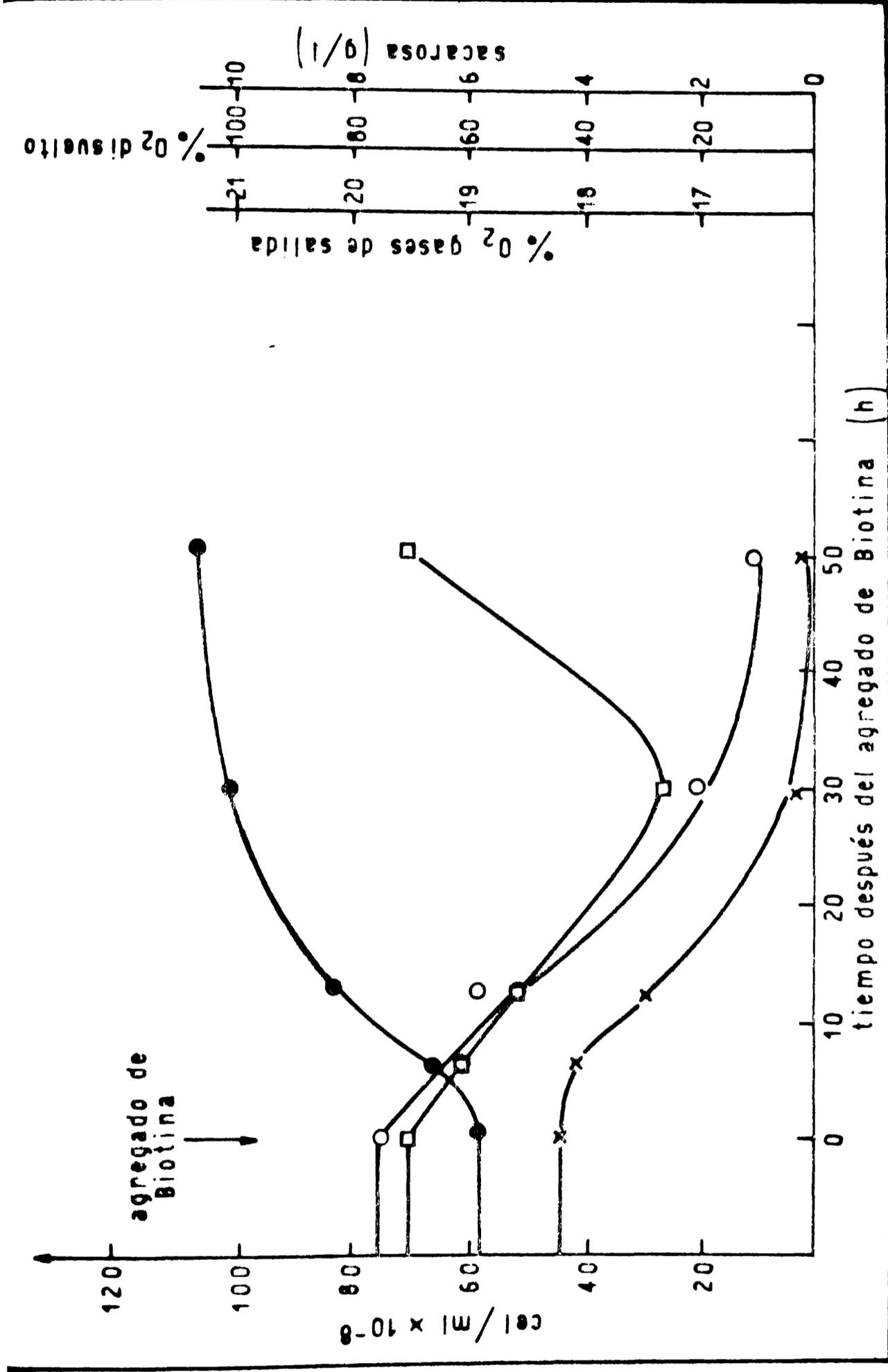


Figura 18. Efecto del agregado de Biotina a un cultivo continuo en estado estacionario de la cepa F 45 de Rhizobium phaseoli. Medio balanceado en sistema batch. Velocidad de dilución (D) = 0,1 h⁻¹.

- cel/ml $\times 10^{-8}$
- × % O_2 en los gases de salida del fermentador
- % O_2 disuelto
- sacarosa remanente (g/l)
- sacarosa (g/l)

modificaciones del cultivo tales como los mostrados en la figura 18. Es decir aumentó el recuento celular y el consumo de sustrato hidrocarbonado hasta valores similares a los observados en los cultivos continuos con el medio de cultivo rebalanceado en este sistema (fig. 19), pero luego no se pudo llegar a estado estacionario debido a que aumentó notablemente la producción de polisacáridos extracelulares (goma) y el cultivo quedó limitado en oxígeno como consecuencia de la viscosidad alcanzada por el mismo (ver curva de consumo de O_2 fig. 18). Este fenómeno ocurrió en dos experiencias sucesivas y en ambos no fue posible alcanzar nuevamente el estado estacionario del que se partió en las 70-80 horas posteriores al agregado de biotina. Este fenómeno no tiene explicación posible en base a la bibliografía conocida pero hace pensar en un posible rol de la biotina en la síntesis de polisacáridos extracelulares por *Rhizobium*.

4.4.4. Resultados obtenidos empleando el medio modificado conteniendo 5 g/l de extracto de levaduras.

Finalmente se realizó un nuevo cultivo continuo con el medio balanceado para tal fin. Los resultados obtenidos se indican en el cuadro 9 y la figura 19.

Se observa que utilizando este medio de cultivo se logra aumentar considerablemente el aprovechamiento de la fuente hidrocarbonada con un aumento sustancial de la productividad. De cualquier forma no podemos asegurar que la sacarosa sea el sustrato limitante del crecimiento microbiano ya que si graficamos $\frac{1}{u}$ vs $\frac{1}{s}$ (figura 20) (Linewaver-Burk) obtenemos valores para K_s del orden de 1,17 g/l mientras que los valores normales para bacterias son de alrededor de unos pocos mg/l. Aunque tenemos que tener en cuenta, tal como lo dice Pirt⁽¹²⁴⁾, que es difícil el cálculo de K_s con las técnicas analíticas habituales, como la usada para dosar sacarosa en este trabajo y más en un medio de elevada complejidad como el empleado en estos cultivos.

De la misma figura obtenemos el valor de u_{max} por extrapolación y vemos que es de $0,21 \text{ h}^{-1}$ que corresponde a un tiempo de generación para esta bacteria de 3,3 horas. Por tanto lo indicado en la Nota del punto 4.2 es correcto y los valores de velocidad específica de crecimiento utilizados como comparación en la parte de estudios de condiciones de operación pueden ser

Cuadro N°9

Cultivo continuo de *Rhizobium phaseoli* (Medio balanceado en continuo)

$D(h^{-1})$	$\bar{x}(cel.ml^{-1}) \times 10^{-8}$	Sacarosa (g.l ⁻¹) (flujo de salida)	%O ₂ disuelto	%O ₂ en los gases de salida	Productividad ₋₈ (cel.ml ⁻¹) x 10 ⁻⁸	Sacarosa consumida (g.l ⁻¹)	Y=constante de rendimiento cél. producidas g. sacarosa consumida x 10 ¹²
0,033	118	0,3	66	19,8	3,89	9,7	1,22
0,065	125	0,5	45	18,8	8,12	9,5	1,31
0,113	112	1,3	34	17,9	12,65	8,7	1,28
0,148	95	3,1	39*	17,8	12,87	6,9	1,37
0,180	40	6,8	60	20,4	8,82	3,2	1,25

* Se aumentó la agitación a 500 rpm.

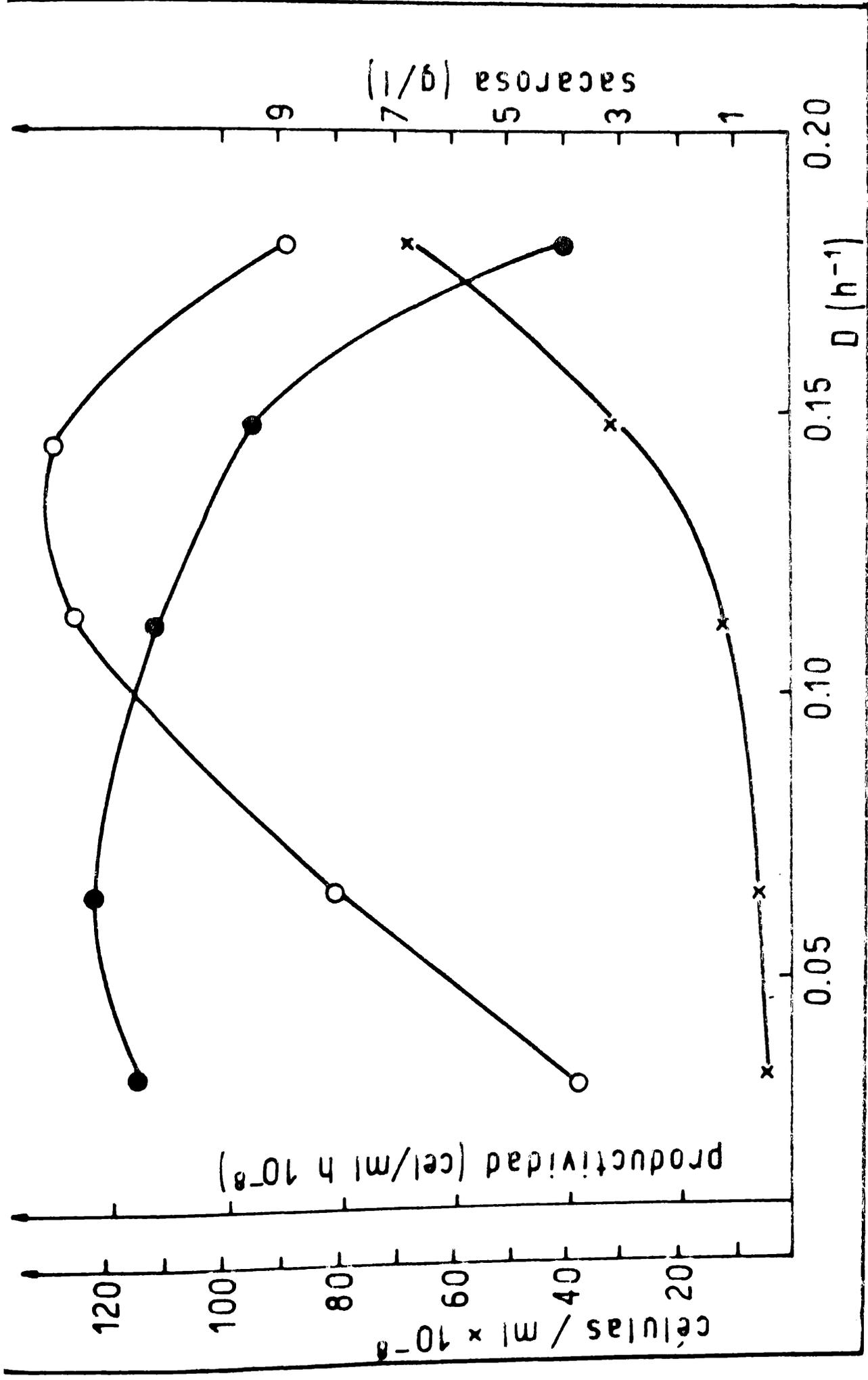


Figura 19. Crecimiento de la cepa F 45 de *Rhizobium phaseoli* a diferentes velocidades de dilución (D) en sistema continuo. Medio rebalanceado en sistema continuo.

- cel/ml × 10⁻⁸
- Productividad (cel/ml.h × 10⁻⁸)
- × sacarosa remanente (g/l)

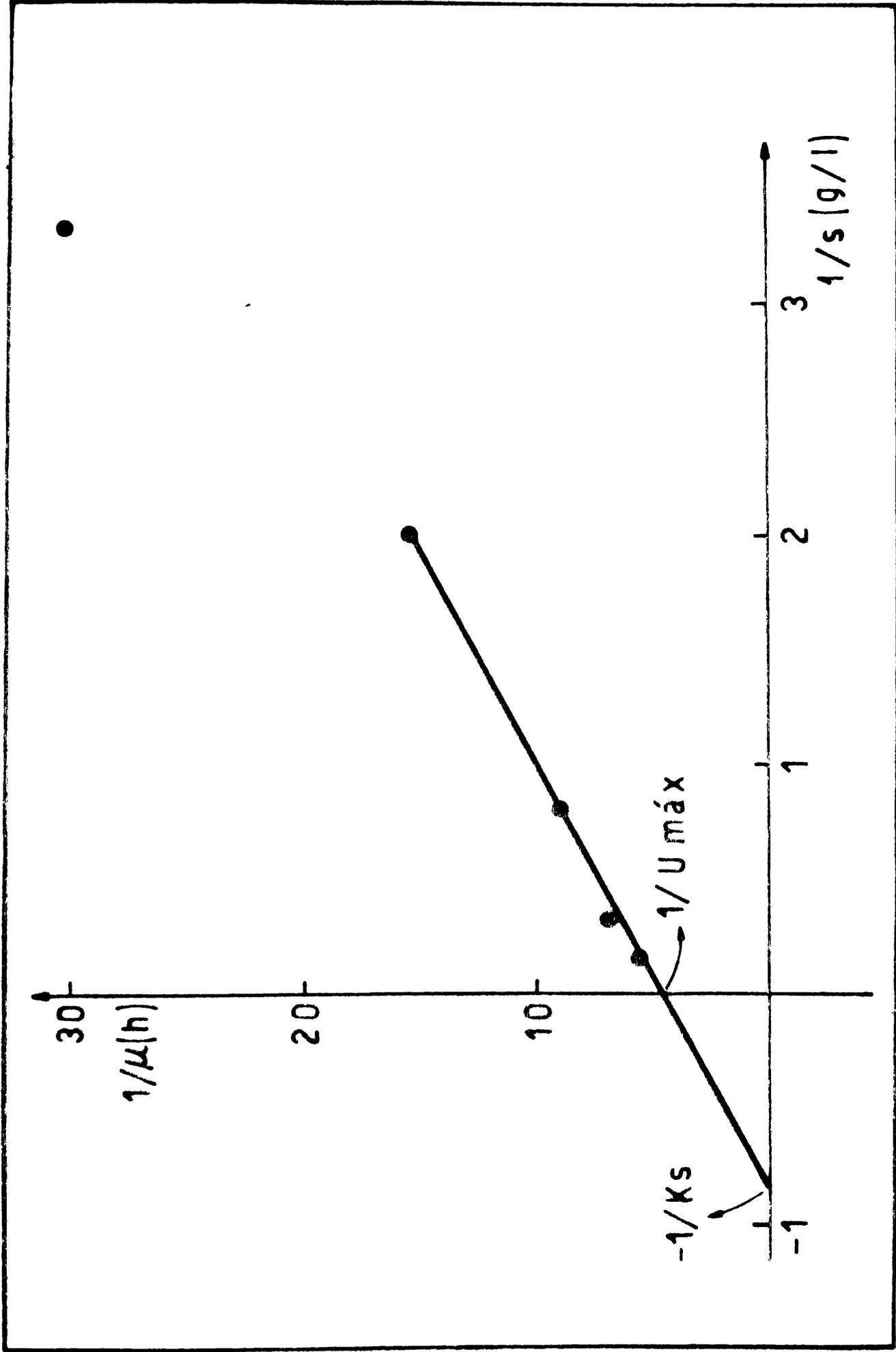


Figura 20. Cálculo de la velocidad específica máxima de crecimiento para la cepa F 45 de Rhizobium phaseoli a partir de los datos obtenidos en el cultivo continuo.

Cuadro N°10

Datos comparativos de cultivos en batch, fed-batch y continuo

	S i s t e m a d e c u l t i v o		
	Batch	Fed-Batch	Continuo*
Máxima concentración celular (cel. ml^{-1})	12×10^9	49×10^9	7×10^9 ^{1a} 9×10^9 ^{2b}
Coefficiente de rendimiento ($\frac{\text{cel. producidas}}{\text{g. sacarosa consumida}}$)	$1,1 \times 10^{12}$	$1,3 \times 10^{12}$	$1,3 \times 10^{12}$
Productividad ($\text{cel. ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$3,75 \times 10^8$	$7,42 \times 10^8$	$10,65 \times 10^8$
Relación de productividades con el batch	1	1,98	2,84
Relación de productividades con el fed-batch	-	1	1,43

* Datos tomados en las condiciones de máxima productividad

a Cultivo continuo con el medio balanceado en batch

b Cultivo continuo con el medio balanceado para continuo

considerados sólo parámetros promedio y no constantes metabólicas del microorganismo.

Del análisis de estos resultados surge que la utilización del sistema continuo para la producción de caldos de *Rhizobium* destinados a la elaboración de inoculantes es una alternativa válida que aumenta considerablemente la productividad de una planta de producción tal como se verá en el punto siguiente.

4.4.5. Comparación de los sistemas batch, fed-batch y continuo en la producción de células de *Rhizobium phaseoli*.

En el cuadro 10 se comparan los parámetros representativos de los diferentes sistemas de cultivos en lo que se refiere a su utilización para producción de células destinadas a la impregnación de soportes para la preparación de inoculantes. Vemos que los cultivos continuos, aún utilizando medios de cultivo no óptimamente balanceados, brindan una productividad muy superior a los otros sistemas, sin tener en cuenta en su cálculo los tiempos de carga, descarga y esterilización de los fermentadores que es muy superior para el caso de los cultivos discontinuos que para los continuos. Además de estas ventajas tienen otras secundarias como lo es que la impregnación de soportes no es compulsiva cuando un proceso finaliza, como ocurre con los sistemas discontinuos, sino que es continua a medida que va saliendo el caldo del fermentador. Además, variando la concentración de nutrientes en el medio de entrada se puede ajustar la concentración bacteriana del caldo de salida a los valores óptimos recomendados para la impregnación de soportes.

Por lo tanto, si bien la operatividad en sistema continuo no es sencilla y es además difícil mantener la asepsia de dicho sistema, el diseño de una planta de producción de inoculantes en continuo es factible y dada su gran productividad es posible, con fermentadores de pequeño tamaño, la obtención de gran cantidad de producto.

4.5. ELABORACION Y ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA DE INOCULANTES PARA *Phaseolus vulgaris* L.

Dentro del plan general de trabajo existe un punto referido a diferentes formas de elaboración de inoculantes y distintas maneras de conservar el producto obtenido. De esta forma se concluiría con todo lo referente a inoculantes ya que se han visto

3 diferentes formas de obtener los caldos para la impregnación de los soportes, como ya fue presentado y ahora trataremos lo referente al producto en sí. Se eligió como soporte turba, debido a que ésta es la más utilizada en todo el mundo y también a que la gran mayoría de los inoculantes que se comercializan en nuestro país son en base a este soporte. Existen en nuestro país dos tipos de turberas: las de cuencas que se desarrollan en áreas depresivas o en las márgenes de lagos y lagunas y las de valle, formadas en las cercanías de ríos y torrentes. En cuanto a su constitución, las que se encuentran al norte del paralelo 52 son de gramíneas en su mayoría, mientras las que se hallan al sur de dicho paralelo están compuestas de restos de musgos y ciperáceas. Estas últimas forman los depósitos más importantes fundamentalmente en Tierra del Fuego e islas circundantes que representan la casi totalidad de las reservas turbíferas conocidas⁽¹⁴³⁾. Debido a ello y además a que estudios previos dieron como resultado que las turbas de Tierra del Fuego son aptas para la elaboración de inoculantes es que se usaron soportes provenientes de esa zona austral⁽¹⁴⁴⁾

Para facilitar la evaluación a través del tiempo de los inoculantes y además, porque este tipo de productos son actualmente de gran difusión en otros países, tal el caso de Australia, es que prepararon inoculantes con soporte estéril. Además se creyó necesario fijar las pautas para que los productores nacionales conozcan la metodología de elaboración y facilitar de este modo la implantación de este tipo de tecnología en la obtención de inoculantes.

Los factores estudiados en cuanto a elaboración fueron: concentración inicial de bacterias en la turba y composición del medio donde las mismas están suspendidas. En cuanto a la conservación se estudiaron 4 diferentes formas de almacenaje. Se trabajó con el inoculante para semillas tradicional y se introdujo el producto granulado, que se utiliza aplicándolo directamente al suelo debido a que éste es utilizado en otros países con éxito y sería de esperar que en el futuro pueda implementarse su uso en la República Argentina. Los resultados de la experiencia se muestran en el cuadro 11.

La dosis empleada de radiación gamma fue insuficiente para lograr la esterilidad en la gran mayoría de las bolsitas

Cuadro N° 11

Supervivencia en función del tiempo en los inoculantes

	ALMA 1						ALMA 2						ALMA 3						ALMA 4													
	CONC 1		MEDI 1		MEDI 2		CONC 1		MEDI 1		MEDI 2		CONC 1		MEDI 1		MEDI 2		CONC 1		MEDI 1		MEDI 2		CONC 1		MEDI 1		MEDI 2			
	TAMI 1	TAMI 2																														
PERI 1	50	133	260	0	300	170	0	0	220	69	150	0	290	600	280	110	33	0	53	0	100	0	0	8	0	0	43	0	100	0	0	0
PERI 2	120	75	231	28	150	120	105	23	50	34	172	1	243	112	310	26	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PERI 3	230	113	221	27	120	87	20	29	141	57	90	11	257	210	93	0	0	0	0	0	8	0	0	22	0	0	8	0	12	0	0	0
PERI 4	277	78	148	24	331	146	25	18	134	81	25	6	165	292	118	8	14	0	2	0	3	0	0	1	3	0	14	0	3	0	4	0
PERI 5	124	20	61	10	112	58	18	6	40	28	10	6	75	88	62	3	12	0	1	0	2	1	1	1	23	0	3	0	0	2	5	

Nota: Cada valor corresponde al número de colonias formadas empleando una dilución de 1×10^{-7}

Los significados de las abreviaturas de los diferentes tratamientos están explicados en el ítem 3.2.

utilizadas. Debido a ello se perdieron por contaminación muchas repeticiones de cada uno de los tratamientos, por lo que se agruparon (sin repeticiones) y se recurrió al uso de las interacciones triples, cuádruples y quíntuples para el cálculo del error experimental.

Realizado el análisis de varianza de los recuentos presentados en el cuadro 11 se encontró una diferencia altamente significativa (F experimental = 48,8 F teórico p 0,01 = 3,97) entre los tratamientos de conservación ALMA 1 y ALMA 2 respecto de ALMA 3 y ALMA 4. Es decir entre los inoculantes que luego de su elaboración se dejaron a temperatura ambiente y los que inmediato a la impregnación fueron sometidos al efecto de bajas temperaturas (4°C). Este hecho surge claramente observando el cuadro 11 en ambas mitades. Vemos un gran número de recuentos nulos, para la dilución empleada, en las columnas correspondientes a ALMA 3 y ALMA 4. Por tanto, la primera conclusión de este experimento es que es necesario madurar los inoculantes luego de la impregnación de la turba con el caldo bacteriano ya que las bajas temperaturas iniciales afectan marcadamente la supervivencia de esta cepa de *Rhizobium phaseoli*. Esta observación no tiene precedentes bibliográficos para las bacterias del género *Rhizobium*. Además, idénticos resultados fueron observados accidentalmente en nuestro laboratorio con caldos de esta cepa ya que suspensiones con recuentos celulares del orden de 1×10^{10} cel/ml colocadas en heladera (4°C) dieron recuentos nulos con diluciones de 1×10^{-7} al cabo de 2 a 3 semanas.

El ANAVAR mencionado presentó un coeficiente de variación porcentual muy elevado ($CV \% = 93,5$). Por esto, y debido a las diferencias ya mencionadas entre las formas de almacenamiento con y sin maduración es que se redimensionó la experiencia suprimiendo del análisis estadístico las formas de conservación ALMA 3 y ALMA 4. De esta forma el diseño queda como un factorial completo sin repeticiones de $5 \times 2 \times 2 \times 2 \times 2$ y se recurrió a las interacciones triples, cuádruples y quíntuples como sustituto del error experimental. El nuevo ANAVAR realizado para este diseño experimental presentó un coeficiente de variación sensiblemente reducido respecto al primitivo ($CV \% = 61$). La magnitud de este valor es atribuible no solamente a la

falta de repeticiones (y por tanto al artificio utilizado para evaluar el error experimental) sino también a la complejidad del diseño factorial y las variaciones propias del método de medida (Recuentos por dilución en Cajas de Petri). Por tanto, este valor de CV % aunque aún alto no descalifica las conclusiones que se presentan en base a los resultados obtenidos.

En los cuadros 12a y b se indican la tabla de valores medios y los resultados del ANAVAR respectivamente.

Del cuadro 12 b surge que no existen diferencias significativas, en cuanto a la supervivencia de las bacterias en el inoculante, entre las dos formas de almacenaje estudiadas (ALMA 1 y ALMA 2). Este resultado se contradice con los obtenidos por otros autores⁽¹⁴⁵⁾ ⁽¹⁰²⁾ para diferentes especies de *Rhizobium* quienes muestran una mayor viabilidad en función del tiempo conservando los inoculantes a bajas temperaturas. Por tanto, los inoculantes conteniendo bacterias de esta cepa de *Rhizobium phaseoli* pueden ser mantenidos a temperatura ambiente (10 a 25°C) en lugares adecuados y no es necesario implementar un sistema de frío para su conservación.

Respecto a los recuentos en función del tiempo vemos, en el cuadro 12 b diferencias significativas para los componentes de 1° y 3° grado. Si graficamos los valores medios de recuentos del cuadro 12 a observamos una curva típica de supervivencia de células (Fig. 21). Vemos en el primer período (desde impregnación hasta el día 115) una cinética de mortandad de 1° orden, luego se alternan períodos de aumentos y descensos del número de células viables (3° orden) siendo este comportamiento conocido como crecimiento "críptico"⁽¹⁴⁶⁾. En la última etapa, entre los 270 y 350 días observamos nuevamente una etapa lineal de mortandad, no debiendo excluirse la posibilidad de que exista una nueva fase de crecimiento a partir de esa última determinación.

Encontramos además una interacción significativa (cuadro 12b) entre el período de recuento y el medio de resuspensión empleado (PERI x MEDI). Esta se manifiesta fundamentalmente a los 50, 190 y 270 días, ya que mientras los recuentos decrecen en forma constante para los inoculantes impregnados con células resuspendidas en el medio completo, los obtenidos a partir de células resuspendidas en las sales del medio presentan períodos alterna-

Cuadro N°12 a

Tabla de medias de los tratamientos

		1	2	3	4	5
	PERI	164,50	112,00	106,63	117,25	45,06
	ALMA	101,50	116,68			
	CONC	88,67	129,50			
	MEDI	149,80	68,37			
	TAMI	145,50	72,67			
ALMA X	PERI					
1		114,13	105,50	105,88	130,88	51,13
2		214,88	118,50	107,38	103,63	39,00
CONC X	PERI					
1		110,25	87,88	111,25	96,63	37,38
2		218,75	136,13	102,00	137,88	52,75
TAMI X	PERI					
1		193,75	171,63	146,50	152,88	62,75
2		135,25	52,38	66,75	81,63	27,38
CONC X	ALMA					
1		111,01	66,25			
2		91,70	167,01			
MEDI X	ALMA					
1		140,30	159,30			
2		62,70	74,05			
TAMI X	ALMA					
1		144,75	146,25			
2		58,30	87,01			
MEDI X	CONC					
1		137,30	153,70			
2		40,05	105,30			
TAMI X	MEDI					
1		171,05	119,95			
2		128,55	16,80			

Nota: Cada valor corresponde a la media del número de colonias del tratamiento indicado, empleando una dilución de 1×10^{-7} .

1; 2; 3; 4 y 5 corresponden a los niveles de las variables en estudio: 5 niveles (períodos) de tiempo; 2 niveles (concentración) de inóculo, 2 niveles (composición) de medio de cultivo; 2 niveles (formas) de almacenamiento y 2 niveles (granulometría) del soporte.

Cuadro N° 12 b

Análisis de la variancia

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F. Exp.
PERI	4	116.014,46	29.003,62	6,32**
Grado 1	1	90.531,31	90.531,31	19,73**
Grado 2	1	556,20	556,20	0,12NS
Grado 3	1	24.912,70	24.912,70	5,43*
Grado 4	1	14,26	14,26	0,01NS
ALMA	1	4.605,61	4.605,61	1,00NS
CONC	1	33.333,52	33.333,52	7,26**
MEDI	1	132.600,13	132.600,13	28,90**
TAMI	1	106.069,44	106.069,44	23,11**
PERI X ALMA	4	40.239,91	10.059,98	2,19NS
PERI X CONC	4	31.161,66	7.790,42	1,70NS
PERI X MEDI	4	55.323,39	13.830,85	3,01*
PERI X TAMI	4	15.253,68	3.813,42	0,83NS
ALMA X CONC	1	72.059,81	72.059,81	15,70**
ALMA X MEDI	1	292,61	292,61	0,06NS
ALMA X TAMI	1	3.740,11	3.740,11	0,82NS
CONC X MEDI	1	54.444,45	54.444,45	11,87**
CONC X TAMI	1	11.931,57	11.931,57	2,60NS
MEDI X TAMI	1	18.392,02	18.392,02	4,00NS
ERROR EXP.	49	224.836,05	4.588,49	

MEDIA: 109,09 F Tabular (1;49) 5%: 4,04 F Tabular (4;49) 5%: 2,56

C.V.: 62,1% F Tabular (1;49) 1%: 7,21 F Tabular (4;49) 1%: 3,75

*: Valor significativo P: 0,05

** : Valor altamente significativo P: 0,01

NS: Valor no significativo

tivos de disminución y aumento de células viables. Si observamos el gráfico 21 nos encontramos con que es bien notorio el comportamiento "críptico" para las células resuspendidas en las sales del medio, mientras que para el caso de las bacterias resuspendidas en medio completo vemos una constante disminución del número de microorganismos viables, lo que probablemente se deba a algún factor del ambiente que afecte su multiplicación. Este hecho se manifiesta más claramente en el cuadro 12 b para el medio de resuspensión (MEDI). Vemos que hay diferencias significativas en la viabilidad de acuerdo al tipo de suspensión bacteriana utilizada. Los inoculantes obtenidos con células en las sales del medio presentan un recuento superior en un 120% (cuadro 12 a) a los obtenidos con bacterias en el medio fresco completo. Este hecho puede ser atribuible a la inhibición del desarrollo celular que esta cepa de *Rhizobium phaseoli* muestra en el medio con alta tonicidad, tal como se demostró en el ítem 4.3 del presente trabajo. Incluso este fenómeno se resalta al impregnar los soportes con altas concentraciones celulares como lo demuestra la interacción altamente significativa entre concentración y tipo de medio de resuspensión empleado (CONC x MEDI) (Cuadro 12 b). Si comparamos en base a los datos del cuadro 12 a los valores de recuentos de turbas impregnadas con altas concentraciones celulares en las sales del medio de cultivo con los inoculantes preparados con idéntica concentración celular pero en el medio completo, vemos que los primeros son 3 veces superiores a estos últimos.

Se muestran además en el cuadro 12 b diferencias significativas en los recuentos de los inoculantes en función de la concentración inicial de bacterias en los mismos. Mientras mayor es el recuento inicial, mayor será la concentración de células viables durante el almacenaje, alcanzándose diferencias cercanas al 50 % para las dos concentraciones iniciales empleadas en este estudio (cuadro 12 a). Estos resultados se contradicen con lo publicado por otros autores, en especial Roughley (147) quien no encuentra diferencias en los recuentos de inoculantes en función del tiempo a pesar de que estos sean preparados a partir de caldos de diferente riqueza celular. Estas diferencias tienen que deberse, de acuerdo a lo mencionado por este mismo autor y otros investigadores (112) (145), a la

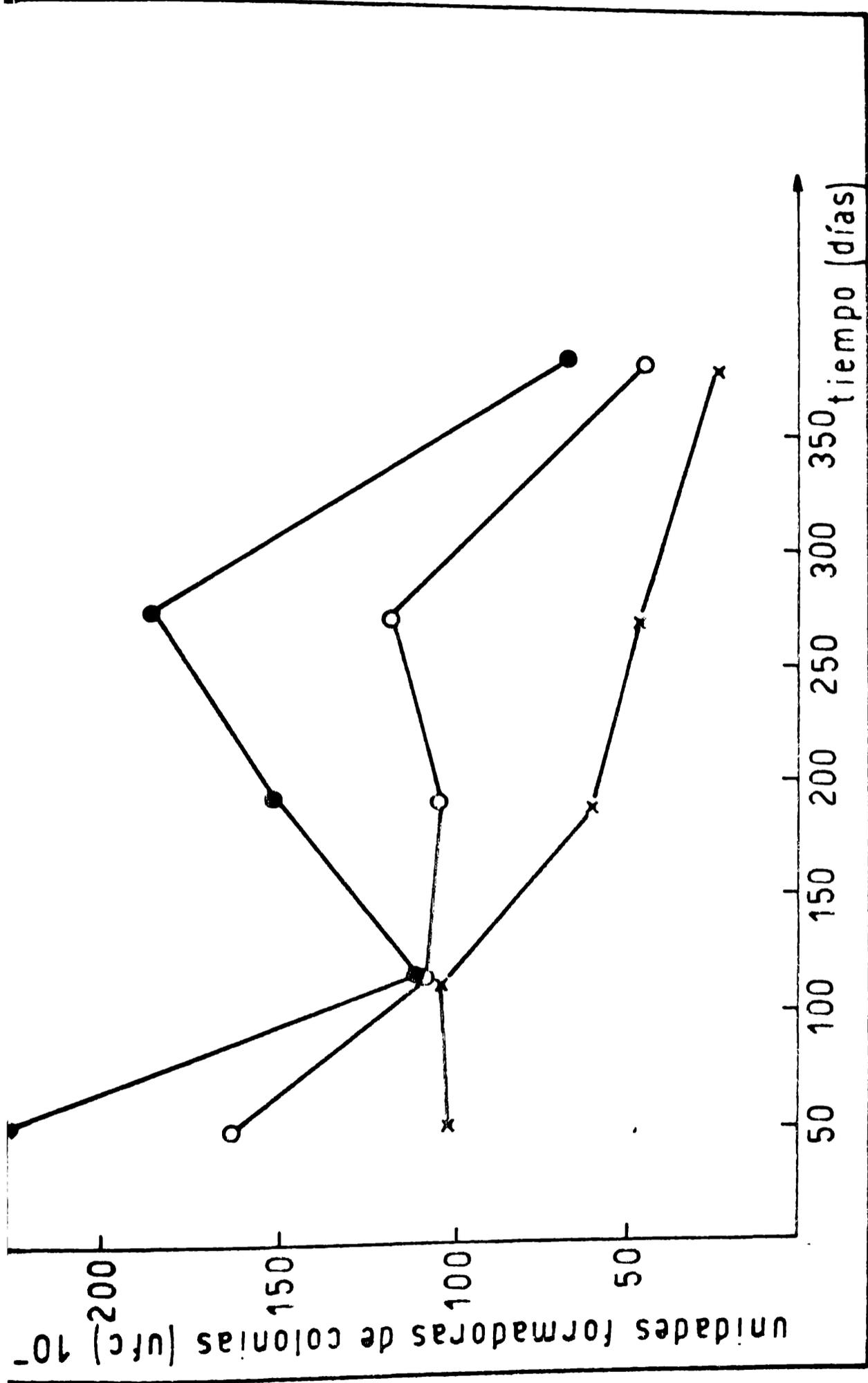


Figura 21. Supervivencia de *Rhizobium phaseoli* (F 45) en inoculantes a base de turba esterilizada. u.f.c. = unidades formadoras de colonias.

- u.f.c. $\times 10^{-7}$ Valores promedio de todos los recuentos
- u.f.c. $\times 10^{-7}$ Valores preparados a partir de la suspensión bacteriana en las sales del medio de cultivo.
- x u.f.c. $\times 10^{-7}$ Valores preparados a partir de la suspensión bacteriana en el medio de cultivo completo.

naturaleza de la turba utilizada en los diferentes estudios. Por tanto para la elaboración de inoculantes con turbas provenientes de Tierra del Fuego, es necesario obtener caldos de *Rhizobium* con alto recuento final para asegurar una adecuada calidad del producto.

Respecto a la concentración, vemos en el cuadro 12 b que ésta presenta una interacción significativa con la forma de almacenamiento (CONC x ALMA). Este fenómeno se manifiesta muy claramente conservando a temperatura ambiente (ALMA 2) ya que se obtuvieron valores de recuentos 2,5 veces superiores para los inoculantes de mayor concentración inicial respecto de los obtenidos con suspensiones diluídas de bacterias (cuadro 12 a).

Otro resultado obtenido es el diferente comportamiento entre los 2 tipos de soporte utilizados (TAMI) (Cuadro 12 b) Se obtienen valores de recuento 100 % superiores en los soportes finos o en polvos (diámetro de partícula < 70 micrones) a los soportes de mayor granulometría (diámetro mínimo de partícula > 400 micrones). Este hecho puede atribuirse a la diferente superficie específica de estos últimos ya que según Dart y col. ⁽¹⁴⁸⁾, las células de *Rhizobium* se encuentran atrapadas y protegidas por una matriz fibrilar que las conecta con la superficie de las partículas de turba y además hay células "acomodadas" en orificios de las partículas. Por tanto cuanto mayor es la superficie específica de la turba, mayor será la cantidad de células que pueden ser atrapadas y protegidas por unidad de peso de soporte. Además, y para tratar de explicar esta observación debemos tener en cuenta que la composición química de los dos tipos de turba son diferentes, ya que presenta diferencias en cuanto a relación C/N, porcentaje de materia orgánica y concentraciones de Fósforo, Calcio y Potasio ⁽¹⁴⁴⁾, siendo alguno de estos elementos, en especial el ion Ca^{++} , de gran importancia en la supervivencia de las bacterias de acuerdo a lo informado por algunos autores ^{(116) (146)}.

Como una discusión final de este estudio quedan claros distintos aspectos relacionados con la elaboración y conservación de inoculantes para poroto. Entre ellos, podemos mencionar como los más importantes: la necesidad de madurar los

inoculantes luego de su impregnación debido al efecto perjudicial de las bajas temperaturas iniciales, la buena conservación del producto a temperatura ambiente, que no difiere del producto conservado en heladera (luego de la etapa de maduración), la no necesidad de enriquecer el caldo bacteriano con nutrientes, la importancia de impregnar los soportes con suspensiones microbianas de alta concentración celular cuando se utiliza turba proveniente de Tierra del Fuego, y el mejor comportamiento como soporte de la turba finamente molida respecto del producto granulado en relación al mantenimiento de altos recuentos de células viables al cabo del tiempo.

4.6. SELECCION DE CEPAS DE RHIZOBIUM PHASEOLI FRENTE A LA LEGUMINOSA HUESPED (Paseolus vulgaris).

El poroto seco, tipo alubia, es uno de los cultivos de secano más importantes en el Noroeste Argentino⁽¹⁴⁹⁾ y como en este cultivo no es usual la práctica de la inoculación de las semillas⁽¹⁵⁰⁾ es que se realizó este estudio. Se evaluó el comportamiento individual de cuatro cepas de *Rhizobium phaseoli* frente a esta leguminosa y además se estudió la competencia por sitios de infección nodular entre ellas y con las cepas autóctonas, vastamente distribuídas en toda la zona del cultivo.

Las experiencias fueron llevadas a cabo en dos etapas. La primera en cámara de clima controlado con 4 cepas de *Rhizobium phaseoli* y la segunda a campo en Cerrillos (Salta) con 3 cepas seleccionadas en la etapa anterior. La experiencia a campo fue repetida dos campañas consecutivas para confirmar los resultados, siendo realizado el ensayo de la segunda campaña en dos localidades diferentes de la zona de cultivo de poroto.

4.6.1. Resultados obtenidos en la experiencia en cámara de clima controlado.

Los resultados se muestran en los cuadros 13 a y 13 b. El cuadro 13a muestra a las cepas F 48 y F 45 como las más eficientes en la fijación de Nitrógeno de acuerdo a los valores significativamente superiores de peso seco de parte aérea obtenidos. La cepa 492 presenta un valor de este parámetro que

indica una aceptable tasa de fijación aunque inferior a las dos cepas mencionadas anteriormente. En cuanto a la cepa 4012, si bien es muy infectiva, como lo indica el valor de peso seco de nódulos, es totalmente ineficiente en la fijación de nitrógeno, ya que el valor de peso seco de parte aérea obtenido en las jarras inoculadas con este estirpe no difiere significativamente del testigo sin inocular. ;

Los tratamientos inoculados con la mezcla de cepas dieron valores de peso seco de parte aérea inferiores a los obtenidos con las cepas F 48 y F 45. Este comportamiento podría ser atribuido al hecho de que los nódulos de estas plantas fueron formados, además de por las cepas eficientes, por las dos restantes (492 y 4012) como lo indica el cuadro 13 b y estas estirpes son menos eficientes en la fijación de Nitrógeno.

Respecto a la nodulación, las cepas eficientes dan un adecuado valor de peso seco de nódulos, pero idéntico comportamiento se obtiene con las estirpes menos eficientes. Estos resultados confirman los obtenidos por otros autores ⁽⁶⁴⁾ ⁽¹⁵¹⁾ quienes informaron la no existencia de una relación directa entre masa o número de nódulos y eficiencia de los mismos. El valor excepcionalmente elevado de nodulación obtenido en el tratamiento inoculado con la mezcla de cepas adicionado con Nitrógeno parecería contrariarse con una vasta bibliografía al respecto ⁽¹⁵²⁾ ⁽¹⁵³⁾ que indica la inhibición de la nodulación por el Nitrógeno combinado. Sin embargo este valor coincide con lo informado por otros autores entre los que se cuentan Guss y Dobereiner ⁽¹⁵⁴⁾ que para *Phaseolus vulgaris* encontraron que para dosis de Nitrógeno (como KNO_3) de hasta 46 ppm se presenta un incremento en la nodulación. Otros investigadores ⁽¹⁵⁵⁾ ⁽¹⁵⁶⁾ encontraron este estímulo de la nodulación a tenores bajos de Nitrógeno para diferentes leguminosas. Además Evans J. ⁽¹⁵⁷⁾, para soja, halló que cuando la concentración de Nitrógeno aportada por Nitratos es del orden de 200 ppm se afecta marcadamente la formación de nódulos mientras que concentraciones del orden de 50 ppm no tienen efecto sobre el establecimiento de la simbiosis. Este estímulo de la nodulación a bajas concentraciones de Nitrógeno sólo tiene lugar si la fertilización se realiza simultáneamente con la siembra y según Guss y Dobereiner ⁽¹⁵⁴⁾ este comportamiento se debe al

A. EXPERIENCIA EN CAMARA CLIMATIZADA

Cuadro N° 13a

Parámetros evaluados sobre el huésped

1. Tratamiento	Peso seco de parte aérea. (g/jarra)	2. Tratamiento	Peso seco de nódulos (mg/jarra)
F 45	5,8095	M + NO ₃ K	692,7
F 48	5,2806	Mezcla	542,2
M + NO ₃ K	4,4671	F 48	430,3
492	4,4597	F 45	412,0
Mezcla	4,2348	4012	410,7
4012	2,4721	492	344,9
Testigo	2,3210	Testigo	0,0

Cada valor corresponde a la media de las 5 repeticiones y aquellas unidas por el mismo trazo no difieren significativamente. (Tukey P: 0,05)

Cuadro N° 13 b

Competencia por sitios de infección nodular

Cepas	Tratamientos	
	Mezcla	Mezcla + NO ₃ K
F 48	80 %	52 %
F 45	12 %	27 %
492	5 %	13 %
4012	3 %	8 %

hecho de que este mineral previene la etapa de deficiencia crítica que sobreviene una vez agotada la reserva de la semilla.

La mezcla de cepas sin la adición de Nitrógeno produjo también mayor masa nodular. Un resultado similar fue obtenido para *Pisum arvense* por Heichel y Vance⁽¹⁵⁵⁾ aunque no se encuentra una explicación adecuada para esta observación.

La cepa F 48 fue la que formó mayor porcentaje de nódulos, aunque, según se muestra en el cuadro 13 b, este valor varió con la modificación del ambiente donde se desarrolló la planta (comparar los porcentajes de nódulos en los tratamientos con y sin Nitrógeno). Es de esperar entonces, que estos valores se vean marcadamente afectados por el tipo de suelos donde se desarrolle la planta, por tanto, el valor de competitividad obtenido en cámara de clima controlado sólo sirve como dato preliminar para el diseño de la experiencia a campo⁽⁵⁶⁾.

4.6.2. Resultados obtenidos en la primera experiencia a campo (Cerrillos, Salta).

Se debe hacer notar que la experiencia fue diseñada en base a los análisis de suelo realizados en el terreno donde se efectuó el ensayo (ver materiales y métodos ítem 3-3-19). Los tratamientos se realizaron fertilizando con fósforo para que este mineral no sea el limitante del crecimiento de la planta ya que el valor de concentración del mismo en ese terreno es considerado de moderada limitación para el cultivo de poroto. Por otra parte es conocida la importancia del Fósforo en el establecimiento de una adecuada simbiosis. Además se introdujeron parcelas inoculadas y fertilizadas con Nitrógeno como testigos de máxima.

Los resultados obtenidos se indican en los cuadros 14 a y b. Los resultados indicados en el cuadro 14 a muestran que la inoculación en ningún caso aumentó el peso de las plantas, su contenido en Nitrógeno, el rendimiento en granos o Nitrógeno y que las diferencias surgidas se deben sólo a la fertilización. Se ve además que el número de nódulos obtenidos es bajo y está influenciado negativamente por la fertilización nitrogenada. Este comportamiento se observa aún en el caso de los nódulos formados por las cepas nativas. Las concentraciones de Nitrógeno alcanzadas en los tratamientos fertilizados con Nitrógeno superan el tope hasta donde se produce un estímulo de la nodu-

lación⁽¹⁵⁷⁾ (158) .

Se observa además que la presencia de Fósforo aumenta el número de nódulos, pero sólo con valores significativos para la cepa F 45. Este comportamiento ha sido citado por otros autores de acuerdo a lo informado por Graham y Rosas⁽¹⁵⁹⁾ y de Mooy y Pesek⁽¹⁶⁰⁾ . En el cuadro 14 b se muestra que existe un cierto porcentaje de nódulos cuyos extractos no reaccionaron con los anticuerpos específicos de las cepas introducidas y por tanto los mismos fueron formados por la población nativa de *Rhizobium phaseoli*. No obstante en todos los casos más de un 80% de los nódulos fueron formados por las cepas introducidas. Este porcentaje tan elevado probablemente sea debido a la gran dosis de inoculantes que se utilizan en este tipo de ensayos, ya que de acuerdo a la literatura, las cepas introducidas con el inoculante, utilizado en dosis habituales, sólo forman un muy pequeño porcentaje de los nódulos frente a las estirpes nativas o naturalizadas⁽⁷⁵⁾ (82) (83) .

En cuanto a la competitividad entre cepas, la F 45 es la que formó el mayor porcentaje de nódulos y este resultado discrepa con el obtenido en cámara. Idéntico comportamiento fue observado en esta misma región, en un estudio de inoculación de soja con las cepas S 100 y 5019⁽⁷⁷⁾ . La explicación a este hecho puede darse en base a las diferencias ambientales en que crece la planta en cámara y a campo y en este caso también a la presencia de cepas autóctonas que pueden modificar la competencia entre las estirpes introducidas de acuerdo a lo indicado por Das y Badhuri⁽¹⁶¹⁾ .

En cuanto a los dos tipos de soportes utilizados (granulado y convencional o polvo fino) no existen diferencias entre ellos, pero este resultado es secundario frente a la falta de respuesta de esta leguminosa a la inoculación. Esta falta de respuesta no sorprende porque, aunque fueron informadas tasas de fijación de Nitrógeno para *Phaseolus vulgaris* superiores a las obtenidas con otras leguminosas⁽¹⁶²⁾ existe una amplia bibliografía que indica el poco éxito que ha tenido hasta el presente la inoculación de poroto a nivel mundial⁽¹⁶³⁾ (164) (165) y además indican la necesidad de realizar más investigación a fin de aclarar aspectos relacionados con la nodulación y fijación de nitrógeno por este cultivo tropical.

B. EXPERIENCIA A CAMPO

Cuadro 14 a

Parámetros evaluados sobre el huésped

- 1 -		- 2 -		- 3 -		- 4 -		- 5 -	
F 45-P	20,5	M-P+N	11,67	M-P+N	467	F 45-P	680	F 45-P	27,78
M-P	18,4	MG-P	10,40	MG-P	360	MG-P	630	M-P+N	27,31
492-P	18,3	M-P	9,55	M-P	320	F 48-P	608	F 48-P	26,48
MG-P	17,7	492-P	9,20	F 48-P	314	M-P+N	589	MG-P	26,33
F 48-P	15,1	F 48-P	8,94	F 45-P	309	492-P	562	492-P	22,88
T-P	10,7	F 45-P	8,59	492-P	266	T-P	520	M-P	22,85
M-0	9,3	T-P	7,36	T-P	241	M-P	513	T-P	21,91
M-P+N	5,6	M-0	6,33	M-0	233	M-0	378	M-0	17,41

Cuadro 14 b

Competencia por sitios de infección nodular (%)

Cepas	- 6 -				Media
	M-P	M-P+N	M-0	MG-P	
F 45	64%	64%	54%	48%	54%
F 48	5%	9%	13%	16%	12%
492	18%	9%	17%	23%	20%
Sin identificar	13%	18%	16%	13%	14%

1. Número de nódulos por planta (media de 15 plantas) C.V. 25%
2. Peso seco de parte aérea en g/planta (media de 15 plantas) C.V. 16%
3. mg de N en parte aérea (media de 15 plantas y 3 Kjeldahl) C.V. 15%
4. Rendimiento en grano en g/parcela (corregido por humedad) C.V. 25%
5. N en grano en g/parcela (media de 3 Kjeldahl) C.V. 30%
6. Porcentaje de nódulos formados por cada cepa.

Las medias unidas por el mismo trazo no discrepan entre sí en forma significativa. (Tukey P 0,05).

4.6.3. Resultados obtenidos en el segundo experimento a campo Cerrillos y Horcones (Salta).

Con el objetivo de corroborar la falta de respuesta a la inoculación por el poroto alubia es que se diseñó este experimento en dos lugares diferentes del NOA. De esta forma, con 2 tipos diferentes de suelos y condiciones atmosféricas se confirmarían las conclusiones realizadas en base a los resultados obtenidos en el primer ensayo realizado únicamente en Cerrillos.

Los resultados obtenidos se indican en los cuadros 15a y b. El análisis del mismo muestra que en el ensayo realizado en Cerrillos no hay respuesta a la fertilización y/o inoculación. El número de nódulos por planta es muy bajo y no existen diferencias entre los diferentes tratamientos, probablemente debido a los altos coeficientes de variabilidad observados tanto para el número de nódulos como para el peso seco de los mismos. Esta variabilidad presumiblemente es debida a la variación natural del huésped⁽¹⁶⁶⁾ por lo que para futuras experiencias se debe tener en cuenta este factor y para un mejor análisis de los resultados sería conveniente trabajar con una población homogénea de semillas.

Vemos además que el porcentaje de nódulos formado por la cepa F 45 es muy bajo y se observa una profusa nodulación por cepas nativas lo que probablemente sea el principal factor que determina la falta de respuesta a la inoculación⁽¹⁶⁷⁾.

En el ensayo de Horcones (cuadro 15b) tampoco se obtuvo respuesta a la inoculación pero sí se observa un claro efecto positivo de la fertilización nitrogenada, lo que demuestra la necesidad de un suministro adecuado de este elemento a la planta que podría ser satisfecho por una buena relación simbiótica y de esta forma alcanzar mayores niveles de producción de granos. La respuesta a la fertilización nitrogenada era esperable en función de la alta relación C/N del suelo⁽¹⁶⁸⁾ pero esta misma relación debió favorecer la respuesta a la inoculación^{(102) (169)}.

El número y peso de nódulos es aceptable y el porcentaje de nódulos formados por la cepa introducida alcanza valores superiores a los del ensayo de Cerrillos, pero también hay una abundante nodulación natural que tal vez enmascara las dife-

rencias que podrían surgir entre plantas noduladas y no noduladas por la cepa introducida.

Si comparamos la nodulación obtenida en ambos ensayos observamos grandes diferencias que se atribuyen a las interacciones climáticas y edáficas sobre los simbioses, por lo que estos factores deben ser tenidos en cuenta en futuros estudios debido a la gran variabilidad existente en la región donde se cultiva esta leguminosa.

En el primer experimento realizado en Cerrillos se obtuvo un 80% de los nódulos a partir de las cepas introducidas, pero en este caso fueron utilizadas dosis masivas de inoculantes, en cambio en este ensayo se utilizó sólo el doble de la cantidad normalmente recomendada por los fabricantes y este porcentaje baja a 12,5% en el de Cerrillos y a 37,5 en Horcones. Esto nos muestra que para esta leguminosa, al igual que lo informado para soja⁽⁸²⁾⁽⁸³⁾ es muy difícil desplazar a la flora nativa o naturalizada y que es necesario utilizar además de eficientes, cepas altamente competitivas. Las diferencias de competitividad de la cepa F 45 en ambos sitios muestra que este parámetro es afectado por factores tales como clima y suelo y las características de la población establecida.

La falta de respuesta a la inoculación de poroto en estas experiencias coinciden con la bibliografía existente ya mencionada y demuestra la necesidad de estudiar esta simbiosis con más detenimiento, centrando el estudio en los factores que la afectan, ya que según vimos en condiciones controladas se presenta una perfecta relación simbiótica que no puede, por el momento, ser trasladada a condiciones de campo. Será necesario por tanto estudiar cómo varía la población de la cepa introducida en esos suelos y qué factores del mismo influyen sobre la supervivencia de las cepas, sobre la infección de la leguminosa por la bacteria o sobre el funcionamiento de la fijación de Nitrógeno. Además es fundamental el estudio del huésped en cuanto a la selección de variedades que presenten una buena relación simbiótica con cepas de *Rhizobium phaseoli*. También será necesario ensayar diferentes cepas aisladas en esa zona o en zonas similares de otros sitios y que hayan sido informadas como eficientes de modo de poder apro-

Cuadro N°15 b

B: Ensayo en Horcones :

	1	2	3	4	5	6	7
N	403	NPK 0,9788	NPK 215,25	NPK 6,676	NPK 1243	NPK 48,42	
NPK	369	PK 0,8793	N 201,25	N 6,066	N 1157	N 44,71	
PK	330	N 0,8462	PK 170,25	PK 5,220	PK 1030	PK 37,25	
T	297	T 0,6363	I 155,00	I 4,656	IPK 1003	IPK 35,75	
I	287	I 0,6071	T 138,50	IPK 4,468	T 956	T 33,14	
IPK	231	IPK 0,5786	IPK 137,75	T 4,266	I 932	I 31,54	

C.V. 29%

C.V. 28%

C.V. 12%

C.V. 14%

C.V. 10%

C.V. 11%

37,5%

Nota: Las medias unidas por el mismo trazo no difieren entre sí en forma significativa (Tukey p: 0,05)

vechar la potencialidad de la simbiosis, que según muestran algunos investigadores⁽¹⁶²⁾⁽¹⁷⁰⁾, puede dar excelentes resultados cuando se encuentran el huésped y la bacteria adecuados para el sitio donde se vaya a implantar el cultivo. Al respecto, un ensayo reciente realizado en Cerrillos por el Ing. Arrarás E.A. (Comunicación personal) utilizando la variedad BATT 76 (mejorada genéticamente por "tasa de fijación" en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (Colombia), inoculada con la cepa F 45, muestra excelentes rendimientos, del orden de 2400 Kg/ha (muy superiores a los valores medios de esa zona). Estos resultados son muy promisorios y será necesario trabajar en base a ellos para obtener los resultados propuestos en la discusión precedente.

4.7. INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS EN LA FORMACION DE NODULOS.

La bibliografía actual muestra que el tema de la especificidad de la nodulación y los factores que la determinan demandan un importante esfuerzo por parte de los investigadores. El estudio del proceso de infección de las raíces de las leguminosas por las bacterias del género *Rhizobium* fue incrementándose paulatinamente a partir del trabajo de Bohlool y Schmidt de 1974⁽¹⁸⁾ en el que estos autores postulan el posible rol de las lectinas vegetales en el reconocimiento mutuo entre ambos simbioses y por tanto que estas moléculas son las responsables de la especificidad de la infección. Si bien esta hipótesis es en la actualidad motivo de controversias (tal como se indicó en la introducción del presente trabajo), la abundante bibliografía en su favor hace pensar que las lectinas tienen algún papel importante en las etapas iniciales del proceso de infección. Se ha demostrado también que existe una determinada influencia de la etapa del crecimiento celular donde son tomadas las células en la capacidad de las mismas de unirse a las lectinas específicas. Se ha informado una mayor afinidad de las lectinas por las células de *Rhizobium* en fase exponencial temprana y tardía⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾ conjuntamente con una mayor formación de hilos infectivos, y si bien hasta ahora no se habían informado diferencias en la capacidad de nodulación

entre células tomadas en diferentes etapas de un cultivo en un reciente trabajo Bhuvanewari y col.⁽¹⁷¹⁾ muestran estas diferencias para el caso particular de la simbiosis *Rhizobium japonicum*-soja indicando además que la edad del cultivo influye sobre la eficiencia de la infección más que sobre la rapidez con que este proceso comienza.

En este estudio, que tiene sólo un carácter preliminar, se trata de hallar diferencias en capacidad de nodulación entre células de diferentes "estados fisiológicos", tomando como tales, en virtud del concepto introducido por Malek⁽¹⁷²⁾, bacterias crecidas a diferentes velocidades de dilución en cultivos continuos, ya que éste es un material estadísticamente mucho más homogéneo que el tomado en diferentes etapas de un cultivo discontinuo clásico.

4.7.1. Estudios previos.

Debido a que el objetivo perseguido era estudiar las diferencias en la capacidad de nodulación entre células crecidas a una determinada velocidad de dilución fue necesario establecer condiciones que aseguren que la mayoría de los nódulos fueron formados por las células agregadas en el inóculo y no por sus células descendientes. Por tanto, para evitar la proliferación de las bacterias del inóculo debido a los posibles exudados radiculares se imitó la experiencia de Purchase y Nutman⁽¹⁷³⁾ diluyendo las bacterias infectivas con una alta proporción de no infectivas, utilizándose para tal fin una cepa de *Rhizobium meliloti* incapaz de formar nódulos en *Phaseolus vulgaris*. De esta forma las probables sustancias estimulantes del crecimiento liberadas por la raíz serían aprovechadas en mayor proporción por las células más numerosas. Además, y con el mismo objeto, se inhibió la población bacteriana inoculada luego de un tiempo tal que las bacterias infectivas hubieran penetrado la superficie radical. Para ello se utilizó una solución de tetraciclina de forma similar a lo realizado por Bedmar y Olivares⁽⁸⁸⁾.

También fue necesario inocular las raíces con un número bajo de bacterias (10^5 /raíz), de forma tal que las probables pequeñas diferencias en capacidad de infección entre células crecidas a diferentes velocidades no quedaran enmascaradas

como consecuencia de un gran exceso de bacterias respecto del número de sitios de infección. Tal vez este detalle sea el más importante a tener en cuenta ya que un gran exceso de bacterias en el inóculo, por ejemplo 10^8 cel/ml como usaron H. Raback y col., produzcan una situación donde hay un gran exceso de bacterias respecto de los sitios de unión de las mismas en la raíz y a pesar de las diferentes capacidades potenciales de las células se esté siempre en condiciones de "saturación" de esos sitios por los microorganismos.

Los estudios previos realizados fueron:

a) Concentración de tetraciclina a utilizar para inhibir totalmente la población bacteriana del inóculo: Se utilizaron 5, 10, 15, 20 y 25 ug/ml de tetraciclina y se observó que por encima de 10 ug/ml se inhibían totalmente las células agregadas por lo que se utilizó 15 ug/ml de antibiótico en todos los casos ya que esta concentración además de inhibir totalmente las bacterias no afectaba notablemente a la planta como ocurría con concentraciones superiores de antibióticos que produjeron una acentuada clorosis.

b) Tiempo de incubación para lograr el establecimiento de la nodulación. Para este ensayo se inocularon lotes de macetas con 2 plantas cada una y se agregó antibiótico en la concentración elegido previamente a las 24, 48, 72, 96 horas y sin agregado de tetraciclina. Los resultados obtenidos se indican en el cuadro 16. Se realizaron 7 repeticiones por tratamiento.

Cuadro 16

Efecto del tiempo de agregado de antibiótico luego de la inoculación sobre el establecimiento de los nódulos

Tratamientos Horas luego de la inoculación en que se agregó tetraciclina	Número de nódulos medio por jarra (valor promedio de 7 repeticiones)
24	364,8
48	421,6
72	508,8
120	429,2
Control (sin agregado de tetraciclina)	591,4

Coeficiente de Variación (CV) = 35%

En base a estos resultados, y a pesar de la gran variabilidad de los mismos, en los estudios posteriores se agregó el antibiótico a las 48 horas debido a que con este tiempo de incubación se forman una apreciable cantidad de nódulos.

4.7.2. Estudios de capacidad de nodulación utilizando células obtenidas de un cultivo continuo a diferentes valores de velocidad de dilución.

En principio se realiza una experiencia con células tomadas de un cultivo continuo en forma idéntica a lo expresado en el punto 3-4-4 del presente trabajo, pero sin efectuar la dilución de *Rhizobium phaseoli* en una suspensión concentrada de *Rhizobium meliloti*.

Los resultados se indican en el cuadro 17.

Vemos como resultado de esta experiencia diferencias altamente significativas ($p=0.01$) entre los valores de número de nódulos obtenidos a partir de las bacterias crecidas a menores y mayores velocidades de dilución. Esto nos indica la existencia de una relación directa de velocidad de crecimiento (como un parámetro de un "estado fisiológico") y la capacidad de formación de nódulos.

Se realizó posteriormente un experimento con mayor número de repeticiones con y sin el agregado de antibiótico a las jarras luego de 48 horas de incubación y con la suspensión de *Rhizobium phaseoli* diluida con una concentrada de *Rhizobium meliloti*. Los resultados se indican en el cuadro 18a para los tratamientos con detención de la infección por agregado de tetraciclina y en el cuadro 18b para los tratamientos sin agregado de antibióticos.

Vemos nuevamente que surge clara la diferencia en capacidad de nodulación entre los diferentes "estados fisiológicos" de las bacterias, aunque, a pesar de aumentar el número de repeticiones por tratamiento y el rango de velocidades de dilución ensayadas, no es posible lograr una mayor resolución estadística entre los diferentes tratamientos. Pensamos que este hecho es fundamentalmente atribuible a que debido a los materiales empleados (jarras Leonard con arena y carbón) es muy difícil lograr una adecuada homogeneidad del sistema y por tanto el número de bacterias que pueden llegar a ponerse en contacto con la raíz es diferente en cada repetición, por ello el coeficiente de variación que se obtiene, no permite diferenciar entre "estados fisiológicos" muy similares. Además

se debe tener en cuenta que se está tratando de medir la influencia en una característica de uno de los simbioses por medio de la expresión del sistema simbiótico (el nódulo), por lo que sería conveniente utilizar un macrosimbionte homogéneo para todas las repeticiones y tratamientos, hecho muy difícil de lograr ya que las semillas de este tipo presentan naturalmente una determinada variación genética y además una homogeneidad estadística de las bacterias de un cultivo continuo no implica en absoluto una invariancia de las mismas por lo que el inóculo tiene su propia fuente de variación debido a las diferencias existentes entre los individuos de una población microbiana. A pesar de ello se demuestra claramente la diferencia en capacidad de nodulación entre los diferentes tipos de células, y vemos que a mayor velocidad de crecimiento aumenta el número de nódulos formados.

En base a la bibliografía existente este resultado puede tener más de una explicación posible. La primera de ellas es que (si tomamos como cierta la teoría de la unión por las lectinas) a medida que aumenta la velocidad de crecimiento de las bacterias aumente consecuentemente la concentración en las mismas de sitios receptores a las lectinas vegetales, lo que se traduciría en un mayor número de células que se adhieren a la raíz específicamente y por tanto en un mayor número de células que infecten la raíz y formen nódulos.

Otra probable explicación es que a medida que aumenta la velocidad de crecimiento de las bacterias, aumente paralelamente la concentración del glucano cíclico, antes mencionado, en el espacio periplasmático de las mismas, y como éste provoca un mayor número de canales de infección, estos se traduzcan en un mayor número de nódulos.

Debido a lo complejo del proceso de infección de las leguminosas por los *Rhizobium* y a las varias etapas que el mismo presenta hasta la formación del nódulo y como estas son en la actualidad poco conocidas, existe la probabilidad que el fenómeno observado no sea debido a ninguna de las dos explicaciones arriesgadas.

Comparando los tratamientos sin agregado de antibiótico con los que se detuvo la infección por agregado de tetraciclina, vemos que en todos los casos se obtienen las diferencias mencio-

nadas pero el número de nódulos obtenidos es levemente mayor (no significativo) en los tratamientos sin antibióticos que en los tratados con éste. Esto puede deberse a que con el agregado de tetraciclina, se inhiben células que pueden llegar a infectar debido a que la detención del proceso de infección según vimos es relativamente temprano. Este resultado nos muestra que de existir una estimulación del crecimiento por los exudados radiculares, ésta es de muy poca extensión coincidiendo este resultado con lo informado por Robert y Schmidt⁽⁵¹⁾ quienes sostienen que para el caso de *Rhizobium phaseoli* no se observa la "estimulación rizosférica" y por tanto no se produce o es muy bajo el incremento de *Rhizobium* en la rizosfera de *Phaseolus vulgaris*.

Estos resultados sumados al obtenido en este trabajo respecto de la importancia del "estado fisiológico" de la cepa en el establecimiento de la nodulación, que es similar al informado por otros autores^{(28) (29) (171)} quienes encuentran diferencias entre células en fase exponencial y en estado estacionario en cuanto a su capacidad de unirse las lectinas específicas, nos dan lugar a pensar que la falta de respuesta a la inoculación de poroto puede deberse en parte a estos factores. La idea es que: como no se presenta una estimulación al crecimiento en la rizosfera de *Phaseolus vulgaris* por tanto las células de *Rhizobium phaseoli* de los inoculantes no desarrollan manifiestamente en las proximidades de la raíz y por tanto la mayoría de ellas no adoptan el estado de crecimiento o etapa del ciclo celular donde están capacitadas para la formación del nódulo. Por tanto si este fuera el caso se podrían solucionar, aunque sea parcialmente, los resultados de la inoculación de poroto (*Phaseolus vulgaris*) provocando artificialmente el crecimiento de las células de *Rhizobium phaseoli* en la rizosfera de poroto de forma tal que esta dinámica de población haga factible en todo momento la presencia de células en un estado tal que puedan infectar la raíz. Una alternativa similar sería la de seleccionar variedades de poroto que secreten cantidades apreciables de sustancias estimulantes del crecimiento a su rizosfera. Esta hipótesis deberá ser probada en ensayos convenientes de laboratorio y campo y la extensión temporal de los mismos hacen imposible que los resultados que se puedan obtener sean mostrados en el presente trabajo.

NODULACION DE POROTO CON CELULAS CRECIDAS A DIFERENTES VELOCIDADES DE DILUCION (D) EN UN QUIMIOSTATO.

Cuadro N° 17

(1er. experimento). Diseño totalmente casualizado con 5 repeticiones

Tratamientos : células crecidas a las siguientes velocidades de dilución: D (h ⁻¹)	Número de nódulos medio por jarra Leonard
0,030	277
0,053	297
0,073	460
0,110	539

Cuadro N° 18 a

(2do. experimento). Diseño totalmente casualizado. El número de repeticiones para cada tratamiento se indica entre paréntesis.

Tratamientos: células crecidas a las siguientes velocidades de dilución: D (h ⁻¹)	Número de nódulos medio por jarra Leonard
0,022	(6) 208
0,047	(7) 284
0,090	(8) 386
0,108	(7) 727
0,113	(8) 672

Cuadro N° 18 b

(3er. experimento)(Sin agregado de antibiótico a las 48 hs.). Diseño totalmente casualizado con 4 repeticiones.

Tratamientos: células crecidas a las siguientes velocidades de dilución. D (h ⁻¹)	Número de nódulos medio por jarra Leonard
0,047	338
0,090	632
0,108	756
0,113	983

Las medias unidas por el mismo trazo no difieren entre sí en forma significativa (Tuckey P: 0,05)

5. CONCLUSIONES GENERALES

5.1. BALANCE DE UN MEDIO DE CULTIVO Y PRODUCCION DE CELULAS EN SISTEMA "BATCH"

De estos estudios surge que para lograr caldos con alta concentración celular es necesario balancear un medio de cultivo para cada cepa de Rhizobium que vaya a ser utilizada en la producción de inoculantes debido a las diferencias que existen entre especies y/o cepas de este género en sus necesidades nutritivas. Con el medio logrado en este trabajo y las condiciones empleadas se pueden obtener caldos de Rhizobium phaseoli con una concentración celular de $1,25 \cdot 10^{10}$ cel/ml en 32 horas de proceso.

5.2. PRODUCCION DE CELULAS EN SISTEMAS NO TRADICIONALES: DISCONTINUO ALIMENTADO (FED BATCH) Y CONTINUO (QUIMIOSTATO)

La utilización de estos sistemas de cultivo, como queda demostrado en el presente estudio, permite aumentar notablemente la productividad de una fábrica de inoculantes en lo que se refiere a volumen de suspensión bacteriana. Además utilizando el sistema discontinuo alimentado es posible incorporar al fermentador cantidades tales de nutrientes que de ser agregadas al medio inicial se alcanzarían concentraciones de los mismos que inhibirían el desarrollo celular, por lo que este sistema es también apto para su utilización con microorganismos sensibles a la presión osmótica.

Por otra parte queda demostrado que el sistema continuo es el de más alta productividad ($\frac{\text{cel}}{\text{ml} \cdot \text{h}}$) y que permite una producción de inoculantes continua en el tiempo a diferencia de los otros dos sistemas empleados. Se debe tener en cuenta también que puede ser necesario balancear el medio de cultivo en continuo para el correcto aprovechamiento de los constituyentes del mismo.

5.3. OBTENCION Y CONSERVACION DE INOCULANTES A BASE DE TURBA

Como resultado de este estudio se concluye que en la preparación de inoculantes con turba proveniente de Tierra del

Fuego y la cepa utilizada de *Rhizobium phaseoli* es necesaria la maduración del producto obtenido a temperatura ambiente debido a la pérdida de viabilidad que se produjo como consecuencia de las bajas temperaturas iniciales; que es satisfactorio el recuento obtenido luego de un año de conservación del producto a temperatura ambiente; que no es necesario, e incluso fue perjudicial, el enriquecer con nutrientes la suspensión bacteriana utilizada para impregnar el soporte; que el recuento de células viables en función del tiempo es directamente proporcional a la concentración inicial de bacterias en el producto y que la supervivencia microbiana mayor en turba finamente molida que en el producto granulado.

5.4. ESTUDIOS AGRONOMICOS, EN CAMARA CLIMATIZADA Y A CAMPO, DE SELECCION DE CEPAS.

Estas investigaciones demuestran que en condiciones controladas se establece un excelente vínculo simbiótico entre la variedad alubia de *Phaseolus vulgaris* empleada y dos de las cepas de *Rhizobium phaseoli* (F 43 y F 48), destacándose ambas además por su adecuada competitividad específica.

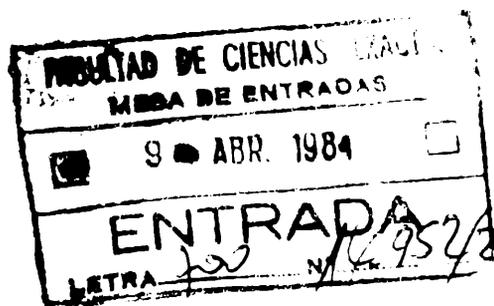
Esta relación simbiótica no pudo ser repetida en condiciones de campo en dos campañas agrícolas sucesivas y en dos localidades diferentes de la zona de cultivo de esta leguminosa (Noroeste Argentino). Por tanto se concluye que por el momento no es recomendable la práctica de la inoculación artificial de las semillas en la zona en cuestión y que es necesario profundizar el estudio de esta simbiosis en lo referente a las causas que determinan la escasa e ineficiente nodulación obtenida en condiciones de campo con inoculantes apropiados a diferencia de lo que se observa en condiciones controladas.

5.5. INFLUENCIA DEL "ESTADO FISIOLÓGICO" DE LAS BACTERIAS EN LA CAPACIDAD DE FORMACION DE NODULOS

Estos estudios muestran que la cantidad de nódulos formados por las bacterias es proporcional a su velocidad de crecimiento en el momento de la inoculación. Por tanto ésta puede ser

una de las causas, enunciadas en el punto anterior, que determinan la escasa nodulación observada a campo, ya que las bacterias en su habitat natural presentan una velocidad de crecimiento varias veces inferior a las obtenidas en los medios de cultivo de laboratorio.

M. G. ...



6. BIBLIOGRAFIA

1. Bond, G. 1976. The results of the IBP survey of root nodule formation in non leguminous angiosperms, en: SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION IN PLANTS. Ed. Nutman P.S.. Cambridge University Press IBP 7 (p. 443-474).
2. Stewart, W.P. 1976. Nitrogen fixation. Phil. Trans. R. Soc. Ser. B., London: 274 (341-358).
3. Peters, G.A. 1977. The azolla-anabaena azollae symbiosis, en: GENETIC ENGINEERING FOR NITROGEN FIXATION. Ed. Hollander, A.. Basic Life Sciences, Vol. 9. Plenum Press, New York (p. 231-258).
4. Burns, R.C. y R.W.F. Hardy. 1975. NITROGEN FIXATION IN BACTERIA AND HIGHER PLANTS. Springer-Verlag, New York.
5. Hardy, R.W.F. y U.D. Havelka. 1976. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis on soybeans, en: SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION IN PLANTS. Ed. Nutman, P.S., Cambridge University Press. IBP. 7. (p. 421-439).
6. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 1982. Situación actual de las leguminosas alimenticias en Argentina, Paraguay y Uruguay. Ed. Oficina Regional para América Latina, Santiago de Chile.
7. Burkart, A. 1952. Las leguminosas argentinas, silvestres y cultivadas. Acme Agency, Buenos Aires. 570 pp.
8. Akkermans, A.D.L., S. Ad Bulkadir, and M.J. Trinick. 1978. Nitrogen fixing root nodules in Ulmaceae. Nature, London: 274 (190-191).
9. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. Eight Edition. 1974. Ed. Buchanan R.E. y Gibbons N.E.
10. Date, R.A. y F.V. Decker. 1965. Minimal antigenic constitution of 28 strains of Rhizobium japonicum. Can. J. Microbiol.: 11(1-8).
11. Dudman, N.F. 1965. Comparative immuno diffusion at gelatin agar interfases; a presumptive test for protein and acidic polysaccharide antigens. J. Immunol.: 95 (704-717).
12. Nutman, P.S. 1965. Ecology of soil-borne plant pathogens. Ed. Baker, K.F. y Snyder, N.C. Berkeley Univ. Calif. Press (p. 231-247).
14. Schmidt, E.L. 1979. Initiation of plant root microbe interactions. Ann. Rev. Microbiol. 33 (356-376).
15. Rovira, A.D. 1969. Plant root exudates. Bot. Rev. 35 (35-57).
16. Dazzo, F.B. y Hubbell, D.H. 1975. Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the Rhizobium-clover association. Appl. Microbiol. 30 (1017-1033).
17. Dazzo, F.B. 1982. The mechanism of recognition between legume roots and Rhizobia: Some implications for biological nitrogen fixation in the tropics, en: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION FOR TROPICAL AGRICULTURE. Ed. Graham, P. y Harris, S. CIAT, Colombia (p. 93-103).
18. Bohlool, B.B. y E.L. Schmidt. 1974. Lectins: possible basis for specificity in the Rhizobium-legume root nodule symbiosis. Science: 185 (269-271).
19. Chen, A.T. y A.D. Phillips. 1976. Attachment of Rhizobium to legume roots as the basis for specific interactions. Physiol. Plant, 38 (82-83).
20. Pull, S.P., S.G. Pueppke, T. Hymowitz, J.H. Orf. 1978. Soybean lines lacking the 120000-dalton seed lectin. Science: 200 (1277-1279).
21. Law, I.J. y B.W. Strijdom. 1977. Some observations on plant lectins and Rhizobium specificity. Soil Biol. Biochem. 9(79-84).

22. Dart, P. 1977. Infection and Development of leguminous nodules, en: A TREATISE ON DINITROGEN FIXATION, Sect. III cap. 8. Ed. Hardy, R.W.F. & Silver, W.. John Wiley and Sons, New York (p. 367-472).
23. Broughton, W.J. 1978. Control of specificity in legume-Rhizobium associations. *J. Appl. Bacteriol.* 45 (165-194).
24. Stacy, G., A.S. Paau y W.J. Brill. 1980. Host Recognition in the Rhizobium-soybean symbiosis. *Plant Physiol.* 66 (609-614).
25. Bhagwat, A.A. y J. Thomas. 1980. Dual binding sites for peanut lectin on Rhizobia. *J. Gen. Microbiol.* 117 (119-125).
26. Tsien, H.C. y E.L. Schmidt. 1981. Localization and partial characterization of soybean lectin binding polysaccharide of Rhizobium japonicum. *J. Bacteriol.* 145 (1063-1074).
27. Bhuvanewari, T.V., S.G. Pueppke y W.D. Bauer. 1977. Role of lectins in plant-microorganism interactions. I. Binding of soybean lectin to Rhizobia. *Plant Physiol.* 60 (486-491).
28. Dazzo, F.B., M.R. Urbano y W.J. Brill. 1979. Transient appearance of lectin receptors on Rhizobium trifolii. *Current Microbiology*: 2 (15-20)
29. Hrabak, E.M., M.R. Urbano y F.B. Dazzo. 1981. Growth-phase-dependent immunodeterminants of Rhizobium trifolii lipopolysaccharide which bind Trifoliin A, a white clover lectin. *J. Bacteriol.* 148 (697-711).
30. Yao, P.Y. y J.M. Vincent. 1976. Host specificity in the root hair "curling factor" of Rhizobium spp.. *Aust. J. Biol. Sci.* 22 (413-423).
31. Dart, P.J. 1974. The infection process, en: THE BIOLOGY OF NITROGEN FIXATION. Ed. Quispel, A. North Holland Publishing Company. Amsterdam-Oxford (p. 381-429).
32. Nutman, P.S. 1956. The influence of the legumine in root nodule symbiosis. A comparative study of host determinants and functions. *Biol. Rev. (Cambridge)* 31 (109-151).
33. Napoli, C.A. y D.H. Hubbell. 1975. Ultrastructure of Rhizobium - induced infection threads in clover root hairs. *Appl. Microbiol.* 30 (1003-1009).
34. Hubbel, D.H., V.M. Morales y M. Unalí-García. 1978. Pectolytic enzymes in Rhizobium. *Appl. Env. Microbiol.* 35 (210-213).
35. Martínez-Molina, E., V.M. Morales y D.H. Hubbell. 1979. Hydrolytic enzyme production by Rhizobium. *Appl. Env. Microbiol.* 38 (1186-1188).
36. Hubbell, D.H. 1981. Legume infection by Rhizobium: A conceptual approach. *Bioscience*, 31 (832-837).
37. Fahraeus, G. y H.L. Ljunggren. 1967. Pre-infection stages of the legume symbiosis. En: THE ECOLOGY OF SOIL BACTERIA. Ed. Gray T.R.G. y Parkinson, D. University Press, Liverpool (p. 396-421).
38. Abe, M., A. Amemura y S. Higashi. 1982. Studies on cyclic B-1,2-glucan obtained from periplasmic space of Rhizobium trifolii cells. *Plant and Soil*, 64 (315-324).
39. York, W.S., M. Mc Neil, A.G. Darvill y P. Albersheim. 1980. Beta-2-linked glucans secreted by fast growing species of Rhizobium. *J. Bacteriol.* 142 (243-248).
40. Higashi, S. y M. Abe. 1980. Promotion of infection thread formation by substances from Rhizobium. *Appl. Env. Microbiol.* 39 (291-301).
41. Libbenqa, K.R. y R.J. Bogers. 1974. Root-nodule morphogenesis, en: THE BIOLOGY OF NITROGEN FIXATION. Ed. Quispel A., North Holland Publishing Company. Amsterdam-Oxford (p. 430-472).

42. Bergersen, F.J. 1974. Formation and function of bacteroids, en: THE BIOLOGY OF NITROGEN FIXATION. Ed. Quispel, A. North Holland Publishing Company. Amsterdam - Oxford (p. 430-472).
43. Paaú, A.S., J.R. Cowles y D. Raveed. 1978. Development of bacteroids in alfalfa (*Medicago sativa*) nodules. *Plant Physiol.* 62 (526-530).
44. Appleby, C.A. 1969. Electron transport systems of *Rhizobium japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 172 (71-105).
45. Pate, J.S. 1977. Functional biology of dinitrogen fixation by legumes, en: A TREATISE ON DINITROGEN FIXATION, Sect. III, Cap. 9. Ed. Hardy, R. W.F. & W. Silver. John Wiley and Sons. New York (675 pp.).
46. Bergersen, F.J. 1975. Factors controlling nitrogen fixation by Rhizobia, en: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN FARMING SYSTEMS OF THE TROPICS. Ed. Ayanaba, A. y P.J. Dart. John Wiley & Sons, (p. 153-165).
47. Orme-Johnson, W.H. 1977. Biochemistry of nitrogenase, en: GENETIC ENGINEERING FOR NITROGEN FIXATION. Ed. Hollaender, A. Basic Life Sciences, Vol. 9. Plenum Press, New York (p. 317-332).
48. Evans, H.J., T. Ruiz-Argueso, N. Jennings y J. Hanns. 1977. Energy coupling efficiency of symbiotic nitrogen fixation, en: GENETIC ENGINEERING FOR NITROGEN FIXATION. Ed. Hollaender. A. Basic Life Sciences, Vol. 9. Plenum Press, New York (p. 333-354).
49. Appleby, C.A. 1974. Leghemoglobin. En: THE BIOLOGY OF NITROGEN FIXATION. Ed. Quispel, A. North Holland Publishing Company. Amsterdam, Oxford (p. 521-554).
50. Verma, D.P.S. y A.C. Bal. 1976. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 73 (3843-3845).
51. Robert, F.M. y E.L. Schmidt. 1983. Population changes and persistence of *Rhizobium phaseoli* in soil and rhizospheres. *Appl. Envir. Microbiol.*, 45 (550-556).
52. Paaú, A.S. y W.J. Brill. 1982. Comparison of the genomic arrangement and the relative transcription of the nitrogenase genes in *Rhizobium meliloti* during symbiotic development in alfalfa root nodules. *Can. J. Microbiol.*, 28 (1330-1339).
53. Bhuvanewari, T.V., A.A. Bhagwat y W.D. Bauer. 1981. Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by Rhizobia. *Plant Physiol.* 68 (1144-1149).
54. Bhagwat, A.A. y J. Thomas. 1982. Legume-Rhizobium interactions: Cowpea root exudates elicits faster nodulation response by Rhizobium species. *Appl. Env. Microbiol.*, 43, (800-805).
55. Vincent, J.M. 1956. Strains of rhizobia in relation to clover establishment. En: SEVENTH INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, Palmerston North, New Zeland (p. 179-189).
56. Date, R.A. 1976. Principles of Rhizobium strain selection. En: SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION IN PLANTS. Ed. Nutman, P.S. Cambridge University Press (p. 137-150).
57. Date, R.A. y R.J. Roughley. 1977. Preparation of legume seed inoculants. En: A TREATISE ON DINITROGEN FIXATION, Sect. IV, cap. 7. Ed. Hardy, R.W. F. & W. Silver. John Wiley & Sons, New York (p. 243-275).
58. Chatel, D.L., R.M. Greenwood y C.A. Parker. 1968. Saprophytic competence as an important character in the selection of Rhizobium for inoculation. En: TRANSACTIONS OF THE NINETH INTERNATIONAL CONGRESS OF SOIL SCIENCE. Ed. Holmes, J.W., ISSS. Angus, S. Robertson. Sidney (p. 65-73).
59. Pahwa, K. y R.C. Dogra. 1981. H₂- recycling system in mungbean Rhizobium in relation to N₂ Fixation. *Arch. Microbiol.*, 129 (380-383).
60. Mc Ferson, J., F.A. Bliss y J.C. Rosas. 1982. Selection for enhanced nitrogen fixation in common beans, *Phaseolus vulgaris*. En: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION TECHNOLOGY FOR TROPICAL AGRICULTURE. Ed. Graham, P.H. y S.C. Harris. CIAT, Colombia (p. 39-44).

61. Johnson, H.W. y U.M. Means. 1960. Interaction between genotypes of soybean and genotypes of nodulation bacteria. *Agron. Journal*, 52 (651-654)
62. Vidor, C., J.R. Freire, I. Godinho, J. Soares, N. Mendez y Z. Kornelus. 1972. Especificidade simbiótica entre estirpes de *Rhizobium japonicum* e variedades de soja. *Agron. Sulrio-grandense*: 9 (61-67).
63. Wilson, J.K. 1944. Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. *Soil Science*, 58 (61-69).
64. Vidor, C. 1977. Studies of saprophytic competence in strains of *Rhizobium* (Kirchner Buchanan). Ph. D. Dissertation. Ohio State University. Columbus USA, 189 pp.
65. Burris, R.H. 1974. Methodology. En: *THE BIOLOGY OF NITROGEN FIXATION*. Ed. Quispel, A. North Holland Publishing Company. Amsterdam-Oxford (p. 9-33).
66. Schwinghamer, E.A., H.J. Evans y M.D. Dawson. 1970. Evaluation of effectiveness in mutant strains of *Rhizobium* by acetylene reduction relative to other criteria of N_2 fixation. *Plant and Soil*, 33 (192-212).
67. Hardy, R.W.F., R.D. Holsten, F.K. Jackson y R.C. Burns. 1968. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: Laboratory and field evaluations. *Plant Physiol.* 43 (1185-1207)
68. Stowers, M.D. y G.H. Elkan. 1980. Criteria for selecting infective and efficient strains of *Rhizobium* for use in tropical agriculture. North Caroline Agricultural Research Service. Technical Bulletin N°264, 73 pp.
69. Diéguez, R.N. 1982. Importancia de la selección de cepas en la preparación de inoculantes para leguminosas. Trabajo presentado en el 3er. Congreso Argentino de Microbiología, 2 al 5-8-82. Buenos Aires, Argentina.
70. Raggio, N., M. Raggio y R.H. Burris. 1959. Nitrogen Fixation by nodules formed on isolated bean roots. *Biochem Biophys. Acta*, 32 (274-275).
71. Ruschel, A.P., V.P. Vose y E. Salati. 1979. Comparison of isotope techniques and non-nodulating isolines to study the effect of ammonium fertilization on Dinitrogen fixation in Soybean, *Glycine Max*. *Plant and Soil*, 53 (513-525).
72. Franco, A.A. y J.M. Vincent. 1976. Competition amongst rhizobial strains for the colonization and nodulation of two tropical legumes. *Plant and Soil.*, 45 (27-42).
73. Russel, P.E. and D.G. Jones. 1975. Immunofluorescence studies for selection of strains of *R. trifolii* by S 184 white clover (*T. repens* L.) *Plant and Soil*, 42 (119-129).
74. Labandera, C.A. y J.M. Vincent. 1975. Competition between an introduced strain and native uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, 42 (327-347).
75. Johnson, H.W. and U.M. Means. 1964. Selection of competitive strains of soybean nodulating bacteria. *Agron. Journal*, 56 (60-62).
76. Skerdleta, V. y J. Karimova. 1969. Competition between two somatic serotypes of *Rhizobium japonicum* used as double-strain inocula in varying proportions. *Arch. Microbiol.* 66 (25-28).
77. Arrarás, E.A., J.L. Boiardi, A.P. Balatti, y L.A. Mazza. 1983. Selección de cepas de *Rhizobium japonicum* para la inoculación de soja en el Noroeste Argentino. *Rev. Facultad Agronomía (UBA)*: 4 (255-261).
78. Amarger, N. 1981. Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biol. Biochem.* 13 (475-480).

79. Saito, S.M.T. y A.P. Ruschel. 1980. Capacidade competitiva e de sobrevivencia no solo de una estirpe de *Rhizobium phaseoli*, usada como inoculante. *Ciencia e Cultura (Brasil)* 32 (887-892).
80. Johnston, A.W.B. y J.E. Beringer. 1976. Mixed inoculations with effective and ineffective strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Appl. Bacteriol.* 40 (375-380).
81. Caldwell, B.E. y D.F. Weber. 1970. Distribution of *Rhizobium japonicum* serogroups in soybean nodules as affected by planting dates. *Agron. J.*, 62 (12-14).
82. Weaver, R.W. y L.R. Frederick. 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill I. Greenhouse Studies. *Agron. Journal*, 66 (229-232).
83. Weaver, R.W. y L.R. Frederick. 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill II. Field Studies. *Agron. Journal*, 66 (233-236).
84. Holland, H.H. 1970. Competition between soil and seed-borne *Rhizobium trifolii* in nodulation of introduced *Trifolium subterraneum*. *Plant and Soil*, 32 (293-302).
85. Vincent, J.M. 1941. Serological studies of the root-nodule bacteria I. Strains of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Linn. Soc. N.S.W.*, 60 (145-154).
86. Vincent, J.M. 1942. Serological studies of the root-nodule bacteria II. Strains of *Rhizobium trifolii*. *Proc. Linn. Soc. N.S.W.*, 67 (82-86).
87. Schmidt, E.L., R.O. Bankole y B.B. Bohlool, 1968. Fluorescent antibody approach to study of rhizobia in soil. *J. Bacteriol.* 95 (1987-1992).
88. Olivares, J., J. Casadesús y E.J. Bedmar. 1980. Method for testing degree of infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. *Appl. Env. Microbiol.*, 39 (967-970).
89. Caetano Anolles, G. y G. Favelukes. 1981. Evaluación cuantitativa de la adhesividad de rizobios a raíces. Primera Reunión Nacional sobre Fijación Biológica de Nitrógeno. Ed.: CINDEFI, La Plata, Argentina (p. 299-311).
90. Van Rensburg, H.J. y B.W. Strijdom. 1982. Root surface association in relation to nodulation of *Medicago sativa*. *Appl. Env. Microbiol.*, 44 (93-97).
91. Chatel, D.L. y R.M. Greenwood. 1973. The colonization of host-root and soil by rhizobia. II. Strain differences in the species *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* 5 (433-440).
92. Chatel, D.L. y 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 (425-432).
93. Chen, M. y M. Alexander. 1972. Resistance of soil microorganisms to starvation. *Soil Biol. Biochem.*, 4 (283-288).
94. Vincent, J.M. 1974. Root-nodule symbiosis with *Rhizobium* en: THE BIOLOGY OF NITROGEN FIXATION. Ed. Quispel, A. North Holland Publishing Company. Amsterdam-Oxford (p. 265-341).
95. Patel, J.J. y T. Gerson. 1974. Formation and utilization of carbon reserves by *Rhizobium*. *Arch. Microbiol.*, 101 (211-220).
96. Meisner, C.A. y D.H. Cross. 1980. Some guidelines for the evaluation of the need for and response to inoculation of tropical legumes. North Carolina Agricultural Research Service. Tech. Bul. N°265. 59 pp.

97. Freire, J.R.J. y C. Vidor. 1971. Factores limitantes dos solos ácidos na simbiose de *Rhizobium* e as leguminosas. En: AS LEGUMINOSAS NA AGRICULTURA TROPICAL. Ed. Dobereiner, J. Pesq. Agropec. Bras. Rio de Janeiro, Brasil (p. 211-243).
98. Alexander, M. 1977. Introduction to soil Microbiology. (2nd. edition). John Wiley & Sons Inc. New York, 554 pp.
99. Alexander, M. 1975. Ecology of nitrogen-fixing organisms. En: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN FARMING SYSTEMS OF THE TROPICS. Ed. Ayanaba, A. y P. Dart. John Wiley & Sons. New York (p. 99-114).
100. Schwinghamer, E.A. y W.F. Dudman. 1973. Evaluation of spectinomycin resistance as a marker for ecological studies with *Rhizobium* sp. J. Appl. Bacteriol., 36 (263-272).
101. Bohlool, B.B. y E.L. Schmidt. 1973. Persistence and competition aspects of *Rhizobium japonicum* observed in soil by immunofluorescence microscopy. Soil Science Soc. Amer. 37 (561-564).
102. Vincent, J.M. 1970. A MANUAL FOR THE PRACTICAL STUDY OF THE ROOT NODULE BACTERIA. IBP Handbook N°15 Blackwell Scientific Publications. Oxford. 164 pp.
103. Burton, J.C. 1979. *Rhizobium* species, en: MICROBIAL TECHNOLOGY, Vol. I (2nd edition). Ed.: Pepller, H.J. y Perlman, D. Academic Press, Inc. New York (p. 29-58).
104. Subba Rao, N.S. 1982. Biofertilizers, en: ADVANCES IN AGRICULTURAL MICROBIOLOGY. Ed. Subba Rao, N.S. Butterworth Scientific & C. London (p. 219-242).
105. Chakrabarti, S., M.S. Lee y A.H. Gibson. 1981. Diversity in the nutritional requirements of strains of various *Rhizobium* species. Soil Biol. Biochem. 13 (349-354).
106. Lopreto, C.R., L.A. Mazza y A.P. Balatti. 1972. Influencia de los componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de generación de una cepa de *Rhizobium japonicum*. An. Soc. Cient. Arg., 193 (35-47).
107. Lopreto, C.R., L.A. Mazza y A.P. Balatti. 1973. Influencia del suministro de oxígeno sobre la velocidad de crecimiento de una cepa de *Rhizobium japonicum*. Rev. Asoc. Arg. Microbiol., 5 (128-131).
108. Lopreto, C.R., L.A. Mazza y A.P. Balatti. 1975. Obtención de cultivos de *Rhizobium japonicum* en un fermentador sin agitación mecánica. Rev. Asoc. Arg. Microbiol., 8 (99-103).
109. Jung, G., J. Mugnier, H.G. Diem y Dommergues. 1982. Polymer-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. Plant and Soil, 65 (219-231).
110. Balatti, A.P. y L.A. Mazza. 1979. Obtención de inoculantes para soja. Comportamiento de soportes a base de turbas de Tierra del Fuego esterilizadas por vapor y óxido de etileno. Rev. Arg. Microbiol., 11 (83-88).
111. Burton, J.C. 1967. *Rhizobium* culture and use, en: MICROBIAL TECHNOLOGY. Ed. Pepller, J. Reinhold Publishing Corporation, New York (p. 1-33)
112. Roughley, R.J. y J.M. Vincent. 1967. Growth and survival of *Rhizobium* in peat culture. J. Appl. Bacteriol. 30 (362-376).
113. Roughley, R.J. 1970. The preparation and use of legume seed inoculants. Plant and Soil. 32 (675-701).
114. Gault, R.R. 1981. A study of developments and trends associated with legume inoculants for use with new legume crops. *Rhizobium Newsletter*, 26 (16-44).

115. Strijdom, B.W. y C.C. Deschodt. 1976. Carriers of rhizobia and the effects of prior treatment on the survival of rhizobia. En: SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION IN PLANTS. Ed.: Nutman, P.S., Cambridge University Press (p. 151-168).
116. Vincent, J.M. 1977. Rhizobium: General Microbiology. En: A TREATISE ON DINITROGEN FIXATION. Sec. III. Ed.: Hardy, R.W.F. & W. Silver. John Wiley & Sons, New York (p. 277-366).
117. Vincent, J.M. 1974. Root-nodule symbiosis with Rhizobium. En: THE BIOLOGY OF NITROGEN FIXATION. Ed.: Quispel, A. North Holland Publishing Company. Amsterdam-Oxford (p. 265-341).
118. De Hollander, J.A. y A.H. Stouthamer. 1979. Multicarbon-substrate growth of Rhizobium trifolii. FEMS Microbiol. Lett., 6 (57-59).
119. De Hollander, J.A., Bettenhausen, C.W. y Stouthamer, A. H. 1979. Growth Yields, polysaccharide production and energy conservation in chemostat cultures of Rhizobium trifolii. Antonie Van Leeuwenhoek, 45 (401-415).
120. Gulati, S.L. 1979. New nonsynthetic medium for Rhizobium culture production from wastes. Biotech. Bioeng., 21 (1507-1515).
121. Allen, O.N. y E.K. Allen. 1950. Biochemical and symbiotic properties of the Rhizobia. Bact. Rev., 14 (273-330).
122. Graham, P.H. 1963. Vitamin requirements of root-nodule bacteria. J. Gen. Microbiol., 30 (245-248).
123. Sherwood, M.T. 1972. Inhibition of Rhizobium trifolii by yeast extracts of glycine is prevented by calcium. J. Gen. Microbiol., 71 (351-358).
124. Pirt, J. 1975. PRINCIPLES OF MICROBE AND CELL CULTIVATION. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, 274 pp.
125. Herbert, D. 1961. The chemical composition of microorganisms as a function of their environment. En: Symp. Soc. Gen. Microbiol. Vol. 11. Meynell, G.G. and Gooder, H., Eds. Microbial Reaction to Environment. The University Press, Cambridge, England (p. 391-416).
126. Ertola, R.J., L.A. Mazza, A.P. Balatti, C.M. Cuevas, y R. Daguerre. 1969. Effect of composition of medium and oxygen supply rates on growth of Rhizobium meliloti. Soil Science, 108 (373-380).
127. Srinivasen, V.R., M.B. Fleenor y R.J. Summer. 1977. Gradient-Feed method of growing high cell density cultures of cellulomonas in a bench-scale fermentor. Biotech. Bioeng., 19 (153-155).
128. Mignone, C.F. 1982. Transformación del suero de queso por procesos fermentativos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 125 pp.
129. Cooper, C.M. G.S.E. Fernston y S.A. Miller. 1944. Performance of agitated gas liquid contactors. Ind. Eng. Chem. 36 (504-509).
130. Hyvarinen, A. y E.A. Nikkila. 1962. Specific determination of blood glucose with O-toluidine. Clin. Chem. Acta, 7 (140-147).
131. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 11th. Edition. 1970. Ed. Horwitz, H. AOAC publish. Washington.
132. Umbreit, W., R.H. Burris, S.F. Stauffer. 1972. MANOMETRIC AND BIOCHEMICAL TECHNIQUES. Ed. Burgess Publishing Company.
133. Cooney, C.L., Wang, H. y Daniel, I.C. 1977. Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. Biotech. Bioeng. 19 (55-67).

134. Pimentel Gómez, F. 1978. CURSO DE ESTADISTICA EXPERIMENTAL. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires. 324 pp.
135. Norris, D.O. 1964. Techniques used in works with Rhizobium, en: SOME CONCEPTS AND METHODS IN SUBTROPICAL PASTURE RESEARCH. Comm. Bureau of Pastures and Field Crops, Hurley, Berkshire, England. Bull N°47 (186-198).
136. Somesagaram, P., H. Hoben y J. Halliday. 1979. Practical exercises in legume-Rhizobium technology. Informe NIFTAL Project- Paia Hawaii.
137. Oura, E. y H. Suomalainen. 1982. Biotin-active compounds, their existence in nature and the biotin requirements of yeasts. J. Inst. Brew., 88 (299-308).
138. Dudman, W.F. 1964 a. Growth and extracellular polysaccharide production by Rhizobium meliloti in defined medium. J. Bacteriol. 88 (640-645).
139. Somasegaran, P. y J. Halliday. 1982. Dilution of liquid Rhizobium cultures to increase production capacity of inoculant plants. Appl. Env. Microbiol., 44 (330-333).
140. Aiba, S., A.E. Humphrey y N. Millis. 1973. Biochemical Engineering (2nd Edition). Academic Press. New York & London. 434 pp.
141. Mateles, R.I. y G. Battat. 1974. Continuous culture used for media optimization. Appl. Microbiol., 28 (901-905).
142. Matz, S.A. 1960. MINOR INGREDIENTS BAKERY TECHNOLOGY AND ENGINEERING. The AVI Publishing Company, New York.
143. Del Campo, G.E. 1954. Los yacimientos de turba en la región Central Atlántica en el territorio de Tierra del Fuego. En: COMBUSTIBLES SOLIDOS, Buenos Aires.
144. Randrup, R.G. 1979. Obtención de inoculantes para leguminosas: Estudios sobre soportes constituidos fundamentalmente a base de turba. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. 162 pp.
145. Van Schreven, D.A. 1970. Some factors affecting growth and survival of Rhizobium spp. in soil peat cultures. Plant and Soil, 32 (113-130).
146. Postgate, J.R. y J.R. Hunter. 1962. The survival of starved bacteria. J. Gen. Microbiol. 29 (233-263).
147. Roughley, R.J. 1968. Some factors influencing the growth and survival of root nodule bacteria in peat culture. J. Appl. Bacteriol. 31 (259-265).
148. Dart, P.J., R.J. Roughley, M.R. Chandler. 1969. Peat culture of Rhizobium trifolii: an examination by electron microscopy. J. Appl. Bacteriol., 32 (352-357).
149. Arrarás, E.A., J.L. Tau, P. Figueroa y A.P. Balatti. 1983. Aislamiento y selección de cepas nativas de Rhizobium phaseoli (1ra. parte, Evaluación de cámara climatizada). Presentado en el X Congreso Argentino y VIII Latinoamericano de Ciencia del Suelo. Mar del Plata, Argentina.
150. Diéguez, R.N. y J.C. Pacheco Basurco. 1981. Informe de Comisión en lo atinente a la labor desarrollada en la EERA Salta. INIA, Castelar, Argentina.
151. Thompson, J.A., R.J. Roughley y D.F. Herridge. 1974. Criteria and methods for comparing the effectiveness of Rhizobium strains for pasture legumes under field conditions. Plant and Soil, 40 (511-524).
152. Awonaike, K.O., P.J. Lea, J.M. Day, R.J. Roughley y B.J. Mifflin. 1980. Effects of combined nitrogen on nodulation and growth of Phaseolus vulgaris. Expl. Agric. 16 (303-311).

153. Dart, P.J.S. 1977. Infection and development of leguminous nodules. En: A TREATISE ON DINITROGEN FIXATION. Sect. III Cap. VII. Ed: Hardy, R.W.F. & Silver, N.. John Wiley & Sons. New York. 675 pp.
154. Guss, A. y J. Dobereiner. 1972. Efeito da adubacao nitrogenada e temperatura do solo na fixacao da nitrogenio en feijao. Pesq. Agrop. Brasil. Serie Agronomia, 7 (87-92).
155. Heichel, G.H. y C.P. Vance. 1979. Nitrate-N and Rhizobium strains role in alfalfa seedling nodulation and growth. Crop Science, 19 (512-518).
156. Oghoghorie, C.G. y J.S. Pate. 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea. (*Pisum arverise* L.). En: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN NATURAL AND AGRICULTURAL HABITATS. Ed. Lil, T.A. & Mulder, E.B. Plant and Soil Special Volume (135-206)
157. Evans, J. 1982. Response of soybean Rhizobium symbiosis to mineral nitrogen. Plant and Soil, 63 (439-442).
158. Gibson, A.H. 1977. The influence of the environment and managerial practices on the legume-Rhizobium symbiosis. En: A TREATISE ON DINITROGEN FIXATION. Sect. IV. Cap. XI. Ed. Hardy R.W.F. y A.H. Gibson. John Wiley & Sons. New York. 527 pp.
159. de Mooy y Pesek, J. 1966. Nodulation responses of soybeans to added phosphorous, potassium and calcium salts. Agron. Journal, 58 (275-280).
160. Graham, P.H. y Rosas, J.C. 1979. Phosphorus fertilization and symbiotic nitrogen fixation in common bean. Agron. J., 71 (925-927).
161. Das, S.N. y P.N. Bhaduri. 1974. Host-Rhizobium interaction between *Phaseolus vulgaris* L. and *Rhizobium phaseoli*. Proc. Ind. Nat. Sci. Acad. Pt. B. Biol. Sci., 40 (554-561).
162. Graham, P.H. y J.C.Rosas. 1977. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium phaseoli*. J. Agric. Sci., 88 (503-508).
163. Graham, P.H. 1978. Variación entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* en la fijación simbiótica de nitrógeno y estrategia para el desarrollo de variedades mejoradas con amplia fijación. CIAT, Cali, Colombia. Serie SE-17-18, 22 pp.
164. Graham, P.H. y Halliday, J. 1977. Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. En: Workshop on Exploring the Legume-Rhizobium symbiosis in Tropical Agriculture. Maui, Hawaii, 1977, (Proceedings). Ed. Vincent, J.M. Misc. Publication, NIFTAL N°145.
165. Graham, P.H. 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L: A review. Field Crops Research: 4 (93-112).
166. Graham, P.H. Importancia del hospedero en la nodulación y fijación de nitrógeno por leguminosas con algunas sugerencias para mejorarlo. CIAT AA.-67-13- Cali, Colombia.
167. Graham, P.H. Problemas en la nodulación y fijación de nitrógeno en la simbiosis *Rhizobium phaseoli*-*Phaseolus vulgaris* L. CIAT AA-67-13, Cali, Colombia.
168. Mengel, K., E.A. Kirby. 1982. Principles of plant nutrition. International Potash Institute Bern, Switzerland. 3rd. Ed. 349 pp.

169. Lie, T.A. 1974. Environmental effects on nodulation and symbiotic nitrogen fixation. En: THE BIOLOGY OF NITROGEN FIXATION. Cap. 11. Ed. Quispel, A. North Holland Publishing Company, 769 pp.
170. Ruschel, A.P., S.M.T. Saito y A.T. Neto. 1979 a. Eficiencia da inoculacao de *Rhizobium* em *Phaseolus vulgaris* L. Efeito de fontes de nitrogenio y cultivares. Rev. Bras. Ci. Solo, 3 (13-17).
171. Bhuvaneswari, T.V., K. Mills Kim, D.K. Crist, W.R. Evans y D. Bauer. 1983. Effects of culture age on symbiotic infectivity of *Rhizobium japonicum*. J. of Bacteriol., 153 (442-451).
172. Malek, I. 1972. Environmental control of cell synthesis and function. J. Appl. Chem. Biotechnol., 22 (65-70).
173. Purchase, H.F. y P.S. Nutman. 1957. Studies on the physiology of nodule formation. VI. The influence of bacterial numbers in the rhizosphere on nodule initiation. Ann. Bot., 21 (439-454).

