

11661

2
2e)



Universidad Nacional
Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"



V N A M

PRODUCCION DE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS
USANDO COMO SOPORTE BAGACILLO DE CAÑA DE AZUCAR

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
(AREA MICROBIOLOGIA)

P R E S E N T A

STELLA MARIS REGINENSI RIVERA

ASESOR: M. G. VICENTE LOPEZ MERCADO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN.

1. INTRODUCCION.....	1
2. GENERALIDADES.....	3
2.1. UBICACION TAXONOMICA.....	3
2.2. CARACTERISTICAS GENERALES DEL GENERO RHIZOBIUM.....	4
2.3. PROCESO DE NODULACION.....	5
2.4. CONTROL GENETICO DE LA NODULACION.....	10
2.5. ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN LA FIJACION DE NITROGENO.....	13
2.5.1. FUENTE DE PODER REDUCTOR.....	14
2.5.2. FUENTE DE ENERGIA.....	15
2.5.3. COMPLEJO ENZIMATICO.....	15
2.5.3.1. Nitrato Reductasa.....	17
2.5.3.2. Nitrito Reductasa.....	17
2.5.3.3. Glutamina sintetasa.....	17
2.5.3.4. Glutamato sintetasa.....	18
2.6. LEGHEMOGLOBINA Y HEMOPROTEINAS DE RHIZOBIUM....	19
2.7. REGULACION DE LA FIJACION DE NITROGENO.....	21
2.8. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS DE RHIZOBIUM.....	22
2.9. USO DE SOPORTES PARA EL TRANSPORTE DE INOCULANTES.....	27
3. OBJETIVOS.....	31
4. MATERIALES Y METODOS.....	32
4.1. DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO.....	32
4.2. RECUPERACION DE CEPAS.....	33
4.3. OPTIMIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO.....	34

4.4. OPTIMIZACION DE PARAMETROS AMBIENTALES.....	38
4.5. ESTUDIOS EN EL FERMENTADOR.....	38
4.6 MATERIAL UTILIZADO COMO SOPORTE.....	39
4.7. METODOS ANALITICOS.....	40
5. RESULTADOS Y DISCUSION.	
5.1. OPTIMIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO.....	41
5.1.1. EVALUACION DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.....	41
5.1.2. EVALUACION DE CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE EXTRACTO DE LEVADURA EN EL MEDIO..	51
5.1.3. EVALUACION DE CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE SULFATO DE MAGNESIO EN EL MEDIO..	60
5.1.4. EVALUACION DE CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE FOSFATO DE POTASIO EN EL MEDIO....	69
5.1.5. EVALUACION DE CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE CLORURO DE SODIO EN EL MEDIO.....	78
5.1.6. EVALUACION DE CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE CLORURO FERRICO EN EL MEDIO.....	87
5.1.7. OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO.....	95
5.2. OPTIMIZACION DE LA CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LOS MEDIOS SELECCIONADOS.....	97
5.2.1. EFECTOS DE LAS MODIFICACIONES DE pH.....	97
5.2.2. EFECTOS DE LAS MODIFICACIONES DE LA TEMPERATURA.....	103
5.2.3. EFECTOS DE LA MODIFICACION DE LOS NIVELES DE APORTE DE MANITOL.....	108
5.3. EVALUACION DE AIREACION Y AGITACION EN MEDIO OPTIMIZADO DE <i>R. phaseoli</i>	112

5.4. EVALUACION DE LA SOBREVIVENCIA DE LAS BACTERIAS EN EL SOPORTE DE BAGACILLO DE CAÑA DE AZUCAR....	125
5.5. CARACTERIZACION DE LAS CEPAS DE ACUERDO A LA PRODUCCION DE SUSTANCIAS ACIDAS O ALCALINAS.....	131
6. DISCUSION.....	128
7. CONCLUSIONES.....	136
8. BIBLIOGRAFIA.....	138

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar las condiciones óptimas para la propagación de *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium meliloti* y *Rhizobium phaseoli*, así como el estudio de la posibilidad de utilizar bagacillo de caña de azúcar como soporte para inoculantes. La optimización de medios nutricionales para las bacterias se realizó mediante la evaluación de variaciones en las concentraciones de fosfato dibásico de potasio (0.66, 1.16, 1.66 y 2.16 g/l), sulfato de magnesio (0.26, 0.51, 1.01 y 1.26 g/l), cloruro de sodio (0.05, 0.15, 0.35 y 0.45 g/l), cloruro férrico (0.05 y 0.15 g/l) y extracto de levadura (0.50, 0.75, 1.25 y 1.50 g/l) en un medio básico de crecimiento calculado en base a la composición bacteriana. Asimismo se evaluaron glucosa, sacarosa, glicerol y manitol (10 g/l) como fuentes de carbono. Los resultados obtenidos muestran que las mejores velocidades de crecimiento y menores tiempos de duplicación se lograron con manitol (9.99 ± 2.9 h), difiriendo en forma significativa ($P < 0.05$) de sacarosa (14.61 ± 4.82 h) y glicerol (15.61 ± 5.61 h) cuyos tiempos de duplicación fueron intermedios, mientras que la glucosa (19.2 ± 6.11 h) demostraron pobres características como fuente de carbono para estas bacterias en forma general. El estudio particular de los tiempos de duplicación de cada bacteria evaluada demostró que *R. phaseoli* puede utilizar alternativamente sacarosa (11.86 ± 1.53 h) o glicerol (10.45 ± 0.86 h) cuyo comportamiento no difirió en forma significativa de manitol (9.73 ± 0.35). En el caso de *R. meliloti* la sacarosa (11.31 ± 1.83 h) y en *R. japonicum* el glicerol presentaron comportamientos similares a manitol, lo cual sugiere que en condiciones de producción pueden ser sustitutos de la fuente de carbono. La evaluación de las concentraciones óptimas de nutrientes demostró que cada bacteria presenta requerimientos diferentes para lograr los máximos crecimientos. Los niveles óptimos que surgen de este estudio fueron para fosfato dibásico de potasio de 1.66, 1.16 y 1.66 g/l, sulfato de magnesio 0.51, 1.01, y 0.26 g/l, cloruro de sodio 0.35, 0.45 y 0.35 g/l, cloruro férrico 0.05, 0.15 y 0.15 g/l y extracto de levadura 0.75, 1.50 y 1.25 g/l, para *R. meliloti*, *R. phaseoli* y *R. japonicum*, respectivamente. En los medios así optimizados, se evaluaron para cada una de las bacterias los niveles óptimos de pH, temperatura y concentración de manitol, variando los niveles en los rangos de 6.0 a 8.0 para pH, 26 a 34 C en la temperatura y 10 a 20 g/l de manitol. El pH óptimo resultante del estudio fue de 7.0 para *R. phaseoli*, 7.5 para *R. japonicum* y 8.0 para *R. meliloti*. Por su parte, las temperaturas óptimas de crecimiento fueron de 28 C para *R. japonicum* y 30 C para *R. meliloti* y *R. phaseoli*. El aumento de las concentraciones de manitol en el medio de cultivo no presentó efectos positivos en *R. japonicum* y *R. phaseoli*, encontrándose una mayor velocidad de crecimiento en *R. meliloti* utilizando 15 g/l. Las condiciones de agitación y aireación del medio se realizó en fermentador utilizando la especie *R. phaseoli*. Los resultados de esta parte

del trabajo indicaron que las condiciones óptimas fueron de 500 rpm de agitación y 0.5 vvm de aireación. En estas condiciones de cultivo se logró una producción de 4.5 g de MS bacteriana/l de medio, lo cual equivale a 0.105 g MS/l/h. El consumo de manitol en estas condiciones fue de 0.24 g/l/h. El estudio final del proceso lo constituyó la evaluación de bagacillo de caña de azúcar molido como soporte bacteriano para su transporte hacia el productor. La evaluación se realizó mediante cuenta viable indicando que a temperatura de 4 C la conservación hasta los 90 días fue muy buena logrando cuentas viables propias de un inoculante de excelente calidad. La conservación fue afectada cuando la temperatura se mantuvo a 30 C lo cual indicaría la necesidad de conservar el inoculante bajo condiciones de refrigeración. De acuerdo a los resultados obtenidos para el soporte bajo estudio se puede concluir que el bagacillo de caña de azúcar puede sustituir el uso de turba como soporte.

1. INTRODUCCION

Los elementos que componen los organismos vivos, particularmente aquellos considerados como mayores (carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno), están sujetos a procesos cíclicos en la naturaleza, siendo el nitrógeno uno de los que revisten mayor importancia desde el punto de vista económico y ecológico (38), ya que es el nutriente limitante más común en la producción agrícola.

La mayoría del nitrógeno que entra al suelo es en forma de compuestos inorgánicos reciclado, tales como nitratos y amonio, que provienen de la lluvia, de excreciones y descomposición de organismos (37). La atmósfera es la fuente original de casi la totalidad del nitrógeno en el sistema suelo-planta-animal, ya que las rocas ígneas presentan contenidos de 10 a 50 ppm, por lo cual su aporte se torna insignificante. La transferencia del nitrógeno atmosférico al suelo es lograda casi totalmente por medio de procesos de fijación microbiológico o industrial de nitrógeno molecular (N_2), aunque una pequeña cantidad proviene de procesos químicos (generados por luz, combustión o descargas eléctricas) aportado por la precipitación (63, 37). Resulta difícil poder estimar con precisión la cantidad de nitrógeno mundialmente fijada por los microorganismos, pero se considera normalmente una cifra anual de 100 millones de toneladas, lo cual supera los

43 millones de toneladas provenientes de la fijación industrial (38, 63). Estimaciones más recientes indican que el total fijado por los diferentes procesos asciende a 240 millones de toneladas, de las cuales el 66% corresponde a procesos biológicos, 25% a la fijación industrial y 9% por procesos químicos espontáneos (37).

La fijación simbiótica de nitrógeno en las leguminosas presenta un especial interés agronómico y ecológico, puesto que es una forma económica de mantener o aumentar el contenido de nitrógeno del suelo, evitando así los efectos contaminantes reportados por la fertilización química excesiva. La utilización de inoculantes con bacterias del género Rhizobium conduce a las siguientes ventajas: 1) disminución en el uso de fertilizantes nitrogenados, 2) aumento en la producción de gramíneas asociadas o en el rendimiento en los cultivos subsecuentes, 3) mejoramiento de las propiedades físicas y químicas del suelo y 4) mejoras en la permeabilidad y drenaje del suelo (21).

2. GENERALIDADES

2.1. UBICACION TAXONOMICA

Las bacterias de los géneros Rhizobium y Agrobacterium son bacilos que pertenecen a la familia Rhizobiaceae, según la clasificación propuesta por Bergey (16). El género Rhizobium se compone de seis especies, las cuales reciben sus nombres de acuerdo a las especies vegetales en que se alojan. A continuación se detallan los géneros y las leguminosas con las cuales se asocian:

- 2.1.1. Rhizobium leguminosarum. Se localizan en leguminosas de los géneros Pisum, Vicia, Lathyrus, Lens y Cicer.
- 2.1.2. Rhizobium phaseoli. Es la especie que encontramos en el frijol (Phaseolus vulgaris).
- 2.1.3. Rhizobium trifolii. Se encuentran en especies de leguminosas forrajeras del género Trifolium.
- 2.1.4. Rhizobium meliloti. Característica de los géneros Medicago, Melilotus y Trigonella.
- 2.1.5. Rhizobium lupini. Se presenta en los géneros Lupinus, y Ornithopus.
- 2.1.6. Rhizobium japonicum. Especie presente en la soja (Glycine maxima).

Otras clasificaciones propuestas incluyen en forma genérica a Rhizobium spp cuya especificidad se asocia a leguminosas tropicales (Vigna, Arachis, Stylosanthes, Leucaena, Pachyrhizus), en las cuales es difícil de establecer una clasificación precisa (49).

2.2. CARACTERISTICAS GENERALES DEL GENERO RHIZOBIUM.

Las bacterias de este género son bastones cortos y medianos de 1.2 a 3 u de largo por 0.5 a 0.9 u de ancho, son móviles cuando jóvenes y muchas veces presentan gránulos prominentes de β -hidroxi-butarato (61). Son bacterias quimioorganotróficas y crecen mejor sobre medios complejos, especialmente con extracto de levadura, incubados entre 25 y 30 C. Son organismos aeróbicos, que presentan su crecimiento máximo a presiones de oxígeno relativamente bajas. Las colonias pueden caracterizarse por la producción de mucílago o goma, aunque se encuentran variantes no gomosas. Este mucílago está formado por glucosa, ácido glucurónico, galactosa y piruvil (38).

Bajo condiciones de cultivo en agar-extracto de levadura-manitol se observa escaso o nulo crecimiento con un período de incubación de 24 horas. Cuando el desarrollo del cultivo es de moderado a abundante entre los 3 y 5 días, incoloro o blanco, con poca a abundante formación de goma, puede corresponder a las especies: Rhizobium phaseoli, Rhizobium meliloti, Rhizobium trifolii y Rhizobium leguminosarum. En cambio, cuando el crecimiento fue escaso luego de 5 días, leve a moderado en 10 días, incoloro o blanco y rara vez rosado, con poca formación de goma, pueden pertenecer a las especies Rhizobium lupini y Rhizobium japonicum (61,49).

Las pruebas de laboratorio para su identificación se basan en la motilidad, tinción de Gram, y las reacciones en leche tornasolada. Las pruebas específicas de identificación se realizan por medio de la producción de anticuerpos para la aglutinación, inmunodifusión o anticuerpos fluorescentes (40,61), así como anticuerpos monoclonales (38).

2.3. PROCESO DE MODULACION.

Los microorganismos del suelo con capacidad para fijar nitrógeno pueden ser de vida libre, como Klebsiella y Azotobacter, o aquellos que se asocian simbióticamente a leguminosas (Rhizobium). Los microorganismos fijadores de vida libre presentan la capacidad de reducir el nitrógeno de la atmósfera del suelo y utilizarlo para su propio crecimiento; mientras que las bacterias del género Rhizobium utilizan solo una parte del nitrógeno fijado aportando cantidades significativas a la planta huésped a cambio de azúcares provenientes de la fotosíntesis del vegetal. El género Rhizobium presenta la capacidad de infectar las raíces de las leguminosas, donde forman estructuras especializadas denominadas nódulos, en las cuales se lleva a cabo el proceso de fijación (49).

La relación entre la formación de nódulos y el aumento en la asimilación de nitrógeno por las leguminosas, fue descrita en

1888 por Hellriegel y Wilfarth. Sin embargo, los primeros estudios de la simbiosis utilizando nitrógeno marcado se realizaron 50 años mas tarde. La nodulación y la fijación de nitrógeno atmosférico son procesos que presentan una gran especificidad entre una determinada leguminosa y cepas de una especie de Rhizobium. Estas interacciones específicas resultan de la variación genética de la planta huésped y en la bacteria, y sobre ellas pueden tener efectos importantes las modificaciones ambientales (38).

Los fenómenos observados durante el proceso de nodulación son los siguientes: 1) invasión de los pelos absorbentes de la raíz, 2) avance del hilo de infección, 3) diferenciación de la bacteria y de las células que integran el nódulo, y 4) fijación de nitrógeno, inducción de las enzimas de asimilación y distribución de amonio (49). El proceso de infección se inicia con la colonización y penetración de bacterias de Rhizobium en los pelos absorbentes de la raíz de la planta. En el momento inicial de la colonización bacteriana se establece la susceptibilidad de la planta y cuales de las cepas de Rhizobium presentes en el suelo serán competitivamente superiores para invadir y establecer la simbiosis (50). La motilidad de la bacteria puede tener incidencia en el grado de colonización de las raíces por una cepa específica, aunque algunos trabajos no han encontrado diferencias entre cepas móviles y no móviles (mutantes Tn5-inducidas, no

móviles) en efectividad de nodulación y fijación de nitrógeno (19,5).

El inicio de la infección radical es facilitado por la producción de poligalacturonasas por la bacteria, que degradan los enlaces a 1,4-glucosídicos de las pectinas y conducen a una pérdida de la estructura de las paredes celulares de los pelos radicales, permitiendo el ingreso del filamento de infección (38). En forma paralela, el pelo absorbente infectado presenta una deformación o enrollamiento en respuesta a la influencia de auxinas o reguladores del crecimiento generados por la bacteria. Entre estos últimos, uno de los más estudiados es el ácido indolacético que tiene efectos hipertróficos en la raíz del vegetal e induce los cambios morfológicos característicos del proceso de nodulación (65). Las paredes del pelo se invaginan desarrollando una estructura de infección en forma de tubo interior. El filamento de infección inicial asemeja una hifa estrecha y posteriormente se ramifica desarrollando el aspecto característico del nódulo. La estructura de infección es rodeada por una pared de celulosa sintetizada por la planta huésped en respuesta a la infección. Las bacterias son liberadas en el citoplasma del simbiote, encerradas por la membrana sintetizada por el huésped, donde se multiplican entre 4 y 6 veces de la cantidad original (4). La estructura final consiste de un corazón central conteniendo las

bacterias de Rhizobium y un área cortical asociado al sistema vascular de la planta (4, 60).

Posteriormente, la bacteria que ocupa el citoplasma vegetal asume una morfología particular denominada bacteroide. La mayoría de los nódulos contienen una sola cepa de bacterias, aunque pueden ser infectadas por una o más de los tres géneros (colectivamente conocidos como rizobios) Rhizobium, Bradyrhizobium, Azorhizobium (55). En los nódulos formados se produce ácido giberélico que tendrá efectos inhibitorios y controlará el desarrollo de los nuevos nódulos (38). El establecimiento de la simbiosis conduce a la producción de los componentes específicos del nódulo, tales como leghemoglobina producida en el citoplasma de la planta y la nitrogenasa sintetizada por el bacteroide (57).

Como se mencionó anteriormente, cada especie de Rhizobium puede establecer una relación simbiótica solo con ciertas especies de leguminosas. Bohlool y Schmidt (12) establecen la existencia de una correlación entre la unión de las lectinas de las plantas a los receptores de superficie de Rhizobium y la existencia de esta especificidad. Las lectinas son proteínas que se unen a estructuras bacterianas superficiales de carbohidratos. En Rhizobium spp los receptores sacáridos interactúan en forma específica con las lectinas de las plantas y la naturaleza bioquímica de éstos es importante en el establecimiento de la relación. Existe una gran

variedad de polisacáridos producidos por las bacterias: heteropolisacáridos acídicos, glucanos asociados a la pared , B 1,2-glucanos y B 1,4-glucanos, que actúan como receptores. Esta unión entre las lectinas de las plantas y carbohidratos de la superficie de las bacterias determina las leguminosas que pueden ser noduladas (3, 29). Por otra parte, la antigenicidad de las diferentes cepas de Rhizobium se expresa por la presencia de lipopolisacáridos (LPS), exopolisacáridos (EPS) y polisacáridos capsulares (CPS), relacionándose en forma directa con el establecimiento de la simbiosis y la formación de nódulos efectivos (3, 29, 18). Sin embargo, algunas cepas de Rhizobium fredii con mutaciones deficientes en EPS y glucanos neutros fueron capaces de producir algunos nódulos eficientes en Glicine maxima, indicando que ni el EPS ni los glucanos neutros son esenciales para la inducción de determinados nódulos por este caso particular (36, 22)

La interacción entre las lectinas y los receptores del microorganismo puede variar entre una y otra fase de crecimiento de la bacteria. Por otra parte, existen evidencias que indican que la síntesis y/o modificaciones del receptor de la lectina en el Rhizobium puede ser afectado por el ambiente de la raíz del huésped (32).

La relación simbiótica entre microorganismo y planta puede ser alterada por factores ambientales como la pérdida de nutrientes, competencia microbiana, saturación de oxígeno, pH, desecación, temperatura y salinidad del suelo (47,8). El efecto del pH es importante en el establecimiento de la capacidad de competencia por los sitios de nodulación. Estudios realizados en Phaseolus vulgaris variando el pH hacia la acidez (pH=6.0 a 4.5), usando cepas ácido tolerantes y ácido sensibles, demostraron la mayor susceptibilidad de algunas biovariedades (59). La restricción a la nodulación en tréboles a pH bajo fueron detectados al agregar sales alcalinizantes en los perfiles superiores del suelo, cuyos efectos condujeron a la proliferación en número y tamaño de nódulos efectivos (45). El contenido de humedad del suelo tiene efectos sobre las bacterias de Rhizobium inoculadas, mejorando la sobrevivencia en suelos con baja humedad (43). La sobrevivencia de inóculos también es afectada por la acción de antibióticos o la predación por otros microorganismos (1). La utilización de fertilizantes nitrogenados en altas o bajas concentraciones pueden alterar tanto la infección como la simbiosis, lo cual se refleja en una menor producción de nódulos y materia verde por la planta (44).

2.4. CONTROL GENETICO PARA LA NODULACION.

La información genética contenida en las diferentes cepas de Rhizobium controlan el proceso de nodulación. En las cepas de

crecimiento rápido, la información genética es codificada en plásmidos; mientras que en las de crecimiento lento la mayoría de los genes asociados con la nodulación se localizan en los cromosomas del núcleo (49). Un plásmido simbiótico (*Sym*) ha sido definido como el que determina la especificidad con una leguminosa para la nodulación (reconocimiento, infección, nodulación y fijación de nitrógeno) y contiene genes estructurales para la producción de enzima nitrogenasa (genes *nif*). Estos plásmidos participan muy frecuentemente en eventos de recombinación, lo cual permite que la bacteria se adapte rápidamente a una serie de cambios que puedan ocurrir en el ambiente, por medio de una generación de nuevas funciones. En México, se han logrado aislamientos de cepas de *Rhizobium phaseoli* simbióticamente inestables a causa de rearrreglos genéticos, que condujeron a un cambio en la estructura del plásmido *Sym* y concomitantemente una modificación en la información transportada (51).

En otras cepas de crecimiento rápido (*R. leguminosarum*, *R. trifoli* y *R. meliloti*) la regulación de los plásmidos *Sym* se localiza en los genes *nod* (54). En general, la bacteria requiere de la presencia de genes para la nodulación (*nod*) y para la especificidad de huésped (*hsn*). Originalmente la designación *nod* fue sugerida para los genes *hsn*. En aquellas especies de crecimiento rápido *nod* y *hsn* son genes unidos, con relación cercana a los necesarios para la fijación de nitrógeno (*fix*) y la producción de la enzima nitrogenasa (*nif*) (46).

Dentro de los genes de nodulación (*nod*) en el plásmido *Sym* se han identificado una serie de genes denominados *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD*, *nodI* y *nodJ*, mientras que para la especificidad de huésped se describen *nodE* y *nodF*. El plásmido *Sym* en *Rhizobium meliloti* contiene 3 genes *nodD*, dos de los cuales *nodD1* y *nodD2* son requeridos para una eficiente nodulación de la planta huésped (53).

Los plásmidos de las cepas de *Rhizobium* son megaplásmidos, y en la mayoría de los casos disponen de más de un plásmido, pudiendo presentar hasta siete. Algunos plásmidos contienen genes que codifican para la entrada de hidrógeno (*hup*), otros determinan la producción de bacteriocina (*mep*) y su represión (*rps*), y para la producción melanina (*mel*) (58).

El complejo nitrogenasa rizobial produce hidrógeno en una reacción ATP dependiente, la cual es mediada por una pérdida de energía. Las cepas de *Rhizobium* con un sistema de activación de hidrogenasa (*hup*) pueden reciclar parcialmente el ATP. Tales cepas son más eficientes en la fijación de nitrógeno (58).

Existen evidencias de que varios genes en las plantas controlan el desarrollo de nódulos efectivos en la raíz. El análisis del

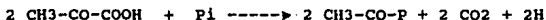
RNAM aislado de nódulos de raíces, ha demostrado la presencia de diferentes clases de RNAMs específicos, que no han sido aislados en tejidos de raíces no infectadas. Lo anterior indica la inducción y expresión de genes nodulares específicos, que codifican la producción de proteínas específicas denominadas nodulinas que intervienen en el proceso de nodulación. La expresión de los genes de leghemoglobina (lb) son esenciales para la fijación de nitrógeno en los nódulos, puesto que esta sustancia provee un balance en la distribución de oxígeno entre los bacteroides y el citoplasma de las plantas (11).

2.5. ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN LA FIJACION DE NITROGENO.

La atmósfera terrestre que rodea una hectárea de superficie contiene 80.000 toneladas de nitrógeno, constituyendo la fuente principal de compuestos nitrogenados para el suelo. Se calcula que en la atmósfera hay 4×10^9 toneladas de nitrógeno el cual no es accesible para las plantas, a menos que sea fijado en forma simbiótica o asimbiótica por microorganismos.

La fijación de nitrógeno requiere de la existencia de microorganismos, una fuente de poder reductor, una fuente de energía y un complejo enzimático (que incluye una hidrogenasa y una nitrogenasa) en la secuencia que se señala a continuación:

2.5.1. Fuente de poder reductor. La fijación de nitrógeno es un proceso de reducción que necesita de la acción de sustancias reductoras como el ácido pirúvico, ácido α -cetoglutarico o hidrógeno molecular. Existe un paralelismo estrecho entre las reacciones que llevan a cabo los organismos fotosintéticos y aquellos fijadores de nitrógeno, por lo cual se ha propuesto la hipótesis de fotorreducción del nitrógeno. El ácido pirúvico puede provenir de la fotosíntesis o de la degradación de los hidratos de carbono exógenos, suministrando el poder reductor (2H) y por otra parte el acetyl fosfato que sirve para la síntesis de ATP :



La glucosa es metabolizada por vía Entner-Duodoroff y ciclo de Krebs en *R. japonicum*. Los polioles como manitol son buena fuente de carbono. Las deshidrogenasas inducibles NAD poliol se producen en cultivos de *R. meliloti* cuando crecen en medios con este compuesto. La acción de estas enzimas es oxidar a D-arabinosa a D-xilulosa y D-manitol, D-sorbitol a D-fructosa. Las enzimas inducidas manitol fructoquinasa , una isomerasa fosfohexosa y una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa fueron detectadas con ausencia de hexoquinasa (9).

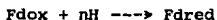
La vía del manitol es la siguiente:



2.5.2. Fuente de energía. El adenosintrifosfato (ATP) proviene de la reacción del acetilfosfato para producir ácido acético:



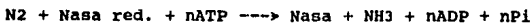
2.5.3. Complejo enzimático. Existe un sistema que funciona como donador de hidrógeno, que incluye una hidrogenasa y las enzimas catalizadoras de reacciones, y un segundo sistema activador de N es una nitrogenasa capaz de catalizar la reducción de nitrógeno. El hidrógeno activado por la hidrogenasa es orientado hacia la nitrogenasa por un transportador de hidrógeno (principalmente ferredoxina) que es una proteína que puede presentarse bajo formas moleculares reducidas u oxidadas.



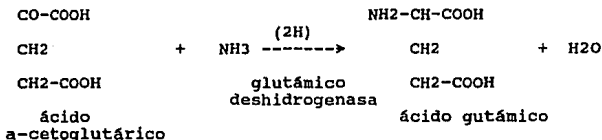
El dinitrógeno es activado por la nitrogenasa (Nasa) y el complejo nitrogenasa-N₂, es reducido por la ferredoxina :



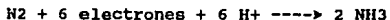
El complejo reducido acepta ATP de la reacción fijadora de energía (*) y se libera amoníaco :



El amoníaco formado se combina con moléculas carbonadas para dar lugar a aminoácidos según las siguientes reacciones :



Las enzimas responsables de la fijación de nitrógeno están formada por dos proteínas fácilmente separables. El componente I, también llamado dinitrogenasa, es un tetrámero de masa molecular entre 200 y 270 KD, que contiene hierro, azufre y molibdeno. El componente II (reductasa) es un dímero de dos subunidades iguales con masa molecular 60 KD, con un centro de transferencia de electrones formado por Fe₄ S₂. Existe un flujo de electrones desde la reductasa a la dinitrogenasa. Esta transferencia de electrones del componente II al componente I está acoplado con el proceso de hidrólisis del Mg-ATP, que conduce a una reducción del nitrógeno molecular (35).



2.5.3.1. Nitrato reductasa.

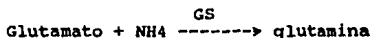
Esta enzima es una Mololibdono-flavoproteína, formada por 2 subunidades idénticas de masa molecular de 200 KD. La enzima puede ser inactivada por amonio, el cianuro y altas temperaturas. En los nódulos esta enzima cataliza la reacción de nitratos a nitritos (41).

2.5.3.2. Nitrito reductasa.

Esta enzima se induce en presencia de nitritos o nitratos. En condiciones in vitro requiere a ferredoxina como reductor. La acción enzimática conduce a la reducción de los nitritos a amonio (41).

2.5.3.3. Glutamina sintetasa (GS).

La actividad de esta enzima es influenciada por la presencia de Mg y Mn, y cataliza la reacción del glutamato a glutamina.

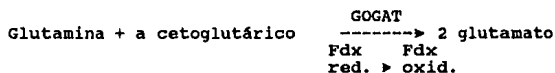


El amonio puede ser incorporado a dos diferentes tipos de grupos químicos. El primero lo constituyen las amidas que se forman por una condensación de amonio con un grupo carboxil-ATP y es catalizada por una glutamina sintetasa. El segundo tipo lo constituye el grupo α -amino, que involucran una aminación reductiva de un oxoácido y requiere un agente reductor, que usualmente es NADH o

Fd reducida. Esto es muy importante para la biosíntesis del grupo a-amino en las rutas metabólicas de proteína. La biosíntesis del grupo amino puede ser llevada a cabo por dos diferentes enzimas, la glutamato-deshidrogenasa y glutamato-sintetasa (13).

2.5.3.4. Glutamato sintetasa (GOGAT).

Esta enzima cataliza la formación de glutamato a partir de glutamina y ácido a-cetoglutárico (41).



La enzima nitrogenasa y glutámico deshidrogenasa se encuentra en el citoplasma del bacteroide, la glutamato sintasa se encuentra unida a la membrana y la glutamina sintetasa en la solución del citoplasma. Los primeros productos orgánicos estables desde la fijación de nitrógeno en nódulos son glutamato, glutamina y asparagina que constituyen el punto final del nitrógeno en el nódulo. Este proceso tiene como resultado la presencia de altos niveles de asparagina en la savia conducida por el xilema de varias especies de leguminosas. La asparagina es una opción lógica para el transporte de nitrógeno debido a que tiene una

alta relación C:N y se sintetiza relativamente rápido. La síntesis de asparagina desde oxaloacetato usando glutamato y glutamina como donadores de nitrógeno, involucra la acción de dos enzimas :

Aspartato aminotransferasa

Oxaloacetato + L-glutamato ----> L-aspartato + 2-oxoglutarato

Asparagina sintetasa

L-Aspartato + L-Glutamina -----> L-asparagina + glutamato

ATP ----> AMP + PPI

Las actividades de estas enzimas en el citoplasma del nódulo de la planta aumenta con la fijación de nitrógeno (13)

2.6. LEGHEMOGLOBINA Y HEMOPROTEINAS DE RHIZOBIUM.

En 1939 se reconoce la presencia de un pigmento rojo en los nódulos de las raíces parecido a la hemoglobina y, al igual que ésta, tiene la capacidad de transportar oxígeno. Esta sustancia es conocida como leghemoglobina (lb) y químicamente es una hemoproteína monomérica con peso molecular de 15000 a 17000 daltons, que tiene como grupo prostético un protohemo IX con un residuo de ácido propiónico. Cuatro de los heme-Fe son ocupado por átomos de nitrógeno de los núcleos tetrapirrol. La lb es la hemoproteína dominante de los nódulos efectivos de las raíces de leguminosas y tiene un rol crítico en el aporte de oxígeno para la actividad

respiratoria del bacteroide relacionado a la fijación de nitrógeno (23). Los bacteroides poseen un sistema respiratorio altamente eficiente en producir ATP para la acción de la nitrogenasa, que opera sólo cuando el oxígeno es suplementado en forma estabilizada y a baja concentración (24). En su síntesis interviene el citoplasma de la planta huésped y el bacteroide. Estudios de biosíntesis de leghemoglobina han confirmado que las leguminosas contienen la información genética para el tipo de lb producido. (25). En relación con el sitio de síntesis del hem y la globina, se ha sugerido que el hem es producto de síntesis del bacteroide y la globina de la planta huésped.

Las leghemoglobinas aisladas de diferentes especies de leguminosas presentan diferencias en composición y propiedades. Entre éstas se han encontrado variaciones en su punto isoeléctrico y en composición de aminoácidos (38). Independientemente de estas variaciones, la función de mayor importancia de la leghemoglobina es transportar oxígeno a muy bajas concentraciones hacia el bacteroide (9). La abundancia de leghemoglobina en el citoplasma asegura un mayor flujo de lb-oxigenada a través del citosol y esto se relaciona en forma directa con una mayor actividad de la nitrogenasa. Las disminuciones en el aporte de oxígeno puede disminuir la actividad nitrogenasa en 10 a 20 veces (64).

La leghemoglobina se encuentra dentro de las membranas peribacteroides y la transferencia de oxígeno al bacteroide se realiza directamente. Los gradientes de presión de oxígeno son los apropiados para que tenga lugar el ingreso por difusión facilitada, en forma similar a la postulada para los músculos (64,24).

2.7. REGULACION DE LA FIJACION DE NITROGENO.

Los tipos de regulación que afectan la síntesis y la actividad de una enzima son determinados por el papel que juega en el metabolismo general. Los organismos han desarrollado vías metabólicas y mecanismos de control que optimizan su habilidad para lograr el máximo beneficio del ambiente en que se encuentran.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno presentan ventajas selectivas en aquellos ambientes que contienen muy poco material nitrogenado disponible. A pesar de la utilidad potencialidad de la enzima nitrogenasa, pocas especies de bacterias la poseen debido a que su formación y mantenimiento pueden no ser viables en la mayoría de los procariotes y en todos los eucariotes. La fijación de nitrógeno requiere de: a) un bajo potencial reductor, b) varias moléculas de ATP para cada molécula de NH_4 formado, c) un complejo metaloproteína, d) una sola forma de los metales en las proteínas y e) un mecanismo para proteger la nitrogenasa al daño producido por el oxígeno. A causa de estos requerimientos, el mantenimiento y producción de la enzima nitrogenasa es consider-

ablemente costoso para una bacteria, lo cual contribuye a la baja incidencia de esta enzima entre los organismos vivos.

El exceso de amonio en el medio inhibe la actividad de la nitrogenasa, que podría ser causado por una inactivación irreversible de la enzima. La presencia de amonio ejerce un alto grado de represión sobre la síntesis de nitrogenasa. Trabajos realizados con precursores de amonio, como urea y nitratos, en concentraciones de 1mg/ml condujeron a una inhibición completa de la nitrogenasa. Otras fuentes nitrogenadas como aspartato, glutamato y asparagina también inhiben a la enzima nitrogenasa por el catabolismo de éstos con producción de NH_4 (15).

2.8. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS DEL GENERO RHIZOBIUM.

Las bacterias de los nódulos de raíces de las leguminosas son heterótrofas y capaces de utilizar una amplia variedad de hidratos de carbono. En general, los compuestos inorgánicos de nitrógeno (NH_4 , NO_3) son suficiente para su desarrollo, aunque existen cepas que pueden tener requerimientos específicos por uno o más aminoácidos y/o vitaminas para lograr crecimientos óptimos.

Los Rhizobium no crecen bien en medios de cultivos con peptonas que son utilizadas normalmente para muchas bacterias, pero pueden

crecer en diversos extractos complejos de origen vegetal. Por lo general, la levadura es la fuente más conveniente y puede ser aportada en forma de extracto fresco o en preparados comerciales.

La fuente de carbono más común es el manitol, pero puede ser sustituido por glucosa o sacarosa. Los rizobios de lento crecimiento crecen mejor en fuentes de galactosa o arabinosa. Los medios líquidos de uso común se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1. Algunos medios de cultivo para Rhizobium.

 CALDO DE LEVADURA MANITOL

K ₂ HPO ₄ (g/l)	0.5	-----	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O (g/l)	0.2	0.2	0.8
NaCl (g/l)	0.1	0.2	0.2
Manitol (g/l)	10	10	10
Agua de levadura (cc/l)	100	-----	100
o			
Extracto de levadura (g/l)	0.4	1	-----
Agua destilada (ml)	900	-----	900
FeCl ₃ .6H ₂ O (mg/l)	-----	6.7	100
K ₂ PO ₄ .3H ₂ O (g/l)	-----	0.65	-----
Completar con agua destilada	-----	X	-----
	(Vincent 1975)	(Paau 1989)	(Norris y Date, 1976)

Se esteriliza en autoclave a 15 Lb durante 15 minutos. El medio sólido se obtiene al agregar 15 a 20 g/l de agar bacteriológico (61,40). El agua de levadura se prepara suspendiendo 100 gramos de levadura de cerveza fresca en 900 ml de agua y se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 15 lb. Se decanta y el sobrenadante

es filtrado. Los extractos de levadura comercial deben ser analizados para evaluar el contenido de aminoácidos; ya que altas concentraciones de éstos inhiben el crecimiento o inducen a fijación inefectiva de nitrógeno (40).

La composición del medio de cultivo usado en propagación industrial de Rhizobium se describen en la Tabla 2.

TABLA 2. Medios de cultivo para la producción industrial de Rhizobium

INGREDIENTES (mg/l)	Wright (1925)	Bond (1940)	Van Schreven (1953)	Burton (1967)	Date (1976)
Sacarosa	----	10.00	15.00	10.00	----
Manitol	10.00	----	----	2.00	10.00
K ₃ PO ₄	----	----	----	0.10	----
K ₂ HPO ₄	0.50	9.50	0.50	----	0.50
KH ₂ PO ₄	----	----	----	0.37	----
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20	0.20	0.20	0.18	0.80
NaCl	0.10	0.10	----	0.06	0.20
(NH ₄) ₂ HPO ₄	----	----	----	0.10	----
CaSO ₄ ·2H ₂ O	----	----	----	0.04	----
CaCO ₃	3.00	1.00	2.00	0.25	----
FeCl ₃ ·6H ₂ O	----	----	----	----	0.10
Agua de levadura (ml)	100	50	100	----	100
Autolisado de levadura	----	----	----	1.00	----
Agua (ml)	900	950	900	1000	900

(Burton, 1979)

Es importante regular el balance de aminoácidos en el medio de cultivo. Los cultivos en medios enriquecidos con glicina, alanina y ciertas formas D de aminoácidos pierden su habilidad para fijar nitrógeno. Las cepas eficientes de Rhizobium han sido mantenidas en cultivos sobre medios que contienen extracto de levadura, el

cual aporta isómeros naturales de aminoácidos en su forma L.

Los requerimientos para el crecimiento de Rhizobium spp son simples y varían según la especie o cepa utilizada (17). La biotina puede ser esencial para el crecimiento de estas bacterias. Los subcultivos del microorganismo por periodos prolongados en medios conteniendo menos que 0.1 p.p.m de calcio son satisfactorios, aunque el Ca no tiene mucho efecto cuando el crecimiento de la bacteria es restringido por los constituyentes del medio (10).

En relación a los efectos del calcio sobre el crecimiento de Rhizobium existe cierta controversia entre autores. Los estudios utilizando medios libres de calcio con suficiente Mg, indican una reducción en la velocidad de crecimiento del cultivo. El Mg es esencial para todas las bacterias por sus funciones como cofactor, pero las evidencias presentadas en la literatura indican que estos cultivos son menos dependientes de calcio. Los signos de deficiencia en Ca se hacen aparentes a menos de 0.025 mM y la deficiencia de Mg a menos de 0.1 mM. El Ca juega el papel de proveer de rigidez a la pared celular (62). Otros autores, consideran que la omisión de las sales de calcio en los medios de cultivo no tendrán incidencia sobre el crecimiento del cultivo cuando se aumenta en 2 a 4 veces el aporte usual de Mg (40).

El crecimiento de Rhizobium en sistemas en lote deben considerar la optimización previa de los medios de cultivo para lograr inóculos densos. La UPIL (Unidad de Producción de Inóculos para Leguminosas) hace una serie de recomendaciones para la producción de inoculantes de Rhizobium de alta calidad. Los diseños propuestos para la propagación de inóculos para leguminosas es el uso de fermentadores de acero inoxidable 30 a 50 l de capacidad, con los accesorios necesarios para el crecimiento de bacterias aeróbicas como Rhizobium. Las principales recomendaciones que realizan son las siguientes:

- 1) El medio a utilizar es caldo de extracto de levadura-manitol (61), esterilizando el fermentador a 105 C durante una hora.
- 2) La inoculación del fermentador de 30 l se realiza con un litro de cultivo líquido de Rhizobium, guardando los cuidados de asepsia.
- 3) La aireación se realiza por inyección de aire estéril en el fermentador a través de un tapón poroso de acero inoxidable con algodón, a una velocidad de 5 l de aire/h/l del medio.
- 4) La regulación de la temperatura es controlada por un baño de agua a 30 grados centígrados.
- 5) La agitación se regula a través de un agitador magnético.

6) El control se realiza muestreando durante el crecimiento, para evaluar la calidad y conteo de Rhizobium. En estas condiciones, la UPIL obtiene cultivos densos de Rhizobium (48).

2.9. USO DE SOPORTES PARA EL TRANSPORTE DE INOCULANTES.

La industria de los inoculantes tiene sus comienzos en 1895 al introducir el "Nitragin" que era un medio de cultivo con bacterias Bacillus radicicola, actualmente conocida como Rhizobium spp., cultivadas en una botella de 10 onzas con una capa de medio sólido el cual contenía azúcar, asparagina, gelatina y extracto de leguminosas.

El soporte es todo material excipiente que por sus características, tanto físicas como químicas, es capaz de mantener viable a los rizobios el tiempo necesario en llevar a cabo la inoculación de las semillas de leguminosas sin que lleguen a perder sus propiedades infectantes y de crecimiento (30).

Las cualidades de un buen soporte para rizobios son: 1) no ser tóxico para las especies de Rhizobium, 2) tener buena absorción, 3) ser de fácil molido y esterilización, 4) presentar buena adsorción a las semillas y 5) estar disponibles en grandes cantidades y a un buen precio (17).

Los inoculantes actuales se basan normalmentes en soportes con medios líquidos o medios sólidos (turba, mezcla suelo-turba, suelo con alto contenido de materia orgánica) con medios de cultivos (30). La turba es el soporte universalmente usado en los inoculantes comerciales, éste no se encuentra en cualquier parte del mundo y donde lo hay es de un valor variable. La turba se forma de la acumulación y descomposición parcial de depósitos vegetales que se han conservado bajo condiciones de escasa aireación en los remansos de los lagos, estanques y pantanos. La turba en México es importada de Estados Unidos o de Canadá. Se han buscado otras alternativas que permitan sustituir a la turba como soporte como son el uso de carbón, bentonita, harina de alfalfa, filtrados obtenidos al procesar la caña de azúcar (20), polvo de bagazo de Machuca latifolia, residuos de hilo de seda (33), vainas de arroz y de sésamo (39), composta de residuos de cultivos de hongos (7). En Colombia y otros países tropicales se ha utilizado el bagacillo de caña de azúcar como soporte para inoculantes de Rhizobium con resultados adecuados que permiten sustituir a otros soportes cuando se dispone de este tipo de recursos (28). El alto contenido de materia orgánica del bagacillo de caña de azúcar hace que pueda ser utilizado como alternativa al uso de turba cuando sus costos lo permitan. Todos los soportes citados anteriormente y otros pueden sustituir a la turba ya que poseen

las características adecuadas para mantener poblaciones elevadas de células viables, conservando la capacidad de infección y de fijación de nitrógeno. La naturaleza del soporte y su tratamiento previo afectan la calidad del inoculante. Este debe ser secado fijando cuidadosamente las variables de temperatura y tiempo, y molido (malla-tamiz 200). En Alemania el secado lo realizan a 60C en grandes cantidades obteniendo buenos resultados en forma económica y efectiva (31).

El soporte se debe de esterilizar con preferencia, se realiza en autoclave o por radiaciones que facilitan la ausencia de sustancias tóxicas que se presentan por calor húmedo (52). Se envasan en bolsas de polietileno y se inoculan con cultivos con alta concentración de células (1×10^9 cél/ml). La humedad final debe de ser entre un 50%-60% a diferentes temperaturas de almacenamiento aumenta la viabilidad (34).

Los soportes se maduran de 2 a 3 días a temperatura ambiente, permitiendo el escape de gases de las bolsas y luego se almacenan. Los inoculantes con soporte sólido son impregnados sobre la superficie de las semillas, se usan adherentes como la goma arábiga u otras que evitan la muerte de los microorganismos por los cambios desfavorables en el suelo. Varios desechos agroindustriales se han utilizado para peletear las semillas inoculadas mejorando las condiciones adversas como son el pH del suelo, las heces de ganado vacuno es una de las alternativas que se probaron

con éxito para evitar la muerte de las bacterias por acidificación del medio (33).

3. OBJETIVOS.

México es un país exportador de azúcar y los residuos provenientes de su proceso industrial pueden ser utilizados para diferentes fines. En la actualidad el destino más importante de estos subproductos es la alimentación de rumiantes. Otras formas de utilización como su uso para soporte de cepas de Rhizobium pueden ser implementadas.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar un estudio que permita generar la tecnología para producir inoculantes a base de Rhizobium usando bagacillo de caña de azúcar como soporte.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

3.2.1. Diseñar un medio de cultivo para el crecimiento de Rhizobium.

3.2.2. Optimizar los componentes de dicho medio.

3.2.3. Optimizar el crecimiento de Rhizobium en función de parámetros ambientales como pH, temperatura, agitación y aireación en cultivo por lote.

3.2.4. Evaluar la factibilidad técnica de usar el bagacillo de caña de azúcar como soporte para la producción de inoculantes para leguminosas.

4. MATERIALES Y METODOS.

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M. Las cepas de bacterias utilizadas en el trabajo provenían de colecciones aportadas por otras instituciones nacionales (CINVESTAV Irapuato, Colegio de Posgraduados Chapingo).

Las cepas de Rhizobium utilizadas en el desarrollo del experimento fueron : 1) R.meliloti C1 (CINVESTAV, Irapuato), 2) R.japonicum 104A 14 Winconsin (Colegio de Posgraduados) y 3) R.phaseoli CPMex 1 (Colegio de Posgraduados) que se mantuvieron en medio de agar-manitol-extrato de levadura en tubo inclinado.

4.1. DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO.

El cálculo de los medios de cultivo se basó en los requerimientos de nutrientes de la bacteria para un rendimiento de 10 g de células por litro, de acuerdo a sus constituyentes celulares inorgánicos y el peso molecular de los nutrientes aportados (2). Los constituyentes celulares considerados fueron azufre, hierro, cloro, magnesio, sodio, fósforo, potasio, así como los aportes de vitaminas y aminoácidos detallados por Norris y Date (40). El aporte de oxígeno e hidrógeno necesarios para el crecimiento de la bacteria provenían de las sales o el agua presentes en el medio. La fuente de carbono utilizada fue el

manitol de acuerdo a las recomendaciones planteadas por otros autores (61, 40, 17). En base a los pesos moleculares de los elementos constituyentes de cada componente del medio se calculó la cantidad que debía integrarse para cubrir el requerimiento por el mismo. El medio base utilizado contenía: manitol 10 g, fosfato dibásico de potasio 1.66 g, sulfato de magnesio heptahidratado 0.76 g, cloruro de sodio 0.26 g, cloruro férrico hexahidratado 0.1 g, extracto de levadura 1 g y agar bacteriológico 15 g, por litro de medio a pH=7. Estos medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 minutos, realizando un control de esterilidad por 24 h a 37 °C.

4.2. RECUPERACION DE LAS CEPAS.

Las cepas liofilizadas fueron activadas en medios líquidos comprobando su pureza por medio de pruebas de laboratorio: tinción de Gram, motilidad, características de crecimiento en medio sólido y reacciones en leche tornasolada. Se evaluó la capacidad de las cepas para producir nódulos eficientes de color rojo, utilizando semillas de cada una de las leguminosas específicas que fueron sembradas en jarras de Leonard modificadas, conteniendo agrolita como soporte inerte (61, 40).

La evaluación de la capacidad acidificadora o alcalinizadora de cada cepa se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio base y 5 ml/l de azul de bromotimol (40), los cuales

fueron inoculados con cultivos de 4 días de crecimiento en medio sólido inclinado a 30 C. El tiempo de incubación de los matraces es particular para cada cepa, pudiendo llegar a un mes de estudio.

4.3. OPTIMIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO.

La optimización de un medio de cultivo se logra al conocer la mejor combinación y proporción de cada uno de los nutrientes seleccionados para el crecimiento de una bacteria (6). Un medio de crecimiento para rizobios requiere de sales (fosfato dibásico de potasio, cloruro de sodio, cloruro férrico hidratado y sulfato de magnesio hidratado), una fuente de carbono (manitol, sacarosa, dextrosa, glicerol), una fuente de nitrógeno y vitaminas (extracto de levadura) (40). En la Tabla 3 se presenta el medio base calculado para un rendimiento de 10 g. de células por litro.

Los niveles de variación utilizados en el estudio de optimización de medios, partiendo del medio base, fueron los que se describen a continuación:

4.3.1. El fosfato dibásico de potasio se estudió en el rango de 0.66 a 2.16 g/l, usando cuatro niveles de tratamiento y la unidad de variación fue de 0.5 g/l.

TABLA 3. MEDIO BASE CALCULADO PARA OPTIMIZACION DE NIVELES.

COMPOSICION	CONCENTRACION (g/l)
CLORURO DE SODIO	0.26
CLORURO FERRICO	0.1
EXTRACTO DE LEVADURA	1.0
SULFATO DE MAGNESIO	0.76
FOSFATO DE POTASIO	1.66
MANITOL	10.00

4.3.2. El sulfato de magnesio hidratado se estudió en el rango de 0.26 a 1.26 g/l, usando 5 niveles de tratamiento y la unidad de variación fue de 0.25 g/l.

4.3.3. El cloruro de sodio se estudió en el rango de 0.05 a 0.45 g/l, usando 5 niveles de tratamiento y la unidad de variación de 0.1 g/l.

4.3.4. El cloruro férrico hidratado se estudió en el rango 0.05 a 0.15 g/l, usando 3 niveles de tratamiento y la unidad de variación fue de 0.05 g/l.

4.3.5. El extracto de levadura se estudió en el rango 0.5 a 1.5 g/l, usando 5 niveles de tratamiento y la unidad de variación fue de 0.25 g/l.

4.3.6. Las fuentes de carbono utilizadas fueron manitol, glicerol, glucosa y sacarosa. Las cuatro fuentes fueron estudiadas en el rango de 10 a 20 g/l, utilizando una unidad de variación de 5 g/l y 3 niveles de estudio.

La optimización del medio se realizó de acuerdo a un arreglo factorial (14, 6, 56). Los medios se prepararon por duplicado en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 150 ml de caldo para cada nivel, se incubaron al ser inoculados en agitador rotatorio provisto de controles para la temperatura y la velocidad de agitación. La velocidad de agitación fue de 100 RPM en agitador rotatorio New Brunswick modelo G 25, con un excéntrico de una

pulgada. La temperatura de incubación fue de 30 C.

Los inóculos provenían de crecimiento de Rhizobium en medio sólido base manitol extracto de levadura en tubo (inclinado), con cuatro días de incubación a 30 C. A cada matraz se le añadieron 2 ml de una suspensión de bacterias provenientes de estos cultivos. Se tomaron muestras de los cultivos por varios días evaluándose el crecimiento microbiano por densidad óptica a 600 nm de absorbancia (espectrofotómetro Espectronic 20 Baush&lomb) para graficar los resultados en relación al tiempo de incubación. En cada caso, se calculó la velocidad de crecimiento (u) por medio de regresión lineal del logaritmo natural de la densidad óptica sobre tiempo en la fase exponencial de crecimiento de acuerdo a Aiba et al. (21) y el tiempo de duplicación (tD) por medio de la ecuación:

$$tD = \frac{\ln 2}{u}$$

Los medios se optimizaron en base a los mejores tiempos de duplicación.

4.4. OPTIMIZACION DE PARAMETROS AMBIENTALES.

Posteriormente a la optimización de cada medio, se variaron las condiciones de pH y temperatura en el medio de crecimiento. Se evaluaron 5 niveles de temperatura para cada uno de los medios optimizados, usando una unidad de variación de 2 C dentro del rango de 26 a 34 C, a pH=7. La evaluación del pH de crecimiento se realizó en el rango de pH=6 y pH=8, usando como unidad de variación 0.5 y estudiando 5 niveles.

4.5. ESTUDIOS EN EL FERMENTADOR.

La etapa de propagación en fermentador se trabajó con la cepa de R.phaseoli CPMex 1, utilizando el medio optimizado conteniendo: manitol 10g, fosfato dibásico de potasio 1.16g, sulfato de magnesio heptahidratado 1.01g, cloruro de sodio 0.45g, cloruro férrico hexahidratado 0.15g, extracto de levadura 1.5g y agua destilada hasta completar un litro. El pH fue ajustado a 7 posteriormente a la esterilización.

Se trabajó con 9 litros medio de cultivo en un fermentador de 14 l (New Brunswick Scientific Magnaferm), realizando cada corrida por duplicado. El inóculo para el fermentador se preparó en matraces tipo Erlenmeyer de 500 ml con 150 ml de medio de cultivo optimizado, los cuales previamente se sembraron con 2ml de suspensión de bacterias provenientes de medio sólido de 4 días de crecidas. El inóculo fue incubado en agitador orbital a 30 C y

100 rpm, y transferido al fermentador en la etapa de crecimiento logarítmico (aproximadamente antes de 36 horas). El volumen de inóculo fue del 10% del volumen del reactor empleado. Se agregaron al medio unas gotas de silicón antiespumante (FG10 Dow Corning).

En las corridas de fermentador se optimizaron las condiciones de agitación a 300, 500 y 700 rpm, aireación 0.3, 0.5 y 0.7 v.v.m. La optimización de las condiciones de crecimiento se establecieron por medio del cálculo de tiempo de duplicación y producción de materia seca. La determinación de peso seco se realizó por medio de filtración usando membranas milipore de 0.22 μm , que posteriormente se llevaron a peso constante por secado en estufa de aire forzado a 80 C con y sin muestra. Se obtuvo una curva por diferencias de pesos secos en relación al tiempo de crecimiento microbiano

4.6. MATERIAL UTILIZADO COMO SOPORTE.

En este estudio se evaluó el bagacillo de caña de azúcar como soporte para bacterias de fijadoras de nitrógeno. El bagacillo fue secado en estufa de aire forzado a 55 C durante 24 h y molido hasta lograr ser tamizado por una malla de 200 (61). Se realizaron pruebas de esterilidad en autoclave en muestras de 5, 10, y 15 gramos; esterilizando a 15 libras por 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 y 180 minutos de exposición. Se evaluaron los contaminantes por recuento de microorganismos usando el método de dilución en

caja, cultivando en medio de agar nutritivo incubando a 37 C por 2 días.

Luego de determinar las mejores condiciones de trabajo se envasaron en bolsas de polietileno de 0.025 pulgadas de espesor. Este soporte debe tener una humedad del 50% y un pH de 7 el cual se ajustó en 10 gramos de bagazo con 100 ml de agua destilada y se agregó carbonato de calcio 3 g/l (61, 40). Se inocularon con los cultivos resultantes de la fermentación optimizada para todas las variables en estudio. Previo a ser inyectado a cada bolsa se realizó una cuenta viable por el método de dilución en caja. En cada bolsa se introdujeron 3 ml cultivo y se determinó la viabilidad por el método de diluciones a los 7 , 15 , 30 , 60 y 90 días, incubándose a por duplicado a 4 y 30 C.

4.5. METODOS ANALITICOS.

Se analizó la cinética de desaparición de azúcares en el medio del fermentador por el método fenol-sulfúrico (26). Para esta prueba se utilizó una solución de fenol al 80%, fundiendo los cristales a 50 C. El ácido sulfúrico utilizado es concentrado y grado químico. La solución patrón de manitol es con una concentración de 10,000 ug/ ml.

5. RESULTADOS

5.1. OPTIMIZACION DE MEDIOS DE CULTIVO

5.1.1. EVALUACION DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

En los Tablas 4, 5, 6 y Figuras 1, 2 y 3 se presentan los resultados de los cambios en densidad óptica en los diferentes tiempos de crecimiento, velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_D) para las cepas R. phaseoli CP MEX1, R. japonicum CP89 104A y R. meliloti C1.

La información correspondiente al tiempo de duplicación (t_D) para las diferentes fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, glicerol y manitol) y las tres cepas evaluadas de Rhizobium fue analizada mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos. Los resultados del análisis estadístico se resumen en el Tabla 7 e indicaron la existencia de diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) en el tiempo de duplicación para las distintas fuentes de carbono y las tres especies de Rhizobium utilizadas; con una interacción altamente significativa ($P < 0.0001$) entre fuente de carbono*especie de Rhizobium. Los tiempos medios de duplicación para las distintas especies en cada fuente de carbono fueron de 19.2 ± 6.11 , 14.61 ± 4.82 , 15.61 ± 5.61 y 9.99 ± 2.9 h para glucosa, sacarosa, glicerol y manitol,

TABLA 4. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium phaseoli* CP MEX1
 CON DIFERENTES FUENTES DE CARBOHIDRATOS (10 g/l).

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	GLUCOSA	SACAROSA	GLICEROL	MANITOL
0	0.05	0.10	0.10	0.16
6	0.12	0.17	0.10	----
15	----	----	----	0.17
18	1.72	2.46	1.88	----
19	----	----	----	0.26
21	2.22	3.25	2.81	----
25	----	----	----	0.82
28	3.18	4.08	3.58	----
39	----	----	----	1.67
40	5.60	6.15	5.10	----
42	----	----	----	1.78
45	6.32	7.06	6.37	----
46	----	----	----	2.15
49	7.10	7.85	6.32	----
50	----	----	----	2.09
53	7.62	8.20	7.50	1.80
66	8.30	9.40	8.22	1.80
70	8.40	9.35	8.78	----
76	8.95	9.40	8.80	----
92	10.50	11.10	11.50	----
115	10.40	10.30	10.85	----
u=	0.039	0.058	0.066	0.071
tD=	17.65	11.86	10.45	9.72

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 1. CRECIMIENTO DE *R. phaseoli* CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

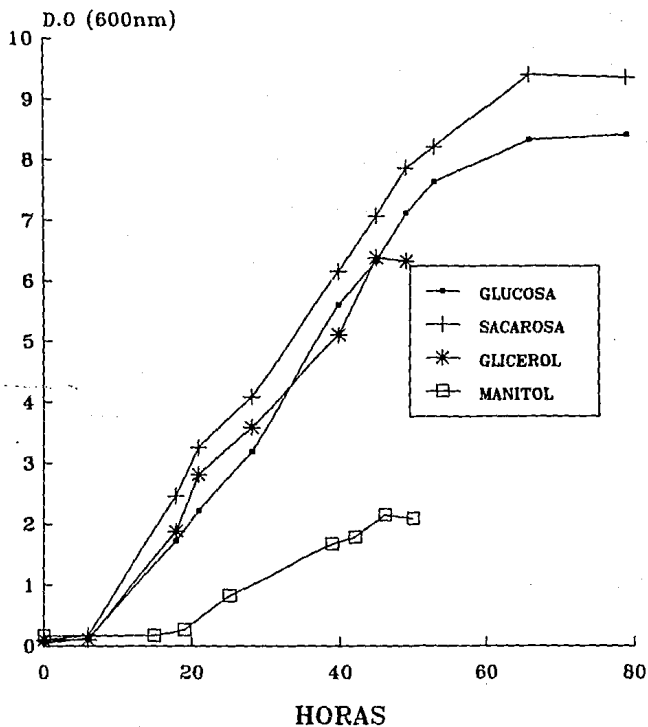


TABLA 5. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium japonicum* CP 89
104 A CON DIFERENTES HIDRATOS DE CARBONO (10g/l).

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	GLUCOSA	SACAROSA	GLICEROL	MANITOL
0	0.095	0.097	0.105	0.103
8	0.26	0.20	0.16	0.282
24	1.27	1.27	1.15	2.02
28	1.40	1.50	1.50	2.13
34	1.70	1.80	1.90	2.15
48	2.27	2.17	2.52	2.45
52	2.35	2.35	2.87	2.37
58	2.52	2.43	3.05	2.52
72	2.60	2.70	2.95	2.7
76	2.66	2.70	3.06	2.74
82	2.62	2.70	3.37	2.74
96	2.95	2.87	3.10	2.8
u=	0.026	0.033	0.049	0.052
tD=	26.49	20.66	13.92	13.32

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 2. CRECIMIENTO DE *R. japonicum* CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

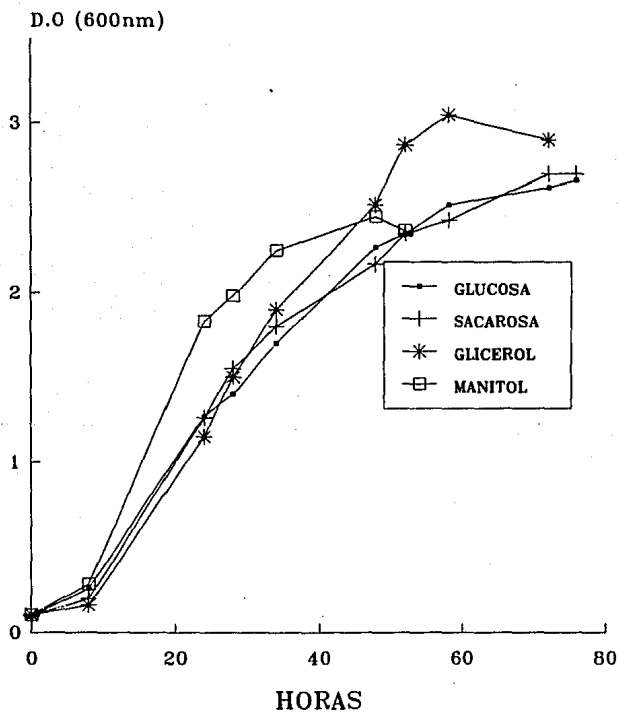


TABLA 6. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium meliloti* C1 CON DIFERENTES FUENTES DE HIDRATOS DE CARBONO (10g/l).

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	GLUCOSA	SACAROSA	GLICEROL	MANITOL
0	0.055	0.066	0.050	0.089
8	0.067	0.086	0.055	0.170
24	0.285	0.850	0.220	0.445
28	0.900	1.500	0.400	1.8
34	1.160	2.200	0.910	2.6
48	2.800	3.600	2.150	2.4
52	3.200	3.780	2.350	2.3
58	3.570	4.100	2.800	2.6
72	3.920	4.950	3.550	3.0
76	3.920	4.700	3.800	3.0
82	4.350	6.250	4.250	3.5
96	4.700	6.250	4.500	4.0
104	5.000	6.300	4.800	4.5
120	6.750	6.350	5.400	4.6
124	5.350	6.000	4.800	4.8
u=	0.051	0.026	0.049	0.100
tD=	13.45	26.49	13.92	6.900

u= velocidad de crecimiento (/h)
tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 3. CRECIMIENTO DE *R. meliloti* CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

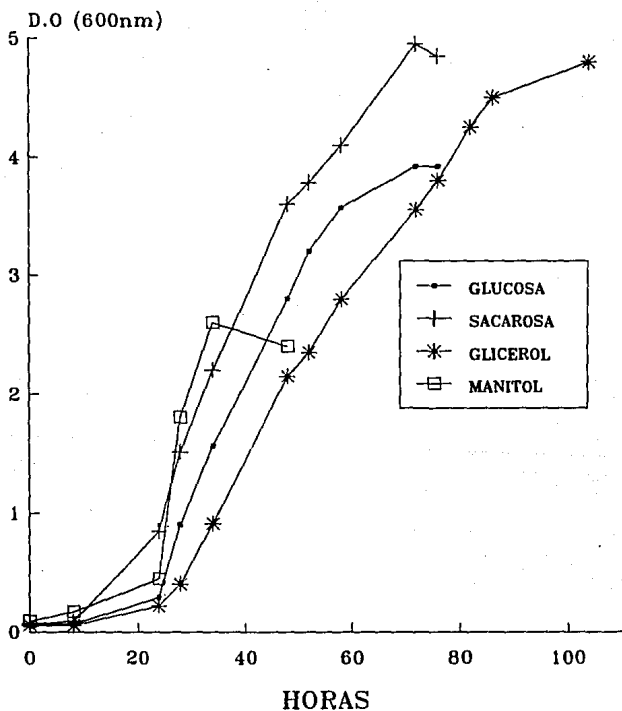


TABLA 7. RESUMEN DE LA COMPARACION DE MEDIAS PARA TIEMPO DE DUPLICACION (td) PARA LAS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

	CONCENTRACION (g/l de medio)				
	GLUCOSA	SACAROSA	GLICEROL	MANITOL	PROMEDIO
<u>Rhizobium phaseoli</u>	a 17.65±2.69	b 11.86±1.53	b 10.45±0.86	b 9.73±0.35	B 12.42±3.55
<u>Rhizobium meliloti</u>	bc 13.45±1.48	cd 11.31±1.83	a 22.42±2.13	d 6.91±0.40	B 13.52±6.16
<u>Rhizobium iaponicum</u>	a 26.49±0.04	b 20.66±0.71	cd 13.92±0.63	cd 13.92±0.63	A 18.62±5.77
	A 19.20±6.11	B 14.61±4.82	B 15.61±5.61	C 9.99±2.90	

a, b, c. Letras diferentes dentro de fila indican diferencias significativas (P<0.05).

A, B, C. Letras diferentes dentro de fila o columna indican diferencias significativas (P<0.05).

respectivamente. Las comparaciones de medias indicaron que la glucosa fue la fuente de carbono que condujo a los mayores tiempos de duplicación, difiriendo en forma significativa ($P < 0.05$) de los restantes azúcares. El manitol presentó el mejor comportamiento con el menor tiempo de duplicación (9.99 ± 2.9 h) difiriendo significativamente con las restantes fuentes de carbono utilizadas. Los tiempos de duplicación de sacarosa y glicerol fueron intermedios y similares entre sí, difiriendo en forma significativa ($P < 0.05$) con glucosa y manitol.

Los tiempos de duplicación para las diferentes especies de bacterias utilizadas fueron de 12.42 ± 3.55 , 13.52 ± 6.16 y 18.62 ± 5.77 h para *R. phaseoli*, *R. meliloti* y *R. japonicum*, respectivamente. El tiempo de duplicación para *R. japonicum* fue más alto y significativamente ($P < 0.05$) diferente las restantes especies estudiadas. El *R. phaseoli* y *R. meliloti* presentaron tiempos similares ($P > 0.05$) de duplicación.

El análisis de la interacción permitió detectar el comportamiento particular de cada una de las especies estudiadas en las fuentes de carbono utilizadas en el experimento. Para *R. phaseoli* los tiempos de duplicación fueron de 17.65 ± 2.69 , 11.86 ± 1.53 , 10.45 ± 0.86 y 9.73 ± 0.35 h para glucosa, sacarosa, glicerol y manitol, respectivamente. La glucosa presentó el mayor tiempo de

duplicación comparado con los restantes azúcares ($P < 0.05$), mientras que sacarosa, glicerol y manitol no difirieron significativamente. Para *R. meliloti*, los tiempos de duplicación fueron de 13.45 ± 1.48 , 11.31 ± 1.83 , 22.42 ± 2.13 y 6.91 ± 0.40 h para glucosa, sacarosa, glicerol y manitol, respectivamente. A diferencia de las restantes bacterias estudiadas, el glicerol fue la fuente de carbono con el mayor tiempo de duplicación difiriendo en forma significativa ($P < 0.05$) de las restantes. El manitol presentó el menor tiempo de duplicación siendo de comportamiento similar a la sacarosa. La glucosa presentó en este caso un comportamiento intermedio en tiempo de duplicación no difiriendo de sacarosa, siendo significativamente ($P < 0.05$) menor a glicerol y mayor que manitol. Para *Rhizobium japonicum* los tiempos de duplicación fueron de 26.49 ± 0.04 , 20.66 ± 0.71 , 13.92 ± 0.63 y 13.34 ± 0.56 h para glucosa, sacarosa, glicerol y manitol, respectivamente. Las fuentes de manitol y glicerol presentaron los menores tiempos de duplicación no difiriendo entre sí, mientras que la glucosa presentó el mayor tiempo de duplicación, difiriendo en forma significativa ($P < 0.05$) con las restantes fuentes. La sacarosa presentó un comportamiento intermedio en el tiempo de duplicación siendo menor ($P < 0.05$) a glucosa y mayor ($P < 0.05$) a glicerol y manitol.

5.1.2. EVALUACION DE CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE EXTRACTO DE LEVADURA EN EL MEDIO.

En las Tablas 8, 9, 10 y Figuras 4, 5 y 6 se presentan los resultados de densidad óptica en diferentes tiempos de cultivo, y los cálculos de velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_D) para *R. Phaseoli*, *R. japonicum* y *R. meliloti*, en medios de cultivo con variación en los niveles de extracto de levadura.

En la Tabla 11 se presenta un resumen de la información de medias y diferencias estadísticas para los diferentes niveles de aporte de levadura (0.5, 0.75, 1.25 y 1.5 g/l) para las tres especies de bacterias bajo evaluación. El análisis de varianza indicó la existencia de diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) para los diferentes niveles de levadura y entre especies de *Rhizobium*, así como una interacción altamente significativa ($P < 0.0001$) de niveles de levadura*especie de bacteria.

Las comparaciones de medias para niveles de aporte de levadura indicaron que, para todas las especies estudiadas, los medios con 0.5 g/l presentaron los mayores tiempos de duplicación (21.36 ± 10.08 h), difiriendo en forma significativa ($P < 0.05$) con los medios que incluían 0.75, 1.25 y 1.50 g/l, cuyas medias fueron 13.06 ± 7.92 , 12.74 ± 6.83 y 11.10 ± 3.54 , respectivamente.

TABLA 8. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium phaseoli* CP MEX 1
CON DIFERENTES NIVELES DE EXTRACTO DE LEVADURA (g/l).

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	0.50	0.75	1.25	1.50
0	0.18	0.09	0.12	0.19
6	0.18	0.08	0.10	0.20
18	2.62	2.06	1.00	1.18
21	3.08	2.58	1.86	1.49
28	3.78	3.02	2.44	1.86
40	5.00	4.54	3.50	2.24
45	5.80	6.97	3.90	2.58
49	6.00	7.13	3.98	2.45
53	6.56	7.18	4.30	2.45
66	7.02	7.70	4.30	2.65
70	7.00	7.90	4.75	2.80
76	7.15	8.15	5.20	3.05
92	8.42	8.90	5.20	3.70
115	9.25	8.95	4.35	2.90
u=	0.036	0.030	0.037	0.054
tD=	19.14	23.00	18.50	12.64

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 4. CRECIMIENTO DE *R. phaseoli* CON DIFERENTES NIVELES DE EXT.LEVADURA

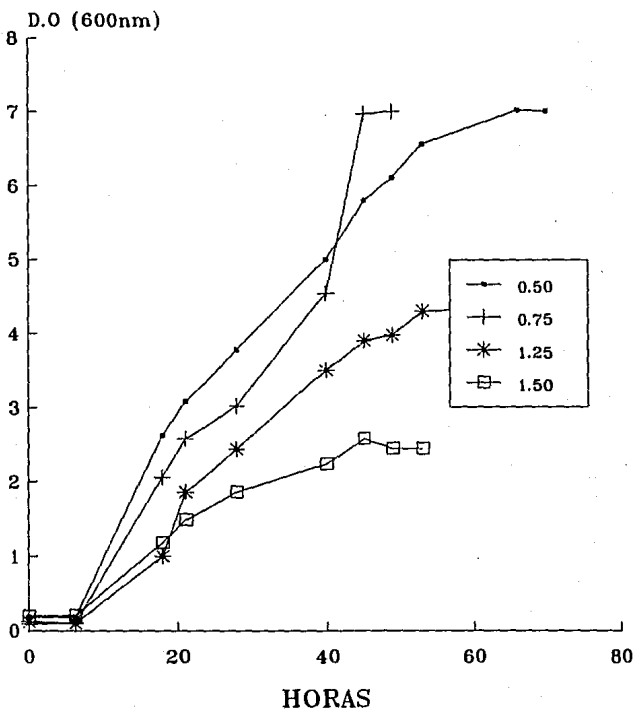


TABLA 9. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium japonicum* CP 89 104
A CON DIFERENTES NIVELES DE EXTRACTO DE LEVADURA (g/l).

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	0.50	0.75	1.25	1.50
0	0.095	0.090	0.127	0.120
8	0.166	0.154	0.148	0.135
24	0.900	1.020	1.97	1.97
28	0.900	1.90	1.56	1.99
34	0.900	2.52	1.72	2.15
48	0.900	1.16	1.37	1.61
52	0.990	1.18	1.50	1.70
58	1.00	1.30	1.80	2.00
72	1.20	1.65	2.30	2.47
76	1.32	1.75	2.30	2.60
82	1.50	1.50	2.00	2.00
u=	0.020	0.113	0.160	0.105
tD=	33.55	6.11	4.33	6.60

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 5. CRECIMIENTO DE *R.japonicum* CON DIFERENTES NIVELES DE EXT.LEVADURA

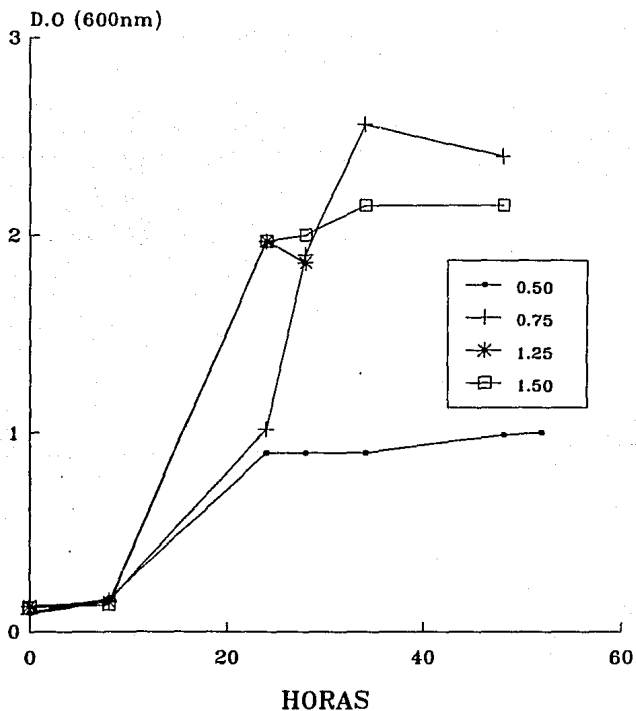


TABLA 10. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium meliloti* C1 CON DIFERENTES NIVELES DE EXTRACTO DE LEVADURA (g/l)

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	0.5	0.75	1.25	1.5
0	0.142	0.110	0.158	0.145
8	0.225	0.135	0.240	0.175
24	0.775	0.360	0.795	0.692
28	0.925	0.600	1.100	0.930
34	1.570	1.420	2.100	1.720
48	2.470	2.700	3.400	3.120
52	2.470	2.850	3.550	3.500
58	3.420	3.720	3.645	3.650
72	3.220	3.410	4.120	3.950
76	3.170	4.020	3.950	3.950
82	3.130	3.900	4.120	4.230
96	3.900	4.750	5.250	5.500
104	3.700	4.350	4.750	4.870
u=	0.060	0.068	0.045	0.049
tD=	11.41	10.06	15.41	14.00

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 6. CRECIMIENTO DE *R. meliloti* CON DIFERENTES NIVELES DE EXT.LEVADURA

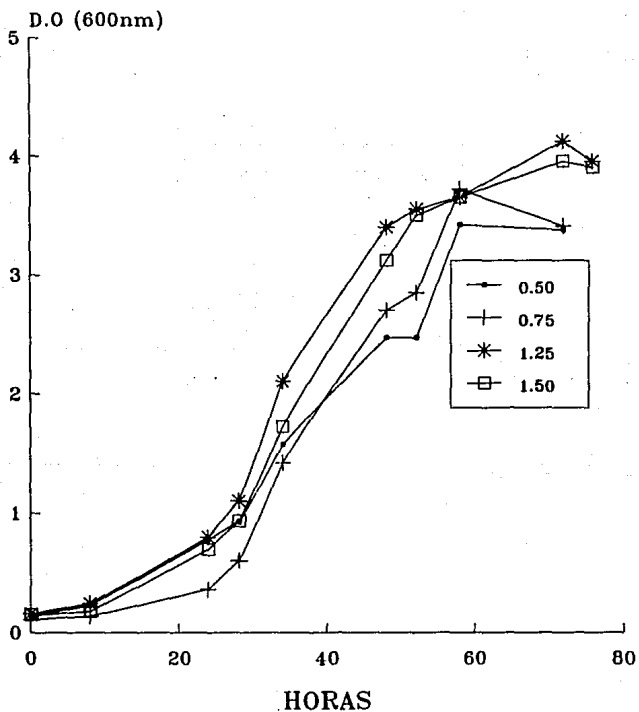


TABLA 11. RESUMEN DE LA COMPARACION DE MEDIAS PARA TIEMPO DE
 DUPLICACION PARA LOS DIFERENTES NIVELES DE LEVADURA.

	CONCENTRACION (g/l de medio)		
	0.5	0.75	1.25
		1.25	1.5
<i>Rhizobium</i>	19.14±1.05	23.00±0.49	18.50±3.05
<i>phaseoli</i>	a	a	b
			A
<i>Rhizobium</i>	33.55±0.79	6.11±1.24	4.33±1.42
<i>laponicum</i>	a	b	b
			B
<i>Rhizobium</i>	11.41±1.18	10.06±0.31	15.41±1.45
<i>melloti</i>	ab	b	a
			ab
			B
	21.36±10.08	13.06±7.92	12.74±6.83
	A	B	B
			11.10±3.54

a, b, c. Letras diferentes dentro de filas indican diferencias significativas (P<0.05).

A, B, C. Letras diferentes dentro de filas o columnas indican diferencias significativas (P<0.05).

Las medias de tiempo de duplicación para R. phaseoli, R. japonicum y R. meliloti para los niveles experimentales de levadura utilizados fueron de 18.32 ± 4.16 , 12.66 ± 12.94 y 12.72 ± 2.37 h, respectivamente.

El estudio estadístico de las interacciones indicó que el comportamiento individual de cada bacteria ante los cambios en los niveles de extracto de levadura presentó características propias. En R. phaseoli, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en tiempo de duplicación cuando se aportaron 0.5, 0.75 y 1.25 g/l, disminuyendo en forma significativa ($P < 0.05$) cuando el aporte al medio fue de 1.5 g/l. Para R. japonicum, el tiempo de duplicación fue elevado (33.55 ± 0.79 h) cuando se aportó al medio 0.5 g/l, difiriendo en forma significativa ($P < 0.05$) de los otros niveles utilizados. El tiempo de duplicación con aportes de 0.75, 1.25 y 1.5 g/l fueron de 6.11 ± 1.24 , 4.33 ± 1.42 y 6.6 ± 0.8 , respectivamente, no difiriendo significativamente ($P > 0.05$) entre sí. En el caso de R. meliloti, los aportes de 0.5 y 0.75 g/l presentaron los menores tiempos de duplicación (11.41 ± 1.18 y 10.06 ± 0.31 h, respectivamente), siendo similares ($P > 0.05$) entre sí y difiriendo ($P < 0.05$) de los tiempos de duplicación logrados con 1.25 y 1.5 g/l (15.41 ± 6.83 y 14.0 ± 0.64 h, respectivamente).

5.1.3. EVALUACION DE CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE SULFATO DE MAGNESIO EN EL MEDIO.

En las Tablas 12, 13, 14 y Figuras 7, 8 y 9 se presentan los resultados de densidad óptica en diferentes tiempos de cultivo, y los cálculos de velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación para *R. japonicum*, *R. meliloti* y *R. phaseoli*, en medios de cultivo con variación en los niveles de sulfato de magnesio.

En la Tabla 15 se presenta un resumen de la información de medias y diferencias estadísticas para los medios conteniendo diferentes niveles de aporte de sulfato de magnesio (0.26, 0.51, 1.01 y 1.26 g/l) para las tres especies de bacterias estudiadas. El análisis de varianza indicó la existencia de diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) para niveles de sulfato y entre las especies de *Rhizobium* estudiadas, así como una interacción altamente significativa ($P < 0.0005$) de niveles de sulfato de magnesio*especie de bacteria.

La comparación de medias para los diferentes niveles de aporte de sulfato de magnesio indicaron, que para todas las especies de bacterias, los medios conteniendo 1.26 g/l presentaron los mayores tiempos de duplicación (30.29 ± 16.37 h), siendo significativamente mayor ($P < 0.05$) a los restantes niveles de aplicación. A su vez, los medios conteniendo 1.01 g/l presentaron

TABLA 12. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium japonicum* CP89 CON DIFERENTES NIVELES DE SULFATO DE MAGNESIO (g/l).

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	0.26	0.51	1.01	1.26
0	0.040	0.082	0.082	0.115
8	0.260	0.225	0.180	0.250
24	1.400	1.500	1.700	1.650
28	1.750	1.610	1.800	1.700
34	2.220	1.700	1.850	1.920
48	3.000	1.810	2.170	2.300
52	1.920	1.750	2.220	2.420
58	2.300	2.020	2.350	2.450
72	2.470	2.150	2.500	2.600
76	2.800	2.100	2.600	2.670
82	2.850	2.150	2.610	2.950
96	2.720	2.320	2.660	3.170
u=	0.060	0.051	0.027	0.019
tD=	11.47	13.71	25.75	36.05

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 7. CRECIMIENTO DE *R. japonicum* CON DISTINTOS NIVELES DE SULFATO DE MAGNESIO

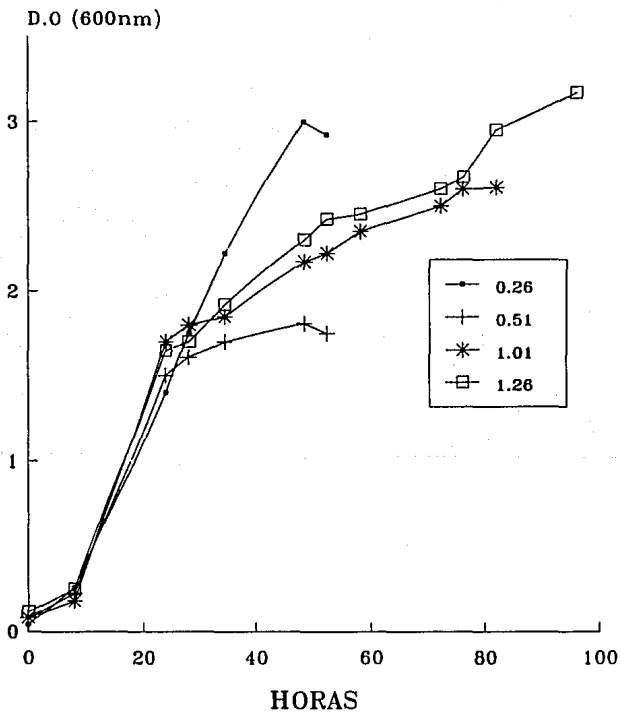


TABLA 13. CINETICA DE CRECIMIENTO *Rhizobium meliloti* C1 CON DIFERENTES NIVELES DE SULFATO DE MAGNESIO (g/l).

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	0.26	0.51	1.01	1.26
0	0.104	0.100	0.164	0.156
8	0.160	0.114	0.297	0.203
24	1.51	1.27	1.44	0.967
28	2.13	2.00	1.65	1.57
34	2.55	2.35	1.95	1.77
48	3.25	3.31	2.30	2.18
52	3.75	3.32	2.70	2.35
58	3.82	3.57	2.72	2.55
72	3.87	3.92	2.67	2.60
76	3.82	4.12	3.30	3.05
82	4.00	4.02	2.72	2.95
96	4.75	4.56	3.07	3.92
104	4.32	4.55	2.67	3.10
u=	0.025	0.026	0.019	0.016
tD=	27.59	26.48	35.99	44.47

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 8. CRECIMIENTO DE *R. meliloti* CON DISTINTOS NIVELES DE SULFATO DE MAGNESIO

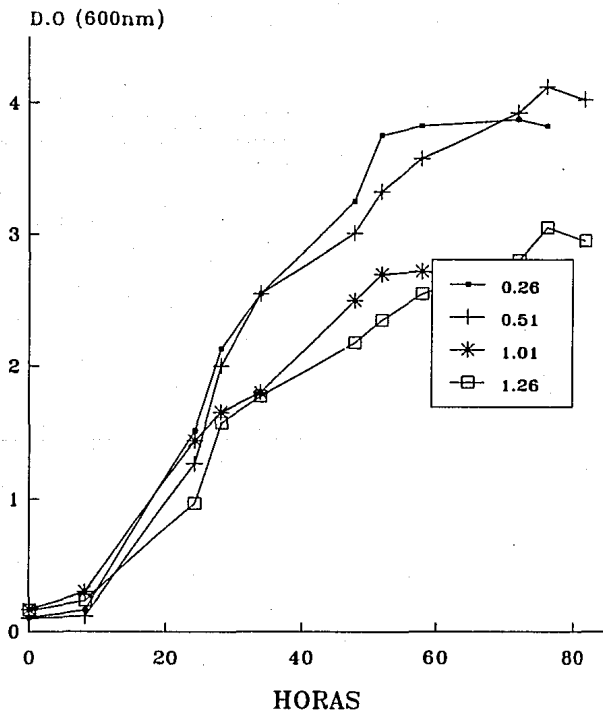


TABLA 14. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium phaseoli* CP MEX 1
CON DIFERENTES NIVELES DE SULFATO DE MAGNESIO (g/l).

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	0.26	0.51	1.01	1.26
0	0.17	0.06	0.13	0.20
15	0.20	0.17	0.17	0.22
19	0.25	0.22	0.26	0.35
25	0.78	0.60	0.94	1.28
39	1.35	0.78	2.22	2.94
42	1.54	0.77	2.42	3.15
46	1.80	0.69	2.56	3.20
50	2.10	0.94	2.85	3.27
66	1.87	0.26	2.70	2.90
u=	0.06	0.07	0.071	0.067
tD=	11.63	9.88	9.81	10.36

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 9. CRECIMIENTO DE *R. phaseoli* CON DISTINTOS NIVELES DE SULFATO DE MAGNESIO

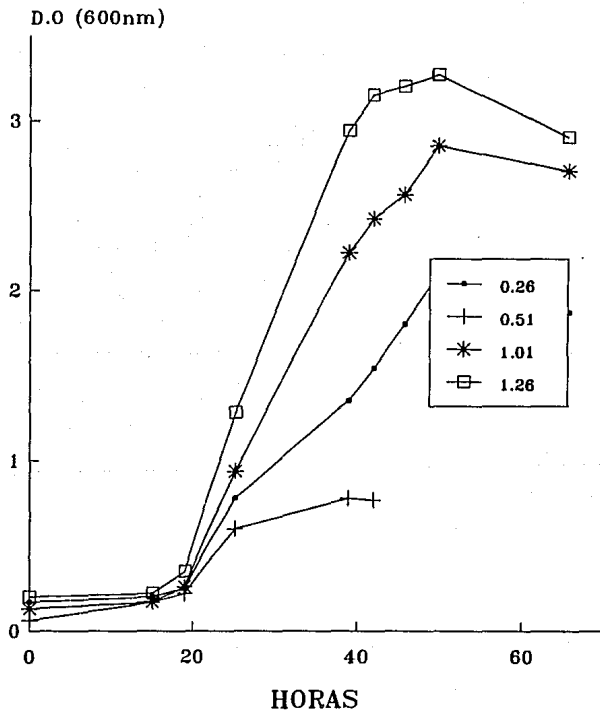


TABLA 15. RESUMEN DE LA COMPARACION DE MEDIAS PARA TIEMPOS DE DUPLICACION (td) PARA LOS DISTINTOS NIVELES DE SULFATO DE MAGNESIO.

	CONCENTRACION (g/l de medio)				
	0.26	0.51	1.01	1.26	
<u>Rhizobium japonicum</u>	c 11.47±0.49	c 13.71±1.11	b 25.75±0.50	ab 36.05±0.68	B 21.74±10.58
<u>Rhizobium meliloti</u>	b 27.59±1.17	b 26.48±0.03	ab 35.99±1.40	a 44.47±8.66	A 33.36± 8.45
<u>Rhizobium phaseoli</u>	c 11.63±2.33	c 9.88±1.37	c 9.81±1.53	c 10.36±1.28	C 10.42± 1.49
	C 16.90±8.37	C 16.69±7.82	B 23.84±11.8	A 30.29±16.37	

a, b, c. Letras diferentes en filas indican diferencias significativas (P<0.05).

A, B, C. Letras diferentes en filas o columnas indican diferencias significativas (P<0.05).

una media mayor (23.84 ± 7.82 , $P < 0.05$) a aquellos conteniendo 0.51 g/l ($16.69 \pm 7.82 \text{ h}$) y 0.26 g/l ($16.90 \pm 8.37 \text{ h}$), los cuales no difirieron entre sí.

Se encontraron diferencias ($P < 0.05$) en el tiempo de duplicación en las especies utilizadas. Los menores tiempos de duplicación se lograron con *R. phaseoli* ($10.42 \pm 1.49 \text{ h}$), mientras las mayores se presentaron en *R. meliloti* ($33.63 \pm 8.45 \text{ h}$). El *R. japonicum* presentó tiempos intermedios ($21.74 \pm 10.58 \text{ h}$) de duplicación.

La existencia de interacciones altamente significativas ($P < 0.0005$) demuestra nuevamente el comportamiento diferencial entre especies al aporte de sulfato de magnesio. El *R. japonicum* presentó una tendencia similar a la descrita en el análisis global de la información para niveles de sulfato de magnesio, con medias de 11.47 ± 0.49 , 13.71 ± 1.11 , 25.75 ± 0.5 y $36.05 \pm 0.68 \text{ h}$ para los medios con 0.26 , 0.51 , 1.01 y 1.26 g/l , respectivamente. Esto indica que los niveles bajos de aporte pueden ser adecuados para esta cepa. El *R. meliloti* presentó el mismo comportamiento con los menores tiempos de duplicación con niveles bajos. Los promedios para esta especie fueron de 27.59 ± 1.17 , 26.48 ± 0.03 , 35.99 ± 1.40 y $44.47 \pm 8.66 \text{ h}$ para 0.26 , 0.51 , 1.01 y 1.26 g/l , respectivamente. En cambio, *R. Phaseoli* no presentó

diferencias significativas ($P > 0.05$) para todos los niveles de aporte de sulfato de magnesio, siendo las medias de 11.63 ± 2.3 , 9.88 ± 1.37 , 9.81 ± 1.53 y 10.36 ± 1.28 h para 0.26, 0.51, 1.01 y 1.26 g/l, respectivamente.

5.1.4. EVALUACION DE CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE FOSFATO DE POTASIO EN EL MEDIO.

En las Tablas 16, 17, 18 y Figuras 10, 11 y 12 se presentan los resultados de densidad óptica en diferentes tiempos de incubación, y los cálculos de velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_D) para *R. japonicum*, *R. meliloti* y *R. phaseoli* en medios de cultivo con variación en los niveles de fosfato de potasio.

En la Tabla 19 se presenta un resumen de la información global de los tiempos de duplicación que incluye las medias y diferencias estadísticas para los medios utilizados conteniendo diferentes niveles de fosfato de potasio (0.66, 1.16, 1.66 y 2.16 g/l) para las tres especies de bacterias utilizadas. El análisis de varianza indicó la existencia de diferencias altamente significativas ($P < 0.0015$) entre especies y significativas ($P < 0.02$) entre niveles de aporte de fosfato de potasio. Se encontraron interacciones significativas ($P < 0.02$) entre niveles de fosfato* especie de bacteria.

**TABLA 16. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium japonicum* CP89
CON DIFERENTES NIVELES DE FOSFATO DIBASICO DE POTASIO**

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	0.66	1.16	1.66	2.16
0	0.080	0.063	0.103	0.066
8	0.195	0.107	0.282	0.110
24	0.920	0.650	2.020	1.550
28	1.200	1.100	2.130	0.800
34	1.920	1.950	2.150	0.700
48	2.270	2.500	2.450	--
52	2.320	2.600	2.370	--
58	2.470	2.800	2.520	--
72	2.600	3.100	2.700	--
76	2.610	3.150	2.740	--
82	2.700	3.100	2.740	--
96	2.850	3.000	2.770	--
u=	0.027	0.038	0.043	0.024
tD=	25.85	18.22	17.20	28.88

u= velocidad de crecimiento (/h)
tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 10. CRECIMIENTO DE *R. japonicum* CON DIFERENTES NIVELES DE FOSFATO DE POTASIO

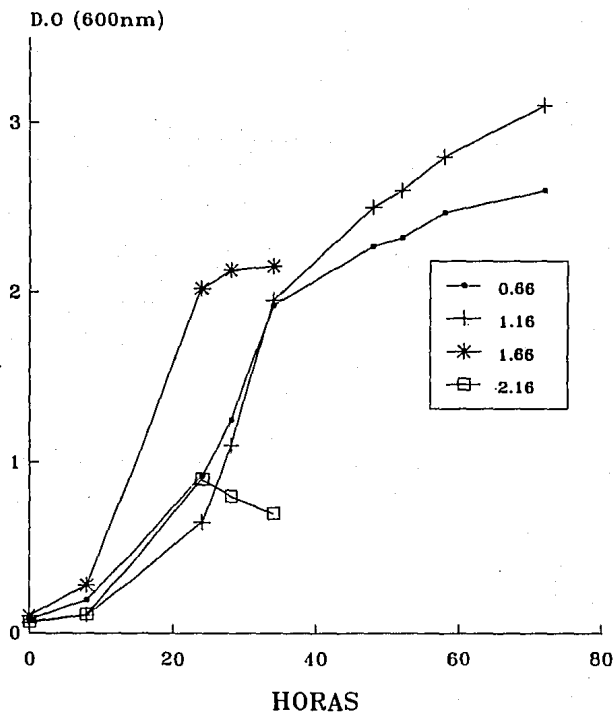


TABLA 17. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium meliloti* C1 CON DIFERENTES NIVELES DE FOSFATO DIBASICO DE POTASIO.

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	0.66	1.16	1.66	2.16
0	0.152	0.157	0.109	0.108
8	0.216	0.201	0.170	0.111
24	1.32	1.44	0.445	1.23
28	1.35	1.64	0.447	1.55
34	1.40	1.82	0.407	1.97
48	1.42	2.35	0.407	2.65
52	1.72	3.02	0.420	3.21
58	1.77	3.09	0.427	3.28
72	1.83	3.22	0.43	3.32
76	1.57	2.90	0.38	3.47
82	1.92	2.96	0.395	3.69
96	1.97	3.56	0.435	3.95
104	1.88	3.06	0.410	3.50
u=	0.024	0.038	0.108	0.059
tD=	33.54	18.05	6.42	11.82

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 11. CRECIMIENTO DE *R. meliloti* CON DIFERENTES NIVELES DE FOSFATO DE POTASIO

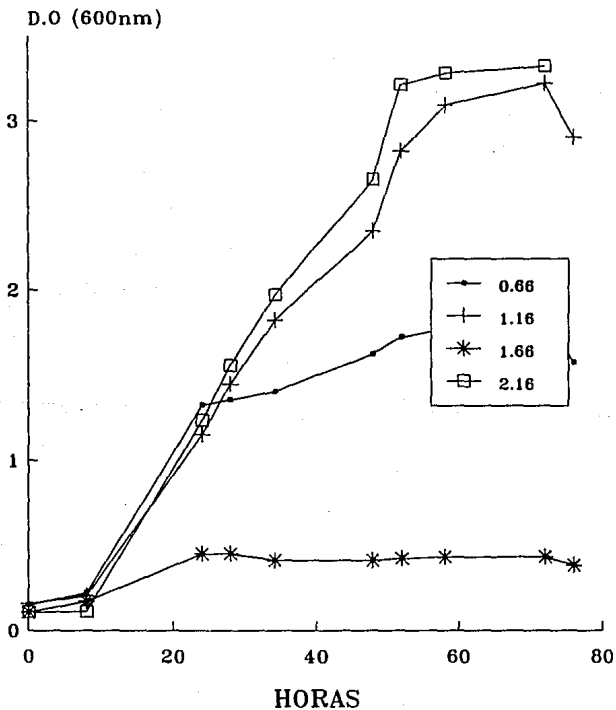


TABLA 18. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium phaseoli* CP MEX 1
CON DIFERENTES NIVELES DE FOSFATO DIBASICO DE POTASIO.

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	0.66	1.16	1.66	2.16
0	0.17	0.08	0.16	0.18
15	0.27	0.18	0.17	0.19
19	0.36	0.30	0.26	0.26
25	1.24	1.02	0.82	0.74
39	3.20	2.65	1.67	1.22
42	3.88	3.53	1.78	1.70
46	3.72	3.50	2.15	1.72
50	3.73	3.30	2.09	1.76
66	2.92	3.89	1.70	1.82
u=	0.095	0.097	0.070	0.051
tD=	7.28	7.08	9.79	13.75

u= velocidad de crecimiento (/h)
tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 12. CRECIMIENTO DE *R. phaseoli* CON DIFERENTES NIVELES DE FOSFATO DE POTASIO

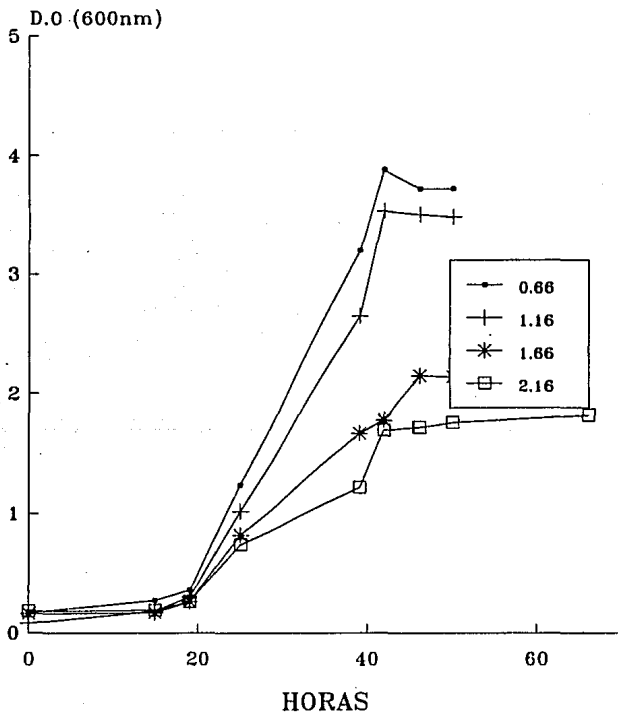


TABLA 19. RESUMEN DE LA COMPARACION DE MEDIAS PARA TIEMPO DE DUPLICACION PARA LOS DIFERENTES NIVELES DE FOSFATO DE POTASIO

	CONCENTRACION (g/l de medio)				
	0.66	1.16	1.66	2.16	Promedio
<u>Rhizobium japonicum</u>	a 25.85±0.46	a 18.22±1.22	a 17.20±1.84	a 28.88±4.40	A 22.53±5.58
<u>Rhizobium meliloti</u>	a 33.54±17.5	abc 18.05±0.22	c 6.42±0.22	bc 11.82±0.17	A 17.46±12.8
<u>Rhizobium phaseoli</u>	a 7.28±0.37	a 7.08±0.12	a 9.79±0.26	a 13.75±2.77	B 9.48±3.06
	A 22.22±14.5	AB 14.45±5.74	B 11.14±5.0	AB 18.15±8.64	

a, b, c. Letras diferentes dentro de filas indican diferencias significativas (P<0.05).

A, B, C. Letras diferentes dentro de filas o columnas indican diferencias significativas (P<0.05).

Las comparaciones de medias para los diferentes niveles de aporte de fosfato de potasio indicaron que, para todas las especies de bacterias utilizadas en el trabajo, los mayores tiempos de duplicación (22.22 ± 14.5 h) correspondieron a los cultivos que contenían 0.66 g/l, y difirieron en forma significativa ($P < 0.05$) con los logrados con medios conteniendo 1.66 g/l (11.14 ± 5.0 h). Los tiempos de duplicación intermedios correspondientes a 1.16 g/l (14.45 ± 5.74) y 2.16 g/l (18.15 ± 8.64) no difirieron entre sí ($P > 0.05$) ni con los tratamientos de 0.66 y 1.66 g/l.

Se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0.0015$) en los tiempos de duplicación de las especies bacterianas utilizadas en el trabajo. El R. phaseoli presentó los menores tiempos de duplicación (9.48 ± 3.06 h), difiriendo en forma significativa ($P < 0.05$) de R. mulloti (17.46 ± 12.8 h) y R. japonicum (22.53 ± 5.58). Estos últimos no presentaron diferencias significativas entre sí ($P > 0.05$).

El estudio de las interacciones indicó el comportamiento diferencial de las especies de Rhizobium utilizadas a los diferentes niveles de fosfato de potasio utilizado. En R. japonicum las medias para tiempos de duplicación fueron de 25.85 ± 0.46 , 18.22 ± 1.22 , 17.20 ± 1.84 y 28.88 ± 4.11 h para los niveles de 0.66, 1.16, 1.66 y 2.16 g/l de fosfato de potasio. Si bien los tiempos de duplicación fueron menores con 1.16 y 1.66 g/l no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$). En el

caso de *R. meliloti*, las medias para tiempo de duplicación fueron de 33.54 ± 17.54 , 18.05 ± 0.22 , 6.42 ± 0.22 y 11.82 ± 0.17 h para los tratamientos de 0.66, 1.16, 1.66 y 2.16 g/l, respectivamente. Los tiempos de duplicación fueron mayores para el aporte de 0.66 g/l, difiriendo en forma significativa con los tratamientos de 1.66 y 2.16 g/l, siendo similar ($P > 0.05$) a los logrados con 1.16 g/l. En *R. phaseoli*, los tiempos de duplicación fueron de 7.28 ± 0.37 , 7.08 ± 0.12 , 9.79 ± 0.26 y 13.75 ± 2.77 para los tratamientos de 0.66, 1.16, 1.66 y 2.16 g/l, no difiriendo significativamente ($P > 0.05$) entre sí.

5.1.5. EVALUACION DE CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE CLORURO DE SODIO EN EL MEDIO.

En las Tablas 20, 21, 22 y Figuras 13, 14 y 15 se presentan los resultados de densidad óptica obtenidas para los diferentes tiempos de incubación, y los cálculos de velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_D) para *R. japonicum*, *R. meliloti* y *R. phaseoli* en medios de cultivo que variaron en sus niveles de aporte de cloruro de sodio.

En la Tabla 23 se presenta un resumen de la información de los tiempos de duplicación obtenidas en el trabajo, indicando las medias y diferencias estadísticas para los medios utilizados. El análisis de varianza para los tiempos de duplicación indicó la existencia de diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 20. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium isponicum* CP89
104A CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO DE SODIO.

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	0.05	0.15	0.35	0.45
0	0.08	0.105	0.10	0.102
8	0.12	0.16	0.165	0.142
24	1.58	1.47	1.30	1.34
28	1.70	1.55	1.37	1.35
34	2.00	1.80	1.20	1.37
48	2.32	2.27	1.47	1.36
52	2.17	2.30	1.50	1.30
58	2.40	2.37	1.60	1.50
72	2.56	2.57	1.82	1.85
76	2.60	2.42	1.57	1.87
82	2.66	2.55	1.50	1.70
96	2.81	2.95	1.48	1.60
u=	0.070	0.034	0.113	0.090
tD=	8.61	18.14	5.42	6.50

u= velocidad de crecimiento (/h)
tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 13. CRECIMIENTO DE *R. japonicum* CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO DE SODIO

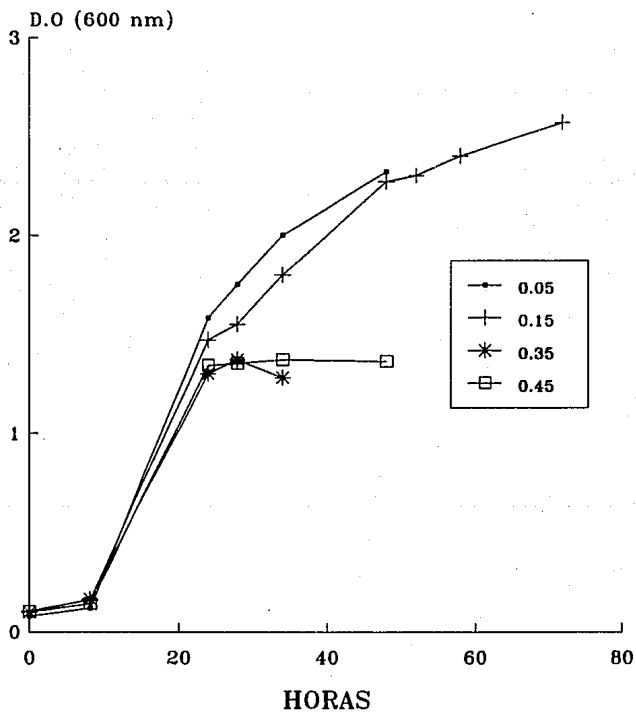


TABLA 21. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium meliloti* C1 CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO DE SODIO.

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	0.05	0.15	0.35	0.45
0	0.101	0.146	0.14	0.16
8	0.15	0.191	0.262	0.26
24	0.185	0.857	0.805	0.95
28	0.195	1.27	0.885	1.25
34	0.225	1.60	1.35	2.17
48	0.662	2.63	2.00	3.22
52	0.875	3.25	1.92	3.32
58	1.28	3.42	2.05	3.47
72	2.85	3.87	2.50	4.65
76	2.85	4.25	2.50	4.15
82	3.75	4.17	2.60	4.07
96	4.20	4.60	2.60	4.30
104	4.37	4.35	2.50	4.20
u=	0.050	0.038	0.049	0.042
tD=	12.18	16.76	12.28	14.37

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 14. CRECIMIENTO DE *R. meliloti* CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO DE SODIO

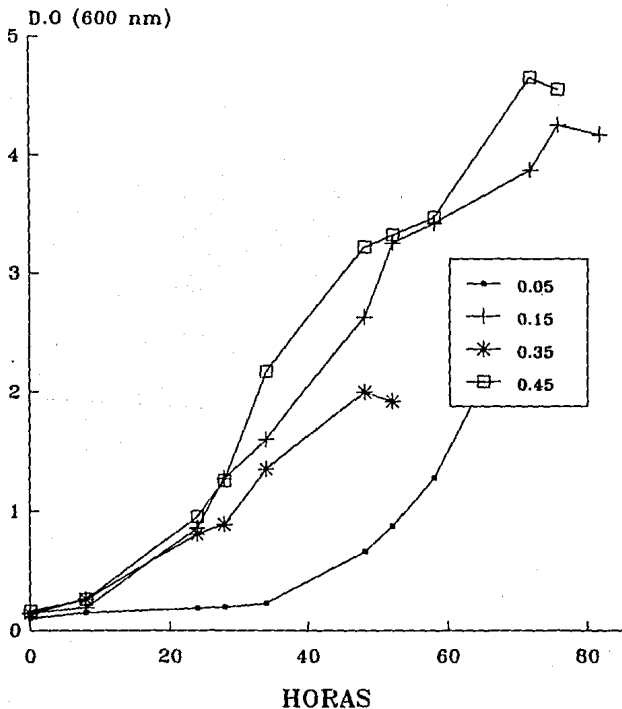


TABLA 22. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium phaseoli* CP MEX 1
CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO DE SODIO.

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)			
	0.05	0.15	0.35	0.45
0	0.07	0.11	0.12	0.16
15	0.08	0.15	0.12	0.22
19	0.12	0.15	0.20	0.31
25	0.33	0.36	0.56	0.99
39	0.37	0.69	1.28	1.97
42	0.46	0.72	1.32	2.52
46	0.47	0.97	1.42	2.65
50	0.63	1.12	1.75	2.72
66	0.63	1.00	1.5	2.65
u=	0.045	0.018	0.040	0.065
tD=	13.61	32.81	16.19	9.42

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 15. CRECIMIENTO DE *R. phaseoli* CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO DE SODIO

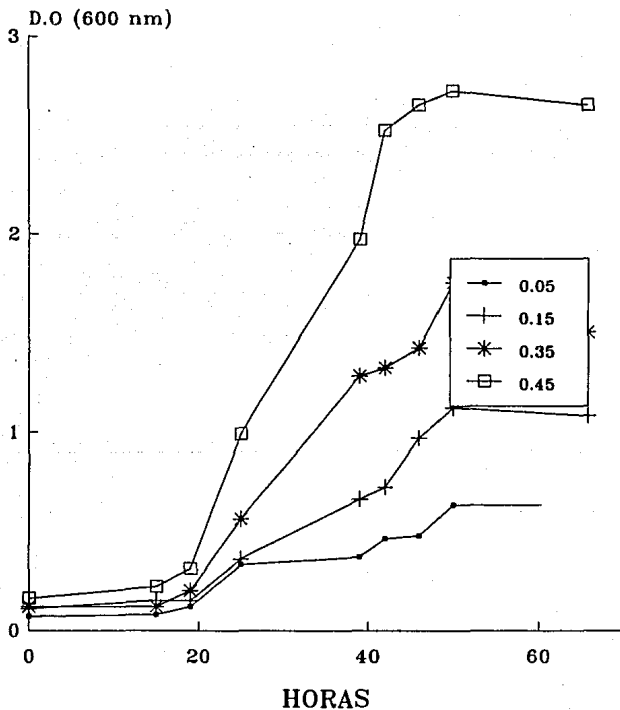


TABLA 23. RESUMEN DE LA COMPARACION DE MEDIAS PARA TIEMPO DE DUPLICACION PARA LOS DIFERENTES NIVELES DE CLORURO DE SODIO

	CONCENTRACION (g/l de medio)				
	0.05	0.15	0.35	0.45	PROMEDIO
<u>Rhizobium japonicum</u>	8.61±0.01 ^{abc}	18.41±0.63 ^a	5.42±0.31 ^c	6.50±0.20 ^{bc}	9.67±5.38 ^C
<u>Rhizobium meliloti</u>	12.18±0.78 ^a	16.76±5.22 ^a	12.28±0.20 ^a	14.37±1.26 ^a	13.90±2.86 ^B
<u>Rhizobium phaseoli</u>	13.61±1.85 ^b	32.81±2.97 ^a	16.19±5.42 ^b	9.42±0.01 ^b	18.00±9.80 ^A
	11.47±2.47 ^B	22.57±8.40 ^A	11.29±5.45 ^B	10.1±3.61 ^B	

a, b, c. Letras diferentes dentro de filas indican diferencias significativas (P<0.05).

A, B, C. Letras diferentes dentro de filas o columnas indican diferencias significativas (P<0.05).

para niveles de aplicación y especies de bacterias estudiadas, así como una interacción altamente significativa ($P < 0.0024$) de niveles*especie de bacteria.

Las comparaciones de medias para niveles de aplicación de cloruro de sodio indicaron que los mayores tiempos de duplicación correspondieron a los medios con 0.15 g/l (22.57 ± 8.4 h), difiriendo en forma significativa ($P < 0.05$) con los tratamientos de 0.05, 0.35 y 0.45 g/l, cuyas medias fueron 11.47 ± 2.47 , 11.29 ± 5.45 y 10.1 ± 3.61 h, respectivamente. En relación a las cepas de bacterias, el *R. phaseoli* presentó los mayores tiempos de duplicación (18.0 ± 9.8 h) difiriendo significativamente ($P < 0.05$) de las restantes cepas. A la vez, el *R. meliloti* presentó mayores tiempos de duplicación (13.9 ± 2.86 h) que la encontrada para *R. japonicum* (9.67 ± 5.38).

El estudio de la interacción entre niveles*especie de bacteria indicó que para *R. japonicum* los mayores tiempos de duplicación (18.61 ± 0.63 h) coincidieron con el nivel de 0.15 g/l de cloruro de sodio, difiriendo significativamente ($P < 0.05$) de los obtenidos para medios con 0.35 g/l (5.42 ± 0.31 h) y 0.45 g/l (6.50 ± 0.20). Probablemente en este caso sea recomendable la utilización de los niveles de 0.35 o 0.45 g/l de cloruro de sodio en los medios optimizados. Para *R. meliloti* las medias de tiempo de duplicación fueron de 12.18 ± 0.78 , 16.76 ± 5.22 , 12.28 ± 0.20 .

y 14.37 ± 1.26 h, para los niveles de 0.05, 0.15, 0.35 y 0.45 g/l de cloruro de sodio en el medio, no encontrándose diferencias entre los diferentes ($P < 0.05$) tratamientos. En el caso de R. phaseoli, el comportamiento de las medias para tiempo de duplicación fue similar al encontrado con R. japonicum, con tiempos máximos de duplicación con niveles de 0.15 g/l de cloruro de sodio..LS1

5.1.6 EVALUACION DE CRECIMIENTO VARIANDO LOS NIVELES DE CLORURO FERRICO EN EL MEDIO.

En las Tablas 24, 25, 26 y Figuras 16, 17 y 18 se presentan los resultados de densidad óptica obtenidas para los diferentes tiempos de incubación, y los cálculos de velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (tD) para R. japonicum, R. meliloti y R. phaseoli en medios de cultivo en los cuales se variaron los niveles de cloruro férrico.

En la Tabla 27 se presenta un resumen de la información de tiempos de duplicación obtenidas en la corridas realizadas, indicando las medias y diferencias estadísticas para los medios utilizados. El análisis de varianza indicó la inexistencia de diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los niveles de cloruro férrico utilizados en el trabajo, aunque las especies bacterianas

TABLA 24. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium japonicum* CP 89
104A CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO FERRICO.

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)	
	0.05	0.15
0	0.062	0.145
8	0.175	0.175
24	1.22	1.42
28	1.24	1.40
34	1.27	1.35
48	1.10	1.22
52	1.30	1.26
58	1.40	1.75
72	1.67	2.02
76	1.80	2.07
82	1.60	1.80
u=	0.083	0.148
tD=	8.36	4.65

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h).

FIGURA 16. CRECIMIENTO DE *R. japonicum* CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO FERRICO

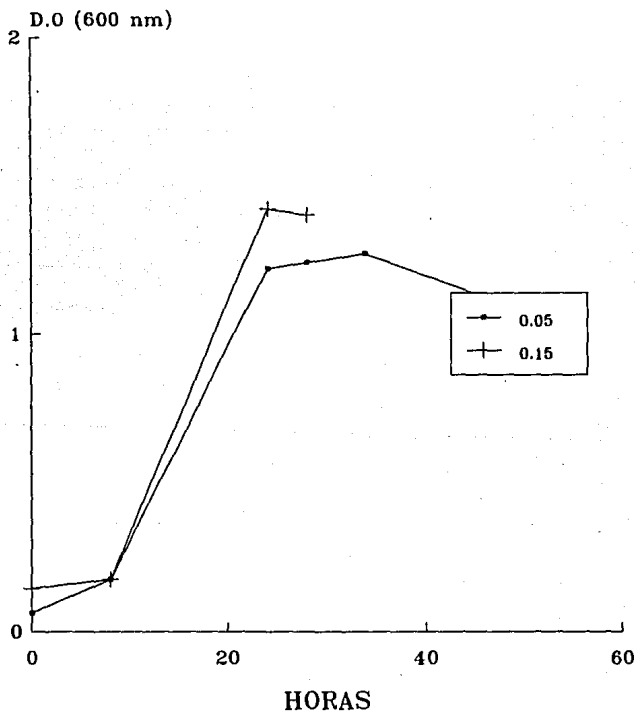


TABLA 25. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium meliloti* C1 CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO FERRICO.

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)	
	0.05	0.15
0	0.051	0.153
8	0.075	0.165
24	0.885	0.435
28	1.20	0.67
34	2.21	1.35
48	3.58	2.70
52	3.20	2.90
58	3.70	3.50
72	3.97	3.87
76	4.12	3.55
82	3.87	4.15
96	4.50	4.50
104	4.75	4.20
u=	0.060	0.049
tD=	11.62	14.01

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 17. CRECIMIENTO DE *R. meliloti* CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO FERRICO.

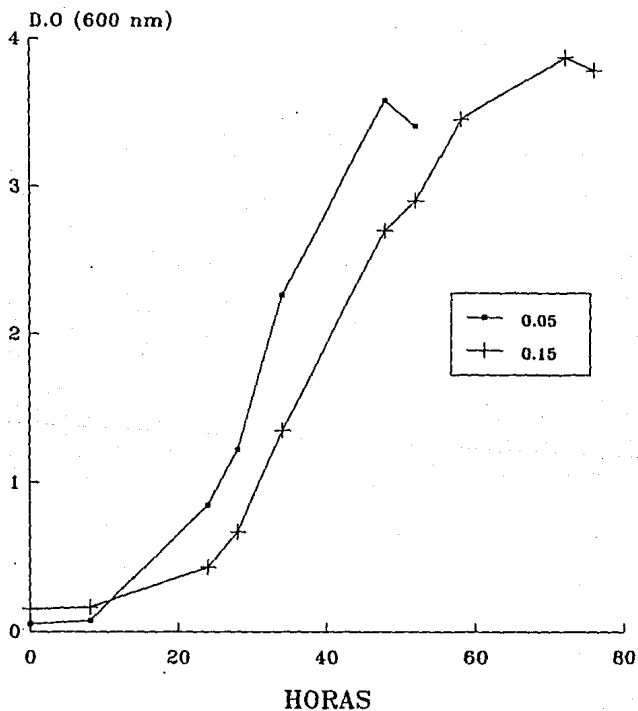


TABLA 26. CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Rhizobium phaseoli* CP MEX 1
CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO FERRICO.

HORA	DENSIDAD OPTICA (600 nm)	
	0.05	0.15
0	0.12	0.12
6	0.12	0.11
18	1.25	1.20
21	1.62	1.58
28	1.75	2.08
40	2.32	3.08
45	2.70	3.50
49	2.61	3.15
53	2.76	3.09
66	2.65	3.80
70	2.47	3.80
76	2.75	4.40
92	2.60	3.25
115	3.00	3.45
u=	0.066	0.076
tD=	10.57	9.20

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 18. CRECIMIENTO DE *R. phaseoli* CON DIFERENTES NIVELES DE CLORURO FERRICO

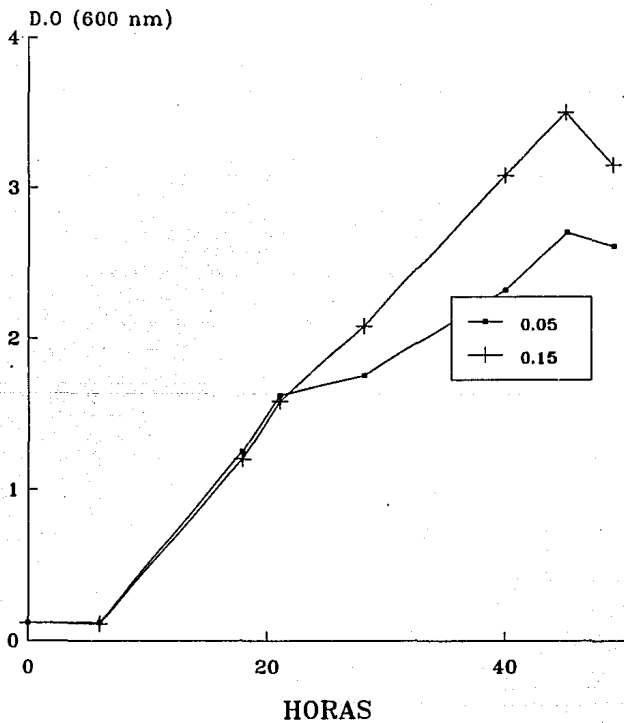


TABLA 27. RESUMEN DE LA COMPARACION DE MEDIAS PARA TIEMPO DE DUPLICACION PARA LOS DIFERENTES NIVELES DE CLORURO FERRICO.

	CONCENTRACION (g/l de medio)		
	0.05	0.15	Promedio
<u>Rhizobium japonicum</u>	8.36±0.74 ^a	4.61±0.01 ^a	6.51±2.18 ^C
<u>Rhizobium meliloti</u>	11.62±1.62 ^a	14.01±0.46 ^a	12.82±1.69 ^A
<u>Rhizobium phaseoli</u>	10.57±1.07 ^a	9.20±1.70 ^a	9.89±1.40 ^B
	10.18±1.76 ^A	9.29±4.26 ^A	

a, b, c. Letras diferentes en filas indican diferencias significativas (P<0.05).

A, B, C. Letras diferentes en filas o columnas indican diferencias significativas (P<0.05)

difirieron en forma altamente significativa ($P < 0.0006$) y se encontró la existencia de una interacción significativa entre niveles*especie de Rhizobium.

Las medias para tiempos de duplicación entre los tratamientos utilizados en el trabajo fueron de 10.18 ± 1.76 y 9.29 ± 4.26 h para los niveles de 0.05 y 0.15 g/l, respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre ellas ($P > 0.05$). La comparación de medias entre especies indicó que los mayores tiempos de duplicación los presentó R. meliloti (12.82 ± 1.69 h), difiriendo en forma significativa ($P < 0.05$) con las otras dos especies utilizadas. Las medias para tiempo de duplicación de R. meliloti fueron de 9.89 ± 1.40 h, presentando diferencias significativas ($P < 0.05$) con los encontrados para R. japonicum (6.51 ± 2.18 h).

El análisis de la interacción entre niveles*especie de bacteria indicó la inexistencia de diferencias significativas ($P < 0.05$) entre niveles de aplicación de cloruro férrico para cada una de las bacterias. Las medias para R. japonicum fueron de 8.36 ± 0.74 h y 4.61 ± 0.01 , en R. meliloti 11.62 ± 1.62 y 14.01 ± 0.46 h, y en R. phaseoli 10.57 ± 1.07 y 9.20 ± 1.7 h, para 0.05 y 0.15 g/l de cloruro férrico, respectivamente.

5.1.7. OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO.

En la Tabla 28 se detallan los medios óptimos surgidos de este estudio para cada una de las especies de bacterias en estudio. Para cada bacteria se presentan las concentraciones de cada

TABLA 28. RESUMEN DE LOS MEDIOS OPTIMIZADOS DE ACUERDO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

	CONCENTRACION (g/l de medio)		
	R. meliloti	R. phaseoli	R. japonicum
CLORURO DE SODIO	0.35	0.45	0.35
CLORURO FERRICO	0.05	0.15	0.15
EXTRACTO DE LEVADURA	0.75	1.50	1.25
SULFATO DE MAGNESIO	0.51	1.01	0.26
POSFATO DE POTASIO	1.66	1.16	1.66
MANITOL	15	10	10

uno de los nutrientes evaluados en las etapas previas de este trabajo.

5.2. OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DEL LOS MEDIOS SELECCIONADOS

5.2.1. EFECTOS DE LAS MODIFICACIONES DEL pH.

En las Figuras 19, 20 y 21 se presenta graficamente la evolución de la cinética de crecimiento para *R. japonicum*, *R. meliloti* y *R. phaseoli*, respectivamente, al modificar el pH del medio entre 6 y 8. En la Tabla 29 se presenta un resumen de los cálculos de velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación para cada una de las bacterias estudiadas al variar el pH del medio de crecimiento. Esta información fue utilizada para ajustar ecuaciones lineales o cuadráticas explicativas del comportamiento general de la velocidad de crecimiento al modificarse el pH del medio utilizado. Las ecuaciones que lograron los mejores ajustes para cada una de las bacterias en estudio fueron las siguientes:

$$\text{R. phaseoli.} \quad \mu = -4.102 + 1.227*(\text{pH}) - 0.0883*(\text{pH})^2 \\ (\text{r}^2=0.85)$$

$$\text{R. meliloti.} \quad \mu = -0.0096 + 0.0308*(\text{pH}) \\ (\text{r}^2=0.82)$$

$$\text{R. japonicum.} \quad \mu = -0.298 + 0.0872*(\text{pH}) - 0.0044*(\text{pH})^2 \\ (\text{r}^2=0.89)$$

FIGURA 19. CRECIMIENTO DE *R. japonicum*
VARIANDO EL pH DEL MEDIO OPTIMIZADO

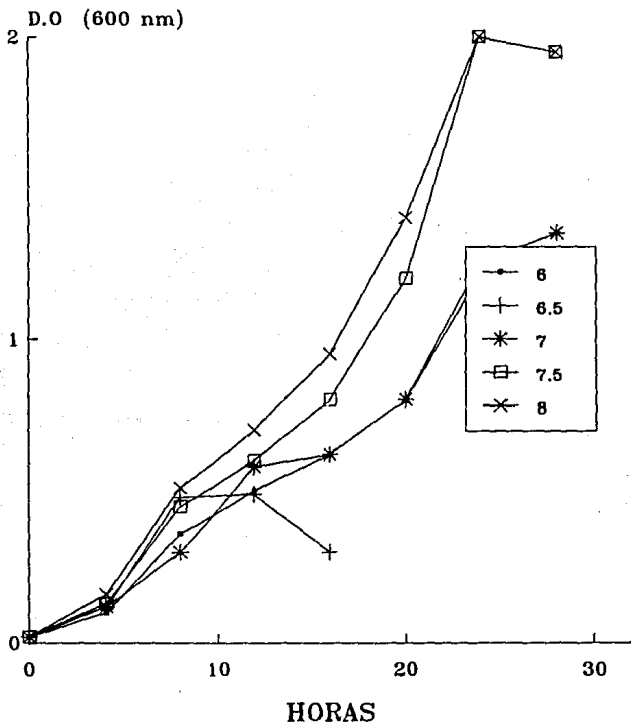


FIGURA 20. CRECIMIENTO DE *R. meliloti*
VARIANDO EL pH DEL MEDIO OPTIMIZADO

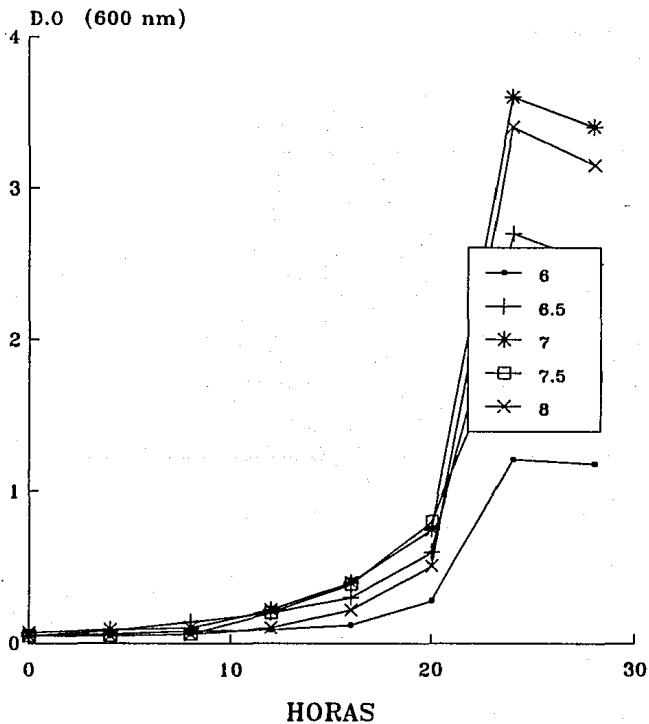


FIGURA 21. CRECIMIENTO DE *R. phaseoli*
VARIANDO EL pH DEL MEDIO OPTIMIZADO

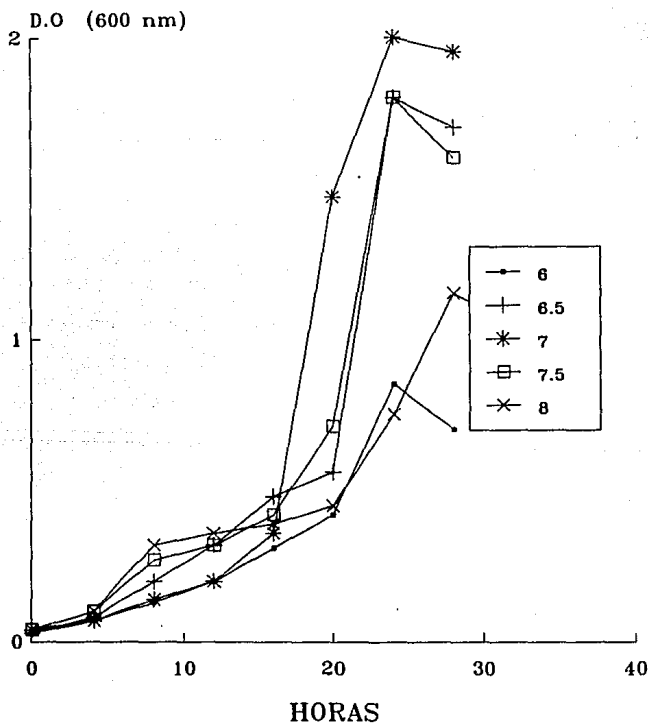


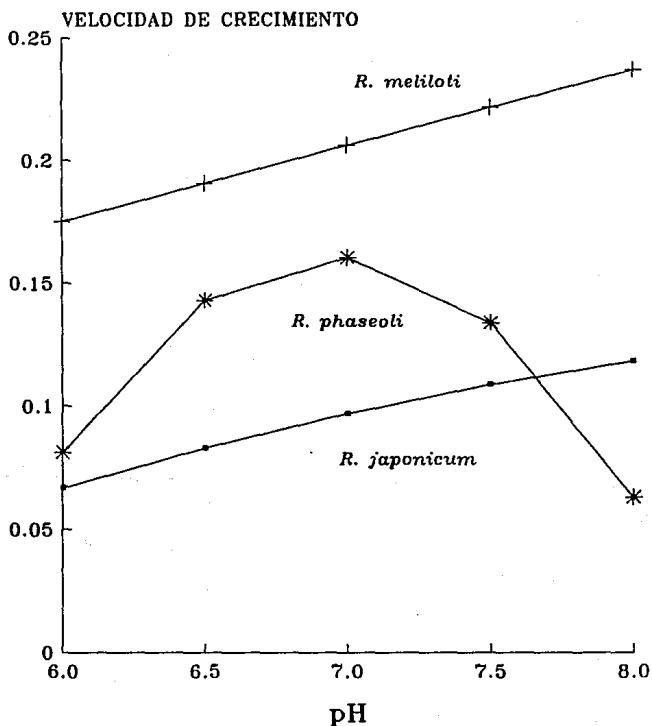
TABLA 29 . VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACION VARIANDO EL pH DEL MEDIO OPTIMIZADO.

pH	R. japonicum		R. meliloti		R. phaseoli	
	u	tD	u	tD	u	tD
6	0.07069	9.80	0.18405	3.76	0.08386	8.26
6.5	0.07767	8.92	0.17543	3.95	0.12385	5.59
7	0.09318	7.44	0.21574	3.21	0.18383	3.79
7.5	0.12069	5.74	0.21242	3.26	0.11478	6.04
8	0.11412	6.07	0.24259	2.85	0.06370	10.9

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 22. VARIACIONES EN VELOCIDAD DE CRECIMIENTO AL MODIFICAR EL pH DEL MEDIO



Los valores ajustados se presentan en la Figura 22 y como surge de las ecuaciones el pH óptimo para las bacterias en estudio fue específicos para cada una. En el caso de *R. phaseoli*, se visualiza claramente que su pH óptimo es de 7.5 dado que hasta este valor la velocidad de crecimiento se incrementó para disminuir posteriormente hasta pH=8.0. Para *R. meliloti*, el mejor ajuste de los datos obtenidos fue lineal indicando que en el rango utilizado en el trabajo la velocidad de crecimiento se incrementó. Probablemente, para esta bacteria sea conveniente incrementar el rango de pH estudiado. En *R. japonicum*, la ecuación de mejor ajuste fue cuadrática lo cual indica que en los valores superiores del rango en estudio la velocidad de crecimiento comenzó a disminuir lográndose el óptimo previamente al pH final.

5.2.2. EFECTOS DE LAS MODIFICACIONES EN LA TEMPERATURA.

En las Figuras 23, 24 y 25 se presentan en forma gráfica los cambios en la cinética de crecimiento de *R. japonicum*, *R. meliloti* y *R. phaseoli*, respectivamente, cuando se modificó la temperatura de incubación de los organismos en crecimiento en el medio optimizado. En la Tabla 30 se resume la información de velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) para cada una de las bacterias cuando se modificó la temperatura entre

FIGURA 23. CRECIMIENTO DE *R. japonicum*
VARIANDO LA TEMPERATURA DE INCUBACION

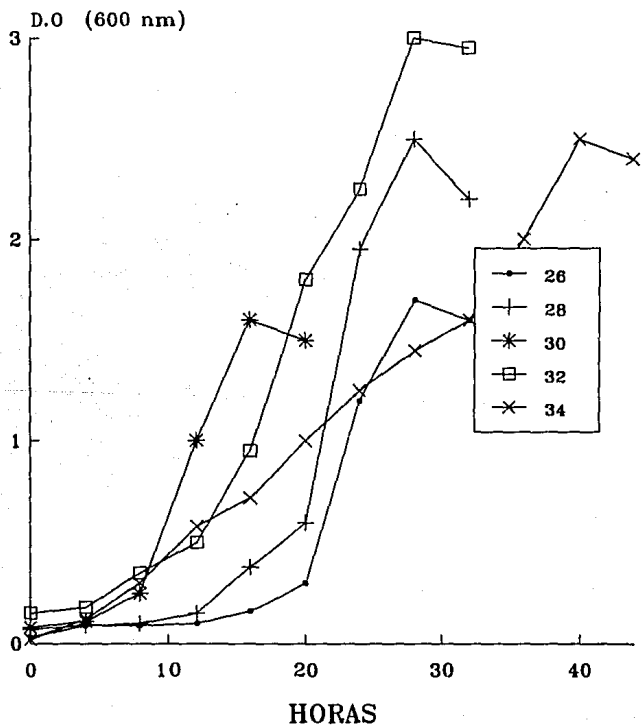


FIGURA 24. CRECIMIENTO DE *R. meliloti*
VARIANDO LA TEMPERATURA DE INCUBACION

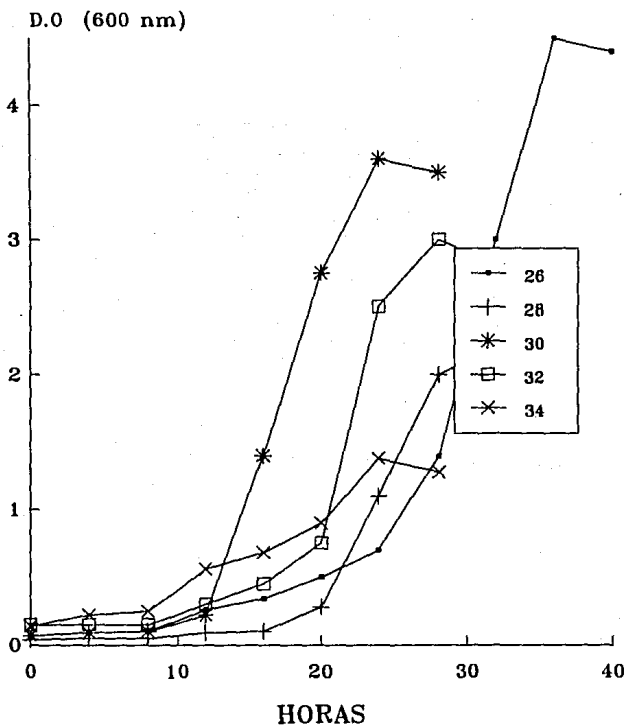


FIGURA 25. CRECIMIENTO DE *R. Phaseoli*
VARIANDO LA TEMPERATURA DE INCUBACION

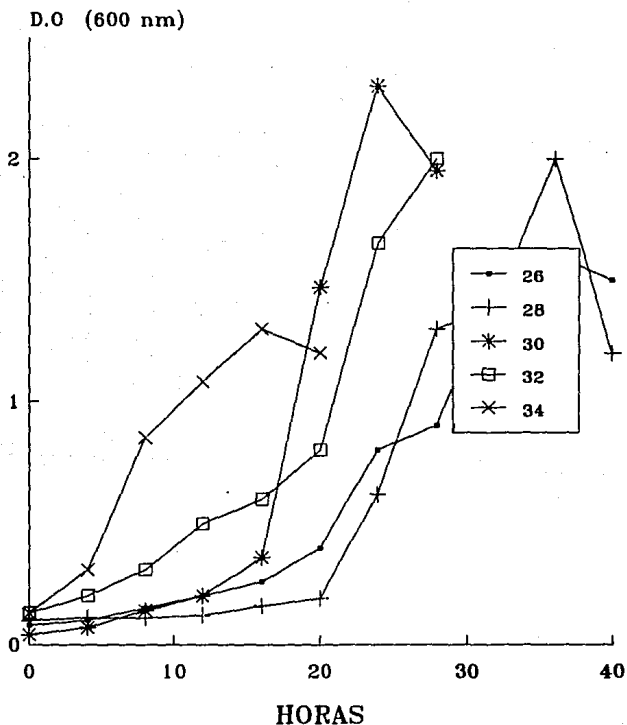


TABLA 30. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACION VARIANDO LA TEMPERATURA DE INCUBACION DEL MEDIO OPTIMIZADO.

T °C	R. japonicum		R. meliloti		R. phaseoli	
	u	tD	u	tD	u	tD
26	0.16267	4.26	0.12933	5.36	0.11255	6.16
28	0.25542	2.71	0.14743	4.70	0.12530	5.53
30	0.23544	2.94	0.19200	3.61	0.1828	3.79
32	0.12277	5.64	0.11743	5.90	0.10915	6.35
34	0.07287	9.51	0.09727	7.12	0.11350	6.11

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

26 y 34 C en el medio optimizado. Como se aprecia en los datos presentados las temperaturas óptimas para la velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación se presentan en forma general entre los 28 y 30 C. En *R. meliloti* y *R. phaseoli* la mayor velocidad de crecimiento del medio optimizado se presentó con 30 C, mientras que para el caso de *R. japonicum* la temperatura óptima fue de 28 C. Los datos obtenidos para velocidad de crecimiento fueron ajustados a modelos de tipo cuadrático para representar la información en forma gráfica. Las ecuaciones para cada una de las bacterias estudiadas fueron:

$$R. japonicum \quad u = -5.383 + 0.3894*(T) - 0.00675*(T)^2 \\ (r^2=0.86)$$

$$R. meliloti \quad u = -2.835 + 0.2047*(T) - 0.00349*(T)^2 \\ (r^2=0.70)$$

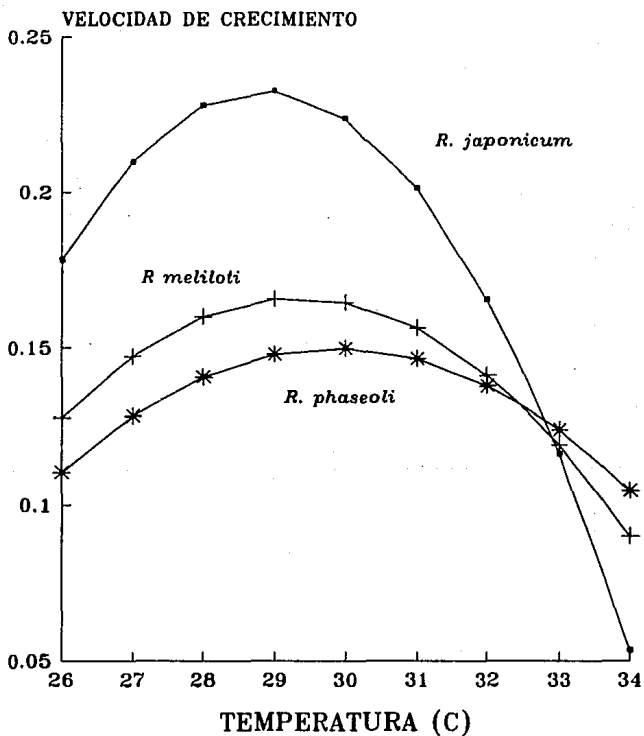
$$R. phaseoli \quad u = -2.207 + 0.1578*(T) - 0.00264*(T)^2 \\ (r^2=0.52)$$

En la Figura 26 se presenta el comportamiento general de cada una de las bacterias estudiadas. En estas curvas se aprecian claramente las temperaturas óptimas que coinciden con las señaladas anteriormente para las tres especies.

5.2.3. EFECTOS DE LA MODIFICACION DE LOS NIVELES DE APOORTE DE MANITOL.

En la Tabla 31 y la Figura 27 se presentan los resultados de

FIGURA 26. VARIACIONES EN LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO AL MODIFICAR LA TEMPERATURA.



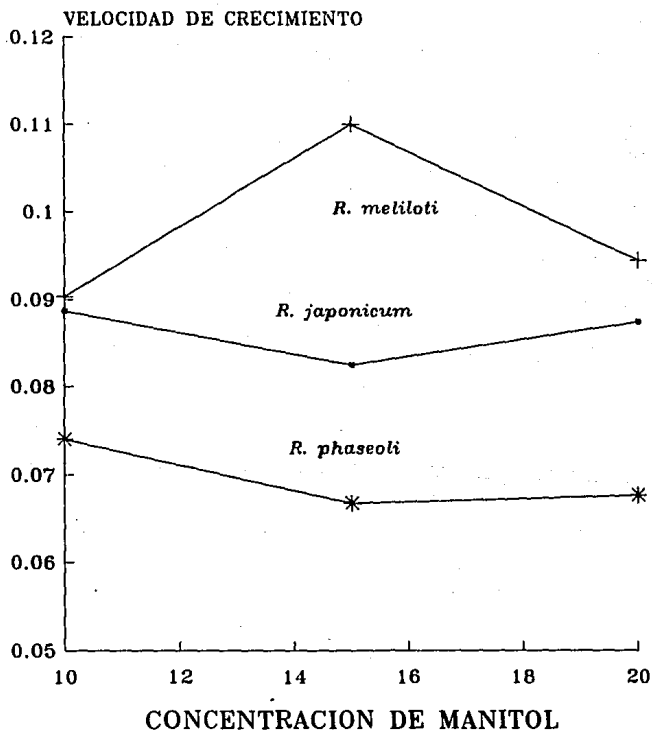
**TABLA 31. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACION
VARIANDO LA CONCENTRACION DEL MANITOL EN EL MEDIO
OPTIMIZADO.**

(g/l)	R. japonicum		R. meliloti		R. phaseoli	
	u	tD	u	tD	u	tD
10	0.08864	7.81	0.09301	7.45	0.07399	9.37
15	0.08244	8.41	0.10998	6.30	0.06670	10.39
20	0.08735	7.93	0.09445	7.34	0.06762	10.25

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

FIGURA 27. VARIACIONES EN LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO AL MODIFICAR EL MANITOL



velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_D) de *R. japonicum*, *R. meliloti* y *R. phaseoli* al modificar las cantidades .pn112

de manitol aportadas al medio óptimo en el rango de 10 a 20 g/l. Como se aprecia en la información presentada, las especies de *R. japonicum* y *R. phaseoli* no presentaron respuestas notorias a los aumentos en la concentración de manitol en el medio optimizado. En el caso de *R. meliloti*, se detectó un aumento hasta concentraciones de 15 g/l con una posterior disminución al incrementar la concentración a 20 g/l. Probablemente, esta bacteria pueda presentar características que permitan crecimiento a mayores concentraciones de la fuente de carbono utilizada. En base a lo anterior podemos concluir que las bacterias presentaron una adecuada velocidad de crecimiento con concentraciones de 10 g/l, y en algunos casos podría aumentarse hasta 15 g/l.

5.3. EVALUACION DE AIREACION Y AGITACION EN MEDIO OPTIMIZADO DE *R. phaseoli*

En la Figuras 28 a 37 se presentan graficamente los resultados de crecimiento, consumo de manitol y peso seco de bacterias en el medio optimizado para *R. phaseoli*, variando las condiciones de agitación y aireación en el fermentador. En la Tabla 32 se resumen los datos calculados para velocidad de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (t_D), consumo de manitol (g/l/h), materia seca total producida durante la fermentación (g/l) y materia seca

FIGURA 28 CRECIMIENTO Y CONSUMO DE
MANITOL A 300 RPM Y 0.5 VVM.

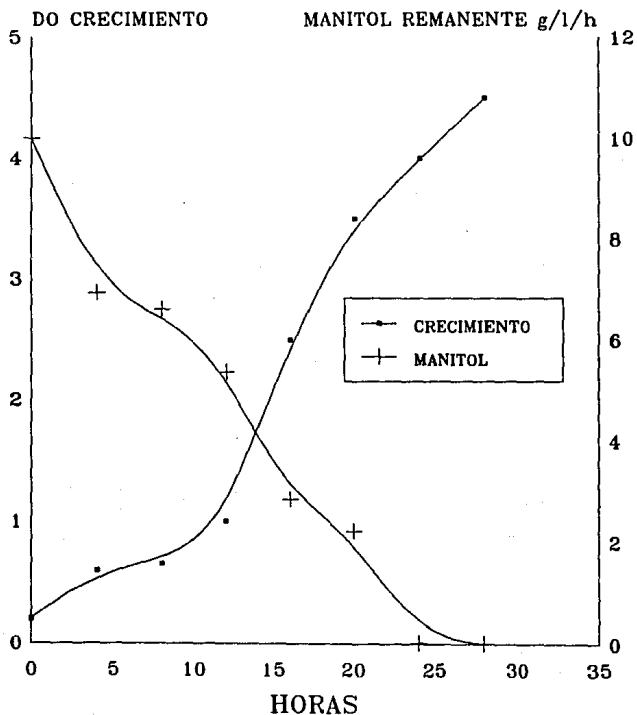


FIGURA 29. CRECIMIENTO Y PESO SECO
A 300 RPM Y 0.5 VVM

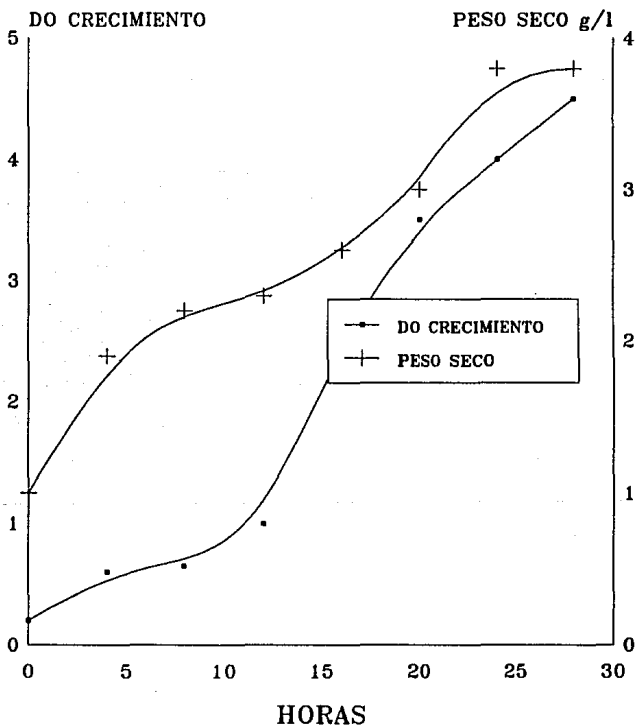


FIGURA 30. CRECIMIENTO Y CONSUMO DE MANITOL A 500 RPM Y 0.3 VVM

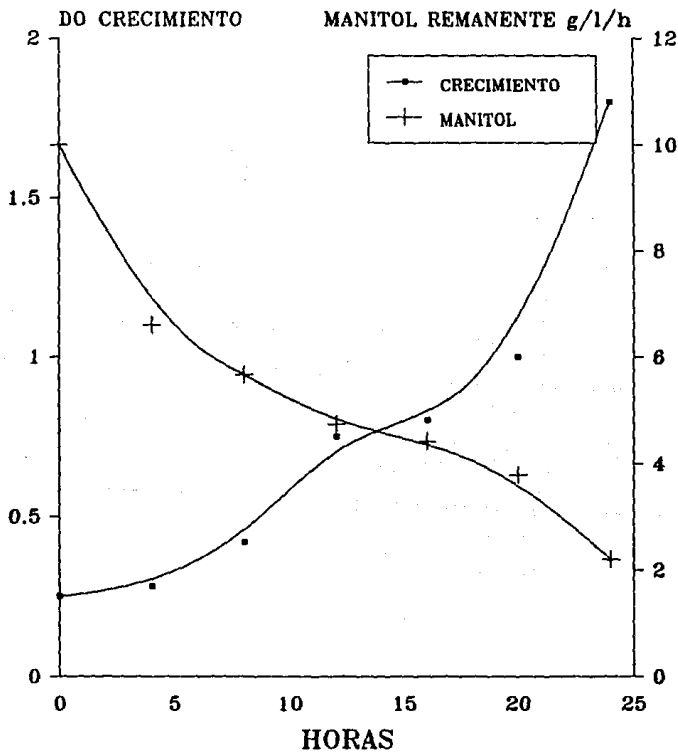


FIGURA 31. CRECIMIENTO Y PESO SECO
A 500 RPM Y 0.3 VVM

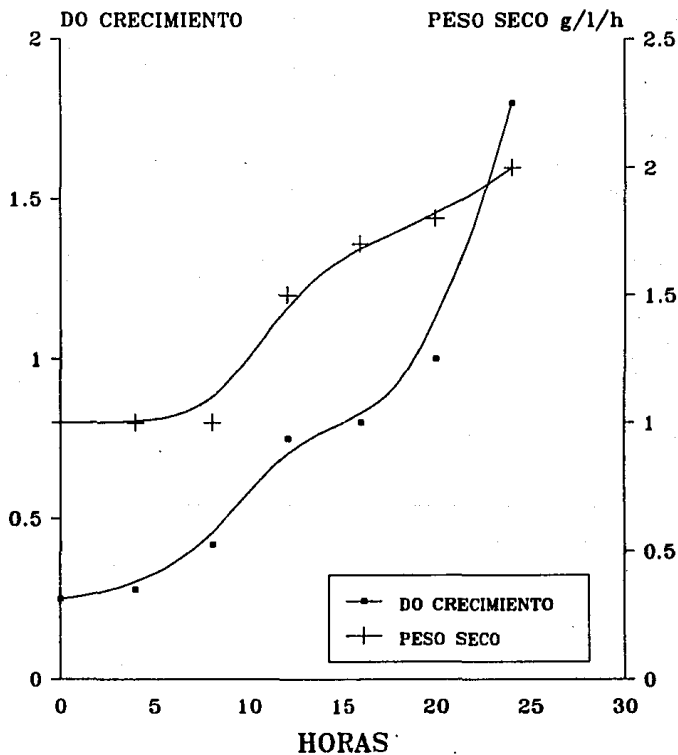


FIGURA 32. CRECIMIENTO Y CONSUMO DE
MANITOL A 500 RPM Y 0.5 VVM

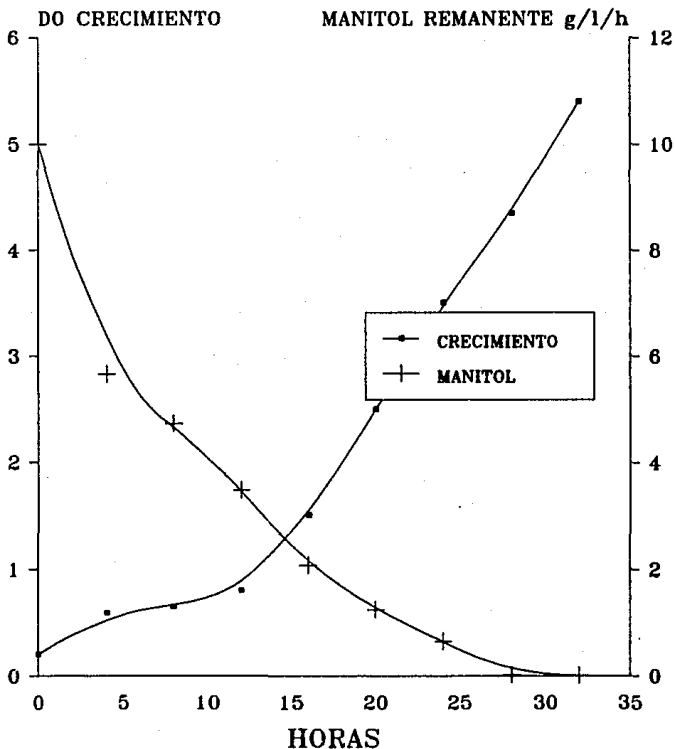


FIGURA 33. CRECIMIENTO Y PESO SECO
A 500 RPM Y 0.5 VVM.

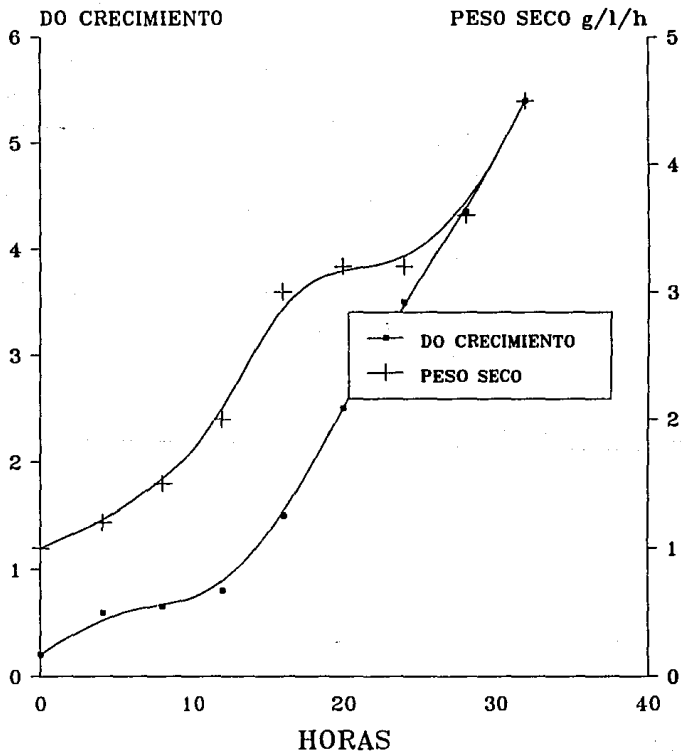


FIGURA 34. CRECIMIENTO Y CONSUMO DE MANITOL A 500 RPM Y 0.7 VVM

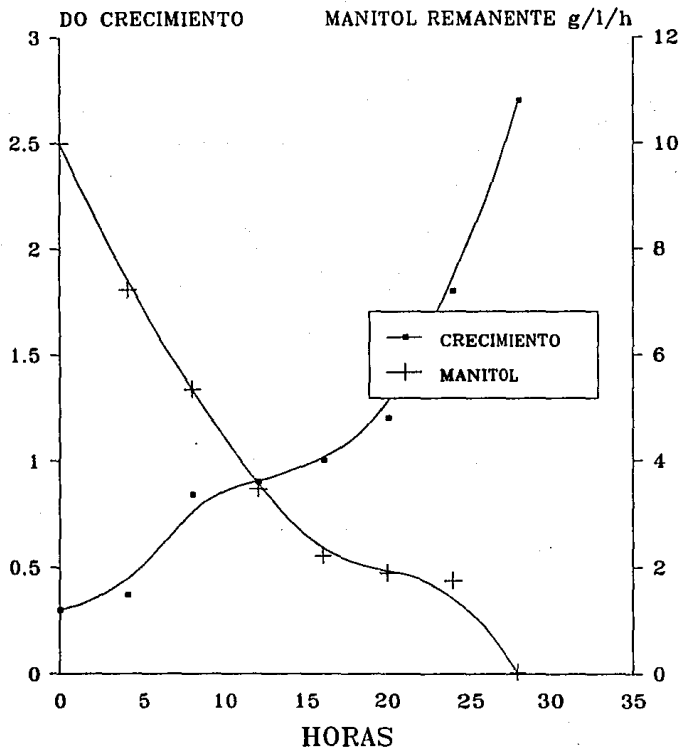


FIGURA 35. CRECIMIENTO Y PESO SECO
A 500 RPM y 0.7 VVM

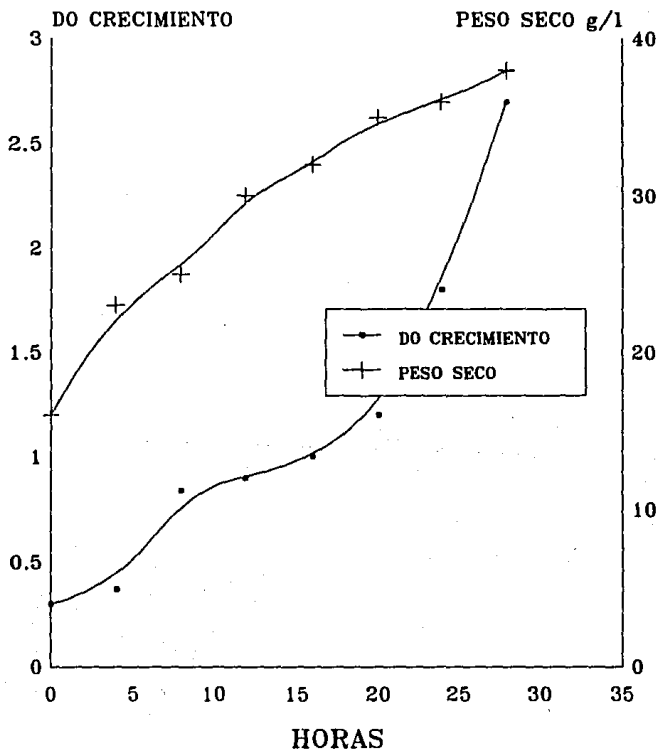


FIGURA 36. CRECIMIENTO Y CONSUMO MANITOL A 700 RPM Y 0.5 VVM

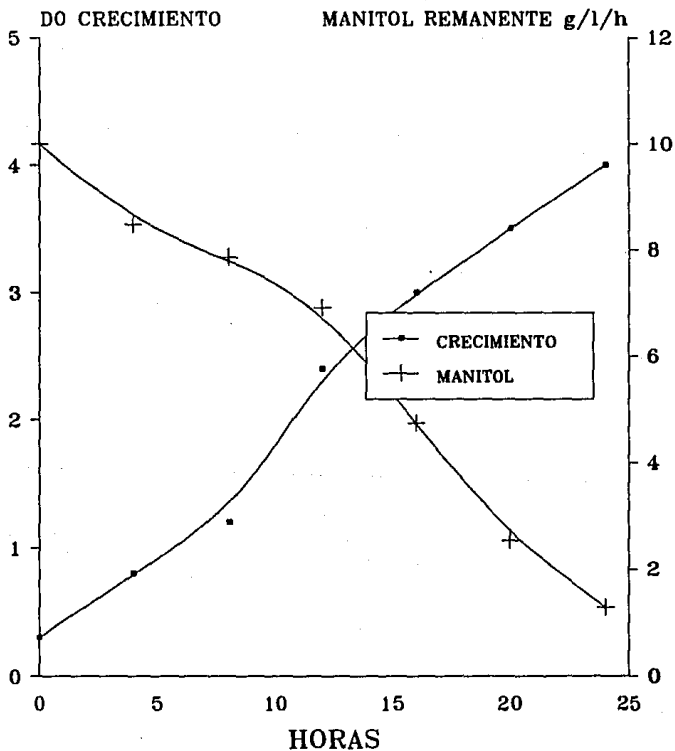


FIGURA 37. CRECIMIENTO Y PESO SECO
A 700 RPM Y 0.5 VVM

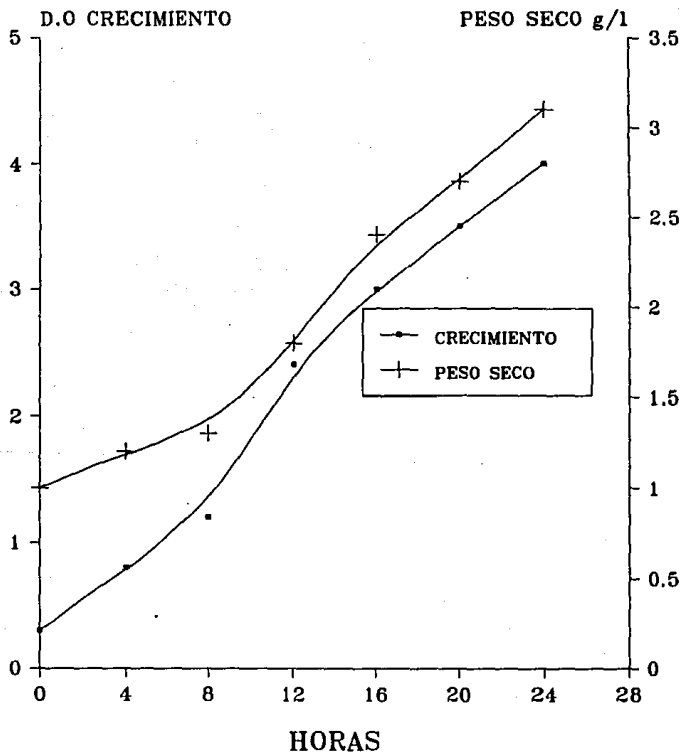


TABLA 32. RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS EN FERMENTACION EN LOTE PARA *Rhizobium phaseoli* CP MEX1.

RPM	VVM	u	tD	CONSUMO MANITOL (g/l/h)	PESO SECO (g/l)	PESO SECO (g/l/h)
300	0.5	0.073	9.48	0.28	4	0.077
500	0.3	0.085	8.10	0.20	2	0.053
	0.5	0.089	7.78	0.24	4.5	0.105
	0.7	0.069	9.99	0.27	3.4	0.045
700	0.5	0.082	8.45	0.39	3.1	0.102

rpm= revoluciones por minuto

vvm= volumen de aire/volumen de medio/minuto.

u= velocidad de crecimiento (/h)

tD= tiempo de duplicación (h)

producida por unidad de tiempo (g/l/h), para las diferentes condiciones de agitación y aireación.

Al variar las condiciones de agitación, los tiempos de duplicación fueron de 9.48, 7.78 y 8.45 h para 300, 500 y 700 rpm. De acuerdo a estos resultados, la agitación a 500 rpm parece ser óptima para el crecimiento de esta bacteria en el medio optimizado. Utilizando la condición anterior de agitación, se evaluaron 0.3, 0.5 y 0.7 vvm de aireación. Los resultados muestran que los tiempos de duplicación fueron de 8.1, 7.78 y 9.99 h para 0.3, 0.5 y 0.7 vvm, respectivamente.

La producción de materia seca en el fermentador para todas las corridas realizadas fue 0.085 g MS bacteriana/l/h. En la Tabla 32 se presenta la producción bacteriana por hora para cada una de las condiciones estudiadas y como puede apreciarse se relaciona directamente con la velocidad de crecimiento del cultivo para cada una de ellas. Por otra parte, analizando la relación entre materia seca y manitol remanente en el medio de todas las corridas realizadas en el fermentador, por medio de regresión fue posible determinar que por cada gramo de materia seca bacteriana producida por litro de medio condujo a una reducción de 0.28 g/l/h de manitol en el medio. La producción de la fermentación a 500 rpm y 0.5 vvm fueron de 4.5 g/l de medio con el mejor tiempo de duplicación y con una cuenta viable de 4×10^9 UFC/ml.

5.4. EVALUACION DE LA SOBREVIVENCIA DE LAS BACTERIAS EN EL SOPORTE DE BAGACILLO DE CAÑA DE AZUCAR

Las bacterias luego de ser inoculadas con un cuenta viable de 4×10^9 UFC/ml fueron evaluadas durante la maduración en las bolsas con soporte a temperatura ambiental por una semana, realizando un nuevo recuento el cual fue de 6×10^9 UFC/ml. Las tomas de muestras y su cuenta viable se describen en la Tabla 33. La cuenta viable a 4 C se redujo en 120 días hasta 2×10^8 UFC/ml, siendo todavía un inoculante de buena calidad de acuerdo a lo sugerido por Córdova (20). A 30 C en el mismo período se redujo la cuenta viable en forma considerable bajando la calidad del producto final. Las temperaturas elevadas pueden haber interaccionado con la humedad del soporte, que disminuyó en forma importante, conduciendo a una mortalidad de bacterias elevada.

5.5. CARACTERIZACION DE LAS CEPAS DE ACUERDO A LA PRODUCCION DE SUSTANCIAS ACIDAS O ALCALINAS

Las cepas de *R. phaseoli*, *R. meliloti* y *R. japonicum*, fueron evaluadas en medios líquidos con indicadores de pH (azul de bromotimol). Luego de 11 días de incubación de las especies *R. phaseoli* y *R. meliloti*, el medio viró al color amarillo indicando que son bacterias acidificadoras. En cambio, en *R. japonicum*

TABLA 33. SOBREVIVENCIA DE Rhizobium phaseoli CP MEX1 EN
BAGACILLO DE CAÑA DE AZUCAR.

DIAS	Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml)	
	ALMACENADO A 4°C	ALMACENADO A 30°C
0	4 X 10 ⁹ /ml	4 X 10 ⁹ /ml
15	4 X 10 ⁹ /ml	3 X 10 ⁹ /ml
30	2 X 10 ⁹ /ml	3 X 10 ⁸ /ml
60	3 X 10 ⁸ /ml	2 X 10 ⁸ /ml
90	3 X 10 ⁸ /ml	1 X 10 ⁸ /ml
120	2 X 10 ⁸ /ml	1 X 10 ⁷ /ml

después de un mes de incubación no se encontraron cambios en el medio. Las bacterias acidificadoras son de rápido crecimiento mientras que las alcalinizadores del medio son especies de crecimiento lento. Esto coincide con los reportes de la literatura (61, 40, 9).

6. DISCUSION.

El estudio de las fuentes de carbono para el crecimiento de Rhizobium permitieron detectar diferencias en los efectos de las mismas en el tiempo de duplicación bacteriana. En forma general, el manitol fue la fuente de mejores resultados en tiempo de duplicación (9.99 ± 2.9 h), la sacarosa y glicerol presentaron un comportamiento intermedio, mientras que la glucosa condujo a las velocidades de crecimiento más bajas. Esta información es coincidente con los reportes de la literatura (9, 17, 40, 61) que señalan al manitol como la fuente de carbono más apropiada para el crecimiento de esta bacteria. Sin embargo, surge del trabajo que cada especie en particular presenta características propias y su respuesta a la fuente de carbono utilizada, así como a los restantes nutrientes y condiciones ambientales del medio bajo estudio, pueden ser diferentes para cada una de ellas (10, 38, 40, 62).

Los aspectos particulares en relación a la fuente de carbono indicaron que R. phaseoli en medios de glicerol y sacarosa se comportó en forma similar al manitol, siendo la glucosa la fuente menos aconsejable por los altos tiempos de duplicación. Para R. meliloti el manitol y la sacarosa presentaron los mejores tiempos de duplicación, mientras que el glicerol mostró el comportamiento

más pobre para esta bacteria. Para *R. japonicum* las fuentes que condujeron a los mejores tiempos de duplicación fueron manitol y glicerol. El manitol aparece en forma general como la fuente más consistente en su comportamiento pero las variaciones dependientes de la especie utilizada permite una cierta flexibilidad en el manejo de las fuentes de carbono a nivel industrial.

La evaluación de las concentraciones de extracto de levadura en el medio para el aporte de vitaminas y nitrógeno, mostraron nuevamente el comportamiento particular de cada especie como lo ha reportado Graham (27). En *R. meliloti* las concentraciones óptimas para tiempo de duplicación fueron de 0.5 y 0.75 g/l, mientras concentraciones superiores condujeron a una menor velocidad de crecimiento. En *R. japonicum* las concentraciones de 0.75, 1.25 y 1.5 g/l no presentaron diferencias en tiempo de duplicación, mientras que el uso de niveles de 0.5 condujo a un notorio aumento en esta variable. En *R. phaseoli* la concentración óptima fue de 1.5 g/l, y concentraciones menores condujeron a una significativa disminución en la velocidad de crecimiento. En este trabajo no se encontraron respuestas inhibitorias al aporte de nitrógeno, que han sido ampliamente reportadas en la literatura (61, 40, 17), probablemente debido a que los niveles utilizados fueron menores a 2 g de extracto de levadura/l de medio.

La evaluación de los diferentes niveles de aporte de sulfato de magnesio indicó que las concentraciones bajas de esta sal en el medio condujo a las mayores velocidades de crecimiento, lo cual concuerda con los planteamientos realizados por Burton (17) y Vincent (61). Este comportamiento general se apreció en forma notoria en R. japonicum y R. meliloti, mientras que en R. phaseoli no se encontraron diferencias para las diferentes concentraciones utilizadas, lo cual indica que esta bacteria parece ser insensible a los cambios en los niveles de aporte de sulfato de magnesio dentro de los bajos rangos manejados en este trabajo.

Las concentraciones óptimas de fosfato de potasio dibásico se encontraron en el rango de 1.16 y 1.66 g/l. En forma particular, R. japonicum y R. phaseoli no presentaron cambios significativos para las diferentes concentraciones utilizadas de esta sal, mientras que R. meliloti presentó un comportamiento superior cuando la concentración fue de 1.66 g/l de medio de cultivo.

El comportamiento de R. japonicum y R. phaseoli a las concentraciones de cloruro de sodio en el medio indicaron que los tiempos máximos de duplicación se presentaron con concentraciones de 0.15 g/l, disminuyendo con los aumentos posteriores. En cambio, en R. meliloti no se encontraron diferencias significativas para las diferentes concentraciones utilizadas. En este trabajo

no se detectaron efectos inhibitorios de esta sal reportadas en la literatura por los rangos de concentración utilizados (40).

No se encontraron diferencias en las concentraciones de cloruro férrico utilizados en este trabajo (0.05 y 0.15 g/l). Los niveles utilizados en los medios utilizados respondieron a las interacciones especie*nivel.

La información obtenida en esta etapa del trabajo para los nutrientes evaluados se presentan en la Tabla 28, estructurando los medios óptimos sobre los que se trabajó en las etapas posteriores para el estudio de las condiciones ambientales del medio de cultivo. Para todos los casos, la fuente de carbono seleccionada para todas las bacterias fue el manitol de acuerdo a los resultados presentados en el Tabla 7. Esto concuerda con los reportes de la literatura en relación a las mejores fuentes de carbono para el crecimiento de Rhizobium (9, 17, 40). Asimismo es posible considerar algunas fuentes alternativas, dado que el glicerol presentó un comportamiento similar al manitol con algunas especies de Rhizobium.

El estudio realizado con extracto de levadura indicó en su análisis global la inexistencia de diferencias significativas entre los niveles 0.75, 1.25 y 1.5 g/l y por esta razón las

concentraciones elegidas fueron aquellas en que el tiempo de duplicación de cada bacteria fue menor. Las concentraciones seleccionadas para el medio óptimo fueron de 0.75, 1.25 y 1.5 g/l para R. meliloti, R. japonicum y R. phaseoli, respectivamente. Los niveles óptimos de sulfato de magnesio correspondieron a 0.26, 0.51 y 1.01 g/l para R. japonicum, R. meliloti y R. phaseoli, respectivamente. El estudio general para la inclusión de esta sal indicó que al aumentar sus niveles la velocidad de crecimiento de esta bacteria disminuyó, lo cual se aprecia particularmente en R. japonicum y R. meliloti. En el caso de R. phaseoli no se encontraron diferencias entre los distintos niveles de aporte de la sal, por lo cual la concentración seleccionada fue la mayor que permitió el menor tiempo de duplicación. Los resultados generales obtenidos para esta sal concuerdan con lo planteado por Vincent (62).

La concentración de fosfato de potasio seleccionado fue de 1.16 g/l para R. phaseoli y 1.66 para R. meliloti y R. japonicum. Los resultados globales indican que no existieron diferencias entre los niveles de aporte de 1.16, 1.66 y 2.16 g/l. En el caso de cloruro de sodio se seleccionaron los niveles de 0.35 g/l para R. japonicum y R. meliloti, y 0.45 g/l para R. phaseoli. Para cloruro férrico no existieron diferencias en el estudio global de las bacterias y se seleccionaron los niveles de 0.05 g/l para R. meliloti y 0.15 g/l para R. phaseoli y R. japonicum que en este

estudio permitieron obtener los mejores tiempos de duplicación.

La evaluación de los niveles óptimos de pH y temperatura se realizaron por medio de ajuste de ecuaciones lineales y cuadráticas que indicaron el comportamiento general en velocidad de crecimiento. En esta forma las ecuaciones demostraron claramente que los niveles óptimos de pH fueron de 7.0, 7.5 y 8.0 para R. phaseoli, R. japonicum y R. meliloti, respectivamente. Es importante considerar que R. meliloti presentó su mejor ajuste a un modelo lineal, lo cual puede indicar que podrían estudiarse niveles superiores a pH 8.0 para conocer su comportamiento en esas condiciones. En relación a la temperatura, las diferentes especies bajo estudio se ajustaron a modelos cuadráticos y los óptimos fueron de 28 C para R. japonicum y 30 C para R. meliloti y R. phaseoli. Esta información es coincidente con los rangos generales de pH y temperatura recomendada en la literatura (17, 34, 38, 40, 61).

En relación a los cambios en la concentración de manitol en el medio entre 10 y 20 g/l, se encontró que R. phaseoli y R. japonicum no presentaron respuestas a los aumentos en la concentración de manitol en el medio optimizado. Esto coincide con los reportes de la literatura que consideran que niveles mayores a 10 g/l de medio pueden ocasionar aumentos en la acidez por productos de la fermentación que afectan el crecimiento de las bacterias (9, 10, 61). Por otra parte, otra alternativa a discutir puede ser que otros nutrientes del medio se hagan limitantes cuando se aumentan

las concentraciones de la fuente de carbono. En el caso de R. meliloti se detectó un aumento hasta concentraciones de 15 g/l de medio, con una posterior disminución al incrementar la concentración a 20 g/l. Probablemente esta bacteria pueda presentar características que permitan el crecimiento a mayores concentraciones de la fuente de carbono utilizada.

Las condiciones de agitación y aireación fueron modificadas en el estudio, utilizando R. phageoli en fermentador, para establecer las condiciones óptimas que se ubicaron en niveles de 500 rpm y 0.5 vvm. En estas condiciones del medio de cultivo se obtuvo un tiempo de duplicación de 7.78 h con una producción de peso seco de 4.5 g células/litro lo cual puede considerarse altamente satisfactorio para las condiciones de producción industrial. Con la información obtenida en esta parte del experimento y utilizando los niveles remanentes de manitol en el cultivo (g/l), permitió calcular, a través de regresión lineal de concentración sobre horas, que la cantidad de esta fuente de carbono que desaparece por consumo es de 0.30 g/l/h ($r^2=0.84$, $P<0.0001$) como promedio para todas las condiciones de trabajo evaluadas. En el análisis del consumo de manitol para cada condición del medio evaluada, indicó que existe un aumento en el consumo de manitol al incrementar la aireación entre los rangos estudiados. Los valores de consumo de manitol en los tres niveles de aireación a 500 rpm

fueron de 0.20 ($r^2=0.96$, $P<0.0005$), 0.24 ($r^2=0.98$, $P<0.0001$) y 0.27 ($r^2=0.92$, $P<0.0006$) g/l/hora, para 0.3, 0.5 y 0.7 vvm, respectivamente. Como vemos, en este mismo rango la velocidad de crecimiento del cultivo se incrementó entre aireaciones de 0.3 a 0.5 vvm, por lo cual el aumento del consumo de manitol puede utilizarse en esta función. En cambio, entre aireaciones de 0.5 y 0.7 vvm se presentó un aumento en el consumo de manitol y una disminución en la velocidad de crecimiento, por lo que se podría señalar que existe un desvío de la fuente de carbono hacia otras funciones, como producción de mucilago, o la eficiencia de utilización de la fuente de carbono disminuye.

La etapa final del proceso de producción de los inoculantes comprendió el estudio de soportes inertes que normalmente se utilizan para el transporte de los microorganismos fijadores de nitrógeno en buenas condiciones hasta los consumidores finales. En este trabajo se evaluó el bagacillo de caña de azúcar como una alternativa viable para la buena conservación del inoculante. Bajo condiciones de conservación de 4 C se obtuvo un inoculante de excelente calidad durante todo el período de almacenamiento estudiado (120 días), mientras que con temperatura de 30 C la disminución en la viable fue mayor y puede considerarse que bajo estas condiciones el período de almacenaje aconsejable es de 90 días. Por lo tanto, se considera que el bagacillo de caña de azúcar puede ser un soporte adecuado para el transporte de inoculantes comerciales.

7. CONCLUSIONES.

7.1. El estudio de fuentes de carbono y niveles de nutrientes para la optimización de los medios de cultivo, indicaron que las especies estudiadas presentan particularidades que conducen a la propuesta de un medio específico para cada una de las cepas.

7.2. La fuente de carbono que permitió las mayores velocidades de crecimiento fue el manitol, aunque el glicerol y sacarosa pueden considerarse como sustitutos adecuados en condiciones industriales de producción. La glucosa, en cambio, demostró ser una fuente inadecuada para el crecimiento de estas bacterias. Los niveles de aporte de nitrógeno, vitaminas y minerales variaron de acuerdo con la cepa utilizada.

7.3. El crecimiento de las bacterias en los medios optimizados fue afectado por el pH, la temperatura y el nivel de manitol utilizado. El pH óptimo de crecimiento varió de acuerdo a la especie: 7.0 (*R. phaseoli*), 7.5 (*R. japonicum*) y 8.0 (*R. meliloti*). La temperatura óptima para crecimiento fue de 28-29°C para *R. japonicum*, mientras que para *R. phaseoli* y *R. meliloti* fue de 30°C. Los aumentos en el aporte de manitol a los medios optimizados no presentó efectos positivos en *R. japonicum* y *R. phaseoli*, mientras que en *R. meliloti* condujo a una mejora en la velocidad de crecimiento hasta el nivel de 15 g/l.

7.4. El estudio de las condiciones de agitación y aireación realizado con R. phaseoli permite concluir que para esta bacteria las mejores condiciones de crecimiento se lograron con 500 rpm y 0.5 vvm de aireación. Bajo estas condiciones de crecimiento, la producción de materia seca bacteriana fue de 4.5 g/l, lo cual implicó una producción por unidad de tiempo de 0.105 g MS/l/h.

7.5. El soporte de bagacillo de caña de azúcar presentó buenas características para ser utilizado como soporte para el transporte de inoculantes comerciales. Las cuentas viables realizadas indicaron que el número de bacterias al variar el tiempo de almacenamiento fue similar a las encontradas en los soportes comerciales usados normalmente en forma extensiva en los inoculantes.

8. BIBLIOGRAFIA.

- (1) Acea, M.J. y M. Alexander. 1988. Survival and growth of bacterial introduced into soil. *Soil. Biol. Biochem.*, 20:509-515.
- (2) Aiba, S., A.E. Humphrey y N.F. Millis. 1973. Requeriments for growth and formulation of medio. *In: Biochemical Engineering. Academic Press (Ed.)*. pp. 27-30.
- (3) Albersheim, P. y A.J. Anderson Prouty. 1975. Carbohydrates, proteins, cell surfaces and the biochesmitry of pathogenesis. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 26:31-52.
- (4) Alexander, M. 1976. The nitrogen cicle. *In: Introduction to Soil Microbiology. J. Wiley and Sons (Ed.)*. pp. 225-332.
- (5) Ames, P. y K. Bergman. 1981. Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.*, 148:728-729.
- (6) Auden, J., J. Gruner, J. Nuesch y F. Knusel. 1967. Some statistical methods in nutrient medium optimalisation. *Path. Microbiol.*, 30:858-866.
- (7) Bahl, N. y K.S. Jauhri. 1987. Spent compost as a carrier for bacterial inoculant production cultivating edible fungi. *In: Developments in crop. Science Publishers (Ed.)*. pp. 63-68.
- (8) Batra, L. y S.K. Ghai. 1988. Performance of different forage legume *Rhizobium* symbiotic systems under saline condition. *Indian. J. Agric. Sci.*, 58:350-353.
- (9) Bergersen, F.J. 1973. Symbiotic nitrogen fixation by legumes. *In: Chemistry and Biochemistry of Herbage. Butler and Bailey (Ed.)*. pp. 189-226.
- (10) Bergersen, F.J. 1961. The growth of *Rhizobium* synthetic media. *Aust. J. Biol. Sci.*, 14:349-360.
- (11) Bisseling, T., R.C. Van Den Bos y Van Kammen. 1986. Host-specific gene expression in legume root nodules. *In: Nitrogen Fixation. W.J. Broughtona Puhler (Ed.)*. pp. 280-312.

- (12) Bohloul, B.B. y E.L. Schmidt. 1974. Lectins: a possible basis for specificity in the Rhizobium-legume root nodule symbiosis. *Science*. 185:269-271.
- (13) Boland, M.J., K.J.F. Farnden y J.G. Robertson. 1980. Ammonia assimilation in nitrogen-fixing legume nodules. In: *Nitrogen Fixation*. W.E. Newton and W.H. Orme-Johnson (Ed.). pp.33-52.
- (14) Box, G. y K.B. Wilson. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. *J. Roy. Stat. Soc.*, B 13:1.
- (15) Brill, J.W. 1975. Regulation of nitrogen fixation. In: *A Treatise on Nitrogen*. Wiley Interscience (Ed.). pp. 764-798.
- (16) Brock, T.D. , D.W Smith y M. T. Madigan. 1987. Clasificación de las bacterias según Bergey. In: *Microbiología*. Prentice Hall (Ed.). pp. 863-867.
- (17) Burton, J.C. 1979. Rhizobium species. In: *Microbial Technology*. Peppler and Perlman (Ed.). pp. 29-55.
- (18) Carlson, R.W. , R.E. Sanders, C. Napoli y P. Albersheim. 1978. Host-symbiont interactions. *Plant. Physiol.*, 62:912-917.
- (19) Catlow, H.Y. , A.R. Glenn y M.J. Dilworth. 1990. Does rhizobial motility affect its ability to colonize along the legume root ? *Soil. Biol. Biochem.*, 22:573-575.
- (20) Cordova, R. , 1985. Evaluación de la turba nacional como soporte para inoculantes de leguminosas con cepas de Rhizobium japonicum. Tesis UNAM. Facultad de Química. 81 p.
- (21) Cubero, J. I. y M. T. Moreno. 1983. Leguminosas de Grano. In: *Mundi Prensa Ed. Madrid, España*. pp. 69-89.
- (22) Choonghyun, K. , R.E. Tully y D.L. Keister. 1989. Exopolysaccharide-deficient mutants of Rhizobium fredii HH 303 which are symbiotically effective. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:1852-1854.
- (23) Dilworth, M.J. 1980. Host and Rhizobium contributions to the physiology of legumes nodules. In: *Nitrogen Fixation*. W.E. Newton and W.H. Orme-Johnson (Ed.). pp. 3-24.
- (24) Dilworth, M.J. and C.A. Appleby . 1979. Leghemoglobin and Rhizobium hemoproteins. In: *A Treatise on Fixation*. Wiley Interscience (Ed.). pp. 691-763.

- (25) Dilworth, M.J. , F. Clark y C.A. Appleby. 1969. Physiology of nodule initiation in the nitrogen fixing. *Biochim. Biophys. Acta* . 184:432.
- (26) Dubois, M. , K.A. Gilles , J.K. Hamilton , P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, 28:350-356.
- (27) Graham, P.H. 1963. Vitamin requirements of root nodule bacteria. *J. Gen. Microbiol.* *J. Gen. Microbiol.*, 30:245-248.
- (28) Graham, P. H., V. M. Morales y R. Cavallo. 1974. Materiales excipientes y adhesibles de posibles usos en la inoculación de leguminosas. *Turrialba*, 24:125.
- (29) Halverson, L. J. y G. Stacey. 1986. Signal exchange in plant-microbe interactions. *Micobiol. Rev.*, 50:193-225.
- (30) Hernández, G.R. 1980. Estudio comparativo de soportes para la elaboración de inoculantes de leguminosas en México. Tesis. UNAM. Facultad de química. 61 p.
- (31) Hoflich, G. , H.J. Wolf y A. Rupprich. 1987. Availability and sterilization of peat as carriers for Rhizobium inoculants. *Z. Mikrobiol.*, 142:581-586.
- (32) Hrabak, E.M. , M.R. Urbano y F.B. Dazzo. 1981. Growth-phase-dependent immuno determinants of Rhizobium trifolii lipopolysaccharide which bind trifolin A, a white clover lectin. *J. Bacteriol.* , 148:697-711.
- (33) Jauhri, K.S. , M. Gupta y K.V. Sadasivan. 1989. Agroindustrial wastes as carriers for bacterial inoculants. *Biol. Wastes.*, 27:81-86.
- (34) Juwarkar, A. , y R.B. Rewari. 1988. Synergistic effect of relative humidity and temperature on the survival of Rhizobium in inoculant carrier. *J. Appl. Bacteriol.*, 64:465-469.
- (35) Kennedy, I.R. 1979. Integration of nitrogenasa in cellular metabolism. In: *A Treatise on Nitrogen Fixation*. Wiley Interscience (Ed.). pp. 653-690.
- (36) Ko, Y. H. y R. Gayde . 1990. Nodule formation in soybeans by exopolysaccharide mutants of Rhizobium fredii USDA 191. *J. Gen. Microbiol.*, 136:105-113.
- (37) Mareckova, H. 1988. Bacteria for nitrogen fixation. In: *Hems R.*(Ed.). *Biotechnology*. pp. 219-232.

- (38) Martínez, V.R. 1986. Ciclo Biológico del Nitrógeno en el Suelo. In: Técnica Científica (Ed.). Cuba. 9-167 p.
- (39) Mora de González, N. , A. Ayunda, M. Gómez y R. González. 1986. Evaluation of some materials as carriers of Rhizobia inoculants. Turrialba, 36:447-452.
- (40) Norris, D.O. y R.A. Date. 1976. Legume bacteriology. In: Tropical Pasture Research Principles and Methods. Shaw y Bryan. Bulletin 51 Commonwealth Bureau of Pasture and Field Crops. C.A.B. (Ed.). pp. 134-173.
- (41) Oaks, A. y B. Hirel. 1985. Nitrogen metabolism in roots. Ann. Rev. Plant. Physiol., 36:345-365.
- (42) Paau, A.S. 1989. Improvement of Rhizobium inoculants. Appl. Environ. Microbiol., 55:862-865.
- (43) Postma, J. , J.A. Van Venn y S. Walter. 1989. Influence of different initial soil moisture contents on the distribution and population dynamics of introduced Rhizobium leguminosarum biovar. trifolii. Soil. Biol. Biochem., 21:437-442.
- (44) Reinsvold, R.J. y P.E. Pope. 1987. Combined effect of nitrogen and phosphorus on nodulation and growth Robinia pseudoacacia. J. Can. Rech. For., 14:964-969.
- (45) Richardson, A.E. , A.P. Henderson , G.S. James y R. Simpson. 1988. Consequences of soil acidity and effects of lime on the nodulation of Trifolium subterraneum L. growing in a acid soil. Soil. Biol. Biochem., 20:439-445.
- (46) Rodríguez-Quinones, F. , Z. Banfalvi , P. Murphy y A. Kondrosi. 1987. Interspecies homology of nodulation genes in Rhizobium. Plant. Mol. Microbiol., 8:61-75.
- (47) Rolz, C. y R. De Leon. 1988. Stress inducing factors of strains of Rhizobium phaseoli as related to inoculant-carrier preparations. Biotechn. Adv., 6:9-27.
- (48) Saint Macary, H. , P. Beunard , D. Montange , J.P. Tranchant y S. Verniau. 1986. Setting and diffusion of a production system for legume Rhizobium inoculants. Sym., 2:363-366.
- (49) Sánchez, F. 1985. Fijación de nitrógeno: bioquímica, biología molecular y perspectivas de la ingeniería genética. In: Prospectiva de la Biotecnología en México. CONACYT México (Ed.). México. pp. 413-433.

- (50) Sargent, L. , S.Z. Huang, B.R. Rolfe y M.A. Djordjevic. 1987. Split-root using Trifolium subterraneum show that Rhizobium infection induces a systemic response that can inhibit nodulation of another invasive Rhizobium strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:1611-1619.
- (51) Soberon-Chávez, G. , R. Nájera , H. Olivera y L. Segovia. 1986. Genetic rearrangements of a Rhizobium phasecol symbiotic plasmid. *J. Bacteriol.*, 167:487-491.
- (52) Somasegaran, P. 1985. Inoculant production with diluted liquid cultures Rhizobium spp. and autoclaved peat: evaluation of diluents, Rhizobium spp., peats, sterility requirements, storage and plant effectiveness. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:398-405.
- (53) Spaink, H.P. , C.A. Wijffelman , E. Pees , R.J.H. Okker y B.J.J. Lugtenberg. 1987. Rhizobium nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature.* 328:337-340.
- (54) Spaink, H. P. , R.J. Okker , C.A. Wijffelman , E. Pees y B.J.J. Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the Rhizobium leguminosarum Sym plasmid pRL1J1. *Plant. Mol. Biol.*, 9:27-39.
- (55) Sprent, J.I. 1989. Which steps are essential for the formation of functional legume nodules?. *New. Phytol.*, 111:129-153.
- (56) Van Breusegen, v. y G. Bastin . 1989. Optimal control of biomass growth in a mixed culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 35:349-355.
- (57) Van Den Bosch, K.A. , N.J. Brewin y E.L. Kannenberg. 1987. Developmental regulation of a Rhizobium cell surface antigen during growth of pea root nodules. *J. Bacteriol.*, 171:4537-4542.
- (58) Van Veen, R.J.M. , R.J.H. Okker , P.J.J. Hooykaas y R.A. Schilperoort. 1986. Plasmid molecular genetics of Rhizobium leguminosarum, Rhizobium trifolii and Rhizobium phasecol. In: Nitrogen Fixation. W.J. Broughton y Puhler (Ed.). pp.224-243.
- (59) Vargas, A.T. y P.H. Graham. 1989. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of Rhizobium beans. *Plant Soil.*, 117:195-200.

- (60) Vincent, J.M. 1980. Factors controlling the legume-Rhizobium symbiosis. In: Nitrogen Fixation. W.E. Newton y H. Orme-Johnson (Ed.). pp. 103-130.
- (61) Vincent, J.M. 1975. Manual práctico de Rhizobiología. In: Hemisferio Sur (Ed.). B. Aires. pp. 1-200.
- (62) Vincent, J.M. 1962. Influence of calcium and magnesium on the growth of Rhizobium. J. Gen. Microbiol., 28:653-663.
- (63) Whitehead, D.C. 1970. The role of nitrogen in grassland productivity. In: Commonwealth Agriculture Bureaux. Bulletin 48. (Ed.). C.A.B. pp.1-14.
- (64) Wittenberg, J.B. 1980. Utilization of leghemoglobin-bound oxygen by Rhizobium bacteroids. In: Nitrogen Fixation. W.E. Newton y H. Orme-Johnson (Ed.). pp. 53-58.
- (65) Yao, P.Y. y J.M. Vincent. 1969. Host specificity in the root hair "curling factor" of Rhizobium spp. Aust. J. Biol. Sci. 22:413-423.