

INOCULANTES PARA SOJA. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA SUPERVIVENCIA DE LOS MICROORGANISMOS¹

ROBERTO GUILLERMO RANDRUP²

RESUMEN - Se estudia en forma comparativa la influencia que ejercen el volumen de impregnación del caldo bacteriano, la composición del líquido de humectación utilizado previo a la impregnación, la granulometría, y el método de esterilización de la turba usada como soporte, sobre la supervivencia y capacidad simbiótica de los microorganismos contenidos en el inoculante. Asimismo se analiza el papel que juega durante el almacenamiento, la luz o el espesor de pared de las bolsas plásticas, en la sobrevivencia de las bacterias.

Termos para indexação: inoculantes para soja.

SOME FACTORS AFFECTING THE SURVIVAL OF STRAIN OF A PEAT CARRIER

ABSTRACT - In this work, the effects of light, thickness of the polyethylene wall of the inoculant bag, inoculum, peat, and others, over the survival of the bacteria in the inoculant are studied.

Index terms: soybean inoculants.

INTRODUCCION

Se acepta casi universalmente que la turba es el material ideal para constituir soportes de inoculantes. Faltaba experimentar sobre los métodos de esterilización de soportes que rindiesen mejores resultados en lo que se refiere a la supervivencia de las bacterias, correlacionando simultaneamente la naturaleza físico-química del soporte y las características de la bolsa que servirá de continente de la turba impregnada.

Se conoce desde hace mucho, la influencia que tiene la conservación de la humedad, en la turba con rizobios; o la temperatura de almacenamiento del inoculante, sobre la disminución de los microorganismos viables (Roughley & Vincent 1967; Van Schreven 1970). Faltaba integrar esos datos con otras variables no consideradas a fondo hasta el presente, tales como el tamaño de la bolsa de inoculante, el volumen de caldo de impregnación usado, la influencia de la composición química del líquido de humectación etc., para esbozar un modelo teórico que trate de explicar el comportamiento experimental de los inoculantes preparados, como también que permita calcular la incidencia que pueda tener cada una de las variables anotadas, en los costos de producción del inoculante.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo

Se utilizó la cepa E-45 de *Rhizobium japonicum*, cedida por la Unidad Simbiosis del INTA (sita en Castelar, Provincia de Buenos Aires).

Obtención de caldos para la impregnación de soportes

A partir del medio sólido (con manitol como fuente de carbono) donde se conservaba la cepa a baja temperatura, se repicaron inóculos de 100 ml, en frascos agitados de medio litro de capacidad. A las 70 horas se sembraron Erlenmeyers de 1000 ml con 1/4 de litro de medio líquido, de los cuales se obtuvo la semilla que servirá para la producción en gran escala del caldo bacteriano.

En la última etapa se utilizó una unidad de fermentación New Brunswick con tanques de fermentación de 7,5 litros de capacidad, llenos hasta la mitad con medio de cultivo, cuya composición, y la de los medios anteriores, así como las condiciones operativas en cada etapa, se presentan en la Tabla 1.

Material empleado como soporte

Se utilizó turba de Tierra del Fuego, obtenida a 15 km de la ciudad de Ushuaia, que tras desecarla, molerla, y neutralizarla con CO₃Ca (impalpable), presentaba la composición y granulometría indicadas en la Tabla 2 y la Fig. 1, respectivamente.

Para algunas experiencias se separó del polvo de turba, aquella fracción que pasase por malla 200 (0,074 mm), o bien se continuó moliendo toda la turba (cuya granulometría original -denominada en este trabajo como "TC"- ya fue dada en la Fig. 1) hasta que el polvo recién molido pudiese también atravesar la malla 200. Se utilizó cada fracción o el conjunto de fracciones (turba "TC"), como

¹ Aceito para publicação em 21 de maio de 1980.

² Dr. em Bioquímica Industrial, Rua Teodoro Baíma 51 Apt.º 92 - CEP 01220, Vila Buarque - São Paulo, SP.

soporte de una población bacteriana, proveniente de un mismo "batch" de fermentación.

Esterilización del soporte

En bolsas de polietileno de 15, 30 u 80 micrones de espesor de pared, se colocaron 150 g (o la cantidad indicada en cada caso) de polvo de turba, ya neutralizada y tamizada, sellándose luego la bolsa por fusión parcial de las paredes en la zona de contacto, con un equipo eléctrico "Poly Sack".

La metodología utilizada en cada uno de los diferentes métodos de esterilización de soportes, y que ya fuera mencionada en un trabajo anterior (Randrup 1979), es la siguiente:

Con vapor húmedo

La turba fue colocada en frascos Pirex de 7 litros de

TABLA 1. Composición de los medios de cultivo utilizados (modificado del medio Lopreto).

Medio pre-inóculo o inóculo	
PO ₄ HK ₂	0,5 g
SO ₄ Mg.7H ₂ O	0,2
CIN	0,05
SO ₄ Mn 10%	2 gotas
Cl ₃ Fe 10%	2 gotas
Cl ₂ Ca 10%	1 gota
NO ₃ K	0,8 g
PO ₄ H (NH ₄) ₂	0,5
Extracto Levadura	1,0 g
Glicerol	10,0 g
Agua c.s.p.	1 litro

Medio de producción:

Al medio anterior se le adicionan 3 g de extracto de Levadura y 0,5% de Tween 80.

Medio sólido de mantenimiento:

Igual al medio inóculo sólo que se reemplaza el glicerol por igual peso de manitol. Se colorea con Rojo Congo 1:400 (10 ml/litro).

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

CONDICIONES OPERATIVAS

Pre-inóculo o inóculo: Erlenmeyers colocados en agitador rotatorio de 2,5 cm de excentricidad, a 250 r.p.m. Cosecha a las 70 horas.

Medio de Producción: Erlenmeyers de 1 litro o Unidad de Fermentación New Brunswick operada a 275 r.p.m. y 0,5 litros de aire/litro de medio x minuto.

En todos los casos la temperatura de desarrollo fue de 30°C, y el volumen de inóculo sembrado, del 10%.

capacidad y tapados con papel de periódico debajo del cual había un "sandwich" de gasa-algodón-gasa, atado alrededor de la boca de cada recipiente. Con ese dispositivo se consigue un buen intercambio gaseoso, con la consiguiente penetración del vapor, al mismo tiempo que se impide la entrada de contaminantes una vez retirado el frasco del autoclave.

Para controlar la transferencia de calor, uno de los frascos poseía, en el seno de la turba, una termocupla calibrada, para indicar la temperatura en ese punto central del frasco, y el tiempo de retención de cada "batch" de esterilización se tomaba a partir del momento en que se alcanzaba ahí una temperatura de 121°C.

Se realizaron también controles periódicos de esterilidad, para lo cual se suspendían 2 g de la turba, en 99 ml

TABLA 2. Turba neutralizada con CO₃Ca utilizada como soporte (Los porcentajes se dan sobre turba desecada a 105°C).

Color	pardo oscuro, heterogéneo
Humedad %	13-15
Capacidad Hídrica % *	72 g
Materia orgánica total %	55-60
Pirógenos a 250°C %	65
Inertes, incluido CO ₃ Ca %	35
Cenizas a 1000 °C %	26
pH (2 g en 100 ml x 1 h)	7,4
Acidez de intercambio	7,7
Toxicidad sobre el rhizobio:	despreciable

*Método de Richards. Determinación realizada en el Laboratorio de Edafología de la Facultad de Agronomía de La Plata.

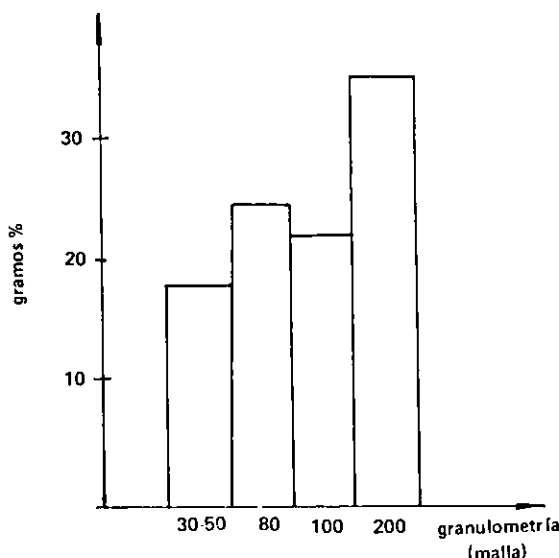


FIG. 1. Histograma granulométrico de la Turba "TC".

de agua con 9% de ClNa, agitando durante una hora, para luego conseguir diluciones crecientes en placas de Petri. A medida que disminuía la probabilidad de encontrar algún microorganismo sobreviviente, se iba incrementando la cantidad de turba a suspender en la solución fisiológica, hasta llegar a los 4 gramos.

Con Oxido de Etileno

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

Turba envasada en bolsitas de polietileno

De 15 micrones de espesor, que contenían 250 g del soporte convenientemente acondicionado (o sea ya molido y neutralizado con CO_3Ca). Se utilizó una cámara con temperatura media de 35°C , que tras cargarse con las bolsitas que se quería esterilizar, se descomprimía hasta una presión de 100 mm de mercurio, llenándose entonces la cámara con una mezcla de Oxido de Etileno y Freón (nueve partes del primero y una parte del segundo) hasta una sobrepresión final de 0,5 atmósferas. Después de un tiempo de retención de una hora, se purgó el aparato, eliminándose los gases utilizados para esterilizar, haciendo vacío nuevamente a 100 mm de mercurio y repitiendo dos veces esta operación. También se esterilizaron bolsas vacías.

A granel

Se trabajó en cilindros de aluminio con baffles, de 40 litros de capacidad, cuidando de no llenarlos con más de la mitad de su volumen con el polvo de turba que se quería esterilizar. La operación es muy similar en cuanto a condiciones operativas, que lo dicho para el caso anterior, recomendándose aquí también una concentración de Oxido de Etileno de 500-900 mg/ml como la más efectiva. Tal vez la única diferencia resida en que aquí el sistema se mantuvo en agitación sobre rodillo, durante cinco horas, a 25°C .

Con radiaciones gamma

Se utilizaron bolsas de 80 micrones de espesor, que contenían 100 g de turba cada una. También se agregaron algunos paquetes de bolsas vacías, de 80 micrones de espesor, para servir posteriormente como continente de turbas esterilizadas por otros procedimientos.

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

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

Sin esterilizar

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

Preparación de los inoculantes

Los soportes neutralizados y esterilizados por la técnica que se indica en cada caso, fueron homogéneamente impregnados con un cultivo puro de *Rhizobium japonicum* de concentración superior a 10^{10} células/ml, hasta alcanzar un contenido final de humedad del 40% (a menos que se indique otra cosa), en algunos casos mojando previamente el soporte con medio de cultivo estéril, en otros con solución fisiológica estéril, y en otros, por fin, con agua también estéril, en todos los casos, hasta una humedad final del 15-18%, para evitar que el calor de mojado pueda afectar la población bacteriana del caldo que se colocaría enseguida.

En la impregnación se utilizó una jeringa estéril de 40 ml (con aguja n.º 8) para introducir el caldo en las bolsas ya selladas, procediéndose luego a cubrir el agujerito dejado por la aguja en la bolsa, con cinta plástica adhesiva.

Algunas bolsas de inoculante fueron envueltas con papel opaco para evitar la incidencia de luz sobre la turba impregnada. A otras se les colocó una bolsa plástica (opaca o no) sobre la ya existente, para verificar que los efectos atribuidos a la falta de luz no se debiesen a una mejor retención de la humedad, a causa de la doble envoltura.

Las bolsas de inoculantes mencionadas en este trabajo, se almacenaron en una cámara de temperatura termostaticada a 30°C , tratando de que queden uniformemente distribuidas, cercanas a dos tubos fluorescentes de 40 W cada uno, a unos dos metros de distancia de ellos.

Determinaciones en los inoculantes preparados

El pH de las turbas se obtuvo al colocar 2 g de la muestra en un Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 100 ml de agua destilada (o de solución fisiológica al 8% cuando se quiso determinar la acidez de intercambio), agitando en un "shaker" rotatorio por una hora. Luego se determinó el pH de la suspensión con un aparato Metrohm E396 B (calibrado con buffer fosfato de pH 6,6).

La determinación del número de bacterias viables se realizó cada 30 días aproximadamente, a partir del quinto al séptimo día de almacenamiento, por recuento en cajas de Petri. Para ello se colocaron 2 g del inoculante en un frasco cónico de 300 ml con 99 ml de solución fisiológica al 9%, llevándose a un agitador rotatorio durante una hora. Cada dilución se plaqueaba por triplicado, expresándose cada resultado de los recuentos como el promedio aritmético de tres cajas de Petri (a menos que alguno de los recuentos difiriese en más de un 50% de los otros, en cuyo caso no se lo consideraba).

La humedad se obtuvo por diferencia de pesada a 105°C , durante unas diez horas (peso constante).

Todos los valores consignados en este trabajo (que provengan de variables que se suponía afectarían los recuentos de rizobios en las turbas) fueron expresados como el promedio aritmético de por lo menos 3 bolsas de inoculante (en total se consideraron cerca de sesenta bolsas).

Para el caso particular de turbas impregnadas con volúmenes muy pequeños, o muy grandes, de caldo bacteriano, era muy difícil conseguir una buena homogeneidad en el material, porque la turba absorbía localmente el caldo en el punto de aplicación (cuando se había usado poco caldo), impidiendo así una correcta humectación del soporte y distribución de los rizobios, o porque el exceso de líquido no era absorbido por la turba (cuando se había utilizado mucho caldo) y entonces este exceso estorbaba en las determinaciones cuyos resultados debían atribuirse exclusivamente al soporte impregnado, tales como su contenido de "humedad" tras la impregnación, o el número de microorganismos presentes por unidad de peso del inoculante.

Para obviar esos problemas, se optó (sólo en esos casos particulares, tal como se menciona en la Fig 8) por calcular el número inicial de microorganismos y de humedad inicial por gramo de inoculante impregnado, pues se conocían la masa de turba a impregnar y su contenido de humedad pre-impregnación, así como el volumen y la concentración celular en el caldo de impregnación utilizado.

Así por ejemplo, si se gastaron 10 ml (de un caldo que

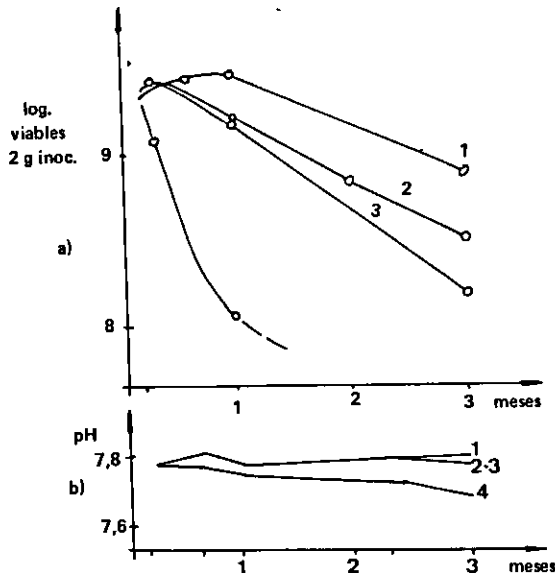


FIG. 2. Influencia de la naturaleza del líquido de humectación:
1. Se humectó con medio de cultivo. 2. Se humectó con agua. 3. Se humectó con solución fisiológica. 4. Idem 1., turba no esterilizada.

Bolsas de 15 micrones, con turba "TC", almacenadas con luz y a 30°C.

contenía 2×10^{10} microorganismos/ml), para impregnar 90 g de turba (que ya tenía una humedad preajustada al 15%), podríamos calcular (suponiendo una perfecta distribución de ese caldo) que cada 2 g de la turba entrarán en contacto con 0,22 ml de caldo, o sea, que albergarán una población de $4,4 \times 10^9$ microorganismos/2 g de turba inoculada.

Igualmente, si suponemos una perfecta distribución de los 10 ml del caldo de impregnación, la humedad total va a ser cercana al 23% (que corresponderían a unos 9-10 g de "humedad" agregada ahora, más 13-14 g de "humedad" ya existente en los 90 g de turba considerada).

De cualquier forma, el cálculo mencionado sólo se utilizó cuando fue imprescindible, y al comenzar la experiencia, prefiriéndose para los meses posteriores (en que el exceso de líquido se había evaporado, o el pequeño volumen de impregnación había difundido mejor), realizar determinaciones directas en varios puntos de cada bolsa, promediando luego esos valores (que ya no diferían mucho entre sí).

Ensayos agronómicos

Se evaluó la capacidad de nodulación de las bacterias en los inoculantes preparados, utilizando como huésped, plantas de soja de la variedad Lee-68, cultivadas en cámara climatizada (Randrup 1979). (En las Fig. 2 a 8 se consignan los ensayos realizados).

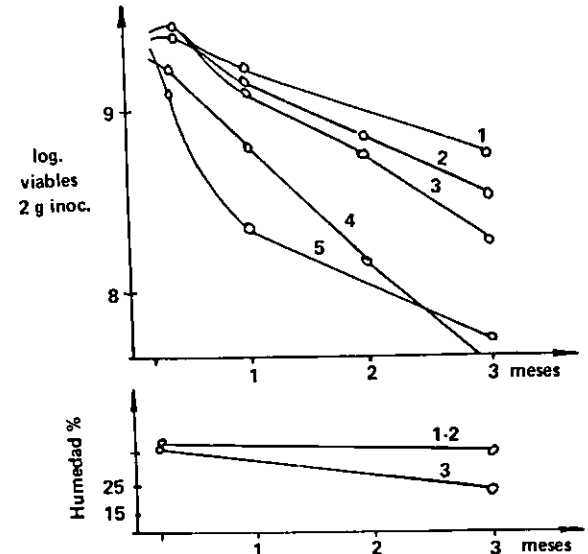


FIG. 3. Influencia del tiempo de retención al esterilizar con vapor. Comparación con otros métodos de esterilización:
1. Vapor a 121°C x 3 hs. 2. Vapor a 121°C x 2 hs. 3. Rayos gamma. 4. Óxido de etileno. 5. Soporte sin esterilizar.

Bolsas de 15 micrones, con turba "TC", almacenadas con luz y a 30°C.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Fig. 2 se estudió lo que sucede al reemplazar el agua de humectación pre-impregnación,

por un medio de cultivo diluido 1:2, o por solución fisiológica, siempre trabajando sobre turba esterilizada durante 2 horas, al vapor. Se observa que después del primer mes las turbas humectadas con

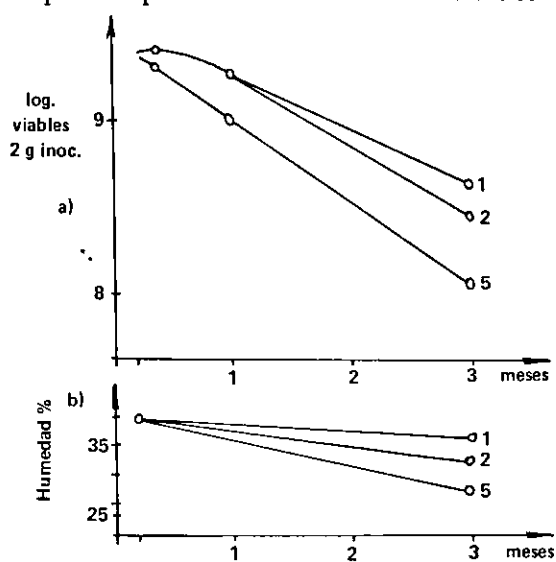
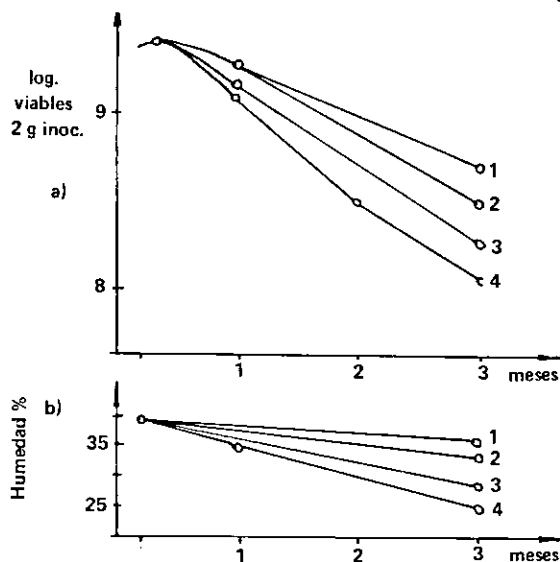


FIG. 4 e 5. Influencia de la granulometría del soporte y el espesor de la bolsa:

1. Turba "malla 200 de TC" en bolsas de 80 μ . 2. Turba "TC" en bolsas de 80 μ . 3. Turba "TC" en bolsas de 30 μ . 4. Turba "TC" en bolsas de 15 μ . 5. Turba "malla 200" (que tiene mas áridos) en bolsas de 80 μ .

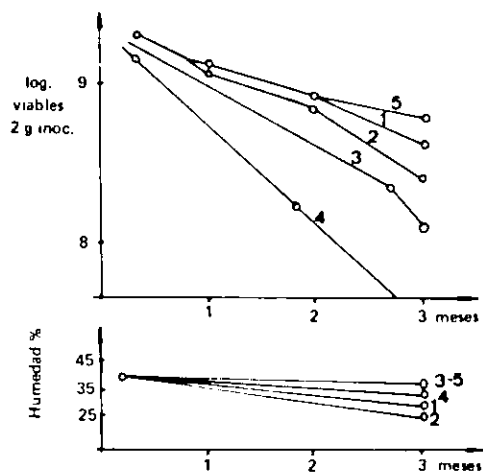


FIG. 6. Influencia de la luz durante el almacenamiento:

1. Soporte estéril con rayos gamma. Oscuridad con bolsa de papel.
 2. Idem pero sin recubrir con el papel opaco.
 3. Soporte estéril con Oxido de Etileno. Oscuridad con plástico.
 4. Idem sin recubrir.
 5. Idem 1. pero oscuridad con bolsa de plástico opaco de 20 μ .

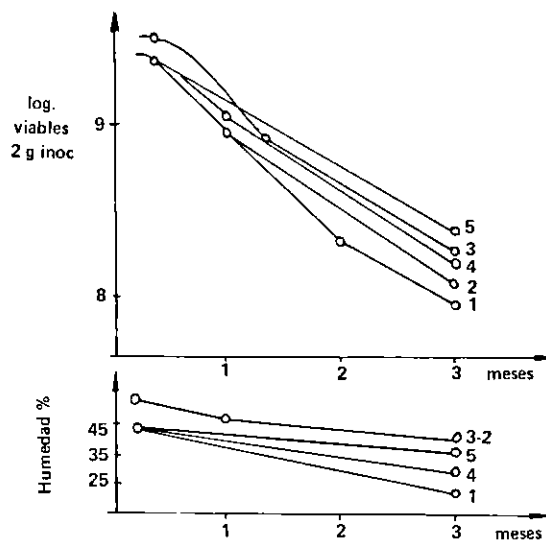


FIG. 7. Influencia del volumen de la bolsa:

1. Bolsa con 100 g de turba.
 2. Idem, con 10% mayor humectación.
 3. Idem 1., con 10% mayor impregnación.
 4. Bolsa de 150 g de turba.
 5. Bolsa con 250 g de turba.

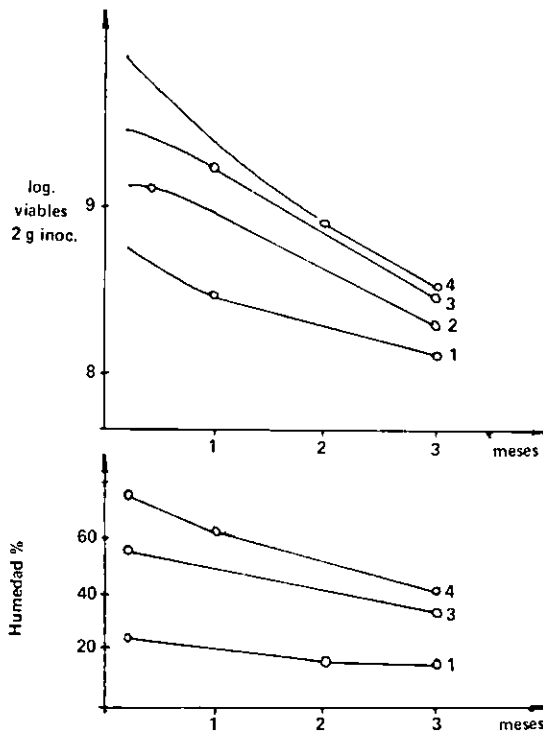


FIG. 8. Influencia del volumen de impregnación: Bolsas de 15 μ de plástico transparente, con 150 g de turba, con humedad pre-impregnación del 15%. Soporte esterilizado por vapor.

1. Volumen de impregnación del 10%.
2. Volumen de impregnación del 20%.
3. Volumen de impregnación del 40%.
4. Volumen de impregnación del 60%.

(* Valores iniciales estimados, pues no existe homogeneidad en el material).

solución fisiológica comenzaron a dar valores de recuento de bacterias más bajos que el testigo, con agua como humectante. En cambio, la utilización de medio de cultivo como reemplazante del agua que es de práctica usar, significó un incremento en la sobrevivencia de los rhizobios, pudiéndose notar además que la población microbiana continuó incrementándose aún mucho después de comenzar el almacenamiento de las bolsas de inoculante.

Tal vez la única desventaja de haber humectado la turba con caldo de cultivo, es que exige condiciones de esterilidad absolutas, tanto del soporte como del propio medio de humectación, pues por ser el *Rhizobium japonicum* un microorganismo de crecimiento lento, cualquier contaminante podrá adueñarse rápidamente de los nutrientes disponi-

bles, aniquilando luego al huésped original. La mejor prueba de ello aparece al enfrentar un caldo de rhizobios puro, con una turba sin esterilizar, humectada con medio de cultivo (Fig. 2). A los 30 días, la mortandad entre los rhizobios es tan grande y el desarrollo de los contaminantes tan notable, que no pueden ser ya detectados en los recuentos en placa, para las diluciones usuales.

Analizando la evolución del pH (parte (b) de la Fig. 2), nótese que solamente ocurrirá un cambio importante en el mismo cuando se esté ante una contaminación muy seria, en cuyo caso el inoculante ya ha perdido valor comercial. Por ello se aconseja no seguir la evolución de este parámetro como elemento para determinar el grado de envejecimiento de un inoculante. Si se hubiese medido la acidez de intercambio, los resultados hubieran sido aún más difíciles de interpretar, debido a que este valor está condicionado por la cantidad de arcillas, proteínas u otros coloides que pudieran existir. Además, la constancia en el valor del pH o de acidez, que hacen de estas determinaciones que sean ineficientes como indicadores de los cambios bioquímicos que pudieran estar ocurriendo en el material, se debe a la gran cantidad de buffers que existen tanto en el medio de impregnación como en el propio soporte.

Con el fin de completar experiencias anteriores (Randrup 1979), en la Fig. 3 se comparan diferentes métodos de esterilización del soporte. Nótese en particular el buen desempeño de los rayos gamma o del vapor de agua como agentes esterilizantes. Obsérvese también que un calentamiento prolongado del material turboso repercute luego en una mejor supervivencia de los microorganismos. Es muy probable que mediante el vapor sobrecalentado se hayan extraído o eliminado algunos componentes de la turba que actuaban como inhibidores del desarrollo bacteriano.

El comportamiento deficiente del Oxido de Etileno como agente de esterilización, se podría explicar suponiendo que no hubo una completa eliminación de este gas previo a la impregnación, así que el Oxido de Etileno adsorbido se encargaría de diezmar la población bacteriana a tal punto que a partir de los dos meses de almacenamiento de esos inoculantes, ya se obtienen recuentos más bajos que los observados en turbas no esterilizadas.

En la Fig. 4 se observa la influencia del espesor de pared de la bolsa que contiene el inoculante. Para la granulometría mencionada en la Fig. 1, la sobrevida de los microorganismos es mayor a medida que aumenta el espesor de la bolsa, evidentemente porque la pared gruesa evita la desecación temprana del material (parte (b) de la Fig. 4). Cuando se continuó moliendo la turba "TC" hasta que pasase una malla 200, para luego impregnarla, se obtuvo aún una mayor sobrevida de las bacterias durante el almacenamiento subsiguiente. Es muy interesante hacer notar la pequeña diferencia de valores de supervivencia entre la turba "malla 200" y aquella granulométricamente más heterogénea (turba "TC"). Esto nos lleva a preguntarnos si el mayor costo de molienda de la turba hasta hacerla atravesar una malla 200, se justifica frente a un material de molido un poco más grosero pero de comportamiento equivalente en lo que hace a sobrevida de las bacterias soportadas. (Anteriormente se analizó la dificultad de recubrir los poros durante la inoculación de los mismos, en el caso de usar turba más gruesa) (Randrup 1979).

En la Fig. 5 se compara la efectividad de la turba de granulometría "TC" frente a una fracción de la misma (denominada "malla 200"), o frente al producto de la molienda integral de la turba "TC" hasta que pase malla 200 ("malla 200 de TC").

Se observa que para una granulometría dada, una fracción granulométrica de la turba no se comporta igual que la turba tomada en conjunto. Al analizar cada muestra granulométrica por separado (Randrup 1979), se vió que la fracción "malla 200" era más rica en arenilla, arcilla o polvo de carbonato de calcio agregado como neutralizante, que el resto de las otras fracciones, donde a su vez existía heterogeneidad en lo que hace a la composición de fragmentos vegetales provenientes de los musgos primitivos que la originaron.

Evidentemente esta mayor proporción de inertes en una de las fracciones, es responsable de la menor capacidad para retener la humedad (parte (b) de la Fig. 5) o del comportamiento tan deficiente como soporte de las bacterias. Estos resultados indicarían la conveniencia de tamizar la turba previo a su empleo, separando aquellas fracciones que se sabe influyen negativamente sobre la longevidad de las bacterias, moliendo luego lo mejor po-

sible las fracciones restantes. El grado de molienda final que tendrá el soporte, dependerá de la naturaleza de la turba utilizada y la molienda será tanto mayor cuanto menor sea la capacidad hídrica o la superficie específica que presente el material. Se elegirá para soportar a los microorganismos, aquel grado de molienda que exija menos potencia mecánica o trabajo para obtenerlo, pero que no dificulte la inoculación de semillas y que permita mantener un número de viables (a un tiempo dado), por encima de los padrones internacionales.

Completando experiencias anteriores, en la Fig. 6 se resume la influencia que tiene la luz proveniente de tubos fluorescentes, sobre la supervivencia del rhizobio.

La disminución de viables fue poco notoria cuando el soporte se había esterilizado mediante radiaciones, pero fue mucho mayor cuando se utilizó el Oxido de Etileno como esterilizante (Randrup 1979). Nótese que la acción de recubrir las bolsas implica colocar otra barrera física contra la evaporación de la humedad de las turbas. Nótese también que la desecación fue menor cuando se utilizaron bolsas plásticas opacas que cuando se usaron bolsas de papel como recubrimiento contra la luz. De cualquier forma, la mayor sobrevida de las bacterias en las bolsas de inoculante protegidas, no se puede explicar exclusivamente por una menor pérdida de humedad, debiendo entonces reconocerse la influencia nefasta de la luz, en especial cuando el material de soporte haya sido esterilizado por Oxido de Etileno. Es probable que el mayor costo de utilizar bolsas opacas, pueda obviarse cuando el soporte haya sido esterilizado con radiaciones gamma o mediante el vapor sobrecalentado, pues la mortandad en esas bolsas iluminadas no fue tan grande, tal como se desprende del análisis de la Fig. 6.

Una variable que influye en la velocidad de pérdida de agua por evaporación, y que nunca se considera como influyente sobre los valores finales de recuento bacteriano, es el volumen de la bolsa que contenga al inoculante. En la Fig. 7 se nota que a medida que aumenta ese volumen, concomitantemente aumentan la retención de humedad y la supervivencia, evidentemente porque se está disminuyendo la superficie específica al aumentar el volumen de la bolsa, retardándose la eva-

poración por ser éste un fenómeno de superficie.

Llegados a este punto, se dispone de otro elemento de juicio para comparar los distintos métodos de esterilización de soportes. Por causa de la baja penetración que presentan los rayos gamma en la turba pulverizada, se aconseja envasar ésta en bolsas con no más de 100 g, para garantizar la esterilidad de las zonas más alejadas de las paredes, por donde penetra la radiación. Así, resulta que esta cota en el volumen máximo admisible para las dosis de radiación usadas comúnmente, repercutirá a largo plazo como una tendencia a perder humedad más fácilmente que otras bolsas de mayor volumen y de igual espesor de pared, esterilizadas por otro método.

En la Fig. 7, se ve que la pérdida prematura de humedad que ocurre en las bolsas de volumen menor, se puede paliar en parte, aumentando el volumen del caldo de impregnación o el volumen de líquido de humectación utilizado previo a la impregnación; en otras palabras, asegurándose que el inoculante tenga un valor de humedad más alto que lo que es de práctica usar. La decisión de usar una u otra técnica para elevar el contenido final de humedad en las turbas, dependerá de la naturaleza físico-química del soporte y de la concentración bacteriana en los caldos utilizados para la impregnación. Para caldos de alta concentración celular, un simple análisis económico demuestra que es mucho más conveniente aumentar la humedad antes de impregnar, que gastar más caldo de impregnación para incrementar la humedad en las turbas.

En la Fig. 8 se analiza con mayor detenimiento la forma como influye el volumen de impregnación sobre la supervivencia de los microorganismos soportados sobre turba. Se observa que a medida que aumenta este volumen, aumenta la población bacteriana inicial, expresada por unidad de peso de inoculante, pero que a períodos medianamente largos de almacenamiento a 30°C, se tiende a un valor único si efectivamente el volumen de impregnación no estuvo por debajo del 20-30%.

El "volumen óptimo de impregnación" estará condicionado por unos pocos parámetros característicos del soporte (además de la concentración bacteriana en el caldo): la capacidad hídrica y la superficie específica de las partículas, por un lado; y el carácter hidrofóbico, así como la constitución

química superficial de esas partículas, por el otro.

Cuando el volumen de impregnación es bajo, existe el problema de conseguir un buen contacto entre el caldo y el soporte, ya que para las turbas analizadas siempre hubo dificultad inicial a mojar-se, probablemente debido al carácter hidrofóbico de sus constituyentes (alquitranes o cualquier otro producto de la degradación anaeróbica en primera biogénesis del material turboso). Esta dificultad en el mojado del soporte estaría compensada en parte por su riqueza en poros o microgrietas (v.g. por el valor de su superficie específica) que por efecto capilar absorberían cualquier fluido presente. Una vez absorbido el caldo bacteriano, las células estarían en contacto más íntimo con las paredes de los poros o grietas del soporte, así que la supervivencia en este habitat dependería principalmente de la constitución química de la turba en su superficie, esto es, de la existencia o no de nutrientes potenciales o de sustancias que puedan inhibir el crecimiento celular.

El problema de los volúmenes de impregnación pequeños, es que exigirían una concentración bacteriana muy alta (no siempre fácil de alcanzar) para obtener un número de células viables/g de inoculante, que caiga dentro de los valores exigidos internacionalmente (Hamatova & Vintikova 1963; Roughley & Vincent 1967); (en Argentina no existe legislación oficial al respecto).

Cuando el volumen de líquido total agregado (de humectación y de impregnación) sobrepasa la capacidad hídrica del material, quedará un inoculante con aspecto de "papilla" que constituye un sistema bifásico permanente, formado por turba saturada y por caldo bacteriano libre, en el que la longevidad de la población de rizobios no soportados, queda representada por una curva de decaimiento logarítmico, que ya fuera determinada a nivel de Erlenmeyer (durante tres semanas), en un trabajo anterior (Randrup 1979).

El superávit en la supervivencia de las bacterias, para el caso de turbas impregnadas con gran cantidad de caldo, se explicaría mediante la mayor retención de humedad que ocurre en estos casos (el interior de la partícula de soporte al estar saturado, actúa como un depósito de humedad en la superficie) y posiblemente por el menor contacto entre las bacterias y el soporte, cuando éste con-

tenga sustancias que puedan afectar negativamente la supervivencia.

En los ensayos realizados en Cámara Climatizada con los principales lotes de inoculantes estudiados, no se observó pérdida de la capacidad simbiótica de los microorganismos, ni alteraciones en el desarrollo vegetal, independientemente del método utilizado para la esterilización de soportes, o de otras variables introducidas.

CONCLUSIONES

1. En el caso de utilizar vapor sobrecalentado como agente de esterilización, se aconseja un calentamiento excesivo para eliminar alquitranes o pirógenos de las turbas.

2. Es conveniente tamizar groseramente la turba desecada, en bruto, eliminando la fracción más rica en áridos, para proceder a la molienda del material remanente. No sería necesario que la totalidad del polvo de turba pasase "malla 200"; basta con que exista una fracción significativa con esa granulometría.

3. Una vez acondicionada y esterilizada, convendría humectar el soporte con un medio nutritivo, para luego impregnar abundantemente, cuidando de que no se llegue a formar una papilla, pues se derrocharía caldo.

4. Es preferible envasar el inoculante en bolsas de mayor volumen pues se pierde menos humedad durante el almacenamiento y se lo protege mejor de la luz, disminuyendo además los costos de empaque por kilo de producto terminado.

5. Para no recargar costos, se debe evitar un sobredimensionamiento del espesor de pared de las bolsas plásticas, adecuándolo al tiempo útil que se le exija al inoculante.

6. Se hace notar el déficit de conocimientos que se tiene actualmente sobre las propiedades físico-químicas de las turbas de origen nacional, elemento fundamental para ajustar la metodología a aplicar.

REFERENCIAS

- HAMATOVA, E. & VINTIKOVA, H. The production of legume inoculant Nitrazon in C.S.S.R. (Czechoslovakia) and its cheking. *Inst. Sci. Tech. Inf., Prague*, 12: 265-80, 1963.
- RANDRUP, R.G. Obtención de inoculantes para leguminosas: estudios de soportes constituidos fundamentalmente a base de turba. Biblioteca de la Facultad de Ciencias Exactas de La Plata, 1979. Tesis.
- ROUGHLEY, R. & VINCENT, J.M. Growth and survival of *Rhizobium* spp. in peat culture. *J. Appl. Bact.*, 30 (2): 362-76, 1967.
- VAN SCHREVEN, D.A. Some factors affecting growth and survival of *Rhizobium* spp. in soil-peat cultures. *Plant and Soil*, 32: 113-30, 1970.