

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Producción de biomasa de Rhizobium en un sistema de fermentación por
lote con agitación - Ayacucho 2008**

**Tesis para optar el título profesional de Bióloga,
Especialidad: Microbiología**

Presentado por:

Bach. Cynthia Carol Madueño Madueño

Asesor:

Blgo. Fidel Rodolfo Mujica Lengua

Ayacucho - Perú

2009

A mi madre:

Ana María, con ferviente y profundo cariño, por su inagotable sacrificio a lo largo de mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Mater: La Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, porque en su seno mi mente despertó a la vida, con cariño y amor eterno a la institución.

A la Dra. Nery L. Santillana Villanueva, por su ayuda incondicional.

Al Mg. Fidel R. Mujica Lengua, por la orientación y colaboración desinteresada, en la culminación del trabajo de investigación.

A mis hermanas Karen y Sthefany, por su apoyo y comprensión.

A Wilfredo Lizana, por su apoyo incondicional y por ser el pilar de mis aspiraciones.

A todas aquellas personas que apoyaron y colaboraron de alguna manera en la culminación de la investigación.

Producción de biomasa de *Rhizobium* en un sistema de fermentación por lote con agitación- Ayacucho.

Autora: Bach. Cynthia Carol Madueño Madueño.

Asesora externa: Dra. Nery L. Santillana Villanueva.

Asesor interno: Mg. Fidel R. Mujica Lengua.

RESUMEN

En la presente investigación se planteó como objetivo principal incrementar la carga microbiana de *Rhizobium* en un sistema de fermentación por lote, con el carbohidrato más apropiado y con agitación magnética, el cual fue realizado en el laboratorio de Rhizobiología del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNSC, a 2750 m.s.n.m. El tipo de investigación fue experimental-aplicativo.

Para la determinación de la carga microbiana de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (Cepa1), *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Cepa2), *Rhizobium meliloti* (Cepa3), generadas en tres fuentes de carbono (manitol, sacarosa y glicerol) y producidos en agitación magnética y manual, se utilizó las técnicas de recuento de células viables en placas de petri con medio LMA (Agar Extracto de Levadura y Manitol), y de cultivo de Miles y Misra descrito por Vincent (1975).

Se empleó el diseño completamente al azar con 2 repeticiones por tratamiento y se determinó el análisis de varianza para cada criterio de evaluación contrastando con la prueba de Duncan (0.05).

La agitación magnética permitió obtener mayor carga microbiana para las cepas 1, 2, y 3 cargas de 84×10^7 UFC/mL, 83×10^7 UFC/mL, 83×10^7 UFC/mL respectivamente, en comparación de la carga obtenida con agitación manual que fue de 78×10^7 UFC/mL, 77×10^7 UFC/mL 78×10^7 UFC/mL, resultado que tiene significancia estadística.

Con el uso del manitol como fuente de carbono se obtuvo mayor carga microbiana para las cepas 1, 2, 3 que fue de: 86×10^7 UFC/mL, 84×10^7 UFC/mL, 82×10^7 UFC/mL, respectivamente en comparación con los otros azúcares.

Palabras claves: *Rhizobium*, biomasa, fermentación por lote

ABSTRACT

In the present investigation the thought about as main objective to increase the microbial load of *Rhizobium* in a system of fermentation for lot, with the most appropriate carbohydrate and with magnetic agitation, which was carried out in the laboratory of Rhizobiología of the Program of Investigation in Grasses and Cattle raising of the Ability of Sciences Agrarian-UNSCH, to 2750 m.s.n.m.

For the determination of the microbial load of the stumps of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (Cepa1), *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Cepa2), *Rhizobium meliloti* (Cepa 3), generated in three sources of carbon (manitol, sucrose and glicerol) and taken place in magnetic and manual agitation, it was used the techniques of recount of viable cells in badges of Petri with half LMA (Agar Extract of Yeast and Manitol), and of cultivation of Thousands and Misra described by Vincent (1975).

The design was used totally at random with 2 repetitions by treatment and the variance analysis was determined for each evaluation approach contrasting with the Test of Duncan (0.05).

The magnetic agitation allowed to obtain bigger microbial load for the stumps 1, 2, and 3 of 84×10^7 UFC/mL, 83×10^7 UFC/mL, 83×10^7 UFC/mL respectively, in comparison of the load obtained with manual agitation that was of 78×10^7 UFC/mL, 77×10^7 UFC/mL, 78×10^7 UFC/mL, result that he/she has statistical significance.

With the use of the manitol like source of carbon was obtained bigger microbial load for the stumps 1, 2, 3 that it was of: 86×10^7 UFC/ml, 84×10^7 UFC/mL, 82×10^7 UFC/mL, respectively in comparison with the other sugars.

key Words: Rhizobium, biomass, batch fermentation.

ÍNDICE

RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Rizobios	3
2.2. Metabolismo del carbono	5
2.3. Metabolismo del nitrógeno	6
2.4. Requerimiento de vitaminas	7
2.5. Fijación biológica de nitrógeno	7
2.6. Inoculantes y control de calidad	10
2.7. Crecimiento de poblaciones	13
2.8. Multiplicación de rizobios en medio líquido	14
2.9. Tecnología de fermentaciones	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Ubicación del ensayo	19
3.2. Materiales	19
3.3. Metodología	19
3.3.1. Optimización de parámetros	19
3.4. Métodos	20
3.4.1. Mantenimiento, reactivación y pruebas de pureza de las cepas	20
3.4.2. Preparación del Pre-inóculo	20
3.4.3. Formulación de los medios de cultivo	20
3.4.4. Inoculación	20
3.4.5. Determinación de la carga microbiana de rizobio	21
3.5. Análisis estadístico	23
IV. RESULTADOS	24
V. DISCUSIÓN	39
VI. CONCLUSIONES	43
VII. RECOMENDACIONES	44
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS	

I. INTRODUCCIÓN

La multiplicación de las bacterias del género *Rhizobium* en medio líquido es uno de los factores que debe ser considerado en la producción de inoculantes. Por ello se realizan muchas investigaciones sobre la cinética de crecimiento de estas bacterias. Actualmente las industrias de inoculantes tienden a introducir las más rigurosas técnicas que permitan obtener altas densidades y alta productividad con uso de biorreactores. El laboratorio de Rhizobiología del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, produce inoculantes desde hace 40 años y cuenta con una metodología de producción de inoculantes, que urge actualizar acorde a las normas vigentes optimizando algunas variables como la multiplicación y la sobrevivencia de las cepas de rizobios en medio líquido y en soporte. La biomasa es producida en caldo extracto de levadura y manitol (LMC) en balones de vidrio de 2 litros con un litro de medio, el cual es agitado manualmente una o dos veces al día lo que causa la sedimentación de los nutrientes requeridos por los rizobios. Esto se presenta como un problema por limitar a la bacteria de los nutrientes que se encuentran sedimentados. Para mejorar la calidad de biomasa se realizó el diseño de un agitador magnético que mantuvo en agitación constante la fermentación de tipo batch, el cual permitió mantener en suspensión los nutrientes necesarios para dichas bacterias en un ambiente adaptado con temperatura adecuada para el crecimiento óptimo de los rizobios, probándose el

crecimiento de la biomasa con diferentes fuentes de carbono (glicerol, manitol y sacarosa) (Balatti ,1992). Dentro de este contexto, se establecieron los siguientes objetivos:

- Incrementar la densidad de biomasa de cepas de *Rhizobium* en un sistema de fermentación por lote con el carbohidrato más apropiado y agitación constante.
- Seleccionar la fuente de carbono (manitol, glicerol o sacarosa) más apropiada para las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* y *Rhizobium meliloti*.
- Determinar el efecto de la agitación constante en la producción de biomasa de cepas de *Rhizobium*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. RIZOBIOS

2.1.1. Características generales

Los rizobios son bacterias Gram-negativas de forma bacilar (0,5 – 0,9 x 1,2-3,0 μm). Su temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 25 y 30°C, y el pH óptimo entre 6 y 7. Son bacterias aerobias. Todas las cepas producen abundante polisacárido extracelular soluble en agua cuando crecen en medios de carbohidratos como fuente de carbono (Jordan, 1984).

Tienen la capacidad de invadir los pelos radiculares de plantas leguminosas e inducir la formación de nódulos radiculares donde se desarrollan como simbiontes intracelulares. Las bacterias dentro de estos nódulos presentan formas pleomórficas y reciben el nombre de bacteroides, en estas condiciones fijan nitrógeno atmosférico y lo transforman a amonio utilizable por la planta hospedera (Jordan, 1984).

2.1.2. Taxonomía

Los rizobios incluyen a todas aquellas bacterias de la familia Rhizobiaceae que tienen la capacidad de inducir la formación de nódulos en plantas leguminosas. La taxonomía de estas bacterias se basó inicialmente en el rango de hospederos en los cuales podrían nodular. Sin embargo, este sistema de clasificación fue abandonada luego de que se reportaron muchas incongruencias y al demostrarse que los genes para la nodulación, especificidad por el hospedero y

la fijación de nitrógeno están localizados en plásmidos transmisibles. En las especies de rizobios de crecimiento rápido, en base al análisis de características fenotípicas, simbióticas, morfológicas fisiológicas y genotípicas (hibridación de ácidos nucleicos, secuenciamiento de genes, etc.), actualmente están reconocidos cuatro géneros de rizobios: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, y *Sinorhizobium* (Jordan, 1984; Graham y col., 1991; Holt y col., 1994; Lindström y col., 1995).

El género *Rhizobium* incluye las siguientes especies: *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. *R. leguminosarum* bv. *viceae*. *R. loti*, *R. galegae*, *R. tropici*, *R. huakii* y *R. etki*. En este género están incluidos los simbiontes de varias especies importantes de leguminosas.

Sawada y col., 2003, menciona que la clasificación de esta bacteria es la siguiente:

Dominio : Bacteria

Clase : Proteobacteria alfa

Orden : Rhizobiales

Familia : Rhizobiaceae

Género : *Rhizobium*

Especie tipo : *Rhizobium leguminosarum*

Especies : *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. meliloti*, *R. lupini* etc.

El género *Bradyrhizobium* incluye a los rizobios de crecimiento lento, solo están reconocidas dos especies: *B. japonicum* y *B. elkanii*, ambas capaces de nodular en *Glycine* (soya) (Graham y col., 1991). Adicionalmente este género incluye un gran número de cepas conocidas colectivamente como *Bradyrhizobium spp*, que nodulan muchas leguminosas tropicales incluyendo algunas de importancia agronómica como el pallar (*Phaseolus lunatus*), el caupí o frijol castilla (*Vigna unguiculata*), el maní (*Arachis hypogaea*) (Thies and Singleton, 1991).

El género *Azorhizobium* incluye sólo una especie *Acaulinodans*. Las cepas de esta especie tienen la capacidad de introducir la formación de nódulos en los tallos de la leguminosa *Sesbania rostrata* (Graham y col., 1991).

Las especies *Sinorhizobium fredii* y *S. xinjiangensis* fueron propuestas para agrupar los rizobios de crecimiento rápido capaces de nodular en *Glycine* (soya). Posteriormente se han descrito dos nuevas especies: *S. saheli* y *S. teranga*, simbioses de la leguminosa arbórea *Acacia* (Lindström y col., 1995).

La especie *Rhizobium meliloti*, simbiote de las leguminosas forrajeras *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*, ha sido renombrada como *Sinorhizobium meliloti* en base a varias investigaciones que han revelado sus estrechas relaciones taxonómicas con los miembros del género *Sinorhizobium* (Lindström y col., 1995).

2.2. METABOLISMO DEL CARBONO

Los rizobios son quimioorganótrofos. La principal vía degradativa de carbohidratos es la de Entner-Doudoroff (Jordan, 1984). Se ha descrito la presencia de la enzima de la vía Embden-Meyerhof-Parnas en cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Mulongoy y Elkan, 1997; Jordan, 1984). Sin embargo se cree que esta vía no tiene importancia fisiológica en el género *Rhizobium* (Jordan, 1984; Irigoyen y col., 1990). Las cepas del género *Rhizobium* poseen actividad 6 fosfogluconato deshidrogenasa asociada a NADP (ruta de la pentosa fosfato o ciclo de las pentosas) y metabolizan un rango mayor de carbohidratos (Jordan, 1984, Irigoyen y col., 1990; Graham. y col., 1991). Las cepas del género *Bradyrhizobium* no poseen esta actividad, pero metabolizan algunos compuestos aromáticos (Graham y col., 1991). El ciclo de los ácidos tricarbóxicos también es operativo y de importancia fisiológica en ambos géneros, además se ha descrito la presencia de las enzimas del ciclo del Glioxilato (Jordan, 1984).

En general, los rizobios son capaces de utilizar una gran variedad de carbohidratos como fuente de carbono.

Peña y col., 1996, la sacarosa es quizá el disacárido más común en la dieta de los organismos, cuyos componentes son dos monosacáridos fructosa y glucosa, donde el OH del carbono 1 de la glucosa y el 2 de la fructosa se unen entre si para formar el puente glucosídico, en el caso de la sacarosa, al formarse el enlace entre los carbonos 1 de la glucosa y 2 de la fructosa, el primero queda en la forma alfa y el segundo en la forma beta. Esta situación es importante, dado que los enlaces en el metabolismo se forman y rompen por la acción de enzimas, las cuales no son capaces de reconocer mas que un tipo de enlace, alfa o beta, para cual fue diseñado su sitio activo. Por ejemplo la sacarasa es capaz de romper el enlace que existe en la sacarosa.

Vincent. 1975, refiere que a menudo los rizobios usan como fuente de carbono el manitol, pero puede ser sustituido por algunos de los azúcares, especialmente glucosa o sacarosa. El manitol es un polialcohol es decir, una molécula que tenía un carbonilo en uno de los átomos de carbono y un grupo alcohólico (OH) en cada uno de los demás carbonos, tiene ahora un grupo OH en cada carbono.

El propanotriol, glicerol ($C_3H_8O_3$), presenta tres grupos alcohólicos y es uno de los principales productos de la degradación digestiva de los lípidos, paso previo para el ciclo de Krebs. Se produce también como un producto intermedio de la fermentación alcohólica. El propanotriol junto con los ácidos grasos, es uno de los componentes de los lípidos simples, como los triglicéridos y fosfolípidos, cumple función energética (Peña, y col., 1996). Es usado en la preparación de medios de cultivos para rizobios como fuente de carbono especialmente para cepas de crecimiento lento como *Bradyrhizobium japonicum* (Vincent, 1975).

2.3. METABOLISMO DEL NITRÓGENO

Los requerimientos de nitrógeno pueden ser satisfechos por nitrato, sales de

amonio (si el medio está bien tamponado), por muchos aminoácidos (aspartato, glutamato, histidina, prolina) y péptidos de cadena corta. Algunos aminoácidos pueden ser inhibitorios (p.e.j., glicina). Algunas cepas de *Bradyrhizobium* aisladas de Lotoonis utilizan bien la peptona (Jordan, 1984).

2.4. REQUERIMIENTOS DE VITAMINAS

La mayoría de cepas de *Rhizobium* son muy exigentes en cuanto a sus requerimientos de vitaminas, especialmente las del complejo B (Sierra y col., 1996). Los requerimientos de tiamina, pantotenato y biotina son variables entre las diferentes especies de *Rhizobium*. Sólo algunas cepas de *Rhizobium* pueden crecer en un medio mineral simple sin vitaminas. Usualmente *Bradyrhizobium* no requiere de vitaminas, con la rara excepción de biotina, que puede ser inhibitoria para algunas cepas de este género. *R. leguminosarum*, *R. meliloti* y *R. loti* (Jordan, 1984).

2.5. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

CIAT. 1987, menciona que el nitrógeno está presente en los tejidos verdes de las plantas en concentraciones relativamente altas (1 y 4 %), y en algunas semillas en concentraciones aun mayores por lo cual se le considera un macro nutriente primario junto con el fósforo y el potasio, casi todo este elemento se encuentra en la materia orgánica.

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso que implica una gran demanda de energía, pero en este caso se obtiene de la radiación solar en condiciones ambientales de la temperatura y presión. Esto es posible gracias a la presencia de la enzima nitrogenasa, catalizadora de la reacción. De aquí se origina la importancia que tiene el proceso de la fijación biológica de nitrógeno para la agricultura y la necesidad de desarrollar una tecnología adecuada para maximizar el aprovechamiento de este recurso (CIAT, 1987).

Devlin 1970, señala que probablemente el papel más importante del nitrógeno

en las plantas es su participación en la estructura de la molécula proteica. Además el nitrógeno se encuentra en moléculas tan importantes como las purinas, pirimidinas y coenzimas. Las purinas y las pirimidinas se encuentran en los ácidos nucleicos ARN y ADN esenciales para la síntesis de proteínas.

2.5.1. Simbiosis Rhizobium- leguminosa

Madigan y col., 2004, señala que una de las interacciones destacadas entre bacterias y plantas son las que se dan entre leguminosas y bacterias del género Rhizobium. Las leguminosas son un grupo amplio que se caracterizan por tener semillas dentro de una vaina. La infección de las raíces de una planta leguminosa con la especie de bacteria apropiada conduce a la formación de nódulos radicales que pueden convertir el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado, un proceso de fijación de nitrógeno.

Ronald (1983) y Valencia (1987), coinciden en señalar que la asociación Rhizobium-leguminosa es un ejemplo característico de la simbiosis. Esta asociación es responsable de que cerca del 40% de la fijación de nitrógeno se realice por medios biológicos; para que exista una alta fijación de nitrógeno se debe contar con ciertos factores que intervienen en la simbiosis de Rhizobium – leguminosa, como son la efectividad, capacidad hospedante, factores del medio ambiente, así como los factores genéticos que determinan la compatibilidad entre cepa de Rhizobium y la leguminosa.

Pelczar y col., (1990) y Madigan y col., 2004, manifiestan que la fijación de nitrógeno por medio de la simbiosis leguminosa – Rhizobium es de considerable importancia en la agricultura, porque causa un aumento significativo del nitrógeno combinado en el suelo dado que la carencia de nitrógeno suele darse en los suelos desnudos y sin abonar, las leguminosas noduladas ofrecen una ventaja selectiva en tales condiciones y pueden crecer en zonas donde no lo harían otras plantas

Santillana. 1997, menciona que varias especies de la familia leguminosae son infectadas por bacterias recientemente reclasificadas en los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, que forman nódulos en las raíces y en algunos casos en el tallo; la planta proporciona a la bacteria, fotosintatos y recibe a cambio productos nitrogenados como aminoácidos y ureidos.

La FAO, 1991, menciona la importancia de algunos elementos indispensables para la fijación biológica de nitrógeno:

- Fósforo

La simbiosis rizobio-leguminosa es altamente sensible a la carencia de fósforo. El fósforo forma parte de las moléculas de ATP, que son las responsables de la liberación e intercambio de la energía. El fósforo es indispensable para la fijación biológica de nitrógeno por la alta energía que este proceso insume (16 moléculas de ATP/N₂ fijado) a lo que se debe sumar el consumo para la formación de los tejidos de los nódulos y para los procesos de reconocimiento genético (señales entre la planta y el rizobio). Para que sea posible la nodulación y fijación de N₂, es necesario un aporte adecuado de fósforo. Cuando la concentración de P en la planta es inferior al 0.2% la nodulación y la fijación de N₂ son casi despreciables. Por debajo de 0.1% ni siquiera se formarán nódulos. Las concentraciones de fósforo en los nódulos son en general, mayores que las concentraciones en el tallo o en el resto de la raíz.

- Azufre

El azufre cumple una función en el metabolismo de los nódulos y forma parte de ciertas proteínas (ferredoxinas) que intervienen en la reducción del N₂. En condiciones deficientes, el azufre de la planta se concentra en los nódulos. No se ha descrito el efecto directo del azufre sobre la nodulación. Sin embargo, se observan incrementos en la nodulación como respuesta a la fertilización azufrada en suelos deficientes en este elemento.

- **Micronutrientes**

En el proceso de fijación biológica intervienen sustancias químicas (enzimas, proteínas y otros compuestos) que tienen en su constitución micronutrientes. Sus carencias generan por lo tanto fallas en el proceso de fijación.

TABLA Nº 01: Micronutrientes que intervienen en la fijación biológica de nitrógeno

ELEMENTO	EFEECTO POR CARENCIA	FUNCIÓN
Boro	Reducción en el tamaño de los nódulos	División celular
Cobalto	Reducción y retraso en la iniciación nodular	Presente en enzimas Rizobianas
Cobre	Reducción en la fijación de nitrógeno	No es claro
Hierro	Reducción en la iniciación nodular desarrollo de los nódulos y tasa de fijación	Constituyente de proteínas y leghemoglobina
Molibdeno	Nódulos inefectivos y deficiencia por nitrógeno	Constituyente de la nitrogenasa
Niquel	Retraso de la nodulación, reducción del crecimiento de la planta	Presentes en encimas de plantas y rizobios
Selenio	Reducción de la actividad hidrogenasa	Constituyente de la hidrogenasa de Bradyrhizobios
Zinc	Reducción en el número y tamaño nodular	Involucrado en la síntesis de leghemoglobina

Fuente: <http://www.nitragin.com.ar/guia.html>.

2.6. INOCULANTES Y CONTROL DE CALIDAD

Los análisis de control de calidad de los inoculantes son realizados por los mismos laboratorios productores, considerándose principalmente el número de

células no menor a 10^8 cel/g de inoculante y el número más probable (NMP) en plántulas. Así también se considera una fecha de vencimiento entre 3 y 5 meses dependiendo de la cepa y del soporte. Los biofertilizantes Rizomack (UNSCH), utilizan turba mientras que Ecorizo (UNALM) la mezcla de compost/suelo estériles (Ormeño y Zúñiga, 1999), como soporte para una concentración de 10^8 rizobios/gramo, teniendo una fecha de vencimiento de 5-7 meses en el caso de Rizomack y de 2 o 3 meses en el caso de Ecorizo (BIOFAG, 2007).

Mackie y García-Blázquez (1980), señalan que para realizar los controles de calidad de inoculantes Rizomack y otorgar fecha de validez o vencimiento de un determinado lote utilizaron la siguiente escala:

- Menos de 10^7 bacterias/g de inoculante se desecha
- 1.1×10^7 a 3.40×10^7 “ 2 meses de vencimiento
- 3.45×10^7 a 9.0×10^7 “ 3 meses de vencimiento
- 1.1×10^8 a 3.4×10^8 “ 4 meses de vencimiento
- 3.45×10^8 a 9.0×10^8 “ 5 meses de vencimiento
- 1.0×10^9 a mas “ 6 meses de vencimiento

Vidor (1979), señala que las cepas de Rhizobium para ser recomendadas a los fabricantes de inoculantes deberán satisfacer las siguientes características:

- Comprobada eficiencia en experimentación de campo
- Representar amplio aspecto de nodulación y eficiencia
- Buena capacidad de colonizar y sobrevivir en el suelo
- Alta capacidad de competición por sitio de infección nodular

Existen varios tipos de inoculantes para leguminosas de acuerdo al tipo de soporte sobre el que se mantienen los rizobios y la forma de prepararlo. Los primeros tipos de inoculantes fueron los siguientes:

a) Inoculantes sobre agar

Fueron los primeros inoculantes comerciales. Consistían de cultivos de rizobios sobre gelatina y posteriormente sobre agar que se aplicaban directamente sobre las semillas o se mezclaban con suelo y se esparcían sobre el campo (Williams, 1984).

b) Inoculantes líquidos

Los cultivos líquidos de rizobios sólo se utilizaban como inoculantes para ensayos experimentales de laboratorio o invernadero, y para la preparación de los inoculantes sobre soporte sólido. Los técnicos de la empresa líder a nivel mundial en biofertilizantes NITRAGIM desarrollaron un medio líquido que le permitió tomar nuevamente la delantera tecnológica en inoculación con una concentración de más de 10^9 cel/mL. Representan a la más novedosa y avanzada tecnología de inoculantes. Pueden ser directamente mezclados con la semilla con un resultado práctico de adherencia muy superior a los que cualquier inoculante sólido (aún a los que contengan adherentes). También pueden ser fácilmente aplicados dentro del surco de siembra con resultados igualmente satisfactorios (Williams, 1984).

c) Inoculantes liofilizados sobre talco

La liofilización es un proceso que remueve el agua intracelular de una célula reduciendo el metabolismo y por lo tanto aumentando la longevidad. Los rizobios así procesados se mezclan usualmente con talco para facilitar su manipulación y utilización (Williams, 1984).

d) Inoculantes secados en aceite

Para elaborar este tipo de inoculante, se suspende en cultivo líquido de rizobios en aceite y mediante burbujeo de aire a través de esta suspensión se puede reducir el contenido de agua de las células sin afectar su viabilidad. Luego del

proceso de secado, se colectan las células por filtración o centrifugación y se mezclan con un soporte como vermiculita (Williams, 1984).

e) Inoculantes líquidos concentrados y congelados

Este tipo de inoculante se elabora concentrando un cultivo líquido hasta formar una pasta (aproximadamente 10^{12} UFC/mL). Luego, se empaqueta y se congela (Williams, 1984).

f) Inoculante sobre soporte sólido

En este caso se mezcla un cultivo líquido de rizobios con preparados sólidos (soportes) adecuados para la supervivencia y estabilidad de los caracteres simbióticos del cultivo por largos periodos de tiempo (Williams, 1984).

g) Inoculantes granulares

Este tipo de inoculantes son una forma especial de los inoculantes sobre soporte sólido. En este caso se utilizan gránulos de turba, arcilla y, ocasionalmente, vermiculita de 0,297 a 0,841 mm de diámetro (Williams, 1984).

2.7. CRECIMIENTO DE POBLACIONES

Madigan, y col., (2004), señalan que la célula bacteriana es una máquina sintética capaz de duplicarse a sí misma. Los procesos bioquímicos de crecimiento celular bacteriano suponen no menos de unas 2000 reacciones de una gran variedad de tipos. El crecimiento se define como el aumento en número de células microbianas de una población, también puede medirse como un incremento de la masa celular. En un sistema cerrado o con medio no renovado, también conocido como cultivo monofásico se obtiene una curva de crecimiento típica con las siguientes fases:

- Fase de latencia

Cuando se inocula una población microbiana, en un medio fresco por lo general el crecimiento no comienza inmediatamente sino solo tras un periodo de tiempo, la cual puede ser breve o larga dependiendo de la procedencia del cultivo y de

las condiciones de crecimiento.

- Fase exponencial

Es una consecuencia del hecho que cada célula se divide para formar dos, cada una de las cuales va a formar otras dos y así sucesivamente. En general las células en crecimiento exponencial están en el estado fisiológico más sano y por ello las células tomadas en el punto medio del crecimiento exponencial son a menudo las más indicadas para estudios enzimáticos y estructurales.

- Fase estacionaria

En un sistema de cultivo cerrado, en medio no renovado o monofásico como por ejemplo un tubo o un matraz, el crecimiento exponencial no se puede prolongar de modo indefinido.

En la fase estacionaria no hay aumento ni descenso neto en el número de células, en algunos casos puede ocurrir un lento crecimiento durante la fase estacionaria.

- Fase de muerte

Si la incubación continua después de que la población haya alcanzado la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, o también pueden morir, si ocurre esto último, se dice que la población está en la fase de muerte. En algunos casos la muerte se acompaña de una lisis celular real (Madigan y col., 2004).

2.8. MULTIPLICACIÓN DE RIZOBIOS EN MEDIO LÍQUIDO

Jordan, 1984, clasifica a las estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* como estirpes de crecimiento rápido con tiempo de generación de 2 a 4 horas. Para la multiplicación de estirpes los autores en general recomiendan medios de cultivo que contengan como fuente de carbono el manitol (10 g/litro). Para una multiplicación a nivel industrial y con la finalidad de abaratar costos de

producción indica que el manitol sea sustituido parcialmente o totalmente por la sacarosa según (Somasegaran, 1985).

2.9. TECNOLOGÍA DE FERMENTACIONES

La fermentación se define como un proceso catabólico en el que una molécula orgánica se oxida parcialmente, lo cual típicamente ocurre en ausencia de oxígeno y no está asociado a la cadena respiratoria de electrones a nivel de membrana. Esta molécula orgánica actúa a la vez como donadora y aceptora de electrones. También se conocen fermentaciones aerobias (<http://es.wikipedia.org/wiki/Rhizobia>).

2.9.1. Fermentación por lote (batch)

Una fermentación discontinua (en batch) puede ser considerada como un "sistema cerrado". Al inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocula con el microorganismo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se añade nada, excepto oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de la biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente como resultado del metabolismo de las células observándose las cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte (<http://es.wikipedia.org/wiki/Rhizobia>).

2.9.2. Diseño y funcionamiento de un fermentador por lote (batch)

Se hace necesario proporcionar un breve resumen de los tipos de fermentadores disponibles y de sus principales características. A continuación se describe una lista de 13 puntos considerados como los criterios más importantes para el diseño de un fermentador ([http://www. diseños de fermentadores.org.html](http://www.diseños de fermentadores.org.html)).

- El tanque debe diseñarse para que funcione asépticamente durante

numerosos días, así como para las operaciones de más larga duración.

- Se debe proporcionar un sistema adecuado de aireación agitación para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos.
- El consumo de energía debe ser tan bajo como sea posible.
- Debe tener un sistema para el control del pH.
- El fermentador debe tener un sistema para la toma de muestras.
- Debe existir un sistema para el control de la temperatura.
- Las pérdidas por evaporación no deben ser excesivas.
- El diseño del tanque debe ser tal que las operaciones laborales durante el funcionamiento, recolección, limpieza y mantenimiento sean mínimas.
- El tanque debe ser versátil para la aplicación de diversas modalidades de procesos.
- Las superficies internas del tanque deben ser lisas, utilizando, donde sea posible, soldaduras.
- La geometría del fermentador debe ser similar a otros tanques más pequeños o mayores del laboratorio para poder reproducir procesos a diferentes escalas.
- Deben emplearse los materiales más baratos que proporcionen resultados satisfactorios.
- Debe existir un servicio adecuado de repuestos para el fermentador.

El mantenimiento de un ambiente aséptico y unas condiciones aeróbicas son, probablemente, los dos puntos de mayor relevancia que hay que considerar (<http://www.diseñosdefermentadores.org.html>).

2.9.3. Factores físico-químicos que afectan al rendimiento de las fermentaciones industriales

a) Oxígeno

Uno de los factores más críticos en la operación de fermentación a gran escala es el suministro de un intercambio de gases adecuado. El oxígeno es el sustrato gaseoso más importante para el metabolismo microbiano y el anhídrido carbónico es el producto metabólico más importante. El oxígeno no es un gas muy soluble ya que una solución saturada de oxígeno contiene aproximadamente 9 mg/L de este gas en agua. Debido a la influencia de los ingredientes del cultivo, el contenido máximo de oxígeno realmente es más bajo de lo que debería ser en agua pura (Balatti, 1992).

b) Temperatura

La temperatura es otro de los parámetros esenciales para el éxito de una fermentación. Los microorganismos que crecen a una temperatura inferior a la óptima tienen retardado su crecimiento y por lo tanto reducida la producción celular, es decir su productividad. A fin de obtener rendimientos óptimos, las fermentaciones deben ser llevadas a cabo en un margen estrecho de temperatura y a ser posible constante (Balatti, 1992).

c) pH

La mayor parte de los microorganismos crecen óptimamente entre pH 5,5 y 8,5. Pero durante el crecimiento en un fermentador, los metabolitos celulares son liberados al medio, lo que puede originar un cambio del pH del medio de cultivo. Por lo tanto se debe controlar el pH del medio de cultivo y añadir un ácido o una base cuando se necesite para mantener constante el pH. Por supuesto que esta adición del ácido o base debe ser mezclada rápidamente de tal manera que el pH del medio de cultivo sea el mismo en todo el fermentador (Balattí, 1992).

d) Agitación y mezclado

La agitación es la operación que crea o que acelera el contacto entre dos o varias fases. Una fermentación microbiana puede ser considerada como un

sistema de tres fases, que implica reacciones líquido-sólido, gas-sólido y gas-líquido. El principal propósito de la agitación es asegurar la suspensión homogénea de los microorganismos en el medio que contiene los nutrientes (Balatti, 1992).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL ENSAYO

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Rhizobiología del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, ubicado en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga y departamento de Ayacucho a una altitud de 2,750. m.s.n.m.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Material biológico

Cepas

Se utilizaron las siguientes cepas con reconocida capacidad simbiótica pertenecientes a la colección del laboratorio de Rhizobiología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

- *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* aisladas de *Pisum sativum* (arveja).
- *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* aisladas de *Trifolium repens* (trébol).
- *Rhizobium meliloti* aisladas de *Medicago sativa* (alfalfa).

3.3. Metodología

3.3.1. Optimización de parámetros

En el experimento se realizaron 18 combinaciones (Esquema Nº 01), en la que se estudió el efecto de tres carbohidratos (manitol, sacarosa y glicerol), y el de la agitación manual (S/A) y magnética (A) en el crecimiento en medio líquido de

las siguientes cepas:

- *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* (Cepa 1)
- *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Cepa 2)
- *Rhizobium meliloti* (Cepa 3)

3.4. MÉTODOS

3.4.1. Mantenimiento, reactivación y pruebas de pureza de las cepas

- a) Los cultivos stock de las cepas fueron mantenidos bajo refrigeración (4± 2°C) en placas de petri con LMA.
- b) Estas fueron sembradas por extensión sobre placas petri conteniendo el medio LMA-RC. Las placas se incubaron a 28°C hasta el desarrollo de las colonias típicas de rizobios (3 a 4 días para las tres cepas en estudio).
- c) Para descartar la presencia de microorganismos contaminantes, se efectuó la tinción de Gram.

3.4.2. Preparación del Pre-inóculo

Los pre-inóculos fueron obtenidos en matraces de 250 mL de capacidad conteniendo 50 mL del medio LC. Se sembró cogiendo una azada de una colonia típica de la cepa respectiva desarrollada sobre placas de petri conteniendo LMA-RC, y fue incubado a 28° C por 72 horas. Las cargas microbianas de los Pre-inóculos fueron obtenidas utilizando la técnica de recuento en placa donde se obtuvo un recuento de 10⁹ UFC/mL.

3.4.3. Formulación de los medios de cultivo

Se iniciaron utilizando la formulación del medio LMC (caldo extracto de levadura-manitol), reemplazando el manitol por sacarosa y glicerol según el ensayo.

3.4.4 Inoculación

- a) El fermentador con 3 litros de caldo LC fue inoculado con 30 mL del pre-inóculo, lo que corresponde al 1% del volumen útil del fermentador, con la

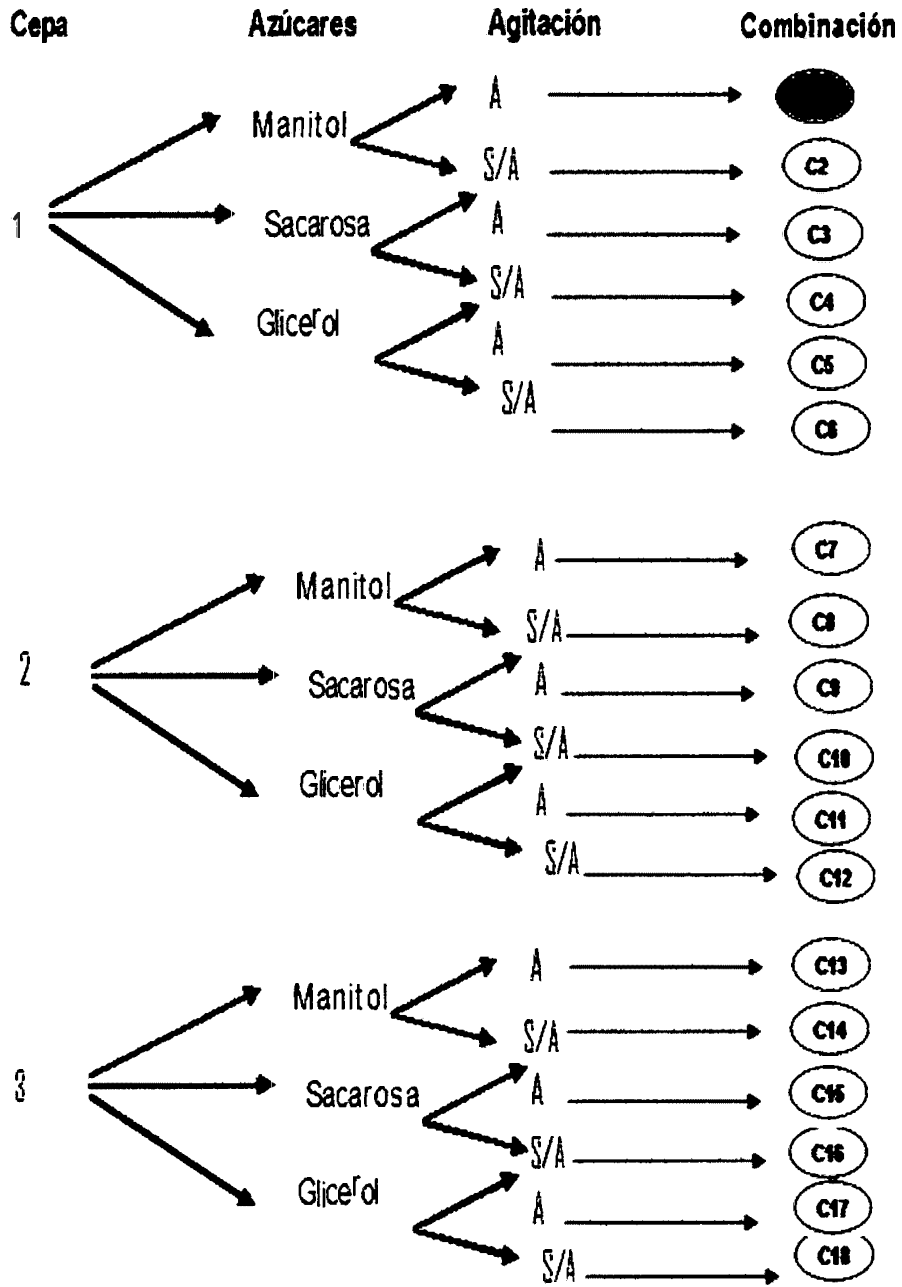
ayuda de jeringas estériles. La temperatura de incubación fue mantenida entre 28 a 30° C en una caseta de tres metros de ancho y cuatro de largo adaptado con focos de 50 y 100 Watts, fue agitada a 80 rpm por un agitador magnético para minimizar el estrés por falta de oxígeno.

- b) La multiplicación mediante el método tradicional, consistió en sembrar una asada de inóculo en balones de 2 litros de capacidad con 1 litro de medio de cultivo LC, la temperatura de incubación se fue mantenida entre 28 a 30° C y fue agitada manualmente dos veces al día. Se realizó la técnica de recuento de células viables en placa en tiempo cero.

3.4.5. Determinación de la carga microbiana de rizobios

- c) El número de bacterias se determinó cada 24 horas hasta las 168 horas utilizando el método de recuento de células viables. El método empleado para la siembra fue el de Miles y Misra (Recuento de células en placa por gota (Vincent, 1975); donde fueron cultivadas las últimas cuatro diluciones (10^{-1} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) y llevadas a incubación a 28° C durante 3 a 4 días.

3.4.6. Combinación de los tratamientos



Esquema Nº 01. Combinación de los tratamientos en estudio.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el análisis de varianza con un modelo factorial (A: Fuente de carbono y B: Agitación) y la prueba de Duncan a un nivel de significación de 0.05; para ver las diferencias entre los tratamientos.

Para poder interpretar mejor se determinó las correlaciones entre las variables que se estimaron más importantes, tanto en tipo de fermentación como fuente de carbono.

IV. RESULTADOS

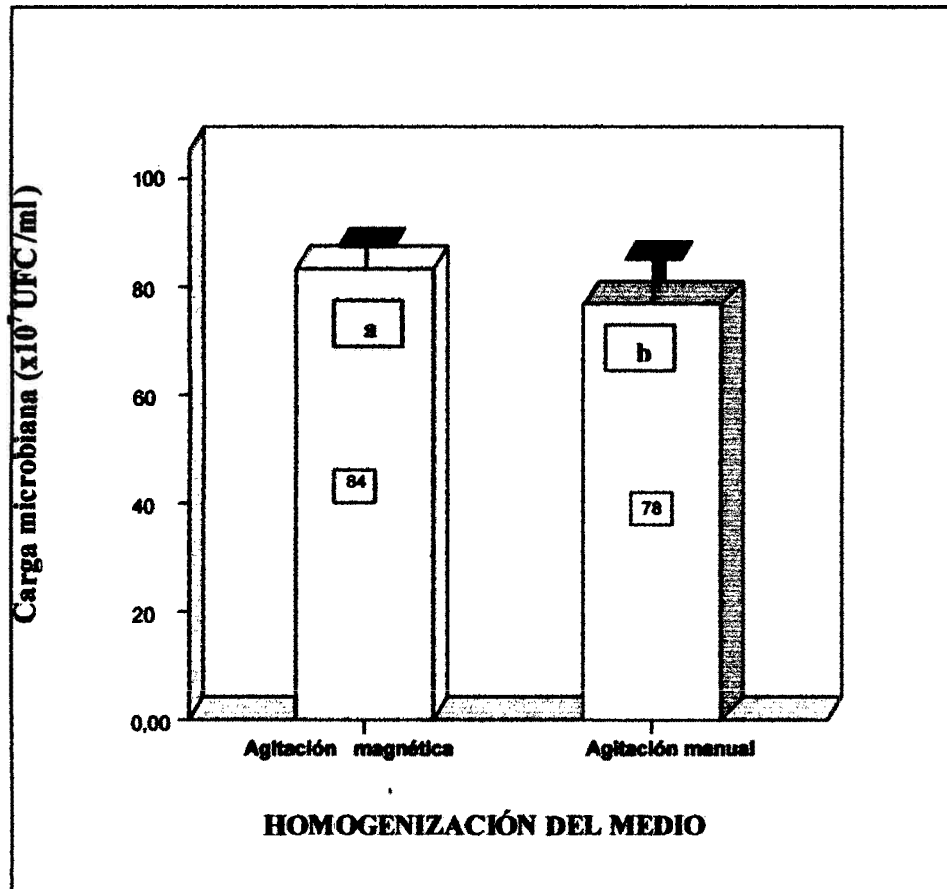


Gráfico N° 01. Producción de células viables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* en función a la homogenización del medio. Laboratorio de Rhizobiología - 2008.

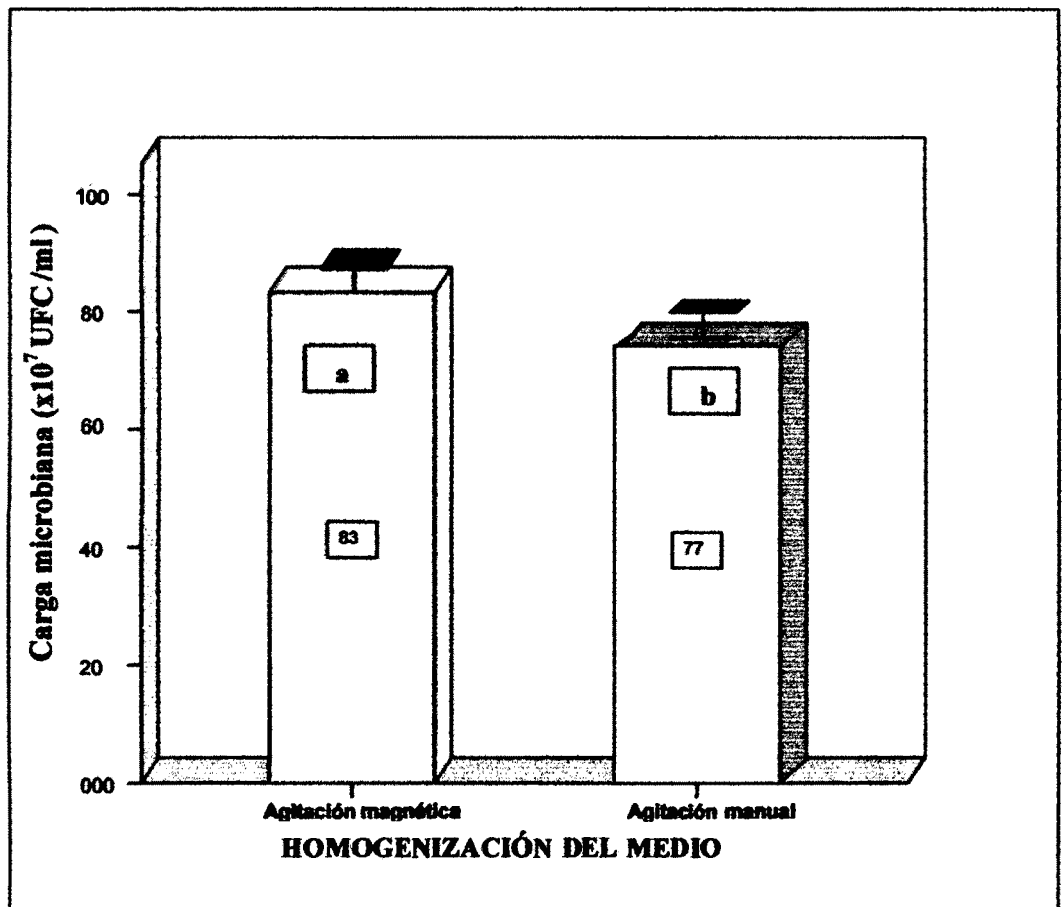


Gráfico N° 02. Producción de células viables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* en función a la homogenización del medio. Laboratorio de Rhizobiología - 2008.

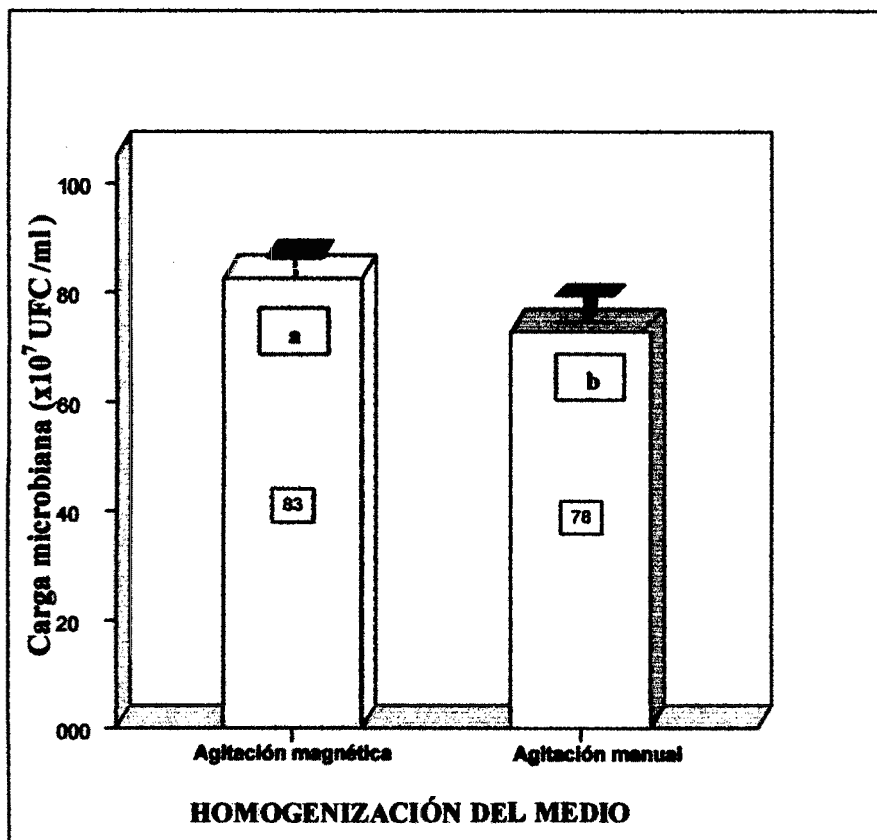


Gráfico N° 03. Producción de células viables de *Rhizobium meliloti* en función a la homogenización del medio. Laboratorio de Rhizobiología - 2008.

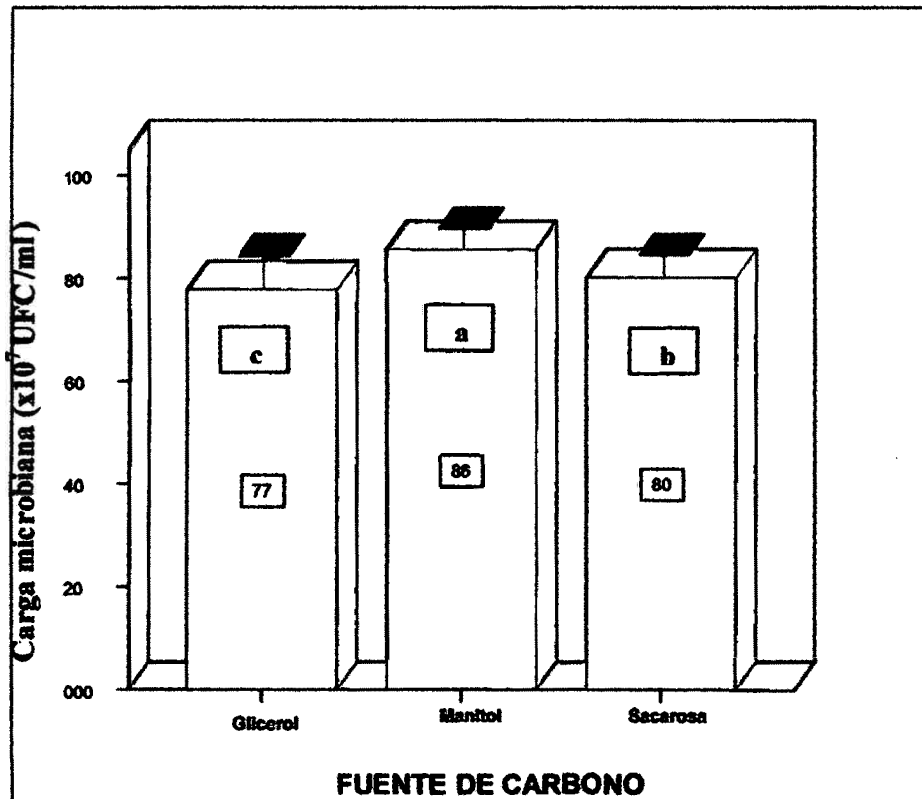


Gráfico N° 04. Producción de células viables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* generadas en tres fuentes de carbono. Laboratorio de Rhizobiología - 2008.

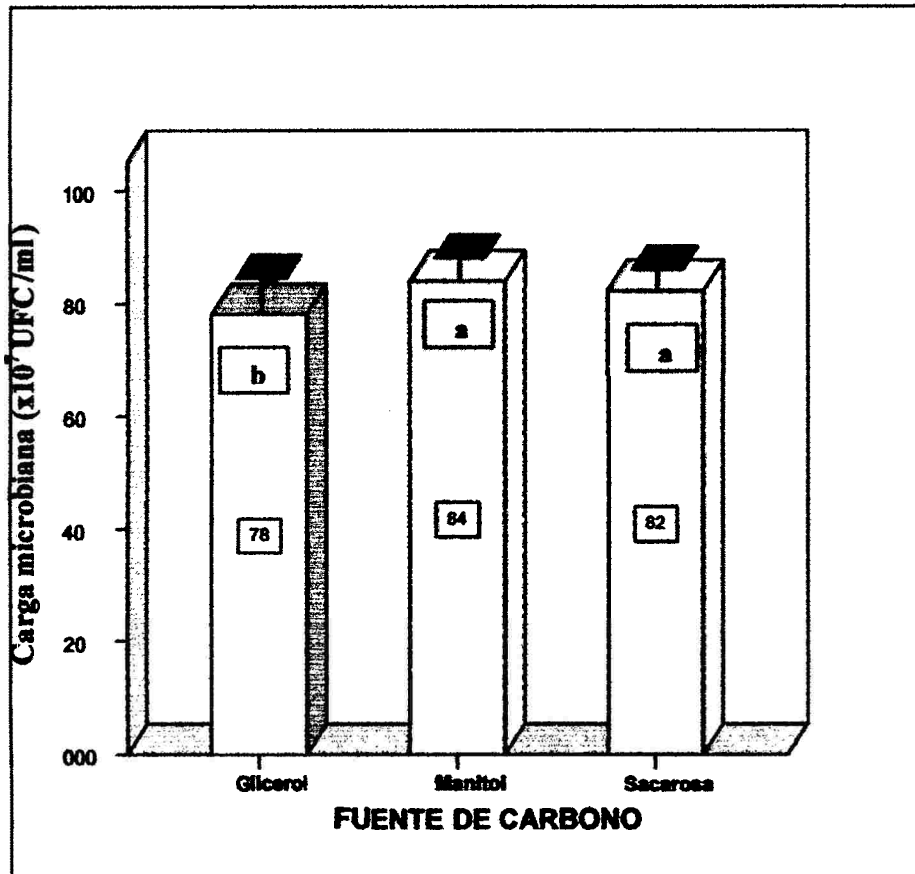


Gráfico N° 05. Producción de células viables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* generadas en tres fuentes de carbono. Laboratorio de Rhizobiología - 2008.

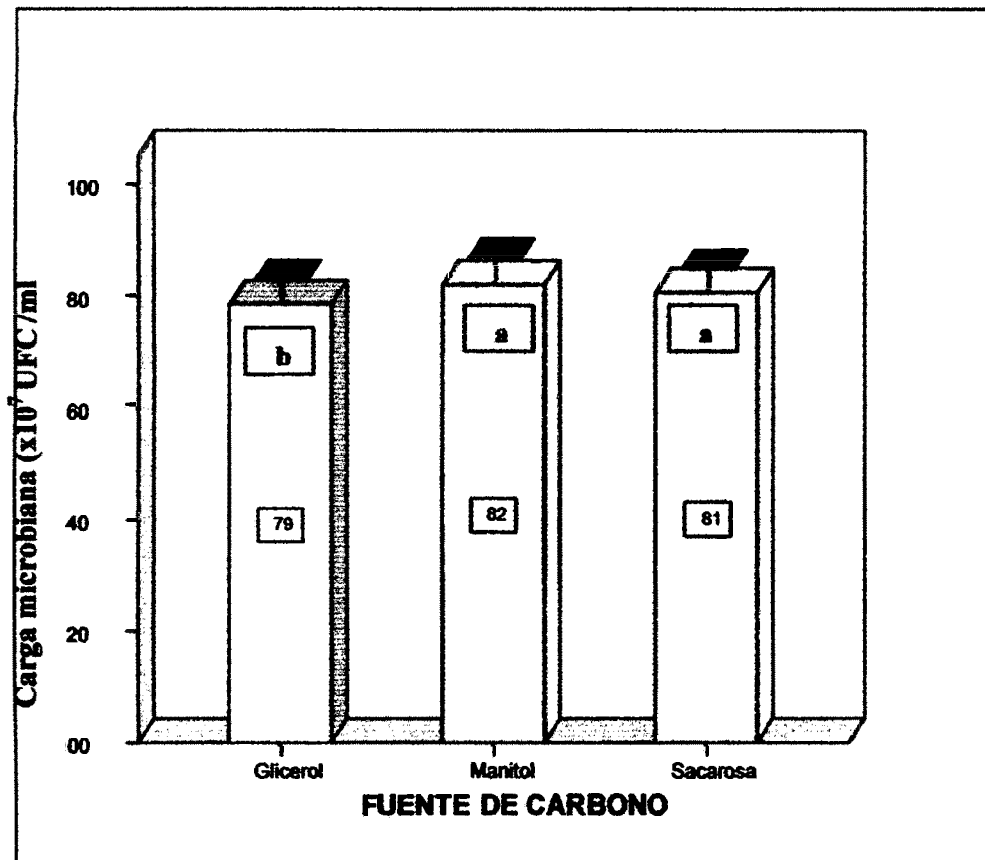


Gráfico N° 06. Producción de células viables de *Rhizobium meliloti* generadas en tres fuentes de carbono. Laboratorio de Rhizobiología - 2008.

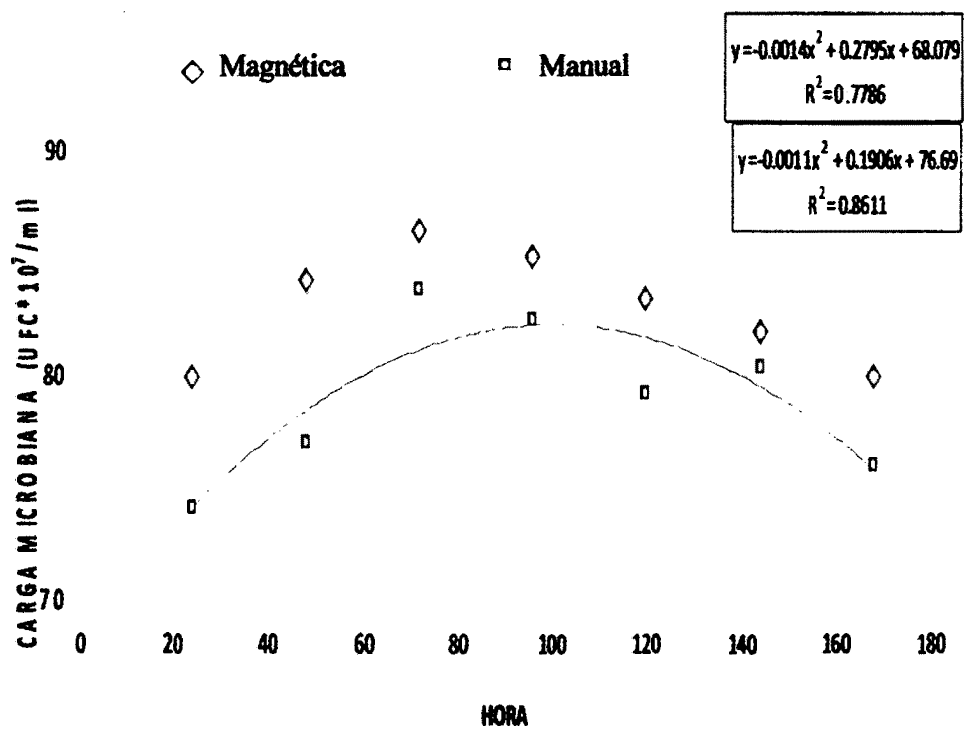


Gráfico N° 07. Cinética de crecimiento de *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae en función a las homogenización del medio. Laboratorio de Rhizobiología - 2008.

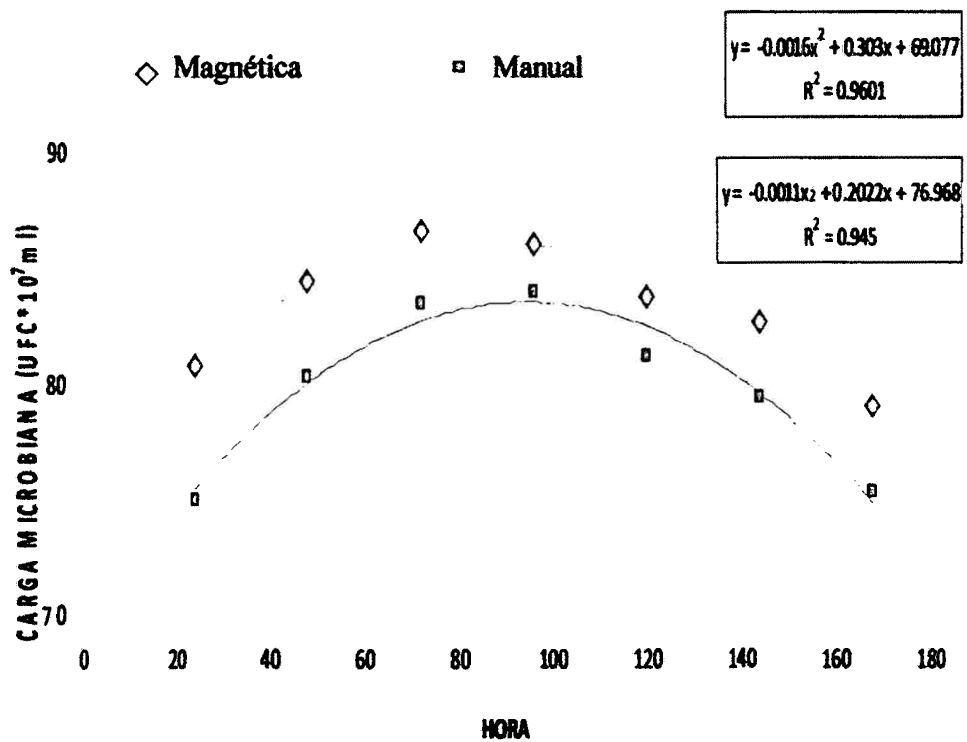


Gráfico N° 08. Cinética de crecimiento de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* en función a la homogenización del medio. Laboratorio de Rhizobiología - 2008.

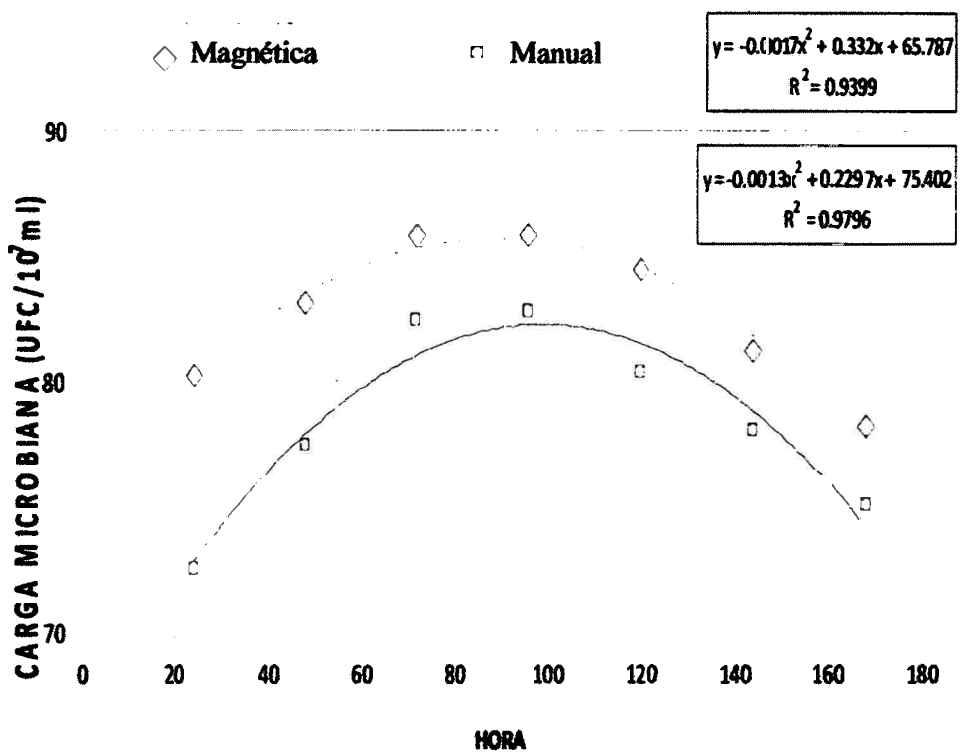


Gráfico Nº 09. Cinética de crecimiento de *Rhizobium meliloti* en función a la homogenización del medio. Laboratorio de Rhizobiología - 2008.

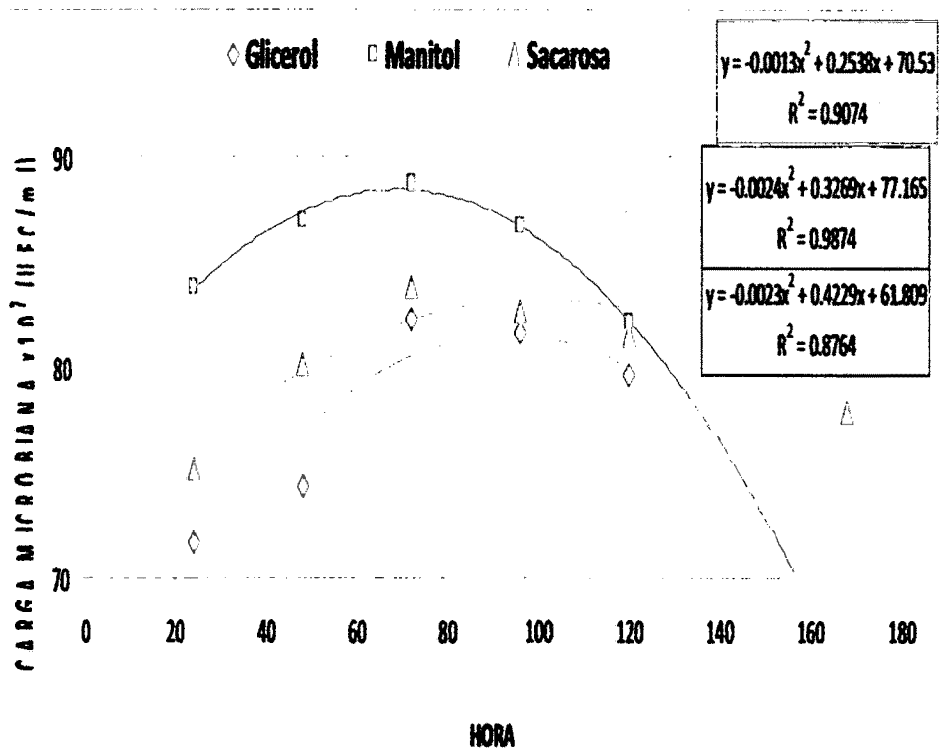


Gráfico N° 10. Cinética de crecimiento de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* en tres fuentes de carbono. Laboratorio de Rhizobiología - 2008.

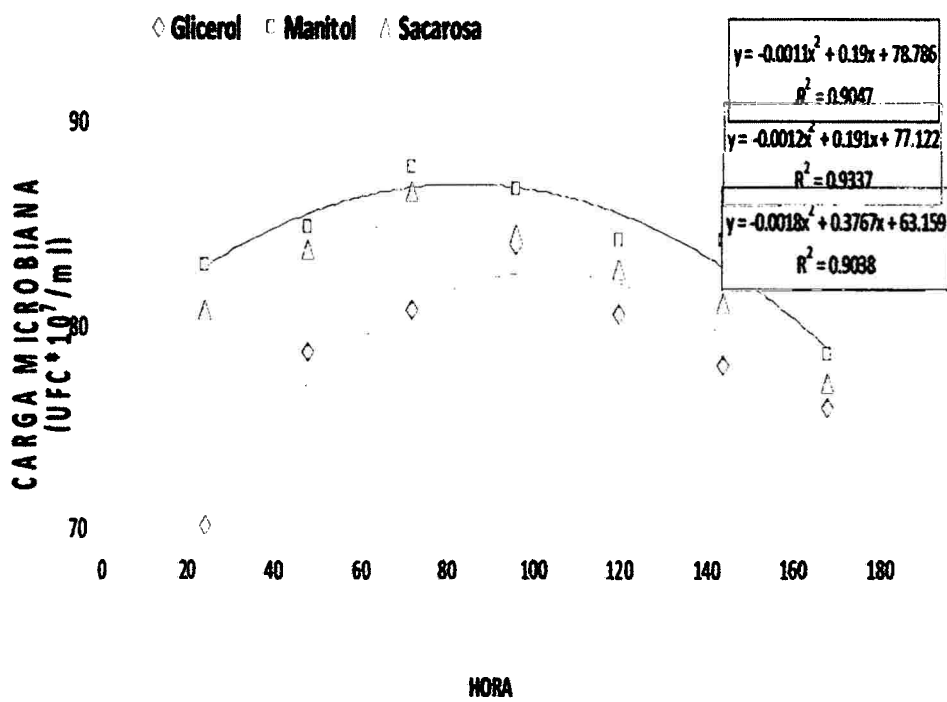


Gráfico N° 11. Cinética de crecimiento de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* en tres fuentes de carbono. Laboratorio de Rhizobiología - 2008.

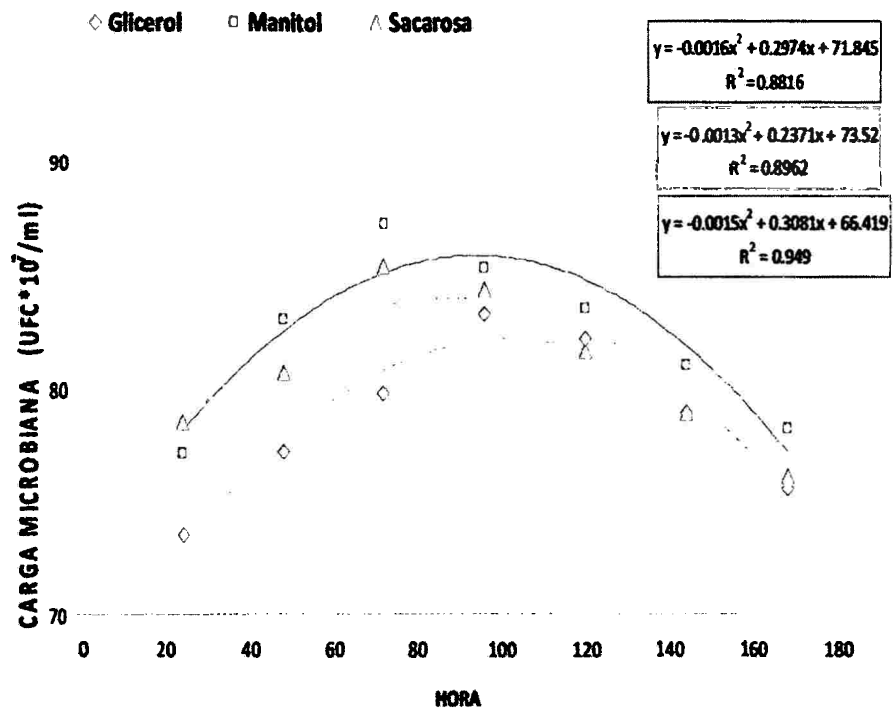


Gráfico N° 12. Cinética de crecimiento de *Rhizobium meliloti* generadas en tres fuentes de carbono. Laboratorio de Rhizobiología - 2008.

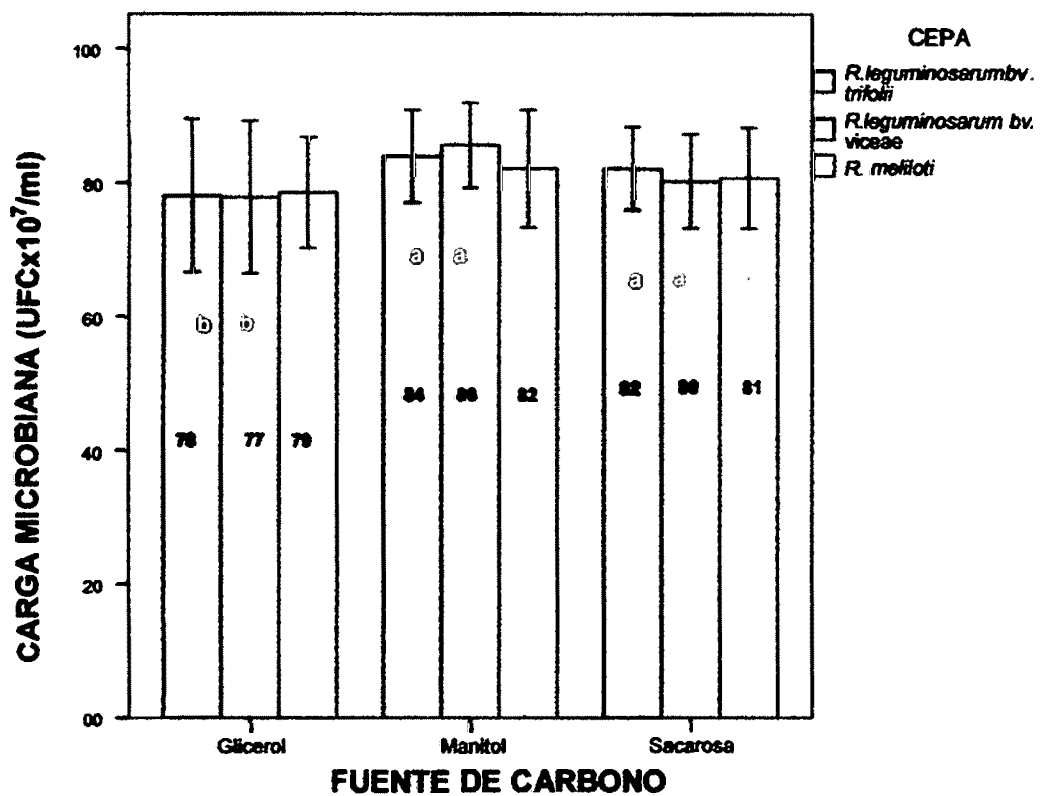


Gráfico N° 13. Producción de células viables de tres cepas de Rhizobium generadas en tres fuentes de carbono. Laboratorio de Rhizobiología - 2008.

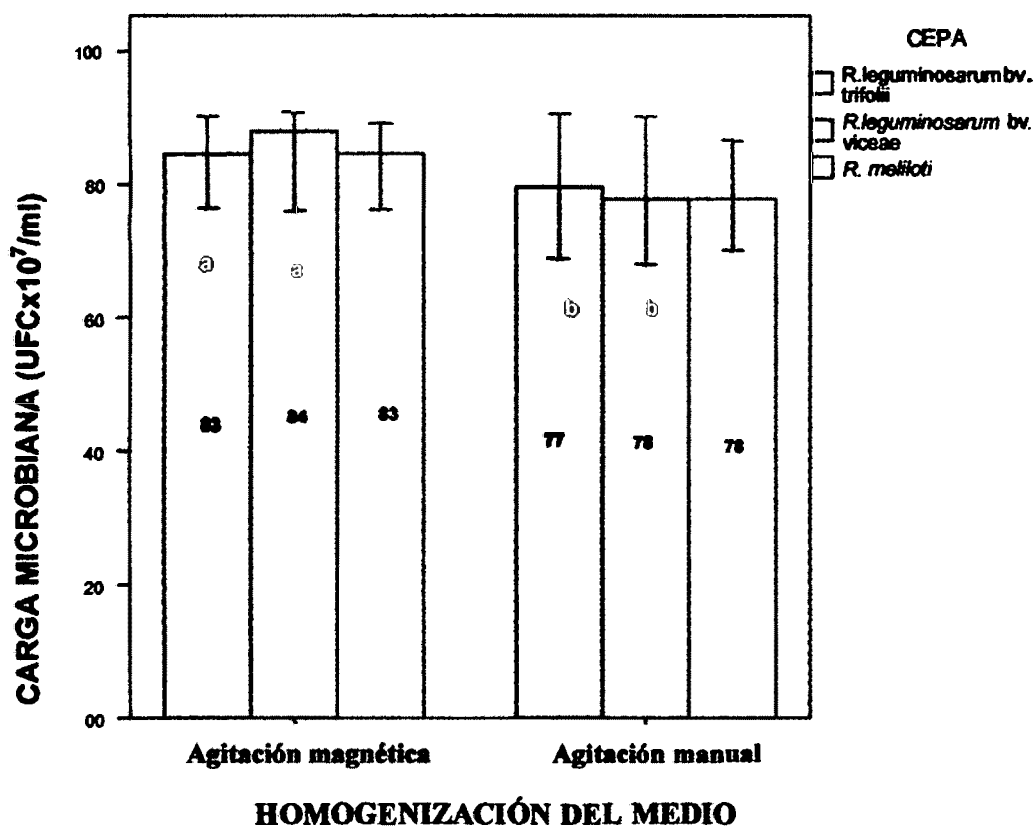


Gráfico N° 14. Producción de células viables de tres cepas de *Rhizobium* en función a la homogenización del medio. Laboratorio de Rhizobiología - 2008.

V. DISCUSIÓN

En el Gráfico N° 01, muestra los resultados de la prueba de Duncan respecto a la evaluación de la producción de células viables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* en función a la homogenización del medio, donde se puede apreciar que la agitación magnética permitió obtener una carga microbiana de 84×10^7 UFC/mL, mientras que la agitación manual (metodología tradicional) obtuvo 78×10^7 UFC/mL.

Al respecto podemos manifestar que la agitación magnética permitió obtener mejores resultados que la agitación manual, resultado que se debe al contacto entre las fases del medio producto de una agitación constante, evitando de esta manera la sedimentación de los nutrientes y creando un medio homogéneo, estos resultados concuerdan con las experiencias reportadas por Santillana (2004), al emplear biorreactor de tanque agitado para la multiplicación de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* que permitió obtener cargas microbianas del orden de 10^9 UFC/mL. Balatti, (1992) menciona que en la producción de la masa celular de rizobios son varios los factores influyentes; la tensión del oxígeno, la agitación, la composición y volumen del medio, la concentración celular del inóculo y las condiciones de operación.

En el Gráfico N° 02, muestra la evaluación de la producción de células viables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* en función a la homogenización en la cual se

carga microbiana, carbono comenzando la fase exponencial a las 24 horas, llegando al punto máximo de crecimiento a las 72 horas donde se obtuvo la mayor carga microbiana. La sacarosa y glicerol permitió obtener menor carga microbiana.

Santillana (1994), reporta el estudio de la cinética de crecimiento utilizando el medio Extracto de levadura manitol- sacarosa, donde obtuvo mayor carga microbiana para las cepas SEMIA 222, T154, T107 en relación c la cepa SEMIA 234, la cepa SEMIA 222, después de 60 horas de incubación alcanzaron la mayor carga microbiana manteniendo hasta el final del experimento, mientras que las cepas SEMIA 235 y T107 presentaron una declinación marcada a partir de las 60 horas hasta las 120 horas. La carga microbiana fue mayor para la cepa SEMIA 222 ($0.31h^{-1}$). La cepa SEMIA 235 presentó menor tasa de crecimiento ($0.18h^{-1}$). Esas características son muy importantes cuando se trata de la selección de cepas para la producción de inoculantes, pues estirpes con menor tiempo de generación y mayor tasa de crecimiento aseguran menor tiempo de permanencia en el fermentador, lo que evita problemas de contaminación y optimiza el proceso de producción.

Los Gráficos 13 y14, Muestran resultados conjuntos de las pruebas de Duncan sobre las evaluaciones de células viables de las cepas 1, 2, 3 en función a la homogenización del medio y el uso de tres fuentes de carbono, gráficas que permitirán visualizar en conjunto los efectos para una mejor comparación.

Los análisis de varianza para las cepas 1, 2 y 3, muestran una alta significación estadística ($\alpha=0.000$) para la homogenización del medio y el uso de fuente de carbono; que fue contrastado con la prueba de Duncan el cual determinó que las 3 cepas llegaron a obtener mayor carga microbiana con el uso del manitol y con agitación magnética.

VI. CONCLUSIONES

1. Se incrementó la carga microbiana en un sistema de fermentación por lote usando manitol como fuente de carbono para las cepas de: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, y *Rhizobium meliloti* producidas con agitación constante.
2. Se seleccionó al manitol como el carbohidrato más apropiado para las cepas 1, 2, y 3 en la multiplicación en medio líquido, obteniendo cargas microbianas de 86×10^7 UFC/mL; 84×10^7 UFC/mL y 82×10^7 UFC/mL respectivamente.
3. Se determinó el efecto positivo de la agitación magnética en la multiplicación de las cepas 1, 2 y 3 en medio líquido logrando obtener cargas microbianas de 84×10^7 UFC/mL, 83×10^7 UFC/mL, y 83×10^7 UFC/mL respectivamente, en comparación con los producidos en agitación manual que obtuvo cargas microbianas de 78×10^7 UFC/mL, 77×10^7 UFC/mL, 78×10^7 UFC/mL, resultado que tiene significancia estadística.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar para estudios posteriores el uso de nuevas fuentes de carbono.
2. Realizar estudios evaluando el efecto de diferentes tiempos de agitación en la etapa de multiplicación de rizobios en medio líquido.
3. Optimizar más parámetros como pH, aireación, agitación, para mejorar la etapa de multiplicación y garantizar mayor carga microbiana.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Balatti, A.** 1992. Tecnología de las fermentaciones aplicadas a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* conferencia dictada durante la XVI Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Universidad Nacional de la Pampa.
2. **BIOFAG 2007.** Taller sobre Inoculantes – Estado Actual y Perspectivas. Red Iberoamericana de Fertilizantes Microbianos para la Agricultura. 27 al 30 de Septiembre de 2006. Montevideo.
3. **CIAT.** 1987. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Simbiosis Leguminosa-Rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. Cali- Colombia.
4. **Devlin, R.** 1970. Fisiología Vegetal, Edit. Omega, Barcelona. 3^{ra} Edición – España.
5. **FAO.** 1991. Summary of selected points of discusión. pp 1-4. En: Report on the Expert Consultation on Legume Inoculant Production and Quality Control. J.A. Thompson (Ed.). Roma.
6. **Graham, P., Sadowsky, M., Keyser, H., Barnett, J., Bradley, R., Cooper, J., Jarvis, B., Roslycky, E., Strijdom, B. and Young, J.** 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-nodulating and stem-nodulating bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 582-587.
7. **Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., and Williams, S.** 1994. Bergey's Manual of Determinative bacteriology. The Williams & Wilkins Co. Baltimore. 962 pp.

8. Irigoyen, J., Sanchez, M. and Emerich, D. 1990. Carbon metabolism enzymes of *Rhizobium meliloti* cultures and bacteroids and their distribution within alfalfa nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2587-2589
9. Jordan, D. 1984. Family III. Rhizobiaceae corn 1938.pp. 234-256. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Vol. I. N.R. Kreig y J.G. Holt (Eds.). The Williams & Wilkins Co.Baltimore-USA.
10. Lindström, K., Van Berkum, M., Gillis, E., Martínez, N., Novikova and Jarvis, B. 1995. Report from the roudtable on Rhizobium taxonomy. En: "Nitrogen Fixation: Fundamentals and Aplications". (Eds.) Moscú.
11. Mackie, F. y García-Blázquez, C. 1980. Las leguminosas y la Producción de Inoculantes RIZOMACK. Laboratorio de Rhizobiología del Programa de Pastos de la UNSCH. Ayacucho- Perú.
12. Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J. 2004. Biología de los Microorganismos10^{ma} Edición. Edit. Prentice hall. Madrid- España.
13. Mulongoy, K. and Elkan, G. 1997. Glucosa catabolism in two derivaties of a *Rhizobium japonicum* strain differing in nitrogen-fixing efficiency. *J. Bacterial.* 131: 179-187
14. Ormeño, E. y Zúñiga, D. 1999. Optimización del tiempo de esterilización de soportes basados en suelo y compost para la producción de inoculantes de leguminosa. *Revista Peruana de Biología* 6: 181-184.
15. Ormeño, E. Zúñiga, D. y Matos, G 1998. Utilización de glicerol y glutamato de sodio para el cultivo de *Bradyrhizobium* sp. (*phaseolus lunatus*). Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima.
16. Pelczar, M., Reid, R., y Capella, A. 1990. Microbiología. Editorial Mc Grau – Hill. Madrid- España.
17. Peña, A. Arroyo, A. y Tapia, R. 1996. Bioquímica. Edit. Limusa. 5^{ta} Edición México.

18. **Ronald, F.** 1983. Manual de Agrobiología. Editorial Trillas, S.A. México.
19. **Santillana, N.** 1994. Evaluación de Cepas de Rizobios para la producción de Inoculantes para trébol rojo. Tesis de Maestría. Universidad Federal de Río Grande del Sur. Brasil.
20. **Santillana, N.** 1997. Agricultura Alternativa para los Andes I Seminario Taller Del 04 al 06 Septiembre. Ayacucho-Perú.
21. **Santillana, N.** 2004. Optimización de la Producción y calidad de los Inoculantes Rizomack. Ayacucho- Perú.
22. **Sawada, H. Kuykendall, L. y Young, J.** 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. J. Gen. Appl. Microbiol. 49 (3): 155-79.
23. **Somasegaran, P.** 1985. Inoculant production with diluted liquid cultures of *Rhizobium spp.* And autoclaved peat: evaluation of diluents, *Rhizobium spp.*; Prats, sterility requirements, storage, and plant effectiveness. Appl. Environ. Microbiol. 50: 398-405.
24. **Speidel, K. y Wollum, A.** 1980. Evaluation of leguminous inoculant quality. Technical Bulletin Nº 266. North Caroline Agricultural Research Service. Raleigh. Filadelfia- USA.
25. **Thies, J., and Singleton, P.** 1991. Subgroups of the cowpea miscellany: Symbiotic specificity within *Bradyrhizobium spp.* For *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea*, and *Macroptilim atropurpureum*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1540-1545.
26. **Valencia, M.** 1987. Simbiosis Leguminosa Más Rhizobium. Editorial Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali-Colombia.
27. **Vidor, C.** 1979. Estudios Ecológicos de *Rhizobium*. En: "Tecnología de *Rhizobium*". Centro de Recursos Microbiológicos. MIRCEN. Porto Alegre-Brasil.

28. Vincent, J. 1975. Manual Práctico de Rhizobiología. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.

29. Williams, P. 1984. Current use of legume inoculant technology. In: "Biological Nitrogen Fixation". Alexander, M. (Ed.). Plenum Publishing Corporation. Filadelfia.

Páginas web:

30. URL 1: <http://es.wikipedia.org/wiki/Rhizobia>

31. URL 2: <http://www.diseñosdefermentadores.org.html>.

32. URL3: <http://www.nitragin.com.ar/guia.html>.

ANEXOS

ANEXON°01

Cuadro N° 01. Análisis de varianza para el número de unidades formadoras de colonias de *R. leguminosarum* bv. *viceae* en función a la homogenización del medio (agitación manual y magnética) y tres tipos de fuentes de carbono (glicerol, manitol y sacarosa).

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Fuente de carbono	6,378	2	3,189	25,007	,000**
Tipo de agitación	3,255	1	3,255	25,526	,000**
Fuente de carbono Vs Tipo de agitación	,311	2	,155	1,219	,302 N.S
Error	7,907	62	,128		
Total	199,404	68			
Total corregida	17,776	67			

ANEXO N°02

Cuadro N° 02. Prueba de Duncan para el número de unidades formadoras de colonias de *R. leguminosarum* bv. *viceae* generadas en tres tipos de fuentes de carbono (glicerol, manitol y sacarosa).

Log UFC/mL

FUENTE DE CARBONO	N	Subconjunto		
		1	2	3
Glicerol	20	7,79128937		
Sacarosa	28		8,03127079	
Manitol	20			8,56704552
Sig.		1,000	1,000	1,000

ANEXON°03

Cuadro N° 03. Análisis de varianza para el número de unidades formadoras de colonias de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* generadas según dos tipos de fermentadores (agitación manual y magnética) y tres tipos de fuentes de carbono (glicerol, manitol y sacarosa).

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Fuente de carbono	5,043	2	2,522	17,340	,000**
Tipo de agitación	2,572	1	2,572	17,687	,000**
Fuente de carbono VS.Tipo de agitación	,653	2	1,326	12,245	,113
Error	11,343	78	,145		N.S
Total	5592,129	84			
Total corregida	19,612	83			

a. R cuadrado = ,422 (R cuadrado corregida = ,385)

ANEXON°04

Cuadro N° 04. Prueba de Duncan para el número de unidades formadoras de colonias de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* generadas en tres tipos de fuentes de carbono (glicerol, manitol y sacarosa).

Log UFC/ml

FUENTE DE CARBONO	N	Subconjunto	
		1	2
Glicerol	28	7,81414567	
Sacarosa	28		8,22080176
Manitol	28		8,39976976
Sig.		1,000	,083

ANEXON°05

Cuadro N° 05. Análisis de varianza para el número de unidades formadoras de colonias de *R. meliloti* generadas según dos tipos de fermentadores (con y sin agitación) y tres tipos de fuentes de carbono (glicerol, manitol y sacarosa).

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Fuente de carbono	1,812	2	,906	7,320	,001**
Tipo de agitación	3,925	1	3,925	31,706	,000**
Fuente de carbono Vs Tipo de agitación	,018	2	,009	,071	,932
Error	9,657	78	,124		N.S
Total	5459,640	84			
Total corregida	15,412	83			

a. R cuadrado = ,373 (R cuadrado corregida = ,333)

ANEXO N° 06

Cuadro N° 06. Prueba de Duncan para el número de unidades formadoras de colonias de *R. meliloti* generadas en tres tipos de fuentes de carbono (glicerol, manitol y sacarosa).

Log UFC/ml

FUENTE DE CARBONO	N	Subconjunto	
		1	2
Glicerol	28	7,85922013	
Sacarosa	28		8,07634025
Manitol	28		8,21625506
Sig.		1,000	,141

ANEXON°07

Medio agar extracto de levadura y manitol (LMA)

K₂HPO₄	0.2g
MgSO₄.7H₂O	0.2g
NaCl	0.15g
Manitol	10g
Extracto levadura	0.2 g
Agua destilada	1000mL
Agar	15g
pH	6.8
Fuente	Vincent, (1975).

ANEXON°08

Método de recuento de Miles y Misra (recuento en placas de petri por gota)

Colocar las placas de petri con Agar en forma invertida y marcarlas en cuatro sectores correspondientes. Elegir las diluciones con un contenido mínimo probable de 20 rizobios viables por gota de 0.02cc (1000/cc). Por lo general, esta será menor que la que se usa para el recuento común en placas.

Sembrar el sector correspondiente en cada una de los cuatro sectores cada una con una sola gota (0.02 cc) de la dilución elegida, dejándola caer desde una altura 2.5 cm. de tal manera que se extienda sobre un área aproximadamente de 2 cm. Incubar en posición invertida a 26 -28°C durante 4 a 5 días para los rizobios mas rápidos y durante un lapso de hasta 10 días para los más lentos (Vincent, 1975).

ANEXON°09



Fotografía N° 01. Inoculación al fermentador con el 1% del volumen útil, laboratorio de Rhizobiología, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 2008.

ANEXON° 10



Fotografía N° 02. Cultivo con una asada (metodología tradicional), laboratorio de Rhizobiología, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 2008.

ANEXON° 11



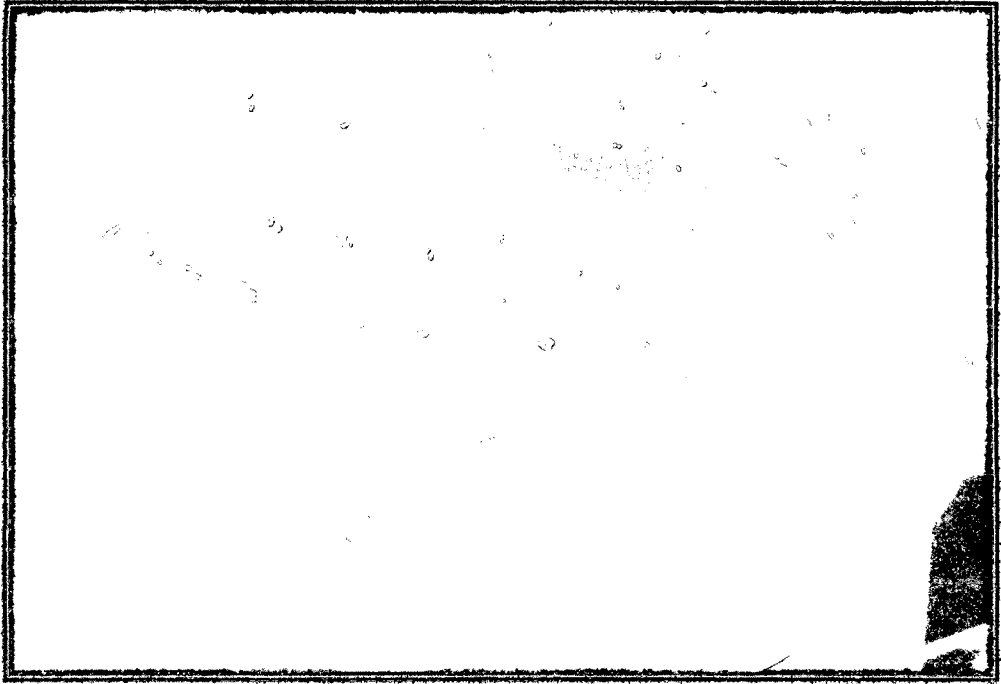
Fotografía N° 03. Extracción de la muestra, laboratorio de Rhizobiología, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 2008.

ANEXON°12



Fotografía N° 04. Fermentador con agitación magnética, laboratorio de Rhizobiología, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 2008.

ANEXO N° 13



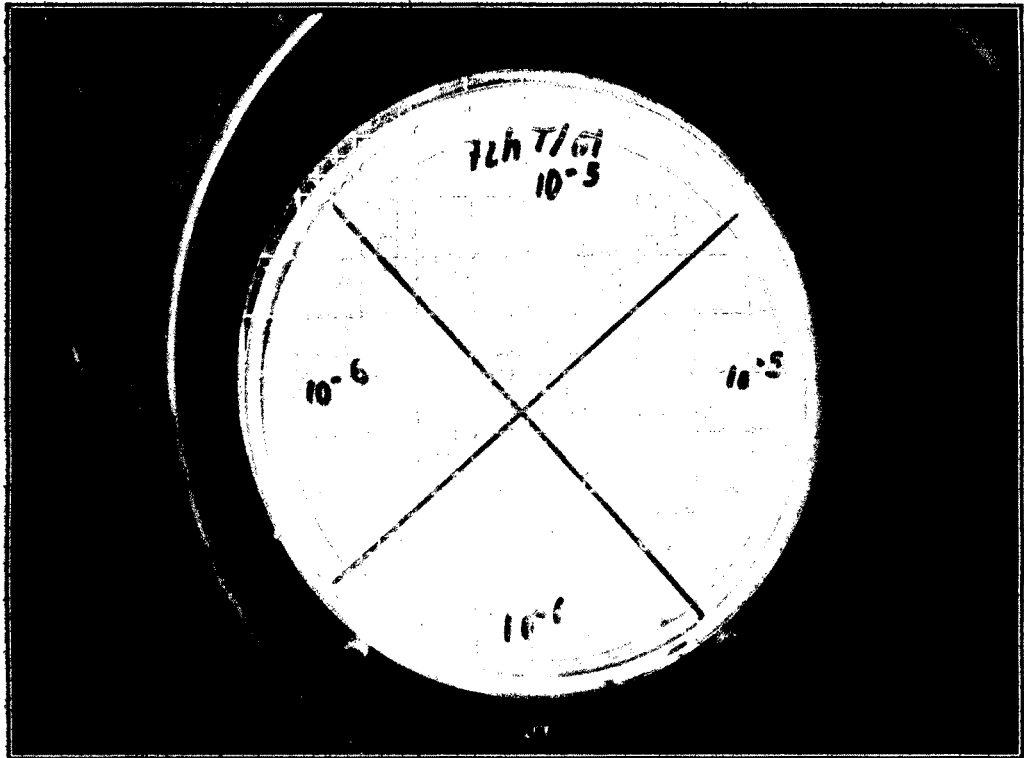
**Fotografía N° 05. Agitador magnético, laboratorio de Rizobiología,
Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 2008.**

ANEXON° 14



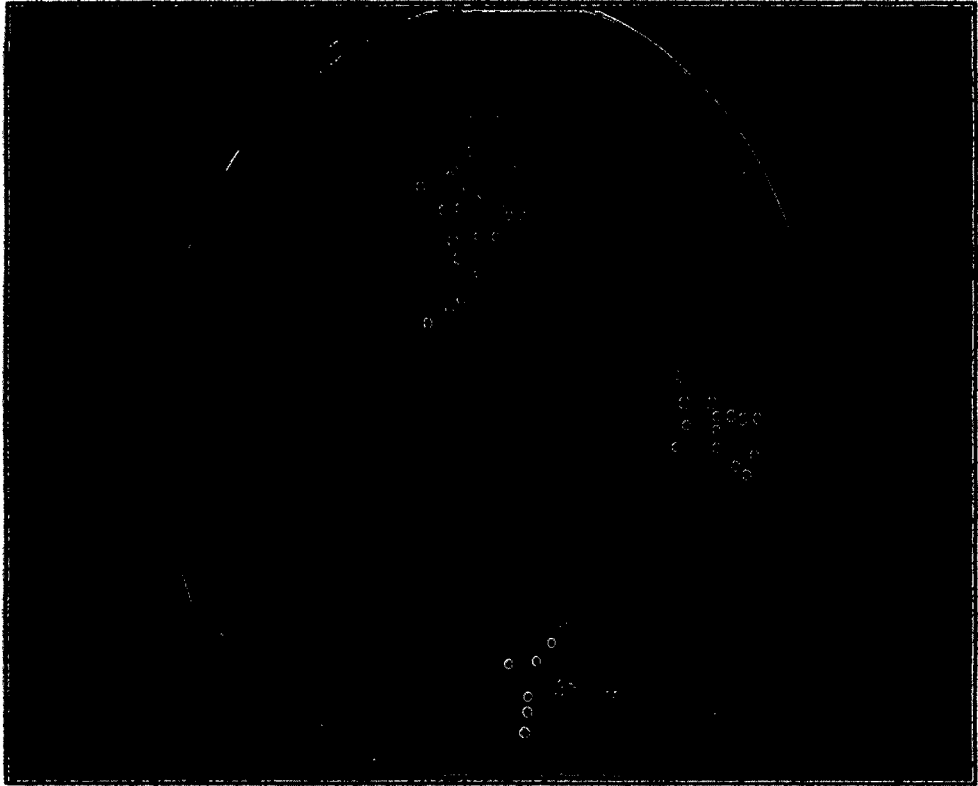
Fotografías N° 06. Producción tradicional (agitación manual), laboratorio de Rhizobiología – Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 2008.

ANEXON° 15



Fotografía N° 07. Recuento de rizobios producidos con agitación manual, laboratorio de Rhizobiología, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 2008.

ANEXO N° 16



Fotografía N° 06. Recuento de rizobios producidos con agitación magnética, laboratorio de Rhizobiología, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 2008.

RESPONSABLE: CYNTHIA CAROL MADUENO MADUENO.	
TÍTULO: Producción de biomasa de Rhizobium en un sistema de fermentación por lote con agitación.	
PROBLEMA <p>¿Cual será la fuente de carbono más apropiada y el efecto de la agitación constante para producir biomasa de <i>Rhizobium</i> en un sistema de fermentación por lote?</p>	OBJETIVO <p>Objetivo General: Incrementar la densidad de biomasa en un sistema de fermentación por lote con el carbohidrato más apropiado y agitación constante.</p> <p>Objetivos Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Seleccionar la fuente de carbono (manitol, glicerol, sacarosa) mas apropiada para las cepas de <i>Rhizobium</i> bv. <i>viciae</i>, <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> y <i>Rhizobium meliloti</i>. • Determinar el efecto de la agitación constante) en la producción de biomasa de <i>Rhizobium</i>.
MARCO TEÓRICO <p>1.0. Rizobios 2.0. Metabolismo del carbono 3.0. Metabolismo del nitrógeno 4.0. Requerimiento de vitaminas 5.0. Fijación biológica del nitrógeno 6.0. Inoculantes y control de calidad 7.0. Crecimiento de poblaciones 8.0. multiplicación de rizobios en medio liquido 9.0. Tecnología de Fermentaciones</p>	HIPÓTESIS <ul style="list-style-type: none"> • Con el uso del manitol como fuente de carbono y energía y la fermentación en agitación permitirá obtener mejores rendimientos en la tasa de crecimiento (biomasa)
VARIABLES <p>Variables Independientes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Agitación (Sin agitación y con agitación) • Fuente de carbono <p>Variable dependientes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tasa de crecimiento 	MÉTODO <p>Recuento de células viables en placa</p>

"Producción de biomasa de *Rhizobium* en un sistema de fermentación por lote con agitación"

Cynthia Carol Madueño Madueño, Nery Luz Santillana Villanueva, Fidel Rodolfo Mujica Lengua.

RESUMEN

En la presente investigación se planteó como objetivo principal Incrementar la carga microbiana de *Rhizobium* en un sistema de fermentación por lote, con el carbohidrato más apropiado y con agitación magnética, el cual fue realizado en el laboratorio de Rhizobiología del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNSCH, a 2750 m.s.n.m. El tipo de investigación fue experimental – aplicativo. Para la determinación de la carga microbiana de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Cepa1), *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Cepa2), *Rhizobium meliloti* (Cepa3), generadas en tres fuentes de carbono (manitol, sacarosa y glicerol) y producidos en agitación magnética y manual, se utilizó las técnicas de recuento de células viables en placas de Petri con medio LMA (Agar Extracto de Levadura y Manitol), y de cultivo de Mites y Misra descrito por Vincent (1975).

Se empleó el diseño completamente al azar con 2 repeticiones por tratamiento y se determinó el análisis de varianza para cada criterio de evaluación contrastando con la Prueba de Duncan (0.05).

La agitación magnética permitió obtener mayor carga microbiana para las cepas 1, 2, y 3 cargas de 84×10^7 UFC/ml, 83×10^7 UFC/ml, 83×10^7 UFC/ml respectivamente, en comparación de la carga obtenida con agitación manual que fue de 78×10^7 UFC/ml, 77×10^7 UFC/ml, 78×10^7 UFC/ml, resultado que tiene significancia estadística.

Con el uso del manitol como fuente de carbono se obtuvo mayor carga microbiana para las cepas 1, 2,3 que fue de: 86×10^7 UFC/ml, 84×10^7 UFC/ml, 82×10^7 UFC/ml, respectivamente en comparación con los otros azúcares.

Palabras clave: *Rhizobium*, biomasa, fermentación por lote

ABSTRACT.

In the present investigation she thought about as main objective to increase the microbial load of *Rhizobium* in a system of fermentation for lot, with the most appropriate carbohydrate and with magnetic agitation, which was carried out in the laboratory of Rhizobiología of the Program of Investigation in Grasses and Cattle raising of the Ability of Sciences Agrarian-UNSCH, to 2750 m.s.n.m.

For the determination of the microbial load of the stumps of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Cepa1), *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (Cepa2), *Rhizobium meliloti* (Cepa3), generated in three sources of carbon (manitol, sucrose and glicerol) and taken place in magnetic and manual agitation, it was used the techniques of recount of viable cells in badges of Petri with half LMA (Agar Extract of Yeast and Manitol), and of cultivation of Thousands and Misra described by Vincent (1975).

The design was used totally at random with 2 repetitions by treatment and the variance analysis was determined for each evaluation approach contrasting with the Test of Duncan (0.05).

The magnetic agitation allowed to obtain bigger microbial load for the stumps 1, 2, and 3 of 84×10^7 UFC/ml, 83×10^7 UFC/ml, 83×10^7 UFC/ml respectively, in comparison of the load obtained with manual agitation that was of 78×10^7 UFC/ml, 77×10^7 UFC/ml, 78×10^7 UFC/ml, result that he/she has statistical significance.

With the use of the manitol like source of carbon was obtained bigger microbial load for the stumps 1, 2,3 that it was of: 86×10^7 UFC/ml, 84×10^7 UFC/ml, 82×10^7 UFC/ml, respectively in comparison with the other sugars.

key Words: *Rhizobium*, biomass, batch fermentation.

INTRODUCCIÓN

La multiplicación de las bacterias del género *Rhizobium* en medio líquido es uno de los factores que debe ser considerado en la producción de inoculantes. Es por ello que se realizan muchas investigaciones sobre la cinética de crecimiento de estas bacterias. Actualmente las industrias de inoculantes tienden a introducir las más rigurosas técnicas que permitan obtener altas densidades y alta productividad con uso de biorreactores. El Laboratorio de Rhizobiología del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería produce inoculantes desde hace 40 años y cuenta con una metodología de producción de inoculantes, que urge actualizar acorde a las normas vigentes optimizando algunas variables como la multiplicación y la sobrevivencia de las cepas de rizobios en medio líquido y en soporte. La biomasa es producida en Caldo Extracto de Levadura y Manitol (LMC) en balones de vidrio de 2 litros con un litro de medio, el cual es agitado manualmente una o dos veces al día lo que causa la sedimentación de los nutrientes requeridos por los rizobios. Esto se presenta como un problema por limitar a la bacteria de los nutrientes que se encuentran sedimentados, para lo cual se realizó el diseño de un fermentador de tipo batch de 6 litros de capacidad, con sistema de agitación magnética; el cual permitió mantener en suspensión los nutrientes necesarios para dichas bacterias en un ambiente adaptado con temperatura adecuada para el crecimiento óptimo de los rizobios, probándose el crecimiento de la biomasa con diferentes fuentes de carbono (glicerol, manitol y sacarosa). Dentro de este contexto, se establecieron los siguientes objetivos:

- el carbohidrato más apropiado y agitación constante.
- Seleccionar la fuente de carbono (manitol, glicerol ó sacarosa) mas apropiada para las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, y *Rhizobium meliloti*.
- Determinar el efecto de la agitación constante (80 rpm) en la producción de biomasa de cepas de *Rhizobium*.

MATERIALES Y MÉTODOS. El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Rhizobiología del Programa de Investigación en Pastos y Ganadería de la Facultad de Ciencias Agrarias- UNSCH. A una altitud de 2,750.m.s.n.m.

Diseño experimental: El experimento se conducirá con el diseño completamente al azar con 2 repeticiones por tratamiento.

Material biológico: Se utilizaron 3 cepas de *Rhizobium* con reconocida capacidad simbiótica.

- * *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*
- * *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*
- * *Rhizobium meliloti*

Análisis estadístico: Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el análisis de varianza con un modelo factorial (A: Fuente de carbono y B: Tipo de fermentación) y la prueba de Duncan a un nivel de significación de 0.05; para ver las diferencias entre los tratamientos.

RESULTADOS

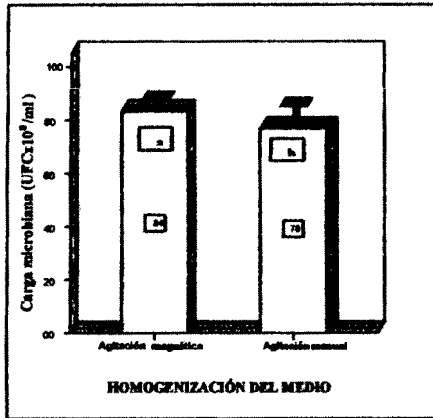


Gráfico N° 01. Evaluación de la producción de células viables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* en función a la homogenización del medio.

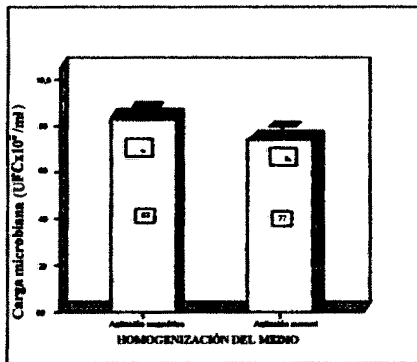


Gráfico N° 02. Evaluación de la producción de células viables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* en función a la homogenización del medio

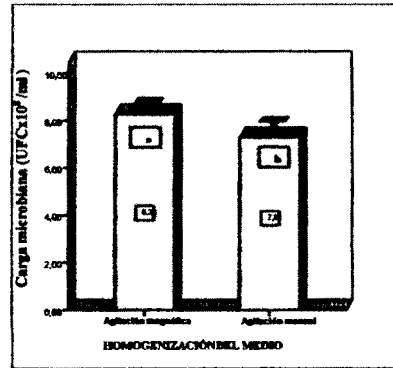


Gráfico N° 03. Evaluación de la producción de células viables de *Rhizobium meliloti* en función a la homogenización del medio.

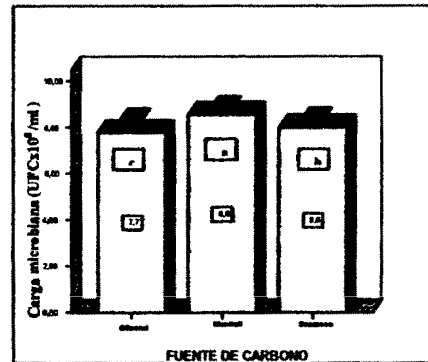


Gráfico N° 04. Evaluación de la producción de células viables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* generadas en tres fuentes de carbono.

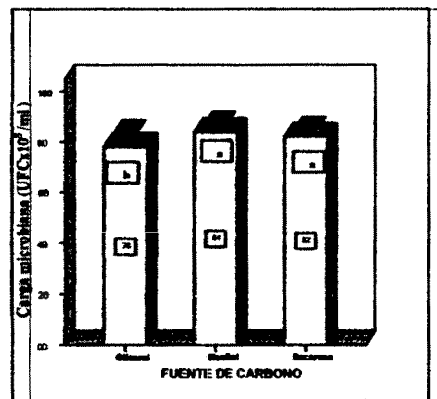


Gráfico N° 05. Evaluación de la producción de células viables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* generadas en tres fuentes de carbono.

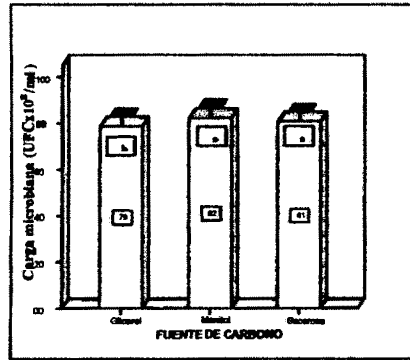


Gráfico N° 06. Evaluación de la producción de células viables de *Rhizobium meliloti* generadas en tres fuentes de carbono.

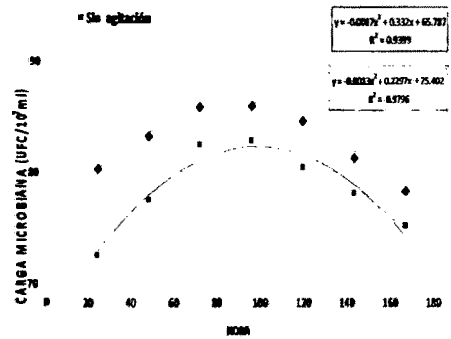


Gráfico N° 09. Cinética de crecimiento de *Rhizobium meliloti* en función a la homogenización del medio.

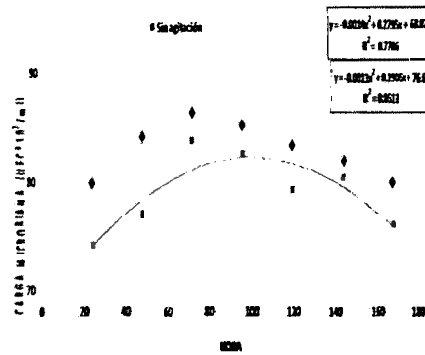


Gráfico N° 07. Cinética de crecimiento expresado en logaritmo de *Rhizobium leguminosarum bv. viceae* en función a las homogenización del medio.

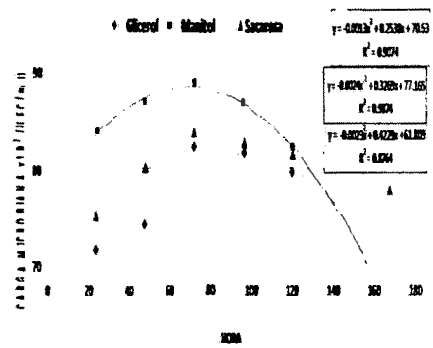


Gráfico N° 10. Cinética de crecimiento de *Rhizobium leguminosarum bv. viceae* en tres fuentes de carbono.

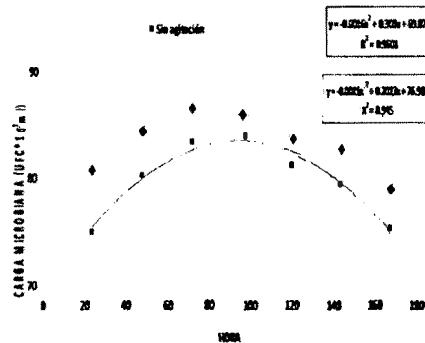


Gráfico N° 08. Cinética de crecimiento de *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii* en función a la homogenización del medio.

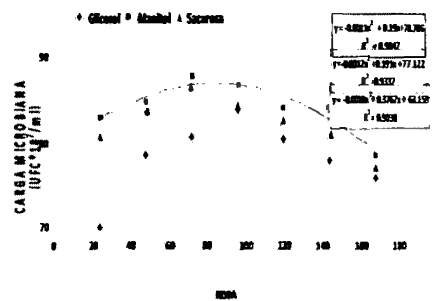


Gráfico N° 11. Cinética de crecimiento de *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii* en tres fuentes de carbono.

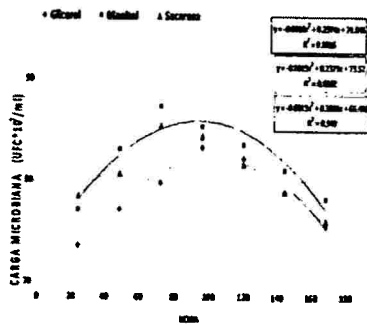


Gráfico N° 12. Cinética de crecimiento de *Rhizobium meliloti* generadas en tres fuentes de carbono.

DISCUSIÓN

En el Gráfico N° 01, muestra los resultados de la prueba de Duncan respecto a la evaluación de la producción de células viables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* en función a la homogenización del medio, donde se puede apreciar que la agitación magnética permitió obtener una carga microbiana de 84×10^7 UFC/ml, mientras que la agitación manual (metodología tradicional) obtuvo 78×10^7 UFC/ml.

Al respecto podemos manifestar que la agitación magnética permitió obtener mejores resultados que la agitación manual, resultado que se debe al contacto entre las fases del medio producto de una agitación constante, evitando de esta manera la sedimentación de los nutrientes y creando un medio homogéneo, estos resultados concuerdan con las experiencias reportadas por Santillana (2004), al emplear biorreactor de tanque agitado para la multiplicación de las cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* que permitió obtener cargas microbianas del orden de 10^9 UFC/ml. Balatti et al., (1992) menciona que en la producción de la masa celular de rizobios son varios los factores influyentes; la tensión del oxígeno, la agitación, la composición y volumen del medio, la concentración celular del inóculo y las condiciones de operación.

En el Gráfico N° 02, muestra la evaluación de la producción de células viables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* en función a la Homogenización en la cual se aprecia que la agitación magnética permitió obtener 83×10^7 UFC/ml, mientras la agitación manual 77×10^7 UFC/ml,

En el Gráfico N° 03, muestra los resultados de la prueba de Duncan para la evaluación de la producción de células viables de *Rhizobium meliloti* en función a la homogenización del medio, donde la fermentación producida con agitación magnética se diferencia de manera significativa con una carga microbiana obtenida de 83×10^7 UFC/ml en comparación con la fermentación producida con agitación

manual que obtuvo una carga microbiana de 78×10^7 UFC/ml.

En el Gráfico N° 04, muestra la evaluación de la producción de células viables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* generadas en tres fuentes de carbono donde los rangos asignados por la prueba de Duncan (a,b,c), muestran las diferencias entre los tratamientos, siendo el manitol el carbohidrato que permitió obtener mayor carga microbiana de 86×10^7 UFC/ml, seguidos por la Sacarosa con una carga microbiana obtenida de 80×10^7 UFC/ml, y el Glicerol reportó valores de 77×10^7 UFC/ml. Al respecto ponemos manifestar que esta preferencia por el manitol como fuente de carbono se deba posiblemente a la adaptación bioquímica de las enzimas presentes en la cepa al medio de cultivo Caldo extracto de levadura y manitol (LMC), donde es producida constantemente y posiblemente tome la vía metabólica mas corta. Ormeño et al., (1998), indican que es posible utilizar la glicerina y el glutamato de sodio de grado comercial para remplazar el manitol y el extracto de levadura en medio LM sin afectar el crecimiento ni la efectividad simbiótica en cepas de *Bradyrhizobium* sp.

En el Gráfico 05, muestra la evaluación de la producción de células viables de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* generadas en tres fuentes de carbono (manitol, glicerol y sacarosa), donde se observa rangos asignados por la prueba de Duncan, donde el manitol y la sacarosa muestran igualdad estadística registrándose una carga microbiana de 84×10^7 UFC/ml y 82×10^7 UFC/ml respectivamente, mientras el glicerol reportó menor carga microbiana de 78×10^7 UFC/ml.

En el Gráfico 06, muestra los resultados de la prueba de Duncan sobre la evaluación de la producción de células viables de *Rhizobium meliloti* generadas en tres fuentes de carbono (manitol, sacarosa y glicerol), donde el manitol reportó una carga microbiana de 82×10^7 UFC/ml y la sacarosa 81×10^7 UFC/ml que según la prueba de Duncan se les ubica en el mismo rango estadístico (a,a) lo que significa que ambos carbonos tienen el mismo efecto, con el uso de glicerol como fuente de carbono no se obtuvo los mismos resultados, demostrando ser menos eficiente en la preferencia nutricional de esta cepa, obteniendo una carga microbiana de 79×10^7 UFC/ml, por lo cual es ubicado en un rango inferior (b) que el manitol y la sacarosa.

Los Gráficos 07,08, 09, muestran la cinética de crecimiento de las cepas 1, 2,3, según la homogenización del medio donde se observa de manera conjunta que las cepas producidas en fermentador con agitación magnética comenzó a las 24 horas la fase exponencial, llegando a su punto máximo de crecimiento a las 72 horas, obteniendo mayor carga microbiana que el producido en fermentador sin agitación (agitación manual) . comenzando después de las 72 horas la fase estacionaria hasta las 96 horas y posteriormente la fase de declive hasta las 168 horas. La fermentación sin agitación inició la fase exponencial a las 24 horas y llegó a su máximo crecimiento a las 72 horas, pero llegando

a obtener menor carga microbiana que el producido con agitación estos resultados se debe al efecto de la agitación, que asegura un buen contacto entre las fases del medio.

Los Gráficos 10, 11, 12, muestran la cinética de crecimiento de las cepas 1, 2,3 generadas entres fuentes de carbono (manitol, sacarosa, y glicerol).Donde se observa que la fermentación con manitol como fuente de carbono obtuvo mayor carga microbiana, carbono comenzando la fase exponencial a las 24 horas, llegando al punto máximo de crecimiento a las 72 horas donde se obtuvo la mayor carga microbiana. La sacarosa y glicerol permitió obtener menor carga microbiana. Santillana (1994), reporta el estudio de la cinética de crecimiento utilizando el medio Extracto de levadura manitol-sacarosa, donde obtuvo mayor carga microbiana para las cepas SEMIA 222, T154, T107 en relación c la cepa SEMIA 234, la cepa SEMIA 222, después de 60 horas de incubación alcanzaron la mayor carga microbiana manteniendo hasta el final del experimento, mientras que las cepas SEMIA 235 y T107 presentaron una declinación marcada a partir de las 60 horas hasta las 120 horas. La carga microbiana fue mayor para la cepa SEMIA 222 (0.31h⁻¹). La cepa SEMIA 235 presentó menor tasa de crecimiento (0.18h⁻¹). Esas características son muy importantes cuando se trata de la selección de cepas para la producción de inoculantes, pues estirpes con menor tiempo de generación y mayor tasa de crecimiento aseguran menor tiempo de permanencia en el fermentador, lo que evita problemas de contaminación y optimiza el proceso de producción.

REFERENCIAS

1. Balatti, A. (1992). Tecnología de las fermentaciones aplicadas a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* conferencia dictada durante la XVI Reunión Latinoamericana de Rhizobiología. Universidad Nacional de la Pampa.
2. Day, J.M. (1991). Inoculant production in the U.K. pp.75-86. En: Report on The Expert Consultation on Legume Inoculant Production and Quality Control. Roma.
3. Lopez, E. (2004). A view on the technology of inoculation in Brazil: present situation and perspectives" 22nd Latin-american Conference on Rhizobiology, EMBRAPA – Agrobiología. 13-15 september 2004. Brasil.
4. Ormeño, E. Zufiga, O. y Matos, G (1998). Utilización de glicerol y glutamato de sodio para el cultivo de *bradyrhizobium* sp. (*phaseolus lunatus*). Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima.
5. Santillana, N. (2004). Optimización de la Producción y calidad de los Inoculantes Rizomack. Ayacucho- Perú.
6. Urenha, L., Pradella, J., Oliveira, M., Bonomi, A. (1994). Produção de biomassa celular de rizobio. Manual de

métodos empregados em estudos de Microbiologia Agrícola. Hungria, M., e Araujo, S. (Eds) EMBRAPA- CNPAF. Brasília.

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bach. Cynthia Carol Madueño Madueño.

R.D. Nº 269-2009-FCB- D

En la ciudad de Ayacucho a los dieciocho días del mes de setiembre del dos mil nueve en el Auditorium de la Facultad de Ciencias Biológicas, siendo las tres y veinticinco de la tarde. Se reunieron los miembros del Jurado Calificador presidido por el M.B. José A. Yarlequé Mujica e integrado por el Mg. Fidel R. Mujica Lengua, Mg. Paula García Godos Alcázar y Dr. Victor Alegría Valeriano, actuando como Secretaria Docente la Mg. Marta Romero Viacava; para la sustentación de tesis, titulada: **Producción de biomasa de Rhizobium en un sistema de fermentación por lote con agitación**, presentada por la **Bachiller EN Ciencias Biológicas Cynthia Carol Madueño Madueño**, con la cual pretende obtener el Título Profesional de Bióloga, en la Especialidad de Microbiología.

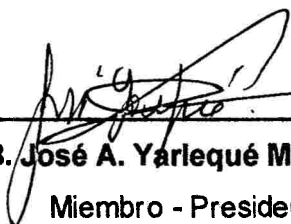
El presidente invitó a la Secretaria Docente a dar lectura a la documentación pertinente y dio inicio a la exposición del trabajo. Concluida la exposición, el presidente invitó a los miembros del Jurado Calificador a realizar las observaciones y preguntas pertinentes.

Concluidas las preguntas y respuestas, el presidente invitó a los docentes a calificar, para lo cual invitó a la sustentante y público en general a abandonar el auditorio, siendo el resultado, el siguiente:

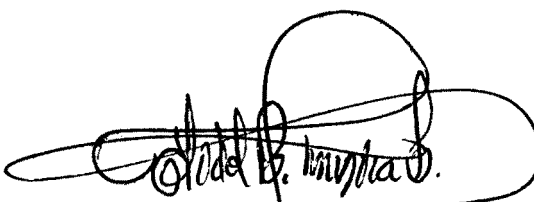
MIEMBRO JURADO	EXPOSICIÓN.	RPTA.PREGUNTAS.	PROMEDIO
Mg. Fidel Mujica Lengua	17	16	17
Mg. Paula García Godos	16	15	16
Dr. Victor Alegría Valeriano	17	16	17
		Promedio final	17

Como resultado de la evaluación la sustentante obtuvo la nota promedio de **diecisiete (17)** de la misma que dan fe los miembros del Jurado Calificador estampando su firma al final del acta.

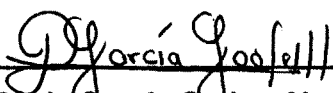
Siendo las cinco y veinte de la tarde finalizó el acto de sustentación la sustentación.




M.B. José A. Yarlequé Mujica
Miembro - Presidente




Mg. Fidel R. Mujica Lengua
Miembro - Asesor



Mg. Paula García Godos Alcázar
Miembro



Dr. Víctor Alegría Valeriano
Miembro



Mg. Marta Romero Viacava
Secretaria - Docente