

# OBTENCION DE CULTIVOS DE *Azospirillum brasilense* Az 39 EN SISTEMAS CON Y SIN CONTROL AUTOMATICO DE pH.

MARIA DE LAS MERCEDES ALCARAZ, MARIA DELIA PASTOR y A.P. BALATTI<sup>(1)</sup>

Recibido: 17/06/95

Aceptado: 20/12/95

## RESUMEN

En el presente trabajo se estudia el desarrollo de una cepa de *Azospirillum brasilense* Az 39 bajo diferentes condiciones de medio y operación. Las experiencias fueron realizadas en la escala de frascos agitados y en fermentador de laboratorio con agitación mecánica y control de pH. Empleando un medio que recomienda la bibliografía, se estudió la influencia de: la naturaleza y concentración de fosfato, concentración de extracto de levadura y de fuente de carbono, con y sin control automático de pH. Empleando un medio que contiene (g/l): ácido málico, 10; extracto de levadura, 4;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 6;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02; NaCl, 0,01;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,02; Edta-Fe, 0,0164 y una solución de micronutrientes, y operando en fermentadores con control automático de pH se produce un notable incremento en la concentración de biomasa, alcanzándose valores de  $2 \cdot 10^{10}$  células viables/ml a las 48 horas de proceso.

**Palabras clave:** *Azospirillum*, biomass, pH control.

## CELLULAR GROWTH OF AN *Azospirillum brasilense* Az 39 STRAIN UNDER DIFFERENT OPERATIVE CONDITIONS

### SUMMARY

The cellular growth of an *Azospirillum brasilense* Az 39 strain under different operative conditions has been studied. Experiments have been carried out with both shaken erlenmeyers flasks, and mechanically stirred laboratory fermentors with a pH control. Using a medium recommended by literature, the influence of phosphate nature and concentration, yeast extract concentration and carbon source concentration, with and without automatic pH control, have been selected. A culture medium containing (g/l): malic acid, 10; yeast extract, 4;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 6;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02; NaCl, 0,01;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,02; Edta-Fe, 0,0164 and a solution of micronutrients has been used. In experiments performed in fermentors with a pH automatic control, a remarkable increased of biomass concentration is obtained. Values of  $2 \cdot 10^{10}$  viable cells/ml have been obtained after a 48 hours process.

**Key words:** *Azospirillum*, biomass, pH control

### INTRODUCCION

El cultivo de cepas del genero *Azospirillum* ha sido estudiado por diversos autores (Albrecht *et al.*, 1980; Bashan, 1986; Berg *et al.*, 1980; Bergensen, 1980; Das *et al.*, 1983; Dobreiner *et al.*, 1987; Eskew *et al.*, 1977; Fages *et al.*, 1991; Ferreyra *et al.*, 1987; Gamo *et al.*, 1991; Goebel, 1984; Hartmann *et al.*, 1987; Loh *et al.*, 1984; Magalhaes *et al.*, 1983; Mukherjee *et al.*, 1987; Okon *et al.*, 1991; Westby *et al.*, 1983; Westby, 1987 and Wong *et al.*, 1979). En el desarrollo de las mismas se utilizó principalmente ácido málico, como fuente

<sup>(1)</sup>Programa de Microbiología y Química Agrícola (PROMIQA). Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UNLPam. Avda Uruguay 151. TE: 0954-25166. FAX: 0954-32679. Santa Rosa. La Pampa. C.P. 6300. Argentina.

de carbono. La concentración de microorganismos alcanzada con estos medios fue de  $10^9$  células viables/ml. En cuanto al diseño de los medios se encontraron dificultades fundamentalmente en lo que se refiere a la evolución del pH en relación al crecimiento celular. Según las consideraciones anteriores, en el presente trabajo se estudió en una primera etapa, el desarrollo de un medio en la escala de frascos agitados donde se consideró la influencia de la concentración de fosfatos, factores de crecimiento y del agregado de fuente de carbono al inicio y durante el proceso. Posteriormente, en escala de fermentadores de laboratorio, operando el sistema para condiciones que satisfacen las necesidades respiratorias de las cepa y empleando un medio seleccionado en erlenmeyers en agitador rotatorio, se realizaron experiencias con un sistema de control de pH a fin de poder regular su valor, con el propósito de incrementar la concentración de biomasa del medio de cultivo.

#### MATERIALES Y METODOS

**Microorganismo:** Los experimentos se realizaron con una cepa de *Azospirillum brasilense* Az 39, suministrada por el Ing. Enrique Rodríguez Cáceres. IMYZA. INTA Castelar. Prov. de Buenos Aires. Es de destacar que esta cepa ha sido utilizada en ensayos de inoculación a campo con resultados promisorios en trigo, obteniéndose un incremento en la producción del 20 % y en ensayos con *Setaria italica* el aumento observado fue del 21 %. (Rodríguez Cáceres *et al.*, 1992; Rodríguez Cáceres, comunicación personal; Di Ciocco *et al.*, 1994).

Esta cepa fue repicada en tubos con agar inclinados en el medio base (Cuadro N° 1) y conservada en heladera a 5° C. Además se desarrolló la cepa en medio líquido y la suspensión fue congelada en alícuotas en tubos adicionados con un 20 % de glicerol (Balatti, 1992).

**Medios de cultivo:** En una primera serie de experiencias se utilizaron los medios 4 y 5 (Cuadro N° 1) que corresponden a los seleccionados por diferentes especialistas (Bergey, 1984; Rodríguez Cáceres, 1982; Krieg y Dobreiner, 1984), sobre los mismos se hicieron modificaciones en lo que concierne a naturaleza y concentración del buffer, concentración de la fuente de factores de crecimiento y forma de agregado de la fuente de carbono (al comienzo y durante el proceso). Todos los medios fueron llevados a un valor de pH 6,9 con ácido sulfúrico 0,1 N antes de esterilizar.

En los estudios realizados en fermentador con agitación mecánica utilizando el medio seleccionado en la escala de agitador rotatorio, se condujeron procesos con y sin control automático de pH.

**Crecimiento Celular:** Se evaluó el crecimiento celular utilizando el método de dilución en serie (Koch, 1981) empleando el medio 3 (Cuadro N° 1).

**Condiciones de Operación:** Los inóculos se prepararon a partir del medio 1 (Cuadro N° 1) con 50 ml de medio en erlenmeyers de 250 ml. Se sembraron con anza de platino proveniente del medio agarizado mantenido en heladera. Los procesos se iniciaron con 10 % de transferencia en erlenmeyers de 500 ml con 100 ml de medio. Para el desarrollo de los mismos se utilizó un agitador rotatorio de 250 r.p.m. y 2,5 cm de excentricidad en cámara de cultivo climatizada a 28° C. En todos los casos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a una temperatura de 121° C durante 20 minutos.

La siembra del proceso en el fermentador, fue realizada por medio de una bomba peristáltica, manteniendo la relación de transferencia del 10 %, asegurando una concentración inicial de  $10^7$  células viables/ml

Se utilizó un fermentador con dos turbinas de cuatro paletas cada una y un diámetro de 8 cm, separadas 18 cm entre sí; una de ellas se empleó como rompedor de espuma, el diámetro del frasco fue de 15 cm y la altura de 35,5 cm. El equipo poseía 4 cortacorrientes de 1,5 cm de ancho. La conexión a monitores permitió obtener medida de pH por medio de un electrodo esterilizable marca INGOLD y control por agregados automáticos de ácido o alcali por medio de bombas peristálticas, en estos ensayos se hicieron agregados periódicos de una mezcla de ácido málico y sulfúrico. Dicha mezcla contuvo 12,5 g de ácido málico con el fin de completar 10 g/l de fuente de carbono en el medio de cultivo y 100 ml de ácido sulfúrico 2 N. Ambos ácidos proveen los miliequivalentes necesarios para neutralizar el medio de cultivo durante el proceso fermentativo. La presión parcial de oxígeno disuelto fue medida por un electrodo Ag-Pb y el control de espuma se realizó mediante el agregado automático con bomba peristáltica de emulsiones de silicona A.E. 33. El volumen de medio de cultivo en cada experiencia fue de 2,5 litros, el pH regulado a 7 antes de esterilizar y la temperatura mantenida automáticamente a 28° C durante el proceso.

Los procesos en fermentador fueron conducidos a 350 r.p.m. y un caudal de aire de 1 l/l.min. Estas condiciones fueron elegidas para satisfacer los requerimientos de oxígeno de la cepa, cuyo valor de consumo específico determinado por el método de Warburg (Umbreit, 1972) fue de 60 ml de O<sub>2</sub>/g.h. La velocidad de absorción de oxígeno que se determinó en frascos

agitados y en fermentador para las condiciones utilizadas, aplicando el método del sulfito, estuvieron en el orden de 500 ml O<sub>2</sub>/l.h; (Cooper *et al.*, 1944).

**RESULTADOS**

**Influencia de la naturaleza y concentración de fosfato**

En experiencias preliminares y empleando los medios 4 y 5 (Cuadro N° 1) se observó que el pH, en procesos conducidos en erlenmeyers, tenía una evolución hacia valores muy alcalinos. (9,5-10), alcanzandose niveles del orden de 3,10<sup>8</sup> células viables/ml a las 48 horas de proceso. De acuerdo con

estos resultados se hicieron nuevos experimentos donde se modificó la naturaleza y concentración de fosfato, reemplazando los 6 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> por 6 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. En estas nuevas condiciones, empleando ese medio, la evolución de pH no superó valores cercanos a 9, obteniéndose además un pequeño incremento en la concentración celular, 5,10<sup>8</sup> células viables/ml.

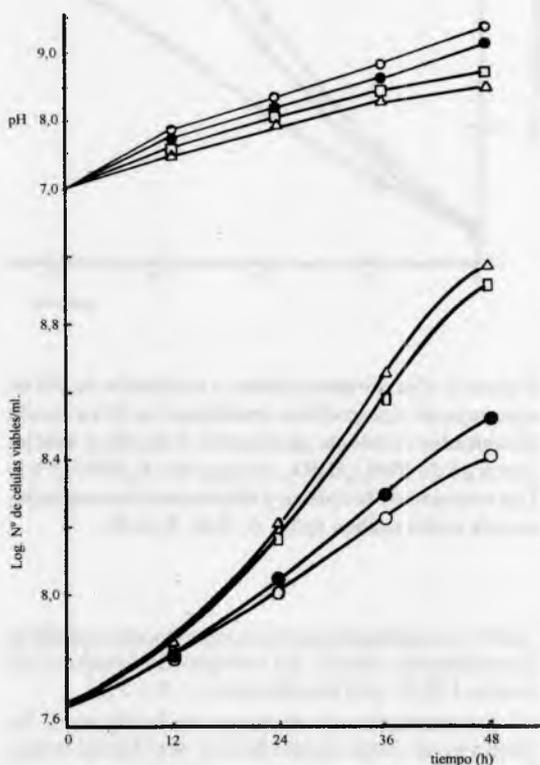
**Influencia de la concentración del extracto de levadura**

Utilizando el medio modificado en su capacidad buffer, integrado el mismo por KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y (NH<sub>4</sub>)

**Cuadro N° 1. Composición de los medios de cultivo utilizados en los procesos en estudio**

g/l	1	2	3	4	5
Acidometálico	5	5	5	5	5
K <sub>2</sub> HP04	0,5	0,5	0,5	0,5	6,0
KH <sub>2</sub> P04					4,0
MgS04.7 H <sub>2</sub> O	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
NaC l	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
A.B.T.	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Solde micro-nutrientes	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
EDTA-Fe	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
NH <sub>4</sub> Cl				1,0	1,0
Ext. de levadura Agar		18,6	20,0		
Rojo Congo (sol.1/400)			15,0 ml		

Medios: 1, Inóculo; 2, Mantenimiento; 3, Recuento Celular; 4 y 5, Proceso.  
 Composición de la solución de micronutrientes (mg/l): CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O, 0,1; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 3; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 18; ZnCl<sub>2</sub>, 25; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 50; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0,15 y CoCl<sub>2</sub>, 0,6.  
 Todos los medios son neutralizados antes de esterilizar



**Figura 1. Crecimiento celular y evolución de pH de una cepa de *Azospirillum brasilense Az 39* en escala de agitador rotatorio en el medio 5 donde se reemplaza 6 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> por igual concentración de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y adición de cantidades variables de extracto de levadura (g/l)**  
 ○ 0,7; ● 1,0; △ 4,0; □ 5,0.

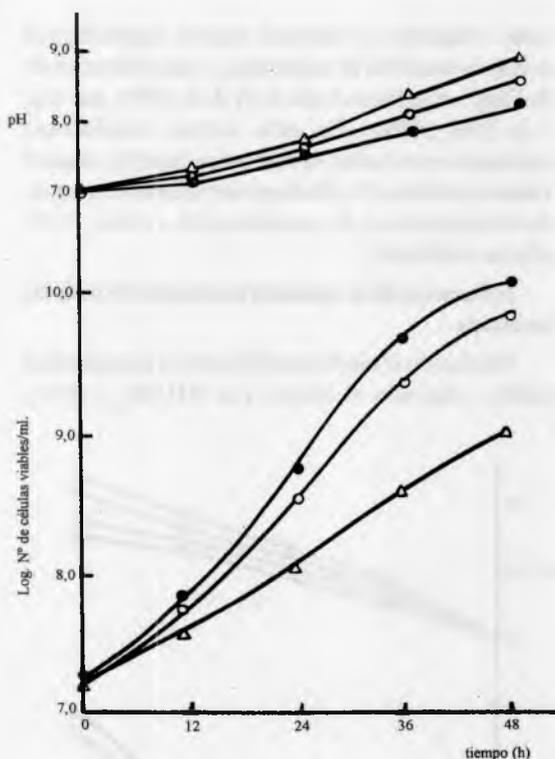


Figura 2. Crecimiento celular y evolución de pH de una cepa de *Azospirillum brasilense* Az 39 en escala de agitador rotatorio en el medio 5 donde se adicionan 6 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  en lugar de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 4 g/l de extracto de levadura y diferentes concentraciones de ácido málico (g/l);  $\Delta$  5;  $\circ$  8;  $\bullet$  10.

$\text{HPO}_4$ , se realizaron nuevos experimentos donde la concentración inicial del extracto de levadura del medio 5 (0,07 g/l) fue elevada a 1, 4 y 5 g/l.

Los resultados se muestran en la Figura 1. Se observa que existe una evolución de pH todavía más favorable con valores máximos al final del proceso de 8,5; alcanzándose concentraciones del orden de  $1,10^9$  células viables/ml a las 48 horas de proceso.

#### Influencia de la concentración de la fuente de carbono

Utilizando un medio modificado en la concentración de fosfatos y con la adición de 4 g/l de extracto

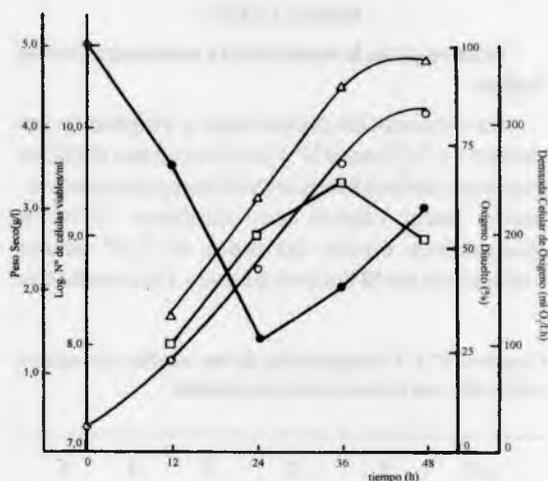


Figura 3. Crecimiento celular oxígeno disuelto y demanda celular de oxígeno en proceso de desarrollo de *Azospirillum brasilense* Az 39 en fermentador con agitación mecánica empleando el medio 5 modificado; donde se adicionan 6g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  en lugar de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4 g/l de extracto de levadura, control automático de pH, adicionando durante el proceso 10 g/l de ácido málico y 100 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N;  $\circ$  log N° células viables/ml;  $\Delta$  peso seco;  $\bullet$  oxígeno disuelto (%);  $\square$  demanda celular de oxígeno.

de levadura, se hicieron experiencias con diferentes concentraciones de ácido málico, las mismas fueron de 5, 8 y 10 g/l. El agregado de mayor cantidad de ácido málico favorece el desarrollo de una mayor concentración de células (Figura 2).

La adición del ácido málico se realizó ya sea agregando toda la fuente de carbono al comenzar el proceso o durante el desarrollo del mismo. La concentración final alcanzada fue del orden de  $1,10^{10}$  células viables/ml a las 48 horas de proceso y similar en ambos casos. Es importante destacar que los valores de pH no superaron el valor 8,5 durante el proceso.

### Desarrollo de procesos con control automático de pH

En la figura 3 se presentan los resultados obtenidos en un proceso con control automático de pH. Se observa que cuando se controla el pH en un rango de 7-7,5 se produce un incremento en la concentración de biomasa, alcanzándose a las 48 horas valores del orden de  $10^{10}$  células viables/ml.

En procesos conducidos en fermentador, en las mismas condiciones, sin control automático de pH, la concentración final fue inferior a  $8,10^9$  células viables/ml.

### DISCUSION

Analizando los resultados que corresponden a experimentos preliminares de desarrollo de células utilizando los medios 4 y 5 recomendados por la bibliografía (Cuadro N° 1), los bajos valores alcanzados, inferiores a  $3,10^8$  células viables/ml, se debían relacionar con los altos valores de pH que se alcanzan ya a las 36 horas de proceso. En cambio, cuando se reemplazaba el  $K_2HPO_4$  por  $(NH_4)_2HPO_4$ , la evolución del pH era hacia valores menos alcalinos, esto traía aparejado un incremento en la concentración celular. Ese comportamiento del pH de este medio podría ser atribuido a que existe un consumo selectivo del ión amonio lo cual se traduce en una mejora del proceso.

Por otra parte si se considera la Figura 1, se observa todavía que el incremento de la concentra-

ción de extracto de levadura a niveles de 4 g/l producía un efecto favorable en la obtención de biomasa, lo cual puede ser atribuido a que el microorganismo pueda utilizar algunos aminoácidos o vitaminas en mayor disponibilidad, esto también conduciría a que el pH del cultivo evolucione a valores menos alcalinos.

Si se analizan los resultados de la Figura 2 surge claramente el notable incremento celular que se obtenía cuando la concentración de ácido málico era duplicada, alcanzándose valores del orden de  $1,10^{10}$  células viables/ml. Es de destacar que la evolución de pH para esos desarrollos está dentro de los valores aceptables que permiten todavía un buen crecimiento.

Si se consideran los experimentos realizados en fermentador, la evolución de la concentración de oxígeno disuelto nos está indicando y confirmando que no existía limitación durante el proceso (Drew, 1981). Por otra parte, el sistema de suministro de la fuente de carbono (ácido málico) durante el mismo, junto con la solución de ácido sulfúrico, establecían condiciones favorables que se traducen en el aumento de la concentración celular, manteniéndose el pH en valores cercanos a la neutralidad. Como era de esperar la utilización de un sistema de control automático de pH representa una técnica segura para poder determinar rangos de esa variable que pueden permitir un mejor crecimiento de la cepa evitando anormales variaciones que se deben al metabolismo que se producen en los medios cuyo control no se realiza.

### BIBLIOGRAFIA

- ALBRECHT, S.L. and Y. OKON, 1980. Cultures of *Azospirillum*. *Methods Enzimology*. 69: 740-749.
- BALATTI, A.P. 1992. Producción de Inoculantes para Leguminosas. Tecnología de la Fermentaciones Aplicada a los Géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Ed. Trabuco. Cap 2. p 29.
- BASHAN, Y. 1986. Enhancement of Wheat Root Colonization and Plant Development by *Azospirillum brasilense*. Cd. Following Temporary Depression of Rhizosphere Microflora. *Appl. and Environ. Microbiol.* 51, N° 5: 1067-1071.
- BERG, R.H.; M.E. TYLER; V. VASIL, and I.K. VASIL, 1980. Biology of *Azospirillum-Surgarcane* Association: Enhancement of Nitrogenase Activity. *Appl. and Environ. Microbiol.* 39, N° 3: 642-649.
- BERGERSEN, F.J. 1980. Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. John Wiley & Sons. New York.
- BERGEY, D.B. 1984. Manual of Sistematic Bacteriology. Ed. Williams and Wilkins. 1: 90.
- COOPER, C.M.; G. FERNSTON, and S.A. MILLER, 1944. Gas Liquid Contactor. *Ind. Eng. Chem.* 36: 504-509.

- DAS, A. and A.K. MISHRA, 1983. Utilization of Fructose by *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 29: 1213-1217.
- DI CIOCCO, C.A.; E.A. RODRIGUEZ CACEREZ, 1994. Field Inoculation of *Setaria italica* with *Azospirillum spp.* in Argentine Humid Pampas- *Field Crops Research*. 37: 253-257.
- DREW, S.W. 1981. Liquid Culture. In: Manual methods in General Bacteriology-American Society for Microbiology. Washington D. C.: 151-176.
- DOBEREINER, J. and F. PEDROSA, 1987. The Genus *Azospirillum* *Contemporary Biocience*: 5-63.
- ESKEW, D.; FOCHT, D.D. and I.P. TING, 1977. Nitrogen Fixation, Denitrification, and Pleomorphic Growth in a Highly Pigmented *Spirillum liposferum*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 34, (5): 582-585.
- FAGES, J. and J.F. ARSAC, 1991. Sunflower Inoculation with *Azospirillum* and Other Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Plant and Soil*. 137: 87-90.
- FERREIRA, M.C.B.; M.S. FERNANDEZ, and J. DOBEREINER, 1987. Role of *Azospirillum brasilense* Nitrate Reductase in Nitrate Assimilation by Wheat Plants. *Biology and Fertility of Soils*. 4: 47-53.
- GAMO, T. 1991. *Azospirillum spp.* from Crops Roots: A Promoter of Plant Growth. *JARQ*. 24, (4): 253-259.
- GOEBEL, E.M. and N.R. KRIEG, 1984. Fructose catabolism in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum liposferum*. *J. Bacteriol.* 159: 86-92.
- HARTMANN, A. AND R.H. BURRIS, 1987. Regulation of Nitrogenase Activity by Oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum liposferum*. *J. of Bacteriol.* 169, (3): 944-948.
- KRIEG, N. and J. DOBEREINER, 1984. Genus *Azospirillum* in Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. 1 y 94.
- KOCH, A.L. 1981. Growth Measurement, in: Manual of Methods for General Bacteriology. Washington, D.C. *American Society for Microbiology*: 179-207.
- LOH, W.H.T.; RANGLES, C.I. and R.H. MILLER, 1984. Intermediary Carbon Metabolism of *Azospirillum brasilense*. *J. of Bacteriol.* 158, N° 1: 264-268.
- MAGALHAES, M.F.; J.I. BALDANI; S.M. SOUTO; J.R. KUYKENDALL, and J. DOBEREINER, 1983. A New Acid-Tolerant *Azospirillum* Species. *An. Acad. Brasil Ciencia*. 4: 55.
- MUKHERJEE, A. and S. GHOSH, 1987. Regulation of Fructose Uptake and Catabolism by Succinate in *Azospirillum brasilense*. *J. of Bacteriol.* 169, (9): 4361-4367.
- OKON, Y; S.L. ALBRECHT; and A. BURRIS, 1976. Carbon and Ammonia Metabolism of *Spirillum liposferum*. *J. of Bacteriol.* 128, (2): 592-587.
- RODRIGUEZ CACEREZ, E.A. 1982. Improved Medium for Isolation of *Azospirillum spp.* *Appl. Environ. Microb.* 990-991.
- RODRIGUEZ CACEREZ, E.A.; G. GONZALEZ ANTA; J.R. LOPEZ; C. DI CIOCCO; J.C. PACHECO BASURCO, y J.L. PARADA, 1994. Inoculación de trigo (*Triticum aestivum*) con bacterias diazotróficas en condiciones semiaridas. *Anales XVI RELAR*. Montevideo, Uruguay. pp: 259.
- UMBREIT, W.W.; R.H. BURRIS, and J.S. SAUFFER, 1972. The Warburg Constant Volume Respirometer. *Manometric and Biochemical Techniques*, Burgess Publishing Co.
- WESTBY, C.A.; C.S. ENDERLIN; N.A. STEINBERG; C.M. JOSEPH, and J.C. MEEKS, 1987. Assimilation of  $\text{NH}_4^+$  by *Azospirillum brasilense* Grown under Nitrogen Limitation and Excess. *J. of Bacteriology*. 169, (9): 4211-4214.
- WESTBY, C.A.; D.S. CUTSHALL, and G.V. VIGIL, 1983. Metabolism of various Carbon Source by *Azospirillum brasilense*. *J. of Bacteriol.* 156. (3). 1369-1372.
- WONG, P.P. and N.E. STENBERG, 1979. Characterization of *Azospirillum* Isolated from NITROGEN-Fixing Roots of Harvested Sorghum Plants. *Appl. and Environ. Microbiol.* 38, (6): 1189-1191.