

# ESTABILIZACIÓN Y SOBREVIVENCIA DE SUSENSIONES DE *Sinorhizobium meliloti*. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS

GRACIELA S. LORDA; MARÍA D. PASTOR y A.P. BALATTI<sup>1</sup>

Recibido: 05/03/01

Aceptado: 30/08/01

## RESUMEN

En este trabajo se estudió la obtención de suspensiones de *Sinorhizobium meliloti* considerando el efecto de la aeración de los cultivos sobre la formación de exopolisacáridos celulares y su relación con la estabilización de las cepas en estudio. Se utilizaron dos cepas caracterizadas como Lq 51 y Lq 22 que fueron aisladas en nuestro laboratorio. Las experiencias de obtención de los cultivos fue realizada en la escala de frascos agitados bajo distintas condiciones de aeración (175 a 650 mlO<sub>2</sub>/l.h). Se determinó que la influencia de la aeración es variable y depende de cada cepa, alcanzándose concentraciones de polisacáridos del orden de 7 a 10 g/l. La sobrevivencia de los cultivos a los 6 meses con esa concentración de polímero fue del orden de 5 a 7 x 10<sup>8</sup> cél/ml, mostrando las células en ensayos de nodulación, que mantenían su capacidad de fijación de nitrógeno. Es de destacar que, si bien todavía es necesario realizar ensayos con mayor número de cepas, los resultados obtenidos en este trabajo podrían ser considerados en el desarrollo de inoculantes líquidos en razón de la buena estabilización de las suspensiones celulares.

**Palabras clave.** Inoculantes. *Sinorhizobium meliloti*. Exopolisacáridos.

## STABILIZATION AND SURVIVAL OF *Sinorhizobium meliloti* INFLUENCE OF THE EXOPOLYSACCHARIDE CONCENTRATION

### SUMMARY

In this work the obtention of *Sinorhizobium meliloti* suspensions was studied considering the influence of aeration on the exopolysaccharides formation. Our purpose was to study the relationship between exopolysaccharides concentrations, stabilization and survival rates of strains. Strains used were Lq 51 and Lq 22, isolated in our laboratory. The experiments were performed in Erlenmeyer flasks at 28°C, in a rotary shaker at 250 rpm and 2.5 cm of stroke, under different aeration rates (175 to 650 mlO<sub>2</sub>/l.h), established using different volumes of culture. It was determined that the influence of aeration is variable and depends on each strain. The polysaccharide concentrations obtained were of the order of 7 to 10 g/l. After six months, survival rates were of the order of 5 to 7x10<sup>8</sup> cell/ml, keeping the strains their symbiotic properties. The results obtained show that it is possible to apply this technique to liquid inoculant production due to the good stabilization rates of the *Sinorhizobium meliloti* suspensions.

**Key words.** Inoculants. *Sinorhizobium meliloti*. Exopolysaccharides.

## INTRODUCCIÓN

La sobrevivencia y estabilidad de suspensiones de microorganismos en inoculantes líquidos, manteniendo las cepas sus propiedades simbióticas,

son condiciones indispensables para lograr preparados de alta eficiencia. La hipótesis de trabajo planteada en estas investigaciones considera la obtención de suspensiones de *S. meliloti* con alta

<sup>1</sup>Instituto de Investigación y Desarrollo en Microbiología y Química Aplicada. Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam). Avda. Uruguay 151, TE: 02954-425166. (6300) Santa Rosa. La Pampa. ARGENTINA. FAX: 02954-432679. E-mail: balatti@exactas.unlpam.edu.ar.

concentración celular y de polímero. El objetivo se refiere a establecer condiciones tecnológicas que aseguren la formación de suspensiones celulares con alto contenido de exopolisacárido, a fin de asegurar la obtención de cultivos que presenten largos períodos de viabilidad conservando las cepas sus propiedades simbióticas. Si bien existen antecedentes sobre la producción de polisacáridos extracelulares a partir de cepas de *S. meliloti* (Van Worum, 1998) donde se menciona fundamentalmente la composición del medio de cultivo, en los experimentos de este trabajo, utilizando un medio base, se realizan estudios considerando principalmente la influencia de la aeración de los cultivos en relación a la formación de biomasa, exopolisacáridos celulares y propiedades fisiológicas de las cepas, especialmente en lo referente a su capacidad simbiótica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

Se utilizaron dos cepas de *Sinorhizobium meliloti*, Lq 22 y Lq 51, que han sido aisladas en los laboratorios del Instituto, caracterizadas por técnicas electroforéticas (multilocus isoenzimático) (Grassano *et al.*, 1996). Fueron mantenidas en un medio que contenía manitol, extracto de levadura, agar y sales (Cuadro N° 1, Medio 1). Los tubos fueron mantenidos en bolsas de polietileno (Balatti, 1996) y mantenidas a 5°C.

Cuadro N° 1. Composición de los medios de cultivo.

Componente (g.l <sup>-1</sup> )	Medio Mantenimiento (1)	Medio Proceso (2)
Sacarosa	-	10
Manitol	5	-
Extracto de levadura	2	4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	0,5
NaCl	0,1	0,1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2	0,2
KNO <sub>3</sub>	0,8	0,8
FeCl <sub>3</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0,008	0,008
MnSO <sub>4</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	0,008	0,008
Agar	14	--

El pH fue ajustado a 6,8 - 6,9 antes de la esterilización.

### Medios de cultivo

La composición del medio base (Medio 1) se describe en el Cuadro N° 1 (Balatti, *et al.*; 1991).

### Inóculo

El medio de cultivo para los inóculos fue similar al utilizado en los procesos, excepto que la fuente de carbono y los factores de crecimiento fueron al 50% de la concentración. El volumen transferido al medio proceso fue de alrededor del 10% del volumen del mismo. En todos los casos, la concentración inicial de microorganismos fue del orden de 10<sup>8</sup> cél/ml.

### Métodos analíticos

El crecimiento bacteriano fue determinado por medio de recuento de células viables, aplicando el método de Koch (1981).

La velocidad de absorción de oxígeno (VAO) fue medida por medio del método del sulfito (Cooper *et al.*, 1944).

La demanda celular de oxígeno fue medida en un respirómetro de Warburg a 28 °C (Umbreit, *et al.*, 1972).

La concentración de sacarosa fue determinada por el método de la antrona para carbohidratos totales (Manual of Methods for General Bacteriology, 1981).

La formación y cantidad de exopolisacárido fueron determinados de acuerdo a la precipitación con etanol según el método de Hebbbar, *et al.*, 1992 y a medidas de viscosidad empleando un viscosímetro Ostwald, a 21°C.

### Condiciones de operación

Los estudios fueron conducidos en escala de agitador rotatorio operando a 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad. Se trabajó con frascos Erlenmeyers de 500 ml con diferentes volúmenes de medio de cultivo: 100, 150, 200, 250 y 300 ml, a los efectos de determinar diferentes condiciones de aeración.

Las condiciones de proceso fueron seleccionadas de acuerdo a las velocidades de transferencia de oxígeno en relación al valor de demanda celular de oxígeno de los cultivos.

Para todos los ensayos, la esterilización se llevó a cabo a 121°C durante 20 minutos.

La temperatura de crecimiento fue de 28°C.

### Preparación de inoculantes líquidos acuosos

Los inoculantes líquidos fueron preparados utilizando diferentes concentraciones de células y de exopolisacárido, adicionados de 0,3 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,6 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, para regular el pH y 0,5M de sacarosa para regular la presión osmótica. (Marquis, 1994).

### RESULTADOS

Los valores de demanda celular de oxígeno para las diferentes cepas de *Sinorhizobium meliloti* utilizadas, fueron de 130 ml O<sub>2</sub>/l.h para la cepa Lq 22 y de 140 ml O<sub>2</sub>/l.h para la cepa Lq 51.

En el Cuadro N° 2 se muestran los valores de velocidad de absorción de oxígeno (VAO) correspondientes a diferentes condiciones de aeración. Las mismas fueron alcanzadas empleando distintas relaciones de volumen de líquido a volumen de frasco.

Como se puede apreciar en el Cuadro N° 2 existe una amplia gama de valores de aeración comprendidos entre 650 y 175 mlO<sub>2</sub>/l.h.

La producción de biomasa y formación de polisacárido estuvieron relacionadas con la aeración de los medios de cultivo. En las Figuras 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos en agitador rota-

torio utilizando la cepa *Sinorhizobium meliloti* Lq 51, desarrollada en el medio 2 (Cuadro N° 1). En la Figura 1 se muestran los resultados obtenidos para altas condiciones de aeración (VAO: 529 mlO<sub>2</sub>/l.h). La máxima concentración de células y de polisacárido fueron obtenidas a las 48 h de proceso, alcanzando valores de 6 x 10<sup>9</sup> cél/ml y 10,54 g/l, respectivamente. En la Figura 2 se presentan los resultados obtenidos utilizando bajos valores de aeración, correspondientes a un valor de VAO de 323 mlO<sub>2</sub>/l.h. Se muestra que la concentración máxima de células fue de 1x10<sup>9</sup> cél/ml y la concentración de exopolisacárido de 2 g/l. Las Figuras 3 y 4 corresponden a los resultados obtenidos en agitador rotatorio utilizando la cepa de *Sinorhizobium meliloti* Lq 22 y el medio de cultivo N° 2 (Cuadro N° 1). La Figura 3 corresponde a un proceso desarrollado a altos valores de agitación (VAO: 529 mlO<sub>2</sub>/l.h). La concentración de microorganismos fue del orden de 9x10<sup>9</sup> cél/ml a las 36 h de proceso, mientras que el máximo valor de exopolisacárido alcanzó 4,57 g/l a las 72 h de proceso. En condiciones de baja aeración (VAO: 323 ml O<sub>2</sub>/l.h), la máxima concentración de células estuvo en el orden de 9x10<sup>9</sup> cél/ml (Figura 4), siendo la concentración máxima de exopolisacárido de 7,32 g/l. El Cuadro N° 3 muestra la sobrevivencia de las suspensiones de *Sinorhizobium meliloti* de las cepas Lq 51 y Lq 22 con diferentes concentraciones iniciales, ajustadas en su pH y presión osmótica.

En el Cuadro N° 3 se observa que, en general, aquellas suspensiones estabilizadas que contenían mayor concentración de polisacárido presentaban a los 6 meses de edad, mayores valores de sobrevivencia.

**Cuadro N° 2. Valores de velocidad de absorción de oxígeno (VAO), determinados en erlenmeyers con distintas relaciones de volumen de líquido a volumen de frasco.**

Volumen de líquido (ml)	Velocidad de absorción de oxígeno (ml O <sub>2</sub> /l.h)
Volumen del frasco (ml)	
50 / 500	650
100 / 500	529
150 / 500	434
200 / 500	367
250 / 500	323
300 / 500	175

**Cuadro N° 3. Sobrevivencia de suspensiones de *Sinorhizobium meliloti* de las cepas Lq 51 y Lq 22, obtenidas bajo diferentes condiciones de aeración y ajustadas en su valor de pH y presión osmótica. Los valores de concentración indicados corresponden a 6 meses de mantenidos los cultivos a 20°C.**

Cepa utilizada	Lq 22		Lq 51	
VAO (ml O <sub>2</sub> /l.h)	529	323	529	323
Concentración de polisacáridos (g/l) a las 72 h de proceso.	4,57	7,32	10,54	2
Concentración inicial células viables/ml	9x10 <sup>9</sup>	9x10 <sup>9</sup>	5x10 <sup>9</sup>	1x10 <sup>9</sup>
Concentración final células viables/ml, en inoculantes a los 6 meses de edad.	2x10 <sup>8</sup>	7x10 <sup>8</sup>	5x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>8</sup>

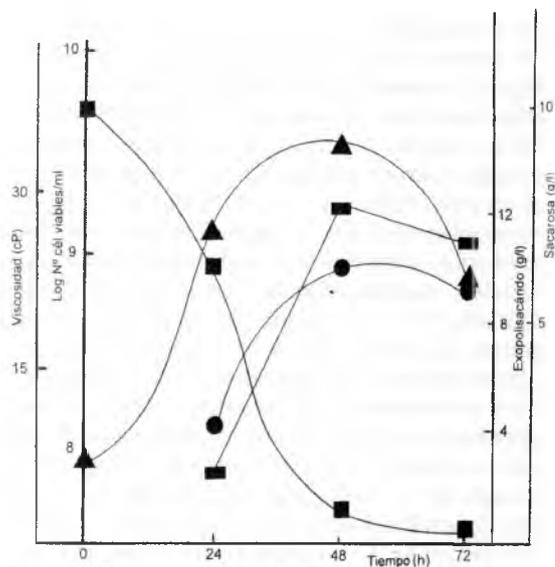


Figura 1. Crecimiento celular, consumo de sacarosa, formación de exopolisacárido y evolución de la viscosidad de *Sinorhizobium meliloti* Lq 51 en un agitador rotatorio a 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad utilizando el medio N° 2. (VAO: 529 ml O<sub>2</sub>/l.h).

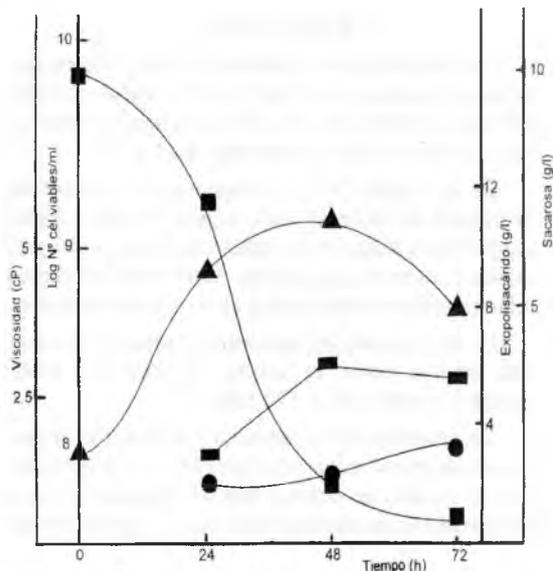


Figura 2. Crecimiento celular, consumo de sacarosa, formación de exopolisacárido y evolución de la viscosidad de *Sinorhizobium meliloti* Lq 51 en un agitador rotatorio a 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad utilizando el medio N° 2. (VAO: 323 ml O<sub>2</sub>/l.h).

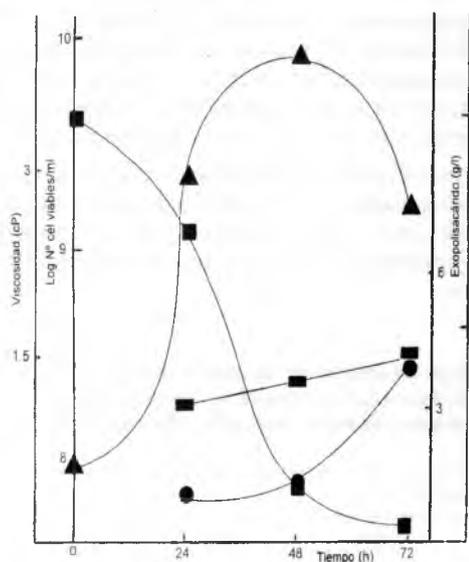


Figura 3. Crecimiento celular, consumo de sacarosa, formación de exopolisacárido y evolución de la viscosidad de *Sinorhizobium meliloti* Lq 22 en un agitador rotatorio a 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad utilizando el medio N° 2. (VAO: 529 ml O<sub>2</sub>/l.h).

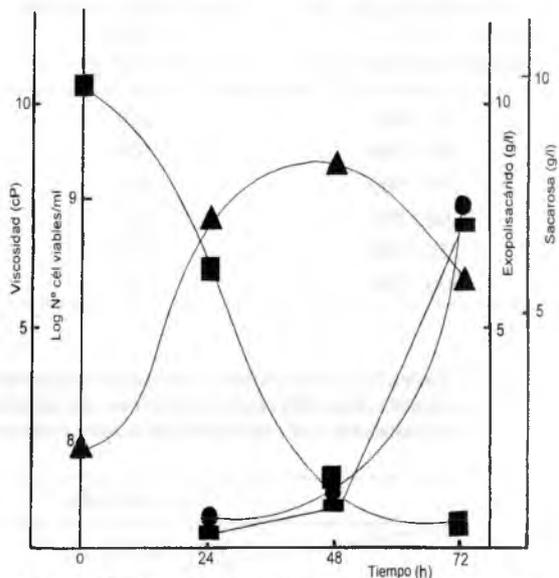


Figura 4. Crecimiento celular, consumo de sacarosa, formación de exopolisacárido y evolución de la viscosidad de *Sinorhizobium meliloti* Lq 22 en un agitador rotatorio a 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad utilizando el medio N° 2. (VAO: 323 ml O<sub>2</sub>/l.h).

Referencias: ▲ Log N° cél viables/ml; ● Exopolisacárido (g/l); ■ Sacarosa (g/l); ■ Viscosidad (cPoise).

El Cuadro N° 4 muestra el contenido de nitrógeno y el peso seco de plantas que corresponden a experimentos en cámara climatizada utilizando las suspensiones obtenidas con ambos microorganismos en similares condiciones de aeración (529 ml O<sub>2</sub>/l.h).

**Cuadro N° 4. Contenido de nitrógeno y el peso seco de plantas de alfalfa inoculadas con suspensiones de *Sinorhizobium meliloti* Lq 51 y Lq 22, conteniendo 10,5 y 4,6 g/l de exopolisacárido respectivamente, y una concentración celular del orden de 10<sup>9</sup> cel.ml<sup>-1</sup>.**

	Contenido de Nitrógeno (%)	Peso seco de planta (mg)
Control	1,45 (a)	9,80 (a)
Lq 51	3,60 (b)	29,00 (b)
Lq 22	3,55 (b)	29,10 (b)

Los valores con la misma letra no tienen diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey (Pimentel Gomes, 1958). Las plantas fueron cultivadas en cámara climatizada e inoculadas según la técnica descrita por Vincent (1970).

### DISCUSIÓN

Las cepas en general presentaron bajos valores de demanda celular de oxígeno, no superiores a 140 ml O<sub>2</sub>/l.h que corresponden a un valor específico de aproximadamente 30 ml O<sub>2</sub>/g.h. En cuanto a los valores de aeración de los Erlenmeyers, variando el volumen se pudo obtener un amplio rango de VAO, las que estuvieron comprendidas entre 650 a 175 ml O<sub>2</sub>/l.h, que está por encima, en su mayor parte, de los valores del consumo de las cepas empleadas.

Si se analizan los resultados obtenidos en las Figuras 1, 2, 3 y 4, surge que la respuesta del cultivo de diferentes cepas de *Sinorhizobium meliloti* bajo diferentes condiciones de aeración es variable. Es evidente que las cepas presentan un metabolismo diferente según las condiciones operativas, que para éstos ensayos está directamente relacionada

con los niveles de aeración. Si se considera el Cuadro N° 3 surge que las suspensiones celulares estabilizadas en su pH y presión osmótica mostraron mayor sobrevivencia aquellas que contenían mayor concentración de polisacárido. Es evidente que la concentración de polímero obtenido ejercía un efecto favorable sobre la estabilidad y sobrevivencia de las células y que permitían alcanzar concentraciones, a los 6 meses que estaban por encima de 6x10<sup>8</sup> cél/ml. Por otra parte, es de destacar, que los ensayos de nodulación de plantas con suspensiones de ambas cepas y con variable concentración de polisacárido, demostraron que los microorganismos mantenían su capacidad simbiótica como lo indican los significativos valores de peso de planta y contenido de nitrógeno, con respecto a los lotes sin nodular. Si bien estos estudios han permitido establecer una relación entre el contenido de biomasa, la concentración de polisacárido y estabilización celular, todavía es necesario realizar más experimentos con otras cepas a fin de poder confirmar los resultados obtenidos. Los realizados en este trabajo muestran la posibilidad de utilizar esta técnica para la preparación de inoculantes líquidos, desarrollando las células en un medio de cultivo con un contenido variable de exopolisacárido, que influiría positivamente sobre la estabilización celular como lo demuestran los resultados obtenidos a los 6 meses de sobrevivencia.

### CONCLUSIONES

Estos resultados muestran que, para incrementar la concentración de exopolisacárido del medio de cultivo, es importante considerar la cepa utilizada y el nivel de aeración empleado. Los estudios han permitido establecer condiciones, para diferentes cepas, que permiten alcanzar diferentes concentraciones de exopolisacárido en el medio de cultivo, que tiene un efecto favorable sobre la estabilización y sobrevivencia de los microorganismos. No obstante ello, todavía sería necesario establecer el comportamiento de más cepas de *S. meliloti*.

### BIBLIOGRAFÍA

- BALATTI, A.P. 1996. Production of inoculants. In: Legume inoculants. Selections and characterization of strains production. Production, use and management. pp 39-54. Ed. Kingraf. 6 N° 221. La Plata. Argentina.
- BALATTI, A.P.; M.D. PASTOR and L.A. MAZZA. 1991. Effect of media nutrient concentration on growth of *Bradyrhizobium japonicum*. *Tropical Agriculture*. 68, 215-218.

- COOPER, C.M.; G. FERSTON and S.A. MILLER.** 1944. Performance of agitated gas liquid contactor. *Ind. Eng. Chem.* 36. 504-509.
- GRASSANO, A.; A. RONCHI y A. BALATTI.** 1996. Respuesta de alfalfa a la inoculación en áreas de la Provincia de La Pampa. *R.I.A. INTA.* 26 (2).
- HEBBAR, K.P.** 1992. Characterization of exopolisaccharides produced by rhizobacteria. *Applied Microbiology Biotechnology.* 38: 248-253.
- KOCH, A.L.** 1981. Growth measurement. *In: Manual of methods for general and Bacteriology*, 179-207. Gerhardt P ed. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- MANUAL OF METHODS FOR GENERAL BACTERIOLOGY.** p.333. American Society for Microbiology. Washington D.C. 1981.
- MARQUIS, R.E.** 1994. Permeability and transport. 587-598. *In: Manual of Methods for General Bacteriology.* American Society for Microbiology. Washington, DC 20006.
- PIMENTEL GOMES, F.** 1958. Curso de estadística experimental. Buenos Aires. Argentina. Ed. Hemisferio Sur.
- UMBREIT W.W.; R.H. BURRIS and J.S. SAUFFER.** 1972. The Warburg constant volume respirometer, *In: Manometric and Biochemical Techniques.* pp. 1-17. Burgess Publishing Co.
- VAN WORKUM, WAT.** 1998. *In: Biological Nitrogen Fixation for the 21<sup>st</sup> Century*, pp 211-212. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- VINCENT, J.M.** 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications.