

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE INOCULANTES LÍQUIDOS PARA ALFALFA

*D.D. MARIANI; *G.S. LORDA; *A.P. BALATTI y °A. FERREIRA¹

Recibido: 02/11/04

Aceptado: 22/11/04

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la producción de inoculantes líquidos para alfalfa (*Medicago sativa*), empleando una cepa de *Sinorhizobium meliloti* B-399. Se consideró la obtención de suspensiones celulares del orden de 5×10^{10} células viables/ml, utilizando un medio que contenía fundamentalmente subproductos industriales, tales como melaza de caña y levadura de cervecera. Las suspensiones celulares fueron estabilizadas mediante la utilización de una mezcla de (g/l): Sacarosa 170,0; KH_2PO_4 1,2; Gelatina 0,1; Glicerol 20,0; $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ 2,13 y 2 ml de una solución de antiespumante. Los valores de sobrevivencia a los 180 días fueron superiores a $8,0 \times 10^9$ células viables/ml, manteniéndose las propiedades simbióticas. Los resultados obtenidos indican que, para la cepa empleada, es posible obtener inoculantes líquidos de muy alta concentración celular.

Palabras clave. Inoculantes líquidos; *Sinorhizobium meliloti*; *Medicago sativa*.

OPTIMIZATION OF LIQUID INOCULANTS PRODUCTION FOR ALFALFA (*Medicago sativa*)

SUMMARY

The present work considers the production of legume aqueous inoculants using the strain *Sinorhizobium meliloti* B-399. Suspensions of the order of $5,0 \times 10^{10}$ viable cells/ml using a medium that contained fundamentally industrial sub-products, such as molasses and brewer's yeast, were produced in shaker at 250 rpm and 2.5 strokes of eccentricity and mechanical stirred fermentors. The cell suspensions were stabilized using a mixture of (g/l) sucrose 170.0; KH_2PO_4 1.2; Gelatine 0.1; Glycerol 20.0; $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ 2.13 and 2.0 ml of antifoam solution. Survival values at 180 days were above $8,0 \times 10^9$ viable cells/ml and maintained their symbiotic properties. Results suggested that, for the strain studied, liquid inoculants having very high cell counts could be obtained.

Key words. Liquid inoculants; *Sinorhizobium meliloti*; *Medicago sativa*.

INTRODUCCIÓN

La evolución de la industria de inoculantes para leguminosas en los últimos años se ha dirigido principalmente hacia la producción de preparados líquidos que han desplazado por su grado de aceptabilidad a los obtenidos tradicionalmente sobre soportes sólidos. Si se tiene en cuenta la información disponible en lo referente al diseño de medios de cultivo, se puede señalar que existen numerosos

trabajos de investigación realizados por distintos autores (Roughley, 1970, 1985; Subba Rao, 1982; Balatti, 1996), donde se demostró que utilizando principalmente productos puros, fue posible alcanzar concentraciones del orden de 10^9 a 10^{10} células viables/ml. Tomando como base los trabajos indicados se consideró la obtención de inoculantes líquidos estabilizados, para alfalfa, utilizando una cepa de *Sinorhizobium meliloti* B-399. En la escala

¹Universidad Nacional de La Pampa, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química, Av. Uruguay N° 151 - 6300 Santa Rosa - La Pampa - Argentina.

*Rizobacter: Argentina S.A. - Ruta 32 km 1,5 - Parque Industrial - BA02HDA Pergamino - Buenos Aires - Argentina.

de frascos Erlenmeyer y fermentadores se programaron estudios de obtención de cultivos de muy alta concentración celular, empleando subproductos industriales como aporte de fuente de carbono y factores de crecimiento, específicamente referidos al empleo de melaza de caña y levadura de cerveza, en razón de que estos materiales son de alta disponibilidad y bajo costo. Las variables consideradas fueron el tipo y concentración de nutriente, y la influencia de las condiciones de operación. Con las suspensiones de microorganismos obtenidos, se prepararon inoculantes líquidos empleando diferentes sustancias para estabilizar a las bacterias. La obtención de inoculantes líquidos de larga vida es un aspecto sobre el cual no existen muchas citas bibliográficas (Balatti y Cervellini, 1977). Por último, con los inoculantes obtenidos bajo diferentes condiciones de proceso, se realizarán ensayos con plantas a fin de determinar si la cepa mantiene sus propiedades simbióticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa utilizada fue *Sinorhizobium meliloti* B-399, suministrada por el INTA Castelar. La misma fue mantenida por subcultivos en medio agarizado, el cual contenía fundamentalmente extracto de levadura, sacarosa y sales minerales. Los medios de cultivo utilizados se indican en el Cuadro N° 1. Como se puede apreciar, en algunos casos se utiliza sacarosa como fuente de carbono, y en otros esta es reemplazada por melaza en concentraciones variables entre 20,0 y 60,0 g/l. La melaza utilizada corresponde a un lote recibido de Tucumán a través del Ing. Calleri, del PROIMI, con una concentración del 50% en azúcares fermentables. Como fuente de nitrógeno se empleó KNO_3 en concentraciones de 0,8 a 3,4 g/l, y como aporte de factores de crecimiento, extracto de levadura DIFCO en niveles de 4,0 a 6,0 g/l, y levadura de cerveza en cantidad de 10,0 a 15,0 g/l. Este subproducto fue suministrado por COMPAL (Compañía de Alimentos S.A.C.I., Av. Mitre esq. 910, Plátanos, Pcia. de Buenos Aires).

El inóculo fue desarrollado en frascos Erlenmeyer con una relación de volumen de líquido a volumen de frasco de 1:5. El medio Inóculo fue sembrado de un repique en tubo agarizado. Las suspensiones de microorganismos fueron transferidas a los medios. Proceso de manera de tener una concentración inicial del orden de 10^8 células viables/ml. La máxima demanda celular de oxígeno fue determinada en un respirómetro Warburg (Umbreit *et al.*, 1972). La velocidad de absorción de oxí-

geno (VAO) fue determinada por el método del sulfito (Cooper *et al.*, 1944). El consumo de la fuente de carbono fue determinado por el método de Miller (1959). El crecimiento celular fue determinado según el número de células viables (Koch, 1994).

Los procesos fueron desarrollados en agitador rotatorio a 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad, en frascos Erlenmeyer, utilizando relaciones de 1:5 y 1:10 de volumen de líquido a volumen de frasco, y en dos fermentadores, uno de laboratorio tipo New Brunswick con una velocidad de agitación de 300 rpm y un caudal de aire de 1 l/l.min, y el otro un fermentador industrial de la firma Rizobacter Argentina, con una capacidad total de 1.000 litros, con 750 litros de medio de cultivo, dos turbinas con cortacorrientes a 90 rpm, y empleando una aeración de 1 l/l.min. En todos los casos se esterilizó a 121 °C y 1 atmósfera de presión.

Sobre la base de experiencias preliminares, para la obtención de inoculantes líquidos las suspensiones fueron ajustadas a pH 7.0 y adicionadas de (g/l): Sacarosa 170; KH_2PO_4 1,2; Gelatina 0,1; Glicerol 20; $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.13 y 2 ml de una solución de antiespumante siliconado. Los ensayos de estabilización se hicieron sobre muestras repetidas siete veces. Para el cálculo de longevidad de los cultivos se aplicó el método estadístico de Winer (1971). Las propiedades simbióticas de la cepa fueron evaluadas utilizando el método recomendado por Vincent (1970).

RESULTADOS

Los requerimientos de oxígeno de la cepa de *Sinorhizobium meliloti* B-399 fueron del orden de los 30 ml O_2 / g.h. Para las condiciones de los ensayos realizados, el valor de la velocidad de absorción fue de 490 y 650 ml O_2 / l.h para los frascos Erlenmeyer con relaciones de volumen de líquido a volumen de frasco de 1:5 y 1:10, respectivamente. En cuanto a los fermentadores, la velocidad de absorción estuvo en el orden de 650-700 ml O_2 / l.h.

En una primera serie de experimentos, operando en frascos Erlenmeyer con relaciones de volumen de líquido a volumen de frasco de 1:5, se utilizaron medios con baja concentración de nutrientes (Cuadro N° 1, Medios 1, 3, 5 y 7), llegándose a obtener en 36 horas de proceso concentraciones de $1,5$ a $2,5 \times 10^{10}$ células viables/ml. Teriando en cuenta esos resultados, se hicieron nuevos experimentos con mayor concentración de nutrientes, empleando en los frascos Erlenmeyer diferentes relaciones de volumen de líquido a volumen de frasco. En el Cuadro N° 2 se presentan los máximos

niveles de células alcanzados, donde se observa que en los frascos Erlenmeyer con menor relación de volumen de líquido a volumen de frasco, se alcanzan mayores concentraciones celulares. Como se puede observar, ya sea empleando extracto de levadura o levadura de cervecera, y sacarosa o me-

laza, se alcanzan valores de $4,8$ a $5,5 \times 10^{10}$ células viables/ml. También se puede ver que el pH tuvo valores muy similares.

En la Figura 1 se puede apreciar la evolución de las curvas de crecimiento y pH en frascos Erlenmeyer y fermentadores, donde se destaca que el comporta-

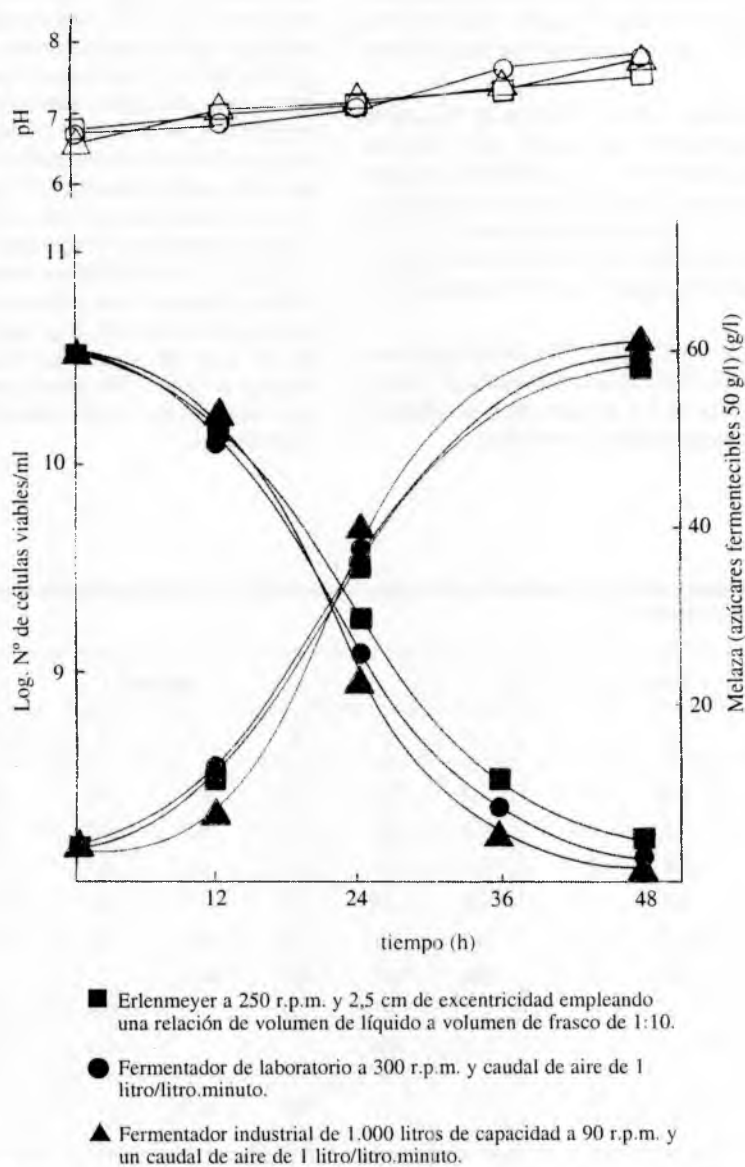


FIGURA 1. Evolución de crecimiento celular, pH y consumo de la fuente de carbono de una cepa de *Sinorhizobium meliloti* B-399 en procesos realizados en distintas escalas.

miento de los procesos es muy similar, alcanzando concentraciones del orden de $5,0 \times 10^{10}$ células viables/ml, así como también el pH, que tiene valores comprendidos entre 7,4 y 7,6. Estos ensayos corresponden a procesos donde se utilizó un medio de igual composición en las tres escalas, formado principalmente por melaza de caña, nitrato de potasio y levadura de cerveza: 60,0; 3,4 y 15,0 g/l. respectivamente. Por otra parte, se ve que el consumo de la fuente de carbono es muy aceptable para las tres escalas.

En lo referente a la sobrevivencia de la cepa en los inoculantes obtenidos, se ve que la longevidad de los preparados (Cuadro N° 3) es aceptable, ya que para las condiciones de estabilización utilizadas, a los 180 días muestran valores del orden de $9,0 \times 10^9$ a $1,0 \times 10^{10}$ células viables/ml. Es decir que existe un comportamiento semejante para las suspensiones empleadas.

Si se considera al Cuadro N° 4, donde se presentan los resultados obtenidos con plantas, se ve que las cepas después de los tratamientos efectuados mantenían sus propiedades simbióticas.

DISCUSIÓN

Si se considera en primer término los valores de máxima demanda celular de oxígeno obtenidos por el método de Warburg, se puede asegurar que para los experimentos realizados con baja concentración de nutrientes (Cuadro N° 1, Medios 1, 3, 5 y 7), donde la concentración de células viables/ml fue del orden de 5,0 g/l, hubo un buen suministro de oxígeno (Pirt, 1975). Sin embargo, en los ensayos donde se incrementó la concentración de nutrientes (Cuadro N° 2), el comportamiento de los procesos indica que solamente estuvieron bien aerados los medios que se utilizaron en los experimentos con frascos agitados con una relación volumen de líquido a volumen de frasco de 1:10, donde el valor de la velocidad de absorción de oxígeno fue de 650 ml O_2 /l.h, lográndose concentraciones del orden de 15,0 g/l y $5,5 \times 10^{10}$ células viables/ml. Es interesante destacar que ese comportamiento lo tuvieron todos los procesos donde se emplearon los Medios N° 2, 4, 6 y 8 (Cuadro N° 1), ya sea con sacarosa o melaza de caña como fuente de carbono, y extracto de levadura o levadura de cerveza como fuente de factores de crecimiento.

CUADRO N° 1. Composición de los medios de cultivo para el desarrollo de la cepa *Sinorhizobium meliloti* B-399, en frascos Erlenmeyer y fermentadores.

Componente (g/L)	Medio inóculo		MEDIOS							
	I	II	1	2	3	4	5	6	7	8
K_2HPO_4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
KH_2PO_4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
KNO_3	0,8	0,8	0,8	3,4	0,8	3,4	0,8	3,4	0,8	3,4
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Sacarosa	5,0	5,0	10,0	30,0	10,0	30,0	-	-	-	-
Melaza	-	-	-	-	-	-	20,0	60,0	20,0	60,0
Extr. Levadura	2,0	-	4,0	6,0	-	-	4,0	6,0	-	-
Levadura	-	5,0	-	-	10,0	15,0	-	-	10,0	15,0
Cervecería	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

El medio I corresponde a ensayos que se realizaron con extracto de levadura y el II a experiencias donde se empleó levadura de cerveza.

En todos los medios se agregó $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ y $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ en una concentración de $3,68$ y $4,47 \times 10^{-5}$ M.

CUADRO N° 2. Máximas concentraciones celulares y pH de una cepa de *Sinorhizobium meliloti* B-399 en diferentes procesos, empleando los medios 1, 2, 4, 6 y 8 (Cuadro N° 1) y operando en la escala de frascos Erlenmeyer agitados a 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad utilizando distintas relaciones de volumen de líquido a volumen de frasco (1/5 y 1/10).

MEDIOS	Relación de volumen de líquido a volumen de frasco 1/5		Relación de volumen de líquido a volumen de frasco 1/10	
	N° células viables/mL	pH	N° células viables/mL	pH
1	2,5 x 10 ¹⁰	7,65	2,5 x 10 ¹⁰	7,50
2	3,0 x 10 ¹⁰	7,65	5,5 x 10 ¹⁰	7,67
4	3,1 x 10 ¹⁰	7,60	4,8 x 10 ¹⁰	7,60
6	2,9 x 10 ¹⁰	7,50	5,2 x 10 ¹⁰	7,62
8	3,0 x 10 ¹⁰	7,60	5,4 x 10 ¹⁰	7,67

Salvo el medio testigo (Medio N°1), corresponden a procesos con alta concentración de nutrientes; fuente de carbono, nitrógeno y factores de crecimiento, que contenían (g/l): sacarosa 30,0; melaza 60,0; nitrato de potasio 3,4 y extracto de levadura y levadura de cerveza 6,0 y 15,0, respectivamente.

CUADRO N° 3. Sobrevivencia de *Sinorhizobium meliloti* B-399 en inoculantes líquidos acuosos en medios con alta concentración de nutrientes (Medios 2, 4, 6, y 8, Cuadro N° 1).

Factores de crecimiento	Extracto de levadura		Levadura de cerveza	
	Sacarosa (cél.viables/ml)	Melaza (cél.viables/ml)	Sacarosa (cél.viables/ml)	Melaza (cél.viables/ml)
Mantenimiento (días)				
0	5,5 x 10 ¹⁰	5,0 x 10 ¹⁰	4,7 x 10 ¹⁰	5,2 x 10 ¹⁰
30	4,0 x 10 ¹⁰	4,5 x 10 ¹⁰	4,0 x 10 ¹⁰	5,0 x 10 ¹⁰
90	2,0 x 10 ¹⁰	2,1 x 10 ¹⁰	1,9 x 10 ¹⁰	1,9 x 10 ¹⁰
180	1,0 x 10 ¹⁰	8,0 x 10 ⁹	9,0 x 10 ⁹	8,0 x 10 ⁹

Los medios contenían: sacarosa 30,0 g/l; melaza 60,0 g/l; extracto de levadura 6,0 g/l y levadura de cerveza 15,0 g/l. Las suspensiones celulares fueron ajustadas a pH 7,0 y luego fueron adicionadas de (g/l): sacarosa 170,0; KH₂PO₄ 1,2; Na₂HPO₄ 2,13; glicerol 20,0; gelatina 0,1 y 0,5 ml de suspensión siliconada como antiespumante.

CUADRO N° 4. Cultivo de plantas de alfalfa utilizando inoculantes acuosos obtenidos en medios enriquecidos con suspensiones de *Sinorhizobium meliloti* B-399 estabilizadas. Los valores indicados corresponden a muestras de 180 días de longevidad.

Suspensiones obtenidas en medios con diferentes fuentes de carbono y factores de crecimiento.	Contenido de nitrógeno (%)	Peso de la planta (mg)
Testigo sin inocular	1,45 (a)	9,45 (a)
Sacarosa + Extracto de levadura	3,45 (b)	27,70 (b)
Sacarosa + Levadura de cerveza	3,55 (b)	28,50 (b)
Melaza + Extracto de levadura	3,40 (b)	27,40 (b)
Melaza + Levadura de cerveza	3,65 (b)	28,20 (b)

Los valores de la misma letra no tienen diferencias significativas de acuerdo al Test de Tukey (Pimentel Gómez, 1966). Las plantas fueron cultivadas en cámara climatizada y de acuerdo al método de Vincent (1970).

Si se analiza la Figura 1, surge claramente que existe un comportamiento muy similar, tanto en frascos agitados, fermentador de laboratorio y fermentador industrial. Es de destacar que en esos experimentos se utilizó melaza como fuente de carbono, y levadura de cervecería como aporte de factores de crecimiento. Esto demuestra que estos materiales, de alta disponibilidad y bajo costo, son muy compatibles en cualquier escala de trabajo para lograr inoculantes con una elevada concentración de células ($5,5 \times 10^{10}$ células viables/ml) y que pueden constituir la base para el desarrollo de inoculantes líquidos.

En lo que respecta a la estabilización de las suspensiones de células obtenidas, se demostró que los materiales y condiciones utilizados que tienen influencia sobre la tonicidad, pH y fragilidad celular son correctos, por cuanto la mezcla de fosfatos, como así también la adición de sacarosa y gelatina, permitieron llegar a obtener altos valores de longevidad, que están en el orden de $9,0 \times 10^{10}$ células viables/ml a los 180 días de preparados los inoculantes (Cuadro N° 3). Es interesante destacar que los resultados indicados tienen una confiabilidad superior al 90%.

Si se considera el Cuadro N° 4, se observa que en los inoculantes preparados utilizando medios enriquecidos y estabilizados convenientemente, la cepa mantenía sus propiedades simbióticas a los 180 días. Esto significa el logro de un producto que satisface las exigencias de los patrones nacionales e internacionales.

Aunque los estudios realizados demuestran la posibilidad industrial de utilizar subproductos como la melaza de caña y levadura de cervecería, se considera que todavía se debería realizar un mayor número de estudios empleando otras cepas que pueden estar recomendadas para el cultivo de la alfalfa.

CONCLUSIONES

A partir de los estudios realizados se concluye que para la cepa empleada, y utilizando medios de muy alta concentración en nutrientes integrados por melaza de caña, nitrato de potasio y levadura de cervecería, es posible obtener inoculantes líquidos acuosos, los cuales presentan altos períodos de sobrevivencia cuando se regulan las condiciones del entorno de las células, manteniendo la bacteria sus propiedades simbióticas.

BIBLIOGRAFÍA

- BALATTI, A.P. and J.R. JARDIM FREIRE. 1996a. Designing Media I. In: Legume inoculants. Selection and characterization of strains. Production, use and management. Editorial Kingraf, La Plata, Argentina, p. 78-96.
- BALATTI, A.P. and J.R. JARDIM FREIRE. 1996b. Designing Media II. In: Legume inoculants. Selection and characterization of strains. Production, use and management. Editorial Kingraf, La Plata, Argentina, p. 97-115.
- BALATTI, A.P. and M.I. CERVellini. 1997. The use of industrial byproducts as carbon source and growth factors in the manufacture of aqueous inoculants of *Sinorhizobium* and *Bradyrhizobium*. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Biological Nitrogen Fixation. 21st Century (UK). Vol 31, 657.
- COOPER, C.M.; G. FERSTON and S.A. MILLER. 1944. Performance of agitated gas liquid contactor. *Ind. Eng. Chem.* 36:504-509.
- KOCH, A.L. 1994. Growth measurement. In: Methods for general and molecular bacteriology. Gerhard P. (Ed), American Society for Microbiology, Washington D.C., p.248-277.
- PIMENTEL GÓMEZ, F. 1966. Curso de estadística experimental. 3a. ed. Piracicaba, S.P.E.S.A.LQ., 404 p.
- PIRT, S.J. 1975. Oxygen demand and supply. In: Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, London, p.230.
- ROUGHLEY, R.J. 1970. The preparation and use of legume seed inoculants. *Plant and Soil*, 32, 657-701.
- SUBBA RAO, N.S. 1982. Biofertilizers. In: Advances in Agricultural Microbiology. Subba Rao (Ed.), Butterworth Scientific, London, p. 219-242.
- UMBREIT, W.W.; R.H. BURRIS and J.S. SAUFFER. 1972. The Warburg Constant volume respirometer. In: Manometric and Biochemical Techniques. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota, p. 1-17.
- VINCENT, J.M. 1970 A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Oxford. Blackwell Scientific Publications.
- WINER, B.J. 1971. Statistical principles in Experimental Design, 2nd edition. New York. Mc Graw Hill, 907 p.