

CULTIVOS DE *Bradyrhizobium japonicum* y *Sinorhizobium meliloti* EN MEDIOS CON HOJAS DE *Amaranthus cruentus* COMO APORTE DE FACTORES DE CRECIMIENTO

A.L. RONCHI; A. GRASSANO; G. RIPANI y A.P. BALATTI¹

Recibido: 07/10/02

Aceptado: 10/03/03

RESUMEN

En este trabajo se estudió la obtención de suspensiones de *Sinorhizobium meliloti* y *Bradyrhizobium japonicum*, considerando el efecto de la harina de hoja de amaranto sobre el crecimiento celular en medios recomendados por distintos autores. Los experimentos se realizaron en erlenmeyers en agitador rotatorio a 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad. Los estudios realizados permitieron establecer medios de cultivo para alcanzar concentraciones celulares del orden de 2×10^{10} células viables/ml. Los resultados obtenidos muestran que es posible reemplazar los 4 g/l de extracto de levadura en los medios típicos por 4 g/l de harina de hoja de *Amaranthus cruentus* o sus extractos acuosos. Con las suspensiones obtenidas de cada microorganismo se prepararon inoculantes utilizando como soportes, turba y perlita. La sobrevivencia de las cepas sobre los soportes indicados, a los seis meses, mostraron una concentración de 9×10^9 a 2×10^{10} células viables/g, manteniendo los microorganismos sus propiedades simbióticas.

Palabras clave. Inoculantes. *Sinorhizobium meliloti*. *Bradyrhizobium japonicum*. Factores de crecimiento.

THE *Bradyrhizobium japonicum* AND *Sinorhizobium meliloti* CULTURES IN THE MEDIA CONTAINING *Amaranthus cruentus* LEAF MEAL AS A GROWTH FACTORS

SUMMARY

In this work the cellular growth of the *Sinorhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* in the culture media using *Amaranthus cruentus* leaf meal as a growth factors were studied. The experiments were performed in erlenmeyers flasks at 28°C in a rotary shaker at 250 rpm and 2,5 cm of eccentricity. The results obtained showed that is possible to replace the 4 g/l the yeast extract the traditional medium by 4 g/l of the *Amaranthus cruentus* leaf meal or its water extract. The bacterial suspensions achieved on the order of 2×10^{10} viable cells/ml for both strains. Inoculants prepared with both strains suspensions using peat an perlite as carriers showed at six month, a bacterial survival on the order of 9×10^9 to 2×10^{10} viable cells/g. The strains maintained their symbiotic proprieties.

Key words. Inoculants. *Sinorhizobium meliloti*. *Bradyrhizobium japonicum*. Growth factors.

INTRODUCCIÓN

La obtención de suspensiones de microorganismos, con alta concentración celular y a bajo costo, es una premisa fundamental en la elaboración de inoculantes comerciales. Las condiciones de medio y operación influyen marcadamente en el crecimiento de las bacteria (Balatti *et al.*, 1987; Balatti *et al.*, 1991). Roughley (1985, 1988) puntualiza que el éxito de los programas de inoculación de leguminosas

depende, entre otros factores, de la concentración de microorganismos que tiene el inoculante. En esta región de la provincia de La Pampa está muy difundido el cultivo de variedades de leguminosas y para su inoculación se utilizan microorganismos que pertenecen a los géneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. El diseño de medios de cultivo para el desarrollo de estas cepas ha utilizado tradicionalmente extracto de levadura como aporte de fac-

¹Instituto de Investigación y Desarrollo en Microbiología y Química Aplicada. Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de La Pampa. Uruguay 151. (6300). Santa Rosa. La Pampa.
alronchi@exactas.unlpam.edu.ar

días fue raleada una planta y a las 8 semanas de la siembra se separó la parte aérea, se secó en estufa con circulación de aire durante 72 horas a 60°C y, al cabo de este tiempo, se determinó peso seco y porcentaje de nitrógeno por el método de Kjeldahl, en un equipo Tecator, Kjeltec Auto 1030 Analyzer.

Para el cultivo de soja se hicieron 5 repeticiones con cuatro plantas cada una, a los 25 días de sembradas las semillas, se realizó el raleo de manera de dejar dos plantas en cada recipiente y a los 50 días se separó la parte aérea, se determinó peso seco y porcentaje de nitrógeno, en las mismas condiciones que para el caso de alfalfa.

RESULTADOS

En el Cuadro N° 3 se presentan las máximas concentraciones de microorganismos alcanzadas con ambas cepas en medios con extracto de levadura, harina de hoja de amaranto en distintas concentraciones, como así también su extracto acuoso. Se observa en general que a medida que se aumenta la concentración de harina de hojas de amaranto se produce una leve disminución del número de células viables teniendo para ambos microorganismos un comportamiento similar. Con extracto acuoso de mayor concentración se obtuvieron valores más altos de concentración de biomasa.

En las Figuras 1 y 2 se presenta la evolución del crecimiento celular durante los procesos, se ve que el comportamiento es muy similar para la concentración de harina de hoja (4 g/l), su extracto acuoso (40 g/l) y

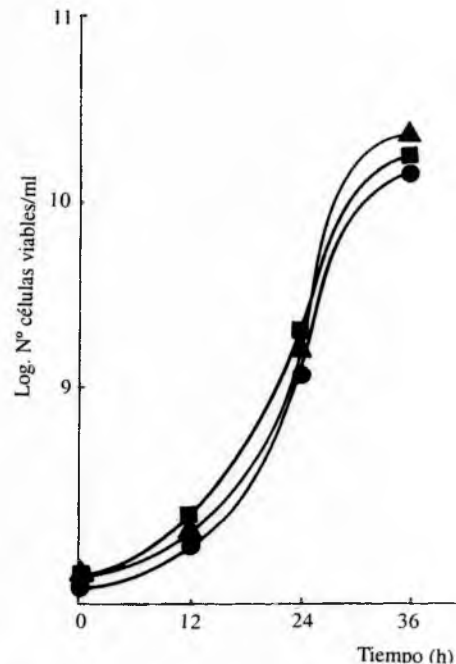


FIGURA 1. Crecimiento celular de *Shinorhizobium meliloti* B399 en medios con: ■ extracto de levadura, ● harina de hoja de amaranto, ▲ extracto acuoso de harina de hoja de amaranto 40 g/l.

CUADRO N° 3. Valores promedios de concentración celular de *Bradyrhizobium japonicum* E109 y *Sinorhizobium meliloti* B399, en células viables/ml, en procesos utilizando 4 g/l de extracto de levadura como testigo, concentraciones variables de harina y extracto acuoso de hojas de *A. cruentus*.

Factores de crecimiento	Microorganismos en células viables/ml	
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109	<i>Sinorhizobium meliloti</i> B399
Extracto de levadura 4 g/l	2,4 x 10 ¹⁰	2,5 x 10 ¹⁰
Harina de hoja de 2 g/l	0,5 x 10 ¹⁰	1,0 x 10 ¹⁰
Harina de hoja de 4 g/l	2,0 x 10 ¹⁰	3,0 x 10 ¹⁰
Harina de hoja de 6 g/l	1,5 x 10 ¹⁰	2,0 x 10 ¹⁰
Harina de hoja de 8 g/l	1,3 x 10 ¹⁰	1,5 x 10 ¹⁰
Harina de hoja de 10 g/l	1,0 x 10 ¹⁰	1,0 x 10 ¹⁰
Extracto acuoso 20 g/l	2,5 x 10 ¹⁰	2,6 x 10 ¹⁰
Extracto acuoso 40 g/l	4,5 x 10 ¹⁰	4,5 x 10 ¹⁰

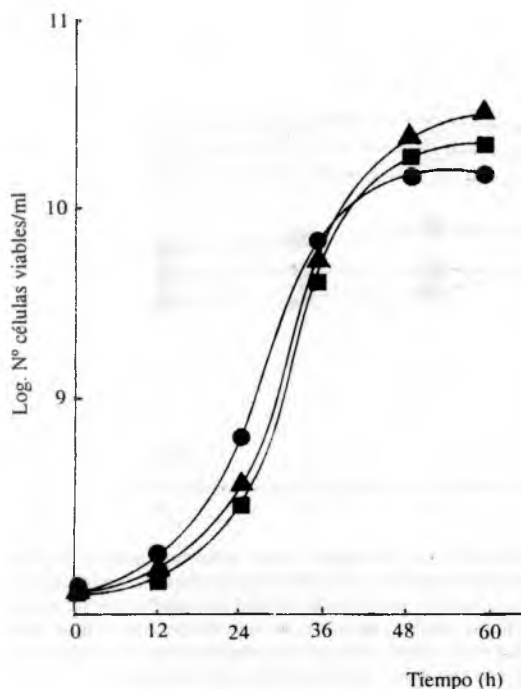


FIGURA 2. Crecimiento celular de *Bradyrhizobium japonicum* E109 en medios con: ■ extracto de levadura, ● harina de hoja de amaranto, ▲ extracto acuoso de harina de hoja de amaranto 40 g/l.

el extracto de levadura. Los valores de células viables fueron del orden de 10^{10} células viables/ml y los valores de tiempo de generación están en el orden de 2,5 horas para la cepa de crecimiento rápido (*Sinorhizobium meliloti*) y 8,5 horas para la cepa de crecimiento lento (*Bradyrhizobium japonicum*).

En las Figuras 3 y 4, se muestra la evolución de la sobrevivencia de las cepas en estudio utilizando inoculantes obtenidos con diferentes medios y distintos soportes. En general, se observa al considerar en primer término el medio de cultivo utilizado, siempre existe una pequeña diferencia a favor de los inoculantes con extracto de levadura. Por otra parte, si se considera el soporte, en general todos los inoculantes preparados con turba mostraron mayor sobrevivencia que aquellos obtenidos con perlita.

En los Cuadros N° 4 y 5 se muestran los resultados del peso seco y porcentaje de nitrógeno, promedio

de 10 repeticiones por tratamiento, realizado en cámara climatizada con plantas de alfalfa y *Sinorhizobium meliloti* e invernáculo con plantas de soja y *Bradyrhizobium japonicum*, respectivamente. En ambos casos, realizado el análisis estadístico de acuerdo al Test de Tukey (Pimentel, 1978) se comprueba que existe un comportamiento similar para todos los inoculantes, independientemente de la fuente de factores de crecimiento y soporte empleado.

DISCUSIÓN

Las Figuras 1 y 2 muestran que existe una evolución muy similar en el crecimiento con ambas cepas, lo cual está indicando que el suministro de factores de crecimiento, vitaminas y aminoácidos es muy adecuado, ya sea que provengan del extracto de levadura, hoja de amaranto o su extracto acuoso. Las concentraciones alcanzadas y el tiempo de generación de cada cepa están indicando que la harina de hoja de amaranto en concentración de 4 g/l y el extracto acuoso de 40 g/l producen los mismos efectos que el extracto de levadura. La disminución celular que se produce en los cultivos usando concentraciones mayores de 4 g/l de harina de hoja se puede atribuir, probablemente, a que se produce un aumento de viscosidad del medio como consecuencia de que este producto se mantiene en suspensión, lo cual podría disminuir la disponibilidad de oxígeno por parte de las células y, por otra parte, a la presencia de algún aminoácido que podría haber limitado el crecimiento.

Si se analiza la sobrevivencia en los inoculantes preparados con suspensiones obtenidas en medios diferentes y con soportes distintos surge según se ve en las Figuras 3 y 4 que existe una tendencia a mayor sobrevivencia con extracto de levadura y con soporte a base de turba. Sin embargo estas diferencias no son significativas.

Por último, si se consideran los estudios con plantas, Cuadros N° 4 y 5, se muestra que no existe ninguna limitación en cuanto a la eficiencia simbiótica de las cepas estudiadas, en razón de que los lotes inoculados presentan un comportamiento similar, no encontrándose entre ellos diferencias significativas, como lo demuestran los estudios estadísticos realizados.

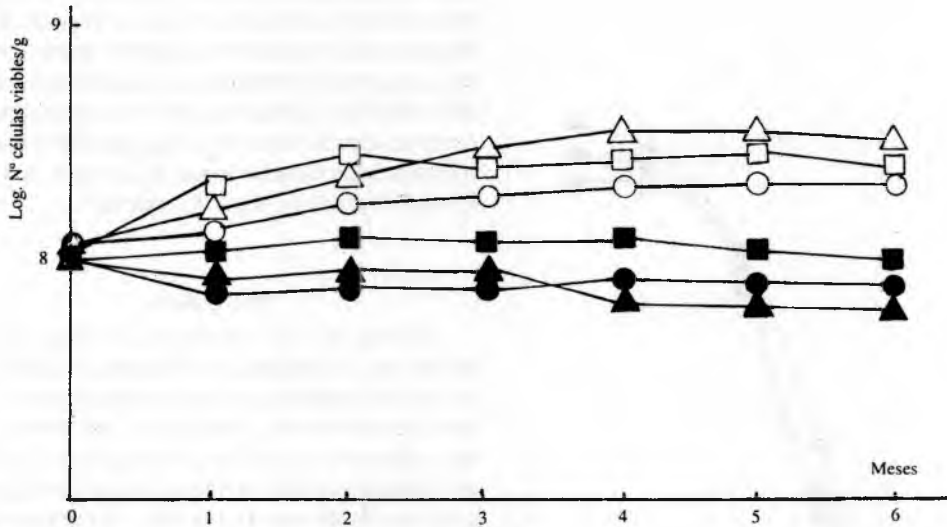


FIGURA 3. Sobrevivencia de *Shinorhizobium meliloti* B399 en inoculantes utilizando como soportes turba y perlita impregnados con suspensiones de microorganismos obtenidos en medios diseñados con diferentes factores de crecimiento. □ turba + suspensión obtenida en medios con extracto de levadura, Δ turba + suspensión obtenida en medios con extracto acuoso de harina de hojas de amaranto, ○ turba + suspensión obtenida en medios con harina de hoja de amaranto, ■ perlita + suspensión obtenida en medios con extracto de levadura, ▲ perlita + suspensión obtenida en medios con extracto acuoso de harina de hojas de amaranto, ● perlita + suspensión obtenida en medios con harina de hoja de amaranto.

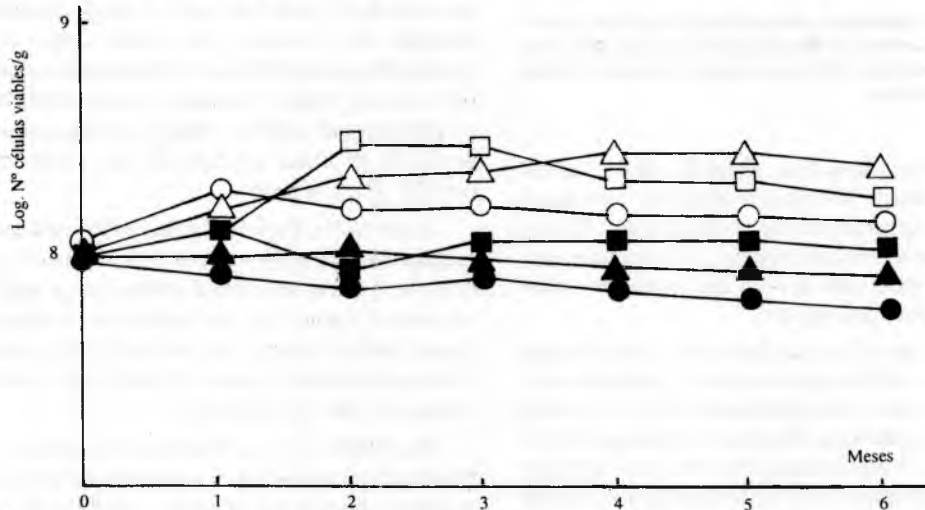


FIGURA 4. Sobrevivencia de *Bradyrhizobium japonicum* E109 en inoculantes utilizando como soportes turba y perlita impregnados con suspensiones de microorganismos obtenidos en medios diseñados con diferentes factores de crecimiento. □ turba + suspensión obtenida en medios con extracto de levadura, Δ turba + suspensión obtenida en medios con extracto acuoso de harina de hojas de amaranto, ○ turba + suspensión obtenida en medios con harina de hoja de amaranto, ■ perlita + suspensión obtenida en medios con extracto de levadura, ▲ perlita + suspensión obtenida en medios con extracto acuoso de harina de hojas de amaranto, ● perlita + suspensión obtenida en medios con harina de hoja de amaranto.

CUADRO N° 4. Ensayos de crecimiento de plantas de alfalfa en cámara climatizada.

Tratamiento	Peso seco g/planta	N parte aérea % N/planta
1	0,00649 (a)	1,38 (a)
2	0,02656 (b)	3,34 (b)
3	0,03130 (b)	3,58 (b)
4	0,02729 (b)	3,63 (b)
5	0,02540 (b)	2,95 (b)
6	0,03187 (b)	3,15 (b)
7	0,02964 (b)	3,42 (b)
8	0,02941 (b)	3,52 (b)

CUADRO N° 5. Ensayos de crecimiento de plantas de soja en invernáculo.

Tratamiento	Peso seco g/planta	N parte aérea % N/planta
1	1,52 (a)	1,29 (a)
2	2,53 (b)	2,01 (b)
3	3,06 (b)	2,42 (b)
4	3,10 (b)	2,39 (b)
5	2,61 (b)	2,36 (b)
6	2,75 (b)	2,23 (b)
7	2,95 (b)	2,33 (b)
8	3,00 (b)	2,39 (b)

Tratamientos: 1) Testigo no inoculado. 2) Testigo suplementado con nitrógeno. 3) Inoculación con preparados a base de turba estéril impregnada con suspensiones celulares desarrolladas en medios de cultivo con extracto de levadura. 4) Inoculación con preparados a base de turba estéril impregnada con suspensiones celulares desarrolladas en medio de cultivo con harina de hojas amaranto. 5) Inoculación con preparados a base de turba estéril impregnada con suspensiones celulares desarrolladas en medio de cultivo con extracto acuoso de hojas amaranto. 6) Inoculación con preparados a base de perlita estéril impregnada con suspensiones celulares desarrolladas en medio de cultivo con extracto de levadura. 7) Inoculación con preparados a base de perlita estéril impregnada con suspensiones celulares desarrolladas en medio de cultivo con hojas de amaranto. 8) Inoculación con preparados a base de perlita estéril impregnada con suspensiones celulares desarrolladas en medio de cultivo con extracto acuoso de hojas de amaranto. Los valores consignados con letras iguales no son significativamente diferentes de acuerdo al test de Tukey (Pimentel, 1978)

CONCLUSIONES

Como corolario y conclusión de estos estudios se ha comprobado, para las cepas ensayadas, que la harina de hoja de *Amaranthus cruentus* y su extracto acuoso pueden ser empleados en reemplazo del extracto de levadura y, por otra parte, también se demuestra que es posible utilizar la perlita, que es un material de bajo costo con relación a la turba, como soporte de suspensiones celulares. La investigación

realizada para este tipo de metodología es original, en razón de que no se conocen antecedentes bibliográficos y, por otra parte, se debe destacar que el uso de harina de hojas de amaranto, que es un producto para aplicación industrial, en los medios de fermentación constituyen un aspecto que permitiría considerar en el futuro, el estudio del crecimiento de otros microorganismos que nodulan leguminosas o de otros procesos industriales.

BIBLIOGRAFÍA

- BALATTI, A.P. y L.A. MAZA. 1979. Obtención de inoculantes para soja. Comportamiento de soportes a base de Turba de Tierra del Fuego esterilizadas con vapor y óxido de etileno. *Revista Argentina de Microbiología*. 11 (3) : 83-88.
- BALATTI, A.P.; L.A. MAZZA and E. MORETTI. 1987. Aeration requeriment of *Rhizobium* culture. *MIRCEN. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 227- 234.
- 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.
- BALATTI, A.P. 1992. Producción de inoculantes para leguminosas. Tecnología de las fermentaciones aplicadas a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Cap. 1. De Trabuco Editorial. La Plata. Buenos Aires. Argentina. 1-24.

- CIAT. 1988. Simbiosis Leguminosa-Rhizobium: Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Ed. por Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali. Colombia. 172 pp.
- GRASSANO, A.; A.L. RONCHI; G. LORDA and A.P. BALATTI. 1999. Effect of amaranth on the growth of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* strains. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 15:93-97.
- KOCH, A.L. 1981. Growth measurement. In Manual methods for general bacteriology. Washington. D.C. American Society for Microbiology. 179-207.
- PASTOR, M.D. 1999. Utilización de amaranto en procesos fermentativos como factor de crecimiento. Tesis Doctoral. 204 pp.
- PIMENTEL GOMES F. 1978. Curso de estadística experimental. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina. 321 pp.
- RONCHI A.L. 1994. Selección de soportes para la producción de inoculantes para leguminosas. Cinética de crecimiento y/o sobrevivencia de diferentes cepas de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* en soportes de diferente origen. Comportamiento fisiológico de los microorganismos. (Tesis doctoral). 178 pp.
- ROUGHLEY, R.J. 1985. Production and quality control of legume seed inoculants in Australia. In Proceeding of the Workshop on Rhizobium/Legume inoculants. Porto Alegre. Brasil. 37-42.
- ROUGHLEY, R.J. 1988. Legume Inoculant, their Technology and Application. In Nitrogen Fixation by Legume in Mediterranean Agriculture. Edited by D.P. Beck and L.A. Materon. 259-268.
- SEGURA NIETO, M.; A.P. BABA DE LA ROSA and O. PAREDES LOPEZ. 1994. Biochemistry of amaranth proteins. In: Amaranth Biology, Chemistry and Technology. Ed. by Paredes López, U.S.A. Chapter 5, 76-101.
- VINCENT J.M. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication. Oxford. 163 pp.
- VINCENT J.M. 1977. Rhizobium General Microbiology. In a Treatise on Dinitrogen Fixation. Edited by D.W.F. Hardy and W.S. Silver. John Wiley and Sons. 289-295.