

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Efecto de la temperatura y el pH en la producción de biomasa de *Azospirillum brasilense* C16 aislada de pasto guinea

Effect of temperature and pH on the biomass production of Azospirillum brasilense C16 isolated from Guinea grass

F. Romero-Perdomo, M. Camelo-Rusinque, Paola Criollo-Campos y Ruth Bonilla-Buitrago*

Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de Investigación Tibaitatá, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica, kilómetro 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia

* Autor para correspondencia: rbonilla@corpoica.org.co

RESUMEN: El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la temperatura y el pH en la viabilidad celular de la cepa *Azospirillum brasilense* C16. Se estudiaron cinco temperaturas (entre 28 y 36°C) y cinco pH (de 4,5 a 8,5). El efecto de la temperatura se evaluó mediante la medición del crecimiento radial (mm) de la cepa, sobre un papel de filtro en medio batata. En el caso del pH se utilizó un fermentador de tanque agitado –con una configuración tipo Rushton– para cuantificar la velocidad de crecimiento, la producción de biomasa y el tiempo de duplicación de la cepa; las condiciones de fermentación fueron: 400 rpm, 1 Lpm y 30°C, durante 24 horas. El pH y la temperatura influyeron significativamente ($p < 0,05$) en la producción de *A. brasilense* C16. La temperatura de 30°C fue la más favorable para que se multiplicara la cepa, con 23,21 mm de crecimiento radial; mientras que la mayor o igual a 34°C inhibió su crecimiento. Los mejores resultados se obtuvieron con un pH de 6,8, con diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al resto. Con esta condición se obtuvieron los valores más altos de velocidad de crecimiento ($1,79 \text{ h}^{-1}$) y producción de biomasa ($8,65 \log_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$), y el valor más bajo del tiempo de duplicación ($1,09 \text{ h}^{-1}$). Estos resultados poseen aplicabilidad biotecnológica, y son de gran importancia en el momento de definir y controlar las condiciones de producción masiva de biomasa de *A. brasilense* C16 para futuras formulaciones como biofertilizante en diversos cultivos de interés en Colombia.

Palabras clave: bacteria, gramínea, inoculación

ABSTRACT: The objective of the study was to evaluate the effect of temperature and pH on the cell viability of the strain *Azospirillum brasilense* C16. Five temperatures (between 28 and 36 °C) and five pH values (from 4,5 to 8,5) were studied. The effect of temperature was evaluated by measuring the radial growth (mm) of the strain, on a filter paper in sweet potato agar. In the case of pH to quantify the growth rate, biomass production and time of duplication of the strain a Rushton-type turbine-agitated fermenter was used; the fermentation conditions were: 400 rpm, 1 Lpm and 30 °C, during 24 hours. The pH and temperature significantly influenced ($p < 0,05$) the production of *A. brasilense* C16. The temperature of 30 °C was the most favorable for the strain to be multiplied, with 23,21 mm of radial growth; while the temperature higher than or equal to 34 °C inhibited its growth. The best results were obtained with a pH value of 6,8, with significant differences ($p < 0,05$) compared with the others. Under this condition the highest growth rate values ($1,79 \text{ h}^{-1}$) and biomass production ($8,65 \log_{10} \text{ CFU mL}^{-1}$), and the lowest value of the duplication time ($1,09 \text{ h}^{-1}$), were obtained. These results have biotechnological applicability, and are very important at the moment of defining and controlling the conditions of massive biomass production of *A. brasilense* C16 for future formulations in diverse crops of interest in Colombia.

Keywords: bacterium, grass, inoculation

INTRODUCCIÓN

El uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) para la formulación de biofertilizantes se ha convertido en una de las tecnologías limpias más promisorias para el desarrollo de la

agricultura sostenible (Bashan *et al.*, 2013). Entre las BPCV que más se destacan se encuentran las del género *Azospirillum*, que tiene la capacidad de fijar nitrógeno; solubilizar fósforo; producir citoquininas, giberelinas e indoles; reducir nitratos;

así como formar diferentes clases de asociaciones con las plantas para mejorar el desarrollo de las raíces e incrementar la tasa de absorción de agua y minerales (Fibach-Paldi *et al.*, 2012). Debido a estas capacidades *Azospirillum* sp. se ha aplicado en cultivos de maíz, arroz y trigo, a nivel mundial (Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2009; Bashan y De Bashan, 2010). Cárdenas *et al.* (2014) demostraron la eficiencia de la cepa *Azospirillum brasilense* C16 para promover el crecimiento del pasto guinea (*Megathyrsus maximus* (Jacq.) B. K. Simon & S. W. L. Jacobs var. Tanzania), en el municipio Agustín Codazzi (Cesar, Colombia).

Con el fin de potenciar la actividad microbiana de los biofertilizantes es necesario definir los parámetros de crecimiento celular de las cepas que los conforman, máxime para un propósito específico como la producción de enzimas o de biomasa (Bhattacharyya y Jha, 2012). Aunque se han realizado investigaciones relacionadas con la optimización de las condiciones para la síntesis de ácido glucónico y polihidroxialcanoatos por especies del género *Azospirillum*, existen pocos estudios sobre el efecto de las condiciones fisicoquímicas en su multiplicación masiva (Rodríguez *et al.*, 2004; Moreno-Galván *et al.*, 2012). Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de factores fisicoquímicos, como la temperatura y el pH, en el crecimiento de la cepa *A. brasilense* C16.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo y condiciones de cultivo.

Se empleó la cepa C16, identificada molecularmente como *A. brasilense* (Cárdenas *et al.*, 2010). Esta se aisló, a partir de suelos cultivados con gramíneas forrajeras en Codazzi (Cesar, Colombia), y se seleccionó por su potencial como biofertilizante del pasto guinea (*M. maximus* var. Tanzania), de acuerdo con lo informado por Cárdenas *et al.* (2014). *A. brasilense* C16 se reactivó en medio batata (Döbereiner *et al.*, 1995), a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 48 horas.

Efecto de la temperatura. Se evaluó el efecto de cinco temperaturas (28, 30, 32, 34 y 36°C) en el crecimiento de *A. brasilense* C16, con un diseño completamente al azar por triplicado. Se preparó una suspensión bacteriana en una solución de NaCl al 0,85 %, de la cual se tomaron 20 μl para inocular un disco de papel de filtro, que se colocó sobre el medio de cultivo batata contenido en una placa Petri, para cuantificar el crecimiento de la bacteria (mm) durante cinco días.

Influencia del pH. Se empleó un fermentador (MINIFORS, modelo INF-30174), con 3,5 L de volumen efectivo de trabajo. La estandarización del inóculo de la cepa se realizó en medio Azosp-1 (Rivera *et al.*, 2012), con el empleo del 10 % (v/v) de una suspensión bacteriana. Se evaluaron cinco pH (4,5; 5,5; 6,8; 7,5 y 8,5) y el diseño fue completamente al azar, con tres repeticiones. Los pH fueron controlados con NaOH (1N) y HCl (1N). Las condiciones de fermentación fueron: 400 rpm, 1 Lpm, a 30°C –temperatura que más favoreció el crecimiento de la cepa–, durante 24 horas. La variable de respuesta fue la viabilidad celular, que se expresó como \log_{10} UFC mL^{-1} , en medio batata, mediante la técnica de microgota y diluciones seriadas (Doyle *et al.*, 2001). Se cuantificó la viabilidad cada dos horas, y se definió la curva de crecimiento para cada pH; a cada curva se le determinó la velocidad máxima de crecimiento (μx) y el tiempo de duplicación.

Análisis estadístico. La normalidad y la homogeneidad de la varianza de los resultados se determinaron mediante las pruebas de Shapiro Wilk y Bartlett, respectivamente. Una vez demostrados estos principios, se aplicó un ANOVA y la prueba de comparación de medias de Tukey. El procesamiento de los datos se realizó con el paquete estadístico SPSS 17 (Analytical Software, Florida, EE. UU.), con un 95 % de nivel de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El pH y la temperatura influyeron significativamente ($p < 0,05$) en la producción de *A. brasilense* C16. La temperatura de 30°C favoreció más el crecimiento de la cepa (fig. 1), y se hallaron halos de 23,21 mm a los cinco días de incubación. Después, se encontraron halos de tamaño inferior a los 32 y 28°C (10 y 25 % por debajo de ese valor, respectivamente). Mientras tanto, a los 34 y 36°C se inhibió totalmente el crecimiento de C16 desde las 24 horas. Por tanto, la producción óptima de C16 ocurrió entre 30 y 32°C . En este sentido, Kaushik *et al.* (2002) afirmaron que temperaturas subóptimas, como 22°C , generaron disminución en la biomasa y en la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal en *A. brasilense* CDJA y A40. Resultados similares fueron encontrados por García *et al.* (2007) y Molina-Favero *et al.* (2008), quienes sugirieron el uso de temperaturas entre 29 y 32°C para la producción de biomasa, auxinas y óxido nítrico en bacterias pertenecientes al género *Azospirillum*.

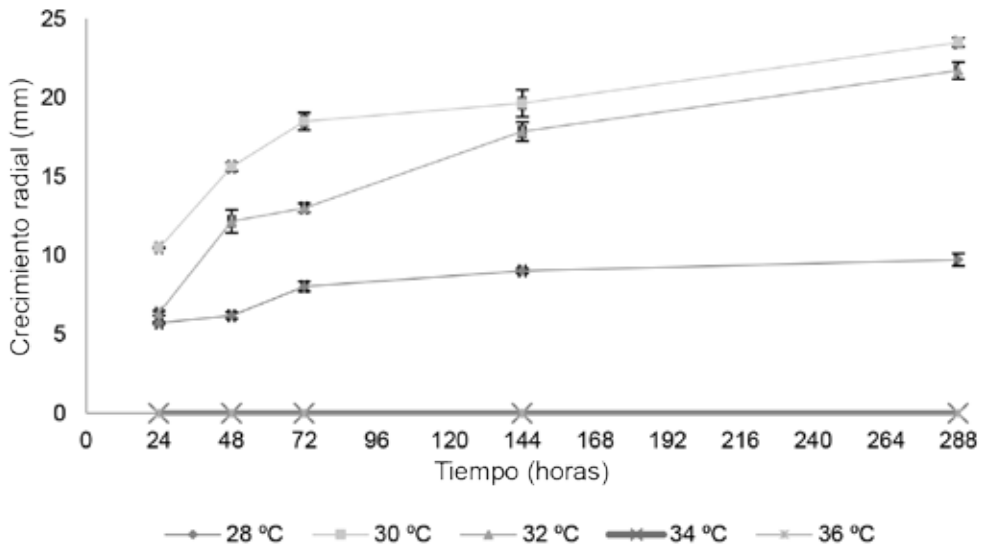


Figura 1. Crecimiento radial de *A. brasilense* C16.

Por otra parte, se observaron drásticas disminuciones de la biomasa en los cinco pH evaluados. El valor 6,8 favoreció más la producción de biomasa de la cepa, y difirió significativamente ($p < 0,05$) del resto; con este pH se cuantificaron $8,65 \log_{10}$ UFC mL^{-1} a las 24 horas de crecimiento (fig. 2). Además, se encontró el valor más alto de velocidad de crecimiento y el más bajo de tiempo de duplicación: $1,79 \text{ h}^{-1}$ y $1,09 \text{ h}^{-1}$, respectivamente (fig. 3). Steenhoudt y Vanderleyden

(2000) señalaron que el rango ideal de pH para la producción de biofertilizantes a base de *Azospirillum* varía entre 6,5 y 7,0; lo que se corrobora con lo obtenido en este estudio.

En comparación con el pH 6,8, en 5,5 y 7,5 se cuantificaron valores de producción de biomasa por debajo de una y tres unidades logarítmicas, a las 24 horas de crecimiento. Por tanto, los valores de los dos parámetros de la cinética de crecimiento

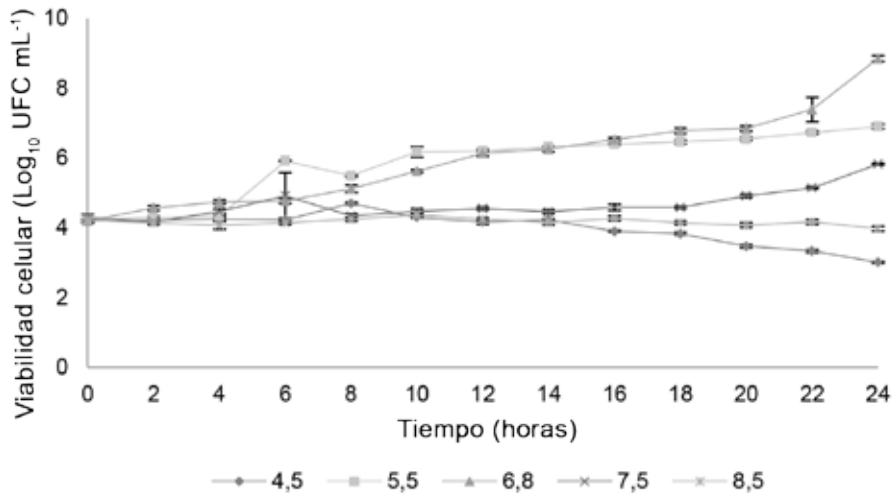
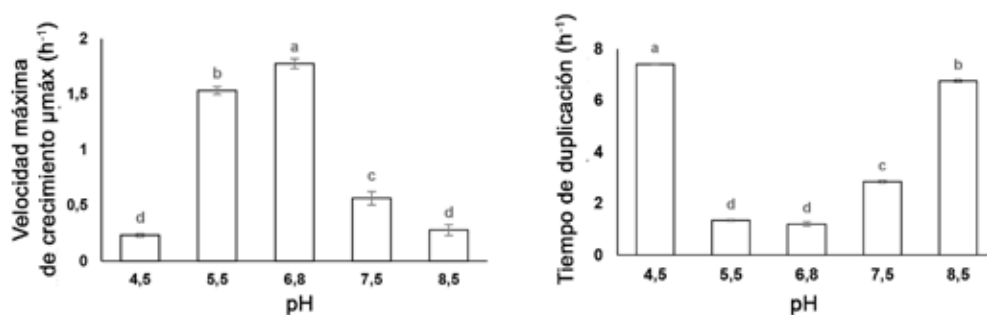


Figura 2. Curva de crecimiento de *A. brasilense* C16 a diferentes valores de pH.



Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 3. Parámetros cinéticos de la cepa *A. brasilense* C16 en diferentes condiciones de pH.

presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Es de señalar que 5,5 favoreció más la producción que 7,5. Estos resultados indican que los pH levemente ácidos, cercanos a la neutralidad, favorecen más la producción de biomasa de *A. brasilense* C16 que los alcalinos.

Sivasakthivelan y Saranraj (2013) informaron que los pH superiores a la neutralidad tienen más aplicabilidad para la producción de compuestos y metabolitos de interés industrial que para la producción de biomasa celular, en el género *Azospirillum* sp. En este sentido, Dahm *et al.* (1993) sugirieron el uso de pH superiores a 7,5 para potenciar la síntesis de vitaminas del grupo B como la riboflavina.

Respecto a los dos pH más extremos a la neutralidad (4,5 y 8,5), se infirió que estos afectan el metabolismo de *A. brasilense* C16. En la figura 2 se muestra que desde la hora 6 hubo un descenso progresivo de la viabilidad a través del tiempo, al punto de no existir inicio de fase exponencial. Tan solo una pequeña fase de adaptación, con un incremento de la hora 4 a la hora 6, se observó en el pH 4,5. Por ende, la velocidad de crecimiento en estos dos pH fue menor, y el tiempo de duplicación fue dos veces superior respecto a los demás pH (fig. 3).

CONCLUSIONES

La temperatura y el pH influyeron significativamente ($p < 0,05$) en la viabilidad de *A. brasilense* C16. La producción máxima se obtuvo a los 30°C y a un pH de 6,8. Los resultados del presente estudio poseen aplicabilidad biotecnológica, y son de gran importancia en el momento de definir y controlar las condiciones de producción masiva de biomasa de *A. brasilense* C16 para futuras formulaciones como biofertilizante en diversos cultivos de interés en Colombia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bashan, Y. & Bashan, Luz E. de. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. *Adv. Agron.* 108:77-136, 2010.
- Bashan, Y.; Bashan, Luz E.; Prabhu, S. R. & Hernández, J. P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil.* 378 (1-2):1-33, 2013.
- Bhattacharyya, P. N. & Jha, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microb. Biotechnol.* 28 (4):1327-1350, 2012.
- Cárdenas, Diana M.; Garrido, María F.; Bonilla, Ruth R. & Baldani, V. L. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes.* 33 (3):285-300, 2010.
- Cárdenas, Diana M.; Garrido, María F.; Roncallo, B. A. & Bonilla, Ruth. Inoculación con *Azospirillum* spp y *Enterobacter agglomerans* en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) en el Departamento de Cesar (Colombia). *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín.* 67 (2):7271-7280, 2014.
- Dahm, H.; Rózycki, H.; Strzelczyk, E. & Li, C. Y. Production of B-group vitamins by *Azospirillum* spp. grown in media of different pH at different temperatures. *Zbl. Mikrobiol.* 148 (3):195-203, 1993.
- Díaz-Zorita, M. & Fernández-Canigia, M. V. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur. J. Soil Biol.* 45:3-11, 2009.
- Döbereiner, J.; Baldani, V. L. D. & Baldani, J. I. *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas ñao leguminosas*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995.
- Doyle, M.; Beuchat, L. & Montville, T. Microorganismos indicadores y criterios microbiológicos.

- Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras*. 1 ed ed. España: Acribia. p. 816, 2001.
- Fibach-Paldi, S.; Burdman, S. & Okon, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett.* 326:99-108, 2012.
- García, J. G.; Moreno, V. R.; Rodríguez, I. C.; Mendoza, A. & Mayek, N. Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento de grano del maíz. *Rev. Fitotec. Mex.* 30 (3):305-310, 2007.
- Kaushik, R.; Saxena, A. & Tilak, K. Can *Azospirillum* strains capable of growing at a sub-optimal temperature perform better in field-grown-wheat rhizosphere. *Biol. Fert. Soils.* 35 (2):92-95, 2002.
- Molina-Favero, C.; Creus, C. M.; Simontacchi, M.; Puntarulo, S. & Lamattina, L. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Mol. Plant Microbe In.* 21:1001-1009, 2008.
- Moreno-Galván, A.; Rojas-Tapias, D. & Bonilla, Ruth R. Development and evaluation of an alternative culture medium for mass cultivation of *Azospirillum brasilense* C16 using sequential statistical designs. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 13 (2):201-206, 2012.
- Rivera, D.; Obando, Melinda & Bonilla, Ruth R. Estandarización de un medio de cultivo a partir de fuentes agroindustriales para la multiplicación de *Azospirillum brasilense*. *Respuestas.* 17 (2):31-38, 2012.
- Rodríguez, H.; González, T.; Goire, I. & Bashan, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften.* 91:552-555, 2004.
- Sivasakthivelan, P. & Saranraj, P. *Azospirillum* and its formulations: a review. *Int. J. Microbiol. Res.* 4 (3):275-287, 2013.
- Steenhoudt, O. & Vanderleyden, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24 (4):487-506, 2000.

Recibido el 8 de mayo de 2015

Aceptado el 17 de junio de 2015