

UTILIZACION DEL ACIDO ASCORBICO COMO PRESERVANTE EN BIOPREPARADOS DE *Azospirillum brasilense*

María C. Nápoles y Ana C. Velazco

ABSTRACT. The effect of ascorbic acid at 1% as preserver in two culture media: nutrient broth and HLLT, under freezing and room temperature conditions, was studied with the purpose of improving biofertilizer quality. Besides studying microorganism viability, the performance of infectivity for a month of biopreparation preservation was analyzed. As a result, it was observed that ascorbic acid can be used as chemical preserver, it enabling the biofertilizer to keep a title of 10^7 UFC/mL medium, as well as a high infectivity up to 30 days, which makes it be applied to the productive process.

Key words: ascorbic acid, preservers, biofertilizers, *Azospirillum brasilense*, biopreparations

RESUMEN. Con el objetivo de mejorar la calidad de los biofertilizantes, se estudió el efecto del ácido ascórbico al 1% como preservante en dos medios de cultivo: caldo nutriente y HLLT, en condiciones de refrigeración y a temperatura ambiente. Además de estudiar la viabilidad del microorganismo, se analizó el comportamiento de la infectividad durante un mes de conservación del biopreparado. Se obtuvo como resultado que el ácido ascórbico se puede utilizar como preservante químico, permitiendo que el biofertilizante mantenga un título de 10^7 UFC/mL de medio, así como una alta infectividad hasta los 30 días, lo cual hace posible su utilización en el proceso productivo.

Palabras clave: ácido ascórbico, preservantes, biofertilizantes, *Azospirillum brasilense*, biopreparados

INTRODUCCION

La inoculación de algunos cultivos con *Azospirillum* ha devenido en resultados muy satisfactorios, informándose notables incrementos en la producción de arroz, maíz (Domergues *et al.*, 1973), trigo (Jain y Patriquin, 1984) y caña de azúcar (Johanna Döbereiner, 1989), entre otros cultivos de interés económico. En nuestro país se han obtenido resultados importantes en arroz (Ana Velazco *et al.*, 1992a), caña de azúcar (Roldós *et al.*, 1992) y en la producción de pastos para la alimentación del ganado (Yolanda Hernández, Sistachs y Prieto, 1992).

Sin embargo, la liberación del microorganismo al suelo no siempre conlleva a resultados esperados (Smith *et al.*, 1984). Uno de los principales problemas en la tecnología del biopreparado es la supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento y varios factores tienen influencia sobre dicha viabilidad: el medio de cultivo, el estado fisiológico de los microorganismos (Chen y Alexander, 1973), el tiempo, la temperatura de almacenamiento y el contenido de agua en el mismo (Hahn-Hagerdal, 1986), entre otros.

Nos proponemos con el presente trabajo determinar qué preservante se puede utilizar, así como analizar su efecto sobre la viabilidad e infectividad de *A. bras-*

lense en el medio líquido sumergido, para dos medios de cultivo y a diferentes temperaturas de almacenamiento.

MATERIALES Y METODOS

El conjunto de experimentos se desarrolló en condiciones de laboratorio, utilizando la cepa *Azospirillum brasilense* sp7 (ATCC 29145).

Para determinar qué preservante era factible utilizar, se realizó la fermentación en caldo nutriente (OXOID) conjuntamente con los preservantes en estudio: ácido ascórbico 1% (v/v), ácido benzoico 1% (v/v) en condiciones de zaranda a 37°C y 150 rpm durante 16 h, analizándose posteriormente el número de unidades formadoras de colonias por mililitro de medio (No. UFC/mL), mediante el método de las diluciones en dos medios de cultivo: agar nutriente (OXOID) y agar rojo congo ácido málico descrito por Rodríguez-Cáceres (1982), probándose la morfología de la colonia y de la célula.

Para determinar el efecto del preservante en la viabilidad de *A. brasilense*, se estudiaron cuatro tratamientos con tres observaciones en un diseño totalmente aleatorizado para cinco momentos después de añadido el preservante (Tabla I).

Un volumen de 0.5 mL de preinóculo con un título de 10^8 UFC/mL de medio caldo nutriente se inoculó en 10 mL de caldo nutriente y HLLT (Ana Velazco *et al.*, 1992b) para cada tratamiento. Se realizó la fermentación en condiciones de zaranda a 37°C y 150 rpm durante 16 horas.

María C. Nápoles, Investigador y Ana Velazco, Investigador Agregado del departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal No. 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Tabla I. Tratamientos analizados en el estudio de la viabilidad de *A. brasiliense*

Tratamientos	Medio de cultivo	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo después de añadir el preservante (días)
T1	caldo nutriente	5 ± 1	0
			7
			15
			21
			30
T2	caldo nutriente	28 ± 1	0
			7
			15
			21
			30
T3	HLLT	5 ± 1	0
			7
			15
			21
			30
T4	HLLT	28 ± 1	0
			7
			15
			21
			30

Posteriormente, se le añadió de forma aséptica el ácido ascórbico al 1 % (v/v) y se colocaron a las diferentes temperaturas a probar (5 y 28°C). Cada parámetro estudiado se analizó a los 0, 7, 15, 21 y 30 días después de añadido el preservante mediante el MNP en el medio semisólido NFB (Johanna Döbereiner y Day, 1976) y se determinó el número UFC/mL mediante la tabla de Mac Grady.

Los datos obtenidos fueron transformados mediante la función logarítmica y se analizaron estadísticamente a partir de un análisis de varianza bifactorial, en un diseño completamente aleatorizado para cada tiempo después de añadido el preservante. Se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan para detectar las diferencias entre medias de tratamiento.

La infectividad fue analizada sembrando diferentes diluciones del microasociado (según cada tratamiento) en tubos espermosféricos con un cultivar de arroz en medio Watanabe (Watanabe y Barraquío, 1979). A los siete días de incubación a 28°C, las raíces fueron esterilizadas superficialmente con hipoclorito de sodio al 10 % (v/v) y posteriormente maceradas, realizándoseles tinción de Gram para observar la presencia o no del microorganismo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Con la utilización del ácido ascórbico al 1 %, se obtiene un título superior (10^8 UFC/mL) al obtenido con el ácido benzoico al 1 % (10^6 UFC/mL) (Figura 1). Al analizar la morfología del cultivo se observan colonias típicas de *A. brasiliense* lisas con bordes muy regulares, lo que se corrobora con la observación microscópica de las células que se presentan en forma bacilar, espiraladas con un marcado pleomorfismo.

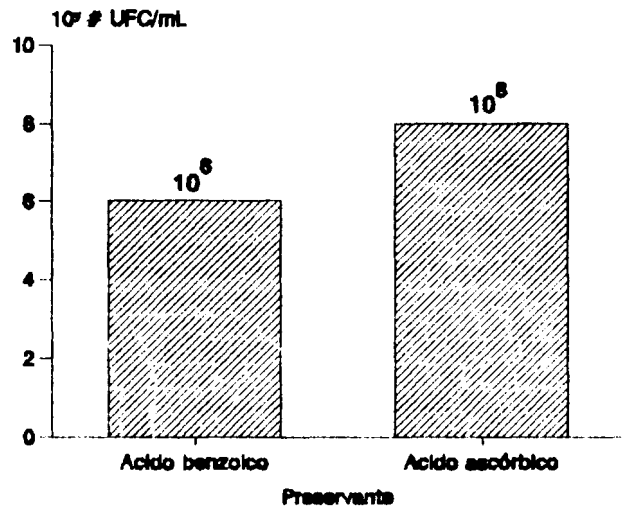


Figura 1. Número de UFC/mL de medio obtenido con cada preservante analizado

En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos con cada tratamiento en los diferentes tiempos estudiados, destacándose que la combinación más eficiente es la del medio HLLT en condiciones de refrigeración 5°C (T3), donde a los 30 días de almacenamiento poseía una población del orden de 9.1×10^7 UFC/mL de medio (Tabla II). Le siguen los tratamientos 1 (caldo nutriente almacenado a 5°C) y 4 (HLLT a 28°C), los cuales poseían a los 30 días poblaciones de 1.7 y 1.2×10^7 UFC/mL de medio. El tratamiento 2 (caldo nutriente, 28°C) resultó el que alcanzó una menor concentración del microorganismo al cabo de este tiempo. Estos resultados denotan la influencia del medio de cultivo y la temperatura. En todos los casos el número UFC/mL de medio disminuyó a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento.

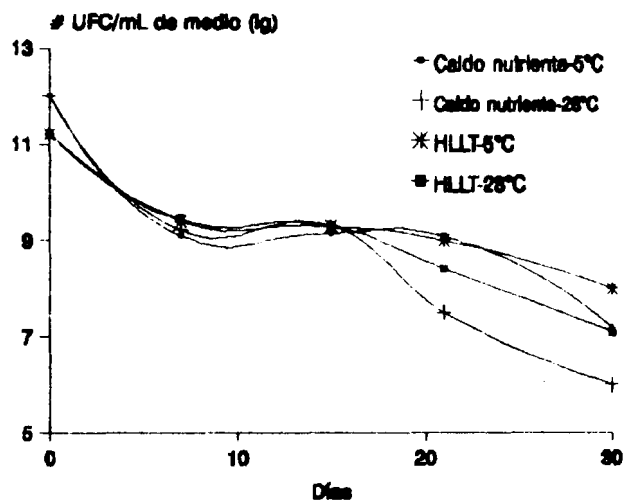


Figura 2. Número de UFC/mL de medio obtenido con cada tratamiento en los diferentes tiempos analizados

Tabla II. Efecto de los distintos tratamientos sobre la viabilidad de *A. brasilense* evaluados a los 0, 7, 15, 21 y 30 días después de añadido el preservante

Tratamiento	No. UFC/mL de medio				
	0	7	15	21	30
1 (C.N-5°C)	1.10 x 10 ¹²	1.2 x 10 ⁹	1.10 x 10 ⁹	9.3 x 10 ⁸	1.7 x 10 ⁷
2 (C.N.-28°C)	1.10 x 10 ¹²	1.7 x 10 ⁹	1.6 x 10 ⁹	2.3 x 10 ⁷	8.3 x 10 ⁵
3 (HLLT-5°C)	1.7 x 10 ¹¹	2.7 x 10 ⁹	1.8 x 10 ⁹	6.0 x 10 ⁸	9.1 x 10 ⁷
4 (HLLT-28°C)	1.7 x 10 ¹¹	2.4 x 10 ⁹	1.7 x 10 ⁹	2.0 x 10 ⁸	1.2 x 10 ⁷

El análisis estadístico (Tabla III) arrojó que para el tiempo 0 existen diferencias significativas entre los medios, a favor del caldo nutriente. A los siete días se mantienen estas diferencias pero a favor de HLLT. A los 15 días los tratamientos no mostraron diferencias significativas, no así a los 21 donde se presentan diferencias muy significativas, destacándose los tratamientos 1 y 3 gracias a la actividad conservadora de las bajas temperaturas.

Tabla III. Resultados del análisis de varianza para cada momento

Momento (días)	Interacción	E.S
0	Caldo nutriente:	12.04 a
	HLLT	11.22 b
7	Caldo nutriente:	9.14 b
	HLLT	9.41 a
15	Caldo nutriente	9.13 ns
	HLLT:	9.24 ns
	5°C:	9.15 ns
	28°C:	9.22 ns
21	Caldo nutriente-5°C:	8.97 a
	caldo nutriente-28°C:	7.37 c
	HLLT-5°C	8.78 ab
	HLLT-28°C:	8.3 b
30	Caldo nutriente:	6.57 b
	HLLT:	7.52 a
	5°C:	7.59 a
	28°C:	6.50 b

A los 30 días existen diferencias significativas entre los medios (teniendo el medio HLLT una tendencia positiva a mantener una mayor concentración del microorganismo) y muy significativas entre las temperaturas, donde los mejores resultados pertenecieron a temperaturas frías.

Al analizar la infectividad, se encontró que los biopreparados mantienen su capacidad infectiva hasta los 30 días almacenados para ambas temperaturas. Observaciones microscópicas demuestran la colonización interna de la raíz, encontrándose formas bacilares de los microorganismos y la no aparición de quistes o formas elongadas poco infectivas.

De forma general, se observó que el ácido ascórbico presentó mayor actividad como preservante a temperaturas frías al coincidir la actividad microbiostática de ambos.

La acción del preservante químico ofrece la posibilidad de extender el uso del biopreparado hasta 30 días, pues Ana Velazco y Fernández (1992) demostraron que en medio líquido almacenado a 30°C, al cabo de este tiempo ya no existía población de *A. brasilense* sp7.

BIBLIOGRAFIA

- La aplicación de biopreparados a base de *Azospirillum* y su efecto sobre la productividad de la caña de azúcar. / J. Roldós... / *et al.* - En: Seminario Científico, 8, INCA, 1992.
- Chen, M. y M. Alexander. Survival of Soil Bacteria During Prolonged Desiccation. *Soil Biochem.* 5:213-221, 1973.
- Döbereiner, Johanna. Isolation and Identification of Root Associated Diazotrophs. / Johanna Döbereiner. - In: Nitrogen fixation with Non-Legumes. - Wageningen: Ed Kluwer, 1989 - p. 103-108.
- Döbereiner, Johanna. Associate Symbiosis in Tropical Grasses: Characterization of microorganisms and Dinitrogen-Fixing Sites. / Johanna Döbereiner, J. M. Day. - En: Proc. Int. Symp. Nitrogen Fixation, 1, 1976. - p. 518-538.
- Dommergues, Y. / *et al.* Non-Symbiotic Nitrogen Fixation in The Tropical Rhizosphere of Rice, Maize and Different Tropical Grasses. *Soil Biol. Biochem.* (Nueva York)5:83-89, 1973.
- Hahn-Hagerdal, B. Water Activity: a Possible External Regulator in Biotechnical Processes. *Enzyme Microb. Technol.* (Covind Ford)8:322-327, 1986.
- Hernández, Yolanda. Introducción al uso de *Azospirillum* en pastos. / Yolanda Hernández, E. Sistachs, A. Prieto. - En: Seminario Científico, 8, INCA, 1992.
- Jain, D. K. y D. G. Patriquin. Root Hair Deformation, Bacterial Attachment, and Plant Growth in Wheat-*Azospirillum* Association. *Appl. Environm. Microbiol.* 48:1208-1213, 1984.
- Obtención de medios de cultivo para la fermentación industrial de *A. brasilense* / Ana Velazco... / *et al.* - La Habana: INCA, 1992b. (Documento interno).
- Rodríguez-Cáceres E. A. Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology* (Washington)44(4):990-991, 1982.
- Smith, R. L. / *et al.* Responses of Sorghum and Pennisetum species to the N₂-Fixing Bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microb.* (Washington)47:1331-1336, 1984.
- Uso del *Azospirillum brasilense* en el cultivo del arroz. / Ana Velazco... / *et al.* - En: Seminario Científico, 8, INCA, 1992a.
- Velazco, Ana y F. Fernández. Efecto de la viabilidad y efectividad de tres cepas del género *Azospirillum* sp. en diferentes tipos de inoculantes. *Cultivos Tropicales* (La Habana)13(1):9-13, 1992.
- Watanabe, I. y W. L. Barraquio. Low Levels of Fixed Nitrogen Required for Isolation of Free Living N₂-Fixing Organisms From Rice Roots. *Nature* (Londres)277:565-568, 1979.

Recibido: 1 de febrero de 1994

Aceptado: 18 de marzo de 1994