



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**Estrategias para la obtención de cultivos de alta densidad celular
en *Azospirillum brasilense***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Ingue Karen Carrasco Espinosa

Tutor principal: Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Comité tutor: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch, Facultad de Química, UNAM

Dr. Humberto García Arellano, UAM Lerma

Ciudad de México, Noviembre

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán en la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Problemas Nacionales 247473, CONACyT INNOVAPYME: 230042, PAPIIT-UNAM IN209113, IN 210013.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán por la confianza depositada en mi persona para la realización de este proyecto, así como el apoyo brindado desde el primer día.

De manera muy especial al Ing. Abel Blancas, al Biól. Jesús Villegas y al M.C. Ramsés García por todo el apoyo técnico que me ofrecieron en la Planta Piloto, así como sus consejos y palabras de aliento que me ayudaron a sacar adelante este proyecto.

A la Dra. Adriana Valdéz quien apoyó con su tiempo, experiencia y críticas acertadas a este proyecto.

A los integrantes de la UBP que cada vez son más! Pero sin duda mi cariño y afecto por siempre a la Dra. Martha, Deisy, Ramsés(es), Monse, Andreita, Dany boy, Betsabé, Yryx, Dianita, Dr. Peter, Emilio, Ulises, Lalito, Pedro, Leslie, Mariana, Greta, Sarita, Giroshi, Daniel, Andrea B, Margarita y Memo.

A mi comité: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch y Dr. Humberto García Arellano que con sus críticas y comentarios de cada semestre, apoyaron este proyecto y ayudaron a formar mi incipiente pensamiento crítico.

Al jurado evaluador Dra. Herminia Loza Tavera, Dr. Carlos Peña Malacara, Dr. Daniel Segura González, Dr. Antonino Baez Rogelio y a la Dra. María Soledad Córdova Aguilar por revisar cuidadosamente este documento, y enriquecer desde su área de conocimiento y experiencia este manuscrito.

Al financiamiento otorgado por PAEP (Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado) para presentar parte de este trabajo en el XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering/ 12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms GIM 2013.

A los proyectos Conacyt: 247473 y 230042, así como al Programa institucional: La producción de biomoléculas de interés biomédico en bacterias y hongos: Desde un enfoque básico hasta algunas aplicaciones biotecnológicas.

DEDICATORIA

A mis padres Ingue y Guillermo por guiarme con su ejemplo y estar en en todos los momentos de mi vida, infinitas gracias por apoyarme y confiar en mí, los llevo en el corazón.

A mi ♥ de mango: Darío, por llenar de luz y felicidad mi vida.

A mi compañero de viaje Alan, por su comprensión, paciencia, cariño y amor incondicional.

A mi hermano José con mucho cariño, por invadir de humor y buena onda, esta pequeña familia.

A mi familia en general, en especial a mis tías de las cuales he recibido afecto, experiencia y motivación en estos últimos años: Norma, Susana, Maricela y Lidia. A mis tíos Raúl, Sergio y Enrique por compartir momentos de alegría y consejos. A mis primoas Lucía, Karla, Edgar, Raymundo, Pavel, Carlos y Raúl por ser ejemplo de diversidad, esfuerzo y lucha.

En memoria a mis abuelos Elenita, Jose Luis y Raymundo por los valores inculcados como el esfuerzo y la perseverancia que hacen de nuestra familia lo que somos. A Conchita por compartir el interés biológico y ser un apoyo constante.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
ABREVIATURAS	8
1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	11
3. ANTECEDENTES	13
3.1 El género <i>Azospirillum</i>	13
3.2 Efecto de <i>Azospirillum</i> en plantas	15
3.3 Producción y degradación de Poli-3-hidroxibutirato (PHB).....	16
3.4 Agregación celular	19
3.5 Crecimiento de <i>A. brasilense</i>	21
3.6 <i>Azospirillum</i> como inoculante.....	27
3.7 Cultivos de alta densidad celular	30
3.8 <i>Azospirillum</i> en cultivo	31
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVOS	35
5.1 Objetivo general.....	35
5.2 Objetivos específicos	35
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	36
7. MATERIALES Y MÉTODOS	38
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
8.1 Evaluación del crecimiento de <i>A. brasilense</i> en fuentes de carbono alternativas	48
8.2 Efecto de la velocidad de aireación sobre el crecimiento de <i>A. brasilense</i> en	52
columnas de burbujeo en lote	52
8.3 Efecto de diferentes perfiles de alimentación sobre el crecimiento de.....	60
<i>A. brasilense</i> en columnas de burbujeo.....	60
9. CONCLUSIONES	65
10. PERSPECTIVAS	65
11. REFERENCIAS.....	66
12. Anexos	80

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1** Umbrales de seguridad ante los principales problemas ambientales
- Figura 3.1** Mecanismos por los cuales *Azospirillum* puede mejorar el crecimiento en plantas
- Figura 3.2** Gránulos de PHB en *Azospirillum brasilense* SP7 crecidas en un relación alta de C:N
- Figura 3.3** Ruta metabólica de PHB en bacterias acumuladoras de PHB
- Figura 3.4** Proceso de adhesión de *Azospirillum* a las raíces de las plantas
- Figura 3.5** Ultraestructuras de los quistes de *A. brasilense* en microscopio electrónico de transmisión
- Figura 3.6** Metabolismo de carbono de *A. brasilense*
- Figura 6.1** Determinación del crecimiento celular y producción de PHB en *A. brasilense*
- Figura 7.1** Descripción de la columna de burbujeo utilizada en el presente trabajo
- Figura 7.2** Descripción del sistema de alimentación en columnas de burbujeo 6 l
- Figura 7.3** Representación de los perfiles de alimentación de los cultivos en mezcla de *A. brasilense* en columnas de burbujeo de 6 l
- Figura 7.4** Curva estándar de PHB en base al coeficiente de extinción del ácido crotonico
- Figura 8.1** Cinética de crecimiento de *A. brasilense* cepa Start en fuentes alternativas de carbono.
- Figura 8.2** Cinética de crecimiento de *A. brasilense* cepa Calf en fuentes alternativas de carbono.
- Figura 8.3** Cinética de crecimiento, consumo de sustrato, producción de PHB y variables ambientales de *A. brasilense* cepa Start a 0.1, 0.5 y 1.0 vvm
- Figura 8.4** Cinética de crecimiento, consumo de sustrato, producción de PHB y variables ambientales de *A. brasilense* cepa Calf a 0.1, 0.5 y 1.0 vvm
- Figura 8.5** Cantidad de PHB a cuatro meses de los cultivos a 0.1, 0.5 y 1.0 vvm de *A. brasilense* Start y Calf
- Figura 8.6** Cinética de crecimiento, consumo de sustrato, producción de PHB y variables ambientales de *A. brasilense* cepas Start-Calf a 0.1 vvm en lote alimentado
- Figura 12.1** Espectro infrarrojo PHB comercial donde se muestran los picos característicos a 1728 y 2928 cm⁻¹
- Figura 12.2** Infrarrojo de PHB obtenido en laboratorio

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Lista de especies de *Azospirillum* aisladas utilizando diferentes medios de cultivo

Tabla 3.2 Vida de anaquel en inoculantes de *Azospirillum* spp.

Tabla 3.3 Cultivos de *Azospirillum* para la generación de biomasa

Tabla 7.1 Composición medio NFb/Rojo Congo

Tabla 7.2 Composición del medio NFb mod

Tabla 7.3 Esquema de alimentación exponencial para el cultivo en mezcla de *A. brasilense*

Tabla 7.4 Esquema de alimentación escalonado para el cultivo en mezcla de *A. brasilense*

Tabla 7.5 Esquema de alimentación lineal para el cultivo en mezcla de *A. brasilense*

Tabla 8.1 Parámetros de crecimiento y biomasa de *A. brasilense* cepa Start en matraces a 30°C y 150 rpm al tiempo final (28h)

Tabla 8.2 Parámetros de crecimiento y biomasa de *A. brasilense* cepa Calf en matraces a 30°C y 150 rpm al tiempo final (28h)

Tabla 8.3 Viabilidad de los cultivos de *A. brasilense* en matraces a 4 meses

Tabla 8.4 Efecto del flujo de aireación sobre el crecimiento de *A. brasilense* cepa Start en columnas de burbujeo de 6L a las 28h

Tabla 8.5 Efecto del flujo de aireación sobre el crecimiento de *A. brasilense* cepa Calf en columnas de burbujeo de 6L a las 28 h

Tabla 8.6 Viabilidad de los cultivos de *A. brasilense* en columna de burbujeo a 4 meses y un año almacenados a temperatura ambiente

Tabla 8.7 Parámetros de crecimiento obtenidos en los diferentes perfiles de alimentación de las cepas Start y Calf de *A. brasilense* en columnas de burbujeo 6 l

Tabla 8.8 Viabilidad de los cultivos de *Azospirillum brasilense* (en mezcla) alimentados y control en columna de burbuja a 2 y 6 meses.

ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
AIA	ácido indol acético
CBR	reactor de columna de burbujeo
CDW	peso seco celular (por sus siglass en inglés: Cell Dry Weight)
CPS	polisacáridos capsulares (por sus siglass en inglés: Capsular Polysaccharid)
EPS	exopolisacáridos (por sus siglass en inglés: Exopolysaccharid)
g	gramo
h	hora
L	litro(s)
L-MDH	L-malato deshidrogenasa
MDH	D-malato deshidrogenasa
µg	microgramo(s)
mL	mililitro(s)
N ₂	nitrógeno atmosférico
NH ₄ Cl	cloruro de amonio
PGPR	Rizobacterias Promotoras del Crecimiento en Plantas (por sus siglas en inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria)
pH	potencial hidrógeno
PHA	polihidroxiclcanoatos
PHB	poli-β-hidroxitirato
rpm	revoluciones por minuto
TCA	Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (por sus siglas en inglés: Tricarboxilic Acid Cycle)
TOD	Tensión de Oxígeno de Disuelto
U.A.	unidades de absorbancia
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UV	Ultravioleta
vvm	volumen de aire/volumen de medio x minuto

1. RESUMEN

Azospirillum brasilense es una de las especies más estudiadas entre las rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas debido a que favorecen la síntesis de fitohormonas y la fijación de nitrógeno. Su atractivo se debe a la capacidad de estimular el crecimiento de plantas como maíz, trigo, arroz, sorgo, avena y de pastos forrajeros. En la actualidad, su uso comercial como biofertilizante, comienza a extenderse en diferentes países como Israel, Argentina, Uruguay, Brasil y México; en los cuales pequeñas y medianas empresas, así como agencias gubernamentales se encuentran involucradas en la producción de cultivos de células viables entre 10^7 - 10^{10} UFC mL⁻¹, conocidos como inoculantes. Por lo anterior, en el presente trabajo se buscó maximizar la densidad celular mediante el uso de diferentes fuentes de carbono en matraces, así como la implementación de diferentes velocidades de aireación y perfiles de alimentación en columnas de burbujeo.

El trabajo se dividió en tres etapas. En la primera, se evaluó el crecimiento en matraces de las cepas industriales Start y Calf de *A. brasilense* (Biofábrica Siglo XXI), utilizando diferentes fuentes de carbono: ácido málico, ácido succínico, glicerol y gluconato de sodio en medio mineral NFb. La mayor densidad celular viable para ambas cepas se obtuvo en el medio NFb con gluconato de sodio a las 28h, $9.10 \times 10^9 \pm 0.15$ UFC mL⁻¹ y $5.5 \times 10^9 \pm 2.19$ UFC mL⁻¹ para las cepas Start y Calf respectivamente. Seguido de ácido málico donde se obtuvieron $1.08 \times 10^9 \pm 0.31$ UFC mL⁻¹ para Start y $2.63 \times 10^9 \pm 0.52$ UFC mL⁻¹ para Calf (con ácido succínico y glicerol se obtuvieron cuentas de 10^8 y 10^7 UFC mL⁻¹). Luego de cuatro meses de almacenamiento, la densidad celular de los cultivos realizados con gluconato de sodio decayó en un orden de magnitud (10^8 UFC mL⁻¹) mientras que, la de ácido málico se mantuvo en el orden de 10^9 UFC mL⁻¹. Por tanto, el resto de los experimentos de este trabajo se realizaron con ácido málico como fuente de carbono.

En la segunda etapa, se realizaron cultivos en lote para cada una de las cepas en columnas de burbujeo, a diferentes velocidades de aireación (0.1, 0.5 y 1.0 vvm). Se observó un efecto negativo de mayores flujos de aireación sobre las densidades celulares de ambas cepas. En 0.1 vvm se obtuvieron las mayores densidades celulares: $7.8 \times 10^{10} \pm 1.31$ UFC mL⁻¹ para el caso de la cepa Calf y $2.86 \times 10^9 \pm 0.47$ UFC mL⁻¹ para la cepa Start. Así mismo, se observó el consumo de la forma D-malato mientras que en 0.5 y 1.0 vvm, el consumo de éste isómero fue nulo.

Finalmente, en la tercera etapa se realizaron cultivos en columnas de burbujeo alimentados con perfiles exponencial, escalonado y lineal con una mezcla 1:1 (al inicio de cultivo) de las cepas Start-Calf en 0.1vvm. En el cultivo control (sin alimentar) se obtuvieron $3.7 \times 10^{10} \pm 0.20$ UFC mL⁻¹ mientras que, con el perfil alimentado escalonado, se obtuvo una cuenta ligeramente superior: $8.3 \times 10^{10} \pm 0.05$ UFC mL⁻¹, con el perfil lineal: $8.52 \times 10^{11} \pm 0.51$ UFC mL⁻¹ y dos ordenes de magnitud sobre el control fue obtenido por el alimentado exponencial: $3.9 \times 10^{12} \pm 1.55$ UFC mL⁻¹. La acumulación de PHB de los cultivos alimentados fue mínima y la viabilidad de los cultivos disminuyó en promedio dos ordenes de magnitud luego de 6 meses en anaquel. A través del desarrollo del presente trabajo, se estableció un proceso de cultivo para *A. brasilense* en columnas de burbujeo, en el cual se utilizan ambos isómeros del sustrato DL-ácido málico tanto en lote como en sistema por lote alimentado en éste último de se obtuvieron altas densidades celulares ($3.9 \times 10^{12} \pm 1.55$ UFC mL⁻¹) de *A. brasilense*.

2. INTRODUCCIÓN

La inoculación de plantas con bacterias benéficas se ha practicado desde hace cientos de años; basada en la experiencia de los agricultores que mezclaban tierra donde crecían las leguminosas, para cultivos no-leguminosos con buenos resultados. El método se extendió y se recomendó como técnica de cultivo por Estados Unidos, aún sin atribuirse los efectos a los microorganismos presentes [Smith, 1992; Bashan *et al.*, 2013].

En 1896 se registró la primera patente de microorganismos para la inoculación en plantas (“Nitragin”), basada en bacterias del género *Rhizobium* [Nobbe y Hiltner, 1896]. Este producto abrió la posibilidad a otras bacterias rizosféricas de ser utilizadas como biofertilizantes (microorganismos vivos o latentes que mejoran la fertilidad del suelo) por ejemplo: *Azotobacter* sp. y *Bacillus megaterium* en los años 30s y 40s del siglo XX y *Azospirillum* en la década de los 70s [Döbereiner y Day, 1976; Bashan, 1998; Bashan y Holguín 1997; Bashan y de Bashan 2010; Glick, 2014] .

Azospirillum es uno de los géneros más estudiado entre las rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) [Perrig *et al.*, 2007; Bashan y de Bashan, 2010]. La inoculación con *Azospirillum* como biofertiizante en cereales y pastos forrejeros genera aumento en el peso seco de planta y granos, aumento en la cantidad de nitrógeno, aumento de retoños; emergencia de plántulas y florescencia temprana; incremento en el número de granos por espiga; plantas más altas, con mayor tamaño foliar y tasas de germinación superiores a las convencionales, además de incremento de la masa radicular en longitud y volumen [Fibach-Paldi *et al.*, 2012; Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2009; Hartmann y Bashan, 2009; Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005].

Ante la creciente demanda de alimentos, el uso de fertilizantes químicos en los campos de cultivo se ha incrementado. Sin embargo, se estima que cerca del 50% del nitrógeno contenido en los fertilizantes se infiltra [Adesemoye y Kloepper, 2009; Tilman 1998], eutrofizando los mantos acuíferos y posteriormente volatilizándose formando gases reactivos, desencadenando la llamada “cascada de nitrógeno” [Murray-Tortarolo y Murray-Prisant, 2013]. El uso de biofertilizantes se propone como una solución sustentable a la alteración del ciclo del nitrógeno [Rodríguez y Fraga, 1999; Ahemad y Kibret, 2014; Sivasakthivelan

y Saranraj, 2013; Suyal *et al.*, 2016], el cual ha superado tres veces el umbral de seguridad para el planeta (Figura 2.1) siendo el segundo desequilibrio ambiental detectado [Rockström *et al.*, 2009].

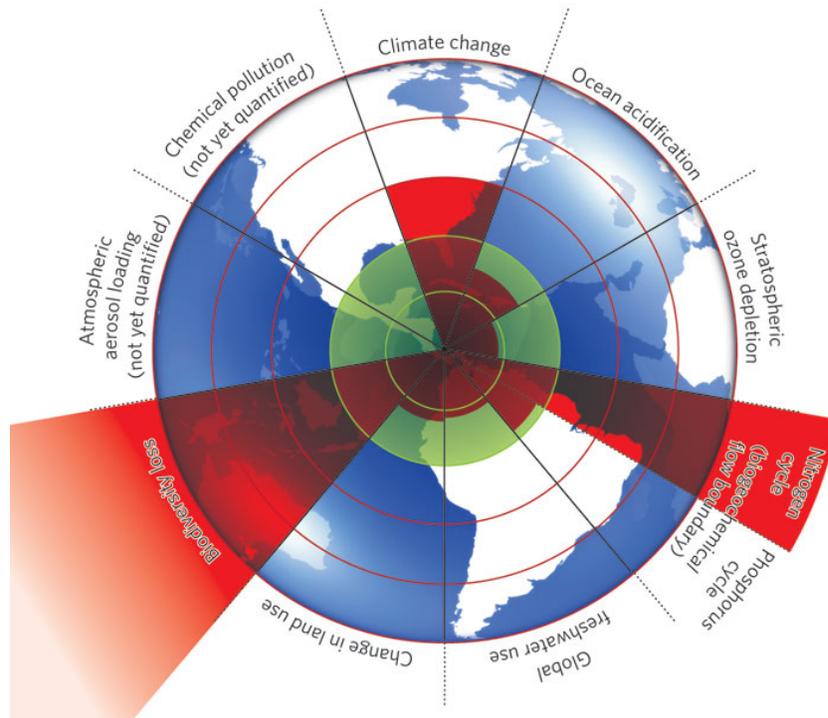


Figura 2.1 Umbrales de seguridad ante los principales problemas ambientales (tomada de Rockström *et al.*, 2009). Se destacan la pérdida de biodiversidad, cambio climático y los cambios en el ciclo de nitrógeno como problemas que han rebasado el umbral seguro para la vida humana.

El objetivo de este trabajo fue establecer estrategias de cultivo donde se obtuvieran altas densidades celulares de *Azospirillum brasilense* (mayores al orden de 10^9 UFC mL⁻¹) con larga vida de anaquel para ser utilizado como biofertilizante.

3. ANTECEDENTES

3.1 El género *Azospirillum*

Las bacterias del género *Azospirillum* se encuentran clasificadas dentro de la subclase α -Proteobacteria por análisis de secuencia de 16S RNAr [Young, 1992]; son microorganismos diazótrofos de vida libre en forma de bastón, con flagelos polares y peritricos, de metabolismo aerobio (aunque algunas cepas tienen la capacidad de crecer en condiciones anaerobias) que colonizan por adhesión la superficie de las raíces [Baldani *et al.*, 2005, Burdman *et al.*, 2000] y cuya ocurrencia dentro de la población rizosférica varía del 1 al 10% [Fani *et al.*, 1995].

Se han descrito 17 especies del género *Azospirillum* (Tabla 3.1), clasificadas de acuerdo a sus características genéticas, bioquímicas y moleculares: *A. lipoferum*, *A. brasilense* (1978), *A. amazonense* (1983), *A. halopraeferens* (1987), *A. irakense* (1989), *A. doebereineriae* (2001), *A. oryzae*, *A. zae*, *A. candense* (2005), *A. melinis* (2006), *A. rugosum* (2008) *A. palatum*, *A. picis* (2009) *A. thiophilum* (2010), *A. formosense*, *A. humicireducens* y *A. fermentarium* (2013) [Reis *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2015].

Los genomas de las especies de *Azospirillum* hasta ahora descritos muestran múltiples replicones con tamaños que varían de 4.8-9.7 Mpb (los de mayor tamaño tienen las características de cromosomas bacterianos completos; mientras que los más pequeños, de plásmidos), los cuales son considerados como elementos potenciales de plasticidad genotípica, dado que pueden existir re-arreglos espontáneos donde los replicones formen nuevos megaplásmidos [Caballero-Mellado *et al.*, 1999; Martin-Didonet *et al.*, 2000; Wisniewski-Dye *et al.*, 2011].

En los genomas del género *Azospirillum* secuenciados, existe un elevado porcentaje de genes (~50%) involucrados en mecanismos de defensa, biogénesis de pared celular, transporte, metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, iones inorgánicos y metabolitos secundarios, así como una pérdida de genes ancestrales propios del ambiente acuático de las proteobacterias pertenecientes al clado "*hydrobacteria*" que apoyan la hipótesis de transición del ambiente acuático al terrestre [Wisniewski-Dye *et al.*, 2011].

Azospirillum fue aislado por primera vez de suelos asociados al cultivo de cereales como avena, maíz, sorgo, mijo y arroz, así como de pastos (*Panicum máximum*, *Cynodon dactylon*); en medio “semi-sólido” libre de nitrógeno (malato, 0.5% como fuente de carbono) que favorecía las condiciones microaerófilas y de fijación de nitrógeno diatómico atmosférico [Day y Döbereiner 1976]. Los aislados de este género incrementaban el contenido de nitrógeno en el medio llamado posteriormente “NFb” [Döbereiner *et al.*, 1976]. En la actualidad, éste y otros medios se han utilizado para el aislamiento e identificación de nuevas especies (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Lista de especies de *Azospirillum* aisladas utilizando diferentes medios de cultivo

Medio	<i>Azospirillum</i>	Fuente de carbono	Condiciones	Referencia
Semi-sólido				
NFb	<i>A.lipoferum</i>	Malato	pH 6.5-6.8+biotina	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
	<i>A.brasilense</i>			Eckert <i>et al.</i> , 2001
	<i>A.doebereineriae</i>			Peng <i>et al.</i> , 2006
	<i>A.melinis</i>			Lin <i>et al.</i> , 2012
	<i>A.formosense</i>			
	<i>A.irakense</i>		pH 7.0-8.5+0.3% NaCl	Khammas <i>et al.</i> , 1989
SM	<i>A.halopraeferens</i>		pH 8.5+1.5% NaCl. Incubación a 41°C	Reinhold <i>et al.</i> , 1987
LGI	<i>A.amazonense</i>	Sacarosa	pH 6.0-6.2	Baldani 1986
	<i>A.melinis</i>			Peng <i>et al.</i> , 2006
FAM	<i>A.amazonense</i>			pH 6.0+NaCl. 100 mg L ⁻¹
M	<i>A.oryzae</i>	Malato	pH 6.8 + extracto de levadura y NaCl 100 mg c/u	Xie y Yokota, 2005
NFG	<i>A.oryzae</i>	Glucosa		
M	<i>A.zaeae</i>	Malato	pH 7.2-7.4 (sin biotina)	Peng <i>et al.</i> , 2006
	<i>A.canadense</i>			
NFb o LGI	<i>A.melinis</i>		Dependiendo del medio	
MPSS	<i>A.thiophilum</i>	Succinato de sodio	pH 7.5-FeS	Lavrinenko <i>et al.</i> , 2010
Sólido				
NB/TSA/BHI	<i>A.rugosum</i>	Medio rico	Agar nutritivo Agar soya-triptona Agar infusión cerebro-corazón	Young <i>et al.</i> , 2008
TYB	<i>A.palatum</i>		Extracto de levadura-carne-triptona	Zhou <i>et al.</i> , 2009
TSA	<i>A.picis</i>		Agar soya-triptona	Lin <i>et al.</i> , 2009
NB	<i>A.humicireducens</i>		Agar nutritivo, pH 7.2	Zhou <i>et al.</i> , 2013
TSA	<i>A.fermentarium</i>		Agar soya-triptona	Lin <i>et al.</i> , 2013

Tomada y modificada de Reis *et al.*, 2015

3.2 Efecto de *Azospirillum* en plantas

El género *Azospirillum* pertenece a las rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPR por sus siglas en inglés), capaces de afectar el rendimiento de numerosas plantas de importancia ecológica y agronómica a través de diferentes mecanismos como: 1) fijación de nitrógeno atmosférico, 2) producción de diversas fitohormonas (auxinas (AIA), giberelinas, citocininas), éstas últimas inducen cambios morfológicos y fisiológicos en las raíces, mejorando así, la absorción de agua y nutrientes, y 3) control biológico (Figura 3.1) [Bashan *et al.*, 2004; Bashan y de-Bashan, 2010; Dobbelaere *et al.*, 2001; Fibach-Paldi *et al.*, 2012].

Azospirillum fue aislado por primera vez de cereales, por lo que fue utilizado para la inoculación en primera instancia de plantas como avena, trigo, maíz y sorgo. Sin embargo las cepas de *Azospirillum* no muestran preferencia por plantas anuales o perenes, cultivos o malezas y puede ser aplicado a plantas sin antecedentes de *Azospirillum* (es decir, en aquellas plantas que no tienen una relación con la bacteria reportada), en diferentes tipos de suelo (árido, semi-árido, de montaña) [Döbereiner *et al.*, 1976; Bashan *et al.*, 1995; Martínez-Morales *et al.*, 2003; Viviene *et al.*, 2004; Joe *et al.*, 2012; Sivasakthivelan y Saranraj, 2013]; por lo que se le considera una bacteria planta-inespecífica y un colonizador generalista de raíces [Fages, 1992; Barassi *et al.*, 2007, Mehraz, 2015].

Otras características que posicionan a *Azospirillum* como una PGPR muy prometedora son: su alta competitividad en la rizósfera para colonizar de manera eficiente, la compatibilidad con otras rizobacterias, tener un amplio espectro de acción (Figura 3.1), es de fácil multiplicación y segura para el ambiente. Por ello, es que ha sido utilizada como inoculante de elección a nivel comercial, sólo o con otras PGPR así como micorrizas arbusculares vesiculares [Miché *et al.*, 2000; 2002; Yasuda *et al.*, 2009; Bashan *et al.*, 2004; Fibach-Paldi, 2012; Reddy, 2013, Perez- Montano *et al.*, 2014; Mehnaz, 2015].

En el presente trabajo nos enfocaremos a trabajar con dos cepas de *A. brasilense*, una de las especies más estudiadas de este género, al ser de las primeras en ser aisladas y descritas por Tarrand en 1978 [Tarrand *et al.*, 1978]. Las cepas Start y Calf de *A. brasilense* fueron aisladas en México y descritas por el Dr. Jesús Caballero-Mellado (CCG-UNAM).

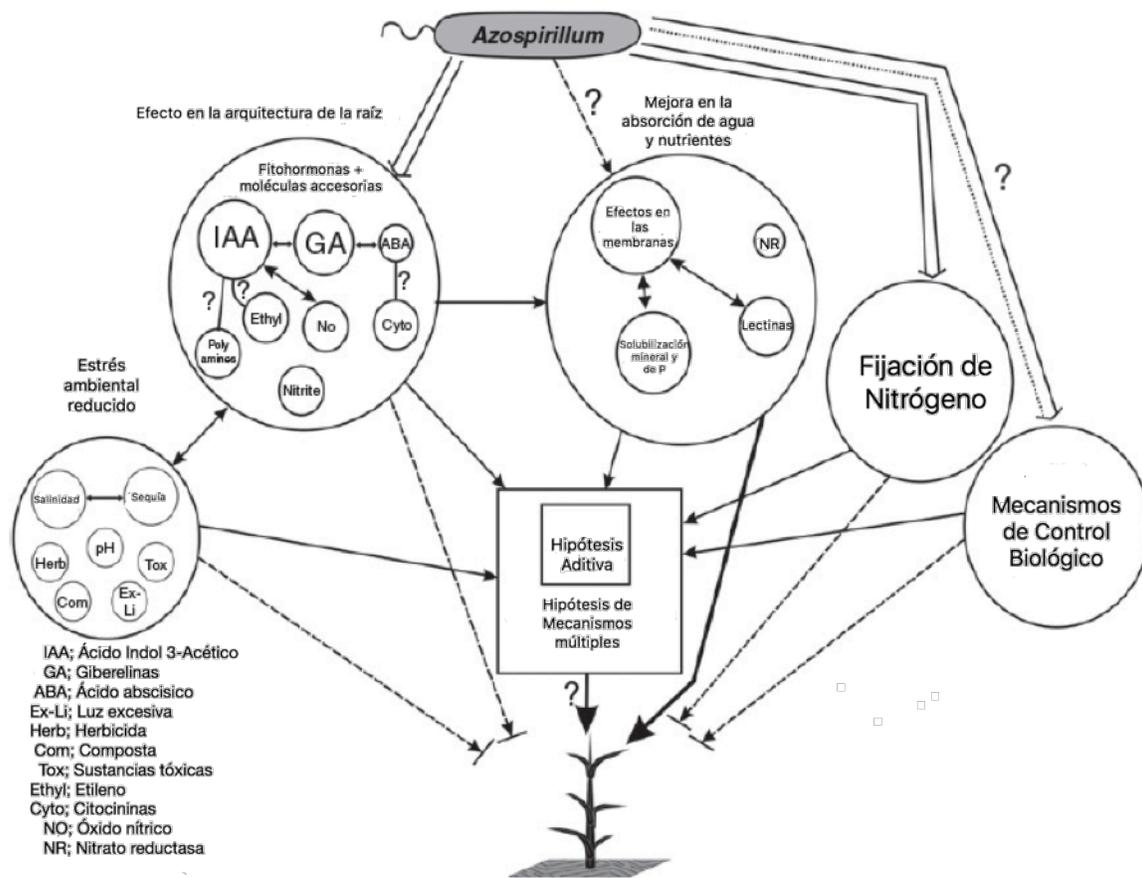


Figura 3.1 Mecanismos por los cuales *Azospirillum* puede mejorar el crecimiento en plantas (tomada y modificada de Bashan y de-Bashan, 2010).

Los círculos representan procesos demostrados experimentalmente y los cuadrados teorías. El tamaño del círculo representa la importancia relativa de acuerdo a los datos actuales. Las flechas sólidas: mecanismos que promueven directamente el crecimiento en planta. Las flechas punteadas: mecanismos que explican parcialmente el efecto promotor. Las flechas sencillas: interacciones probadas entre diferentes mecanismos. Las flechas en doble línea: producción directa de moléculas o procesos por las células bacterianas. El signo de interrogación (?): vías parcialmente probadas o no probadas al momento.

3.3 Producción y degradación de Poli-3-hidroxi-butarato (PHB)

El poli-D(-)3-hidroxi-butarato (PHB), es un polímero que se almacena como material de reserva en forma de cuerpos de inclusión (Figura 3.2) en algunas bacterias bajo condiciones de limitación de O_2 , N, PO_4^{3-} , ó SO_4^{2-} , pero siempre en exceso de alguna fuente de carbono [Manna *et al.*, 1997]. La producción de PHB

en *A. brasilense* fue reportada por primera vez en 1976, en la cepa Sp7 crecida con N_2 , donde se obtuvo hasta el 30% del peso seco; mientras que, con NH_4^+ , el PHB representaba menos del 1% del peso seco [Okon *et al.*, 1976] y hasta el 12% en condiciones microaerobias [Nur *et al.*, 1982]. Sin embargo, la máxima concentración (75% del peso seco) se obtuvo en el medio bajo condiciones de fijación de nitrógeno (en ausencia de NH_4Cl) en la cepa de *A. brasilense* Cd [Tal y Okon, 1985].



Figura 3.2 Gránulos de PHB en *Azospirillum brasilense* SP7 crecidas en un relación alta (4:25) de C:N. La flecha señala a los gránulos de PHB vistos en microscopio electrónico de transmisión (tomada de Kadouri *et al.* 2002).

La vía de síntesis de PHB en *A. brasilense* parece ser la misma que se describió para *Ralstonia eutropha* [Kadouri *et al.*, 2002]. Esta vía (Figura 3.3) comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, catalizada por la β -cetotiolasa (codificada por *phbA*), una reductasa de acetoacil-CoA dependiente de NADPH (codificada por *phbB*) cataliza la conversión de acetoacil-CoA (en una reacción reversible) a β -hidroxibutiril-CoA, que es polimerizado por la PHB sintasa (codificada por *phbC*). A diferencia de otros procariontes productores de PHB, *A. brasilense* no produce co-polímeros de hidroxialcanoatos, únicamente homopolímeros [Itzingsohn *et al.*, 1995].

El PHB es degradado por la depolimerasa intracelular: *phaZ*, se hidroliza en oligómeros 3HB, los cuales son oxidados por la 3HB deshidrogenasa (BDH). El acetoacetato resultante es convertido a acetoacetyl-coenzima A por la acetoacetyl-CoA sintetasa o la enzima succinil CoA transferasa. Cada molécula de acetoacetyl-CoA es transformada para dar lugar a dos moléculas de acetil-CoA mediante la acción de la enzima β -cetotiolasa. Las moléculas de acetil-CoA son metabolizadas vía el Ciclo de los Ácidos

Tricarboxílicos (TCA) o por la vía del glioxilato, así como para síntesis de algunos aminoácidos (ver Figura 3.3) [McCool y Cannon, 1999; Shiraki *et al.*, 2006].

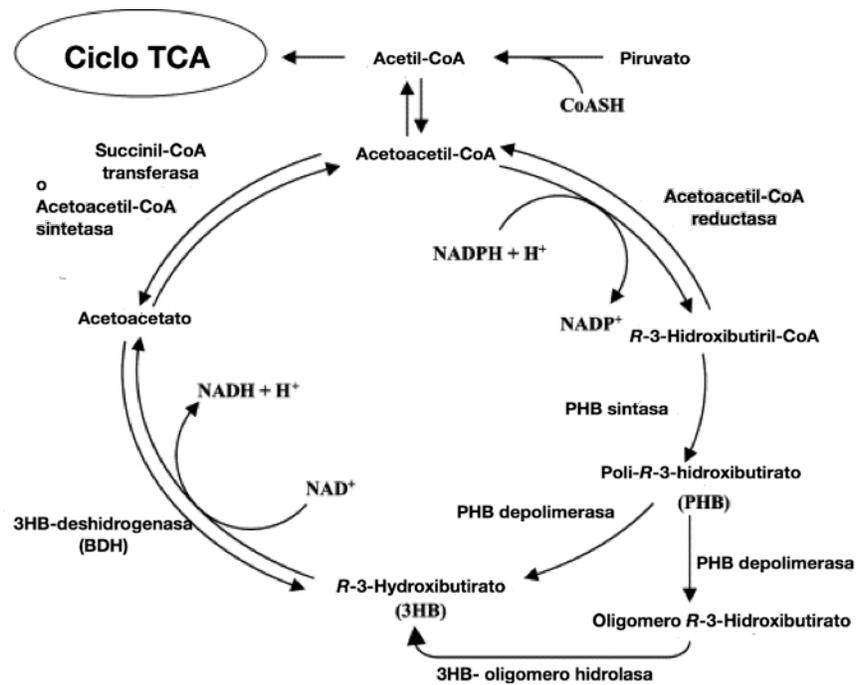


Figura 3.3 Ruta metabólica de PHB en bacterias acumuladoras de PHB (tomada y modificada de Shiraki *et al.*, 2006).

La producción y degradación de PHB en *A. brasilense* es relevante para mejorar la vida de anaquel, la eficiencia y confiabilidad en los inóculos comerciales por las siguientes razones:

- a) Vida de anaquel: Las bacterias que contienen altos niveles de PHB sobreviven y proliferan en mayor medida que aquellas con bajos niveles de PHB [Kadouri *et al.*, 2002; Tal y Okon, 1985].

En un estudio donde se mutó el gen *phbC*, el cual es responsable del último paso en la biosíntesis del PHB, se observó un decremento en la habilidad de sobrevivencia de *A. brasilense* [Kadouri *et al.*, 2002].

Mutantes en la enzima PHA depolimerasa no son capaces de tolerar, sobrevivir a diferentes condiciones de estrés como: la radiación UV, calor, choque osmótico, desecación y estrés oxidativo [Kadouri *et al.*, 2003 y 2005].

b) Eficiencia y confiabilidad: La acumulación de polihidroxialcanoatos en *A. brasilense* ha mostrado estar relacionada con los procesos de quimiotaxis, motilidad y multiplicación celular, características importantes para la adhesión y colonización de estas bacterias a las raíces de plantas inoculadas [Kadouri *et al.*, 2005].

Las plantas de maíz y trigo muestran aumento en el rendimiento (20-70%) de manera consistente con inóculos ricos en polihidroxialcanoatos [Helman *et al.*, 2011; Kadouri *et al.*, 2005; Dobbelaere *et al.*, 2001].

3.4 Agregación celular

La agregación celular puede ser definida como el conjunto de células que se asocian para tener una conformación estable, lo cual ocurre bajo ciertas condiciones fisiológicas. Existen palabras sinónimas en la literatura como aglomeración, aglutinación, agrupamiento, coagulación, cohesión y floculación. En general, la agregación celular involucra polímeros naturales en complejos de polisacáridos y poliaminoácidos que son secretados o expuestos a la superficie celular [Burdman *et al.*, 2000; Vanbleu *et al.*, 2004].

Azospirillum puede formar quistes con tiempos de vida largos cuando existe limitación de algún(os) nutriente(s) de manera persistente y pueden retomar la forma vegetativa cuando las condiciones favorables regresan [Castellanos *et al.*, 2000]. En bacterias rizosféricas como *Azotobacter vinelandii*, la formación de quistes se encuentra asociada a la acumulación de PHB [Segura *et al.*, 2003].

Se han observado exopolisacáridos (EPS) y polisacáridos capsulares (CPS), los cuales revelan la presencia de glucosa, galactosa, ramnosa, fucosa, xilosa, arabinosa, ácido galacturónico, glucosamina, galactosamina y lectinas en los flóculos de *A. brasilense* [Alenkina *et al.*, 2014; Burdman *et al.*, 2000]. Mutantes de *A. brasilense* que carecen de estos polisacáridos pierden la habilidad de anclarse a las raíces así como de agregarse (Figura 3.4) [Martínez-Morales *et al.* 2014; Dutta y Podile, 2010; Sadasivan y Neyra, 1987; Michiels *et al.*, 1991].

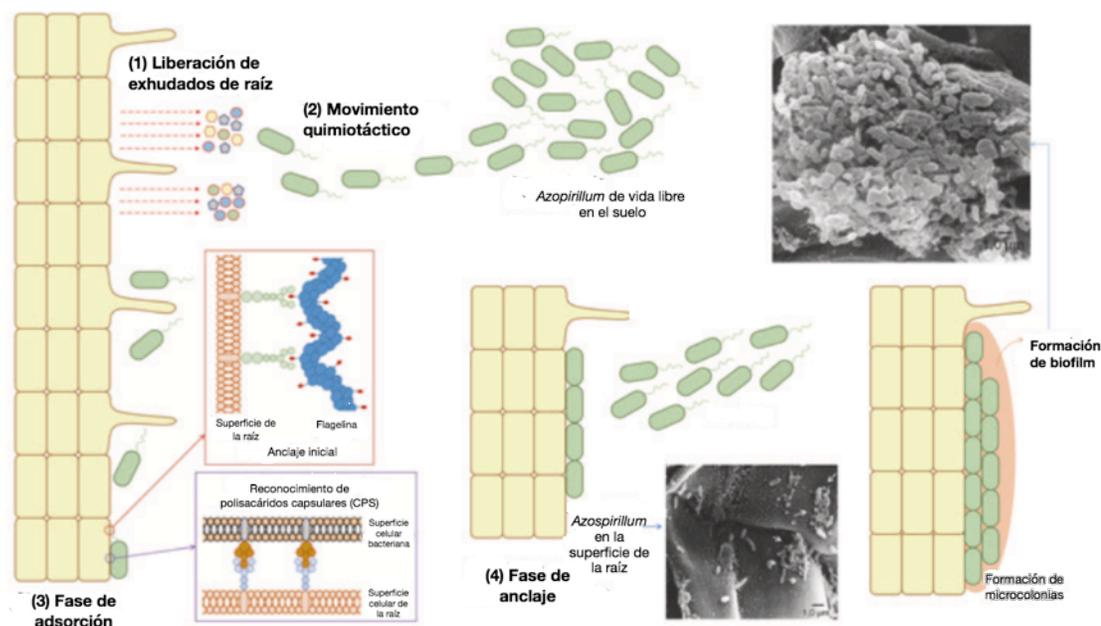


Figura 3.4 Proceso de adhesión de *Azospirillum* a las raíces de las plantas (tomada y modificada de Guerreo-Molina *et al.*, 2012). *Azospirillum* muestra quimiotaxis a diferentes exudados de las raíces tales como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y compuestos aromáticos, lo cual es el primer paso en la colonización en donde los polisacáridos capsulares toman un papel relevante en la adhesión.

La floculación en *A. brasilense* puede ser inducida por fuentes de carbono presentes en el medio tales como fructosa, gluconato, PHB y ácido málico. El proceso de agregación generalmente se acompaña de la producción de una cápsula, enquistamiento, acumulación de PHB, pérdida de la motilidad y frecuentemente se ha asociado a pigmentos del tipo melánico (Figura 3.5) [Sadasivan y Neyra, 1987; Burdman *et al.*, 1998].

La relación C:N en el medio está relacionada con la capacidad de agregación; si la bacteria es cultivada en un medio alto en la relación C: N (p ej: 37 mM de fructosa y 4 mM NH_4Cl) se acumula PHB durante la floculación a diferencia de un medio bajo en la relación C:N (37 mM de fructosa y 18 mM NH_4Cl) donde no se observan agregados celulares. Sin embargo, ésta relación C:N, no afecta la capacidad de crecimiento, al menos eso demuestra un estudio realizado en cuatro cepas de *A. brasilense* con diferente capacidad de agregación pero no en crecimiento [Burdman *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2000].

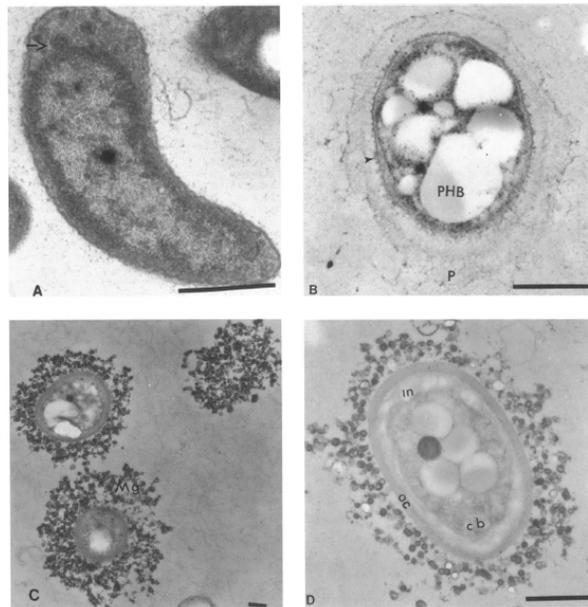


Figura 3.5 Ultraestructuras de los quistes de *A. brasilense* en microscopio electrónico de transmisión. (A) Célula vegetativa, (B) Quiste con gránulos de PHB y cápsula de polisacáridos, (C) Quiste con gránulos pigmentados tipo melanina y (D) Aumento óptico de quiste maduro que muestra el cuerpo central (cb), capa interna (in) y cápsula externa (oc) (tomada de Sadasivan y Neyra 1987).

A pesar de que en los últimos años se han acumulado evidencias que indican que los EPS están relacionados con el anclaje a las raíces y la agregación [Martínez-Morales *et al.* 2014; Dutta y Podile, 2010], estos fenómenos siguen sin ser explicados, ya que se relacionan con la complejidad de la superficie celular y sus interacciones, así como con los procesos de adhesión que generan las diferentes cepas, las condiciones de cultivo, la edad del cultivo, entre otros.

3.5 Crecimiento de *A. brasilense*

“*Azospirillum brasilense* muestra una variabilidad morfológica y de metabolismo dependiendo del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento, por lo que la selección de ambas es importante”.... “...Probablemente no existe una única manera de crecer a todas las cepas de *A. brasilense*” [Albrecht y Okon, 1980].

Fuentes de carbono

A. brasilense, a diferencia de *A. lipoferum*, carece del shunt de hexosas monofosfato (específicamente de fosfogluconato deshidrogenasa) y de enzimas principales como glucocinasa y glucosa deshidrogenasa, lo cual explica porque no puede utilizar glucosa, manosa, sorbosa y sacarosa (Figura 3.6) como únicas fuentes de carbono o lo hace de manera deficiente [Westby *et al.*, 1983].

A pesar de que *A. brasilense* carece de las enzimas catabólicas (p ej: 6-fosfofructocinasa) de la vía Embden-Meyerhof-Parnas, mantiene todas las enzimas anfibólicas triosa-fosfato que explican el buen crecimiento presentado con ácidos orgánicos como malato, succinato, lactato y piruvato [Westby *et al.*, 1983; Martínez-Drets *et al.*, 1984; del Gallo y Fendrik 1994].

Las enzimas lactato y malato deshidrogenasa son esencialmente importantes para el crecimiento de *A. brasilense*, debido a los niveles presentados durante el cultivo e inducidas independientemente de las fuentes de carbono presentes, lo cual se traduce en menores tiempos de generación cuando se utiliza DL-ácido málico (3.0 h) ó DL-ácido láctico (2.9 h) como fuente de carbono en comparación a otros ácidos (p ej: D-gluconato (5.2 h)). Esta afinidad puede ser explicada en el caso del ácido málico debido a que es el principal ácido encontrado en los exudados de las raíces de diversas especies de plantas, seguido de los ácidos succínico, fumárico, cítrico y oxálico [Del Gallo y Fendrik, 1994].

Por lo anterior, el medio mineral NFb “libre de nitrógeno” con malato de sodio o succinato de sodio como fuente de carbono, ha sido el más utilizado para los cultivos de *Azospirillum* [Bashan *et al.*, 2004; Westby *et al.*, 1983]. En cinéticas de crecimiento donde se ha realizado el seguimiento del consumo de DL-malato, se ha reportado que sólo la forma L-malato es consumida por *Azospirillum* y en algunos casos se opta por realizar los cultivos únicamente con este isómero [Fallik y Okon, 1996; Okon, 2005].

La asimilación de gluconato en *A. brasilense* se realiza principalmente por la vía Entner Doudoroff al igual que otras bacterias en la rizósfera como *Pseudomonas* y *Rhizobium* [Heath y Gaudy, 1978; Keele *et al.*, 1970]. El acetato puede dar crecimiento moderado, pero con citrato, α -cetoglutaratato, oxalacetato, fumarato e isocitrato el crecimiento es deficiente [Martínez-Drets *et al.*, 1984].

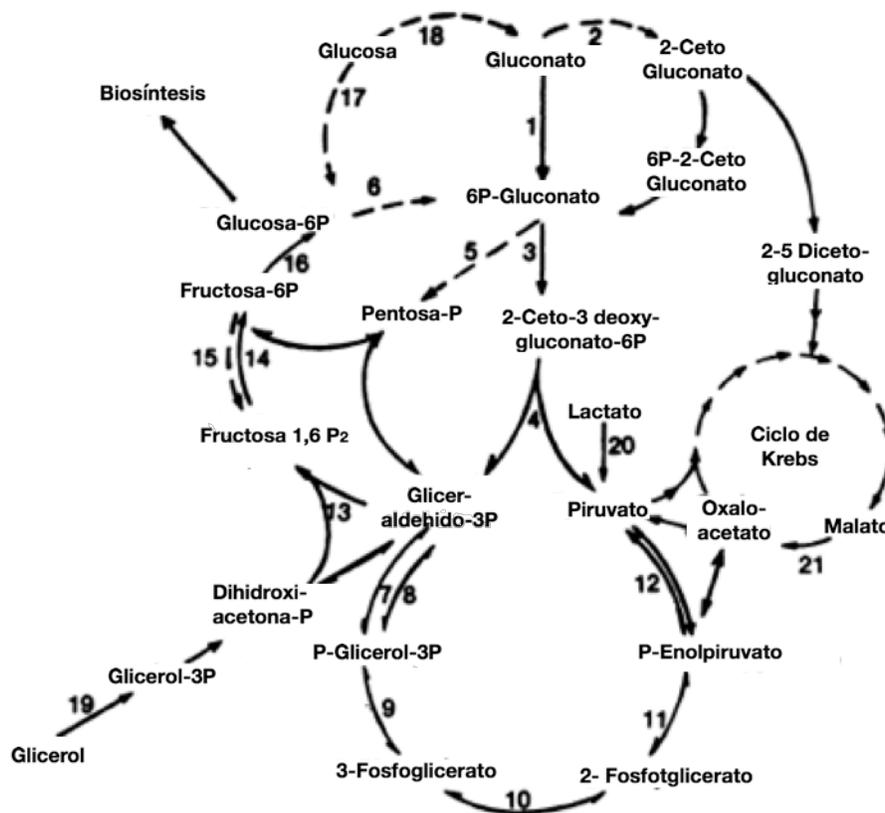


Figura 3.6 Metabolismo de carbono de *A. brasilense*

Las enzimas se encuentran numeradas de la siguiente manera: 1, glucocinasa; 2, gluconate 2-deshidrogenasa; 3, fosfogluconato deshidratasa; 4, fosfo-2-ceto-3-desoxiglucoanto aldolasa; 5, fosfogluconato deshidrogenasa; 6, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; 7, gliceraldehido-fosfato deshidrogenasa; 8, gliceraldehido-fosfato deshidrogenasa (NADP⁺); 9, fosfoglicerato cinasa; 10, fosfoglicerato mutasa; 11, enolasa; 12, piruvato cinasa; 13, fructosa-bifosfato aldolasa; 14, fructosa bifosfatasa; 15, 6-fosfofructocinasa; 16, glucosa-fosfato isomerasa; 17, glucocinasa; 18, glucosa deshidrogenasa; 19, glicerolcinasa; 20, lactato deshidrogenasa; 21, malato deshidrogenasa. Las flechas punteadas corresponden a reacciones faltantes en esta bacteria o que son detectadas en niveles muy bajos en extractos (tomada y modificada de Westby *et al.*, 1983).

Durante un estudio previo realizado en el laboratorio con las cepas de *A. brasilense*: Start y Calf se observó mayor densidad óptica en medio NFb mod (NH₄Cl como fuente de nitrógeno) con DL-malato como fuente de carbono llegando a 2.337 y 2.016 DO_{600nm} respectivamente, en cambio con glucosa, fructosa y sacarosa se alcanzaron 0.49, 0.56 y 0.288 DO_{600nm} para Start y 0.258, 1.294 y 0.159 para Calf [Acevedo, E. datos no publicados].

Nitrógeno

Azospirillum utiliza una gran variedad de fuentes de nitrógeno las cuales incluyen N_2 , NO_3^- , extracto de levadura, peptona, casaminoácidos y NH_4Cl . Cuando se utiliza amonio en medio líquido como única fuente de nitrógeno se puede obtener un tiempo de generación de aproximadamente 1 h, pero con una pobre acumulación de PHB (menos del 1% de peso seco) [Albretch y Okon, 1980; Fallik y Okon, 1996]. Si se utiliza N_2 como única fuente, se necesita mantener entre 0.1226-0.3271 mmol O_2 /L [Albretch y Okon, 1980], debido a la sensibilidad del complejo nitrogenasa al oxígeno [Kamnev *et al.*, 2008]. Sin embargo, si se agrega otra fuente de nitrógeno al medio, es posible mantener el crecimiento en condiciones aerobias. La adición de pequeñas cantidades de extracto de levadura (0.005% (p/v)) pueden acortar la fase lag sin afectar la tasa de crecimiento, ni reprimir el complejo de nitrogenasa, lo cual puede ocurrir si se agregan cantidades considerables de otra fuente de nitrógeno (p. ej, 0.25% (p/v) de NH_4Cl) [Albrecht y Okon, 1980].

Cuando *Azospirillum* crece en presencia de N_2 produce altos niveles de poli- β -hidroxibutarato (PHB), hasta 70% del peso seco, el cual le ayuda a resistir a la desecación, estrés causado por la radiación UV, presión y choque osmótico (se propone que puede existir una cascada de señalización parecida a la que ocurre en *Pseudomonas*) [Ruiz *et al.*, 2001], al incrementarse los niveles de ppGpp (guanosina tetrafosfato) que inducen la expresión del gen *rpoS*, factor transcripcional involucrado en la activación de genes relacionados con la protección a agentes nocivos como etanol, agua oxigenada, altas temperaturas y concentraciones de sal) así como reserva de carbono [Tal y Okon, 1985; Kadouri *et al.*, 2003].

El crecimiento de *Azospirillum* dependiente de N_2 es pobre o inexistente bajo condiciones de limitación (<0.1226 mmol O_2 /L) o exceso en la concentración de oxígeno disuelto. En estas condiciones la velocidad de crecimiento decae (pasa de 1-2 hr hasta 5-6 hr de replicación) y el almacenamiento de carbono en forma de PHB incrementa [Albrecht y Okon, 1980].

La demanda energética que implica el proceso de fijación de N_2 explica por qué *Azospirillum* crece de manera más lenta si el medio carece de una fuente de nitrógeno a diferencia de un medio nutricionalmente rico [Bashan *et al.*, 2004].

Oxígeno y Agitación

A. brasilense es una bacteria microaerófila y aerotáctica que se sitúa en zonas de baja concentración de oxígeno dentro del gradiente rizosférico. El rango óptimo de oxígeno que favorece su crecimiento es de 3-5 μM , lo cual corresponde de 1.2% a 2% TOD (tensión de oxígeno disuelto) [Kamnev *et al.*, 2008; Zhulin *et al.*, 1996]. Dentro de una suspensión con gradiente espacial de oxígeno formado por una burbuja de aire, la bacteria migra formando una banda, la cual es considerada como resultado de la acción dual del oxígeno como atrayente y repelente [Grishanin *et al.*, 1991]. Se ha sugerido que el reconocimiento de oxígeno en aerotaxis puede ocurrir por vía del estado redox de citocromo *o*, una de las oxidasas terminales [Shioi *et al.*, 1987].

La producción de ácido indol acético (AIA) así como la fijación de nitrógeno, son dos aspectos relevantes en la funcionalidad de *Azospirillum* como biofertilizante. Sin embargo, son afectadas por la cantidad de oxígeno presente en el ambiente. La vía de síntesis de AIA se ve fuertemente disminuida cuando *Azospirillum* es cultivada en condiciones aerobias (30% TOD), aunado a un mayor tiempo de cultivo (sin afectarse significativamente la cantidad de biomasa), a diferencia de una condición microaerófila (3% TOD), donde la expresión del gen *ipdC* (indol-3-piruvato descarboxilasa), enzima esencial en la producción de esta fitohormona, se ve favorecida [Ona *et al.*, 2005; Okon *et al.*, 1991].

La velocidad de crecimiento también se ve limitada por la habilidad de fijar nitrógeno; lo cual está fuertemente influenciado por la cantidad de oxígeno en el ambiente [Zhulin *et al.*, 1996]. A diferencia de otros microorganismos que han adquirido durante la evolución mecanismos que les permiten proteger la actividad nitrogenasa en presencia de oxígeno, en *Azospirillum* esta enzima es inhibida irreversiblemente, bloqueando así la fijación de nitrógeno [Kamnev *et al.*, 2008].

El exceso de oxígeno en el cultivo de *A. brasilense* es considerado como un factor estresante [Fages, 1992; Kamnev *et al.*, 2008]. Sin embargo, *A. lipoferum* puede tolerar y crecer de manera aerobia cuando se suplementa el medio con NH_4Cl [Albretch y Okon, 1980], no así en las especies de *A. brasilense*, donde el efecto de aumentar la cantidad de oxígeno disuelto reduce hasta en 30% el crecimiento cuando pasa de 0.489-0.684 $\text{mmol O}_2 \text{L}^{-1}$ (medio NFb) [Didonet y Magalhaes, 1997].

La agitación ha sido un parámetro utilizado para desagregar los flóculos formados durante el crecimiento en *A. brasilense*, Bashan y colaboradores mostraron que si se aumenta la agitación de 40rpm a 180 rpm es posible incrementar el crecimiento de *A. brasilense* Cd (de 2×10^7 a 4×10^8 UFC g⁻¹), con la consecuencia de células menos adherentes (29.2 a 9.8%) [Bashan *et al.* 1991]. En *A. lipoferum* se desarrollaron cultivos en lote de 2L a 32°C, con una turbina tipo Rushton variando la agitación inicial de los cultivos desde 200 hasta 800 rpm pasando por 350, 400 y 500 rpm, en donde confirmaron el efecto nocivo (limitación de crecimiento y prolongada fase lag) de altos niveles de oxígeno disuelto (arriba de 80% de saturación) y la influencia favorable de concentraciones bajas de saturación (por debajo del 30% de saturación), concluyendo que la concentración de oxígeno disuelto necesita ser considerado como un parámetro operativo y debe ser controlado para asegurar el crecimiento óptimo de las células de *Azospirillum* [Paul *et al.*, 1990].

pH y temperatura

Azospirillum crece a pH cercanos a la neutralidad (6.8-7.8). Los cultivos que generalmente comienzan a pH 7.0 alcanzan un pH de 7.8 una vez que crecen; sobre este valor el crecimiento y la fijación de N₂ decaen. Existe muy poco crecimiento por debajo de 5.5 o por encima de 8.7. Cuando se administran ácidos orgánicos, el pH incrementa rápidamente, lo cual se puede solucionar agregando 10 mg mL⁻¹ de sales de fosfato como amortiguador, a concentraciones más altas este compuesto resulta inhibitorio [Albrecht y Okon, 1980].

La temperatura óptima de crecimiento observada para *Azospirillum* se encuentra entre 32 y 35°C, aunque crece en un intervalo de 4-40°C [Albrecht y Okon, 1980]. Para la actividad de la enzima nitrogenasa, la temperatura óptima de funcionamiento se encuentra entre 33°C y 40°C, temperaturas por encima de los 40°C o por debajo de 33°C, comienzan a tener efectos negativos en la actividad y en 45°C ó 10°C resultan temperaturas donde ya no existe actividad de ésta enzima [Albrecht y Okon, 1980].

3.6 *Azospirillum* como inoculante

Los biofertilizantes son microorganismos vivos o latentes que pueden ejercer una o varias de las siguientes características: mejorar la fertilidad del suelo al movilizar los elementos químicos que se encuentran fijados en el suelo (p. ej: P, S, Zn, K, Fe, etc.), añadir nutrientes del ambiente al suelo (p. ej. nitrógeno atmosférico), proveer hormonas de crecimiento a las plantas e/o inducir mecanismos de protección en las mismas contra patógenos. Los biofertilizantes, también llamados inoculantes, se producen tanto a pequeña escala, en condiciones de laboratorio o a gran escala en fermentaciones en lote [Rodríguez y Fraga, 1999; Sivasakthivelan y Saranraj, 2013].

Uno de los principales problemas de los inoculantes es la supervivencia de los microorganismos durante el almacenamiento (vida de anaquel), la cual es afectada por el medio de cultivo, el estado fisiológico de los microorganismos, el proceso de deshidratación, la temperatura de almacenamiento, entre otros. Por lo anterior, diversos estudios se han enfocado a incrementar la vida de anaquel, buscando cambios en las formulaciones, acarreadores, protectores celulares, así como una alta densidad celular [Fages 1992; Fallik y Okon, 1996; Sivasakthivelan y Saranraj, 2013].

Existen diversas formulaciones con densidades celulares de 1×10^7 - 3×10^{10} UFC mL⁻¹ del género *Azospirillum*, que se utilizan como inoculantes [Okon e Itzigsohn, 1995; Schulz y Thelen, 2008; Trujillo-Roldan *et al.*, 2013] en formulaciones líquidas (Tabla 3.3).

Inoculantes basados en sustratos acarreadores como la turba (Tabla 3.2) con cuenta inicial de 10^9 UFC g⁻¹ luego de 3 meses, disminuyen a 10^7 UFC g⁻¹ [Okon, 1985; Morandini, *et al.* 1990] y hasta cuatro órdenes de magnitud en 6 meses [Fallik y Okon, 1996].

Los costos de un acarreador sólido para los inoculantes suelen ser altos, debido a que implica mano de obra, molienda, tamizado y corrección de pH [Somasegaran y Hoben, 1994]. Las soluciones líquidas que contengan alguna sustancia que favorezca la sobrevivencia de las células antes de su aplicación en el campo representan una solución a estos problemas. Para ello, se han utilizado diferentes tipos de polímeros debido a su habilidad de limitar la transferencia de calor y sus propiedades reológicas. Kumaresan y Reetha en 2011 probaron la adición de goma arábica (0.3% p/v), polivinil pirrolidona (PVP) (2% p/v),

glicerol, trehalosa (10 mM), polietilen-glicol (PEG 1% p/v) y polivinil-alcohol (PVA 0.5% p/v) en medio NFb sobre cultivos de *A. brasilense* AZ15. Observaron que la adición de trealosa, glicerol, goma arábica y PVP permitió mantener una concentración de 10^7 cel mL⁻¹ por 12 meses partiendo de 10^{10} cel mL⁻¹, seguido de PEG por 10 meses y PVA por 9 meses. Como control se utilizó la formulación sólida de lignita, la cual mantuvo la concentración de 10^7 cel mL⁻¹ hasta los 6 meses (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Vida de anaquel en inoculantes de *Azospirillum* spp.

Sustrato	Concentración celular inicial	Concentración celular final	Vida de anaquel (meses)	Referencia
Turba	10^9 UFC mL ⁻¹ 10^9 UFC gr ⁻¹	10^7 - 10^8 UFC mL ⁻¹ 10^7 UFC gr ⁻¹	3	Morandini, <i>et al.</i> 1990; Okon, 1985.
Vermiculita, Basalto	10^{10} UFC mL ⁻¹	10^7 UFC mL ⁻¹	1	Fallik y Okon 1996
Turba granular		10^5 - 10^6 UFC mL ⁻¹	6	
Lignita	10^{10} UFC mL ⁻¹	10^7 UFC mL ⁻¹	6	Kumaresan y Reetha, 2011
PVA (0.5%)			9	
PEG (1.0%)			10	
Trehalosa PVP (2.0%) Goma arábica Glicerol			12	
Alginato	10^9 UFC mL ⁻¹	10^7 UFC mL ⁻¹	12	Bashan <i>et al.</i> , 2011
Medio MSM (quistes)	10^{10} UFC mL ⁻¹	10^8 UFC mL ⁻¹	14	Vendan y Thangaraju 2007
Medio NFb	10^8 UFC mL ⁻¹	10^7 UFC mL ⁻¹	24	Trujillo-Roldán <i>et al.</i> , 2013

PVA: polivinil-alcohol, PEG: polietilen-glicol, PVP: polivinil-pirrolidina.

La supervivencia de los inoculantes puede ser mejorada si se pone atención al estado fisiológico de las células, como: altos contenidos de PHB [Kadouri *et al.*, 2002], formación de quistes-flóculos [Okon e Itzigsohn, 1995] o en las propiedades de los aditivos. Por ejemplo, la trealosa ofrece protección contra la desecación, presión osmótica, estrés térmico, ayuda en la estabilización de enzimas y membranas [Kumaresan y Reetha, 2001].

A pesar de la investigación en estos aditivos, existen reportes donde los inóculos líquidos, también llamados “inoculantes primitivos” o “sin formulación” (debido a que fueron los primeros en ser aplicados y probados) [Bashan y de Bashan, 2015] muestran ser cultivos sin contaminantes con mayor vida de anaquel [Trujillo-Roldán, *et al.* 2013], protección a estrés ambiental y eficiencia en campo que muchas formulaciones con base acarreadores tipo turba [Singleton, *et al.* 2002].

La formación de quistes en *Azospirillum*, como se mencionó previamente, es otra alternativa para mejorar la vida de anaquel del inoculante. En 2007, Vendan y Thangaraju realizaron un cultivo de *A. lipoferum* en medio NFb hasta alcanzar densidades ópticas de 1.45, que correspondían a una concentración de 10^9 UFC mL⁻¹ y posteriormente indujeron la formación de quistes (mediante estrés nutricional), lavando las células y colocándolas en medio mínimo salino MSM, fructosa y KNO₃ como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente.

En las primeras 96 h, el 100% de las células pasaron del estado vegetativo a quiste y mantuvieron la concentración celular intacta hasta los 5 meses. Luego, ésta fue disminuyendo a 10^9 UFC mL⁻¹ en un período variable de 6 hasta 11 meses y la última medición realizada a los 14 meses (420 días) mostró una concentración final de 10^8 UFC mL⁻¹. Adicionalmente, realizaron el seguimiento de la cantidad de PHB en las células en diferentes momentos, mostrando que una vez que se indujo la formación de quistes (pasando el cultivo a medio mínimo MSM) hubo una acumulación de PHB constante durante las primeras 108 h (hasta 3.8 mg (PHB) g CDW⁻¹ (peso seco celular)) y luego ésta fue disminuyendo [Vendan y Thangaraju, 2007].

3.7 Cultivos de alta densidad celular

Los cultivos de alta densidad celular han sido objeto de estudio en la investigación científica y tecnológica, en específico con la finalidad de maximizar la productividad volumétrica ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), es decir, obtener la mayor cantidad de producto en un volumen y tiempo dado [Riesenberg y Guthke, 1999]. La demanda de oxígeno en estos cultivos excede por mucho la capacidad de transferencia de oxígeno de los bioreactores convencionales, tales como tanque agitado y columnas de burbujeo. En ellos, la concentración de oxígeno disuelto limita la actividad y crecimiento microbiano, lo cual puede tener efectos, no sólo en la disminución de la velocidad de producción y crecimiento, sino en el cambio de la vía metabólica que lleve a la disminución del rendimiento e incluso a la formación de subproductos tóxicos [Egli y Zinn, 2003].

Para evitar la limitación de oxígeno y metabolismo anaerobio, los cultivos de alta densidad celular se diseñan comúnmente como procesos en lote alimentado. Esta estrategia supone que existe una restricción al crecimiento debido a algún nutriente, el cual se administra en el bioreactor en el tiempo en que cesa el crecimiento exponencial. Una vez alcanzada la capacidad máxima de transferencia de oxígeno, la tasa de alimentación debe ser constante, por lo que a alta concentración celular se obtienen velocidades de crecimiento específicas muy bajas y el tiempo de fermentación se prolonga considerablemente [Knoll *et al.*, 2007].

Inicialmente, los cultivos de alta densidad se establecieron para levaduras (1943) para obtener proteína, etanol y biomasa [Shiloach y Fass, 2005]. Posteriormente, se extendió hacia otros microorganismos como *Streptomyces sp*, donde los cultivos densos de éste garantizaban una alta productividad en la formación de antibióticos [Riesenberg y Guthke, 1999]. Fue en el organismo modelo por excelencia, *Escherichia coli*, donde combinando técnicas de biología molecular e ingeniería de procesos se llegó a un límite de hasta 190 g L^{-1} , que corresponde a una densidad óptica de 500 unidades (540nm) [Fuchs *et al.*, 2002]. En este cultivo se utilizó una estrategia de cultivo alimentado con medios optimizados, además de diálisis, donde se retiran los componentes de bajo peso molecular del cultivo que pueden inhibir el crecimiento.

Algunos de los intentos previos por obtener cultivos de *E. coli* de alta densidad fueron: cultivos alimentados (con glucosa concentrada en solución), sin retiro de componentes, llegando a 54 g L⁻¹ [Shiloach y Bauer, 1975]; 104 g L⁻¹ con adición lineal de ácido cítrico y glucosa en un medio definido [Riesenberg et al, 1991] y 134 g L⁻¹ para cultivos con adición de glucosa sólida en polvo [Neidhart *et al.*, 1974]. Cuando se cambió la fuente de carbono glucosa por glicerol se obtuvieron concentraciones finales de biomasa máxima de 148 g L⁻¹ [Korz *et al.*, 1995].

Las estrategias de cultivo son diversas y especiales para cada organismo y el producto deseado. Por ejemplo, para la producción de polihidroxicanoatos de cadena mediana (PHAMCL) en *Pseudomonas putida* IPT 046 se propusieron varios sistemas de alimentación con mezclas equimolares de glucosa y fructosa. La alimentación por pulsos seguida de alimentación constante produjo una concentración celular de 32 g L⁻¹ en 18 h de fermentación, con alimentación exponencial 30 g L⁻¹ en 20 h de fermentación, ambas con bajo contenido de PHAMCL. Se logró incrementar en 15% el contenido de PHAMCL con una alimentación constante, obteniendo 35 g L⁻¹ y con la estrategia de limitación de NH₄⁺, se obtuvo 21% de PHAMCL en 34 h de operación y 40 g L⁻¹, por último se limitó el fosfato, logrando una concentración celular de 50 g L⁻¹ y 63% de PHAMCL en 42 h [Cardoso-Diniz *et al.*, 2004].

García y colaboradores (2014) desarrollaron una estrategia de producción de PHB en *Azotobacter vinelandii* OPNA, basada en una fermentación mixta (en medio PY con pulsos de sucrosa y extracto de levadura), en cultivos en lote alimentado con perfil exponencial, en conjunto con mutaciones en las vías de regulación negativas de síntesis de PHB (PTS_{Ntr} y RsmA-RsmZ/Y), a una TOD de 4% constante. Consiguiendo 27.3 g L⁻¹ de PHB (concentración celular de 37 g L⁻¹ y 73% PHB) a las 60h, incrementando la producción en 7 veces con respecto al cultivo en lote.

3.8 *Azospirillum* en cultivo

Los inóculos de *Azospirillum* se emplean en densidades de aproximadamente 2 x 10⁹ UFC mL⁻¹ [Schulz y Thelen, 2008] con la finalidad de que al menos exista una población de 10⁵-10⁶ células por planta [Kapulnik et al., 1985; Arzac *et al.*, 1990]. Existen algunos estudios (Tabla 3.3) enfocados al crecimiento y optimización en la producción de biomasa de *Azospirillum* con las siguientes estrategias:

1) Modificación de medio de cultivo en matraces

Bashan y colaboradores en 2011 modificaron el medio de cultivo para las cepas de *Azospirillum Cd* y *Sp6*; reemplazando las fuentes de carbono tradicionales (ácido málico y succínico), por gluconato de sodio (presente en algunos exudados de raíz) y glicerol (producto de la trans-esterificación de lípidos y grasas utilizado en el cultivo de *Bradyrhizobium*). Esto en un medio complejo TYG (triptona-extracto de levadura-glucosa), con la intención de obtener cultivos con alta densidad celular que pudieran ser utilizados como inoculantes. Se lograron producir entre $4.5-5 \times 10^9$ UFC mL⁻¹, con resultados muy similares entre gluconato de sodio y glicerol, sin aparente fase lag y con velocidades de crecimiento entre 0.47 y 0.49 h⁻¹. Posteriormente, después de haber sido encapsulados en camas de alginato como medio de conservación durante un año, mantuvieron su densidad en el orden de 10^7 UFC mL⁻¹ [Bashan *et al.* 2011]. Algunas de las limitaciones de esta propuesta es que el medio tiene componentes nutritivos, tales como la peptona y extracto de levadura, que en formulaciones líquidas (o en acarreadores) y bajo condiciones de anaquel, corren el riesgo de contaminarse, así como el alto costo de estos compuestos comparados con el de un medio mínimo sintético [Bashan *et al.*, 2011, Mutturi *et al.*, 2016].

2) Fuentes de carbono en mezcla

Albrecht y Okon (1980) sugieren el cultivo de *Azospirillum* para su uso como fertilizante en medio líquido en diferentes condiciones. Algunas de ellas son: a) condiciones microaerofílicas (0.002-0.008 atm O₂) fijando N₂, una mezcla de malato-succinato como fuente de carbono, pH 7.8, llegando a una concentración de 6×10^8 células mL⁻¹, b) malato o succinato, NH₄Cl, condiciones aerobias (0.2 atm O₂), logrando una concentración de 1×10^9 y c) condiciones aerobias (0.2 atm O₂), medio nutritivo con tripticaseína de soya como fuente de nitrógeno y carbono, pH de 7.2 obteniendo 1.5×10^9 células mL⁻¹ para cultivos en lotes de hasta 180 litros.

3) Coeficiente de transferencia de masa.

El oxígeno es un parámetro importante que afecta el crecimiento de *Azospirillum* [Paul *et al.*, 1990], por lo que una estrategia exitosa que ha llevado a la producción de inóculos comerciales ha sido utilizar el coeficiente de transferencia de masa, en este caso oxígeno (K_{La}) como un parámetro de escalamiento. Trujillo-Roldán y colaboradores (2013) llegaron a densidades de $3-5-7.5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ en un reactor

agitado de 1000 L (K_{La} : $31h^{-1}$) para las cepas de *A. brasilense* Start y Calf, manteniendo 30% TOD en todo el cultivo con 0.5 vvm y agitación, en un medio NFb modificado (con la adición de $0.3 g L^{-1}$ de extracto de levadura) mediante un análisis factorial para maximizar el crecimiento (modificando la relación carbono-nitrógeno) y pH controlado a 7.0 [Trujillo-Roldán *et al.*, 2013].

4) Diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en cultivo lote alimentado

Para la producción de biomasa de *Azospirillum brasilense* ATCC 29729 Cd en un fermentador de 16 L Fallik y Okon (1996) propusieron un cultivo en lote alimentado. Utilizaron la siguiente formulación en el medio de cultivo (en $g L^{-1}$): K_2HPO_4 , 3; KH_2PO_4 , 2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2; extracto de levadura, 0.2; NaOH, 3.5. Se probaron varias fuentes de carbono (malato, succinato, fumarato, glicerol y lactato $5 g L^{-1}$) y nitrógeno (nitrato de amonio, $2.0 g L^{-1}$, acetato de amonio $2.0 g L^{-1}$, amonio 26.5%, $2.6 g L^{-1}$ y cloruro de amonio, $1.5 g L^{-1}$) a $35^\circ C$ y oxígeno disuelto entre 30-50%, llegando a concentraciones máximas de $2.0 \pm 8.5 \times 10^{10}$ UFC mL^{-1} con amonio 26.5% y ácido málico, aunque con un desperdicio del 50% de la fuente de carbono, ya que sólo se consumió el isómero L-malato, seguido de $2.4 \pm 6.0 \times 10^{10}$ UFC mL^{-1} con amonio 26.5% y succinato. Los autores observaron que el pH se elevaba y esto reducía el crecimiento celular. Al final del crecimiento, se redujo el oxígeno disuelto cerca del 0%, manteniendo el flujo constante de fuente de carbono, sin nitrógeno por 3-4 h, induciendo así la acumulación de PHB. Se estimaron las cuentas viables por el procedimiento de número más probable (MPN), obteniendo de $1-3 \times 10^{10}$ UFC mL^{-1} en 24-28 h, con una velocidad de replicación de $0.4 h^{-1}$ y 40% de acumulación de PHB [Fallik y Okon, 1996].

En el presente trabajo se pretende abordar algunas de las estrategias antes mencionadas, para la obtener la mayor cantidad de biomasa viable de *A. brasilense* en particular de las cepas Start y Calf como son, la optimización del uso de fuentes de carbono en matraces, evaluación de diferentes condiciones de aireación, así como estrategias de cultivo en lote alimentado explorando diferentes perfiles de alimentación. Debido a que no es posible realizar modificaciones genéticas en estos microorganismos (a falta de la regulación en México), este trabajo busca implementar un proceso de producción en un reactor de columna de burbujeo que presenta valores de transferencia de oxígeno menores a aquellos que tienen los reactores de tanque agitado (utilizados comúnmente en el cultivo de *Azospirillum*), aprovechando la condición microaerofílica de esta bacteria, para así establecer un proceso eficiente y de menor costo al actual.

Tabla 3.3 Cultivos líquidos de *Azospirillum* spp. para la generación de biomasa

Biomasa UFC mL ⁻¹	Medio cultivo	Oxígeno (atm ó TOD%)	Fuente de N	Fuente de C	pH inicial	Temp (°C)	Agitación (rpm)	Tipo de Cultivo	Tiempo de cultivo (h)	Volumen (L)	Referencia
6.5 x 10 ⁸	NFb	Microaerobia (0.003- 0.008 atm de O ₂)	N ₂	Ac. málico- succinico	7.8	30	--	Batch	--	--	Albrecht y Okon (1980)
1.0 x 10 ⁹			NH ₄ Cl								
1.5 x 10 ⁹		Aerobia (0.2 atm de O ₂)		Tiptocaseína de soya							
~2.0-3.0 x 10 ⁹	AN	--			6.8	36	120		18	0.12	Bashan <i>et al.</i> (2011)
~1.5-2.5 x 10 ⁹	OAB		NH ₄ Cl	Ac. málico							
~3.0-4.0 x 10 ⁹ *	TYG mod		Extracto de triptona y levadura	Glucosa							
5.0 x 10 ⁹ *	TY+ GluNA			Gluconato de Sodio							
~4.0-5.0 x 10 ⁹	TY +Gli			Glicerol							
3.5-7.5 x10 ⁸	NFb mod	0.5 vvm/ control ≥30% TOD	NH ₄ Cl	Ac. málico	30	205	28		10	Trujillo-Roldán <i>et al.</i> (2013)	
						52			1000l		
1.0-3.0 x 10 ¹⁰	NFb	30-50% TOD	NH ₃ ⁺ 26.5%	Ac. málico/ Ac. succinico	7.0	35	200	Fed batch	28	16	Fallik y Okon (1996)

4. HIPÓTESIS

El cultivo en lote alimentado de *A. brasilense* en columna de burbujeo permitirá obtener una densidad celular mayor que la obtenida en cultivos en lote (10^9 UFC mL⁻¹), ya que suministrará de manera constante los nutrientes necesarios para mantener la fase de crecimiento exponencial, permitiendo así obtener inóculos adecuados para su uso como biofertilizante.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Establecer las condiciones de cultivo en lote alimentado de *Azospirillum brasilense* en columna de burbujeo para la obtención de cultivos de alta densidad celular viables.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento de *Azospirillum brasilense* en matraces, utilizando fuentes de carbono alternativas tales como ácido succínico, gluconato de sodio y glicerol.
- Evaluar en cultivos en lote en columna de burbujeo, el efecto de la tensión de oxígeno disuelto en el crecimiento de *Azospirillum brasilense*.
- Establecer estrategias de cultivo en lote alimentado, evaluando diferentes perfiles de alimentación (lineal, escalonado y exponencial) para lograr rendimientos mayores de sustrato y densidad celular alta en cultivos de *Azospirillum brasilense*.
- Relacionar la concentración de polihidroxibutirato (PHB) acumulado intracelularmente por *Azospirillum brasilense* y la vida de anaquel en cultivos con medio agotado.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El trabajo se dividió en tres partes que se esquematizan en la Figura 6.1. En la etapa 1 se evaluó el crecimiento de fuentes de carbono alternativas al medio tradicional ocupado para el cultivo de *A. brasilense*, el cual contiene 5 g L^{-1} de ácido málico (NFb). Se realizaron cultivos en matraces para las cepas Start y Calf con la formulación del medio NFb, variando la fuente de carbono en succinato, gluconato de sodio ó glicerol, todos en 5 g L^{-1} .

En la segunda fase se realizaron cultivos en lote en columnas de burbujeo para las cepas Start y Calf de *A. brasilense*, bajo diferentes flujos de aireación, para establecer aquél que favoreciera el crecimiento. En ellos no se controló el pH, debido a que en trabajos previos de este laboratorio, en cultivos en reactor de tanque agitado, utilizando diversas fuentes de carbono como glucosa y frutosa además de ácido málico, el pH se mantuvo dentro de los valores que permiten el crecimiento (entre 5.5-8.7 unidades de pH) [Acevedo, E. Datos no publicados].

En la tercer fase, se probaron diferentes perfiles de alimentación (lineal, escalonado y exponencial) en cultivo con la mezcla de cepas (Start-Calf 1:1 al inicio del cultivo) para determinar en cual se obtiene una mayor densidad celular y cuál de ellos favorece la producción de PHB. Finalmente, se estudió la relación entre la cantidad de PHB acumulado con la vida de anaquel.

Figura 6.1 Determinación del crecimiento celular y producción de PHB en *A. brasilense*

Cultivos en matraces

Cepas: Start y Calf (por separado)

Condiciones de cultivo

Medio de cultivo: NFb mod ácido málico (control), ácido succínico, gluconato de sodio y glicerol (5 g L⁻¹)

Volumen de llenado: 100 mL

Volumen de matraz: 500 mL

Agitación: 150 rpm

Temperatura: 30°C

Cultivos en lote CBR

Cepas: Start y Calf (por separado)

Condiciones de cultivo

Medio de cultivo: NFb mod ácido málico

Volumen nominal: 6 L

Volumen de trabajo: 5 L

Flujo de aireación: 0.1, 0.5 y 1.0 vvm

Temperatura: 30 °C

pH: sin control

Cultivo en lote alimentado CBR

Cepas: Start y Calf (en mezcla 1:1)

Condiciones de cultivo

Medio de cultivo: NFb mod ácido málico

Volumen nominal: 6 L

Volumen de trabajo 5 L + 500 mL alimentación (Medio NFb mod 20x)

Flujo de aireación: 0.1 vvm

Perfiles de alimentación: lineal, escalonado (pulsos), exponencial

Temperatura: 30°C

Consumo de fuente de carbono: Kit enzimático

Producción de PHB: Método de Law y Slepecky modificado

Vida de anaquel: UFC mL⁻¹

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepas y medios de cultivo

7.1.1 Cepas

Las cepas utilizadas en este estudio de *A. brasilense* Start y Calf, originalmente fueron aisladas en el Centro de Ciencias Genómicas, UNAM por el Dr. Jesús Caballero-Mellado, las cuales se encuentran en concesión a la empresa Biofabrica Siglo XXI S.A. de C.V. La diferencia entre las cepas está en la capacidad de cada una para crecer en diferentes tipos de suelo [Trujillo-Roldán *et al.*, 2013].

7.1.2 Preservación de las cepas

Los cultivos stock se mantuvieron a temperatura ambiente (20°C) en cajas con medio NFb/rojo Congo (Tabla 7.1) solidificado con agar (16 gL⁻¹) a pH 6.8 y se realizaron resiembras cada mes para mantenerlos viables.

7.1.3 Medios de cultivo

El medio utilizado en este trabajo, fue el medio NFb mod. cuya composición se muestra en la Tabla 7.2, ajustado a pH de 7.2 con H₂PO₄ concentrado y esterilizado a 121°C durante 20 min y 15 psi, y que en el resto del trabajo se menciona únicamente como NFb.

Se realizaron soluciones stock (100x) de manera independiente, para los microelementos como CaCl₂, Na₂MoO₄, MnSO₄, H₃BO₄ y FeSO₄.

7.2 Cultivos en matraces agitados

Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con 100 mL de medio NFb. En los cultivos control se utilizó ácido málico como fuente de carbono y para los otros cultivos, se utilizaron ácido succínico, gluconato de sodio y glicerol, todos en la concentración de 5 g L⁻¹. Se incubaron a 30°C y 150 rpm (Trujillo-Roldán *et al.*, 2013) en una incubadora con agitación orbital (Ø 2.54cm) modelo C25 (New Brunswick Scientific) durante 28 h, por triplicado.

Tabla 7.1 Composición medio NFb/Rojo Congo modificado*

Reactivo	Concentración (g L ⁻¹)
Ácido málico	5.0
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
KOH	4.8
FeCl ₃	0.015
Extracto de levadura	0.3
Agar bacteriológico	16.0

* Modificado en extracto de levadura por la Empresa Biofabrica Siglo XXI.

Tabla 7.2 Composición del medio NFb modificado*

Reactivo	Concentración (g L ⁻¹)	Reactivo	Concentración (g L ⁻¹)
Ácido málico	5.0	NaCl	0.1
KOH	4.8	CaCl ₂	0.02
K ₂ HPO ₄	0.5	FeSO ₄	0.015
NH ₄ Cl	0.3	MnSO ₄	0.01
Extracto de levadura	0.3	H ₃ BO ₄	0.01
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2	Na ₂ MoO ₄	0.0025

* Modificado en extracto de levadura por la Empresa Biofabrica Siglo XXI.

7.3 Cultivos en reactor de columna de burbujeo (CBR) de 6.0 L

7.3.1 Cultivos en lote

Los cultivos se llevaron a cabo en columnas de burbujeo de 6 L de volumen nominal y 5L volumen de trabajo de diseño propio [García Cabrera, 2012]. Tienen puertos para electrodos de oxígeno disuelto (AppliSens™ Applikon Biotechnology) y pH (AppliSens™ Applikon Biotechnology), así como uno de inoculación y venteo (Figura 7.1). El aire es filtrado antes de entrar a la columna por medio de un filtro

de 0.45µm ingresando a través de un difusor de vidrio sinterizado. La temperatura fue controlada por medio de una mantilla térmica de 110 W.

La columna fue sanitizada con vapor por 8 hr y el medio esterilizado en autoclave: 121°C /20 min y 15 psi, fue vertido a la columna por medio de una bomba.

A través de los controladores (ADI 1010 y ADI 1030, Applikon Biotechnology, USA), conectados a una computadora, se registraron los parámetros de pH, temperatura y Tensión de Oxígeno Disuelto (TOD) en línea cada minuto para su análisis con el programa BioXpertR Lite (Applikon Biotechnology, USA). Paralelamente, se obtuvieron datos de densidad óptica en espectrofotómetro (Beckman DU730, USA) para analizar el crecimiento durante 28 h de cultivo, tomando muestras cada 4 h. Los cultivos se realizaron a 30°C por duplicado a 0.1, 0.5 y 1.0 vvm, sin control de pH para las dos cepas Start y Calf de *A. brasilense* de manera independiente.

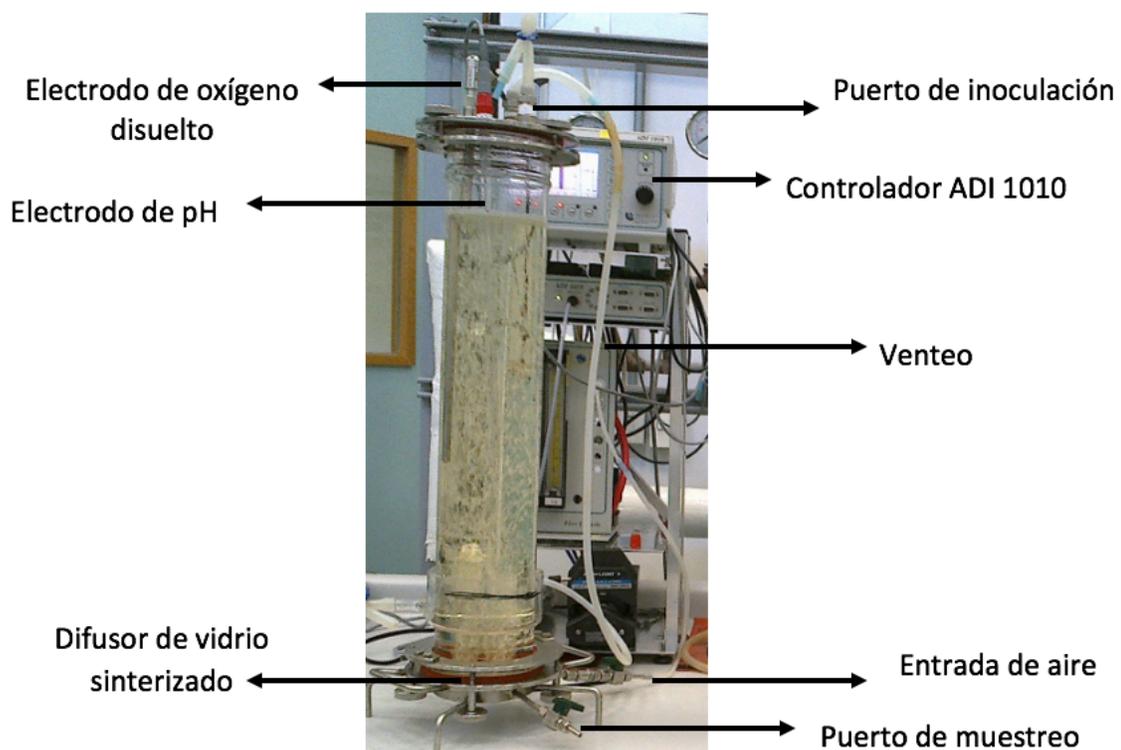


Figura 7.1 Componentes de la columna de burbujeo 6 L utilizada en el presente trabajo
Columna diseñada por el M.C. Ramsés García Cabrera [García Cabrera, 2012]

7.3.2 Cultivos alimentados en columna de burbujeo

Los cultivos alimentados se realizaron en el mismo sistema de columna de burbujeo de 6L, colocando un puerto de alimentación similar al de muestreo, cerca del difusor para un mejor mezclado. Se diseñó un sistema de trampa en la parte inferior de la columna que permitió la entrada del flujo de medio (Figura 6.2). La alimentación del medio NFB 20x se realizó con una bomba peristáltica de precisión (Masterflex™, modelo L/S Análogica). Los flujos se prediseñaron y se cambiaron manualmente según el tipo de perfil en evaluación. El flujo inicial de la alimentación fue de 0.5 mL min^{-1} en todos los casos por motivos operacionales pero se detuvo la alimentación una vez vertidos los 500 mL. En los cultivos en mezcla (1:1 inicial) de las cepas de *A. brasilense* Start y Calf se añadió antiespumante de silicona (10%p/v) de manera manual.

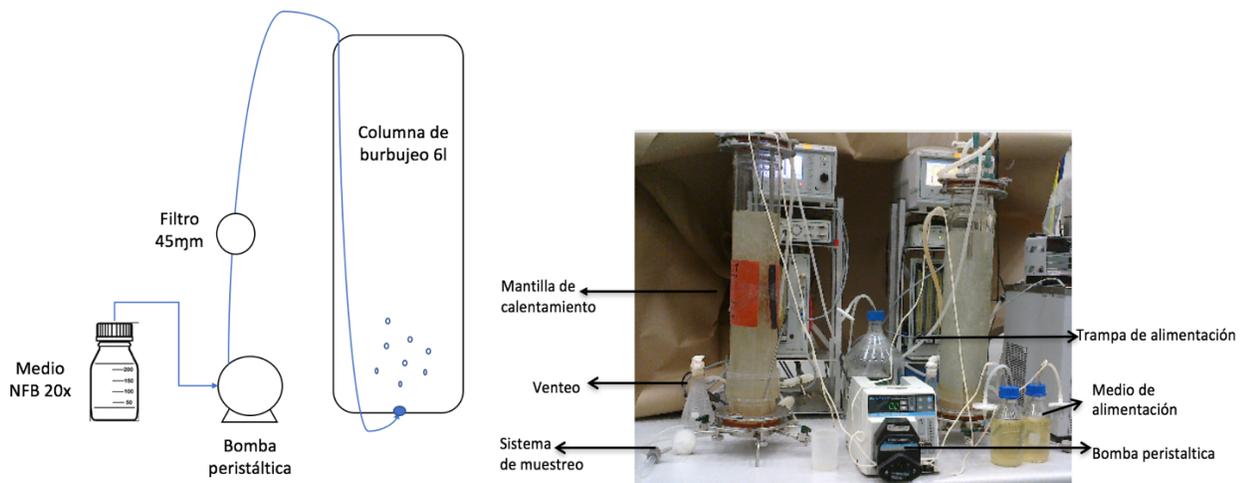


Figura 7.2 Esquema de trampeo y componentes del sistema de alimentación en columnas de burbujeo 6 l

En la figura 7.3 se muestran los perfiles de alimentación que se evaluaron en este trabajo. En todos los casos se comenzó la alimentación del medio de cultivo NFB 20x a las 12 h, momento en que el cultivo de *A. brasilense* se encontraba en fase exponencial.

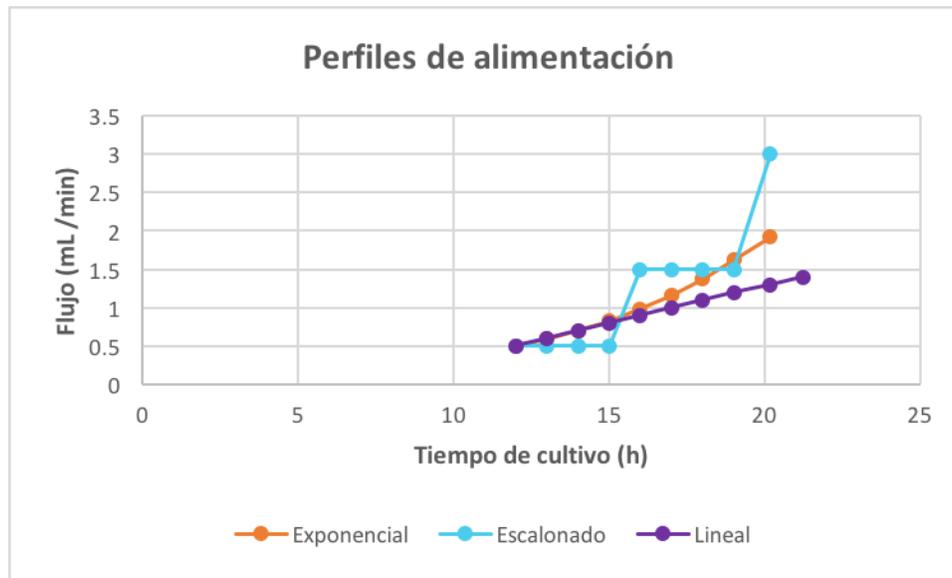


Figura 7.3 Perfiles de alimentación de los cultivos en mezcla de *A. brasilense* en columnas de burbujeo de 6 L

7.3.3 Perfil de alimentación exponencial

La alimentación exponencial, permite alargar la fase de exponencial de crecimiento, manteniendo la velocidad específica de crecimiento y suministrando nutrientes de manera que no sean limitantes para el microorganismo. Una vez que se llega a la fase exponencial se comienza a alimentar el medio mediante la siguiente ecuación:

$$F(t) = \frac{\mu X_B V_B}{S_0 Y_{X/S}} e^{\mu t}$$

Donde μ (h^{-1}) es la velocidad específica de crecimiento, en este caso, se tomó el 30% de la μ más baja entre las cepas Start (0.22 h^{-1}) y Calf (0.28 h^{-1}) de *A. brasilense*, para evitar la dilución en el cultivo en mezcla (1:1 al inicio) X_B (g l^{-1}) es la concentración de biomasa al inicio de la alimentación, V (l) es el volumen de medio en el reactor, S_0 (g l^{-1}) es la concentración de sustrato en la alimentación, $Y_{X/S}$ (g g^{-1}) es el rendimiento de biomasa en base a sustrato y t (h) es tiempo.

Para el caso del cultivo en mezcla 1:1 al inicio de las cepas Start y Calf de *A. brasilense*, la velocidad de crecimiento fue de 0.16 h^{-1} , X_B : 0.5 g/l , V_B : 5.0 l , S_0 : 100 g/l y $Y_{X/S}$: 0.25 (g/g) . Con esta información, se realizó un esquema de alimentación exponencial (Tabla 7.3)

Tabla 7.3 Esquema de alimentación exponencial para el cultivo en mezcla de *A. brasilense*

Tiempo de cultivo (h)	Flujo de alimentación (mL min ⁻¹)	Medio 20x alimentado (mL)	Volumen de llenado en CBR (mL)
12	0.500	30.00	5030.00
13	0.591	35.51	5065.46
14	0.700	42.00	5107.46
15	0.828	49.69	5157.15
16	0.979	58.74	5215.89
17	1.158	69.48	5285.37
18	1.370	82.20	5367.57
19	1.621	97.26	5464.83
20.18	1.918	35.17	5550.00

7.3.4 Perfil de alimentación escalonado

La alimentación con perfil escalonado o por pulsos, inició a las 12 horas de cultivo, encontrándose en último tercio de la fase exponencial. El perfil consistió en alimentar con medio de cultivo NFb 20x hasta agotar los 500 mL, con 3 pulsos, el primero empezó en 0.5 mL min⁻¹ y se mantuvo durante 4 h, el siguiente pulso fue de 1.5 mL min⁻¹ por otras 4 h y el tercero de 3.0 mL min⁻¹ por 1.11 h (Tabla 7.4)

Tabla 7.4 Esquema de alimentación escalonado para el cultivo en mezcla de *A. brasilense*

Tiempo de cultivo (h)	Flujo de alimentación (mL min ⁻¹)	Medio 20x alimentado (mL)	Volumen de llenado en CBR (mL)
12	0.50	30.00	5030
13	0.50	30.00	5060
14	0.50	30.00	5090
15	0.50	30.00	5120
16	1.5	90.00	5210
17	1.5	90.00	5300
18	1.5	90.00	5390
19	1.5	90.00	5480
20.11	3.0	115.08	5500

7.3.5 Perfil de alimentación lineal

El esquema de alimentación lineal comenzó a alimentar el medio NFB 20X con el flujo de 0.5 mL min^{-1} y fue incrementando linealmente en 0.1 mL min^{-1} cada hora como se presenta en la Tabla 7.5

Tabla 7.5 Esquema de alimentación lineal para el cultivo en mezcla de *A. brasilense*

Tiempo de cultivo (h)	Flujo de alimentación (mL min^{-1})	Medio 20x alimentado (mL)	Volumen de llenado en CBR (mL)
12	0.5	30.00	5030
13	0.6	36.00	5066
14	0.7	42.00	5108
15	0.8	48.00	5156
16	0.9	54.00	5210
17	1.0	60.00	5270
18	1.1	66.00	5336
19	1.2	72.00	5408
20	1.3	78.00	5486
21.23	1.4	19.60	5500

7.4 Procedimiento de inoculación

a) Pre-inóculo

En un matraz Erlenmeyer de 500 mL, con 100 mL de medio NFb, se colocó 1 cm^3 de agar de las placas de medio NFb/rojo Congo como inóculo de las cepas Start o la cepa Calf de *A. brasilense*. Los cultivos se incubaron a 30°C y 150 rpm (incubadora con agitación orbital modelo C25, New Brunswick Scientific) durante 48h para la cepa Start y 24h para la cepa Calf.

b) Inóculo

Se tomó el 10% del volumen del pre-inóculo y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio NFb y se incubó a 30°C y 150 rpm por 12h-18h (O/N).

c) Cultivo

El inóculo para los cultivos en matraz se ajustó al 10% del volumen en una densidad óptica $_{600\text{nm}}$ de 0.1 U.A. y para las columnas de burbujeo, se ajustó a una absorbancia $_{600\text{nm}}$ de 0.05 U.A.

7.5 Métodos analíticos

7.5.1 Determinación del número de bacterias por conteo en placa.

Se determinó el número de bacterias por el método del número más probable (MPN), realizando diluciones seriadas (1:10) y se hizo un conteo en cajas de medio Rojo Congo (cuya base es el medio mineral NFb), incubadas a 30°C durante 48 h.

$$UFC\ ml^{-1} = NxD$$

$$N=(\text{número de colonias en caja}) \times D\ (\text{factor de dilución})$$

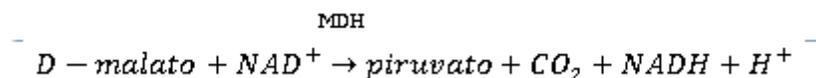
7.5.2 Determinación de biomasa por turbimetría

Durante el cultivo, se tomó 1.0 mL de muestra cada 4h y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 600nm (Beckman DU730, USA), se realizaron las diluciones apropiadas (1:2; 1:5, 1:10) cuando la absorbancia superaba las 0.8 unidades. Sin embargo, esta información se complementó con las UFC mL⁻¹ para seguir el crecimiento bacteriano.

7.5.3 Cuantificación de ácido málico

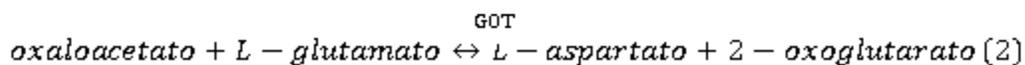
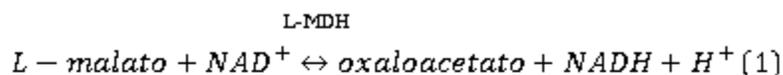
El consumo de la fuente de carbono se realizó mediante el uso de kits enzimáticos, para D-malato (R-Biopharm, Roche: Cat .No. 11215558035) y L-malato (R-Biopharm, Roche: Cat. No. 10139068035), cuyo principio es que:

La forma isomérica: D-malato, es oxidado a oxaloacetato por la enzima D-malato deshidrogenasa (MDH) en presencia de NAD⁺. El oxaloacetato es inmediatamente convertido por la misma enzima a piruvato y dióxido de carbono. La cantidad de NADH formado es estequiométricamente igual a la cantidad de D-malato.



La forma isomérica: L-Malato, es oxidado a oxaloacetato por la enzima L-malato deshidrogenasa en presencia de NAD⁺, el equilibrio de esta reacción recae hacia la formación de L-malato, por lo que si se

elimina el oxaloacetato del medio, la reacción se dirige hacia oxaloacetato. La reacción catalizada por la enzima GOT (glutamato-oxaloacetato transaminasa) convierte el oxaloacetato a L-aspartato en presencia de L-glutamato



La cantidad de NADH formada igual que en el caso anterior es estequiometricamente la cantidad de L-malato. La cantidad de NADH formada se mide por su absorbancia a 334, 340 o 365nm (Beckman DU730, USA) dependiendo de la concentración de ácido málico en la muestra, según las indicaciones del proveedor.

7.5.4 Cuantificación de PHB

La cuantificación de PHB se realizó de acuerdo al Método Law y Slepecky (1961) con algunas modificaciones. Para la extracción de PHB de las células, se tomó 1 mL de muestra del cultivo en los diferentes tiempos (4, 8, 12, 20 y 28h) en tubos EppendorfTM, se centrifugaron por 10 min a 12,000 rpm, el *pellet* se secó en la mufla a 70°C. Se agregó 1 mL de hipoclorito de sodio (6%v/v) y se dejó reposar por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 15 min, se eliminó el hipoclorito (fase alta) con micropipeta y se realizaron lavados con agua destilada (agregando 1 mL de agua destilada estéril, centrifugando a 10,000 rpm por 10 minutos, en dos ciclos), posteriormente se agregó 1 mL de acetona fría, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos y finalmente se resuspendió en 300 µL de etanol.

Para la hidrólisis de la muestra, la muestra resuspendida en alcohol, se transfirió a un tubo de vidrio de 5 mL con tapa y se dejó evaporar el etanol a 70°C en la estufa con la tapa ligeramente abierta (el *pellet* obtenido en este paso se analizó mediante espectrofotometría infrarroja: ANEXO 1). Posteriormente, se agregaron 5 mL de H₂SO₄ concentrado, se taparon los tubos y se mantuvieron en la estufa a 70°C por 4 horas más para hidrolizar el PHB completamente, a ácido crotónico (Yu *et al.*, 2005). Se dejaron enfriar las muestras y se midió la absorbancia a 235 nm en celdas de cuarzo usando H₂SO₄ como blanco (bajo las mismas condiciones que las muestras: 4 horas a 70°C, que también fue utilizado en caso de requerir

diluciones en las lecturas de las muestras). Finalmente, se cuantificó la cantidad de PHB mediante una curva estándar de ácido crotonico (Law y Slepecky, 1961), realizada con diferentes concentraciones de PHB comercial (Sigma Aldrich. CAS:29435-48-1) como se muestra en la Figura 7.4.

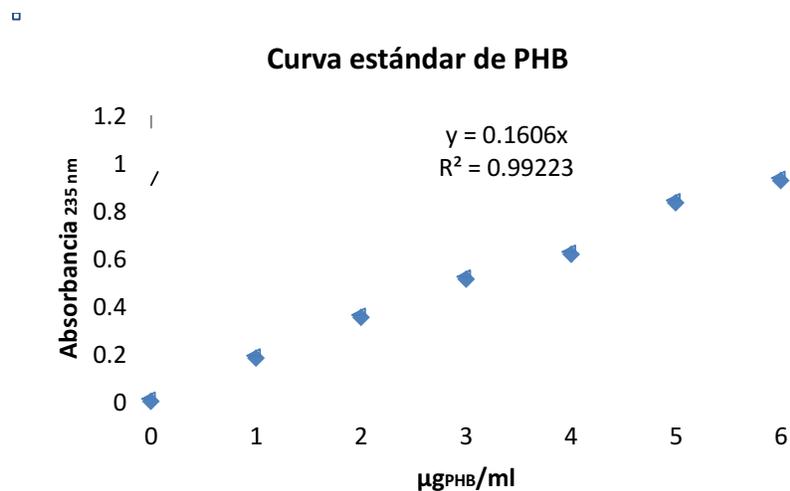


Figura 7.4 Curva estándar de la hidrólisis de PHB en ácido crotonico.

La curva estándar se realizó pesando diferentes cantidades de PHB (μg) disueltos en 1 mL de H_2SO_4 , posteriormente se sometieron a hidrólisis (en la estufa 70°C por 4 horas) y luego se midió la absorbancia a 235 nm (Beckman DU730, USA) del ácido crotonico (producto de la hidrólisis de PHB) para cada una de las concentraciones probadas.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Evaluación del crecimiento de *A. brasilense* en fuentes de carbono alternativas

En la Figura 8.1 se puede observar que a las 28h de cultivo, las mayores densidades ópticas se obtuvieron de manera similar en los cultivos con gluconato de sodio (4.43 ± 0.3 U.A.), ácido málico (4.38 ± 0.22 U.A.) y ácido succínico (3.19 ± 0.42) (Tabla 8.1). Sin embargo, la absorbancia no se corresponde con las UFC obtenidas, en el caso de ácido málico se obtuvieron 1.08×10^9 (± 0.31) UFC mL⁻¹ mientras que con gluconato de sodio se obtuvieron 9.10×10^9 (± 0.15) UFC mL⁻¹, lo cual sugiere la presencia de exopolisacáridos o polímeros de reserva como PHB, que incrementan la absorbancia medida en el espectrofotómetro. Las UFC mL⁻¹ en los cultivos con ácido málico, ácido succínico y glicerol no presentan diferencias estadísticas ($1.08 \times 10^9 \pm 0.31$ UFC mL⁻¹, $5.50 \times 10^8 \pm 3.53$ UFC mL⁻¹ $2.85 \times 10^8 \pm 0.49$ UFC mL⁻¹, respectivamente), pero sí las UFC mL⁻¹ obtenidas en gluconato de sodio, las cuales fueron superiores al resto de las fuentes de carbono evaluadas.

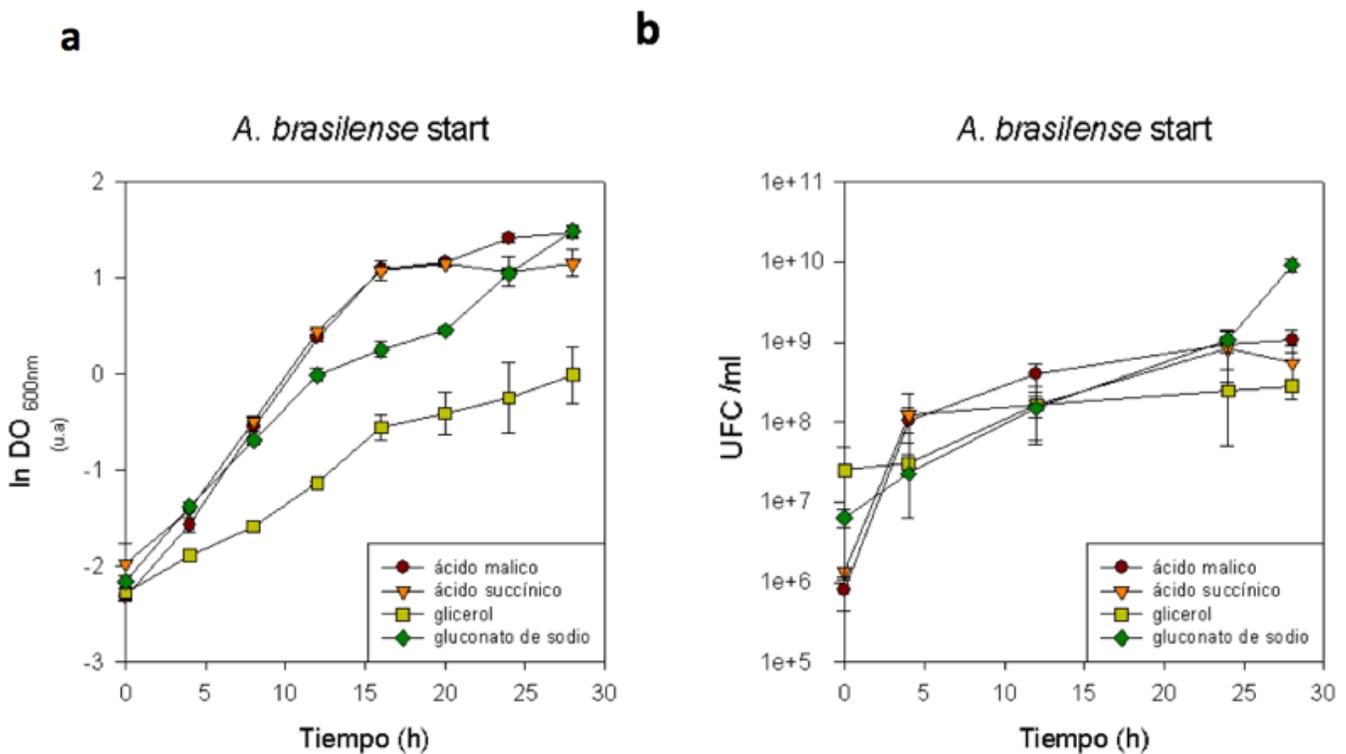


Figura 8.1 Cinética de crecimiento de *A. brasilense* cepa Start en fuentes alternativas de carbono. Cinética con base a densidad óptica medida a 600nm (a) y en unidades formadoras de colonias (b), en medio NFb con ácido málico (control), glicerol, gluconato de sodio y ácido succínico (5 g/L) a 30°C y 150 rpm en matraces agitados a 150 rpm.

La velocidad específica de crecimiento de *A. brasilense* Start fue mayor en el medio NFb con ácido málico y succínico (0.22 h^{-1}) comparados con gluconato de sodio y el glicerol (0.18 y 0.09 h^{-1} respectivamente). Cabe destacar que, aunque la velocidad de crecimiento con gluconato de sodio fue menor (0.18 ± 0.005), a la presentada por los cultivos con ácido málico y succínico, presentó una tendencia de crecimiento hacia el final del cultivo (en este caso se consideraron únicamente 28h como tiempo final para comparar los resultados con estudios previos realizados en este laboratorio). La velocidad específica de crecimiento en el medio con glicerol fue la menor presentada entre las cuatro fuentes de carbono probadas para el crecimiento de *A. brasilense* Start (60% menor con respecto al control, 0.09 h^{-1} vs 0.22 h^{-1}).

Tabla 8.1 Parámetros de crecimiento y biomasa de *A. brasilense* cepa Start en matraces a 30°C y 150 rpm al tiempo final (28h)

Fuente C	$\mu_{\text{exp}} (\text{h}^{-1})$	$\text{DO}_{600\text{nm}} (\text{U.A.})$	UFC mL^{-1}
Ácido málico	0.22 ± 0.003	$4.38 \pm 0.22_a$	$1.08 \times 10^9 \pm 0.31_a$
Gluconato Na	0.18 ± 0.005	$4.43 \pm 0.30_a$	$9.10 \times 10^9 \pm 0.15_b$
Ácido succínico	0.22 ± 0.004	$3.19 \pm 0.42_a$	$5.50 \times 10^8 \pm 3.53_a$
Glicerol	0.09 ± 0.003	$1.02 \pm 0.32_b$	$2.85 \times 10^8 \pm 0.49_a$

Los subíndices corresponden a las diferencias estadísticas presentadas (Anexo 2)

El comportamiento para la cepa Calf de *A. brasilense* con las fuentes de carbono probadas (ácido málico, gluconato de sodio, ácido succínico y glicerol) fue similar a la cepa Start (Figura 8.2, Tabla 8.2).

Los cultivos con gluconato de sodio y ácido málico son los que presentaron mayores densidades ópticas ($4.80 \text{ U.A.} \pm 0.03$, $4.37 \text{ U.A.} \pm 0.18$ respectivamente), que se corresponden con las mayores densidades celulares viables Figura 8.2 (b): $5.5 \times 10^9 \pm 2.19 \text{ UFC mL}^{-1}$ con gluconato de sodio y $2.63 \times 10^9 \pm 0.52 \text{ UFC mL}^{-1}$ con ácido málico. Sin embargo, de la misma manera que en la cepa Start, las UFC presentadas en el medio con gluconato de sodio, son estadísticamente mayores también para la cepa Calf.

Las cepas de *A. brasilense* Start y Calf presentan un buen crecimiento en el medio NFb modificado con gluconato de sodio similar a lo reportado para otras especies de *Azospirillum* (Cd y Sp6) según Bashan y colaboradores (2011), en los que reportaron 10^{11} células mL^{-1} en conteo al microscopio y $5 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$ a las 18h en medio complejo de triptona-extracto de levadura, enriquecido ya sea con gluconato de

sodio ó con glicerol. Para las cepas Start y Calf en este estudio el glicerol añadido al medio NFb fue el que presentó la menor velocidad específica de crecimiento y densidades del orden de 10^8 UFC mL⁻¹.

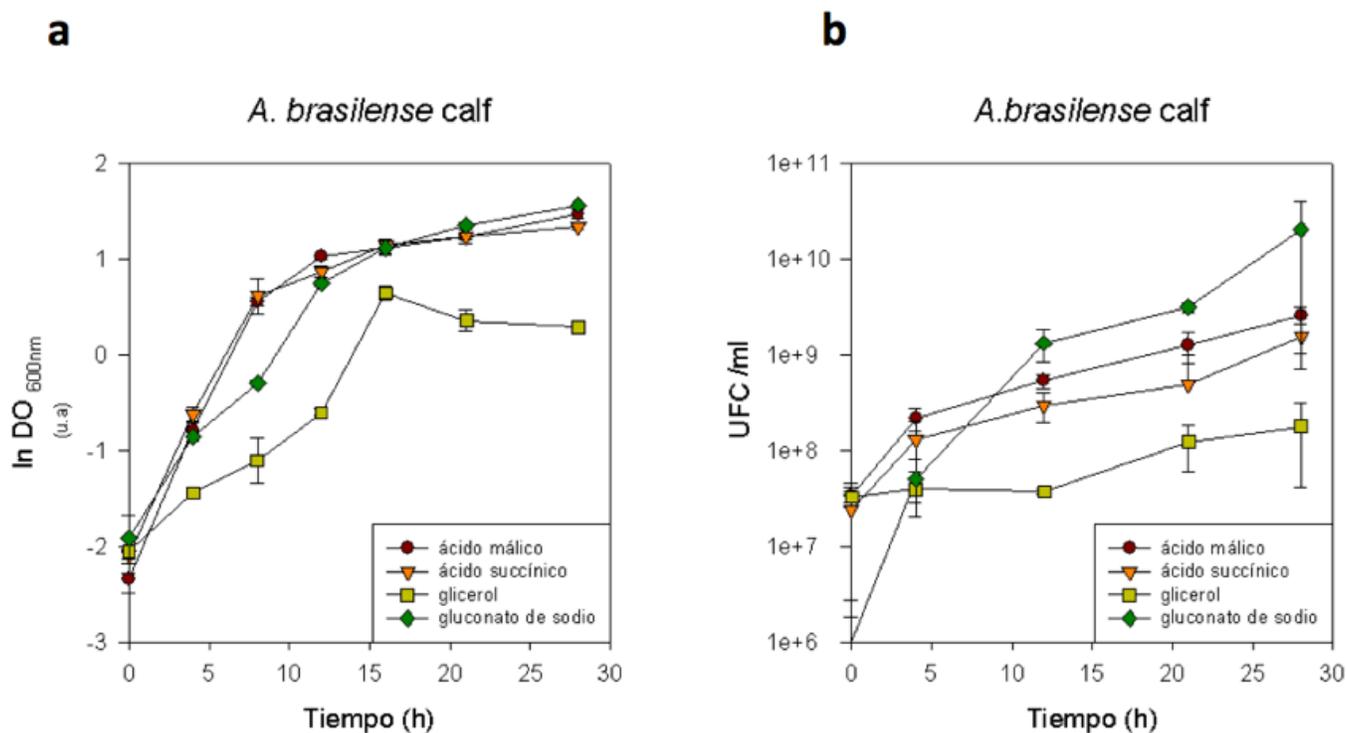


Figura 8.2 Cinética de crecimiento de *A. brasilense* cepa Calf en fuentes alternativas de carbono. Cinética con base a densidad óptica medida a 600nm (a) y en unidades formadoras de colonias (b), en medio NFb con ácido málico (control), glicerol, gluconato de sodio y ácido succínico (5 g/l) a 30°C y 150 rpm en matraces agitados a 150 rpm.

Tabla 8.2 Parámetros de crecimiento y biomasa de *A. brasilense* cepa Calf en matraces a 30°C y 150 rpm al tiempo final (28h).

Fuente C	μ_{exp} (h ⁻¹)	DO _{600nm} (U.A.)	UFC mL ⁻¹
Ácido Málico	0.28 ± 0.01	4.37 ± 0.18 _a	2.63 x10 ⁹ ±0.52 _b
Gluconato Na	0.21 ± 0.02	4.80 ± 0.03 _a	5.5 x10 ⁹ ±2.19 _a
Ácido Succínico	0.25 ± 0.01	3.84 ± 0.11 _b	1.57 x10 ⁸ ±0.52 _b
Glicerol	0.12 ± 0.01	1.34 ± 0.07 _c	5.56x10 ⁸ ±3.85 _b

La viabilidad de los cultivos es un aspecto importante en la producción de los inoculantes, por lo que fue relevante en este trabajo analizarla en los cultivos, tanto en las diferentes fuentes de carbono, como en los flujos de aireación y perfiles de alimentación probados.

El medio NFb modificado con gluconato de sodio fue el que presentó mayor densidad celular al final del cultivo (28h), además desde el punto de vista económico es el que presenta un menor costo entre las fuentes probadas en este estudio (gluconato de sodio, \$715; ácido málico, \$1,122; glicerol, \$1460 y ácido succínico, \$1648 (precio por 500g_{Sigma Aldrich})) por lo que parecía ser un buen candidato en la formulación del proceso. Sin embargo, la viabilidad se vió muy afectada en estos cultivos ya que, el 91% de la cuentas viables de la cepa Start y el 84% de la cepa Calf, se perdieron durante los siguientes cuatro meses de estar almacenados (Tabla 8.3).

Después de los cultivos con gluconato de sodio, aquellos que se vieron más afectados en cuanto a la viabilidad, fueron los que se realizaron con glicerol, perdiendo el 98% de las cuentas viables para la cepa Calf y cerca del 62% de las cuentas viables para la cepa Start (Tabla 8.3).

Tabla 8.3 Viabilidad de los cultivos de *A. brasilense* en matraces con medio NFb y diferentes fuentes de carbono a 4 meses

Fuente Carbono		UFC mL ⁻¹				
Cepa	Start			Calf		
Viabilidad	Inicial	4 meses	% Viabilidad	Inicial	4 meses	% Viabilidad
Ácido Málico	1.08 x10 ⁹ ±0.31	1.02 x10 ⁹ ±0.02	94.44	2.63 x10 ⁹ ±0.52	1.70 x10 ⁹ ±0.42	64.63
Gluconato Na	9.10 x10 ⁹ ±0.15	8.20 x10 ⁸ ±0.38	9.01	5.5 x10 ⁹ ±2.19	9.0 x10 ⁸ ±0.10	16.36
Ácido Succínico	5.50 x10 ⁸ ±3.53	3.0 x10 ⁸ ±0.80	54.54	1.57 x10 ⁸ ±0.52	8.7 x10 ⁷ ±0.53	55.41
Glicerol	2.85x10 ⁸ ±0.49	1.11x10 ⁸ ±0.07	38.94	5.56x10 ⁸ ±3.85	1.20x10 ⁷ ±0.17	2.15

La viabilidad para los cultivos realizados en medio NFb con ácido málico como fuente de carbono, se mantuvo en el orden de 10⁹ UFC mL⁻¹, siendo la fuente de carbono que conserva la mayor viabilidad tanto para la cepa Start (94.44%) como para Calf (64.63%), seguida de ácido succínico en la cual mantienen 54 y 55% de las cuentas viables iniciales respectivamente, luego de cuatro meses.

Por lo anterior, se decidió continuar con el medio originalmente formulado con ácido málico como fuente de carbono para el resto de los experimentos, ya que fue uno de los que permitió tener mayor densidad celular, así como mayor viabilidad a los 4 meses para las cepas de *A. brasilense* Start y Calf.

8.2 Efecto de la velocidad de aireación sobre el crecimiento de *A. brasilense* en columnas de burbujeo en lote

Los cultivos en columna de burbujeo se realizaron en medio NFb con ácido málico (5g l^{-1}), modificando los flujos de aireación en 0.1, 0.5 y 1.0 vvm para conocer el efecto de éste parámetro sobre el crecimiento de *A. brasilense*.

La Figura 8.3 muestra el efecto de diferentes condiciones ambientales como la temperatura, pH, tensión de oxígeno disuelto, sobre el crecimiento de *A. brasilense* Start (medido en $\text{DO}_{600\text{nm}}$ y UFC mL^{-1}), la producción y consumo de PHB en los diferentes flujos de aireación (0.1, 0.5 y 1.0 vvm), así como el consumo de ácido málico (D y L-malato). El error corresponde al cultivo duplicado bajo las mismas condiciones.

El cultivo a 0.1 vvm de *A. brasilense* cepa Start fue el que alcanzó la mayor densidad óptica (3.94 U.A.), comparado con 0.5 vvm (2.80 U.A.) y 1.0 vvm (1.15 U.A.), así como en UFC mL^{-1} , en donde se obtuvieron $2.86 \times 10^9 (\pm 0.47) \text{ UFC mL}^{-1}$ para el flujo de 0.1 vvm, $4.85 \times 10^8 (\pm 0.30) \text{ UFC mL}^{-1}$ en 0.5 vvm y $3.5 \times 10^7 (\pm 0.50) \text{ UFC mL}^{-1}$ en 1.0 vvm (Tabla 8.4).

Se observó el consumo del isómero L-malato como ya se había reportado previamente para los cultivos de *A. brasilense* [Albrecht y Okon, 1980; Fallik y Okon 1996] en los tres flujos de aireación probados (0.1, 0.5 y 1.0 vvm). Sin embargo, entre las 14 y 28h de cultivo, se observó el consumo de la forma D-malato, únicamente en el flujo de 0.1 vvm (como se puede observar en la Figura 8.3).

A. *brasiliense* Start

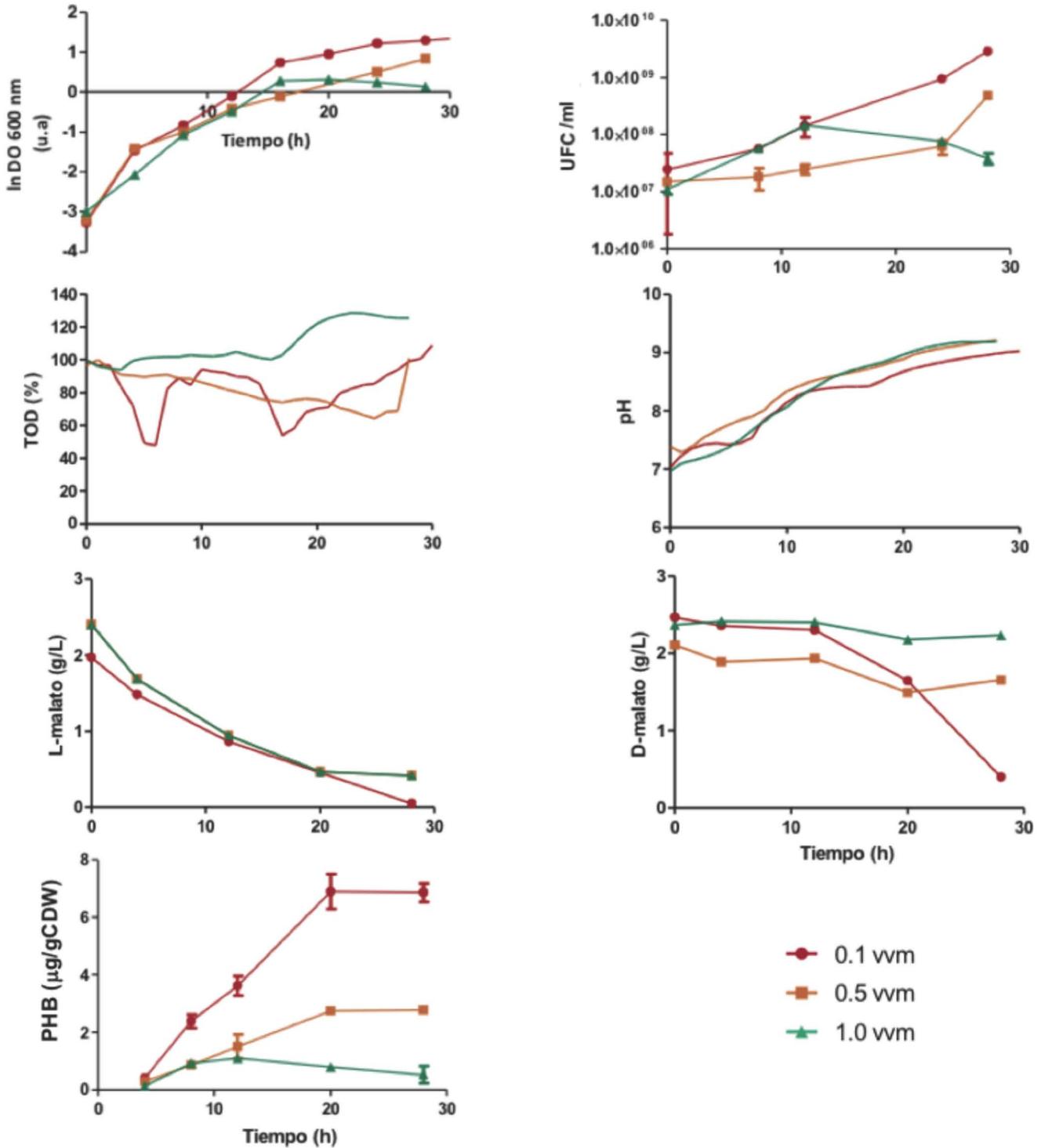


Figura 8.3 Cinética de crecimiento, consumo de sustrato y producción de PHB de *A. brasiliense* cepa Start a 0.1, 0.5 y 1.0 vvm en lote. Temperatura controlada a 30°C, sin control de pH en columnas de burbujeo de 6L por duplicado. NOTA: Se observa un error de calibración en los electrodos de TOD en 1.0 vvm

Adicionalmente se pudo observar que el pH superó las 8.5 unidades, donde se reporta que el crecimiento puede verse afectado [Albrecht y Okon, 1980]. Sin embargo, este no parece ser el caso ya que existe una tendencia de crecimiento aún hacia el final del cultivo tanto en 0.1 como en 0.5 vvm.

El cultivo a 0.5 vvm de la cepa Start, mostró un comportamiento similar al de 0.1 vvm, en cuanto a aumento de pH y una TOD por encima de 30%, pero un menor crecimiento reflejado en una unidad de densidad óptica y hasta un 80% menor en UFC mL⁻¹ (Tabla 8.4). De la misma manera que en el cultivo a 0.1 vvm, en el flujo de 0.5 vvm se observó la preferencia de consumo de la forma L-malato en la fase exponencial. Sin embargo, en este caso no consumió ni el 50% de la forma D-malato.

Tabla 8.4 Efecto del flujo de aireación sobre el crecimiento de *A. brasilense* cepa Start en columnas de burbujeo de 6L a las 28h de cultivo.

Flujo de aire (vvm)	DO _{600nm} (U.A.)	μ (h ⁻¹)	UFC mL ⁻¹	Biomasa (g L ⁻¹)	q _{S_D-malato exp} (g/UFC*mL)*h	q _{S_L-malato exp} (g/UFC*mL)*h	PHB (μg/gCDW)
0.1	3.94 ± 0.19	0.21 ±0.02	2.86x10 ⁹ ±0.47	0.96 ± 0.35	4.90E-10 ±0.44	3.28E-09 ±0.29	7.45 ±0.53
0.5	2.80 ± 0.02	0.12 ±0.02	4.85x10 ⁸ ±0.30	0.81 ± 0.04	2.31E-09 ±0.07	1.94E-08 ±0.08	3.38 ±0.42
1.0	1.15 ± 0.01	0.19 ±0.01	3.5x10 ⁷ ±0.50	0.52 ± 0.09	2.4E-10 ±0.01	5.19E-09 ±0.47	1.35 ±0.27

pH inicial de 7.0 y una temperatura controlada de 30°C.

Durante el crecimiento de *A. brasilense* cepa Start a 1.0 vvm, se observó una TOD alta durante las 28 h de cultivo, indicando el exceso de oxígeno en el medio pero con valores de pH similares a los obtenidos en 0.1 y 0.5 vvm. Lo anterior, indica que el oxígeno afectó el crecimiento, reflejado en la densidad óptica obtenida, así como en las UFC mL⁻¹, las cuales fueron las menores de las tres condiciones (1.15 U.A.(± 0.01), 3.5x10⁷ UFC mL⁻¹ (±0.50)). A pesar de la baja densidad celular, ésta logró consumir por completo el isómero L-malato, a diferencia de la forma D, la cual prácticamente permaneció igual durante todo el cultivo. Este fenómeno ya había sido reportado anteriormente por Fallik y Okon (1996) quienes reportan que, *A. brasilense* únicamente consume la forma L-malato, por lo que el cultivo con la mezcla DL-malato representaría un desperdicio del 50% en la fuente de carbono. Cabe destacar que ellos controlaron la TOD entre 30-50% lo cual se podría comparar con las condiciones de 0.5 y 1.0 vvm, ya que la TOD se

mantuvo por encima del 50% y que, de manera similar se observa un consumo deficiente de la forma D-malato (Figura 8.3 y Tabla 8.4).

La producción volumétrica de PHB al final del cultivo es 2 veces mayor en el menor flujo de aireación 0.1 vvm, que en 0.5 vvm y casi 6 veces más sobre 1.0 vvm, lo cual corresponde con lo reportado [Tal y Okon, 1985; Itzigsohn *et al.*, 1995], en donde se menciona que la limitación de oxígeno es un factor que desencadena la acumulación de PHB. En todos los cultivos, la producción de PHB es mayor durante la fase exponencial y decae en la fase estacionaria lo cual corresponde para *A. brasilense* [Sun, 2002; Cholula, 2005], y otras bacterias como *Azotobacter vinelandii* [Page y Knosp, 1989], *Alcaligenes latus* [Wang y Lee, 1997] y *Pseudomonas putida* [Huisman *et al.*, 1992].

La Figura 8.4 muestra el efecto de la temperatura, pH, tensión de oxígeno disuelto sobre el crecimiento bacteriano de *A. brasilense* Calf (medido como $\ln DO_{600nm}$ y UFC mL⁻¹), la producción de PHB, así como el consumo de ácido málico (D y L-malato) en los diferentes flujos de aireación (0.1, 0.5 y 1.0 vvm). El error corresponde al cultivo duplicado bajo las mismas condiciones.

De la misma manera que en el cultivo de *A. brasilense* cepa Start, en la cepa Calf se observó un mejor crecimiento (en promedio $7.8 \times 10^{10} \pm 1.31$ UFC mL⁻¹ (0.1vvm), sobre $5.0 \times 10^9 \pm 0.20$ UFC mL⁻¹ (0.5vvm) y $2.6 \times 10^9 \pm 0.50$ UFC mL⁻¹ (1.0vvm)) en el menor flujo de aireación (0.1vvm); sin embargo, la diferencia entre 0.5 y 1.0 vvm no fue tan marcada para esta cepa, de hecho la velocidad de crecimiento es mayor en 1.0 vvm que en 0.5 vvm, este fenómeno también habría sido reportado para la cepa JA03 de *A. brasilense* (Didonet y Magalhães, 1997) donde el crecimiento muestra variaciones conforme aumenta el oxígeno disuelto; es decir el crecimiento a $0.493 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1}$ es de 0.623 U.A. (660nm), cuando la concentraciones de oxígeno disuelto aumentan ($0.606 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1}$), la densidad óptica es de 0.466 y si se aumenta un poco más ($0.657 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1}$), la densidad óptica aumenta con respecto al anterior (0.605).

Durante el crecimiento de *A. brasilense* cepa Calf con el flujo de aire de 0.5 vvm, la fase estacionaria coincidió con el cambio en el pH alrededor de las 15 h, donde se rebasó el límite de pH de 8.5, en el cual *A. brasilense* es capaz de crecer [Albrecht y Okon, 1980], no se pudo resolver si el efecto detrimental en el crecimiento se debe al pH ó al oxígeno, ya que se requeriría realizar el experimento con pH controlado.

Por otro lado *A. brasilense* Calf en el flujo de 0.5 vvm, aumentó el consumo del isómero L-malato hacia el final de la fase exponencial (entre las 12 y 15 h de cultivo), que fue utilizado para continuar el crecimiento y no para acumular PHB como suele ocurrir en especies productoras de PHB [Sun *et al.*, 2000].

El perfil de la cinética de la cepa Calf de *A. brasilense* en 1.0 vvm (Figura 8.4) es muy parecida a aquella que se presenta en la cepa Start al mismo flujo de aireación (Figura 8.3), donde el flujo de aire es máximo y se mantiene la TOD en valores por encima del 80%, de igual manera se observa un consumo total del ácido L-málico y prácticamente nulo de la forma D.

Las cinéticas en 0.5 y 1.0 vvm para la cepa Calf son muy parecidas tanto en densidad óptica obtenida como en biomasa (peso seco y UFC mL⁻¹). Sin embargo, a pesar de estar en las mismas condiciones de pH y concentración de fuente de carbono que en 0.1 vvm, parece que al estar sobre el 80% de TOD, la cepa Calf de *A. brasilense* ésta sufre algún tipo de estrés que detiene el crecimiento.

La Tabla 8.5 resume los parámetros cinéticos de *A. brasilense* cepa Calf, bajo diferentes velocidades de aireación. En ella se puede apreciar el efecto negativo a altos flujos de aireación en la biomasa final obtenida a las 28h. Sin embargo, la diferencia entre el menor y el mayor flujo únicamente es de un orden de magnitud en cuanto a UFC mL⁻¹ obtenidas a diferencia de la cepa Start, la cual se ve afectada hasta en dos órdenes de magnitud.

Tabla 8.5 Efecto del flujo de aireación sobre el crecimiento de *A. brasilense* cepa Calf en columnas de burbujeo de 6L a las 28 h.

Flujo de aire (vvm)	DO _{600nm} (U.A.)	μ (h ⁻¹)	UFC mL ⁻¹	Biomasa (g L ⁻¹)	q _{SD-malato exp} (g/UFC*mL)*h	q _{SL-malato exp} (g/UFC*mL)*h	PHB (μg/gCDW)
0.1	2.88 ± 1.05	0.24 ± 0.02	7.8 x10 ¹⁰ ± 1.31	1.36 ± 0.22	1.2E-10 (±0.05)	5.08E-09 (±0.46)	1.35 ± 0.15
0.5	1.41 ± 0.03	0.17 ± 0.02	5.0x10 ⁹ ± 0.20	0.75 ± 0.02	2.3E-11 (±0.03)	1.67E-10 (±0.02)	0.68 ± 0.11
1.0	1.10 ± 0.14	0.21 ± 0.01	2.6x10 ⁹ ± 0.50	0.65 ± 0.13	2.2E-11 (±0.13)	4.79E-09 (±0.43)	0.40 ± 0.09

pH inicial de 7.0 y una temperatura controlada de 30°C.

A. *brasilense* Calf

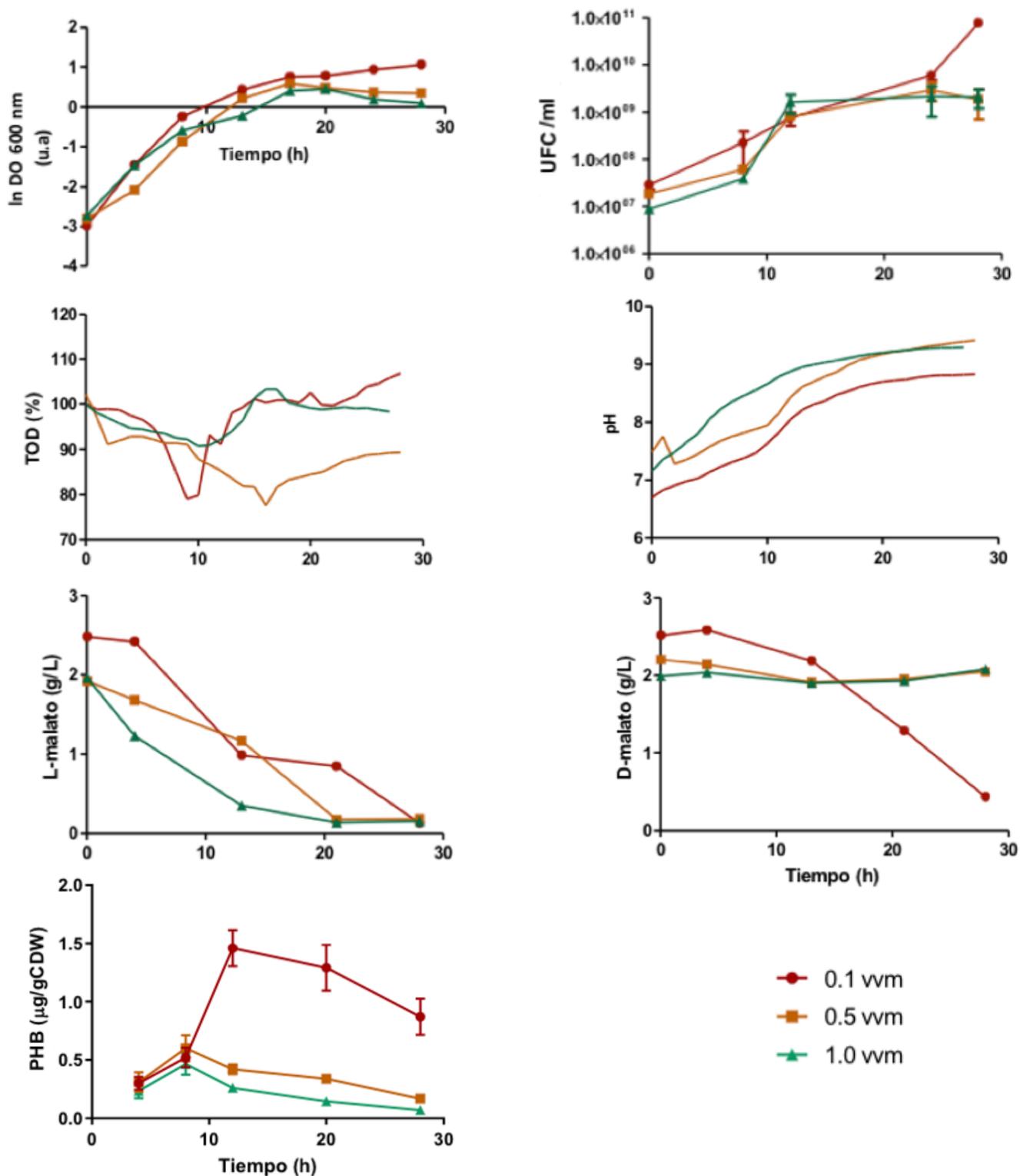


Figura 8.4 Cinética de crecimiento, consumo de sustrato y producción de PHB de *A. brasilense* cepa Calf a 0.1, 0.5 y 1.0 vvm en lote. Temperatura controlada a 30°C, sin control de pH en columnas de burbujeo de 6L por duplicado.

Fue en 0.1 vvm, el menor flujo de aireación probado en este estudio, donde se obtuvo la mayor densidad celular tanto para la cepa Start como Calf de *A. brasilense* (Tabla 8.3 y 8.4), además se corroboró la información obtenida por parte de la empresa Biofabrica Siglo XXI, la cual menciona que la cepa Calf crece más rápido que la cepa Start (en este estudio: 0.24 h^{-1} vs 0.21 h^{-1} en 0.1 vvm respectivamente) logrando así una mayor biomasa que la obtenida con la cepa Start a las 28h de cultivo ($7.8 \times 10^{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ vs $2.86 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$). Sin embargo, la cepa Start acumula hasta 5 veces más PHB que la cepa Calf en 0.1 vvm. Por esta razón es que el proceso productivo actual de la empresa Biofabrica Siglo XXI realiza el cultivo en mezcla, ya que la cepa Calf, les ayuda a tener una alta densidad al momento de inocular y la cepa Start ayuda al establecimiento a largo plazo debido a la acumulación de PHB.

Las cepas Start y Calf de *A. brasilense*, son capaces de consumir ambos isómeros de la mezcla DL-malato a un flujo de 0.1vvm (publicado en Carrasco-Espinosa *et al.*, 2015), a diferencia de lo reportado como desperdicio del 50% en la fuente de carbono por parte de *A. brasilense* cuando se utiliza la mezcla DL-malato (Fallik y Okon, 1996). Adicionalmente, se sabe que en el genoma de algunas cepas de *Azospirillum brasilense* (Sp245, Sp7) se encuentran codificadas enzimas malato deshidrogenasa descarboxilantes (enzimas málicas) cuya reacción consiste en transformar el D-malato en piruvato (Uniprot). Por lo que, es probable que también se encuentren en las cepas Start y Calf y que las condiciones de cultivo en columna de burbujeo presentadas en este estudio a 0.1 vvm, permitieron observar el efecto de represión catabólica ejercida por el isómero L-malato sobre el D-malato.

Para tener una referencia de las densidades celulares obtenidas en este estudio, con aquellas que se obtienen en otros sistemas de cultivo, se eligió comparar con el trabajo de Trujillo-Roldan y colaboradores (2013); en el que se realizaron cultivos en mezcla (1:1 al inicio del cultivo) de las cepas Start y Calf de *A. brasilense*, en un reactor de tanque agitado de 1000L, medio NFb mod, control de TOD al 30%, así como control de pH a 7 unidades. Con estas condiciones lograron entre $3.5 - 7.8 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ (2.7 U.A.), éstas cuentas viables son menores a las obtenidas en columnas de burbujeo para ambas cepas en el flujo de 0.1vvm, $2.86 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$ (3.94 U.A.) y $7.8 \times 10^{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ (2.88 U.A.) para Start y Calf respectivamente.

Por otro lado, la viabilidad de los cultivos de las cepas Start y Calf durante los primeros cuatro meses de almacenamiento, se ve favorecida en la menor velocidad de aireación probada, 0.1 vvm (Tabla 8.6) y a

un año permanece en el rango óptimo para un inoculante de *A. brasilense* (10^7 - 10^9 UFC mL⁻¹) según lo reportado [Kapulnik et al., 1985; Arzac et al., 1990, Okon e Itzigsohn, 1995; Schulz y Thelen, 2008].

Tabla 8.6 Viabilidad de los cultivos de *A. brasilense* en columna de burbujeo a 4 meses y un año de almacenamiento, a temperatura ambiente.

Flujo de Aireación		UFC mL ⁻¹				
vvm	Tiempo inicial	Start		Calf		
		4 meses	1 año	Tiempo inicial	4 meses	1 año
0.1	2.86x10 ⁹ ±0.47	2.59x10 ⁹ ±0.08 (90.55%)	9.52x10 ⁸ ±0.52 (33.28%)	7.8 x10 ¹⁰ ±1.31	5.5 x10 ¹⁰ ±0.29 (70.51%)	1.4x10 ⁹ ±0.42 (1.79%)
0.5	4.85x10 ⁸ ±0.30	6.15x10 ⁷ ±1.86 (12.68%)	1.25x10 ⁷ ±0.18 (2.57%)	5.0x10 ⁹ ±0.20	1.20x10 ⁹ ±0.46 (24%)	1.6x10 ⁷ ±0.29 (0.32%)
1.0	3.5x10 ⁷ ±0.50	1.4x10 ⁷ ±0.40 (40%)	3.4x10 ⁶ ±0.84 (9.71%)	2.6x10 ⁹ ±0.50	1.51x10 ⁹ ±0.10 (58.07%)	3.1x10 ⁸ ±0.39 (11.92%)

Sin embargo, el porcentaje de cuentas viables que se mantienen a los 4 y 12 meses de almacenamiento es mayor en 1.0 vvm que en 0.5 vvm, por lo que no parece ser un efecto relacionado únicamente con la velocidad de aireación del que provienen, ni con la cantidad de PHB (como se muestra en la Figura 8.5), ya que a cuatro meses de estar almacenadas, la cantidad de PHB disminuye drásticamente casi hasta agotarse. A pesar de que la cepa Start acumuló durante la fase exponencial hasta 3 veces más PHB que la cepa Calf, parece no haber una relación lineal entre la cantidad de PHB acumulada y la supervivencia de los cultivos.

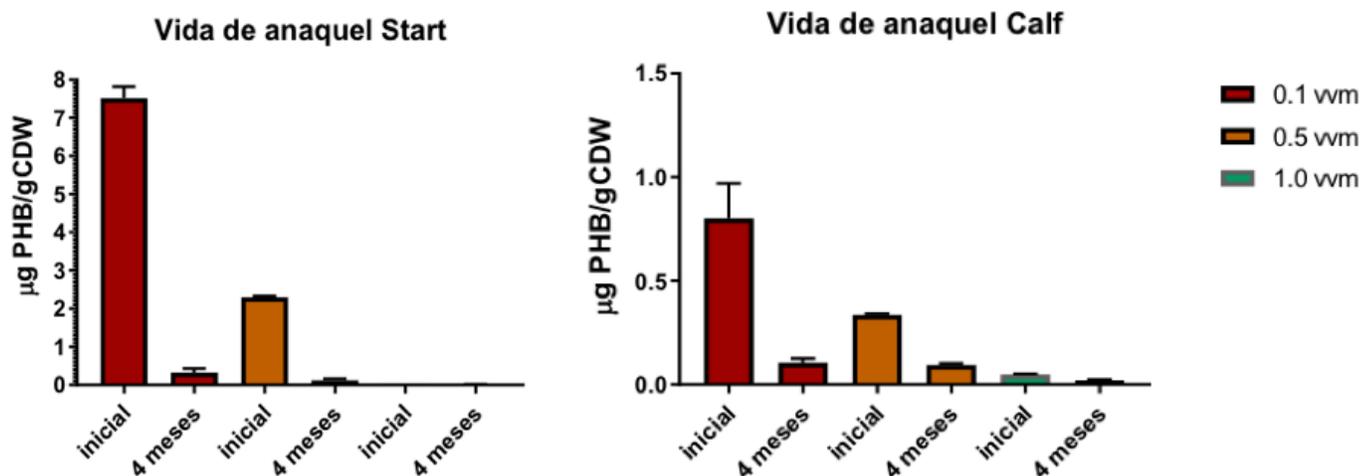


Figura 8.5 Cantidad de PHB de los cultivos a 0.1, 0.5 y 1.0 vvm de *A. brasilense* Start y Calf a cuatro meses de estar almacenados

En todos los casos se incluye el dato al término de las 28 h de cultivo (dato inicial) y luego a cuatro meses (dato final). En el caso de 1.0 vvm para la cepa Start la escala no permite observar la mínima cantidad de PHB acumulada

8.3 Efecto de diferentes perfiles de alimentación sobre el crecimiento de

A. brasilense en columnas de burbujeo

El cultivo en lote en columnas de burbujeo de 6L con medio NFb, permitió establecer que en el flujo de 0.1vvm, se obtiene la mayor velocidad de crecimiento, densidad celular, así como producción de PHB, para ambas cepas de *A. brasilense* (Start y Calf). Por lo anterior es que bajo esas condiciones se evaluaron tres perfiles de alimentación en cultivos en mezcla (1:1 cepas Start y Calf al inicio), con la finalidad de establecer una estrategia que permita tener una mayor concentración de biomasa viable.

En la Figura 8.6 se muestran las cinéticas de los cultivos control, alimentados: lineal, escalonado y exponencial de *A. brasilense* cepas Start-Calf (en mezcla 1:1), por duplicado, en ellos se controló la temperatura a 30°C, con flujo de 0.1vvm y sin control de pH. El cultivo control (cultivo en mezcla 1:1 cepas Start y Calf) presentó una velocidad de crecimiento ligeramente superior (0.27 h^{-1} vs 0.21 y 0.24 h^{-1}) a la de los cultivos Start y Calf en 0.1 vvm por separado, esto se ve reflejado en una mayor biomasa obtenida a las 28h ($3.7 \times 10^{10} (\pm 0.20) \text{ UFC mL}^{-1}$, ver Tabla 8.7). El cultivo en mezcla generó espuma que antes no se veía, la TOD descendió a 0%, y se mantuvo así hasta el final del cultivo. Éste fenómeno,

parece favorecer la acumulación de PHB durante el cultivo control en mezcla, ya que se obtuvo un rendimiento superior de PHB ($100.77 \pm 5.99 \mu\text{g/gcdw}$) que el obtenido para Start o Calf por separado ($7.45 \pm 0.53 \mu\text{g/gcdw}$ y $1.35 \pm 0.53 \mu\text{g/gcdw}$ respectivamente).

Tabla 8.7 Parámetros de crecimiento obtenidos en los diferentes perfiles de alimentación de las cepas Start y Calf de *A. brasilense* en columnas de burbujeo 6 l

Perfil de alimentación	DO _{600nm} (U.A.)	μ (h ⁻¹)	UFC mL ⁻¹	PHB ($\mu\text{g/gcdw}$)
Control (sin alimentación)	2.63 (± 0.07)	0.27 (± 0.003)	3.7×10^{10} (± 0.20)	100.77 ± 5.99
Escalonado	3.37 (± 0.19)	0.31 (± 0.003)	8.3×10^{10} (± 0.05)	24.06 ± 5.49
Lineal	2.64 (± 0.22)	0.38 (± 0.006)	8.52×10^{11} (± 0.51)	25.57 ± 3.54
Exponencial	3.22 (± 0.05)	0.46 (± 0.02)	3.9×10^{12} (± 1.55)	28.33 ± 0.70

El cultivo escalonado (o por pulsos) muestra un comportamiento de crecimiento similar al obtenido en el cultivo control (sin alimentar), se observa como las formas D y L malato se acumularon en el medio (Figura 8.6). A diferencia del cultivo control donde la acumulación de PHB es evidente (Tabla 8.7), en el cultivo alimentado escalonado esta acumulación no ocurrió, probablemente debido a que en el cultivo control existió la limitación de algún nutriente como P ó S, distinto al oxígeno que desencadenó la producción de PHB.

Estudios realizados por Acevedo, E. (datos no publicados) señalan un decremento ligero en el crecimiento de *A. brasilense* cuando se añaden concentraciones desde 10 g L^{-1} de ácido málico y más drástico cuando se añaden hasta 50 g L^{-1} de ácido málico. Lo anterior resulta importante ya que, en el cultivo alimentado por pulsos (escalonado) existen cerca de 14 g l^{-1} de ácido málico, que se están acumulando en el medio lo cual puede estar limitando el crecimiento de *A. brasilense* en mezcla.

A. *brasiliense* Start-Calf

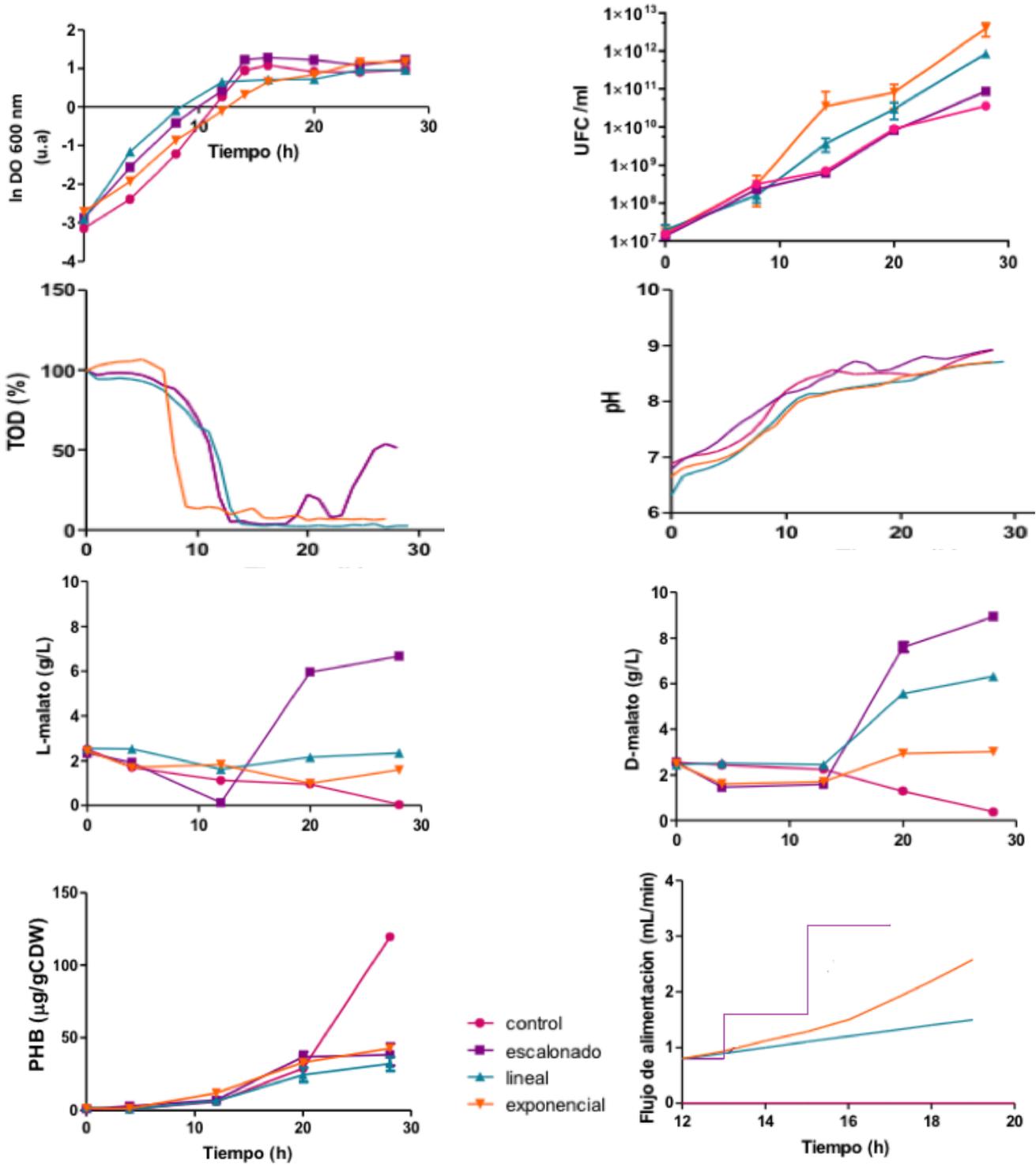


Figura 8.6 Cinética de crecimiento, consumo de sustrato, producción de PHB y variables ambientales de las cepas Start y Calf de *A. brasiliense* en mezcla (1:1 al inicio de cultivo, 0.1 vvm en lote alimentado). Temperatura controlada a 30°C, sin control de pH, medio NFb 20X (alimentación) en columnas de burbujeo de 6L por duplicado.

En el cultivo alimentado lineal se observaron altas densidades celulares viables del orden de 8.52×10^{11} UFC mL⁻¹ (Tabla 8.7); sin embargo, a las 20h de cultivo se empezó a acumular ácido málico, principalmente la forma D- malato, la cual alcanza más de 6 g l⁻¹ (2.4 veces más que la concentración al inicio del cultivo), así mismo se observó que la forma preferencial de consumo L-malato, no fue consumida por completo. Esta concentración de ácido málico en el medio no parece ser inhibitoria ya que el cultivo continúa creciendo.

El cultivo alimentado de perfil exponencial a 0.1vvm, es el que presentó la mayor velocidad de crecimiento específica. En este perfil se obtuvo la mayor densidad celular viable ($3.9 \times 10^{12} \pm 1.55$ UFC mL⁻¹) a las 28h. En este sentido, el cultivo exponencial cumplió con el objetivo de prolongar la fase de crecimiento que no se afectó por el incremento de pH ni por la microaerobiosis (TOD 0%) que prevaleció durante la segunda mitad del cultivo. Los perfiles de concentración de sustrato muestran que la fuente de carbono en ningún momento fue un factor limitante y que *A. brasilense* lo consume y lo utiliza para la generación de biomasa no así para la producción de PHB.

La viabilidad de los cultivos alimentados a los 6 meses de almacenamiento, decae de 2 a 3 órdenes de magnitud en cuanto a UFC mL⁻¹ (Tabla 8.8). Los cultivos que pierden menor viabilidad al estar almacenados son el cultivo control y el escalonado, que al final de las 28h de cultivo son los que presentaron menor cuenta viable, por el contrario el cultivo alimentado exponencial que obtuvo mayor cuenta viable a las 28h de cultivo, fue el que presentó mayor pérdida de viabilidad en almacenamiento.

A los 6 meses, todos los cultivos (control y alimentados) se encuentran dentro del rango para ser utilizados como inoculantes (10^7 - 10^9 UFC mL⁻¹). Por lo que, la estrategia de cultivo alimentado lineal y exponencial permiten obtener altas densidades celulares al final del cultivo (28h), pero no favorece la viabilidad de los cultivos que termina siendo similar a la que se obtuvo en los cultivos control (en mezcla, sin alimentar).

Tabla 8.8 Viabilidad de los cultivos de *Azospirillum brasilense* (en mezcla) alimentados y control en columna de burbuja a 2 y 6 meses.

Condición	PHB inicial ($\mu\text{g/gcdw}$)	Tiempo inicial	2 meses UFC mL ⁻¹	6 meses
Control	100.77 ± 5.99	3.7×10^{10} (± 0.20)	7.3×10^9 (± 0.18)	2.3×10^9 (± 0.36)
%Viabilidad			19.72%	6.21%
Escalonado	24.06 ± 5.49	8.3×10^{10} (± 0.05)	6.42×10^9 (± 0.215)	5.2×10^8 (± 0.17)
%Viabilidad			7.73%	6.26%
Lineal	25.57 ± 3.54	8.52×10^{11} (± 0.51)	3.2×10^{10} (± 0.10)	5.3×10^9 (± 0.55)
%Viabilidad			3.75%	0.62%
Exponencial	28.33 ± 0.70	3.9×10^{12} (± 1.55)	2.46×10^{10} (± 0.23)	3.05×10^9 (± 0.71)
%Viabilidad			0.63%	0.07%

9. CONCLUSIONES

1. Con el medio NFb modificado y gluconato de sodio (5 g L^{-1}) como fuente de carbono, se logró la mayor velocidad de crecimiento específica y la mayor producción de biomasa de *A. brasilense* en matraces con ambas cepas (Start y Calf), comparado con ácido málico, succínico y glicerol.
2. El crecimiento de las cepas Start y Calf de *A. brasilense* en columnas de burbujeo de 6 L se ve afectado al aumentar el flujo de aireación. La mayor concentración de biomasa en ambas cepas (Start y Calf) se obtuvo en los sistemas con 0.1 vvm.
3. La condición de aireación a 0.1 vvm en columnas de burbujeo permite el consumo de la forma D-malato en ambas cepas de *A. brasilense* (Start y Calf), lo cual no ocurre en las condiciones 0.5 y 1.0 vvm.
4. La acumulación de PHB en los cultivos en mezcla 1:1 (al inicio) de las cepas Start y Calf de *A. brasilense* es mayor a la presentada individualmente.
5. Los cultivos por lote alimentado en mezcla de las cepas Start y Calf de *A. brasilense* acumulan PHB de manera muy deficiente comparada con el control.
6. No se encontró una relación entre la cantidad de PHB acumulado y la vida de anaquel presentada en los cultivos de *A. brasilense* cepas Start y Calf.
7. El cultivo alimentado de forma exponencial permitió obtener la mayor cantidad de biomasa viable al final del cultivo comparada con los cultivos de perfiles de pulsos y lineal.
8. La vida de anaquel a los 6 meses es similar entre el cultivo control y los cultivos por lote alimentado.

10. PERSPECTIVAS

Para incrementar la concentración de PHB acumulada por las células de *A. brasilense*, se propone hacer cultivos alimentados con la fuente de carbono en donde se limite la fuente de fósforo y/o azufre.

Por otro lado, se propone evaluar mediante qPCR las proporciones de las cepas Start y Calf de *A. brasilense*, durante el cultivo.

11. REFERENCIAS

- Adesemoye, A.O. Kloepper, J.W. (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology Biotechnology* 85:1-12
- Ahemad, M, Kibiret, M. (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*. Vol 26, 1:1-20
- Albrecht, S.L., Okon, Y. (1980). Cultures of *Azospirillum*, *Methods of Enzymology* 69: 740-749.
- Alenkina, S.A., Bogatyrev, V.A., Matora, L.Y., Sokolova, M.K., Chernyshova, M.P., Trutneva, K.A., Nikitina, V.E. (2014) Signal effects of the lectin from the associative nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 in bacterial-plant root interactions. *Plant Soil* 381(1-2):337-349
- Arzac, J.F., Lamothe, C., Mulard, D, Fages, J. (1990) Growth enhancement of maize (*Zea mays* L) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plants genotype and bacterial concentration. *Agronomie* 10_649-654.
- Baldani, J.I., Baldani V.L.D., Seldin, L., Döbereiner, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36:86-93.
- Baldani, J.I., Krieg, N.R., Bldani, V.L.D., Hartmann, A., Döbereiner, J. (2005) Genus II. *Azospirillum*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. ed) pp:7-26. Springer-Verlag, NY.
- Barassi, C.A., Sueldo, R.J., Creus, C.M., Carrozzi, L.E., Casanovas, E.M., Pereyra, M.A (2007). *Azospirillum* spp., a dynamic soil bacterium favourable to vegetable crop production. *Dynamic Soil, Dynamic Plant* 1(2): 68-82.
- Bashan Y. (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances* 16:729-770
- Bashan, Y., Levanony, H. (1990) Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 36: 591-608
- Bashan, Y., Mitiku, G., Whitmoyer, R.E., Levanony, H. (1991). Evidence that fibrillar anchoring is essential for *Azospirillum brasilense* CD attachment to sand. *Plant and Soil*. 132:73-83.
- Bashan, Y., Puente, M.E., Rodríguez-Mendoza, M.N., Holguín, G., Toledo, G., Ferrera-Cerrato, R., Pedrín, S. (1995). Soil Parameters which affect the Survival of *Azospirillum brasilense* en

Azospirillum VI and Related Microorganisms Edited by Fendrik et al. NATO ASI Series G 37. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Bashan, Y., Holguin, G., Ferrera-Cerrato, R. (1996) Interacciones entre plantas y microorganismos beneficios I. *Azospirillum*. Terra, 14(2):159-194
- Bashan, Y., Holguin, G. (1997) *Azospirillum* plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Canadian Journal of Microbiology 43: 103-121.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E. (2002). Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. Tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Applied of Environmental Microbiology. 68:2637-2643.
- Bashan, Y., Holguin, G., de-Bashan L.E. (2004) *Azospirillum*-Plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Canadian Journal of Microbiology 50:521-577
- Bashan, Y. de-Bashan, L.E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth- a critical assessment. Advances in Agronomy 108:77-136.
- Bashan, Y. Trejo, A., de-Bashan, L.E. (2011) Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum spp.* and for production of inoculants to enhance plant growth. Biol Fertil Soils 47:963-969.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R (2013). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). Plant Soil (2014) 378:1-33
- Bashan, Y., de-Bashan (2015) Inoculant preparation and formulations for *Azospirillum spp.* En. Chapter 26- Handbook for *Azospirillum*. Cassán et al. (eds) Springer International Publishing Switzerland.
- Barassi, C.A., Sueldo, R.J., Creus, C.M., Carrozzi, L.E., Casanovas, E.M., Preyra, M.A. (2007). *Azospirillum spp.*, a dynamic soil bacterium favourable to vegetable crop production. Dynamic Soil, Dynamic Plant 1(2): 68-82.
- Burdman, S., Jurkevitch, E. Schwartsburd, B., Hampel, M, Okon, Y. (1998) Aggregation in *Azospirillum brasilense*: Effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. Microbiology, 144: 1989-1999

- Burdman, S. Jukervitch, E., Okon, Y (2000) Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. Crit Rev Microbiol 26: 91-110
- Caballero-Mellado, J., Lopez-Reyes, L., Bustillos-Cristales, R. (1999). Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiology Letters. 178:283-288.
- Caballero-Mellado, J. (2010). Microbios. Capítulo 10. El género *Azospirillum*. Biblioweb, UNAM.
- Cardoso-Diniz, S., Keico-Taciro, M., Cabrera- Gómez, J.G., da CruzPradella, J.G. (2004) High-Cell density cultivation of *Pseudomonas putida* IPT 046 and médium chain-length polyhydroxyalkanoate production from sugarcane carbohydrates. Applied Biochemistry and Biotechnology 119 (1): 51-69
- Carrasco-Espinosa, K., García-Cabrera, R.I., Bedoya-López, A., Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A. (2015) Positive effect of reduced aeration rate on growth and stereospecificity of DL-malic acid consumption by *Azospirillum brasilense*: Improving the shelf life of a liquid inoculant formulation. Journal of Biotechnology 195: 74-81
- Castellanos, T., Ascencio, F., Bashan, Y. (2000) Starvation-induced changes in the cell surface of *Azospirillum lipoferum*. FEMS Microbiology Ecology 33:1-9.
- Cholula, L.P. (2005). Estudio de la producción de poli-β-hidroxibutirato en *Azospirillum brasilense* Sp7. Tesis de Maestría en Biotecnología Genómica. IPN.
- Christiansen-Weniger, C., Van Veen, J.A. (1991) NH₄⁺- excreting *Azospirillum brasilense* mutants enhance the nitrogen supply of a wheat host. Applied and Environmental Microbiology. 57(10): 3006-3012.
- Das, A., Mishra, A.K. (1983) Utilization of fructose by *Azospirillum brasilense*. Canadian Journal of Microbiology, 29 (9): 1213-1217.
- Day, J.M., Döbereiner, J. (1976) Physiological aspects of N₂-fixation by *Spirillum* from *Digitaria* roots. Soil Biology and Biochemistry 8:45-50
- Del Gallo, M, Fendrik, I. (1994). The rhizosphere and *Azospirillum* en Okon, Y. (ed) *Azospirillum/Plant associations*. CRC Press. USA.
- Diaz-Zorita, M., Fernandez-Canigia, MV (2009). Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. Eur J Soil Biol 45:3-11

- Didonet, A.D., Magalhaes, A.C. (1997). Growth and nitrite production by *Azospirillum* strains subjected to different levels of dissolved oxygen in the medium. *Soil Biol Biochem*(Vol 29) 11/12:1743-1746.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzales, C., Caballero Mellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S., Okon, Y. (2001) Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Australian Journal of Plant Physiology* 28(9): 871-879.
- Döbereiner, J., Day, J.M. (1976). Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. En: Proceedings of the 1st International Symposium on N₂ Fixation. Newton, W.E., Nyman, C.J. eds Washington State University Press, Pullman.
- Dutta, S., Podile, A.R. (2010) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Critical Reviews in Microbiology* 36(3):232-244.
- Eckert, B., Weber, O., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., Hartmann, A. (2001) *Azospirillum dobereineriae* sp. Nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C₄-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:17-26
- Egli, T., Zinn, M. (2003) The concept of multiple-nutrient-limited growth of microorganisms and its application in biotechnological processes. *Biotechnology Advances* 22:35-43.
- Fages, J. (1992) An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. *Symbiosis* 13:15-26
- Fallik, E., Okon, Y. (1996) Inoculants of *Azospirillum brasilense*: Biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biol Biochem.*28(1):123-126.
- Fani, R.C., Bandi, C., Bazzicalupo, M., Ceccherini M.T., Fancelli, S., Gallori, E., Gerace, L., Grifoni, A., Miclaus, N., Damiani, G. (1995) Phylogeny of the genus *Azospirillum* based on 16srRNA sequence. *FEMS Microbiol. Lett*, 129:195-200.
- Fasciglione, G. Casanovas, E.M., Yommi, A., Suedo, R.J., Barassi, C.A. (2012). *Azospirillum* improves lettuce growth and transplant under saline conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92:2518-2523.
- Favilli, F., Balloni, W., Cappellini, A., Granchi, L. Savoini, G. (1987) Esperienze pluriennali di batterizzazione campo con *Azospirillum* spp. Di colture cerealicole. *Annals of Microbiology*. 37:169-181.

- FAO (1991) Report of expert consultation on legume inoculant production and quality control. FAO, Rome p.148
- Fibach-Paldi, S., Burdman, S., Okon, Y. (2012) Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiology letters 326: 99-108.
- Fuchs, C., Koster, D., Wiebusch, S. Mahr, K., Eisbrenner, G., Märkl, H. (2002) Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology 93: 243-251
- Fuentes-Ramírez, L.E., Caballero-Mellado J. (2005) Bacterial biofertilizers. En Siddiqui, Z.A. (ed) PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer, Dordrecht pp: 143-172.
- García, A., Segura, D., Espín, G, Galindo, E, Castillo, T., Peña, C. (2014) High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. Biochemical Engineering Journal 82:117-123.
- García-Cabrera, R.I., Hernández, F.N., De Leonardo, A., Morales, M., Trujillo-Roldán, M.A. (2012) Efecto del oxígeno disuelto y aireación en el crecimiento de una cepa de *Rhizobium etli* utilizada como biofertilizante. en XIV Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas. Universidad Autónoma Chapingo.
- García-Olivares, J.C., Moreno-Medina, V.R., Rodríguez-Luna, I.C., Mendoza-Herrera, A., Mayek-Pérez, N. (2006) Biofertilización con *Azospirillum brasilense* en sorgo, en el norte de México. Agricultura Técnica en México. 32 (2): 135-141
- Glick, B.R. (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological Research 169(1):30-39
- Grishanin, R.N., Chalmina, I.I., Zhulin, I.B. (1991) Behaviour of *Azospirillum brasilense* in a spatial gradient of oxygen and in a "redox" gradient of an artificial electron acceptor. Journal of General Microbiology, 137:2781-2785.
- Guerrero-Molina, M.F., Winik, B.C., Pedraza, R.O. (2012) More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. Applied Soil Ecology 61:247-254.
- Hartmann, A., Burris, R.H. (1987). Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. Journal of Bacteriology. 169:944-948.

- Hartman, A., Bashan Y (2009) Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB)-special issue. Eur J Soil Biol 45:1-2
- Hartmann, A., Baldani, J.I. (2006). The Genus *Azospirillum*. Prokaryotes 5:115-140.
- Heath, H.E., Gaudy, E.T. (1978) Relationship between catabolism of glycerol and metabolism of hexose-phosphate derivatives by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology. 136:638-646
- Helman, Y., Burdman, S., Okon, Y. (2011). Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms (ed. Rosenberg, E., Gophna, U. eds.)pp 89-103. Springer-Verlag, Berlin.
- Hon, K., Sun, S. Tian, W., Chen, G., Huang, W. (1999) A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by fourier transform infrared spectroscopy. Applied Microbial Biotechnology. 51: 523-526.
- Huisman, G.W., Wonink, E., de Koning, G., Preusting, H., Witholt, B. (1992) Synthesis of poly (3-hydroxyalkanoates) by mutant and recombinant *Pseudomonas* strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:1-5
- Itzingsohn, R., Yarden, O., Okon, Y. (1995). Polyhydroxyalkanoate analysis in *Azospirillum brasilense*. Canadian Journal of Microbiology 41:73-76
- Joe, M., Karthikeyan, M.B., Seka, C., Deiveekasundaram, M. (2010). Optimization of biofolc production in *Azospirillum brasilense* (MTCC-125) and evaluation of its adherence with the roots of certain crops. Indian Journal of Microbiology 50:21-25.
- Joe, M.M., Karthikeyan, B., Chauhan, P.S., Shagol, C., Islam, M.R., Deiveekasundaram, M., Sa, T. (2012). Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. European Journal of Soil Biology 50:198-206.
- Kadouri, D., Burdman, S. Jurkevitch, E. Okon, Y. (2002) Identification and Isolation of Genes Involved in Poly (β -Hydroxybutyrate) Biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phbC* mutant. Applied and Environmental Microbiology, 68 (6): 2943-2949.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y. (2003) Involvement of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. Applied and Environmental Microbiology. 69(6):3244-3250.

- Kadouri, D., Castro-Sowinski, S., Jurkevitch, E., Okon, Y. (2005) Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*. 31:55-67
- Kamnev, A.A., Sadovnikova, J.N., Tarantilis, P.A., Polissiou, M.G, Antonyuk, L.P. (2008) Responses of *Azospirillum brasilense* to Nitrogen Deficiency and to Wheat Lectin: A Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) Spectroscopic Study. *Microbial Ecology* 56: 616-624
- Kantarci, N., Borak, F., Ulgen, K.O. (2005) Bubble column reactors. *Process Biochemistry*. Vol 40 (7); 2263-2283.
- Kapulnik, Y., Sarig, S., Nur, I, Okon, Y. (1983) Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field-grown wheat. *Canadian Journal of Microbiology*. 29 (8):895-899
- Kapulnik, Y., Okon, Y., Henis, Y (1985) Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. *Canadian Journal of Microbiology* 31: 881-887.
- Keele, B.B., Jr., Hamilton, P.B., Elkan, G.H. (1970). Gluconate catabolism in *Rhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*. 101:638-646.
- Khammas, K., Ageron, E., Grimont, P., Kaiser, P. (1989) *Azospirillum irakense* sp. Nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology* 140: 679-693
- Khanna, S. Srivastava, A.K. (2006) Optimization of nutrient feed concentration and addition time for production of poly (β -hydroxybutyrate). *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 1145-1151.
- Khawas, H., Adachi, K. (1999) Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biol. Fertil. Soils*. 28 (4): 377-381.
- Knoll, A., Bartsch, S., Husemann, B., Engel, P., Schroer, K., Ribeiro, B. Stöckmann, C., Seletzky, J., Büchs, J. (2007) High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. *Journal of Biotechnology*. 132:167-179
- Kumaresan, G., Reetha, D. (2011) Survival of *Azospirillum brasilense* in liquid formulation amended with different chemical additives. *Journal of Phytology*, 3 (10): 48-51
- Korz, D.J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E.A., Deckwer, W.D. (1995) Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 39:59-65.

- Lavrinenko, k., Chernousova, e., Gridneva, E., Dubinina, G., Akimov, V., Kuever, J., Lysenko, A., Grabovich, M. (2010) *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
- Law, J.H., Slepecky, R.A. (1961) Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. Journal of Bacteriology. 82(1):33-36
- Lin, S.Y., Young, C.C., Hupfer, H., Siering, C., Arun, A.B., Chen, W.M., Lai, W.A., Shen, F.T., Rekha, P.D., Yassin, A.F. (2009) *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59:761-765.
- Lin, S.Y., Shen, F.T., Young, L.S., Zhu, Z.L., Chen, W.M., Young, C.C. (2012) *Azospirillum formosense* sp. Nov., a diazotroph from agricultural soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62:1185-1190
- Lin, S.Y., Liu, Y.C., Hameed, A., Hsu, Y.H., Lai, W.A., Shen, F.T., Young, C.C. (2013) *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63:3762-3768
- Magalhães, F., Baldani, J., Souto, S et al (1983) A new acid tolerant *Azospirillum* species. Anais Da Academia Brasileira de Ciencias 55:417-430
- Manna, A. Pal, S., Paul, A.K. (1997) Ocurrance of Poly-3-hydroxybutyrate in *Azospirillum* sp. Folia Microbiol. 42(6):629-634.
- Martin-Didonet, C.C.G., Chubatsu, L.S., Souza, E.M., Kleina, M., Rego, F.G.M., Rigo, L.U., Yates, M.G., Pedrosa, F.O (2000) Genome Structure of the Genus *Azospirillum*. Journal of Bacteriology 182(14):4113-4116
- Martínez-Drets, G., del Gallo, M., Burpee, C., Burris, R.H. (1984) Catabolism of carbohydrates and organic acids and expression of nitrogenase by *Azospirilla*. Journal of Bacteriology, July:80-85
- Martínez-Morales, L.J., Soto-Urzúa, L., Baca, B. E., Sánchez, J.A. (2003). Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett. 228 (2):167-173.
- Martínez-Morales, L.J., Soto-Urzúa, L, Martínez-Martínez, M.A., Rosas-Olvera, M. (2014) *Azospirillum brasilense* mutant affected in motility, nitrogen fixation, flocculation and exopolysaccharide (EPS) production. Pinnacle Biological Sciences. ISSN:2360-9478.

- McCool, G.J., Cannon, M.C. (1999) Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* 181(2): 585-592
- Mehnaz, S (2015) *Azospirillum*: a biofertilizer for every crop (En Arora, N.K. ed) *Plant microbes symbiosis: Applied Facets*. Springer
- Miché, L., Bouillant, M.L., Rohr, R., Sallé, G., Bally, R. (2000). Physiological and cytological studies on the inhibition of *Striga* seed germination by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *European Journal of Plant Pathology* 106:447-351.
- Michiels, K.W., Croess, C.L., Vanderleyden, J. (1991). Two different modes of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *Journal of General Microbiology*, 137:2241
- Morandini, P., Vignola, R., Vittorioso, P. (1990) Efficiency of *Azospirillum* inocula in peat formulations: Maize (*Zea mays*) root colonization and effects on initial plant growth. *Plant Nutrition-Physiology and Applications* Vol. 41 pp:127-131.
- Murray Tortarolo, G., Murray Prisant, G. 2013. ¿Cómo ves?) 170:30-33.
- Mutturi, S., Sahai, V., Sharma, S., Bisaria, V.S. (2016) Strategies for high-density cultivation of bio-inoculants in submerged culture with special reference to Pseudomonads. En *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Sigh D.P *et al.* (ed) Springer, India.
- Neidhardt, F.C., Bloch, P.L., Smith, D.F. (1974) Culture medium for enterobacteria. *Journal of Bacteriology* 119: 736– 747
- Nobbe, F., Hiltner, L. (1896). US Patent 570 813. Inoculation of the soil for cultivating leguminous plants.
- Nur, I., Okon, Y., Henis, Y. (1982) Effect of dissolved oxygen tension on production of carotenoids, poly- β -hydroxybutyrate, succinate oxidase and superoxide dismutase by *Azospirillum brasilense* Cd grown in continuous culture. *J. Gen Microbiol.* 128:2937-2943.
- Okon, Y., Albrecht, S.L., Burris, R.H. (1976). Factors Affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*, 127:1248-1254.
- Okon, Y., Albrecht, S.L., Burris, R.H. (1977) Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Applied of Environmental Microbiology* 33:85-88
- Okon, Y. (1985) *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends in Biotechnology* 3: 223-228.

- Okon, Y., Bar, T., Tal, S., Zaddy, E. (1991) Physiological properties of *Azospirillum brasilense* involved in root growth promotion. En. Nitrogen Fixation. Polsinelli, M., Naterassi, R., Vincenzini, M. (eds) pp:113-125. Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA.
- Okon, Y., Itzigsohn, R. (1995) The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. Biotechnology Advances, Vol. 13(3):415-424.
- Okon, Y. (2005) PGPR-technology cases of application and future prospects. En Rhizosphere 2004- Perspectives and Challenges. A Tribute to Lorenz Hiltner. Hartmann, A., Schmid, M., Wenzel, W., Hisinger, Ph. (eds) GSF, Neuherberg 273-274.
- Ona, O., Van Impe, J., Prinsen, E., Vanderleyden, J. (2005) Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* SP245 is environmentally controlled. FEMS Microbiology Letters 246:125-132.
- Page, W.J. Knosp, O. (1989) Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. Applied and Environmental Microbiology. 55:1334-1339.
- Paul, E., Mulard, D. Blanc, P., Fages, J., Goma, G., Pareilleux, A. (1990). Effects of partial O₂ pressure, partial CO₂ pressure, and agitation on growth kinetics of *Azospirillum lipoferum* under fermentor conditions. Applied and Environmental Microbiology, 56(11): 3235-3239.
- Peng, G. Wang, H., Zhang, G., Hou, W., Liu, Y, Wang, E.T., Tan Z. (2006) *Azospirillum melinis* sp. Nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology
- Perez-Montano, F., Alias-Villegas, C., Bellogin, R.A., del Cerro, O., Espuny, M.R., Jimenez-Guerrero, I., Lopez-Baena, F.J., Ollero, F.J., Cubo, T (2014) Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. Microbiological Research 169(5-6): 325-336.
- Perrig, D., Boiero, M.L., Masciarelli, O.A., Penna, C., Ruiz, O.A., Cassan, F.D., Luna, M.V. (2007) Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense* and implications for inoculants formulation. Applied of Microbiology Biotechnology 75:1143-1150.
- Reddy, P.P (2013) Plant growth promoting rhizobacteria. En: Recent advances in crop protection. Pp 131-158.

- Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Pot, B., Gillis, M., Kersters, K., Thielemans, S., De Ley, J. (1987) *Azospirillum halopraeferens* sp. Nov., a nitrogen- fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). International Journal of Systematic Bacteriology 37:43-51
- Reis, V.M., Baldani, V.L.D, Baldani, J.I. (2015) Isolation, identification and biochemical characterization of *Azospirillum* spp. and other nitrogen-fixing bacteria. en Cassán *et al.* (eds) Handbook for *Azospirillum*. Springer International Publishing Switzerland 2015.
- Rewald, B., Godbold, D.L., Falik, O., Rachmilevitch, S. (2014) Root and rhizosphere processes-high time to dig deeper. Frontier in Plant Science. Vol 5. Article 278.
- Riesenber, D., Schulz V., Knorre W.A., Pohl H.D., Korz D., Sanders E.A., Rob A., Deckwer W.D. (1991) High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. Journal of Biotechnology. 20:17-28
- Riesenber, D., Guthke, R. (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms. Applied Microbiology Biotechnology. 5(4):422-430
- Rockström, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, A., Stuart Chapin, F., III, Lambin, E.F. (2009) A safe operating space for humanity. Nature, 461: 472-75
- Rodrigues, C.A., Bonifacio, A, de Araujo, F.F., Junior, M.A.L., do Vale Barreto Figueiredo, M. (2015) *Azospirillum* sp. as a challenge for agriculture (en Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem, Sustainable Development and Biodiversity). Springer International Publishing Switzerland.
- Rodríguez, H., Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances, 17:319-339.
- Ruiz, J.A., Lopez, N.I., Fernandes, r., Mendez, b. (2001) Polyhydroxy-alkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhanced stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. Applied and Environmental Microbiology, 67:225-230.
- Sadasivan, L. Neyra C.A. (1985) Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. Journal of Bacteriology, 163(2):716
- Sadasivan, L., Neyra, C.A. (1987) Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. Journal of Bacteriology. 169(4):1670-1677.

- Schulz, T.J., Thelen K.D. (2008) Soybean seed inoculant and fungicidal seed treatment effects on soybean. *Crop Science* 48:1975-1983
- Segura, D., Cruz, T., Espín, G. (2003) Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. *Archives of Microbiology* 179:437-443.
- Shiloach, J., Bauer S. (1975) High yield growth of *E. coli* at different temperatures in a bench scale fermentor. *Biotechnol Bioeng* 17: 227– 239.
- Shiloach, J., Fass, R. (2005) Growing *E. coli* to high cell density- A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances* 23:345-357
- Shioi, J. Dang, V., Taylor, B.I. (1987) Oxygen as attractant and repellent in bacterial chemotaxis. *Journal of Bacteriology* 169:3118-3123.
- Shiraki, M., Endo, T., Saito, T. (2006) Fermentative production of (R)-(-)-3-hydroxybutyrate using 3-hydroxybutyrate dehydrogenase null mutant of *Ralstonia eutropha* and recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 102:529-534
- Singleton, P., Keyser, H., Sande, E. (2002) Development and evaluation of liquid inoculants. En Herridge (ed) *Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam*. ACIAR proceedings 109e: 52-66
- Sivasakthivelan, P., Saranraj, P. (2013). *Azospirillum* and its formulations: A review. *International Journal of Microbiological Research* 4(3):275-287.
- Smith, R.S. (1992). Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology* 38:485-492
- Somasegaran, P. Hoben, J.H. (1994) *Handbook for rhizobia methods in legume-rhizobium technology*. Springer-Verlag, NY.
- Sun, J., Peng, X., Van-Impe, J., Vanderleyden, J. (2000) The *ntrB* and *ntrC* genes are involved in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Applied and Environmental Microbiology*.66(1):113-117
- Suyal, D.C., Soni, R., Sai, S., Goel, R. (2016) *Microbial Inoculants as Biofertilizer*. En: *Microbial Inoculants in Sustainable Productivity*. Singh et al. (eds). Springer, India.
- Tal, S., Okon, Y. (1985) Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Microbiology*. 31, 608-613.

- Tarrand, J.J., Krieg, N.R., Döbereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen.nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Canadian Journal of Microbiology.24:967-980.
- Tilman, D. (1998) The greening of the green revolution. Nature 396:211-212.
- Trujillo-Roldán, M.A., Valdéz-Cruz, N.A., Gonzalez-Monterrubio, C., Acevedo-Sanchez, E.V., Martínez-Salinas, C., García-Cabrera R.I., Gamboa-Suasnavart, R.A., Marín-Palacio, L.D., Villegas, J., Blancas-Cabrera, A. (2013) From shake flasks to pilot-scale production of the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for a liquid inoculant formulation. Applied Microbiology and Biotechnology, 97: 9665-9674
- Van de Broek, A., Lambrecht, M., Eggermont, K., Vanderleyden, L.J. (1999) Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. Journal of Bacteriology. 181(4):1338-1342.
- Vanbleu, E., Marchal, K., Lambrecht, M., Mathys, J., Vanderleyden, J. (2004) Annotation of the pRhico plasmid of *Azospirillum brasilense* reveals its role in determining the outer surface composition. FEMS Microbiology Letters 232:165-172
- Vendan, R.T., Thangaraju, M. (2007). Development and standardization of cyst based liquid formulation of *Azospirillum* bioinoculant. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 54(2): 167-177.
- Vivienne, N., Matiru, F.D., Dakora, S. (2004). Potential use of rhizobial bacterial as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. African Journal of Biotechnology 3(1): 1-7.
- Wisniewski-Dyé, F., Borziak, K, Khalsa-Moyers, G., Alexandre, G., Sukharnicov, L.O., Wuichet, K., Hurst, G.B., McDonald, WH., Robertson, J.S., Barbe, V., Calteau, A., Rouy, Z., Mangenot, S., Prigent-Combaret, C., Normand, P., Boyer, M., Siguier, P., Dessaux, Y., Elmerich, C., Condemine, G., Krishnen, G., Kennedy, I., Paterson, A.H., González, V., Mavingui, P.m Zhulin, I.B. (2011). *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. PLoS Genetics, Vol 7(12): e1002430

- Wang, F. Lee, S.Y. (1997). Poly(3-hydroxybutyrate) production with high polymer content by fedbatch culture of *Alicagenes latus* under nitrogen limitation. Applied and Environmental Microbiology 63:3703-3706.
- Watanabe, I, Lin, C. (1984) Response of wetland rice to inoculation with *Azospirillum lipoferum* and *Pseudomonas* sp. Soil Science & Plant Nutrition 30:117.124
- Westby, C.A., Cutshall, D.S., Vigil, G.V. (1983) Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. Journal of Bacteriology 156(3): 1369-1372.
- Xie, C., Yokota, A. (2005) *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55:1435-1438
- Yasuda, M., Isawa, T., Shinozaki, S., Minamisawa, K., Nakasita, H. 2009. Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 73:2595-2599.
- Yu, J., Plackett, D., Chen, L.X.L. (2005) Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly [(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions.. Polymer Degradation and Stability 89: 289-299.
- Young, J.P.W. (1992) Phylogentic classification of nitrogen-fixing organisms en Stacey, G., Burris, R.H., Evans H.J. (ED). Biological Nitrogen fixation. Chapman & Hall, NY.
- Young, C.C., Hupfer, H., Siering, C., Ho, M.J., Arun, A.B., Lai, W.A., Rekha, P.D., Shen, F.T., Hung, M.H., Chen, W.M., Yassin, A.F. (2008) *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58:959-963
- Zhou, Y., Wei, W., Wnag, X. (2009) *Azospirillum palatum* sp. nov. isolated from forest soil in Zhejiang province, China. Journal of General and Applied Microbiology 55:1-7.
- Zhou, S., Hang, L., Wang, Y., Yang, G., Zhuang, L., Hu, P. (2013) *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63:2618-2624
- Zhulin, I.B., Armitage, J.P. (1993) Motility, chemokinesis, and methylation independent chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. Journal of Bacteriology 175(4): 952-958.
- Zhulin, I., Bespalov, Y.A., Johnson, M.S., Taylor, B.L. (1996) Oxygen taxis and proton motive force in *Azospirillum brasilense*. Journal of Bacteriology. 178 (17): 5199-5204

12. Anexos

Anexo 1

A continuación se muestra el espectro infrarrojo obtenido del reactivo PHB de Sigma con 98% pureza, en donde se observan las bandas características de este compuesto a 1728 cm⁻¹ (C=O) y 2928 cm⁻¹ (C-H) [Hon, et al., 1999].

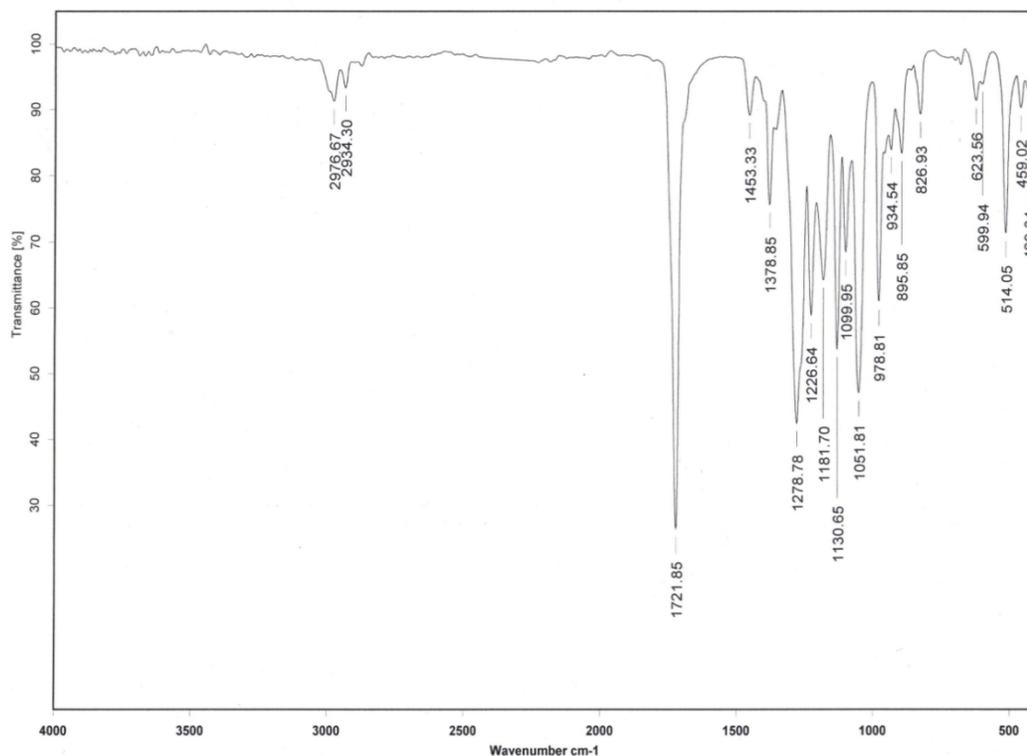


Figura 12.1 Espectro infrarrojo PHB comercial donde se muestran los picos característicos a 1728 y 2928 cm⁻¹

Debido a las dificultades para obtener la curva estándar de PHB, se utilizó una metodología modificada de Law y Slepecky [Cholula, 2005]. En el cual se obtuvo una pastilla blanca que se envió a infrarrojo para su caracterización la cual se muestra en la Figura 12.1.

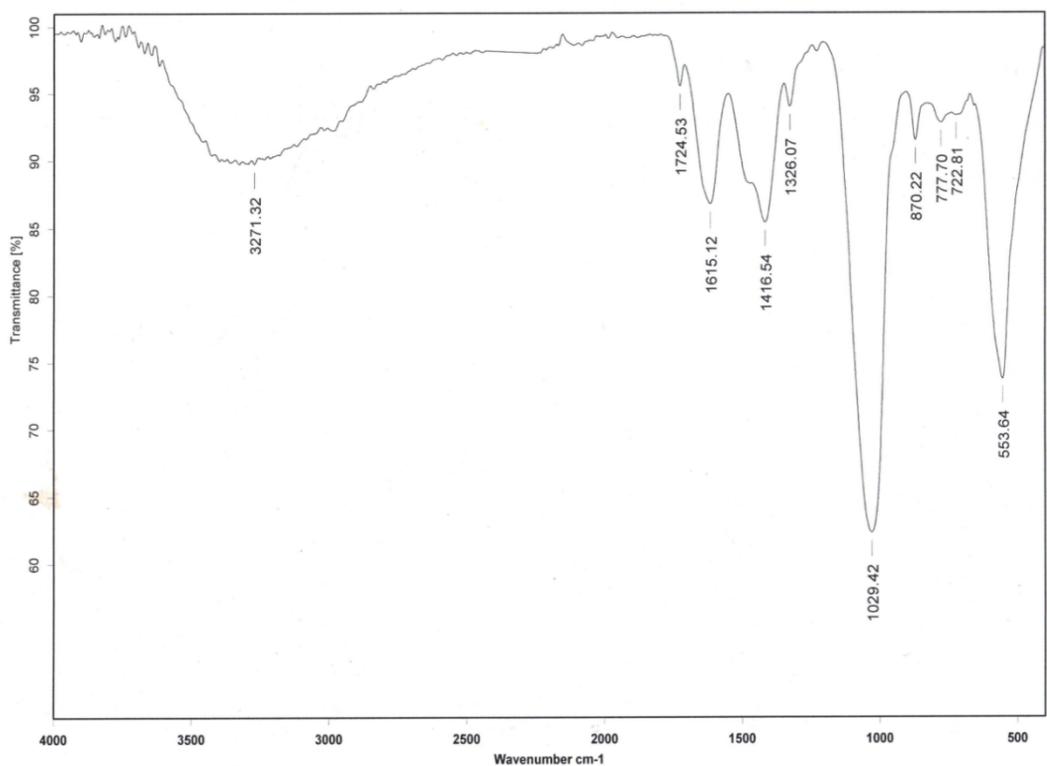
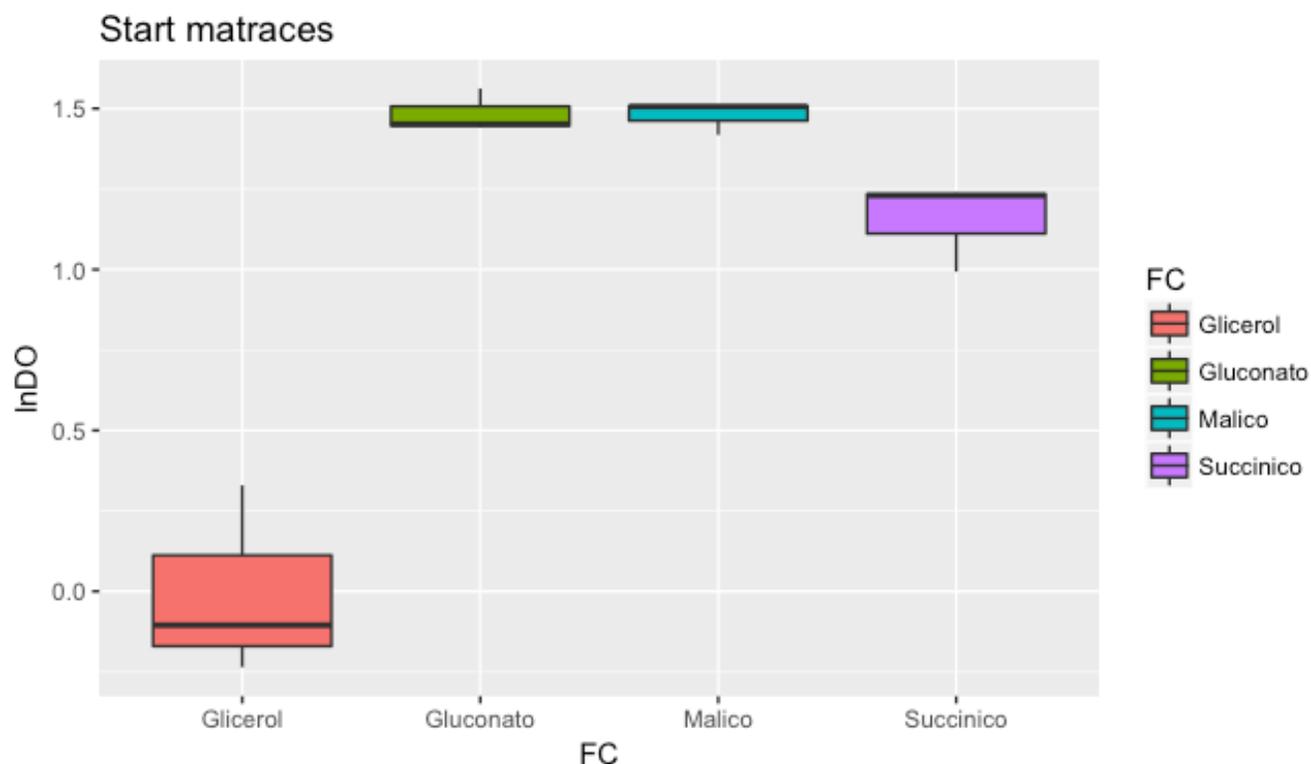


Figura 12.2 Infrarrojo de PHB obtenido en laboratorio.

En esta figura se observa el pico cercano a 1728 reportado para PHB, sin embargo el de 2928 cm-1 se encuentra opacado por contaminación por grupos alcoholes característicos.

Anexo 2

Los análisis estadísticos se realizaron con el software libre R, con las funciones aov (ANOVA) y tukeyHSD (Prueba poshoc Tukey)



ANOVA

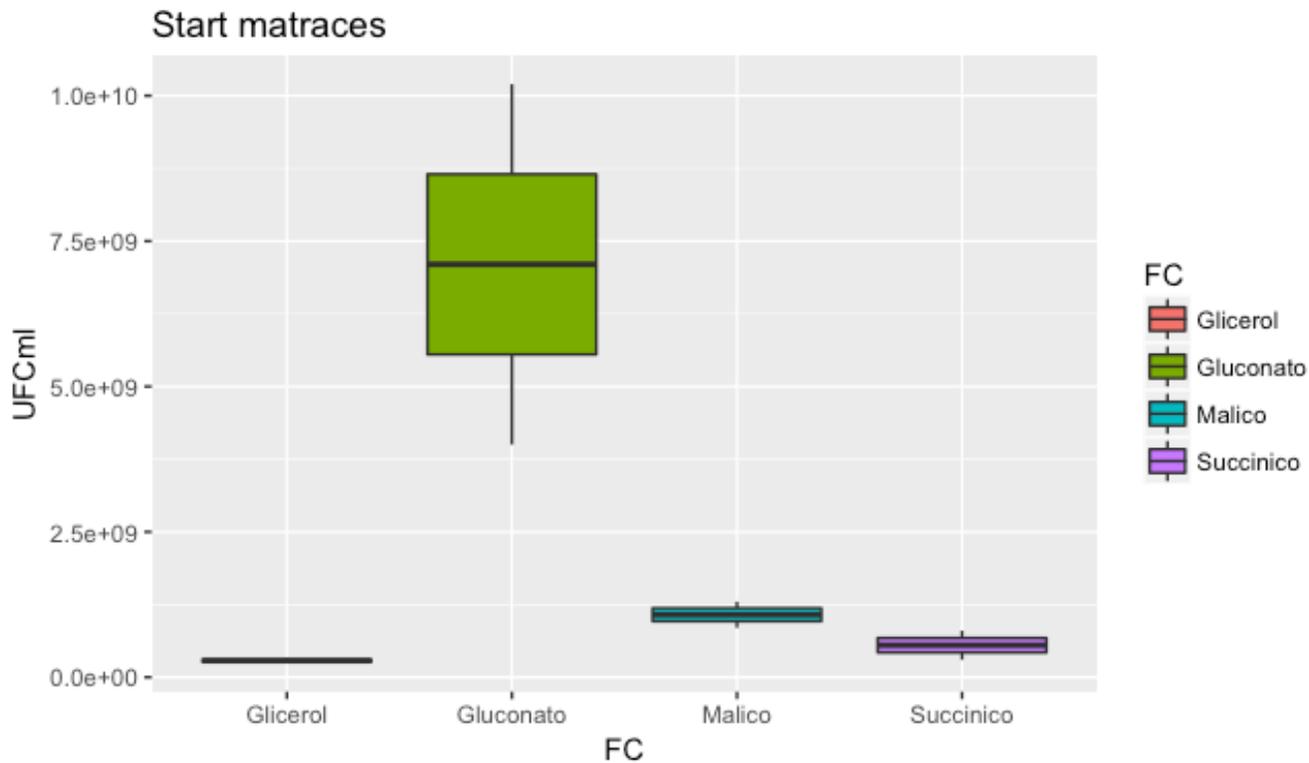
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Carbono	3	4.476	1.4921	52.36	1.33e-05 ***
Residuals	8	0.228	0.0285		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

TUKEYHSD (posthoc)

Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level

	diff	lwr	Upr	p adj
Gluconato-Glicerol	1.489313743	1.0479315	1.9306960	0.0000222
Malico-Glicerol	1.481621886	1.0402397	1.9230041	0.0000231
Succinico-Glicerol	1.157681886	0.7162997	1.5990641	0.0001419
Malico-Gluconato	-0.007691857	-0.4490741	0.4336904	0.9999320
Succinico-Gluconato	-0.331631857	-0.7730141	0.1097504	0.1531048
Succinico-Malico	-0.323940000	-0.7653222	0.1174422	0.1653265



ANOVA

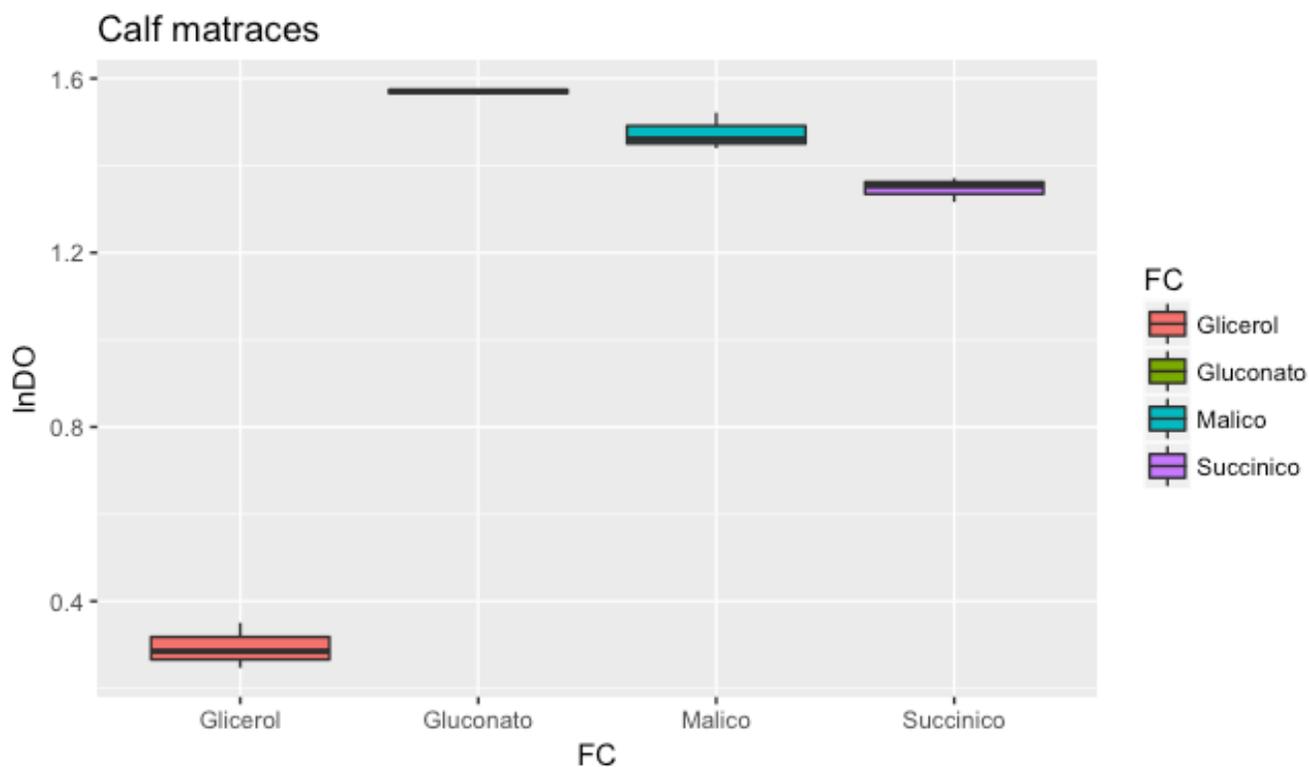
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Carbono	3	9.496e+19	3.165e+19	13.02	0.00191 **
Residuals	8	1.945e+19	2.431e+18		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

TUKEYHSD (posthoc)

Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level

	diff	lwr	Upr	p adj
Gluconato-Glicerol	6.815e+09	2738159376	10891840624	0.0030304
Malico-Glicerol	7.900e+08	-3286840624	4866840624	0.9226331
Succinico-Glicerol	2.650e+08	-3811840624	4341840624	0.9965451
Malico-Gluconato	-6.025e+09	-10101840624	-1948159376	0.0064355
Succinico-Gluconato	-6.550e+09	-10626840624	-2473159376	0.0038803
Succinico-Malico	5.250e+08	-4601840624	3551840624	0.9747964



ANOVA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Carbono	3	3.1523	1.0508	779.1	3.33e-10 ***
Residuals	8	0.0108	0.0013		

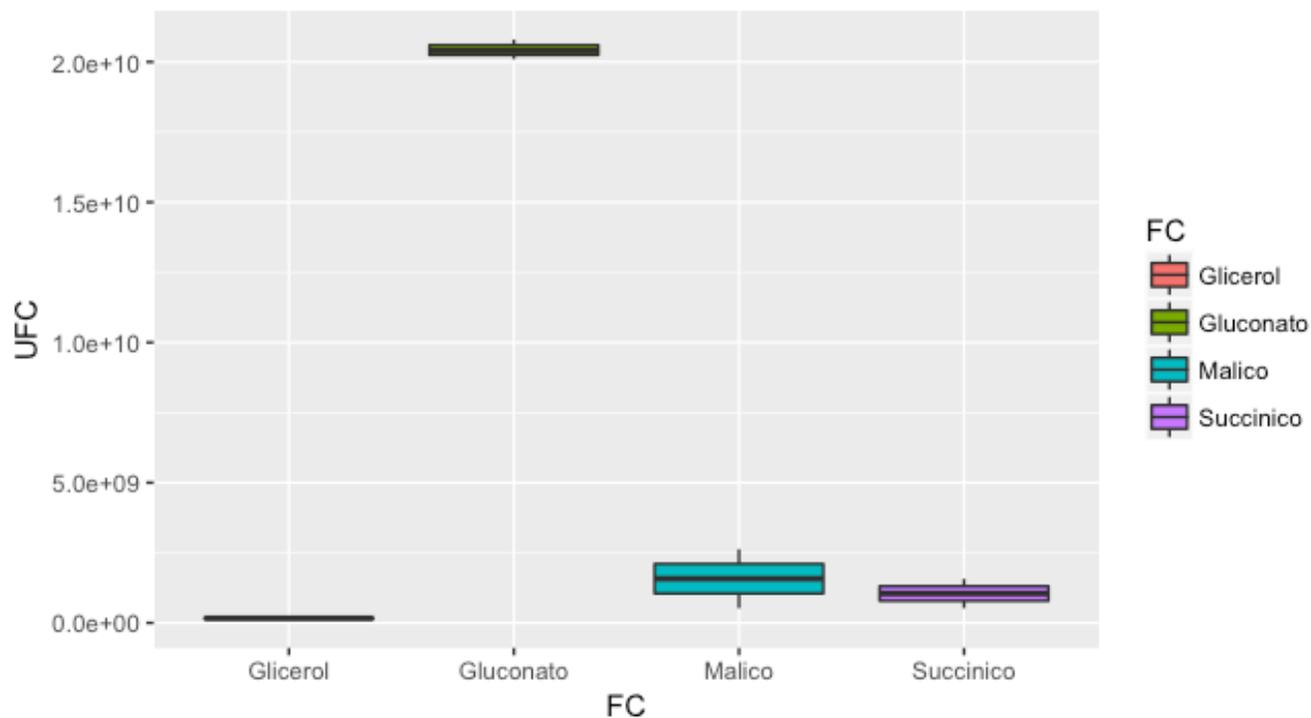
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

TUKEYHSD (posthoc)

Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level

	diff	lwr	Upr	p adj
Gluconato-Glicerol	1.27575407	1.1797309	1.3717772617	<0.001 ***
Malico-Glicerol	1.17992538	1.0839022	1.2759485684	<0.001 ***
Succinico-Glicerol	1.05271586	0.9566927	1.1487390464	<0.001 ***
Malico-Gluconato	-0.09582869	-0.1918519	0.0001944957	0.0504584
Succinico-Gluconato	-0.22303822	-0.3190614	-0.1270150263	0.0003368***
Succinico-Malico	-0.12720952	-0.2232327	-0.0311863329	0.0120722*

Calf matraces



ANOVA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Carbono	3	8.590e+20	2.863e+20	759.9	3.67e-10 ***
Residuals	8	3.015e+18	3.768e+17		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

TUKEYHSD (posthoc)

Tukey multiple comparisons of means 95% family-wise confidence level

	diff	lwr	Upr	p adj
Gluconato-Glicerol	20270508747	18665460018	21875557475	<0.001 ***
Malico-Glicerol	1413804922	-191243806	3018853651	0.0856777
Succinico-Glicerol	883804922	-721243806	2488853651	0.3551552
Malico-Gluconato	-18856703824	-20461752553	-17251655096	<0.001 ***
Succinico-Gluconato	-19386703824	-20991752553	-17781655096	<0.001 ***
Succinico-Malico	-530000000	-2135048729	1075048729	0.7228504



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Biotechnology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbiotec

Positive effect of reduced aeration rate on growth and stereospecificity of DL-malic acid consumption by *Azospirillum brasilense*: Improving the shelf life of a liquid inoculant formulation



Karen Carrasco-Espinosa, Ramsés I. García-Cabrera, Andrea Bedoya-López, Mauricio A. Trujillo-Roldán, Norma A. Valdez-Cruz*

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, México, D.F. CP 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2014
Received in revised form
17 December 2014
Accepted 20 December 2014
Available online 30 December 2014

Keywords:

Malic acid
Oxygen mass transfer
Azospirillum brasilense
Rhizosphere
Pneumatic bioreactors

ABSTRACT

Azospirillum brasilense has significance as a growth promoter in plants of commercial interest. Two industrial native strains (*Start* and *Calf*), used as a part of an inoculant formulation in Mexico during the last 15 years, were incubated in laboratory-scale pneumatic bioreactors at different aeration rates. In both strains, the positive effect of decreased aeration was observed. At the lowest (0.1 vvm, air volume/liquid volume \times minute), the highest biomass were obtained for *Calf* (7.8×10^{10} CFU/ml), and *Start* (2.9×10^9 CFU/ml). These were higher in one magnitude order compared to cultures carried out at 0.5 vvm, and two compared to those at 1.0 vvm. At lower aeration, both stereoisomeric forms of malic acid were consumed, but at higher aeration, just L-malate was consumed. A reduction in aeration allows an increase of the shelf life and the microorganism saved higher concentrations of polyhydroxybutyrate. The selected fermentation conditions are closely related to those prevalent in large-scale bioreactors and offer the possibility of achieving high biomass titles with high shelf life at a reduced costs, due to the complete use of a carbon source at low aeration of a low cost raw material as DL-malic acid mixture in comparison with the L-malic acid stereoisomer.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Among the plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), *Azospirillum brasilense* is one of the most used and studied for its ability to increase crops yield, attributed mainly to an enhancement in root development by the uptake of water and minerals (Fibach-Paldi et al., 2012). This is because *A. brasilense* has the ability to produce key signals and components of plant growth promotion in association with several plants, including wheat, sorghum, barley, rice and maize (Fibach-Paldi et al., 2012; Okon and Itzigsohn, 1995).

A large number of literature has been published on the mechanisms of action and benefits of the consortium plant-microorganism (Bashan and de-Bashan, 2005; Fibach-Paldi et al., 2012). Furthermore, the effect of submerged culture nutrients on *A. brasilense* growth has been studied with the aim of increasing bacterial productivity (Albrecht and Okon, 1980; Bashan et al.,

2011; Fallik and Okon, 1996; Joe et al., 2010; Kefalogianni and Aggelis, 2002). Malic acid is one of the most common nutrients for *A. brasilense*. An important field of study with significant industrial implications can be the understanding of how operating conditions can modify biomass yields on cultures, based on the consumption of malic acid as a carbon source. This is because there is a misunderstanding in the literature about the consumption of both stereoisomers D- and L-malic acid. Even more, the highest biomass yields achieved using the mixture of these stereoisomers has been reported in comparison with other carbon sources, without specifying whether both were consumed by the microorganism (Kamnev et al., 2012; Konnova et al., 2003; Rodelas et al., 1994; Westby et al., 1983). However, Fallik and Okon (1996) reported that *A. brasilense* is not able to use the D-stereoisomer. Certainly, as a consequence of this, L-malic acid is commonly used as a carbon source (Cappuyens et al., 2007; Ona et al., 2005), supported by the fact that roots selectively secrete the L-stereoisomer, which is used by plants as a signal to recruit beneficial rhizobacteria (Rudrappa et al., 2008; Westby et al., 1983). Nevertheless, D-malic consumption was previously reported in wild-type strain Sp7 and also in mutant defective to produce polyhydroxybutyrate (PHB) (Kadouri et al., 2003).

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56229192; fax: +52 55 56223369.
E-mail addresses: adri@biomedicas.unam.mx, adrivaldez1@gmail.com (N.A. Valdez-Cruz).

In addition, the effect of oxygen in the metabolism and growth of *A. brasilense* has been studied. For example, low levels of oxygen can be determinant factor in regulating bacterial growth rate and production of nitrites (Didonet and Magalhaes, 1997), and in the production of indole-3-acetic acid, a well-known auxin (Ona et al., 2005). Furthermore, high oxygen levels are highly related to floc formation by *A. brasilense* (Joe et al., 2010), and to the inhibition of nitrogenase activity (Fadel-Picheth et al., 1999; Hartmann and Burris, 1987). On the other hand, in order to obtain large amounts of inoculants based on *A. brasilense*, some culture strategies have been proposed, such as fed-batch cultures (Fallik and Okon, 1996) or scale-up strategies using the volumetric oxygen transfer coefficient ($K_{L,a}$) (Trujillo-Roldán et al., 2013). The use of low $K_{L,a}$ values to successful scale-up this bioprocess supports the idea of the sensitivity to oxygen by *A. brasilense* in submerged cultures (Didonet and Magalhaes, 1997; Ona et al., 2005). Here, we evaluate the effect of three different aeration conditions on *A. brasilense* kinetics of growth of two native Mexican strains, named *Start* and *Calf*, used as a part of an inoculant formulation in México during the last 15 years, with an application between 50×10^3 and 200×10^3 hectares per year. Moreover, we evaluated the effect of the aeration on D- and L-malate consumption as carbon source, PHB production, following culture variables such as pH and dissolved oxygen tension, and one year shelf life of a liquid inoculant formulation based on *A. brasilense* from bubble column submerged cultures.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms and culture conditions

Two native Mexican strains of *A. brasilense*, named *Start* and *Calf*, from the company Biofabrica Siglo XXI S.A. de C.V. culture collection were used (Trujillo-Roldán et al., 2013). An additional cell bank is in the Bioprocess Unit at the Biomedical Research Institute at UNAM. These strains were firstly isolated by Professor Jesus Caballero-Mellado Ph.D. (CCG-UNAM, Mexico). The difference between both strains is the ability to adapt to different types of soils with in Mexico (Trujillo-Roldán et al., 2013). Pre-cultures were performed in 500-ml Erlenmeyer flasks (Pyrex, México) at 30 °C, 150 rpm, containing 100 ml of modified NFb, which contains (g/l): 5.0 DL-malic acid, 0.5 K₂HPO₄, 0.2 MgSO₄·7H₂O, 0.1 NaCl, 0.02 CaCl₂, 0.012 FeSO₄, 0.0025 Na₂MoO₄, 0.01 MnSO₄, 4.8 KOH, 0.3 NH₄Cl, 0.01 H₃BO₃ and 0.3 of yeast extract.

2.2. Analytical determinations

Bacterial growth was determined by three methods: optical density at 600 nm (Beckman DU730 spectrophotometer, IN USA), dry weight, and colony forming units (CFU/ml). CFU/ml were determined by 1:10 serial dilutions with NaCl 0.85%, cultured in solid NFb medium with Congo red at 30 ± 2 °C for 48 h. Solid NFb-Congo red medium contains (g/l): 5.0 DL-malic acid; 0.5 K₂HPO₄, 0.2 MgSO₄·7H₂O, 0.1 NaCl, 0.015 FeCl₃, 0.3 of yeast extract, and 16.0 of bacteriological agar. Final CFU/ml was determined by multiplying the number of colonies in the Petri dish by the dilution factor. CFU/ml was also used for monitoring the shelf-life of the liquid pre-formulated bacterial cultures at room temperature (22–26 °C). The shelf formulation is a proprietary formulation of Biofabrica Siglo XXI S.A. de C.V., and trials were made at 4 and 12 months by triplicate.

Carbon source consumption was performed using an enzymatic kit for D-malate (Catalog 11215558035, R-Biopharm, Roche, Darmstadt, Germany) and L-malate (Catalog 10139068035, R-Biopharm, Roche, Darmstadt, Germany). In summary, D-malate is oxidized to oxaloacetate by nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) in the

presence of D-malate dehydrogenase. Oxaloacetate is converted by the same enzyme to pyruvate and CO₂. Wherein the amount of NADH formed was stoichiometrically equal to the amount of D-malate. On the other hand, L-malate is oxidized to oxaloacetate by NAD in the presence of L-malate dehydrogenase. In order to remove all oxaloacetate, a second reaction takes place catalyzed by the glutamate-oxaloacetate transaminase, converting all oxaloacetate to L-aspartate in the presence of L-glutamate. Finally, the amount of NADH formed was stoichiometrically equal to L-malate. In both cases, NADH was measured at 334, 340, and 365 nm (Sheng et al., 2010).

Polyhydroxybutyrate (PHB) was quantified by using the method reported by Law and Slepecky (1961), but with some modifications. Briefly, vacuum dried cells (from 1.0 ml of culture medium) were incubated for 1 h at 30 °C with 1.0 ml of sodium hypochlorite (6%, v/v). After centrifugation (11,000 × g, 15 min), the hypochlorite was removed, and the centrifuged material was washed with 1.0 ml of distilled water. After washing, 1.0 ml of cold acetone was added, centrifuged again (11,000 × g, 15 min) and finally, suspended in 300 μl of ethanol. For PHB hydrolysis to crotonic acid, ethanol was evaporated by heating the sample at 70 °C. Five milliliters of concentrated H₂SO₄ were added and the covered tubes were kept in an oven for 4 h at 70 °C. Cooled samples were measured at 235 nm using H₂SO₄ as blank. The standard linear relation was PHB (mg/l) = 0.1606 × Abs (235 nm), quantified by using crotonic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). It has been reported that the method used in this work showed a strong correlation when compared with a gas chromatography based quantification method (Hohenschuh et al., 2012).

2.3. Culture conditions in pneumatic bioreactors, data acquisition and control

A. brasilense Start and *Calf* strains were grown in individual 500-ml Erlenmeyer shake flasks (Pyrex, México) containing 100 ml of modified NFb culture media at 30 °C, and 220 rpm (C251, New Brunswick-Eppendorf Co., USA). Cultures were carried out in homemade bubble columns with a nominal volume of 6 liters, and working volume of 5 liters (diameter height ratio of 5:1). Aeration rates of 0.1, 0.5, and 1.0 volume of air per medium volume (vvm) were evaluated for both *A. brasilense* strains using also the modified NFb culture media. This bubble columns were designed to have enough ports for pH and dissolved oxygen tension (DOT) electrodes, as well as inoculation and venting. Air was filtered through a 0.45 μm filter (Millex, Merck-Millipore, USA) before entering the column and bubbled through a sintered glass diffuser. The only controlled parameter was the temperature (30 °C). DOT, temperature and pH were displayed online and stored in a hard drive for further analysis using a homemade data acquisition control system based on LabView™ (Trujillo-Roldán et al., 2001), and in ADI 1010/1030 Applikon™ data acquisition control system. Off-line optical density 600 nm (Beckman DU730 spectrophotometer, IN USA) was followed every 4 h during cultures.

2.4. Primers design, RNA extraction, cDNA synthesis, quantitative RT-PCR and data analysis

Reference genes (*gyrA* and *glyA*) were selected from genes previously used in quantitative RT-PCR assays for *A. brasilense* (McMillan and Pereg, 2014) (Table 1). NCBI's primers blast was used to design the others primers in Table 1 (Ye et al., 2012). Primer efficiencies were determined by construction of a standard curve using 4-fold serial dilutions of pooled cDNA template (Table 1).

Total RNA was collected at 2 and 20 h of culture near the beginning and ending of the exponential growth phase. The RNA was isolated using the ZR Fungal/Bacterial RNA MiniPrep (Zymo

Table 1
qRT-PCR primer sets used in this study.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size (bp)	Efficiency (%)	Reference
<i>girA</i>	TCACCGACGAAGAGTTGATG	CTCTTCGATCTCGGTCTTGG	143	100.9	McMillan and Pereg (2014)
<i>glyA</i>	GGAGATCGCCAAGAAGATCA	GCTCTGGCGTAGGTCTTGA	133	98.2	McMillan and Pereg (2014)
<i>leuB</i>	AGTCACGAAGCTCCATCAGG	GAACAGGTTGTCGGTGACGA	127	100.5	This work
<i>mdh</i>	AGATGGCCGAGTCTACCTG	GATCTTCTCAGCCACCCG	134	98.0	This work

Research, CA, USA) combined with on-column DNaseI treatment using Turbo-DNase™ (Applied Biosystems/Ambion, TX, USA), following the manufacturer's recommendations. In order to remove completely genomic DNA, DNaseI incubation was extended to 30 min at 37 °C. The RNA integrity was verified in 1.5% agarose gels and the concentration was quantified by measuring the optical density (OD) at 260 and 280 nm in a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, MA, USA). The first cDNA strand was synthesized from 1 µg of total RNA, using the mouse moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase and random hexamer primer under conditions described by the manufacturer (Fermentas Life Science, MD, USA). Reactions of 12 µl were evaluated, containing 6.0 µl of SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems, CA, USA), 150 nM of primers, and 50 ng template. The reaction incubation was 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min and 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Amplification was performed in a PikoReal 24 RT-PCR (Thermo Scientific, MA, USA) and analyzed with PikoReal software 2.2 (Thermo Scientific, MA, USA). Amplification efficiency (*E*) was calculated (Schwarz et al., 2004). Specificity of each amplification reaction was confirmed analyzing the melting curve. All amplification efficiencies were above 98% (Table 1). All samples were run by triplicate and negative controls were included. qRT-PCR data analysis was carried out using the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.5. Statistical analysis

All experiments were independently performed at least in triplicate, and differences among treatments were evaluated with ANOVA analysis ($p = 0.05$) using DESIGN-EXPERT version 8.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN).

3. Results and discussion

3.1. *Azospirillum brasilense* (Start and Calf strains) growth and D/L malate consumption

The effect of aeration (0.1, 0.5 and 1.0 vvm) on pneumatic bioreactors over the growth and D/L-malate consumption of two different strains of *A. brasilense* (Start and Calf) is shown in Figs. 1 and 2. As observed, the growth was followed in all cultures by measuring the optical density and by the colony forming units per milliliter (CFU/ml) in at least three independent experiments (per aeration rate). Moreover, with the intention to provide uniformity in comparing the growth of *A. brasilense*, it was decided to initiate all bioreactor cultures at an optical density of 0.1 ± 0.04 AU (600 nm) by using the corresponding volume of inoculum from shake flasks.

Fig. 1A–C shows the growth kinetics in optical density of *A. brasilense* Start strain cultures, and Fig. 1D–F presents the viability measured as CFU/ml. As observed, the highest biomass (3.94 ± 0.19 AU or $2.86 \pm 0.47 \times 10^9$ CFU/ml) was obtained in cultures carried out at the lowest aeration rate (0.1 vvm), and decreased with respect to an increase to 0.5 or 1.0 vvm (Table 2). In order to compare the biomass growth among aeration rates, the biomass dry weight was determined at the end of cultures (Table 2). A behavior similar to the optical density and the viability was found observing a higher biomass (0.96 ± 0.35 g/L) at the lowest aeration rate, and lower biomass at the higher ones (0.81 ± 0.04

and 0.52 ± 0.09 g/L at 0.5 and 1.0 vvm, respectively). On the other hand, the specific growth rate (calculated by using optical density data) was lower at 0.5 vvm (0.12 ± 0.02 h⁻¹), and statistically similar at 0.1 and 1.0 vvm with values of 0.21 ± 0.02 and 0.19 ± 0.01 h⁻¹, respectively (Table 2). Moreover, in cultures carried out at 0.5 vvm the biomass growth ceased close to 20 h of culture, and cultures carried out at 1.0 vvm ceased to grow near 10 h of culture. In both cases the biomass values were significantly lower than those obtained in cultures at 0.1 vvm, where the peak biomass growth was obtained after 25 h of culture (Fig. 1 and Table 2). The end of the exponential phase on 0.5 and 1.0 vvm cultures was reached when L-malate concentration was near or below 0.5 g/l. Furthermore, at 0.1 vvm all D-malate was consumed (Fig. 1G), but the consumption apparently starts midway through the exponential phase of growth, when L-malate was below 1.0 g/l. At 0.5 vvm, almost 1.0 g/L of D-malate was consumed, while at 1.0 vvm D-malate was not consumed by the microorganism (Fig. 1H and I).

A very similar behavior was found in cultures carried out with *A. brasilense* Calf strain, where higher biomass was obtained in cultures carried out at the lower aeration rate (0.1 vvm) when compared to 0.5 and 1.0 vvm (Fig. 2A–C in optical density and Fig. 2D–F in viability, and Table 2). Moreover, the final biomass concentration measured by dry weight showed a behavior similar to the optical density and viability, being higher the biomass at the lowest aeration rate (1.36 ± 0.35 g/L), than the higher aeration rates (0.75 ± 0.04 and 0.65 ± 0.09 g/L at 0.5 and 1.0 vvm, respectively). Furthermore, the specific growth rate was also lower at 0.5 vvm (0.17 ± 0.02 h⁻¹) than at 0.1 and 1.0 vvm with values of 0.24 ± 0.02 and 0.21 ± 0.01 h⁻¹, respectively (Table 2).

Additionally, in cultures carried out at 0.5 and 1.0 vvm, the *A. brasilense* Calf growth ceased close to 10 h of culture, with a small decrease in optical density in both cases (Fig. 2B and C). Similarly to *A. brasilense* Start strain (Fig. 1B and C), the end of the exponential phase on 0.5 and 1.0 vvm cultures was reached when L-malate concentration was near or below 0.5 g/l, less than 20% of D-malate was consumed at 0.5 vvm, and no D-malate consumption was observed at 1.0 vvm (Fig. 2H and I). At 0.1 vvm the consumption of D-malate apparently started midway through the exponential phase of growth, when L-malate was below 1.0 g/l (Fig. 2G), and less than 0.5 g/l of D- and L-malate remained at the end of the cultures. Fallik and Okon (1996) reported that when bioreactor cultures were carried out by a fed-batch strategy using D/L-malate as carbon source, just L-malate was consumed by *A. brasilense*. In this case, the dissolved oxygen tension (DOT) was maintained near 50% (with respect to air saturation). However, authors did not mention the values of aeration or agitation used in those cultures to control DOT (Fallik and Okon, 1996). The preference of L-malic by *A. brasilense* instead of the D-form, might be associated to the fact that roots selectively secrete the L-stereoisomer and apparently plants use it as a signal to recruit beneficial rhizobacteria (Rudrappa et al., 2008; Westby et al., 1983).

The utilization of D-malate and L-malate as carbon source under aerobic conditions can be supported by different enzymes with broad specificity coded in *A. brasilense* genome like 3-isopropylmalate dehydrogenase (GenBank: EZQ09531.1, coded by *leuB*), putative malate/lactate dehydrogenase (GenBank: CCC97273.1) and malate dehydrogenase (GenBank: CCC99457.1 coded by *mdh*). This could indicate a differential regulation in

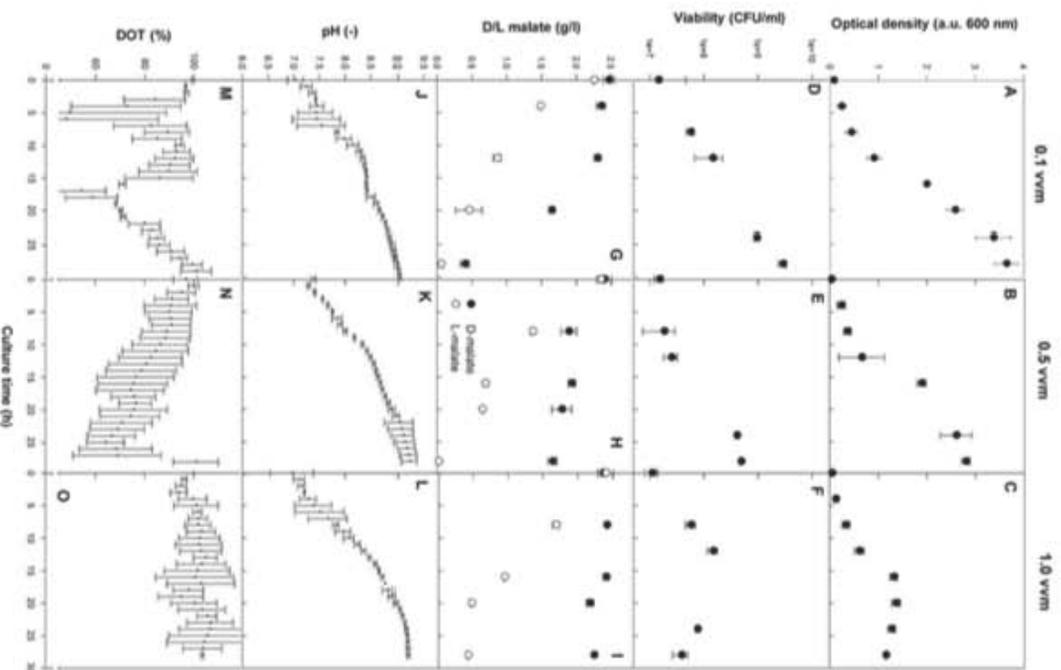


Fig. 1. Biomass growth of *A. brasiliense* Strart measured as optical density (A–C), and colony forming units (D–F), D-malate (closed symbols) and L-malate (closed symbols) consumption (G–I), pH behavior (J–L), and dissolved oxygen tension (M–O) behavior during cultures carried out in bubble column bioreactors at aeration rates of 0.1 (left), 0.5 (center), and 1.0 vvm (right).

Table 2
Aeration effects on the kinetic parameters on *A. brasiliense* (Strart and Colf strains) cultures carried out in pneumatic bubble column bioreactors at aeration rates of 0.1, 0.5, and 1.0 vvm.

Strain	Aeration rate (vvm)	Optical density (AU)	Viability (CFU/ml)	Biomass (g/l)	μ (h^{-1})	PHB (mg/g _{dw})
Strart	0.1	3.94 ± 0.19	2.86 ± 0.47 × 10 ⁶	0.96 ± 0.35	0.21 ± 0.02	7.45 ± 0.53
	0.5	2.80 ± 0.02	4.85 ± 0.30 × 10 ⁶	0.81 ± 0.04	0.12 ± 0.02	3.38 ± 0.42
	1.0	1.15 ± 0.01	3.5 ± 0.50 × 10 ⁶	0.52 ± 0.09	0.19 ± 0.01	1.35 ± 0.27
Colf	0.1	2.88 ± 1.05	7.80 ± 1.31 × 10 ⁶	1.36 ± 0.35	0.24 ± 0.02	1.35 ± 0.15
	0.5	1.41 ± 0.03	5.10 ± 0.20 × 10 ⁶	0.75 ± 0.04	0.17 ± 0.02	0.68 ± 0.11
	1.0	1.10 ± 0.14	2.62 ± 0.50 × 10 ⁶	0.65 ± 0.09	0.21 ± 0.01	0.40 ± 0.09

enzymatic activity, particularly in 3-isopropylmalate dehydrogenase that has been reported that could catalyzed the oxidative decarboxylation of D-malate (Drewland et al., 2007). With the aim of demonstrating the stereospecificity phenomenon of D-malic acid consumption, differential expression of *mdh* and *leuB* were measured by qRT-PCR. Samples were taken at 20 h of culture (end growth phase) and compared with samples from 2 h of culture (beginning of the growth phase). This comparison was performed in cultures at 0.1 and 1.0 vvm with Strart strain. Under the lowest aeration rate (0.1 vvm), the mRNA expression profiles at 20 h of culture exhibited an overexpression of *leuB* (4.21 ± 0.17 fold) and *mdh* (2.07 ± 0.04 fold), compared with 2 h of culture. However,

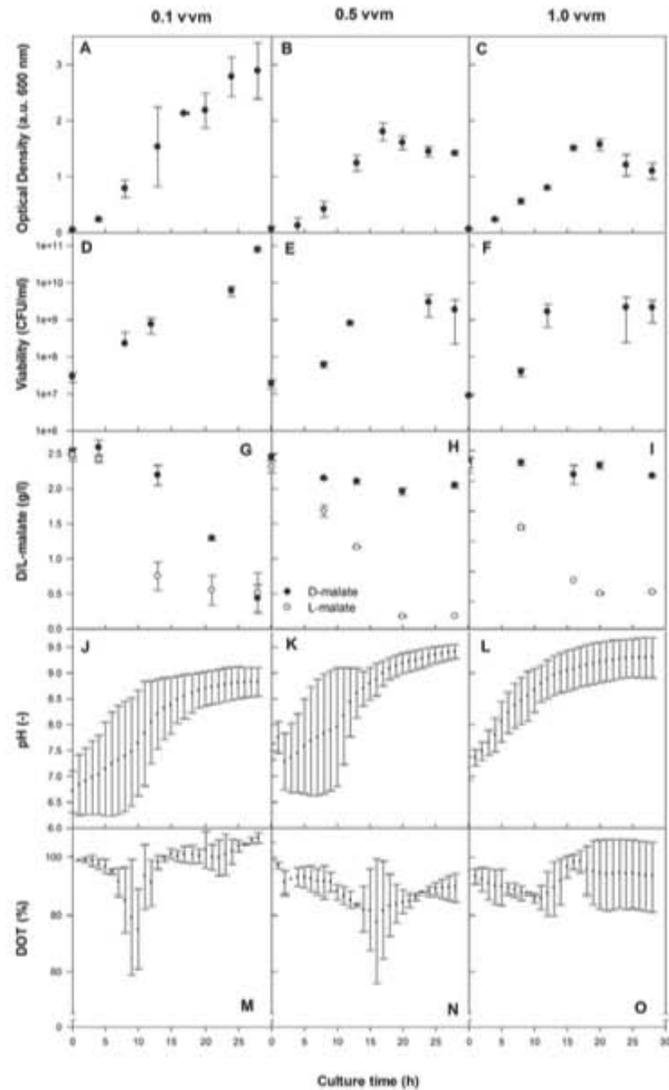


Fig. 2. Biomass growth of *A. brasilense* Calf measured as optical density (A–C), and colony forming units (D–F), D-malate (closed symbols) and L-malate (open symbols) consumption (G–I), pH behavior (J–L), and dissolved oxygen tension (M–O) behavior during cultures carried out in bubble column bioreactors at aeration rates of 0.1 (left), 0.5 (center), and 1.0 vvm (right).

at the highest aeration rate (1.0 vvm), at 20 h of culture *leuB* was repressed (-4.76 ± 0.26 fold) and *mdh* was maintained constant (1.16 ± 0.17 fold) compared with 2 h of culture. As a reference gene *gyrA* was used (McMillan and Pereg, 2014), which was maintained stable under all conditions studied. The information obtained in this work is the first fact showing differential regulation of L-malate and D-malate consumption by *A. brasilense*, caused by differences in aeration that could open a new field of study.

Moreover, the lack of D-malate consumption in cultures carried out at 1.0 vvm in both strains (Figs. 1I and 2I), is certainly associated with the decrease in biomass concentration at the end of the exponential phase, an also with the decrease in optical density or viability (Figs. 1C and 2C). The decrease in viability might also be associated with the lack of energy storage molecules as the intra-polysaccharide polyhydroxybutyrate (PHB), since in those

cultures the lowest amount of this compound for each strain was obtained at 1.0 vvm (Table 2). The highest PHB concentration was found at aeration rates of 0.1 and 0.5 vvm in *Start* strain (7.45 ± 0.53 and 3.38 ± 0.42 mg_{PHB}/g_{DW}, respectively), and *Calf* strain at 0.1 vvm (1.35 ± 0.15 mg_{PHB}/g_{DW}). In cultures carried out with *Calf* strain at 0.5 vvm (Fig. 2B) and 1.0 vvm (Fig. 2C), the optical density decreases in the last 10 h, but not the viability, probably due to a variation in cell sizes, as a results of the consumption of PHB, when no consumption of D-malate occurs. Nevertheless, when *Start* strain is cultured at 0.5 vvm (Fig. 1B), almost 1.0 g/L of D-malate was consumed (Fig. 1H), suggesting that cell sizes were not affected. Although this work was not aimed to improve the accumulation of PHB, the data here presented are in agreement with other reports where values of 2.85 and 2.86 mg_{PHB}/g_{DW} were obtained for a minimal salt medium (MSM), and MSM added with glycerol in *A. lipoferum*

cultures (Vendan and Thangaraju, 2007). However, the data in this work are lower compared to some reports where values close to 40% (in dry weight) are reported in various strains; the epiphytic strain Sp7 (Kamnev et al., 2012; Sun et al., 2000) and endophytic strain Sp245 (Kamnev et al., 2012), and strain Cd (Okon and Itzigsohn, 1992; Tai and Okon, 1985).

At lower aeration rates (0.1 vvm) the biomass obtained as measured by optical density (3.94 ± 0.19 and 2.88 ± 1.05 AU for *Start* and *Calf* strains, respectively) was higher than those previously reported by our group (Trujillo-Roldán et al., 2013), where a maximum biomass of 2.52 ± 0.14 AU was observed in shake flasks, 10- and 1000-liter agitated bioreactor cultures at the same volumetric mass transfer coefficient (k_{La} of 31 h^{-1}). In those bioreactor, culturing was carried out at 0.5 vvm and the mass transfer coefficient was settled by changing the agitation rate. Importantly, the k_{La} in the bubble columns used in this study at 0.1 vvm was about 26 h^{-1} , measured by the experimental chemical (sulfite) oxygen consumption method (Trujillo-Roldán et al., 2013). This lower k_{La} value and the lower aeration rates might be responsible for the higher viability obtained ($2.86 \pm 0.47 \times 10^9$ and $7.80 \pm 1.31 \times 10^{10}$ CFU/ml for *Start* and *Calf*, respectively), at least one order of magnitude higher in comparison with those from Trujillo-Roldán et al. (2013), where the final viability for both strains of *A. brasilense* were in the range of 4.5×10^8 to 6.1×10^8 CFU/ml.

Moreover, our data at the lowest aeration rate (0.1 vvm), are higher than those reported for batch cultures by Ona et al. (2005), who reported a maximum growth of 1.596 ± 0.06 , 1.338 ± 0.06 , 0.824 ± 0.07 , and 0.682 ± 0.06 AU using different carbon sources as L-malate, D-gluconate, D-fructose, and DL-lactate, respectively. Each of this carbon sources were used at a concentration of 0.02 M in minimal medium (Vanstockem et al., 1987). Using 5.0 g/L of L-malate, as in this work, Ona et al. (2005) reported a maximum of 2.045 ± 0.05 AU. However, by a fed-batch strategy did not increase the biomass growth (1.839 ± 0.08 AU). The specific growth rate for both *A. brasilense* strains in cultures carried out at 0.1 vvm were similar to those reported by Ona et al. (2005) ($0.20 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$). However, Ona et al. (2005) reported that two distinct growth patterns were observed in the growing phase; an initial fast growing phase (μ_1) followed by a second slow growing phase (μ_2). The transition was observed when the carbon source was exhausted. An average of 0.20 ± 0.03 and $0.09 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ were reported for μ_1 and μ_2 , respectively. Here, no deceleration phase was observed at any aeration condition (Figs. 1 and 2). This may be due to differences in the culture medium used by Ona et al. (2005) associated to different carbon source consumption metabolism in each growing phase.

Although the tendency in the effect of the aeration rate remains similar in both strains, being higher biomass growth at lower aeration rates, significant differences between the two strains were found, when compared at the same culture conditions (Table 2). Similar behavior was also observed in both strains in shake flasks and 10 liters agitated bioreactors (Trujillo-Roldán et al., 2013). This is probably due to an increased capacity in the accumulation of intracellular polyhydroxyalkanoates (mainly polyhydroxybutyrate or PHB) for the *A. brasilense Start* strain. While higher PHB accumulation at lower aerations was observed in both strains, a higher PHB yield was obtained in those cultures with *A. brasilense Start*, under the same aeration rate, than those carried out using the *Calf* strain (Table 2). Previously, the *phbC* gene which is responsible for the last step in the polymerization of PHB was mutated (by insertion of a kanamycin resistance cassette) and a decrease in the ability of *A. brasilense* to survive under endure starvation conditions were found (Kadouri et al., 2002). However, cell aggregation, root adhesion, and exo and capsular polysaccharides production were higher in the *phbC* mutant. This would allow us to suggest

that for those cultures carried out in higher conditions of aeration (0.5 and 1.0 vvm), wherein the PHB production is decreased, and some other metabolic events associated with the production of exo and capsular polysaccharides can be enhanced. Moreover, we were not able to find a linear relation between the three methods to determine *A. brasilense* growth (Table 2). This is mostly due to the differences in capsular and exopolysaccharides produced at each aeration condition, and the strain used.

3.2. Behavior of process parameters: pH and dissolved oxygen tension

In consideration for a simple, cheap and efficient processes, non-controlled pH cultures was used, because the viabilities and optical densities obtained were in the same magnitude order (Figs. 1J–L and 2J–L) than those previously reported wherein the pH control was made (Ona et al., 2005; Trujillo-Roldán et al., 2013). An increase in pH was observed in all cultures from the beginning, where all cultures started with a pH close to neutrality (Fig. 1J–L). However, as aeration increases, the cultures end with a higher pH, being close to 9.0 for those cultures carried out at 0.1 vvm, and up to 9.5 in those performed at aeration rates of 0.5 and 1.0 vvm. This behavior was similar in the both strains of *A. brasilense* evaluated, being more erratic in *Calf* strain cultures (Fig. 2J–L).

A. brasilense growth in a wide range of external pH due to its capacity to regulate and stabilize their internal pH (Bashan et al., 1995), particularly isolated from neutral and alkaline soils (Bashan et al., 1995; Harthmann et al., 1991). It has been reported that when *A. brasilense* grown on malic acid release ammonia modifying the medium which becomes alkaline (Christiansen-Weniger and Van Veen, 1991), as observed in this work with pH up to 9.5 (Figs. 1J–L and 2J–L). Furthermore, under alkaline pH *A. brasilense* produces lysine, arginine and methionine in chemical defined media using malic acid as a carbon source (Rodelas et al., 1994). Moreover, to regulate their internal homeostasis *A. brasilense* increases the Na motive force from environment to inside the cell and improve the growth and survival at high pH (New and Kennedy, 1989; Bashan et al., 1995).

On the other hand, different behaviors of dissolved oxygen tension (DOT, with respect to air saturation) were seen as a function of the aeration used in cultures (Fig. 1M–O). In those cultures performed with *A. brasilense Start* at 0.1 vvm two drops of DOT from 100% to values near 50% were detected (Fig. 1M). This is most likely caused by the change of metabolism, probably due preferentially to L-lactate consumption at the beginning of culture, and thereafter D-lactate (Fig. 1G). Nevertheless, in cultures carried out to 0.5 vvm, only one drop in DOT was observed (from 100% to almost $70 \pm 15\%$), as a consequence of the consumption of L-lactate. In addition, in cultures carried out at 1.0 vvm no change in DOT was observed. This is probably because the oxygen transfer rate under these conditions exceeds the oxygen uptake rate, thus maintaining the DOT constant near 100%. In the case of *Calf* strain, only one decrease in DOT was observed when L-malate values were near 1.0 g/L. Most probably, in this strain the specificity change to consume the D-stereoisomer is lighter than what can be seen in *Start* strain. The differences in the trends of the DOT between those cultures carried out with both strains at 0.1 vvm (Figs. 1M and 2M) and 0.5 vvm (Figs. 1N and 2N) are surely due to different specific oxygen consumption rates (q_{O_2}), caused by the physiological differences between strains. Our results in terms of the specific growth rate are in the same range of those reported by Paul et al. (1990) who reported a decrease in specific growth rate (0.17 h^{-1}) in *A. lipoferrum* submerged cultures carried out at high DOT (>85%), but in cultures carried out at lower DOT (near 30%) higher specific growth rates (0.26 h^{-1}) were obtained (Paul et al., 1990).

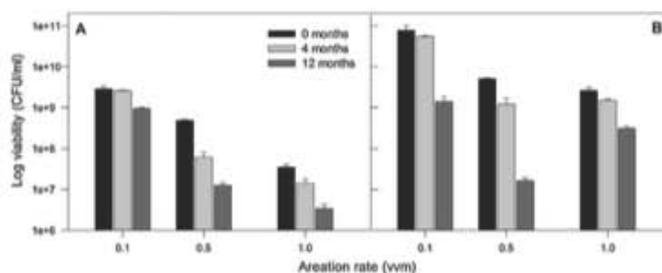


Fig. 3. Shelf life viability of the liquid inoculants formulation of *A. brasilense* strains Start (A) and Calf (B) for 4 and 12 months, maintained at room temperature (circa 22–26 °C), and measured as colony-forming units (CFU/ml) for cultures cultured in bubble column at 0.1, 0.5 and 1.0 vvm.

3.3. Shelf life viability of *Azospirillum brasilense* (Calf and Start strains)

The growth promotion in plants depends directly on the presence of live bacteria, and the decrease on bacterial viability through time determine the shelf life of an inoculant formulation (Trujillo-Roldán et al., 2013). In this order, the inoculants available in the Mexican market are in-between 1×10^7 and 1×10^8 CFU/ml, and 250 ml of pre-formulated product is an adequate amount for 1.0 hectare (2.47 acres). Thus we characterized the shelf life of liquid inoculant formulations based on the cultures carried out at 0.1, 0.5 and 1.0 vvm in both strains. We stored at room temperature (circa 22–26 °C), liquid inoculants formulation for 4 and 12 months. Enough samples of each culture (in both strains) were saved (Trujillo-Roldán et al., 2013), and at least three samples were sacrificed each time a viability reading (as CFU/ml) was performed. No significant differences in viability were obtained in the formulations of the first 4 months shelf life from cultures carried out at 0.1 vvm in both strains (Fig. 3). In *A. brasilense* Start, the viability was $2.86 \pm 0.47 \times 10^9$ CFU/ml, and at the end of 4 months the viability obtained was $2.59 \pm 0.08 \times 10^9$ CFU/ml (Fig. 3). In *A. brasilense* Calf, the viability obtained was one order of magnitude higher ($7.80 \pm 1.31 \times 10^{10}$ CFU/ml), and at the end of 4 months similar viable cells were measured ($5.50 \pm 0.29 \times 10^{10}$ CFU/ml). However, even at aeration rates of 0.5 or 1.0 vvm, a decrease in viability was observed after 4 months of storage in both strains. Moreover, one order of magnitude was lost after a period of one-year shelf life for all cultures carried out, except those carried out at 0.5 vvm with Calf strain where a decrease of two magnitude orders was obtained. These data are in agreement with those previously reported by our group, where one order of magnitude on viability decrease was obtained after one year of storage in a liquid formulation where both strains were mixed (Trujillo-Roldán et al., 2013). Our results are similar to those obtained in fed-batch cultures of *A. brasilense* where $1\text{--}3 \times 10^{10}$ CFU/ml were obtained, and two magnitude orders of viability were lost after 6 months of storage on different solid carriers (ground or granular peat, vermiculite, talcum powder, basalt granules, and bentonite) (Fallik and Okon, 1996).

Storage and utilization of polybetahydroxyalkanoate polymers (mainly polyhydroxybutyrate) are important to the shelf life of the bacteria in the production of inoculants (Okon and Itzigsohn, 1995). Although the aim of this work was not the improvement of PHB during culture, we measured the amount of this biopolymer at the beginning of storage conservation (Table 2), and twelve months later. It is worth saying that whenever an experiment was done, the liquid inoculant product was formulated for shelf life. Very small amounts of PHB were found at the end of the shelf life storage of all cultures. Just in those cultures carried out at 0.1 vvm by *A. brasilense* Start, 0.42 ± 0.11 mg_{PHB}/g_{DW} was observed. In all other cultures, smaller amounts as low as 0.20 mg_{PHB}/g_{DW} were detected. Those

data are in agreement with those reported by Kadouri et al. (2002), who reported that a *phbC* mutant (gene responsible for the last step in the polymerization of PHB) decreases the ability of *A. brasilense* to survive under endure starvation conditions. Moreover, in the presence of stress factors such as desiccation or osmotic stress, enriched cells containing PHB survived better than cells with low PHB content (Okon and Itzigsohn, 1992).

4. Conclusions

This work provides, for the first time, an insight of how typical culturing conditions in pneumatic bioreactors, such as aeration rate, can modify *A. brasilense* stereospecificity for its carbon source. A reduction in aeration rate resulted in an increase of final biomass and increased the consumption of D-malate, at higher aeration rate only L-malate was consumed. Furthermore, for *A. brasilense* a reduction in aeration rate allows an increase of the shelf life with less viability loss compared to higher aeration rates. Finally, it was proved that those microorganisms cultured with low aeration rates saved higher concentrations of PHB, which is associated with increased shelf life.

Acknowledgements

This work was funded by projects CONACYT 220795 and 178528, CONACYT-INNOVAPYME 214404, and PAPIIT-UNAM IN-210013 and IN-209113. IKCE, ABL and RIGC thanks the scholarship from CONACYT-Mexico. Authors thank Abel Blancas Eng. for his technical assistance. Authors thank Marcel Morales Ph.D. (CEO of Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V.), and Agustín de Leonardo Eng. (Process Manager of Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V.). We also thank Ana Carmen Delgado for reviewing the English version of the manuscript.

References

- Albrecht, S.L., Okon, Y., 1980. Cultures of *Azospirillum*. In: Anthony, S.P. (Ed.), Methods in Enzymology Photosynthesis and Nitrogen Fixation – Part C. Academic Press, pp. 739–749.
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., 2005. Bacteria/plant growth-promoting. In: Hillel, D. (Ed.), Encyclopedia of Soils in the Environment. Elsevier, Oxford, pp. 103–115.
- Bashan, Y., Puentes, M.E., Rodríguez-Mendoza, M.N., Toledo, G., Holguín, G., Ferrera-Cerrato, R., Pedrin, S., 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and Rhizosphere of 23 soil types. Appl. Environ. Microbiol. 61 (5), 1938–1945.
- Bashan, Y., Trejo, A., de-Bashan, L., 2011. Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. Biol. Fertil. Soils 47, 963–969.
- Cappuyns, A.M., Bernaerts, K., Smets, I.Y., Ona, O., Prinsen, E., Vanderleyden, J., Van Impe, J.F., 2007. Optimal fed batch experiment design for estimation of monod kinetics of *Azospirillum brasilense*: from theory to practice. Biotechnol. Progr. 23, 1074–1081.
- Christiansen-Weniger, C., Van Veen, J.A., 1991. NH₄⁺-excreting *Azospirillum brasilense* mutants enhance the nitrogen supply of a wheat host. Appl. Environ. Microbiol. 57 (10), 3006–3012.

- Didonet, A.D., Magalhaes, A.C., 1997. Growth and nitrite production by *Azospirillum* strains subjected to different levels of dissolved oxygen in the medium. *Soil Biol. Biochem.* 29, 1743–1746.
- Drevland, R.M., Waheed, A., Graham, D.E., 2007. Enzymology and evolution of the pyruvate pathway to 2-oxobutyrate in *Methanocaldococcus jannaschii*. *J. Bacteriol.* 189, 4391–4400.
- Fadel-Picheth, C.M., Souza, E.M., Rigo, L.U., Funayama, S., Yates, M.G., Pedrosa, F.O., 1999. Regulation of *Azospirillum brasilense* *nifA* gene expression by ammonium and oxygen. *FEMS Microbiol. Lett.* 179, 281–288.
- Fallik, E., Okon, Y., 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. *Soil Biol. Biochem.* 28, 123–126.
- Fibach-Paldi, S., Burdman, S., Okon, Y., 2012. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 326, 99–108.
- Hartmann, A., Burris, R.H., 1987. Regulation of nitrogenase activity by oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* 169, 944–948.
- Hartmann, A., Prabhu, S.R., Galinski, E.A., 1991. Osmotolerance of diazotrophic rhizosphere bacteria. *Plant Soil* 137 (1), 105–109.
- Hohenschuh, W., Ma, C., Dalton, D., Murthy, G.S., 2012. Optimization of a poly-3-hydroxybutyrate quantification method for rapid detection in plant based systems. *J. Bioprocess Eng. Biorefinery* 1, 120–126.
- Joe, M., Karthikeyan, M.B., Sekar, C., Deiveekasundaram, M., 2010. Optimization of biofloc production in *Azospirillum brasilense* (MTCC-125) and evaluation of its adherence with the roots of certain crops. *Indian J. Microbiol.* 50, 21–25.
- Kadouri, D., Burdman, S., Jurkevitch, E., Okon, Y., 2002. Identification and isolation of genes involved in poly(beta-hydroxybutyrate) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phbC* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2943–2949.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y., 2003. Involvement of the reserve material poly-beta-hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3244–3250.
- Kamnev, A.A., Tugarova, A.V., Tarantilis, P.A., Gardiner, P.H.E., Polissiou, M.G., 2012. Comparing poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: the effects of copper(II). *Appl. Soil Ecol.* 61, 213–216.
- Kefalogianni, I., Aggelis, G., 2002. Modeling growth and biochemical activities of *Azospirillum* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 352–357.
- Konnova, S.A., Fedonenko, I., Makarov, O.E., Ignatov, V.V., 2003. Effect of cultivation parameters on the composition of extracellular polysaccharide containing substances in bacterium *Azospirillum brasilense*. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 430–437.
- Law, J.H., Slepecky, R.A., 1961. Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* 82 (1), 33–36.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25 (4), 402–408.
- McMillan, M., Pereg, L., 2014. Evaluation of reference genes for gene expression analysis using quantitative RT-PCR in *Azospirillum brasilense*. *PLOS ONE* 9 (5), e98162, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098162>.
- New, P.B., Kennedy, I.R., 1989. Regional distribution and pH sensitivity of *Azospirillum* associated with wheat roots in Eastern Australia. *Microb. Ecol.* 17 (3), 299–309.
- Okon, Y., Itzigsohn, R., 1992. Poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Lett.* 103, 131–139.
- Okon, Y., Itzigsohn, R., 1995. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotechnol. Adv.* 13, 415–424.
- Ona, O., Van, I.J., Prinsen, E., Vanderleyden, J., 2005. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 125–132.
- Paul, E., Mulard, D., Blanc, P., Fages, J., Goma, G., Pareilleux, A., 1990. Effects of partial O₂ pressure, partial CO₂ pressure, and agitation on growth kinetics of *Azospirillum lipoferum* under fermentor conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3235–3239.
- Rodelas, B., Salmeron, V., Martinez-Toledo, M.V., Gonzalez-Lopez, J., 1994. Production of amino acids by *Azospirillum brasilense* in chemically-defined medium amended with malate, gluconate or fructose. *Soil Biol. Biochem.* 26, 301–303.
- Rudrappa, T., Czymbek, K.J., Paré, P.W., Bais, H.P., 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol.* 148, 1547–1556.
- Schwarz, G., Bäumler, S., Block, A., Felsenstein, F.G., Wenzel, G., 2004. Determination of detection and quantification limits for SNP allele frequency estimation in DNA pools using real time PCR. *Nucleic Acids Res.* 32, e24.
- Sheng, J., Baldeck, J.D., Nguyen, P.T.M., Quivey, R.G., Marquis, R.E., 2010. Alkali production associated with malolactic fermentation by oral streptococci and protection against acid, oxidative, or starvation damage. *Can. J. Microbiol.* 56, 539–547.
- Sun, J., Peng, X., Van, I.J., Vanderleyden, J., 2000. The *ntrB* and *ntrC* genes are involved in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 113–117.
- Tal, S., Okon, Y., 1985. Production of the reserve material poly-beta-hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 31, 608–613.
- Trujillo-Roldán, M.A., Peña, C., Ramirez, O.T., Galindo, E., 2001. Effect of oscillating dissolved oxygen tension on the production of alginate by *Azrobacter vinelandii*. *Biotechnol. Progr.* 17, 1042–1048.
- Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A., Gonzalez-Monterrubio, C.F., Acevedo-Sanchez, E.V., Martinez-Salinas, C., Garcia-Cabrera, R.I., Gamba-Suasnavart, R.A., Marin-Palacio, L.D., Villegas, J., Blancas-Cabrera, A., 2013. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9655–9674.
- Vanstockem, M., Michiels, K., Vanderleyden, J., Van Gool, A.P., 1987. Transposon mutagenesis of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: physical analysis of Tn5 and Tn5-Mob insertion mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 410–415.
- Vendan, R.T., Thangaraju, M., 2007. Development and standardization of cyst based liquid formulation of *Azospirillum* bioinoculant. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 54, 167–177.
- Westby, C.A., Cutshall, D.S., Vigil, G.V., 1983. Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 156, 1369–1372.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.