

## CULTIVOS DE *Rhizobium phaseoli* EN SISTEMA SUMERGIDO

J. L. Boiardi, A. P. Balatti y L. A. Mazza (1)

Recibido: 1/3/82

Aceptado: 14/10/82

### RESUMEN

En este trabajo se estudia la obtención de suspensiones celulares de *Rhizobium phaseoli* cepa F-45 destinadas a la preparación de inoculantes. Las experiencias se realizaron en frascos agitados y en fermentadores convencionales operando en sistema "batch". Se considera la influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno, factores de crecimiento, pH inicial, concentración de inóculo y diferentes condiciones de aeración sobre el crecimiento celular. Usando un medio que contiene fundamentalmente sacarosa, peptona, extracto de levadura y sales y operando a 400 rpm con un caudal de aire de 1 l/1 x min. se obtienen caldos con una concentración celular de *Rhizobium phaseoli* de  $1,25 \times 10^{10}$  cel/ml en 32 horas de proceso.

### *Rhizobium phaseoli* CULTURES IN SUBMERGED SYSTEM

### SUMMARY

It is considered here the attainment of a cellular suspension of *Rhizobium phaseoli* (strain F-45), which is used to inoculant preparation.

The experiments are performed in shaker flasks and in stirred fermentor. The optimization of the process is considered. The influence of carbon source, nitrogen source, growth factors, initial pH, inocula concentration and different aeration conditions on the cellular growth is studied.

Using a medium which contains fundamentally: sucrose, peptone, yeast extract and salts, and operating at 400 rpm employing an air flow of 1 l/1 x min. it is possible to achieve a cellular concentration of  $1,25 \times 10^{10}$  cell/ml in 32 hours.

### INTRODUCCION

La industria de producción de inoculantes para leguminosas necesita disponer de cultivos con un alto número de células viables.

Si bien los microorganismos del género *Rhizobium* no son muy exigentes en cuanto a sus requerimientos nutritivos (Burton, 1979), los medios de producción deben satisfacer

las necesidades particulares de cada cepa principalmente en lo que se refiere a fuentes nitrogenadas y vitaminas (Chakrabarti *et al.*, 1981; Vincent, 1977) como así también en sus necesidades de oxígeno (Balatti y Mazza, 1970) para lograr elevados recuentos celulares.

En este trabajo se estudia el balance de un medio adecuado para el cultivo de una cepa de *Rhizobium phaseoli* que puede ser uti-

(1) Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales, Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, (1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina.

lizada en la inoculación de *Phaseolus vulgaris* variedad "alubia". Además, se estudia la influencia de distintas variables operativas a fin de optimizar el proceso. Los experimentos fueron realizados en escala de frascos agitados y fermentadores de laboratorio.

## MATERIALES Y METODOS

### Microorganismo

Se empleó la cepa de *Rhizobium phaseoli* F-45 que resulta efectiva para variedades de *Phaseolus vulgaris* que se cultivan en la Argentina, la cual fue suministrada por la Unidad Simbiosis del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar, provincia de Buenos Aires. La cepa fue mantenida por liofilización.

### Medios

Para el repique de la cepa y el mantenimiento en heladera por períodos cortos de tiempo se empleó el medio N° 1. Los estudios de balance de medio se iniciaron em-

pleando el medio N° 3, se hicieron modificaciones sobre la fuente de carbono, nitrógeno y de sus relaciones. La composición de los medios se indica en el Cuadro 1.

### Inóculo

Los inóculos fueron preparados a partir de la cepa liofilizada, la que fue repicada en tubos conteniendo el medio N° 1. Para iniciar cada proceso se sembró con ansa de platino (3 ansadas) un erlenmeyer de 250 ml con 50 ml del medio N° 2 (Pre inóculo). El desarrollo así obtenido fue empleado para sembrar erlenmeyers de 1 litro con 200 ml del medio N° 3 con sacarosa. Estos desarrollos se utilizaron como inóculo de procesos tanto a nivel de erlenmeyers como en escala de fermentadores. En todos los casos la concentración bacteriana inicial fue ajustada a un mismo valor ( $1,5 \times 10^8$  células/ml).

### Crecimiento

El crecimiento celular fue evaluado por: medida de densidad óptica empleando una longitud de onda de 625 nm; recuento del

CUADRO 1: Composición de los medios de cultivo

Componente (g/l)	Medio N° 1 Mantenimiento	Medio N° 2 Inóculo	Medio N° 3 Base	Medio N° 4 Balanceado
Fuente de Carbono	-	-	0,5	-
Sacarosa	5,0	5,0	-	10,0
Ext. de Levadura *	1,0	1,0	1,0	2,0
Peptona **	-	-	-	2,0
PO <sub>4</sub> HK <sub>2</sub>	0,5	0,75	0,75	0,75
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	-	0,6	0,6	0,6
SO <sub>4</sub> Mg. 7H <sub>2</sub> O	0,2	0,2	0,2	0,2
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O (Sol. 10%) (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1
MnSO <sub>4</sub> (Sol. 10%) (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1
Agar	14	-	-	-
Biotina mg/l (Merck)	-	0,2	-	-
CaCO <sub>3</sub>	3	-	-	-
pH	7,0	6,5	7,0	6,5

\* Oxoid. \*\* INORP (MC8).

número de microorganismos totales usando una cámara de Petroff Hauser y recuento del número de viables en caja de Petri.

#### Fuente de carbono

El consumo de sacarosa fue calculado con determinaciones de su concentración en el caldo de cultivo empleando el método propuesto por Hyvarinen y Nikkila (1962).

#### Velocidad de absorción de oxígeno (VAO)

Se determinó por el método recomendado por Cooper *et al.* (1944).

#### Condiciones de operación

La esterilización de la fuente de carbono fue realizada separadamente de los otros constituyentes del medio. La temperatura fue de 121°C y el tiempo 20 minutos. Los experimentos en la escala de frascos fueron realizados en agitador rotatorio a 250 rpm con una excentricidad de 2,5 cm en cuarto estufa a 30°C. Los ensayos en fermentadores de laboratorio fueron conducidos en una unidad de fermentación New Brunswick con 3 fermentadores que tienen una capacidad de 7,5 litros cada uno con 3 litros de medio. El caudal de aire empleado fue de 1 volumen de aire por volumen de medio y por minuto. Se hicieron determinaciones a 100, 150, 200, 400 y 500 rpm.

## RESULTADOS

#### Influencia de la fuente de carbono

En una primera serie de ensayos empleando el medio base N° 3 se estudió el efecto sobre el crecimiento de diferentes fuentes de carbono tales como galactosa, glucosa, lactosa, manitol, glicerol y sacarosa.

Los resultados mostraron un comportamiento satisfactorio de sacarosa, glicerol y lactosa (Figura 1) alcanzándose concentra-

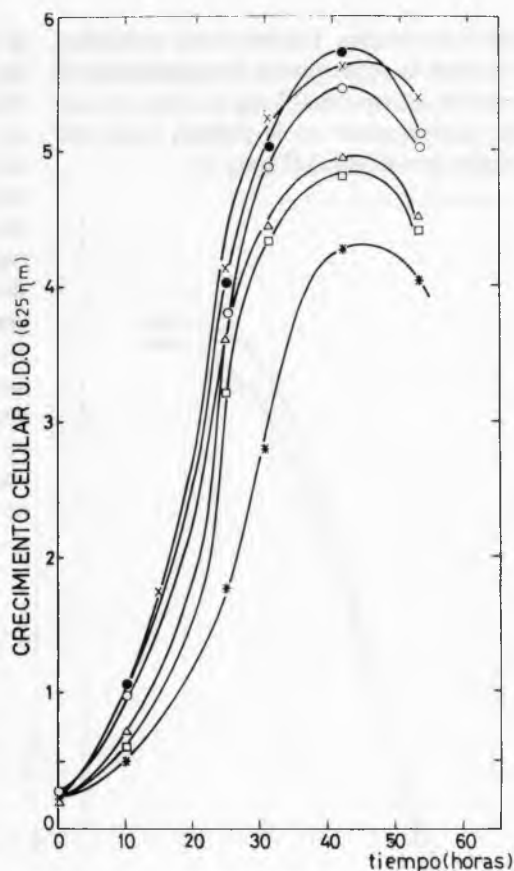


Figura 1: Influencia de la naturaleza de la fuente de carbono sobre el crecimiento celular de una cepa de *Rhizobium phaseoli* (F 45).

Medio N° 3 adicionado con 10 g/l de las fuentes de carbono: □ galactosa; \* manitol; △ glucosa; ● lactosa; ○ glicerol; X sacarosa.

ciones celulares máximas de  $5 \times 10^9$  cel/ml,  $2 \times 10^9$  cel/ml y  $2 \times 10^9$  cel/ml, respectivamente, a las 40 horas de proceso.

#### Influencia de factores de crecimiento

Teniendo en cuenta las necesidades nutricionales de las cepas de *Rhizobium phaseoli* (Graham, 1963; Vincent, 1977), se hicieron ensayos donde se estudió el efecto de diferentes vitaminas. Se ensayaron las siguientes: biotina, en concentraciones de 2,0; 0,5 y 1 mg por litro; pantotenato de calcio 4, 10 y 20 mg por litro y tiamina 2,5 y 10,0 mg por litro. Estas sustancias fueron utilizadas

solas o en mezclas. Los resultados obtenidos mostraron la conveniencia de suplementar el medio de cultivo con 0,2 mg por litro de biotina, especialmente en la primera etapa del proceso (pre-inóculo) (Figura 2).

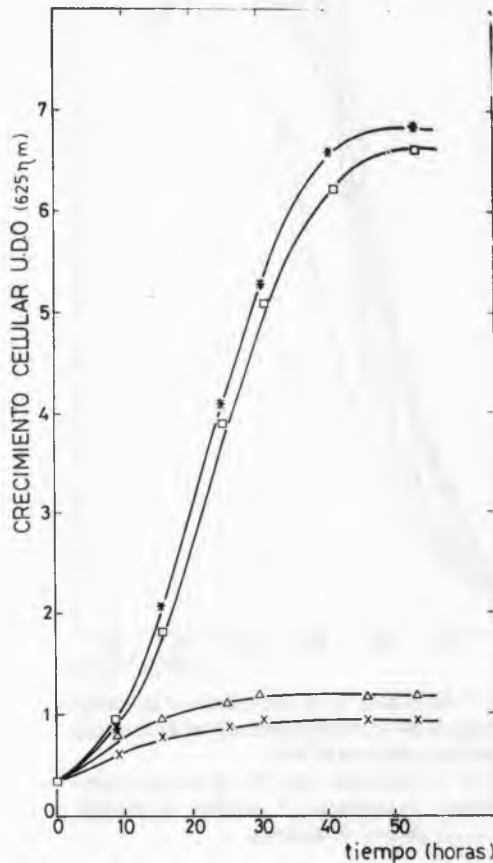


Figura 2: Efecto del agregado de vitaminas sobre el crecimiento de *Rhizobium phaseoli* (F 45). Medio N° 1 adicionado con: \* 0,2; 0,4 y 1,0 mg/l de biotina. □ 0,2 mg/l Biotina + 4 mg/l de Pantotenato de calcio y 0,5 mg/l de Biotina + 10 mg/l de Pantotenato de calcio. △ 4; 10 y 20 mg/l de Pantotenato de calcio. X 2,5 y 10 mg/l de Tiamina.

### Influencia de la fuente nitrogenada

En ensayos orientativos realizados en caja de Petri empleando el medio base N° 1 con sacarosa adicionado del 2 por ciento de agar se hicieron experimentos utilizando diferentes sustancias, tales como: extracto de levadura (Oxoid), una peptona que resulta

de la hidrólisis pepsínica de estómago de cerdo (INORP tipo MC8), extracto de carne (Swift), agua de macerado de maíz (Compañía Refinería de Maíz), urea, nitrato de potasio, extracto de malta y  $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ . De estos ensayos surgió que la peptona, el agua de macerado y el extracto de carne produjeron los mayores desarrollos de colonias. Por ello se realizaron experimentos en erlenmeyers de 1.000 ml con 200 ml de medio, empleando el medio base con 10 g por litro sacarosa, donde se utilizó separadamente peptona, extracto de carne y agua de macerado en concentraciones de 3 g por litro. Los resultados se indican en la Figura 3 donde se ve que la peptona influye favorablemente en

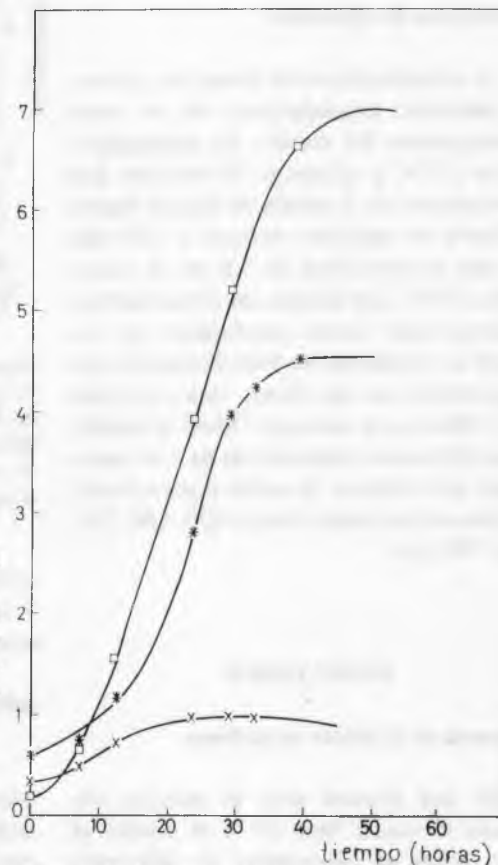


Figura 3: Influencia de la peptona, extracto de carne y agua de macerado de maíz sobre el crecimiento de una cepa de *Rhizobium phaseoli* (F 45). Medio N° 3 adicionado de sacarosa 10 g/l y: □ 3 g/l de peptona. X 3 g/l de extracto de carne. \* 3 g/l de agua de macerado de maíz.

el crecimiento. Posteriormente se hicieron nuevos experimentos donde se varió la concentración de peptona: se ensayaron 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 g por litro. Los resultados de estos experimentos demostraron que concentraciones de peptona superiores a 3 g por litro limitan el crecimiento celular (Figura 4).

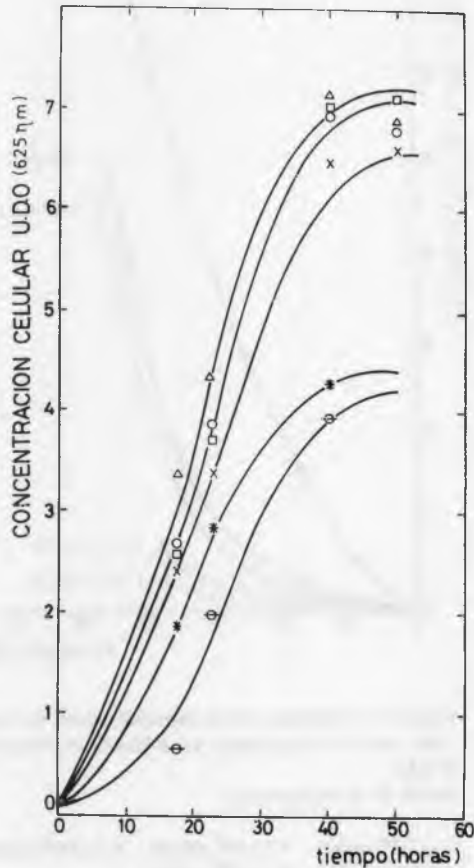


Figura 4: Efecto de diferentes concentraciones de peptona sobre el crecimiento de *Rhizobium phaseoli* (F 45).

Medio No 3 adicionado de 10 g/l de sacarosa y peptona en concentraciones de: ○ 2,0 g/l. □ 2,5 g/l. △ 3,0 g/l. X 3,5 g/l. \* 4,0 g/l. ⊕ 4,5 g/l.

**Influencia del pH inicial del medio de cultivo sobre el crecimiento**

Con el medio base adicionado del 3 % de peptona proveniente de la hidrólisis pep-

sínica de estómago de cerdo, y partiendo de un pH inicial de 7,0 se observó un prolongado período de retardo (aproximadamente 9 horas). El crecimiento celular comenzaba a acelerarse cuando el valor de pH descendía a 6,5. En razón de este comportamiento se programaron nuevos experimentos partiendo de diferentes valores de pH (5,5; 6,0; 6,5; 7,0). Los resultados de estos ensayos mostraron la conveniencia de iniciar los procesos a pH 6,5; ya que para este valor el cultivo presentaba una evolución de la curva de crecimiento con una fase de retardo reducida (aproximadamente 2 horas).

**Influencia de distintas relaciones de extracto de levadura y peptona.**

Después de ajustar el medio en su pH

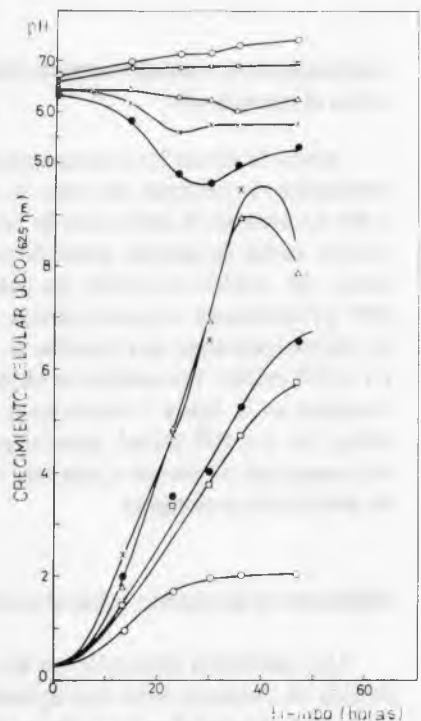


Figura 5: Influencia de distintas relaciones de concentración de extracto de levadura y peptona sobre el crecimiento de *Rhizobium phaseoli* (F 45).

Medio No 3 adicionado de sacarosa 10 g/l y:

	●	X	△	□	○
Peptona (g/l):	3,0	2,0	1,0	0	0
Extr. de lev. (g/l):	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0

inicial se hicieron nuevos experimentos variando la relación de extracto de levadura y peptona. Los resultados obtenidos se indican en la Figura 5, donde se destaca que los medios (medio base N° 3 adicionado de 2,0 g por litro de peptona y 2,0 g por litro de extracto de levadura) y el medio C (medio base N° 3 adicionado de 1 g por litro de peptona y 3 g por litro de extracto de levadura) son los que permiten alcanzar mayores valores de densidad óptica, 9,5 y 8,5, respectivamente, que corresponden a  $9 \times 10^9$  y  $8 \times 10^9$  células por ml. Las curvas de evolución de pH que se obtienen empleando estos medios se encuentran comprendidas entre valores de 5,7 y 6,5. Por otra parte, puede apreciarse que concentraciones de extracto de levadura por encima de 4 g por litro limitan el crecimiento del *Rhizobium phaseoli* F-45.

#### Influencia de la concentración de inóculo sobre el crecimiento

Antes de iniciar los experimentos en fermentadores se hicieron una serie de ensayos a fin de estudiar la influencia de la concentración inicial de inóculo sobre la fase de retardo. Se empleó un medio ya balanceado (N° 4) utilizando concentraciones iniciales de microorganismos en el ámbito de  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^8$  cel/ml. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6 donde surge que por debajo de  $1 \times 10^8$  cel/ml, para las condiciones ensayadas, se presenta una fase de retardo demasiado prolongada.

#### Influencia de la aeración sobre el crecimiento

Los resultados obtenidos en los experimentos en fermentadores con agitación mecánica empleando el medio balanceado se indican en el Cuadro 2.

Se observa que a medida que aumenta la velocidad de agitación, y consecuentemente el VAO, la concentración celular de los caldos se incrementa, mientras que los tiempos de proceso disminuyen. Así con un valor de

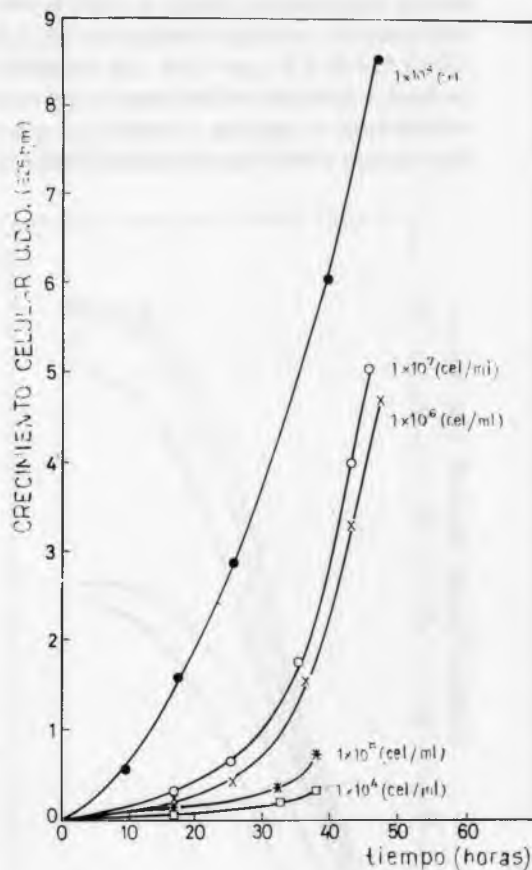


Figura 6: Influencia de la cantidad inicial de inóculo sobre el crecimiento de *Rhizobium phaseoli* (F 45).

Medio N° 4 (balanceado)

□  $1 \times 10^4$  cel/ml \*  $1 \times 10^5$  cel/ml X  $1 \times 10^6$  cel/ml  
 ○  $1 \times 10^7$  cel/ml ●  $1 \times 10^8$  cel/ml

agitación de 100 rpm la máxima concentración celular fue de  $6,0 \times 10^9$  cel/ml a las 50 hs de proceso, alcanzándose el más alto valor a 400 rpm, con una concentración de  $12,5 \times 10^9$  cel/ml en 32 horas de proceso. La velocidad específica de crecimiento aumenta de  $0,053 \text{ h}^{-1}$  a 100 rpm a  $0,106 \text{ h}^{-1}$  a 400 rpm. Como puede también observarse la productividad se incrementa hasta alcanzar un valor máximo de  $3,75 \times 10^8$  cel/ml.h. Valores de agitación superiores (500 rpm) no se

CUADRO 2: Influencia de la aeración sobre el crecimiento de *Rhizobium phaseoli* F-45.

Velocidad de agitación rpm	100	150	200	300	400	500
Velocidad de absorción de O <sub>2</sub> ml. O <sub>2</sub> /l.h (VAO)	25	90	180	410	812	1.375
Tiempo de proceso (h)	50	48	42	35	32	32
Máxima cc. celular células/ml	6 x 10 <sup>9</sup>	10,4 x 10 <sup>9</sup>	11 x 10 <sup>9</sup>	11,6 x 10 <sup>9</sup>	12,0 x 10 <sup>9</sup>	11,8 x 10 <sup>9</sup>
Máxima productividad células/ml.h	1,2 x 10 <sup>8</sup>	2,18 x 10 <sup>8</sup>	2,8 x 10 <sup>8</sup>	3,3 x 10 <sup>8</sup>	3,75 x 10 <sup>8</sup>	3,7 x 10 <sup>8</sup>
Velocidad específica de crecimiento (u) h <sup>-1</sup>	0,053	0,066	0,085	0,100	0,106	0,105

En todos los experimentos fue empleado: el medio balanceado (Nº 4), la concentración inicial de microorganismos fue ajustada a 1,5 x 10<sup>8</sup> cel/ml y el caudal de aire fue de 1 v/v.min.



traducen en la obtención de caldos con mayores concentraciones celulares.

En la figura 7 se presentan las curvas de evolución de pH, DO, recuento celular, consumo de sacarosa del proceso de crecimiento

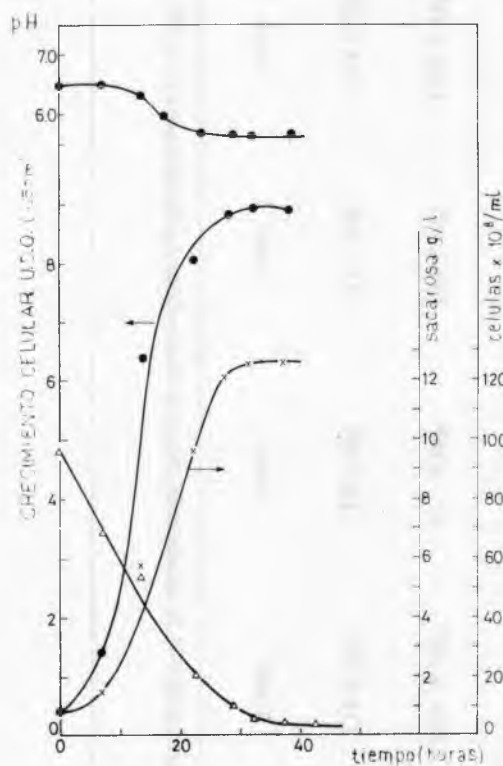


Figura 7: Proceso típico de crecimiento de *Rhizobium phaseoli* (F 45) en fermentadores con agitación mecánica.

Medio No 4 (balanceado); caudal de aire 1 l/l. min. Velocidad de agitación 400 rpm.

● UDO y pH

X cel. viables

△ concentración de sacarosa

de *Rhizobium phaseoli* en el medio balanceado a 400 rpm. La constante de rendimiento  $Y = 0,45$  presenta un valor normal para este tipo de proceso y la curva de sacarosa muestra que cuando se alcanza la máxima concentración celular se ha consumido casi totalmente.

## DISCUSION

Los estudios demostraron que la sacarosa, el glicerol y la lactosa son los glúcidos más recomendables para obtener alto número de células de *Rhizobium phaseoli* F-45, en tiempos cortos de proceso. Se seleccionó la sacarosa por ser el de menor costo.

Los ensayos con diferentes vitaminas demuestran la necesidad de suplementar el medio pre-inóculo con biotina. Cuando se omite el agregado de biotina, el crecimiento celular se retarda enormemente y, en algunos casos, no se observa crecimiento celular. Este comportamiento está de acuerdo con algunos investigadores que indican la necesidad de suplementar los medios de cultivo para el desarrollo de *Rhizobium phaseoli* con factores de crecimiento, tales como biotina, pantotenato de calcio, etc. (Vincent, 1977).

El pH inicial del medio de cultivo puede tener un gran significado en el desarrollo de la cepa, como acontece en este caso, donde se demuestra que operando a pH 6,5 se reduce notablemente la fase de retardo de la curva de crecimiento, obteniéndose al final del proceso un valor de pH 5,7 adecuado para medios de cultivo que se utilizan para la impregnación de soportes.

En cuanto al efecto de las fuentes nitrogenadas, que en nuestro caso también se comportan como factores de crecimiento, se demuestra el efecto favorable de una determinada concentración de peptona y extracto de levadura. Esta influencia positiva está relacionada con el suministro de fracciones nitrogenadas, tales como aminoácidos, péptidos de bajo peso molecular (dipéptidos, tripéptidos, etc.) como así también vitaminas y otros factores que aporta el extracto de levadura (Vincent, 1977). La limitación del crecimiento celular observado en medios que contienen concentraciones de extracto de levadura superiores a 4 g/l es atribuible al efecto inhibitorio de ciertos componentes presentes en el extracto (Sherwood, 1972).

Por otra parte, la relación establecida de fuentes nitrogenadas y de factores que constituyen la peptona y el extracto de levadura



favorecen la evolución de pH en valores comprendidos entre 5,7 y 6,5.

La concentración inicial de microorganismos resulta de gran importancia en razón de su influencia sobre los períodos de retardo del crecimiento microbiano. Es de resaltar que inóculos con un número de  $1 \times 10^8$  cel/ml, además de suministrar una alta concentración inicial, aportan también factores que son estimulantes del crecimiento microbiano que provienen en parte de la autólisis celular.

Los resultados de los experimentos realizados en fermentadores muestran que operando a 400 rpm y empleando 1 laire/l.min. (VAO 812 ml  $O_2$ /1xh) se satisfacen las necesidades de oxígeno del cultivo y que una mayor disponibilidad del mismo no mejora los rendimientos. A más bajos valores de VAO las menores concentraciones alcanzadas pueden atribuirse a una insuficiente transferencia de materia.

Estos estudios han permitido establecer condiciones de medio y operación que aseguran la obtención de suspensiones de *Rhizobium phaseoli* del orden de  $1 \times 10^{10}$  cel/ml que está muy encima de los valores recomendados (Vincent, 1970) para la impregnación de soportes en la preparación de inoculantes.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) Balatti, A. P. y L. A. Mazza, 1970. Producción de inoculantes para leguminosas. *ION*, 30: 270-275.
- 2) Burton, J. C., 1979. *Rhizobium species*. En: Peppler, H. J. y Perlman, D. (Ed.). *Microbial Technology*. Second Edition, Vol. 1. Academic Press Inc. 552 pp.
- 3) Chakrabarti, S.; M. S. Lee and A. H. Gibson, 1981. Diversity in the nutritional requirements of strains of various *Rhizobium species*. *Soil Biol. Biochem.*, 13: 249-354.
- 4) Cooper, C. M.; G. S. E. Fernston and S. A. Miller, 1944. Performance of agitated gas liquid contactors. *Ind. Eng. Chem.*, 36: 504-509.
- 5) Graham, P. H., 1963. Vitamin requirements of root nodule bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 30: 245.
- 6) Hyvarinnen, A. and E. A. Nikkila, 1962. Specific determination of blood glucose with O-Toluidine. *Clin. Chem. Acta*, 7: 140-147.
- 7) Sherwood, M. T., 1972. Inhibition of *Rhizobium trifolii* by yeast extracts of glycine is prevented by calcium. *J. Gen. Microbiol.*, 71: 351-358.
- 8) Vincent, J. M., 1977. *Rhizobium General Microbiology*. En: Hardy, R.W.F. (Ed.) *A treatise on dinitrogen fixation*. Sect. III. John Wiley & Sons. New York, 675 pp.
- 9) Vincent, J. M., 1970. *A manual for the practical study of the root nodule bacteria*. International Biological Programme. London. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburgh. 164 pp.