

## Obtención de biomasa de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*: Influencia de la concentración de nutrientes y de la aeración

### Biomass production of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains: effect of media nutrient concentration and aeration

Recibido: 5/7/95 Aceptado : 24/7/96

Ronchi, A.L.<sup>1</sup>; A. Grassano<sup>1</sup> y A.P. Balatti.<sup>1</sup>

#### Resumen

En este trabajo se estudia el crecimiento de cepas de *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*, en sistema batch con el propósito de obtener suspensiones de muy alta concentración celular. Para tal fin se considera la influencia de la aeración y de los constituyentes del medio de cultivo. Las experiencias fueron realizadas en frascos erlenmeyers en un agitador rotatorio y en fermentador con agitación mecánica. La evolución del crecimiento celular fue determinada en base a medidas de densidad óptica, recuento de células viables, y peso seco. Usando el medio seleccionado y las cepas de *Rhizobium meliloti* B 36, B 399, *Rhizobium trifolii* A 113, *Rhizobium loti* LL 22, *Rhizobium leguminosarum* D 70 y *Bradyrhizobium japonicum* E 109, E 110 y E 45 fue posible obtener concentraciones de microorganismos de  $6 \times 10^{10}$  a  $1 \times 10^{11}$  células viables/ml en 48 y 96 horas de proceso, que corresponden a valores de peso seco del orden de 10 a 12 g/l. Además se determinaron valores de presión osmótica del orden de 300 miliosmoles. Por último, es de destacar que las cepas desarrolladas en los nuevos medios seleccionados mantienen su capacidad fisiológica.

**Palabras claves:** Producción de biomasa. *Rhizobium*. *Bradyrhizobium*.

#### Summary

This paper reports a work on growth strains of the *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, in a batch system, in order to obtain microorganisms suspensions of a very high cell concentration. In the process of designing the culture media the influence of the aeration and the nutrient concentration is considered. The experiments were carried out in a erlenmeyers flask on rotatory shaker and in laboratory fermentors. The evolution of cell growth was determined according to measures of optical density, viable cell count and dry weight. Using a selected balanced media and strains such as *Rhizobium meliloti* B 36, B 399, *Rhizobium trifolii* A 113, *Rhizobium loti* LL 22, *Rhizobium leguminosarum* D 70 and *Bradyrhizobium japonicum* E 109, E 110 and E 45, it was possible to obtain microorganisms concentrations of  $6 \times 10^{10}$  to  $1 \times 10^{11}$

<sup>1</sup> Programa de Microbiología y Química Agrícola. Departamento de Química. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de La Pampa. Uruguay 151. (6300) Santa Rosa. La Pampa. Argentina.

viable cell/ml in 48 and 96 hour processes, corresponding to dry weight concentrations higher than 10 g/l. The osmotic pressure in the selected medium was in the order of 300 miliosmoles. The modifications introduced in the culture media to achieve high microorganisms concentration did not alter the nitrogen fixation capacity of the strains.

Key words: Biomass productions. *Rhizobium*. *Bradyrhizobium*.

## Introducción

La obtención de biomasa con alta concentración de microorganismos es una premisa fundamental en el desarrollo de suspensiones celulares de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* destinados a la elaboración de inoculantes comerciales. Roughley (1985 y 1988) puntualiza que el éxito de los programas de inoculación de leguminosas depende entre otros factores de la concentración de microorganismos que tiene el inoculante y de la densidad de siembra. Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, en el presente trabajo se estudia la obtención de biomasa de altas concentraciones celulares de cepas de los géneros antes indicados.

Los estudios fueron programados tomando inicialmente un medio base que indica la bibliografía y teniendo en cuenta las recomendaciones de algunos autores tales como Vincent (1977), Balatti *et al* (1991) y Balatti (1992) a fin de determinar la influencia de diferentes nutrientes en el crecimiento celular. Así se analiza la influencia de la concentración de fosfato, fuente de carbono, nitrógeno y factores de crecimiento bajo condiciones de operación que aseguren una correcta aeración de los medios de cultivo (Balatti *et al*. 1987). Además en razón de que los medios son incrementados en sus constituyentes, se evalúa el valor de la

presión osmótica de los mismos a fin de establecer su compatibilidad con el desarrollo celular.

Por otra parte es de destacar que la velocidad de crecimiento de los microorganismos en los nuevos medios es muy similar, lo cual nos está indicando que no existen limitaciones en esta nueva condición, como así también lo demuestra la transferencia de oxígeno al medio de cultivo ya que la concentración de oxígeno disuelto no baja del 30% del valor de saturación en su valor mínimo.

## Materiales y métodos

**Microorganismos:** Las cepas utilizadas fueron *Bradyrhizobium japonicum* E 109, E 110 y E 45, *Rhizobium meliloti* B 36 y B 399, *Rhizobium leguminosarum* D 70, *Rhizobium trifolii* A 113 y *Rhizobium loti* LL 22.

Estos microorganismos fueron suministrados por el Ing. Alejandro Peticari, de INTA Castelar, Villa Udaondo, Pcia. de Buenos Aires.

**Medio:** Los medios usados en los procesos son indicados en la Tablas 1 y Tabla 2.

**Inóculo:** Fueron preparados con los medios base (medio 1 de Tablas 1 y 2) pero empleando el 50% de fuente de carbono y extracto de levadura.

Para la transferencia del inóculo, se utilizó un volumen del orden del 10% tratando de alcanzar en todos los procesos una concentración inicial no inferior a  $10^8$  células viables/ml.

**Crecimiento celular:** El crecimiento celular fue evaluado en base a medidas de: densidad óptica a 600 nm, recuento de células viables aplicando el método de Koch (1981) y peso seco.

**Medidas de la presión osmótica:** Fue determinada con un osmómetro de Fiske modelo G 66 en el rango 0-1000 miliosmol.

**Demanda celular de oxígeno:** Fue determinada en un respirómetro Warburg, según la técnica recomendada por Umbreit et al (1972).

**Velocidad de absorción de oxígeno:** La velocidad de absorción de oxígeno fue evaluada aplicando el método del sulfito (Cooper et al 1944).

**Porcentaje de oxígeno disuelto:** Fue medido con un electrodo galvánico Ag-Pb.

**Condiciones de operación:** Los inóculos fueron desarrollados en frascos erlenmeyers de 250 ml con 50 ml de medio y los procesos en erlenmeyers de 1000 ml con 200 ml de caldo. Los mismos fueron esterilizados en autoclave a  $121^{\circ}$  C durante 20 minutos. Una vez fríos, se sembraron con las cepas mencionadas y se colocaron en agitador rotatorio a 250 rpm y 2,5 cm de excentricidad en cuarto estufa a  $28^{\circ}$  C, durante 48 horas para las cepas de crecimiento

rápido y 96 horas para las de crecimiento lento. Además se desarrollaron los cultivos en fermentador con agitación mecánica a 350 rpm empleando 1 volumen de aire/volumen de medio/minuto. Se utilizó un equipo con dos turbinas de cuatro paletas cada una y un diámetro de 8 cm. El diámetro del frasco es de 14 cm y la altura de 34 cm. El reactor posee cuatro cortacorrientes de 1,5 cm de ancho. La conexión a monitores permite obtener medidas y control de temperatura y velocidad de agitación, medida de la concentración de oxígeno disuelto por medio de un electrodo Ag-Pb y control de espuma mediante el agregado automático de antiespumante emulsionable AE al 33%. La temperatura fue mantenida a  $28^{\circ}$ C. El fermentador fue esterilizado a  $121^{\circ}$ C durante 30 minutos.

**Evaluación de la capacidad simbiótica:** Las semillas de soja y alfalfa fueron inoculadas de acuerdo a los métodos recomendados por Lopreto et al (1973) y Vincent (1970) respectivamente, según el siguiente esquema: tratamiento 1 sin inoculación (control); tratamientos 2 y 3 usando suspensiones de microorganismos obtenidas en el medio base (medio 1 de Tablas 1 y 2) y en los medios modificados (medio 7 de Tabla 1 y medio 4 de Tabla 2) respectivamente. Se determinó, tanto en las plantas de soja como en las de alfalfa, peso seco y contenido de nitrógeno de la parte aérea y el número de nódulos.

## Resultados

**Experiencias con cepas de crecimiento lento.** En una primera

serie de experiencias se realizaron procesos con diferentes concentraciones de fosfatos a fin de compatibilizar su nivel y naturaleza con la regulación de pH. Estos ensayos se hicieron sobre el medio base (medio 1 de Tabla 1), donde se varió la concentración de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  y  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  entre 0,5 y 1,8 g/l y la de  $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$  entre el 0,3 y 0,6 g/l. Aquí se vió que la integración del medio de cultivo con 0,5 g/l de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  y  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  y la adición de 0,3 g/l de  $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$  aseguraba una buena regulación del pH del medio de cultivo.

Posteriormente ajustado ya el medio en cuanto a la concentración de fosfatos se realizaron experiencias con diferentes niveles de concentración de glicerol y nitrato de potasio (medios 3 y 4 de Tabla 1). Aquí se observó que cuando se duplica la tasa de fuente de carbono y de nitrógeno se obtienen valores de densidad óptica del orden de 14 (Figura 1).

Sobre el medio base, corregido en sus concentraciones de fosfato, fuente de carbono y nitrógeno (medio 3 de Tabla 1), se incrementó la concentración de extracto de levadura a 6g/l, pero este incremento de 2g/l se hizo con y sin agregado de  $\text{CaCl}_2$  (medios 6 y 7 de Tabla 1). Los resultados obtenidos que se indican en la Figura 2, muestran que el incremento del extracto de levadura favorece una mayor obtención de biomasa cuando su adición (2g/l) se realiza a las 48 horas de proceso. Por otra parte la adición de  $\text{CaCl}_2$  no tuvo ninguna influencia para el medio estudiado.

En la Figura 3, se muestran los resultados obtenidos en fermentador con agitación mecánica, utilizando una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* E 109 donde se presenta la evolución del crecimiento en función del peso seco, densidad óptica, consumo de fuente de carbono y oxígeno disuelto. Se observa que los valores de biomasa son similares a los obtenidos en agitador rotatorio y que la concentración de oxígeno disuelto en su valor mínimo está en el orden de 26-27 %.

Paralelamente a los ensayos de crecimiento celular, en razón del incremento de la concentración de nutrientes, los medios fueron evaluados en su presión osmótica. Los valores para el medio 7 (Tabla 1), que corresponde al medio final seleccionado, están en el orden de 300 miliosmoles.

**Experiencias con cepas de crecimiento rápido.** En las experiencias empleando las cepas indicadas, se determinó que la integración del medio con 0,5 g/l de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  producía una muy buena regulación del pH, esto se puede observar en las Figuras 4 y 6 donde el pH varía entre 7 y 7,35.

En la Figura 4 se presentan los resultados obtenidos con una cepa de *Rhizobium meliloti* B 36. Se observa que el máximo crecimiento se alcanza cuando se lleva la concentración de nitrato de potasio y sacarosa a 2,4 y 30 g/l respectivamente (medio 4 de Tabla 2) y que el aumento de concentración de extracto de levadura (medio 3 y 5 de Tabla 2) no favorece la obtención de mayores niveles de células. Es de

destacar que la adición de  $\text{CaCl}_2$  con y sin agregado de extracto de levadura no produjo ningún efecto positivo.

En la Figura 5 se presentan los resultados obtenidos del desarrollo de una cepa de *Rhizobium meliloti* en fermentadores agitados. Se alcanzan valores semejantes de densidad óptica a los obtenidos en erlenmeyers los cuales se corresponden con un peso seco de aproximadamente 12 a 13 g/l, como se ve la concentración de oxígeno disuelto en su valor mínimo es del 30% del valor inicial.

En la Figura 6 se presenta la evolución del crecimiento celular de *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium trifolii* y *Rhizobium loti* utilizando el medio 4 de Tabla 2, se ve que existe un comportamiento similar al alcanzado con *Rhizobium meliloti*.

La Tabla 3 muestra la máxima concentración celular obtenida utilizando diferentes cepas de crecimiento rápido y lento. Se ve que las suspensiones de *Bradyrhizobium* a las 96 horas de proceso alcanzan el orden de 6 a 7 x  $10^{10}$  células viables/ml, mientras que con los microorganismos de crecimiento rápido se llega a valores de 7,4 x  $10^{10}$  a  $10^{11}$  células viables/ml a las 48 horas.

**Ensayos agronómicos.** En las Tablas 4 y 5 se muestran los valores de número de nódulos, materia seca y porcentaje de nitrógeno de ensayos de crecimientos de plantas de soja y alfalfa, obtenidos de 10 (diez) repeticiones para cada tratamiento en ambas leguminosas.

## Discusión

Las modificaciones introducidas en medios donde se utilizan cepas de crecimiento lento demuestran que aumenta sensiblemente la concentración de microorganismos cuando se incrementa la fuente de carbono, nitrógeno y factores de crecimiento. El aumento de concentración de extracto de levadura a 6 g/l debe realizarse adicionando 2 g/l a las 48 horas de proceso, de esta manera además de mejorar los rendimientos celulares, se evita el efecto negativo que se produce en el medio para concentraciones mayores de 4 g/l de extracto de levadura. La adición del  $\text{CaCl}_2$  no tuvo el efecto esperado. Vincent (1980) indica que la mayor concentración de extracto de levadura produce un efecto quelante sobre el ión calcio. Para las cepas por nosotros ensayadas, para las condiciones utilizadas no se observó ningún efecto positivo del agregado de  $\text{CaCl}_2$ .

Por otra parte si consideramos experiencias con cepas de crecimiento rápido, para los microorganismos utilizados surge que se incrementa notablemente la biomasa cuando solamente se aumenta la concentración de sacarosa y nitrato de potasio. El aumento de concentración de extracto de levadura no produce el efecto esperado, es probable que la concentración de 4 g/l sea suficiente para suministrar los requerimientos en factores de las cepas empleadas.

Además es de destacar que, si bien se aumenta la concentración de nutrientes ensayados, la presión osmótica de los medios está en el

orden de 300 miliosmoles, valores compatibles con el desarrollo celular (Pirt, 1975).

En cuanto a la modificación introducida en los medios aumentando la concentración de nutrientes, su nueva condición, como así también el desarrollo celular alcanzado no limitan la transferencia de oxígeno al medio de cultivo ya que la concentración de oxígeno disuelto no baja del 30% del valor de saturación en su valor mínimo.

Los ensayos realizados con plantas de soja y alfalfa, utilizando cepas desarrolladas en los medios seleccionados nos están indicando que los microorganismos mantienen sus propiedades fisiológicas

## Conclusiones

Como corolario de estas investigaciones surge la posibilidad industrial de poder incrementar sensiblemente la concentración de las suspensiones celulares que normalmente se utilizan en la elaboración de inoculantes comerciales, lo cual representa un avance tecnológico significativo, en razón de la alta disponibilidad de microorganismos en el entorno de la semilla y consecuentemente de la rizosfera.

## Bibliografía

BALATTI A.P., MAZZA L.A., MORETTI E. 1987. Aeration requirement of *Rhizobium* culture. MIRCEN. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 227-34.

BALATTI A.P., MAZZA L.A., PASTOR M.D. 1991. Effect of media nutrient concentration on growth of *Bradyrhizobium japonicum*. Tropical Agriculture. 68:215-218.

BALATTI A.P. 1992. Diseño de medios de cultivo. En: Producción de Inoculantes para Leguminosas. Tecnología de las fermentaciones aplicadas a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Ediciones Trabuco. La Plata. Argentina. 63-127.

COOPER C.M., FERST G., MILLES.A. 1944. Gas liquid contactor. Industrial and Engineering Chemistry. 36:504-509.

KOCH A. 1981. Growth Measurement. In Manual of methods general bacteriology. Whashington D.C. American Society for Microbiology. 179-207.

LOPRETO C.P., MAZZA L.A., BALATTI A.P. 1973. Producción de inoculantes para soja. Revista Facultad de Agronomía. La Plata XLIX: 201-212.

PIMENTEL, G.F. 1958. Curso de estadística experimental. Ed. Hemisferio Sur S.A. 173-176.

PIRT S.J. 1975. Oxygen demand supply. In Principles of microbes and cell cultivation. Oxford: Blackwell Scientific Publication. 81-106.

ROUGHLEY R.J. 1985. Products and quality contents of legume seed inoculant in Australia. In Proceeding of the Workshop on Rhizobium/legume inoculant Porto Alegre. R.S. Brasil. 37-42.

ROUGHLEY R.J. 1988. Legume inoculants; their technology and application. Nitrogen Fixation by Legumes. In Mediterranean Agriculture. Edited by Beck and Materon. 259-267.

UMBREIT W.W., BURRIS R.H., SAUFFER J.F. 1972. The Warburg constant volume respirometer. *Manometric Techniques*. Burgess Publishing Company, 1-17.

VINCENT J.M. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication Oxford. 163 pag.

VINCENT J.M. 1977. *Rhizobium* : General microbiology. In *A Treatise on Dinitrogen Fixation*. Sec. III. Hardy and Silver (Eds). John Wiley and Sons. New York. 277-366.

VINCENT J.M. 1980. Australian studies of legume/Rhizobium symbiosis. *Rhizobium News Letter*. 25:



TABLA 1: Composición de medios (g/l) de cepas de crecimiento lento. El medio 1 (medio base) es modificado en la concentración de los fosfatos, nitrato de potasio, glicerol y extracto de levadura con y sin agregado de cloruro de calcio.

MEDIO	1	2	3	4	5	6	7
Componentes							
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3	0,6	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
KNO <sub>3</sub>	0,8	0,8	1,6	2,4	1,6	1,6	1,6
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Ext. Levadura	4	4	4	4	4	4+2	4+2
Glicerol	10	10	20	30	20	20	20
CaCl <sub>2</sub>	-	-	-	-	0,15	0,15	-

En todos los casos las concentraciones de FeCl<sub>3</sub> y de MnSO<sub>4</sub> fueron de 3,68 y 4,47 x 10<sup>-5</sup> mol/l. El pH fue ajustado a 6,9 antes de la esterilización

TABLA 2: Composición de medios (g/l) de cepas de crecimiento rápido. El medio 1 (medio base) es modificado en la concentración de nitrato de potasio, sacarosa y extracto de levadura.

MEDIO	1	2	3	4	5
Componentes					
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Sacarosa	10	20	20	30	30
Ext. Levadura	4	4	4+2	4	4+2
KNO <sub>3</sub>	0,8	1,6	1,6	2,4	2,4

En todos los casos la concentración del FeCl<sub>3</sub> y el MnSO<sub>4</sub> fueron de 3,68 y 4,47 x 10<sup>-5</sup> mol/l. El pH fue ajustado a 6,9 antes de la esterilización.



TABLA 3: Máxima concentración celular obtenida en el medio modificado usando diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* E 109, E 110, E 45; *Rhizobium meliloti* B 36, B 399; *Rhizobium loti* LL 22; *Rhizobium leguminosarum* D 70; *Rhizobium trifolii* A 113.

MICROORGANISMOS	CONCENTRACIÓN CELULAR x 10 <sup>10</sup>	TIEMPO DE PROCESO h.
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E 109	6,7	96
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E 110	6,5	96
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E 45	6,6	96
<i>Rhizobium meliloti</i> B 36	10	48
<i>Rhizobium meliloti</i> B 399	9,7	48
<i>Rhizobium loti</i> LL 22	8,5	48
<i>Rhizobium leguminosarum</i> D 70	7,4	48
<i>Rhizobium trifolii</i> A 113	8,0	48

TABLA 4: Plantas de soja inoculadas con suspensiones de *Bradyrhizobium japonicum* E 109 obtenidas en el medio seleccionado (medio 7, tabla 1).

MEDIO	NITROGENO %	PESO SECO PARTE AEREA (g)	Nro. NODULOS
Control	1,29 (a)	4,80 (a)	----
Medio base	2,36 (b)	7,70 (b)	32
Medio seleccionado	2,43 (b)	7,90 (b)	35

Las medias indicadas con las mismas letras no son significativamente diferentes de acuerdo al test de Tuckey (Pimentel, 1958).

TABLA 5: Plantas de alfalfa inoculadas con suspensiones de *Rhizobium meliloti* B 36 obtenidas en el medio seleccionado (medio 4, tabla 2)

MEDIO	NITROGENO (%)	PESO SECO PARTE AEREA (mg)	Nro. NODULOS
Control	1,50 (a)	7,80 (a)	----
Medio base	3,15 (b)	25,60 (b)	17
Medio seleccionado	3,10 (b)	26,70 (b)	19

Las medias indicadas con las mismas letras no son significativamente diferentes de acuerdo al test de Tuckey (Pimentel, 1958).

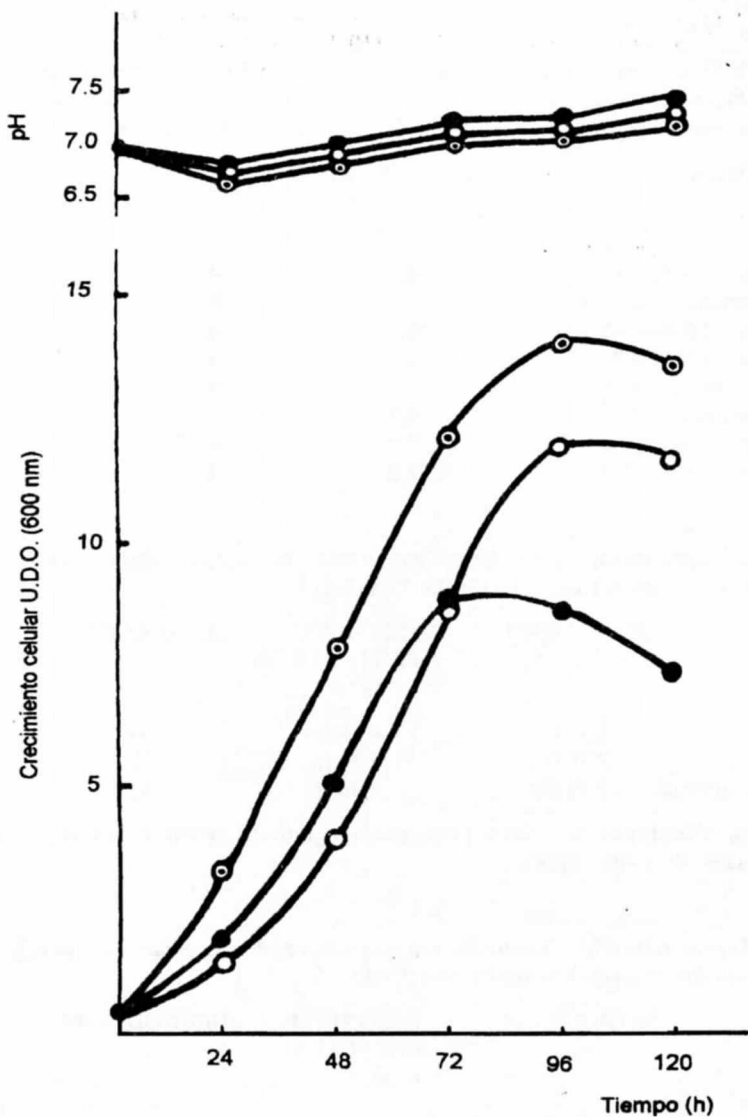


Figura 1. Crecimiento celular de una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* E 109, en medios con diferentes concentraciones de glicerol y nitrato de potasio.

● Medio 1 ; ○ Medio 3 ; ○ Medio 4 ; (Tabla 1)

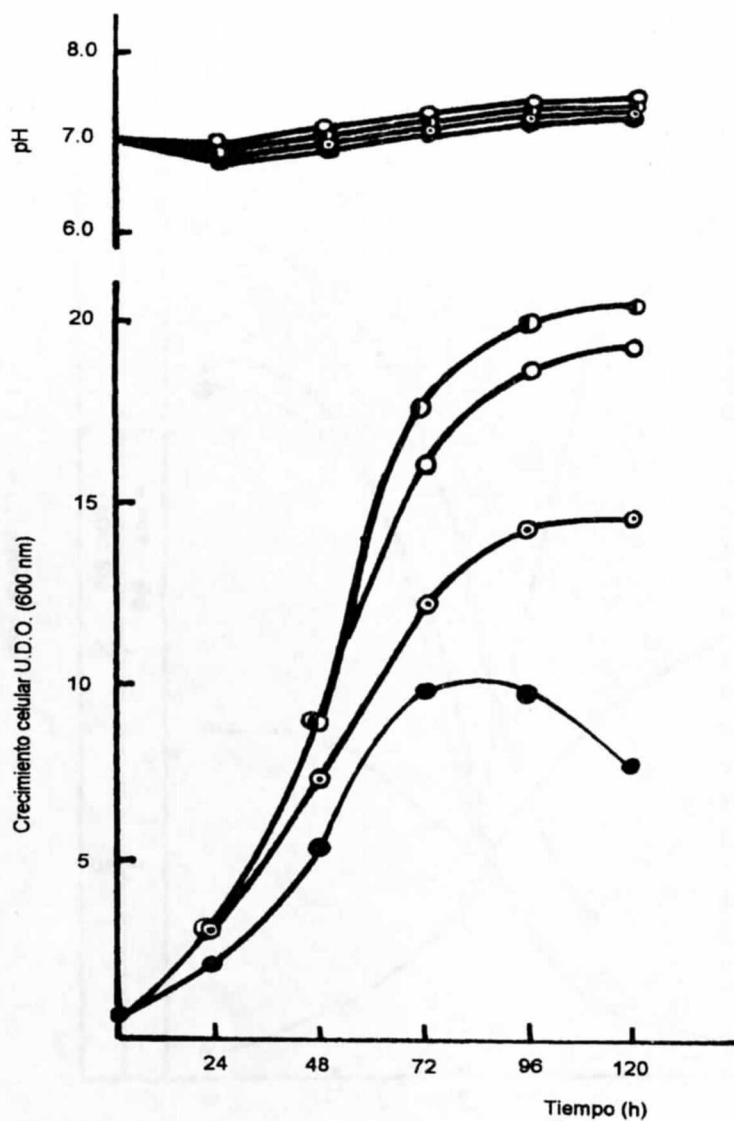


Figura 2. Crecimiento celular de una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* E 109, en medios con diferentes concentraciones de extracto de levadura con y sin agregado de cloruro de calcio. ● medio 1 ; ○ medio 3 ; ◐ medio 6 ; ◑ medio 7 ; (Tabla 1)

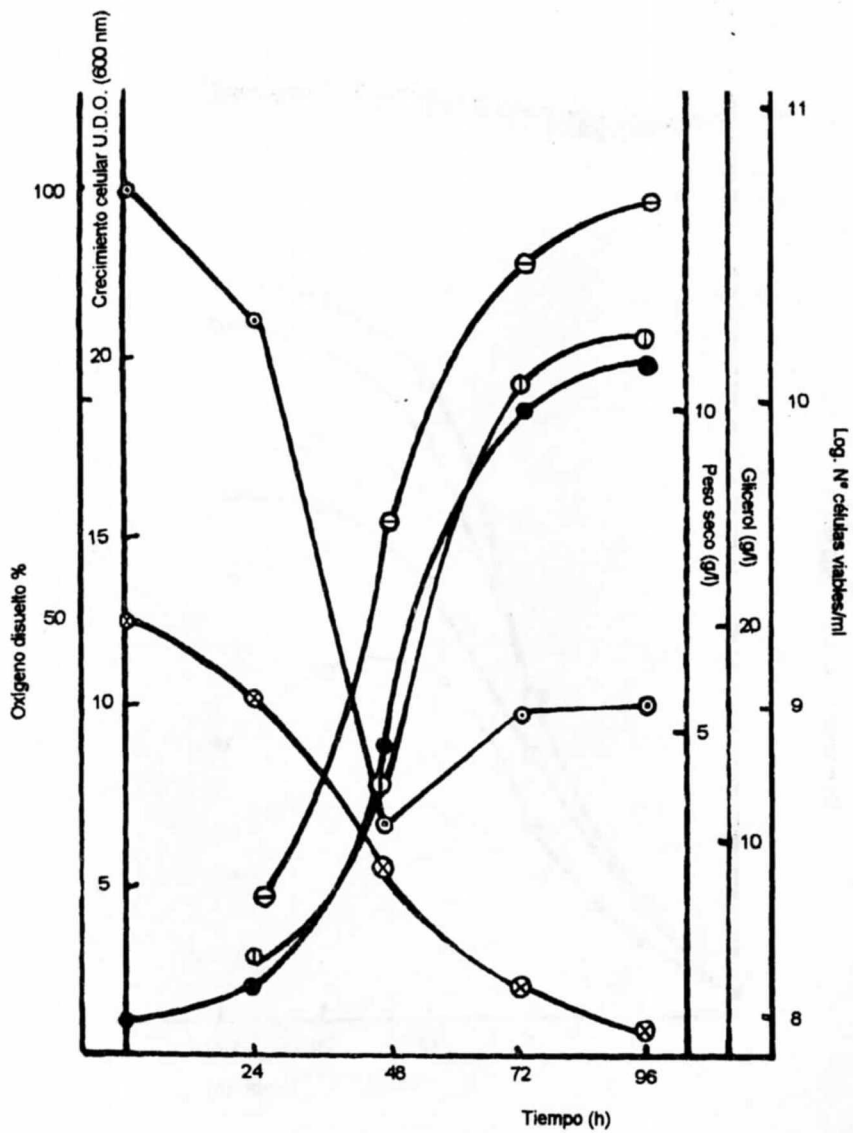


Figura 3. Curvas típicas de crecimiento celular de una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* E 109 en el medio 7. (Tabla 1).  
 ○ densidad óptica ; ⊗ oxígeno disuelto (%); □ glicerol;  
 ○ Log. Nro. células viables / ml ; ● peso seco;

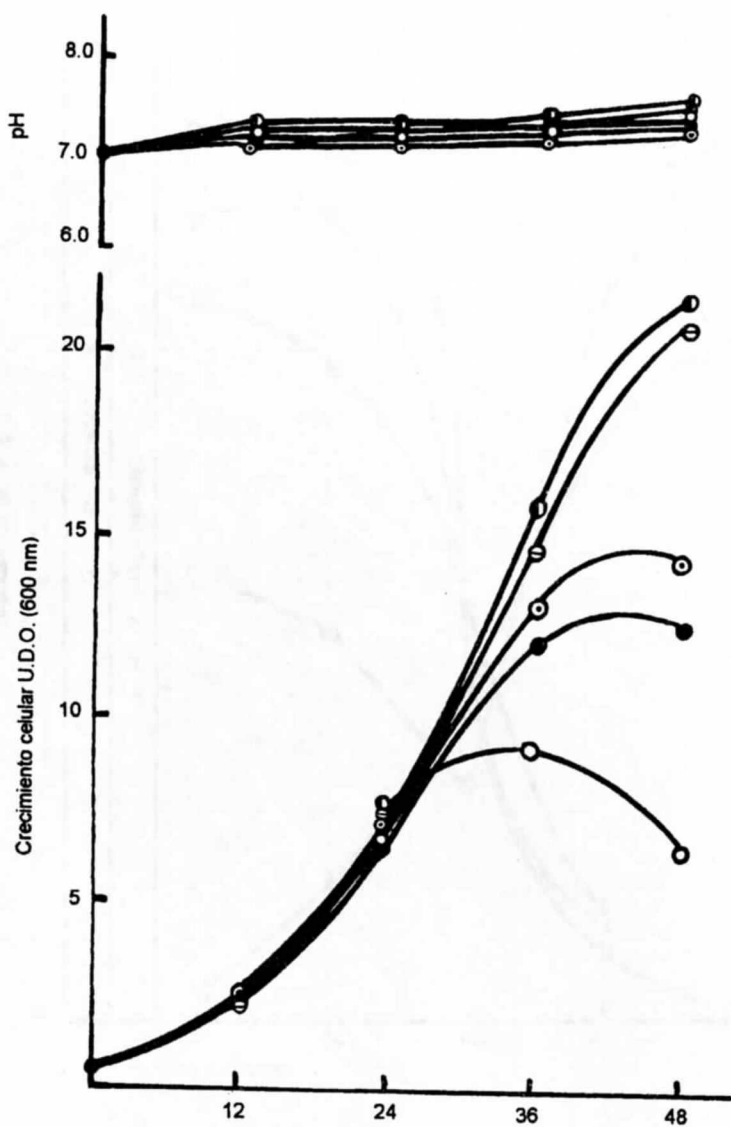


Figura 4. Crecimiento celular de una cepa de *Rhizobium meliloti* B 36 con diferentes concentraciones de sacarosa y nitrato de potasio.  
 ○ medio 1; ⊙ medio 2; ● medio 3. ● medio 4; ⊕ medio 5;

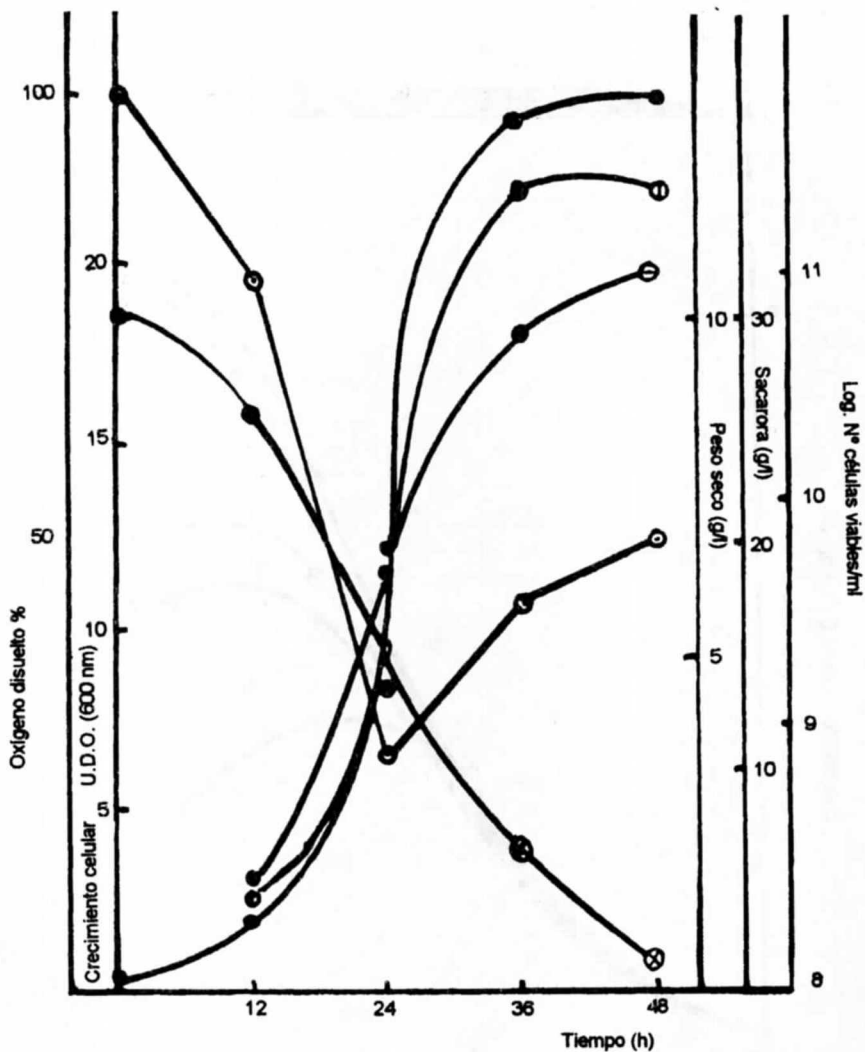


Figura 5. Curvas típicas de crecimiento celular de una cepa de *Rhizobium meliloti* B 36 en el medio 4. (Tabla 2).

⊙ densidad óptica ; ⊙ oxígeno disuelto (%); ⊗ sacarosa;  
 ⊕ Log. Nro. células viables / ml ; ● peso seco;

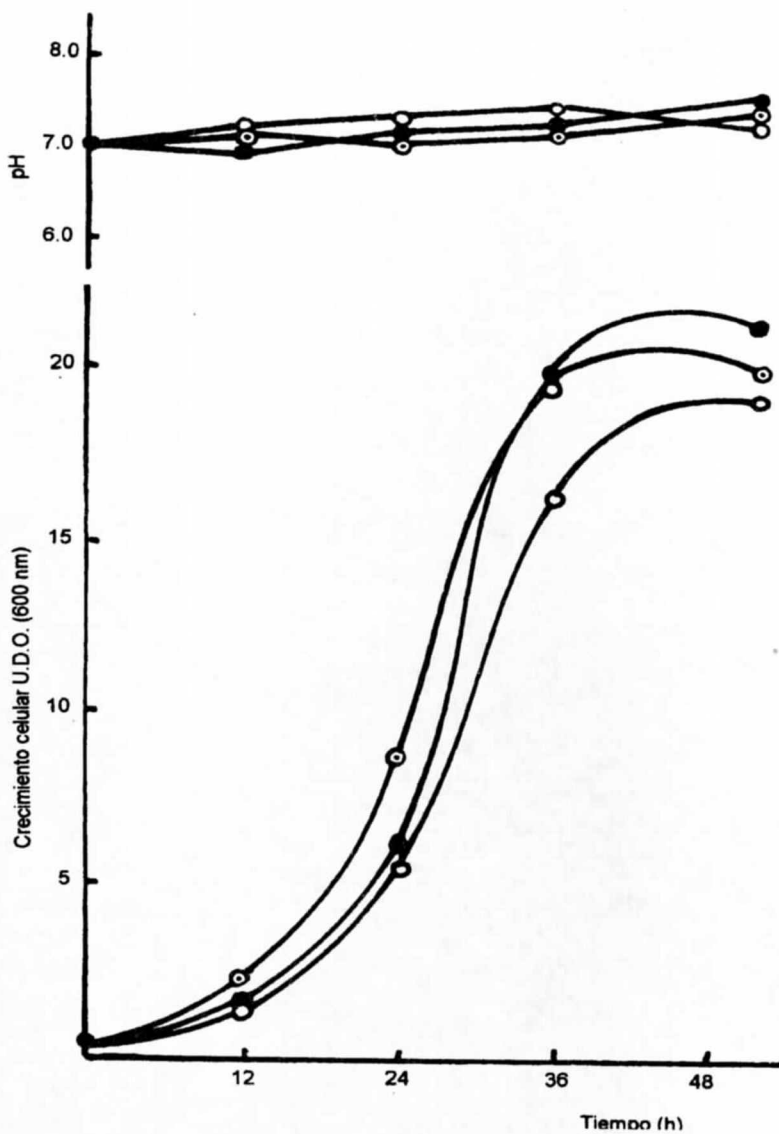


Figura 6. Crecimiento celular de diferentes cepas en el medio enriquecido. (medio 4 de Tabla 2).

- *Rhizobium trifolii* A 113; ○ *Rhizobium leguminosarum* D 70 ;
- *Rhizobium loti* LL 22.