

# EFECTO DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO EN LA MULTIPLICACIÓN CELULAR DE *Bradyrhizobium elkanii*

María C. Nápoles<sup>✉</sup>, J. Martínez, Daimy Costales, Gretel Gómez y Ellen Somers

**ABSTRACT.** Cells need a source of energy carbon and other nutrients to grow in nature or under laboratory conditions. They also require adequate oxygen concentration, temperature and pH conditions. In this work, the behaviour of two *Bradyrhizobium elkanii* strains in different culture media, was studied. Different cell multiplication dynamics were evident to each strain under those culture media, as a result of its nutrient composition. Modified propagation medium was notable for both strains studied.

*Key words:* culture media, *Bradyrhizobium*, cell multiplication

**RESUMEN.** Para crecer, ya sea en la naturaleza o en condiciones de laboratorio, las células necesitan de una fuente de energía, carbono y otros nutrientes, y condiciones tales como la concentración de oxígeno, temperatura y pH. En este trabajo se estudia el comportamiento de dos cepas de *Bradyrhizobium elkanii* en distintos medios de cultivo. Se evidenciaron diferentes dinámicas de multiplicación celular para cada cepa en los distintos medios, como resultado de su diferenciada composición nutricional. Se destacó para las dos cepas estudiadas el medio Propagación modificado.

*Palabras clave:* medio de cultivo, *Bradyrhizobium*, multiplicación celular

## INTRODUCCIÓN

Cada organismo requiere encontrar en su medio todas las sustancias necesarias para la generación de energía y biosíntesis celular. Los elementos de ese medioambiente que son utilizados para el crecimiento celular se refieren como nutriente (1). Los requerimientos nutricionales de una célula bacteriana son revelados por su composición elemental, la cual se compone de C, H, O, N, S, P, K, Mg, Fe, Ca, Mn y trazas de Zn, Co, Cu y Mo. Estos elementos se encuentran en forma acuosa, iones inorgánicos, pequeñas moléculas y macromoléculas, las cuales desempeñan un papel estructural o funcional en la célula.

Los medios de cultivo, ya sean preparaciones sólidas, semisólidas o líquidas, constituyen el micromundo de los microorganismos en condiciones de laboratorio, intentando ser un reflejo de su hábitat natural en relación con la satisfacción de sus más vitales y principales necesidades como ser vivo (2). El diseño de un medio de cultivo responderá entonces a las exigencias del microorganismo en cuestión y a la finalidad que se persigue con su multiplicación.

Los rizobios son organismos heterótrofos (utilizan como fuente de energía compuestos orgánicos) exigentes, que se desarrollan en medios ricos, aunque existen gran variedad de cepas que difieren en sus requerimientos nutricionales, necesitando en el medio vitaminas y/o aminoácidos (3).

Según la finalidad que se persiga, los medios a emplear para el cultivo de estos microorganismos pueden ser complejos o definidos. Los complejos son los más comúnmente empleados, sobre todo en la preparación de inoculantes y frecuentemente proporcionan el rango completo de factores de crecimiento que pueden ser requeridos por un organismo (4). Un ejemplo de este tipo de medio es el Medio YEM (extracto de levadura-manitol-agar) (5).

La composición del medio de cultivo puede influir sobre diferentes aspectos en la fisiología del microorganismo: su nutrición, multiplicación, la producción de metabolitos primarios y secundarios (6). Por ello, desde hace muchos años se diseñan medios con fines prácticos para fermentar poblaciones microbianas. Se ha encontrado un marcado efecto de diferentes medios de cultivo sobre la interacción de *Azotobacter-Rhizobium* así como sobre la nodulación, el crecimiento y desarrollo del trébol (7).

En las investigaciones llevadas a cabo con la cepa ICA 8001 en Cuba, comúnmente se ha empleado el medio YEM (5) y para la producción de inoculantes el medio Propagación (8), por lo que ambos son considerados como medios tradicionales para el cultivo de esta cepa.

Dra.C. María C. Nápoles, Investigador Auxiliar, Daimy Costales y Gretel Gómez, Reserva Científica del Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana; Dr.C. J. Martínez, Profesor Titular de la Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba; Dra. Ellen Somers, Investigadora Profesora del Centre of Microbial and Plant Genetics, Katholieke Universiteit, Leuven, Heverlu, Bélgica.

✉ tere@inca.edu.cu

Los medios de cultivo antes mencionados son considerados complejos. En el primero el extracto de levadura le imprime esta característica, mientras que en el medio Propagación la melaza además del extracto de levadura aporta varios compuestos a su complejidad. Ambos medios han permitido durante años la multiplicación celular de la cepa ICA 8001 y la obtención de inóculos con fines prácticos sobre la fertilización de la soya, con resultados satisfactorios. Sin embargo, no se ha tenido en cuenta en el diseño de estos medios de cultivo la posibilidad de inducir a una expresión más elevada los genes de nodulación en la bacteria, lo cual sin dudas, los haría más eficientes.

Por lo anterior se hace necesaria la optimización o el diseño de medios de cultivos, que tengan como objetivos ambas características: alta obtención de biomasa y de producción de factores Nod.

En este trabajo se estudia el efecto de un nuevo medio de cultivo sobre la multiplicación celular de dos cepas de *B. elkanii*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron los medios YEM (5), Propagación (8) y Propagación modificado (9) para estudiar la dinámica de crecimiento de *Bradyrhizobium* con las cepas *B. japonicum* ICA 8001 y *B. elkanii* LMG 6134. Se molieron semillas frescas de soya de la variedad Cubasoy 23 y se procesaron en un molino foliar. La melaza utilizada provino del Complejo Agroindustrial "Héctor Molina", ubicado en la Provincia La Habana, zafrá 1995.

Se evaluó el efecto de los factores medio de cultivo y cepas, con tres y dos niveles respectivamente, empleándose cinco réplicas por tratamiento en un diseño completamente aleatorizado.

Como inóculo estas cepas fueron cultivadas durante tres días en medio YEM, a 30°C y en condiciones de agitación. Los precultivos se diluyeron en  $MgSO_4$  (10 mM), hasta un valor de densidad óptica de 0.3 a  $\lambda=595$  nm (dilución aproximada de 10 veces; espectrómetro Lambda-2, Perkin Elmer, UV/VIS). Posteriormente, los inóculos con igual número de bacterias se diluyeron 100 veces en los diferentes medios de cultivo bajo estudio y 300 mL de cada una de las suspensiones bacterianas se inocularon en los pozos de una placa de microtítulo.

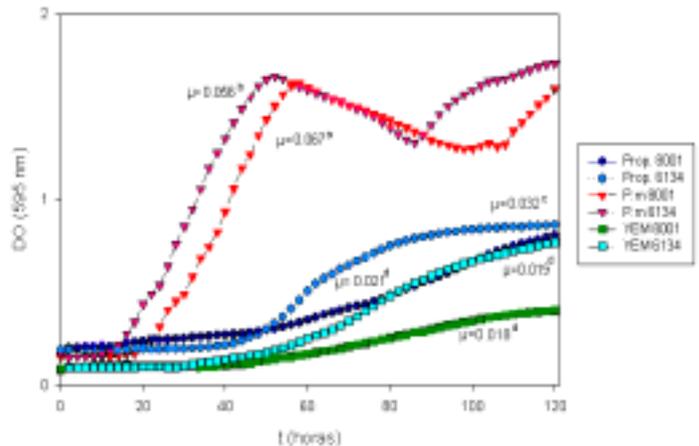
Las bacterias se cultivaron a 30°C durante seis días a 230 rpm y su multiplicación fue medida automáticamente cada 30 minutos en un Bioscreen C (Labsystems, Helsinki, Finlandia), a una longitud de onda de 595 nm. Para cada punto se calculó la densidad óptica promedio y se representaron los valores cada 120 min, después de lo cual se calculó la velocidad específica de crecimiento  $m$  ( $h^{-1}$ ) en la fase lineal del crecimiento exponencial según:

$$\mu = \frac{\ln(DO_2/DO_1)}{t_2 - t_1}$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar la dinámica de crecimiento de las cepas *B. elkanii* ICA 8001 y *B. elkanii* LMG 6134 frente a los medios YEM, Propagación y Propagación modificado, se encontró interacción entre los factores medio de cultivo - cepa de *Bradyrhizobium*, con diferencias altamente significativas para el factor medio de cultivo y no significativas para el factor cepa.

El medio nuevo "Propagación modificado" mostró una clara superioridad en su capacidad de permitir una multiplicación celular mayor, con respecto a los medios tradicionales para las dos cepas estudiadas (Figura 1).



Prop: medio Propagación P.m: medio Propagación modificado  
 YEM: medio YEM  
 ES\*\*\* = 0.0027  
 P < 0.001 n=5

**Figura 1. Dinámica de crecimiento de las cepas ICA 8001 y LMG 6134 en diferentes medios de cultivo**

Si se comparan los medios tradicionales, para la cepa LMG 6134, el medio Propagación superó en velocidad específica de crecimiento al medio YEM; sin embargo, para la cepa ICA 8001 el comportamiento en estos medios fue similar.

La dinámica de la cepa ICA 8001 en el medio Propagación modificado mostró la fase de latencia entre las 0 y las 8 horas; la exponencial entre las 8 y las 55 horas y la estacionaria a partir de este momento y hasta las 72 horas, tiempo en el cual comienza la fase de declinación o muerte (según otros ensayos realizados no mostrados en este trabajo). El máximo de población se obtuvo alrededor de las 55 horas de cultivo, con un valor de densidad óptica de 1.60 en longitud de onda 595 nm y la velocidad máxima de crecimiento se observó aproximadamente a las 31 horas.

La velocidad específica del crecimiento para esta cepa en este medio fue de  $0.067 h^{-1}$ , mientras que en los medios tradicionales YEM y Propagación fue de  $0.018 h^{-1}$  y  $0.020 h^{-1}$ , respectivamente.

Se evidenció un comportamiento similar de la cepa 6134 al presentado por la cepa ICA 8001, en cuanto a las diferentes fases del crecimiento frente a todos los medios de cultivo. En el medio Propagación modificado esta cepa alcanzó el máximo de la fase exponencial del crecimiento a las 50 horas del cultivo, con una velocidad específica de  $0.0563 \text{ h}^{-1}$ .

Al comparar la dinámica de ambas cepas en el medio Propagación modificado, se apreció que si bien la cepa ICA 8001 tuvo una fase de adaptación mayor, fisiológicamente sus enzimas respondieron mejor con un mayor aprovechamiento del sustrato, lo que se expresó en una velocidad específica del crecimiento superior, resultado que se ratificó para la segunda fase de crecimiento. Se debe tener en cuenta que la velocidad específica de crecimiento es función de la concentración de sustrato dentro de un rango y de las propiedades de cada cepa en cuanto a su utilización, razones que diferencian ambas cepas aunque son de la misma especie.

Para las dos cepas en el medio Propagación modificado, se apreció una curva bifásica de multiplicación celular a partir de las 85 horas de cultivo para LMG 6134 y a partir de las 108 horas para ICA 8001. Este perfil bifásico recuerda una curva diáuxica, que pudiera justificarse si se tiene en cuenta que el sustrato soya molida presenta compuestos complejos, que pueden ser utilizados por las células como fuentes de carbono y energía al agotarse las fuentes más asequibles (4). También este comportamiento pudiera estar relacionado con la formación de mucílago a partir de la fuente carbonada o con la acumulación de poli- $\beta$ -hidroxibutirato como cuerpos de inclusión (10), lo que cambiaría las propiedades ópticas del cultivo, dando lugar a una aparente curva bifásica de multiplicación. Otra explicación pudiera ser que debido a la elevada velocidad específica de crecimiento obtenida con este medio de cultivo, se produzca una temprana muerte celular con la subsiguiente lisis y la posibilidad de que nuevas células se multipliquen a expensas de las que han muerto.

El desplazamiento en tiempo de la aparición de la curva bifásica entre las dos cepas estudiadas, puede deberse a la diferencia en la dinámica de su multiplicación, donde la cepa *B. elkanii* LMG 6134 arriba a los diferentes estadios con antelación, señal, como ya se refirió, de un aprovechamiento diferenciado de los sustratos entre las cepas.

Tampoco se conoce si esta bifase pudo estar relacionada con la respuesta a una expresión genética del microorganismo, que se manifestó frente a determinado componente presente en el medio de cultivo Propagación modificado (se supone que la soya molida sea el efector) y no está presente en los medios YEM y Propagación. La falta de aparición de esta bifásica en estos medios de cultivo pudo deberse a que en ellos la multiplicación celular es más lenta y no llegó a registrarse este momento en los tiempos evaluados, pero no es posible predecir si pudo aparecer más tarde.

Entre los tres medios de cultivo se apreciaron diferencias entre las velocidades específicas de crecimiento, las cuales se considera que se deben a las diferencias en su composición. El medio YEM, por ejemplo, contiene la fuente carbonada por excelencia del género *Rhizobium*: el manitol, además de hidrolizado de levadura como componente que brinda nucleótidos, vitaminas y otros probióticos no definidos, los que le permiten crecer y producir factores de nodulación satisfactoriamente.

La menor velocidad de crecimiento y rendimiento en biomasa de este medio con respecto al medio Propagación modificado, puede radicar en la menor eficiencia del manitol frente a la melaza, ya que existen referencias de que aquel, aunque ampliamente utilizado para rizobiáceas, no siempre es quien produce las más altas velocidades de crecimiento o de rendimientos en biomasa (11).

En el medio Propagación, por su parte, se incrementa la concentración del hidrolizado de levadura y se introducen, con la melaza, muchos azúcares que pueden ser utilizados, como la sacarosa, rafinosa, fructosa y glucosa, además de aminoácidos, ácidos carboxílicos, vitaminas y proteínas (12), que sin dudas contribuyen al incremento en la velocidad de crecimiento con respecto al medio YEM. Este medio ha sido utilizado tradicionalmente en la producción masiva de inoculantes para soya (13).

Las diferencias del medio Propagación con respecto al medio Propagación modificado, pueden ser también imputables a la fuente de carbono, pues en el primero se hallan a concentraciones elevadas. Aquí se pudiera explicar mediante el fenómeno de la inhibición por exceso de sustrato (14), dado por los diferentes azúcares que componen las melazas. Por otra parte, en las melazas existen además compuestos como los fenólicos, que presentan actividad inhibitoria sobre el crecimiento de muchos microorganismos (15), los cuales a tan elevada concentración pudieran también estar influyendo en estos resultados de menor multiplicación.

El medio Propagación modificado, por su parte, contiene extracto de soya en sustitución de la levadura, el cual es rico en lípidos, aminoácidos, proteínas y vitaminas (16), que favorecen la multiplicación celular acortando la fase de adaptación y permitiendo un crecimiento acelerado de los cultivos.

La disminución de la concentración de azúcares en este medio, resultó en valores superiores de multiplicación celular, lo que pudiera deberse a que se eliminó con ello la inhibición por exceso de sustrato y se diluyó el efecto de los inhibidores presentes, además de que este medio le brinda al microorganismo la posibilidad de aprovechar los otros nutrientes presentes en la soya. En 1996 se observó que el suplemento de medios semidefinidos o complejos con compuestos como la triptona, el extracto de levadura, peptona, casaminoácidos, hidrolizado de semillas de algodón, extracto de carne, hidrolizado de caseína, hidrolizado de colágeno o licor de remojo de maíz, aumentan el crecimiento celular de *Escherichia coli*, debido a que dichos sustratos aportan directamente los

aminoácidos necesarios para el desarrollo celular y ello supone un ahorro energético para la bacteria (17).

El medio nuevo propuesto evidenció su superioridad sobre el resto de los medios, por permitir una mayor velocidad específica de crecimiento y mayor biomasa, no solo para la cepa ICA 8001 sino también para la cepa LMG 6134.

## REFERENCIAS

1. Todar, K. Nutrition and growth of bacteria. [Consultado 8-2002]. Disponible en: <<http://www.bact.wisc.edu/Bact303/NutritionandGrowth>>.
2. Herrera, A. Manual de medios de cultivo. Editorial Científico-Técnica. Ministerio de Cultura. C. Habana, 1985
3. Watson, R. J.; Heys, R.; Martin, T. y Savard, M. *Sinorhizobium meliloti* cells require biotin and either cobalt or methionine for growth. *American Society for Microbiology*, 2001, vol. 67, no. 8, p. 3767-3770.
4. Madigan, M. T. Martinko, J. M. y Parker, J. (2003). Brock biology of microorganisms. Tenth Edition. Prentice Hall. Pearson Education, Inc. NJ.
5. Vincent, J. M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria/. En: International Biological Programme Handbook. No. 15. Blackwele scientific publications, Oxford, England, 1970.
6. Bernal, G.; Illanes, A. y Ciampi, L. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* *Electronic Journal of Biotechnology*, On line. [Consultado 28-10-2004]. Disponible en: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/1550c1/index.html>>
7. Villar, C. y Zúñiga, D. (1999). Microbial interaction between *Azotobacter* spp. and *Rhizobium* spp., and their influence on plant growth of clover associated to rye grass. [Consultado 11-2002]. Disponible en: <<http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/villararteaga.pdf>>.
8. López, M. Manual de tecnologías de producción del biofertilizante Bio-Rhizo. La Habana: Empresa Cubana de Productos Veterinarios Cuba-Vet., Instituto de Ciencia Animal, Instituto de Investigaciones Pastos y Forrajes, 1990.
9. Nápoles, M. C. Inducción de la nodulación en soya (*Glycine max* (L.) Merrill) por *Bradyrhizobium* sp. Influencia del medio de cultivo. [Tesis de Doctorado]; Universidad de La Habana, 2003.
10. Mercan, N.; Aslim, B.; Ksekdaú, N. y Beyatli, Y. Production of Poly- $\beta$  Hydroxybutyrate (PHB) by some rhizobium bacteria. *Turk J. Biol.*, 2002, vol. 26, p. 215-219.
11. Lasala, F. *Mesorhizobium plurifarium*, una nueva especie productora de polihidroxicanoatos (PHAs): estudio de la síntesis a escala de zaranda. [Tesis de Maestría]; Universidad de La Habana, 2000, 60 p.
12. Vohra, A. y Satyanarayana, T. A cost-effective cane molasses medium for enhanced cell-bound pectinase production by *Pichia anomala*. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, vol. 97, p. 471-476.
13. López, M. y Pijeira, L. Requerimientos nutricionales para la soya en Cuba. La Habana, 1996. 35 p.
14. Galvez, L. /et al./ Manual de derivados de la caña de azúcar. 2 ed. México : GEPLACEA/PNUD, 1990. 67 p.
15. Bornemann, W. S. Effect of phenolics monomers on ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, vol. 52, no. 6, p. 1331.
16. Smith, K. Advances in feeding soybean meal. [Consultado 3-2002]. Disponible en: <<http://www.soymeal.org/ksmith1.html>>.
17. Lee, S. Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends Biotechnology*, 1996, no. 14, p. 98-105.

Recibido: 23 de mayo de 2005

Aceptado: 23 de noviembre de 2005

# Cursos de Verano

Precio: 320 CUC

## Las Oligosacarinas reguladoras de los mecanismos de defensa, del desarrollo y la diferenciación de las plantas

Coordinador: M s.C. Humberto Izquierdo Oviedo

M s.C. Alejandro Falcón

Fecha: agosto

Duración: 40 horas

### SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr. C. W alfredo Torres de la Noval  
Dirección de Educación, Servicios Informativos  
y Relaciones Públicas  
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)  
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,  
La Habana, Cuba. CP 32700  
Telef: (53) (47) 86-3773  
Fax: (53) (47) 86-3867  
E.m ail: posgrado@inca.edu.cu