

Tesis de Licenciatura

Formulación de un medio de cultivo para la obtención de inoculantes de alta calidad y caracterización de respuestas fisiológicas de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* frente a distintos nutrientes

Steinberg, Marcos Wenceslao

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Steinberg, Marcos Wenceslao. (1997). Formulación de un medio de cultivo para la obtención de inoculantes de alta calidad y caracterización de respuestas fisiológicas de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* frente a distintos nutrientes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000505_Steinberg
Steinberg, Marcos Wenceslao. "Formulación de un medio de cultivo para la obtención de inoculantes de alta calidad y caracterización de respuestas fisiológicas de cepas de *Bradyrhizobium japonicum* frente a distintos nutrientes". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000505_Steinberg

EXACTAS
UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

TESIS DE LICENCIATURA
EN CIENCIAS BIOLOGICAS

Formulación de un medio de cultivo para la obtención de inoculantes
de alta calidad y caracterización de respuestas fisiológicas de cepas de
Bradyrhizobium japonicum frente a distintos nutrientes.

Alumno: Marcos Wenceslao Steinberg

Directora: Dra. Norma L. Kerber

Codirector: Lic. Marcelo A. Soria

Lugar de trabajo: CIByF-CONICET. Cátedra de Microbiología. Facultad de
Agronomía. UBA.

Indice

	Pág.
Resumen	3
Introducción	4
Utilización de rizobios en cultivos agrícolas.....	5
Importancia de los inoculantes en la agricultura.....	6
Objetivos	7
Materiales y Métodos	8
Resultados	20
1. Evaluación de la nodulación de las cepas E45 y E97 para considerar el estado de las mismas.....	20
2. Evaluación del crecimiento de la cepa E45 frente a distintas combinaciones de nutrientes diseñadas en base a un modelo estadístico (parte I).....	21
3. Evaluación del crecimiento de la cepa E45 frente a nuevas combinaciones de nutrientes redefinidas en base a los resultados obtenidos en la parte I (parte II).....	22
4. Evaluación de las curvas de crecimiento y caracterización de las cepas E45 y E97 creciendo en los medios de cultivo AP y su variante con mayor concentración de extracto de levadura (parte III)	23
5. Evaluación de las curvas de crecimiento y caracterización de la cepa E45 cultivada en medio APE (parte IV).....	36
6. Evaluación de las curvas de crecimiento y caracterización de la cepa E45 cultivada en medio AP+Glutamato (parte IV).....	38
Discusión	41
Anexo	47
Bibliografía	49
Agradecimientos	51

Resumen

En este trabajo nos hemos propuesto diseñar un medio de cultivo para *Bradyrhizobium japonicum* que permita alcanzar altos títulos bacterianos, y por otra parte caracterizar diferentes cepas pertenecientes a esta especie creciéndolas frente a distintos ambientes nutricionales. Nuestra hipótesis es que determinados nutrientes utilizados en concentraciones elevadas pueden producir efectos adversos sobre el crecimiento bacteriano.

Evaluando diferentes diseños de medios de cultivo con el fin de hallar alguna formulación que nos permita alcanzar los títulos bacterianos mas altos posibles, obtuvimos uno que denominamos AP, en el cual se pueden obtener 10^{12} células/ml luego de 80 hs de crecimiento. Este medio contiene K_2HPO_4 0.3 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g/l; $NaCl$ 0.2 g/l; Ext. Levadura 2 g/l; Glicerol 16 g/l y $(NH_4)_2SO_4$ 0.65 g/l.

Por otra parte comprobamos que en las condiciones de cultivo empleadas por nosotros, elevadas concentraciones de extracto de levadura o de glutamato afectan significativamente el crecimiento bacteriano. Nosotros sugerimos que al igual que otras bacterias gram negativas, las cepas E45 y E97 de *B. japonicum* son capaces de entrar en un estado VBNC, en donde las células permanecen viables pero no son cultivables, luego de sufrir algún efecto estresante cuando se las crece frente a elevadas concentraciones de los nutrientes antes mencionados.

Introducción

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso que permite la incorporación del nitrógeno gaseoso (N_2) en las moléculas orgánicas de los seres vivos. Es el mecanismo más importante de asimilación de nitrógeno inorgánico en los sistemas biológicos; si este proceso no existiera los otros procesos de incorporación de nitrógeno no podrían compensar las pérdidas normales de nitrógeno de los seres vivos y en última instancia la vida sobre el planeta no se podría sustentar.

Sólo un grupo reducido de microorganismos es capaz de fijar N_2 . El nitrógeno asimilado en compuestos orgánicos se distribuye luego al resto de los seres vivos. Los microorganismos que pueden fijar N_2 se dividen en dos grandes grupos de acuerdo a las condiciones en las cuales se realiza la fijación biológica de nitrógeno: el primer grupo comprende a los fijadores libres y el segundo a los fijadores asociados a plantas (Mylona *et.al.*, 1995).

La asociación más importante desde el punto de vista económico y agronómico es la asociación simbiótica que se establece entre las leguminosas y bacterias del grupo de los rizobios (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*) (Long S.R., 1989).

La simbiosis *rhizobium-leguminosa* es muy compleja y muchos de sus aspectos bioquímicos, celulares y genéticos aún no han sido completamente dilucidados. Una de sus características es la especificidad. Para cada especie de leguminosa existe un rango restringido de especies de rizobios, o aun de cepas de una misma especie, entre las cuales se puede establecer una asociación simbiótica exitosa, que implica que la planta recibe de la bacteria amonio y la bacteria recibe de la planta compuestos carbonados para su crecimiento. (Fisher and Long, 1992; Verma, 1992). El avance de las investigaciones en los últimos años en lo que a especificidad se refiere, ha permitido describir a la misma como el resultado de la interacción de la planta con el rizobio en las diferentes etapas del proceso de asociación simbiótica, poniéndose en juego señales que favorecen el reconocimiento del simbionte adecuado y señales inhibitorias para los inapropiados. Es así que la información genética de ambos simbiontes debe complementarse a través de este complejo juego de señales para lograr establecer con éxito la simbiosis adecuada (Wall and Favelukez, 1991).

El establecimiento de la simbiosis se realiza a nivel del sistema radicular. En primer lugar, como se dijo anteriormente, hay un intercambio de señales entre la planta y las bacterias específicas para esa planta. Luego, enzimas bacterianas degradan parte de la pared celular de la raíz y permiten que las bacterias ingresen a las células del pelo radical. Si estos pasos se cumplen correctamente, entonces los rizobios se multiplican abundantemente dentro del pelo radical y avanzan hacia el interior atravesando el tejido cortical. Cuando las bacterias llegan a las células de la corteza interna se liberan al citoplasma de éstas y estimulan la división de algunas de ellas, sobre todo de células tetraploides. Estas divisiones causan una proliferación de tejidos de la planta y se forma entonces una estructura *ad hoc* llamada nódulo. El rizobio una vez en el nódulo sufre importantes cambios morfológicos y metabólicos, transformándose en lo que se conoce como bacteroide. Por lo general los bacteroides se encuentran en el citoplasma en grupos, cada uno rodeado por una membrana celular denominada **membrana peribacteroidea**. Entre esta membrana y el grupo de bacteroides se encuentra una región que recibe el nombre de **espacio peribacteroideo** (Salisbury and Ross, 1992). El bacteroide es la forma celular capaz de convertir N₂ en amonio y de utilizar los compuestos carbonados que le aporta la planta. (Fisher and Long, 1992; Verma, 1992).

Utilización de rizobios en cultivos agrícolas.

En la actualidad, el agregado de rizobios al suelo junto con la semilla al momento de la siembra es una práctica común conocida como inoculación y requiere de varios factores concurrentes para que tenga un efecto beneficioso sobre el cultivo. Los inoculantes se comercializan de distintas formas, algunos son rizobios adsorvidos sobre turba estéril, otros son suspensiones de bacterias en soluciones acuosas u oleosas, mientras que en otros casos se comercializa la semilla con los rizobios adheridos a geles que recubren la superficie de la misma.

La gran mayoría de los rizobios adsorvidos a turba mueren sobre la semilla o bien al poco tiempo después de ocurrida la siembra. Al parecer las formulaciones con geles son mas ventajosas que la turba y en algunas circunstancias éstas posibilitan una excelente ocupancia de nódulos por las cepas inoculadas. También las formulaciones

líquidas son una buena alternativa ya que permiten una muy buena dispersión del inóculo en el campo (Streeter J.G., 1994).

Las bacterias deben ser capaces de sobrevivir en estos soportes por períodos de hasta seis meses, a veces durante lapsos prolongados a temperaturas elevadas. Esto impone sobre el inoculante la necesidad de poder adaptarse a situaciones de estrés térmico y de estrés por desecación y ausencia de nutrientes.

Una vez en el suelo los rizobios del inoculante deben competir con otras cepas indígenas preexistentes en el suelo, que generalmente al estar mejor adaptadas desplazan a las cepas introducidas durante la formación de nódulos. Pero estas cepas indígenas son menos efectivas que las cepas introducidas, las cuales han sido seleccionadas para lograr alta eficiencia en la fijación. Es por ello que es sumamente importante eliminar estos efectos no deseados que producen las cepas indígenas. Con el fin de poder favorecer la competencia con estas cepas se recomienda inocular un número muy elevado de bacterias, pero estos niveles son difíciles de alcanzar con los inoculantes convencionales (Dowling and Broughton, 1986; Streeter J.G., 1994). Es por lo tanto una inquietud permanente de la industria de los inoculantes obtener medios de cultivo que permitan altos títulos de rizobios viables en los preparados sin que ello signifique un incremento en los costos de producción (Boiardi *et.al.*, 1983).

Importancia de los inoculantes en la agricultura.

La carencia de nitrógeno en los suelos afecta la fertilidad de los mismos y en consecuencia los rendimientos obtenidos por los productores descienden año tras año significando menos ingresos para los mismos. Este problema puede ser subsanado con la aplicación de fertilizantes nitrogenados, pero como es sabido los precios de estos compuestos son muy elevados y encarecen los costos de producción. Mediante el uso de inoculantes, la planta puede recibir de las bacterias todo el nitrógeno que necesita para su desarrollo, y de esta manera no es necesario hacer fertilizaciones nitrogenadas de los cultivos. Esto implica dos beneficios: uno es el ahorro en fertilizantes y otro es que los fertilizantes pueden ser agentes agresivos para el medio ambiente. Por ejemplo, el exceso de compuestos nitrogenados puede alcanzar cuerpos de agua cercanos y favorecer el desarrollo de algas sobre la superficie de los mismos, las cuales al proliferar

reducen el intercambio de oxígeno y la luz disponibles, perjudicando a las otras poblaciones existentes.

Por otra parte, la actividad de raíces de plantas fijadoras beneficia a las raíces de plantas circundantes y aporta nitrógeno al suelo, ya sea por la excreción del nutriente en los nódulos o mediante la descomposición microbiana de los mismos o incluso de las plantas completas (Salisbury and Ross, 1992).

Objetivos

Los objetivos de este proyecto son dos: el primer objetivo es diseñar un medio de cultivo que permita alcanzar altos títulos bacterianos y determinar la posibilidad de manipular las condiciones de cultivo con el fin de obtener bacterias más aptas para la formulación de inoculantes de mejor calidad en cuanto a su vida útil, supervivencia y adaptación en el suelo. El segundo de los objetivos es caracterizar diferentes cepas de *B. japonicum* frente a distintos ambientes nutricionales determinados por dos concentraciones diferentes de extracto de levadura, evaluando algunos de los parámetros que hacen al metabolismo de estas bacterias.

Materiales y métodos

1. Medios de cultivo utilizados en la parte I:

A) Medio utilizado como punto de partida para el diseño de los demás medios de cultivos usados en los diferentes experimentos: Se tomó como medio de partida un diseño que ha sido utilizado por Balatti *et.al.*, (1991).

B) Concentraciones de los componentes de los medios de cultivo ensayados en la primera etapa de los diseños de medios.

Niveles utilizados:

[Nutrientes]	Baja	Intermedia	Alta
K ₂ HPO ₄	0.3 g/l	0.45 g/l	0.6 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3 g/l	0.3 g/l	0.3 g/l
NaCl	0.2 g/l	0.2 g/l	0.2 g/l
Ext. Levadura	2 g/l	5 g/l	8 g/l
Glicerol	10 g/l	16 g/l	22 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4 g/l	0.65 g/l	0.9 g/l

En todos los casos el pH se llevó a 6.8 - 7 antes de autoclavar.

C) Medio de cultivo para la obtención del preinóculo:

K ₂ HPO ₄	0.45 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3 g/l
NaCl	0.2 g/l
Ext. Levadura	5 g/l
Glicerol	16 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.65 g/l
pH	6.8 - 7 (antes de autoclavar)

D) Medios formulados según un diseño estadístico de 2 niveles con 4 factores (2^4). Las cantidades de cada nutriente se expresan en g/l.

Medio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	K_2HPO_4	Glicerol	Ext. Lev.
1	0.65	0.45	16	5
2	0.65	0.45	16	5
3	0.65	0.45	16	5
4	0.5	0.3	10	2
5	0.8	0.3	10	2
6	0.5	0.6	10	2
7	0.8	0.6	10	2
8	0.5	0.3	22	2
9	0.8	0.3	22	2
10	0.5	0.6	22	2
11	0.8	0.6	22	2
12	0.5	0.3	10	8
13	0.8	0.3	10	8
14	0.5	0.6	10	8
15	0.8	0.6	10	8
16	0.5	0.3	22	8
17	0.8	0.3	22	8
18	0.5	0.6	22	8
19	0.8	0.6	22	8

Para todos estos medios las concentraciones utilizadas de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y NaCl fueron 0.3 y 0.2 g/l respectivamente y el pH se llevó a 6.8 - 7 antes de autoclavar.

2. Medios de cultivo utilizados en la parte II:

A) Medio de cultivo para la obtención del preinóculo: Se utilizó el mismo medio de cultivo que fue usado en la parte I.

B) Medios formulados según diseño estadístico 2⁴. Las cantidades de cada nutriente se expresan en g/l.

Medio	(NH ₄) ₂ SO ₄	K ₂ HPO ₄	Glicerol	Ext. Lev.
1	0.65	0.45	16	4
2	0.65	0.45	16	4
3	0.65	0.45	16	4
4	0.5	0.3	10	2
5	0.8	0.3	10	2
6	0.5	0.6	10	2
7	0.8	0.6	10	2
8	0.5	0.3	22	2
9	0.8	0.3	22	2
10	0.5	0.6	22	2
11	0.8	0.6	22	2
12	0.5	0.3	10	6
13	0.8	0.3	10	6
14	0.5	0.6	10	6
15	0.8	0.6	10	6
16	0.5	0.3	22	6
17	0.8	0.3	22	6
18	0.5	0.6	22	6
19	0.8	0.6	22	6

Para todos estos medios las concentraciones utilizadas de MgSO₄ .7H₂O y NaCl fueron 0.3 y 0.2 g/l respectivamente y el pH se llevó a 6.8 - 7 antes de autoclavar.

3. Medios de cultivo utilizados en la parte III y IV:

A) Medio de cultivo para la obtención del preinóculo:

K2HPO ₄	0.3 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3 g/l
NaCl	0.2 g/l
Ext. Levadura	1 g/l
Glicerol	16 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.65 g/l
pH	6.8 - 7 (antes de autoclavar)

B) Medio AP (alta producción) con baja concentración de extracto de levadura y su variante con alta concentración del extracto:

K2HPO ₄	0.3 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3 g/l
NaCl	0.2 g/l
Ext. Levadura	2 g/l (baja) ——— 6 g/l (alta)
Glicerol	16 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.65 g/l
pH	6.8 - 7 (antes de autoclavar)

C) Medio APE, basado en el AP con la concentración de glicerol reducida, y su variante con alta concentración del extracto:

K2HPO ₄	0.3 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3 g/l
NaCl	0.2 g/l
Ext. Levadura	2 g/l (baja) ——— 6 g/l (alta)
Glicerol	4 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.65 g/l
pH	6.8 - 7 (antes de autoclavar)

D) Medio AP suplementado con glutamato: Medio AP + glutamato (1 g/l).

4. Medios de cultivo agarizados:

A) Medio de Vincent:

K ₂ HPO ₄	0.5 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g/l
NaCl	0.1 g/l
Ext. Levadura	1 g/l
Manitol	10 g/l
Agar	15 g/l
Rojo Congo	10 ml.
pH	6.8 - 7 (antes de autoclavar)

B) Medio AP con alto extracto de levadura agarizado: Medio AP + agar (20 g/l).

C) Medio AP con alto extracto de levadura correspondiente a 40 o 70 hs. de cultivo:

Se cultivó la cepa E45 hasta las 40 y 70 hs. Cumplidos cada uno de los tiempos correspondientes se procedió a centrifugar los cultivos durante 10 min. a 10000 r.p.m. en una centrífuga (SORVAL). Se recobró el sobrenadante (50ml.) en un erlenmeyer de 250 ml. y se le agregó 1 gr de agar para obtenerlo así al 2 %. Una vez hecho esto se procedió al autoclavado de los mismos.

Todos los medios descriptos fueron autoclavados a 121 °C y 1 atm. de presión durante 20 minutos.

5. Cepas utilizadas:

Se trabajó con las cepas E45 y E97 de *Bradyrhizobium japonicum* (INTA-Castelar, Argentina). Se partió de cultivos stock conservados en tubos pico de flauta con

medio de Vincent, a 4°C . Durante el transcurso de los experimentos, las cepas fueron repicadas periódicamente y conservadas de igual manera que los stock.

6. Condiciones de cultivo:

- Preinóculos: se cultivaron en erlenmeyers de 125 ml con 25 ml de medio; los mismos fueron inoculados con ansa partiendo de un cultivo en pico de flauta con medio de Vincent. La incubación se efectuó en un agitador orbital a 220 r.p.m. y a 30 °C durante 75 hs.
- Cultivos diseñados por método estadístico (**parte I**): los cultivos se realizaron en erlenmeyers de 125 ml. con 20 ml. de medio, los cuales fueron inoculados con 400 ul. del preinóculo. Se incubaron a 30 °C y con agitación orbital a 220 r.p.m.
- Cultivos diseñados por método estadístico (**parte II**): Se cultivaron en erlenmeyers de 125 ml. con 25 ml. de medio. Se inocularon con 500 ul. del preinóculo y se incubaron de la misma manera que los cultivos de la parte I.
- Cultivos con bajo y alto extracto de levadura (**parte III y IV**): Los mismos se realizaron en erlenmeyers de 250 ml. con 50 ml. de medio. Se inocularon con 1 ml. del preinóculo correspondiente y se incubaron como los cultivos de las partes I y II.

Los cultivos con concentración de glicerol reducida o adicionados con 1 g/l de glutamato se realizaron de la manera indicada para la parte III y IV.

En las partes I, II y IV se trabajó con la E45, en tanto que en la parte III se utilizó además de la E45, la cepa E97.

7. Realización de las curvas de crecimiento.

El aumento de biomasa se siguió por absorbancia medida a 550 nm. en un espectrofotómetro Carl Zeiss. Las curvas de crecimiento correspondientes a los diferentes medios utilizados se realizaron tomando muestras de los mismos a las 8, 21, 31, 46, 55, 69 y 79 hs. de cultivo.

8. Determinación del número de células totales.

El número de células totales se determinó por medio del recuento de las mismas en cámara de Newbauer. El mismo se llevó a cabo con muestras de los cultivos **AP** , **AP** con alto extracto de levadura y **AP** + glutamato, correspondientes a las 80 hs. de crecimiento. Para el recuento se utilizó un microscopio óptico (Nikon) y la observación se hizo con un aumento de 400x y 1000x.

9. Determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC).

i) Recuentos realizados en medio de Vincent:

A partir de las muestras obtenidas de los cultivos **AP** y **AP** con alto extracto de levadura, a cada uno de los tiempos correspondientes a la curva de crecimiento, se realizaron diluciones seriadas en solución fisiológica, en condiciones de esterilidad. Las mismas fueron hechas teniendo en cuenta los títulos alcanzados en otros trabajos que han sido publicados (Balatti *et.al.*, 1991). De la dilución adecuada para cada tiempo se plaquearon 20 ul. formando una gota, la cual una vez seca sobre el agar forma una superficie circular en donde se cuentan las colonias.

Los recuentos de los cultivos **AP** + glutamato se realizaron de igual manera pero tomando las muestras a las 80 hs de crecimiento.

Las placas de Petri sembradas se incubaron a 30°C durante 72 hs. como mínimo. Las colonias se contaron a ojo desnudo.

ii) Recuentos realizados en medio **AP con alto Ext. Lev., sin inocular y con crecimiento de 40 o 70 hs.:**

Cuando los cultivos alcanzaron las 40 o 70 hs. de crecimiento, se hicieron las diluciones de igual manera que para el recuento en medio de Vincent y se plaquearon 100 ul extendiéndose con un rastrillo por la superficie de la placa. Se incubó de forma similar a la indicada antes.

10.Determinación de glicerol consumido.

La determinación del glicerol consumido se realizó según una técnica enzimática (Boehringer mannheim gmbh, 1989). Unicamente se modificaron los volúmenes utilizados en las mezclas de reacción, los cuales fueron reducidos a la mitad por cuestiones prácticas.

La cantidad consumida se calculó como la diferencia entre la concentración inicial de glicerol y la concentración remanente en el medio de cultivo al momento de realizar las mediciones.

Para cada medición, 1 ml de cultivo fue centrifugado 5 min. a 16,000 x g en una microcentrífuga Hoefer MC 1400. Los pellets fueron descartados y los sobrenadantes se guardaron en eppendorf a -20°C. Una vez obtenida la totalidad de los sobrenadantes correspondientes a todos los tiempos en los que se tomaron muestras, se procedió a descongelar los mismos a temperatura ambiente y se los diluyó 40 veces con agua milli Q. De cada dilución resultante se utilizaron 50 ul. para efectuar la determinación.

Preparación de los standard de glicerol:

De una solución 87% glicerol (Merk) se tomaron 374 ul. y se llevaron a 100 ml. con agua milli Q. La solución resultante se diluyó al décimo obteniéndose un stock de concentración 0.4 gr/l de la cual se tomaron 50, 37.5, 25, 12.5 y 6.25 ul. para obtener un rango de concentraciones entre 20 y 2.5 ug por tubo de reacción, lo que representa la mitad del rango de concentración especificado por la técnica; esto se calculó así teniendo en cuenta que se redujeron todos los volúmenes a la mitad.

Tanto para el standard como para las muestras, las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro GILFORD *response*, a una longitud de onda de 340 nm., usando agua como blanco.

11.Determinación de los amino ácidos consumidos.

La cantidad de amino ácidos (a.a.) consumida se calculó como la diferencia entre la concentración inicial de estos y la concentración remanente en el medio de cultivo al momento de realizar las mediciones. La determinación se realizó según el método utilizado por Logan *et.al.*(1983). De igual manera que para la determinación del glicerol

consumido, los sobrenadantes guardados a -20 se descongelaron y de cada uno de ellos se hizo una dilución 1/10 para ingresar dentro del rango de concentraciones para el cual el método es efectivo.

Preparación de la curva standard: La curva se realizó a partir de una solución stock de Leucina de concentración 250 uM. De esta solución se pipetearon 40, 80, 120, 200, 320 y 400 ul. para obtener un rango de entre 10 y 100 nmoles de a.a. La absorbancia se midió a 440 nm con el mismo espectrofotómetro utilizado para la determinación de glicerol.

Todas las muestras tomadas para realizar las mediciones pertinentes a las determinaciones de glicerol y a.a. correspondieron a las 8, 21, 31, 46, 55, 69 y 79 hs. de cultivo.

12. Determinación del contenido de proteínas intracelulares en las bacterias.

La determinación de proteínas se hizo tanto para la cepa E45 como para la E97. De cada uno de los cultivos con 79 hs. de crecimiento se tomó una muestra de 200 ul la cual se centrifugó 5 minutos a 16,000 x g en una microcentrifuga HOEFER MC 1400. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 200 ul. de agua Milli Q. La determinación se realizó sobre la suspensión resultante, mediante una modificación del método de Lowry *et.al.*(1951) para células enteras. Las mismas se incubaron 10 minutos a 100 °C luego del agregado del “reactivo C”. La absorbancia de las muestras se midió a 660 nm. en un espectrofotómetro GILFORD *response* utilizando agua como blanco. La curva standard se confeccionó a partir de una solución stock de BSA (1 mg/ml).

13. Determinación del contenido de hidratos de carbono.

Los hidratos de carbono se determinaron por el método de la antrona (Hanson and Phillips, 1981). Se partió de 1 ml de muestra de los cultivos con bajo y alto extracto de levadura, con 40 y 79 hs. de crecimiento. Las muestras correspondientes a los cultivos con bajo extracto y pertenecientes a las 79 hs. de cultivo debieron ser de un volumen menor al mililitro ya que con esa cantidad de muestra se salía del rango de concentraciones de la curva de calibración, de manera que se utilizaron 400 ul. de dichos

cultivos. Las muestras fueron centrifugadas a 16,000 x g en una microcentrífuga HOEFER MC 1400 durante 5 minutos y los pellets se resuspendieron en 0,5 ml de agua milli Q.

14.Determinación del contenido de DNA.

Se tomaron 2 ml de cultivo con 79 hs. de crecimiento y se centrifugaron a 16,000 x g durante 5 minutos en una microcentrífuga HOEFER MC 1400. Los pellets resultantes se resuspendieron en 0,5 ml. de agua milli Q y sobre la suspensión resultante se hizo la determinación del DNA. Para tal fin, se utilizó el método de Daniels *et.al.* (1994), reduciendo todos los volúmenes a la tercera parte de los indicados en el protocolo. La curva standard se realizó a partir de una solución de DNA 2.5 ug/ml., la cual se preparó diluyendo 20,27 mg de DNA 74 % de pureza (SIGMA) en 6 ml. de una solución 0,5 M de NaCl.

Esta determinación solo se realizó en la cepa E45.

15.Determinación de perfiles de proteínas.

La caracterización del perfil de proteínas de las cepas crecidas en medio AP con alto y bajo extracto de levadura se hizo por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 %, según la técnica de Laemmli (1970).

En todos los casos las muestras se centrifugaron y los pellets se lavaron repetidas veces con agua destilada. Una vez que los pellets estuvieron bien enjuagados, se resuspendieron en 100 ul del buffer de siembra. Las suspensiones resultantes fueron las que se sembraron en las calles correspondientes del gel.

16.Determinación de peso seco.

Se partió de 15 ml de un cultivo con 80 hs de crecimiento en medio AP + glutamato, los cuales fueron centrifugados en una centrifuga SORVAL a 10.000 rpm durante 10 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 15 ml de solución fisiológica.

Este procedimiento se repitió 2 veces y el pellet obtenido luego de la tercera centrifugación se resuspendió en 1 ml de agua destilada. La suspensión fue transferida a cazoletas metálicas y se colocaron en una estufa a 80 °C. Las muestras fueron mantenidas en estufa y pesadas periodicamente hasta que el peso de las mismas fue constante (aproximadamente 72 hs).

17. Conteo directo de células viables.

El número de células viables se determinó mediante el método utilizado por Kogure et.al.(1979). El método basicamente consiste en hacer crecer las bacterias en una solución con ácido nalidíxico. Este ácido es un antibiótico que actúa a nivel de la división celular. El mismo permite que las células se elongen preparándose para la división, no dejando que las mismas realicen la citocinésis. De esta manera, las células que se hayan elongado luego del tratamiento con nalidíxico serán aquellas que permanecen viables.

Los cultivos se realizaron en erlenmeyers de 25 ml conteniendo 5 ml de una solución estéril compuesta por 0.002 % de ácido nalidíxico + 0.025 % de extracto de levadura.

De los cultivos crecidos 80 hs en medio AP o AP + glutamato, se tomaron 500 ul que fueron centrifugados a 16,000 x g durante 5 minutos en una microcentrífuga HOEFER MC 1400. El pellet resultante se resuspendió en 1 ml de la solución antes mencionada y la suspensión se utilizó como inóculo. Las cultivos se incubaron durante 15 hs a 30 °C con agitación orbital.

Para evaluar los resultados del experimento, se tomaron muestras de cada tratamiento y se colocaron entre un porta y cubre objetos para ser observados al microscopio. Las imágenes fueron tomadas por una cámara conectada al microscopio para digitalizarlas. Estas imágenes son transportadas luego desde la cámara hacia una tarjeta digitalizadora OFG VISIONplus-AT (Imaging Technology Inc.) que las transforma en una señal digital. Las mediciones de la longitud de las células se hicieron utilizando el software para procesamiento de imágenes Image-Proplus, Media Cybernetics (IPplus).

18. Ensayos de nodulación.

Medio de cultivo utilizado: Las cepas E45 y E97 se crecieron en medio líquido utilizando el de Vincent no agarizado.

Condiciones de cultivo: Se cultivaron las cepas E45 y E97 en erlenmeyers de 250 ml. con 50 ml. del medio de cultivo utilizado en este ensayo. La incubación se realizó a una temperatura de 30 °C con agitación orbital.

Semillas utilizadas: Para el ensayo se utilizaron semillas de soja (*Glicine max*), pertenecientes a una variedad comercial actualmente disponible en el mercado (Asgrow A4422).

Esterilización de las semillas: 15 semillas de las antes mencionadas fueron tratadas de la siguiente manera: se mantuvieron 1 minuto en alcohol 70 %, luego se las traspasó a una solución de $HgCl_2$ al 0.1 % en la cual permanecieron 2 minutos y por último se enjuagaron 6 veces con agua destilada estéril.

Preparación de las macetas: Se utilizaron recipientes plásticos de 500 ml. los cuales fueron cuidadosamente lavados con alcohol y enjuagados varias veces con agua. Como soporte se usó arena lavada y esterilizada a 121 °C y 1 atm durante 1 hora. Por cada maceta se sembraron 3 semillas, ubicadas a 5 cm de profundidad. Sobre cada semilla se inoculó 1 ml. de cultivo de 72 hs. de crecimiento y luego se las tapó con arena. Los plantines se mantuvieron a temperatura ambiente y se regaron cada 72 hs. con solución de Hoagland et.al. (1950), carente de nitrógeno.

Resultados

Las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* suelen perder la capacidad de nodular plantas de soja cuando se las mantiene por períodos prolongados a bajas temperaturas. Rutinariamente, los cultivos se almacenan a 4 °C en medios agarizados en tubos pico de flauta. Teniendo en cuenta esto, antes de comenzar cualquier experimento con este tipo de bacterias es necesario chequear el estado de las mismas y corroborar que las células no hayan perdido la capacidad de nodular. Lo que se hace habitualmente son ensayos de nodulación en plantas de soja de alguna variedad comercial y se observan la cantidad y calidad de los nódulos producidos por las cepas.

1. Evaluación de la nodulación de las cepas E45 y E97 para considerar el estado de las mismas.

Para determinar el estado de las cepas y la capacidad de las mismas para nodular, se realizaron ensayos de nodulación en plantas de soja (*Glycine max*). Los ensayos se hicieron con ambas cepas y las mismas se cultivaron en el medio de Vincent no agarizado. Las semillas de soja de una variedad comercial, fueron esterilizadas y luego se sembraron en recipientes plásticos conteniendo arena estéril. Sobre la superficie de las semillas se inoculó 1 ml del cultivo correspondiente, los cuales tenían 72 hs de crecimiento, luego las semillas se cubrieron con arena. Los plantines fueron mantenidos a temperatura ambiente y se regaron cada 72 hs con solución de Hoagland sin nitrógeno.

Pasadas 6 semanas los plantines se sacaron de las macetas y se observaron las raíces de los mismos. Las plantas que habían sido inoculadas presentaron una buena nodulación, mientras que los controles que carecían de inóculo no tenían nódulos. Las primeras, presentaron raíces mas cortas que los controles y una parte foliar mas desarrollada, lo cual fue mas evidente durante las primeras semanas de crecimiento. Con respecto a la calidad de los nódulos, la cepa E97 produjo nódulos mas grandes y una mayor cantidad de los mismos ubicados sobre la raíz principal. La E45 produjo una buena nodulación, pero los nódulos fueron mas pequeños que los observados en las plantas inoculadas con la E97. De esta manera comprobamos que ambas cepas mantenían la capacidad de nodular soja.

2. Evaluación del crecimiento de la cepa E45 frente a distintas combinaciones de nutrientes diseñadas en base a un modelo estadístico (parte I).

A fin de estudiar el efecto de 4 nutrientes ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , Glicerol y Extracto de Levadura) y sus interacciones, se utilizó un diseño factorial de 2 niveles con 4 factores (2^4) (ver anexo). Se estudió el crecimiento de la cepa E45 de *Bradyrhizobium japonicum* frente a 19 combinaciones distintas de los componentes antes mencionados (ver materiales y métodos, ítem 1-D).

El objetivo de este experimento era encontrar un medio que nos permitiera alcanzar una alta absorbancia tomando a ésta como una medida directa del título de bacterias presente en el cultivo. Los 19 medios fueron inoculados con 400 ul de un preinóculo obtenido como se especifica en materiales y métodos. Los cultivos se incubaron con agitación a 30 °C y de cada uno de ellos se tomaron muestras a distintos tiempos de crecimiento para medir las absorbancias a 550 nm.

Se calculó mediante un ANOVA la significancia de los nutrientes sobre el crecimiento. El análisis indicó que la concentración de extracto de levadura era el único factor que afectaba significativamente el crecimiento de las cepas en las condiciones que desarrollamos la experiencia.

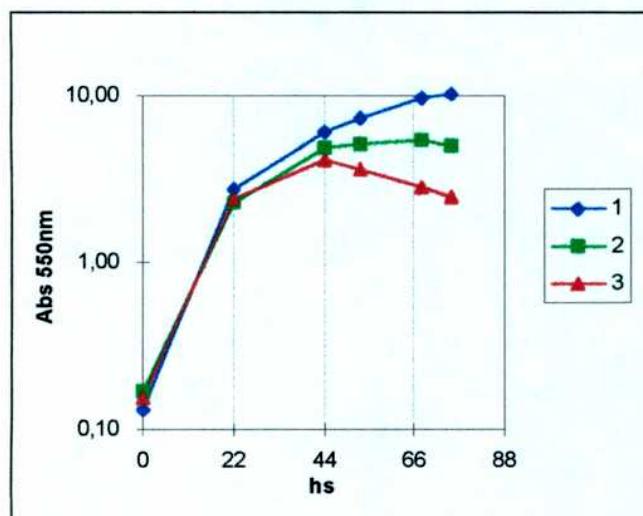


Figura 1. Curva de crecimiento para la cepa E45 en la parte I. 1-Cultivos con 5 g/l de E.Lev.; 2-cultivos con 2 g/l de E.Lev.; 3-cultivos con 8 g/l de E.Lev. En todos los casos se graficó el promedio de los valores de absorbancia obtenidos de los cultivos con cada una de las concentraciones de extracto de levadura probadas.

Basandonos en este experimento, nos concentraremos en el extracto de levadura, particularmente en los efectos del mismo sobre el crecimiento. Los datos graficados corresponden a los promedios de las absorbancias para los cultivos con 2, 5 y 8 g/l del extracto. Los resultados muestran que los cultivos con 5 g/l de extracto de levadura (1, 2 y 3 de los medios diseñados en la parte I), llegaron a un valor de absorbancia mayor a los obtenidos con los otros medios, los cuales en general no superaron los seis puntos de absorbancia. Las mayores diferencias se observaron luego de las 44 hs de crecimiento, donde se pudo observar que frente a 8 g/l de extracto de levadura los cultivos entran mas rápidamente en fase estacionaria. Posterior al ingreso en esta fase, los valores de absorbancia obtenidos disminuyeron, sugiriendo que los cultivos sufrieron autólisis. Los valores obtenidos con los cultivos que tienen 2 g/l de extracto de levadura se mantuvieron casi constantes luego de las 44 hs. de crecimiento. Esto demuestra que los cultivos con una baja concentración del extracto no sufrieron autólisis. De esta manera nosotros concluimos que frente a concentraciones altas de extracto de levadura existe una inhibición del crecimiento y los cultivos ingresan mas rápidamente en fase estacionaria produciéndose además autólisis de las células.

3. Evaluación del crecimiento de la cepa E45 frente a nuevas combinaciones de nutrientes redefinidas en base a los resultados obtenidos en la parte I (parteII).

Siguiendo con los objetivos de la primera parte, en esta segunda se confeccionó la curva de crecimiento en nuevos medios de cultivos, los cuales fueron diseñados según los resultados obtenidos de la parte I. Los nutrientes utilizados y las concentraciones de los mismos fueron iguales a las ensayadas en la primera parte con excepción de las concentraciones de extracto de levadura. Las mismas fueron redefinidas tomando como baja, intermedia y alta 2, 4 y 6 g/l respectivamente (ver materiales y métodos, item 2-B).

Los cultivos fueron inoculados con 500 ul del preinóculo y se incubaron de la misma manera que los de la parte I. La curva de crecimiento se siguió midiendo la absorbancia a 550 nm. Los resultados obtenidos muestran que al disminuir la concentración máxima de extracto de levadura de 8 a 6 g/l, las diferencias en los títulos finales no son significativas con respecto a los demás cultivos.

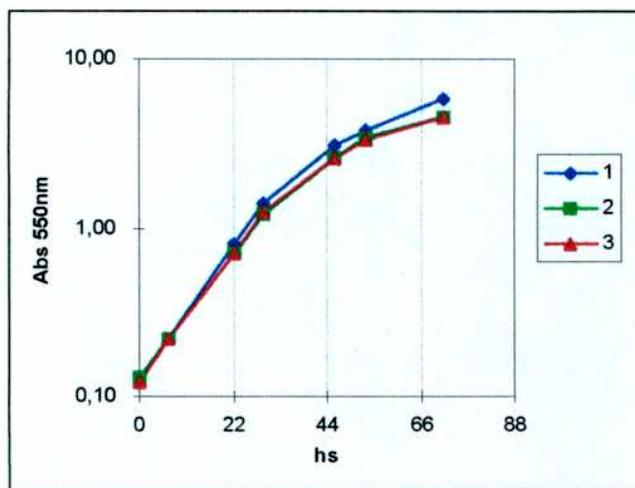


Figura 2. Curva de crecimiento para la cepa E45-part II. 1-cultivos con 4 g/l de E.Lev.; 2- cultivos con 2 g/l de E.Lev.; 3- cultivos con 6 g/l de E.Lev. Se muestran los promedios de los valores de absorbancia obtenidos por los cultivos para cada una de las concentraciones de extracto de levadura probadas. Los valores máximos de absorbancia no difirieron significativamente entre los tratamientos.

Esto indica que disminuyendo la concentración del extracto se logra también eliminar el efecto de autólisis. Por otra parte, en estos experimentos se pudo observar que la concentración de fosfatos influye en el crecimiento de las bacterias, alargando los tiempos de duplicación cuando se lo utiliza en la mayor concentración (dato no mostrado).

4. Evaluación de las curvas de crecimiento y caracterización de las cepas E45 y E97 creciendo en los medios de cultivo AP y su variante con mayor concentración de extracto de levadura (parte III).

Con los datos obtenidos en las partes I y II definimos un medio basal el cual fue utilizado con las dos concentraciones extremas del extracto de levadura usado en la parte II con el fin de evaluar y caracterizar el comportamiento de las cepas E45 y E97.

Los cultivos se realizaron en erlenmeyers de 250 ml. con 50 ml. de medio, los cuales fueron inoculados con 1 ml. del preinóculo. Los resultados muestran que para la cepa E45, no hay diferencias significativas en las absorbancias alcanzadas por los cultivos con 2 y 6 g/l de extracto de levadura, lo cual ya había sido observado en la parte II. En cuanto a la forma de la curva, se puede apreciar una fase de crecimiento exponencial

hasta pasadas las 40 hs. de cultivo, tiempo a partir del cual los cultivos entran en fase estacionaria (fig.3-A). Resultados semejantes fueron observados cuando se utilizó la cepa E97. La forma de la curva de crecimiento coincidió con la de la E45 aunque se observó una mayor dispersión entre los valores obtenidos para una u otra situación de crecimiento durante las primeras 44 hs (fig. 3-B).

Hacia el final de la curva, los títulos alcanzados por los cultivos no difirieron significativamente entre sí, y tampoco se diferenciaron de los alcanzados por la otra cepa.

En función de lo visto hasta aquí, podríamos pensar que no hay alteración alguna en el crecimiento en respuesta a una concentración elevada de extracto de levadura. Esto sería lógico si tenemos en cuenta que las absorbancias finales no difieren entre los distintos tratamientos y que la forma de las curvas de crecimiento son casi idénticas para los mismos. Pero esto no nos garantiza que los cultivos crecidos en presencia de 2 o 6 g/l del extracto estén fisiológicamente en condiciones semejantes. Nosotros creemos que a pesar de que no existan diferencias en las absorbancias alcanzadas, los estados fisiológicos de las bacterias crecidas en una u otra condición deberían ser diferentes y

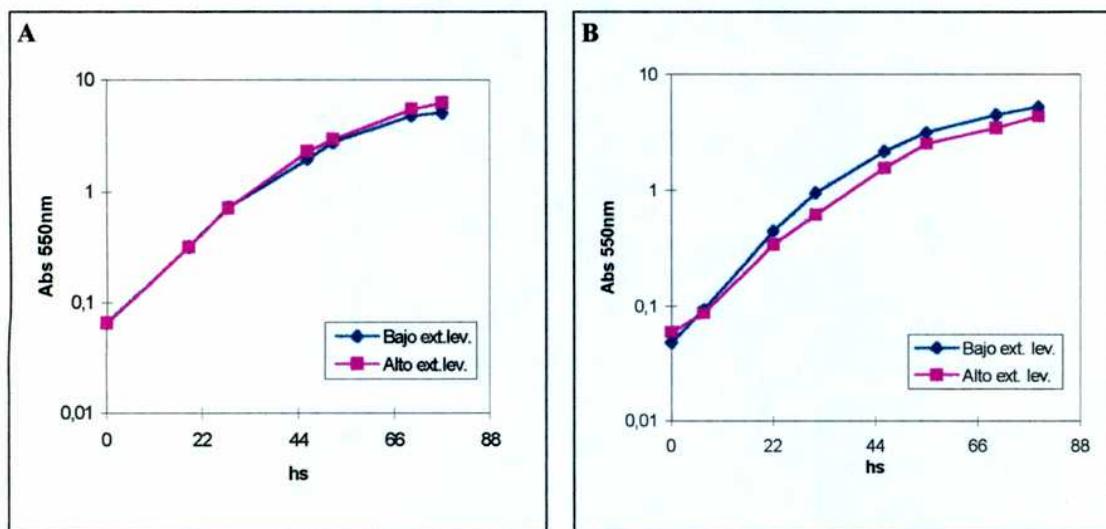


Figura 3. A-Curva de crecimiento para la cepa E45 en la parte III. B-Curva de crecimiento para la cepa E97 en la parte III. Bajo ext.lev. y Alto ext.lev. corresponden a 2 y 6 g/l de extracto de levadura respectivamente. Los datos graficados corresponden al promedio de tres repeticiones para cada cultivo.

esto podría llegar a influir en la viabilidad y en la capacidad de las mismas para adaptarse y competir a la hora de ser inoculadas. Para poner a prueba esto decidimos estudiar la viabilidad de las células mediante recuentos de células viables en placas de Petri con

medio de Vincent. Este medio es el que normalmente se utiliza para realizar los recuentos de rizobios. Los resultados que arrojaron los recuentos mostraron importantes diferencias entre los cultivos con 2 o 6 g/l de extracto de levadura.

Para la cepa E45, los cultivos que contenían 2 g/l de extracto llegaron a títulos cercanos a 10^{12} células por mililitro de cultivo, 2 órdenes de magnitud por arriba de los alcanzados por los cultivos crecidos frente a la concentración mayor del extracto. Obsérvese que hasta las 44 hs. aproximadamente, no existían diferencias entre los cultivos en lo que a número de UFC se refiere. A partir de dicho tiempo el título de los cultivos con 6 g/l de extracto de levadura comienza a decaer en forma leve mientras que el de los que contienen poco extracto siguen aumentando (fig.4-A). La cepa E97 mostró

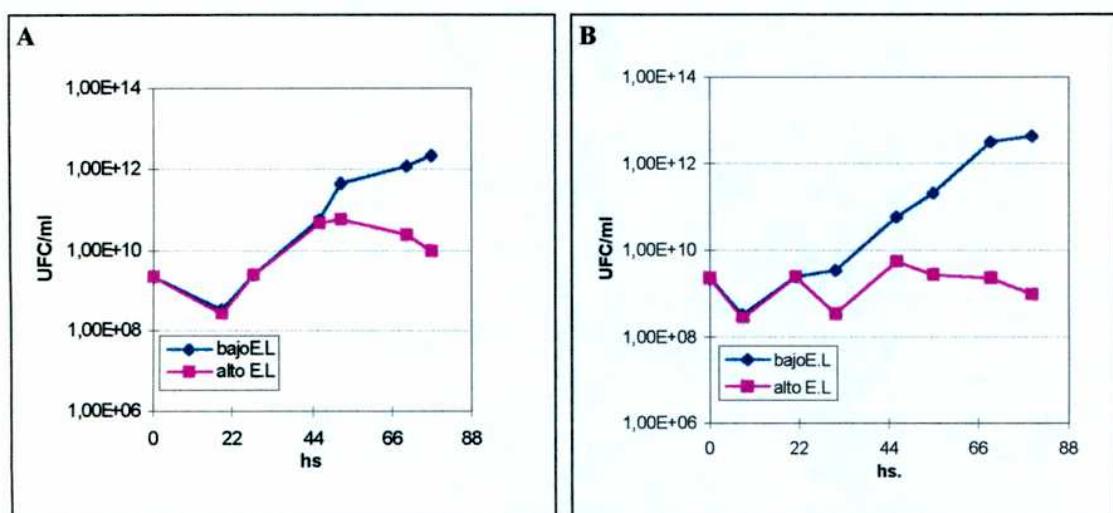


Figura 4. A-Recuentos de UFC/ml para la cepa E45. B-Recuentos de UFC/ml para la cepa E97. La abreviatura EL se refiere a Extracto de Levadura. Se representa el promedio de datos tomados por triplicado.

un comportamiento muy parecido al de la E45, aunque las diferencias entre los cultivos aparecen aproximadamente a las 22 hs. de crecimiento y no a las 44. Por otra parte también la diferencia entre los cultivos en relación a los títulos alcanzados es mayor en este caso, siendo estos mayores en 3 órdenes de magnitud para las células crecidas frente a la concentración mas baja de extracto de levadura (fig.4-B). Observando este comportamiento, nuestro objetivo era encontrar la causa que nos permitiera explicar porque los valores de absorbancia no habían diferido significativamente entre los tratamientos cuando los resultados obtenidos en los recuentos de células viables

indicaban una diferencia de 2 o 3 órdenes de magnitud entre los títulos alcanzados por los cultivos con 2 o 6 g/l de extracto de levadura.

En primer lugar y con el fin de encontrar esta diferencia en los cultivos líquidos, se efectuaron recuentos de células totales presentes en una y otra situación de crecimiento a las 80 hs. de cultivo. Los resultados obtenidos no difirieron significativamente entre los cultivos (Datos no mostrados), es decir que no existe relación entre el número de células totales y el recuento de UFC.

Se pudieron apreciar diferencias notables en el tamaño de las células. Las que

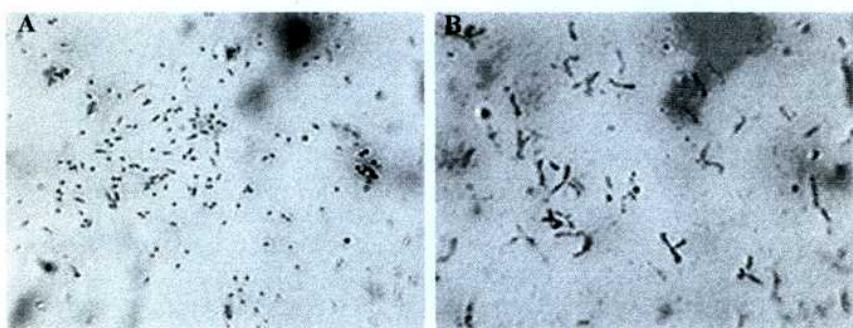


Figura 5. Observación microscópica de células crecidas durante 80 hs. A-Células crecidas en medio AP. B-Células crecidas en medio AP con 6 g/l de extracto de levadura. En ambos casos para la observación se utilizó un aumento de 1000x.

crecieron con 6 g/l de extracto de levadura tuvieron un tamaño mucho mayor que el de las crecidas con 2 g/l (fig.5-A,-B).

Para confirmar el hecho de que realmente no existían diferencias en la cantidad de biomasa presente en una u otra condición de crecimiento, decidimos realizar una determinación de DNA total presente en los cultivos con 80 hs. de crecimiento. La determinación se realizó mediante un método químico y solo fue hecha para la cepa E45.

Aunque se observaron diferencias en las concentraciones de DNA entre los distintos cultivos, las mismas fueron pequeñas y no representaron los 2 o 3 órdenes de magnitud que habían sido determinados en los recuentos de UFC (fig.6). Por el contrario, nosotros interpretamos estos resultados como una prueba más de que la cantidad de biomasa no difiere entre los cultivos cuando son crecidos en medio líquido.

Debíamos pensar entonces en otros experimentos que aportaran mas datos para tratar de dilucidar lo que realmente estaba sucediendo con estas células. En forma

paralela a la construcción de las curvas de crecimiento, se confeccionaron curvas de variación de pH, tanto para la cepa E45 como para la E97.

Mediante la interpretación de las mismas podríamos obtener una primera

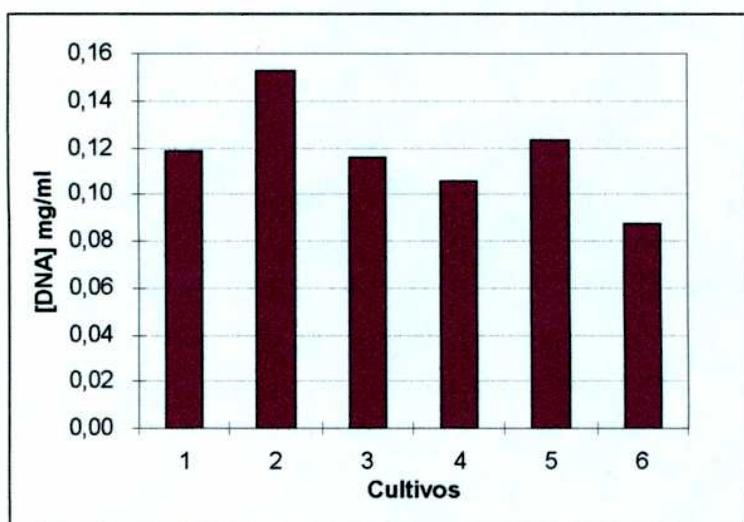


Figura 6. Gráfico de la concentración de DNA en cultivos con 80 hs. de la cepa E45. Los cultivos 1, 2 y 3, y los cultivos 4, 5 y 6 contienen 2 y 6 g/l de extracto de levadura respectivamente.

aproximación para observar si existen diferencias metabólicas entre los cultivos, dependiendo del ambiente nutricional en donde se los creció. Las curvas se construyeron midiendo los valores del pH en cada uno de los puntos de la curva de crecimiento. Todos los cultivos se iniciaron con un pH de 6,8. Para la cepa E45 e independientemente de la concentración de extracto de levadura, durante las primeras 20 hs. de cultivo, el pH se mantuvo constante y después comenzó a subir paulatinamente en todos los cultivos volviéndolos ligeramente alcalinos hasta un pH aproximado de 7,5 a las 28 hs. de crecimiento. Luego de este tiempo se produjo una llamativa divergencia en donde los cultivos que crecían con 2 g/l de extracto de levadura acidificaron y los que lo hacían frente a la concentración mas elevada del nutriente alcalinizaron. Este comportamiento se extendió hasta las 80 hs. de crecimiento. En dicho tiempo el pH final de los cultivos con 2 g/l de extracto fue cercano a 4, mientras que en los que contenían mayor cantidad del nutriente, el pH se aproximó a 7,6 (fig.7-A). Para la E97 se obtuvieron resultados muy similares con la excepción de que el pH comenzó a subir antes de las 20 hs., mas precisamente pasadas las 7 hs. de crecimiento. Después de las 30 hs. y de igual manera

que para la E45, se produjo la divergencia entre cultivos con baja y alta concentración de extracto de levadura (fig. 7-B).

Para profundizar el estudio del metabolismo decidimos evaluar los perfiles de proteínas intracelulares de los cultivos en geles de poliacrilamida. Utilizamos esta técnica para comparar los cultivos de células crecidas frente a 2 o 6 g/l de extracto. Se hicieron corridas para las dos cepas. En ambos casos se utilizaron cultivos con 80 hs. de crecimiento en las distintas situaciones nutricionales.

El desarrollo de la electroforésis se efectuó en idénticas condiciones, tanto para E45 como para E97. El volumen de muestra utilizado fue el mismo para los cultivos con 2 o 6 g/l de extracto de levadura, como así también para los que tenían 45 o 80 hs. de crecimiento.

Los resultados muestran patrones distintivos para una u otra situación nutricional

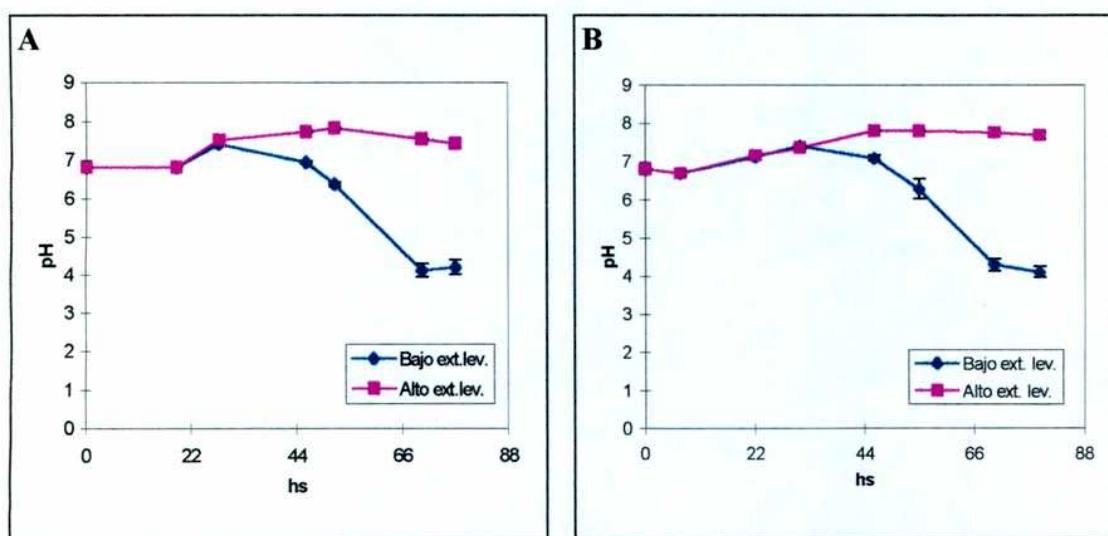


Figura 7. A-Curva de variación de pH para la cepa E45. B-Curva de variación de pH para la cepa E97. Bajo ext.lev. y Alto ext.lev. corresponden a 2 y 6 g/l de extracto de levadura respectivamente. Los datos graficados corresponden al promedio de tres repeticiones para cada cultivo.

dependiente del extracto de levadura, y los mismos pueden ser diferenciados perfectamente entre los cultivos a las 45 hs. de crecimiento. En los cultivos contenido la concentración mayor de extracto de levadura pueden apreciarse algunas bandas de mayor intensidad comparadas con las bandas de igual peso molecular pero pertenecientes a los cultivos con 2 g/l de extracto, lo que indicaría que ciertas proteínas se acumulan

más cuando la concentración de extracto es mayor (fig.8-a, b). Por otra parte, existen bandas que solo son observadas en esta última situación, lo cual pone de manifiesto la presencia de ciertas proteínas que solo son sintetizadas en presencia de 6 g/l de extracto de levadura (fig.8-c,d,e).

En la figura 8 solo se han indicado con flechas bandas correspondientes a la calle 6, pero esta calle fue tomada solo como un ejemplo de lo que se observa en todas las calles donde se sembraron cultivos con 6 g/l de extracto de levadura. Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos en las curvas de variación de pH quedaba claro que hubo diferencias en los tipos de metabolismo que se ponían de manifiesto en las bacterias dependiendo de la concentración del extracto.

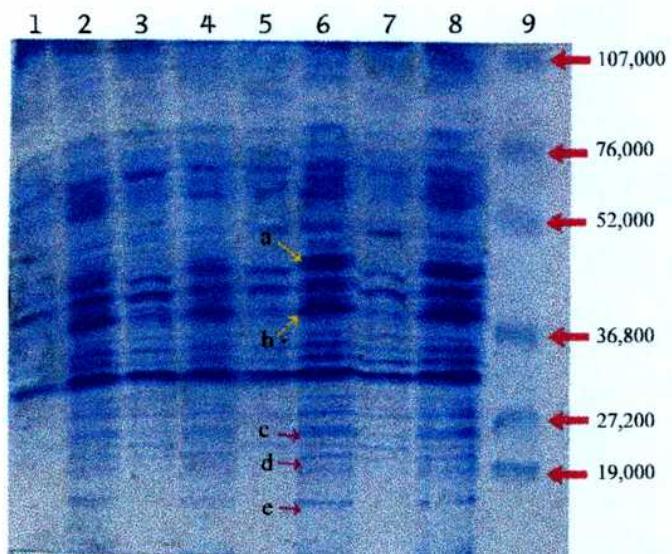


Figura 8. En las primeras cuatro calles se sembraron muestras conteniendo células con 45 hs. de cultivo, mientras que en las cuatro siguientes, las muestras sembradas contenían células con 80 hs. de crecimiento. Las muestras sembradas fueron las siguientes: calles 1 y 5, E45 crecida con 2 g/l de Ex.Lev.; calles 2 y 6, E45 crecida con 6 g/l de Ex.Lev.; calles 3 y 7, E97 crecida con 2 g/l de Ex.Lev.; y calles 4 y 8, E97 crecida con 6 g/l de Ex.Lev. En la calle 9 se sembraron marcadores de peso molecular.

Para tratar de comprender a qué nivel podría estar actuando el extracto decidimos analizar diferentes parámetros que hacen al metabolismo celular. Comenzamos analizando el consumo de glicerol, que fue utilizado como fuente de carbono. A pesar de que la técnica utilizada es muy precisa, los datos aparecen con mucha dispersión, y esto probablemente se deba a errores cometidos durante el pipeteo en las preparaciones de las

soluciones mezclas. De todos modos, estos errores no impiden que estimemos correctamente si esta fuente de carbono fue consumida en gran medida o no. De esta manera y como se puede apreciar en los gráficos de la figura 9, los valores de las concentraciones iniciales oscilan entre 17 y 15 g/l.

Los datos obtenidos muestran un bajo consumo de glicerol por parte de los cultivos.

Aproximadamente 5 g/l son consumidos por la cepa E45 durante las 80 hs. de crecimiento frente a 2 g/l de extracto de levadura, en tanto que en presencia de 6 g/l del extracto se consumieron 5.5 g/l. Esta diferencia es poco significativa teniendo en cuenta el error que se arrastra a lo largo de toda la determinación (fig.9-A). Para el caso de la cepa E97, se observa un patrón semejante al de la cepa antes analizada, aunque el consumo es bastante menor y los datos no contienen tanta dispersión. En este caso, durante las 80 hs. de crecimiento se consumen alrededor de 1.6 g/l de glicerol en

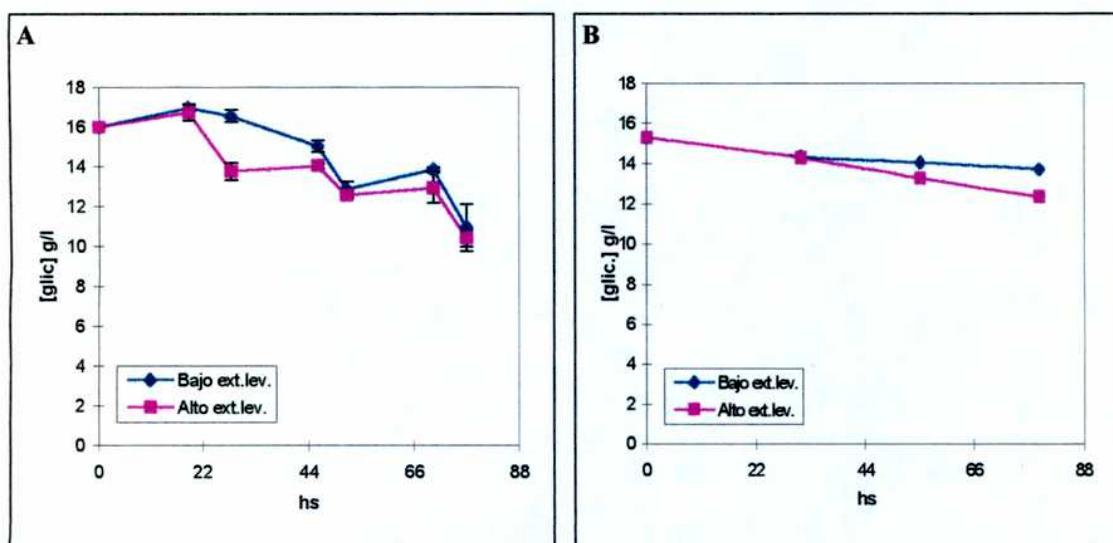


Figura 9. Determinación del glicerol consumido. La determinación se realizó sobre las muestras de los distintos cultivos tomadas en cada punto de la curva de crecimiento.

A-Consumo de glicerol por la cepa E45. **B**-Consumo de glicerol por la cepa E97. En ambos casos se muestra el promedio de tres determinaciones para cada uno de los tratamientos.

aquellos cultivos crecidos frente a la concentración menor de extracto de levadura, mientras que los que lo han hecho frente a 6 g/l de este nutriente, consumieron 2,94 g/l de la fuente de carbono utilizada (fig.9-B). El hecho de que solo se consuman unos pocos gramos por litro de glicerol nos hizo pensar que probablemente las células obtenían la energía metabolizable de una fuente de carbono diferente. Decidimos entonces estudiar el consumo de amino ácidos para dilucidar si los mismos eran

utilizados como fuente carbonada. La determinación se realizó mediante un método enzimático según se especifica en materiales y métodos. Las determinaciones se hicieron por triplicado tanto para los cultivos con 2 g/l de extracto de levadura como para aquellos que contenían la concentración mayor del nutriente.

Los cultivos de la cepa E45 conteniendo 6 g/l de extracto de levadura inicialmente presentaron una concentración de amino ácidos de 4500 nmoles/ml. Al cabo de 80 hs. de crecimiento, el promedio de las concentraciones determinadas fue cercano a los 3000 nmoles/ml. De esta manera puede observarse que estos cultivos consumieron cerca de 1500 nmoles de amino ácidos por mililitro de cultivo. Este consumo fue independiente de la concentración de extracto de levadura, ya que aquellos que crecieron con 2 g/l de extracto y que contenían inicialmente 1500 nmoles/ml, luego de las 80 hs. la cantidad remanente en el medio era cercana a 0 (fig.10-A). Con respecto a la cepa E97, los resultados que se obtuvieron para los cultivos con 2 g/l de extracto de levadura mostraron un consumo similar al observado con la E45. La concentración inicial de

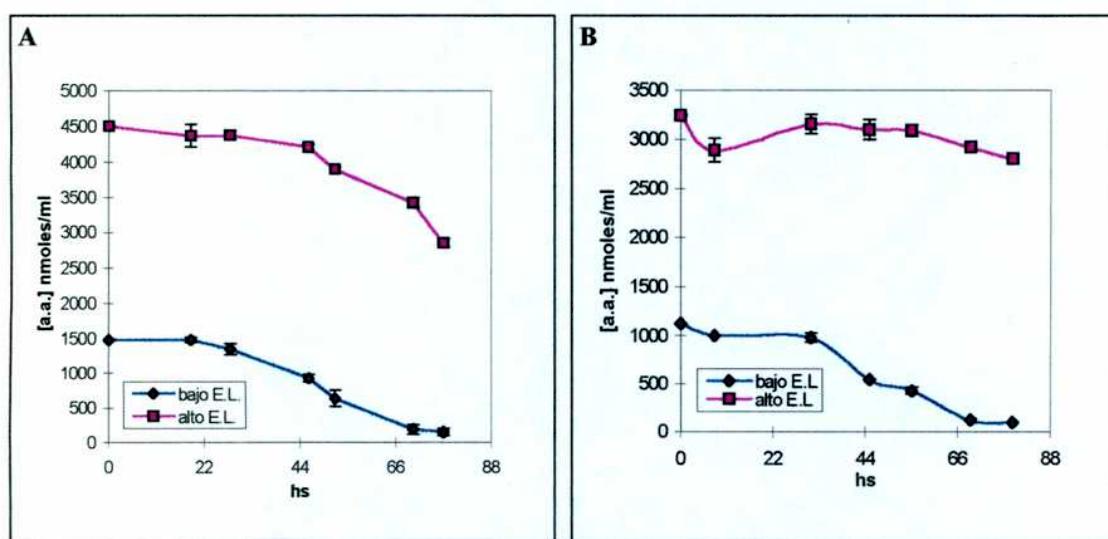


Figura 10. Determinación de los amino ácidos consumidos durante 80 hs. de crecimiento.

A-Consumo de a.a. por la cepa E45. **B**-Consumo de a.a. por la cepa E97. En los dos gráficos se muestran el promedio de tres determinaciones para cada tratamiento. La abreviatura E.L corresponde a extracto de levadura.

amino ácidos fue algo menor respecto de la de los cultivos de la E45. La misma fue de 1125 nmoles/ml, los cuales fueron casi totalmente consumidos, dado que la

concentración remanente a las 80 hs. fue de 100 nmoles/ml. En lo que respecta a los cultivos crecidos frente a 6 g/l, se observó un comportamiento diferente a los observados previamente. De los 3250 nmoles/ml de amino ácidos que inicialmente contenían los cultivos solo se consumieron 500 nmoles/ml durante las 80 hs. de crecimiento, 1000 nmoles/ml menos que lo que consumió la cepa E45 en la misma situación nutricional. Esto demuestra que cada cepa puede responder de forma diferente a un determinado entorno nutricional (fig. 10-B). Estos resultados sugieren que una parte importante de los amino ácidos aportados por el extracto de levadura son utilizados como energía metabolizable para el crecimiento de los rizobios. Con los datos obtenidos hasta aquí no podemos decir que existan diferencias importantes entre los cultivos con 2 o 6 g/l de

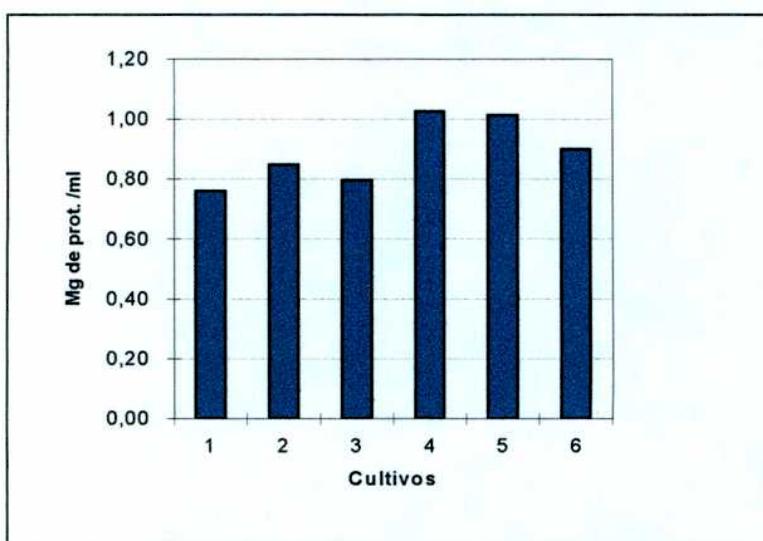


Figura 11. Gráfico de la concentración de proteínas intracelulares acumuladas hasta las 79 hs. de crecimiento. La determinación solo se realizó en la cepa E45. Los cultivos 1, 2 y 3 y los cultivos 4, 5 y 6 contienen 2 y 6 g/l de extracto de levadura respectivamente.

extracto de levadura, con excepción de aquellas observadas en las curvas de pH donde claramente se aprecian distintas tendencias entre cultivos crecidos frente a 2 o 6 g/l de extracto de levadura.

Concentrados en seguir caracterizando las cepas en relación a la concentración de extracto de levadura, decidimos determinar la cantidad de proteínas y de hidratos de carbono acumulados en las células luego de 80 hs. de crecimiento. La determinación de proteínas se realizó mediante el método de Lowry y la misma solo fue hecha para la cepa E45. Los resultados muestran una cantidad mayor de proteínas intracelulares acumuladas

en los cultivos crecidos en presencia de 6 g/l de extracto (fig.11). La diferencia obtenida entre los promedios de los cultivos con 2 y con 6 g/l de extracto es de 0.18 mg de proteína por ml. de cultivo. En otras palabras, los cultivos crecidos frente a la concentración mayor de extracto de levadura, acumularon por mililitro de cultivo un 22% más que aquellos crecidos en presencia de 2 g/l del extracto.

Para determinar los hidratos de carbono se aplicó el método de la antrona el cual se especifica en materiales y métodos. Esta determinación se llevó a cabo en ambas cepas, en células con 46 y 86 hs. de crecimiento. Comenzaremos con el análisis de la cepa E45. Para esta cepa, los resultados muestran una mayor acumulación de hidratos de carbono en aquellas células crecidas en presencia de 2 g/l de extracto de levadura. Si bien esto ya puede ser observado a las 46 hs., la diferencia se hace mucho mas notoria a las 86 hs. de crecimiento. Obsérvese que a partir de las 46 hs. las células crecidas frente a 2 g/l de extracto incrementan el contenido de los hidratos de carbono a mas del doble de

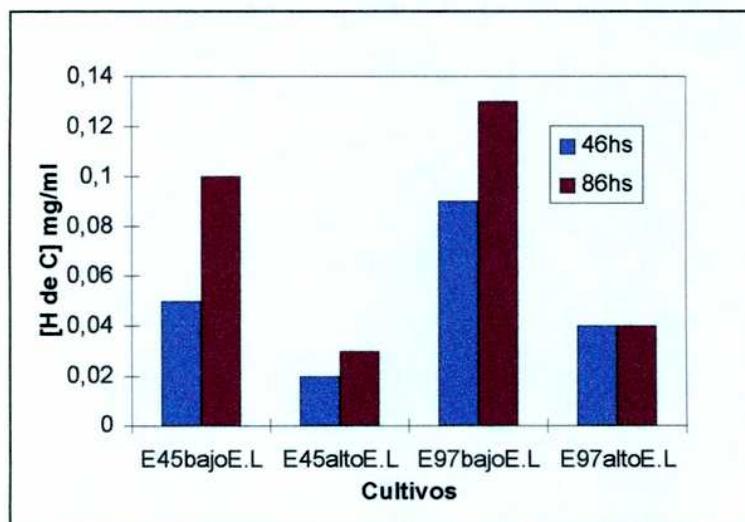


Figura 12. Determinación de los hidratos de carbono acumulados intracelularmente en las cepas E45 y E97, luego de 46 y 86 hs de crecimiento con 2 o 6 g/l de extracto de levadura. La abreviatura E.L significa extracto de levadura.

los acumulados hasta ese tiempo, en cambio, las crecidas frente a 6 g/l solo incrementaron la mitad de lo que habían acumulado hasta las 46 hs (fig.12).

Para la cepa E97, los resultados son similares aunque las cantidades de hidratos de carbono acumuladas a las 46 hs. son algo mayores que las observadas en la E45. Por otra parte, el incremento luego de las 46 hs. en los cultivos con menos extracto de

levadura es menor, teniéndose en cuenta lo acumulado hasta ese momento en la otra cepa. En ambos casos, la diferencia entre la cantidad de hidratos de carbono acumulados por los cultivos con menos extracto y aquellos con 6 g/l del mismo, a las 86 hs. de crecimiento es notoria. Tanto la E45 como la E97, crecidas con 2 g/l de extracto acumularon un 70% mas de hidratos de carbono que las células crecidas con 6 g/l de este nutriente.

Con todos los datos obtenidos hasta aquí no habíamos podido relacionar lo observado en los recuentos de células viables con lo obtenido en las diferentes determinaciones realizadas para estimar biomasa. Estaba claro que los dos órdenes de magnitud en que los cultivos crecidos en medios con 2 g/l de extracto de levadura

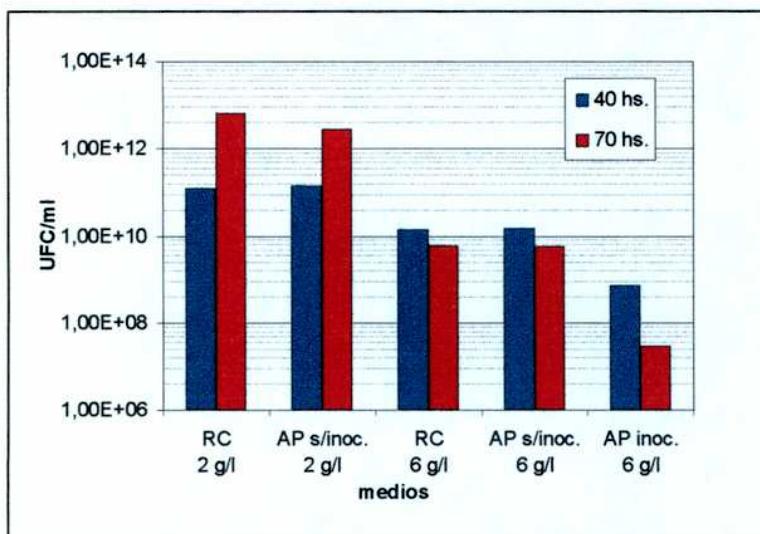


Figura 13. Gráfico de recuentos de UFC en distintos medios de cultivo para la cepa E45 crecida 40 o 70 hs. Referencias: RC: Rojo Congo; AP s/inoc.: medio AP sin inocular; AP inoc.: medio AP inoculado. 2 g/l: 2 g/l de extracto de levadura; 6 g/l: 6 g/l de extracto de levadura.

superaban a aquellos crecidos frente a la concentración mayor del extracto no fueron vistos en ninguno de los otros experimentos. Pensamos entonces en realizar un nuevo recuento de células viables pero esta vez, además de plaquear en medio de Vincent, también plaquearíamos en los mismos medios de crecimiento (AP), con 2 y 6 g/l de extracto de levadura y agarizados. De esta forma podríamos dilucidar si lo observado en los recuentos en medio de Vincent se reproduce en los medios de crecimiento agarizados

y así evaluar la posibilidad de un efecto inhibitorio del medio de Vincent sobre las células crecidas con 6 g/l de extracto de levadura. Los medios preparados fueron AP sin inocular, AP en donde se cultivó la cepa E45 hasta las 40 y 70 hs., y por último medio de Vincent. Cumplidos cada uno de los tiempos correspondientes y luego de centrifugar los cultivos, se recobró el sobrenadante y se le agregó 1 gr. de agar para obtenerlo así al 2%. Una vez hecho esto se procedió al autoclavado de los mismos. Analizaremos primero los datos obtenidos con cultivos de 40 hs. Los cultivos crecidos frente a 2 g/l alcanzaron títulos mas elevados que aquellos que lo hicieron frente a 6 g/l del nutriente, Comparando los títulos alcanzados en el mismo medio en una u otra condición de crecimiento, se puede observar que tanto los plaqueados en medio de Vincent como en medio AP sin inocular difieren en mas o menos un orden de magnitud. Con respecto al título alcanzado en el medio inoculado, crecido 40 hs. y luego agarizado, se puede ver que el mismo está por debajo de los obtenidos en los tratamientos restantes. Con respecto a los cultivos con 70 hs. de crecimiento, se observa un incremento en los títulos para aquellos crecidos frente a la menor concentración del extracto, alcanzando valores cercanos a 10^{13} células por mililitro de medio. Por el contrario, los que crecieron en presencia de 6 g/l de extracto presentaron títulos menores que a las 40 hs. Nuevamente no hay diferencias entre los títulos alcanzados en medio de Vincent y en el AP sin inocular, en tanto que en el medio AP inoculado el título a las 70 hs. esta por debajo de todos los demás y el mismo no llega a 10^8 células por mililitro de medio (fig.13).

5. Evaluación de las curvas de crecimiento y caracterización de la cepa E45 cultivada en medio APE (parte IV).

Considerando los resultados obtenidos anteriormente en donde los cultivos consumían muy poco glicerol, decidimos probar con 4 g/l de este nutriente para comprobar si era posible obtener tan altos títulos como los obtenidos con 16 g/l de dicha fuente de carbono, en aquellos medios con 2 g/l de extracto de levadura. Para ello, se utilizaron los medios AP, AP con alta concentración de extracto de levadura y AP con 4 g/l de glicerol (APE). Los cultivos fueron crecidos de la misma manera que en los anteriores tratamientos y solo se trabajó con la cepa E45. Los resultados obtenidos permiten ver que las curvas de crecimiento son muy similares a las observadas para los

cultivos de E45 creciendo frente a 16 g/l de glicerol (fig.3-A). En este caso los cultivos alcanzan valores de absorbancia cercanos a 6, y las diferencias entre aquellos crecidos frente a 2 o 6 g/l de extracto de levadura no son significativas (fig.14-A).

Al analizar los resultados obtenidos de los recuentos de células viables se comprobó que los cultivos crecidos frente a la menor concentración de extracto alcanzaron títulos cercanos a 10^{12} , un orden de magnitud por sobre los obtenidos por los cultivos crecidos frente a 6 g/l del extracto. Los recuentos se realizaron por triplicado para cada tratamiento (fig.14-B).

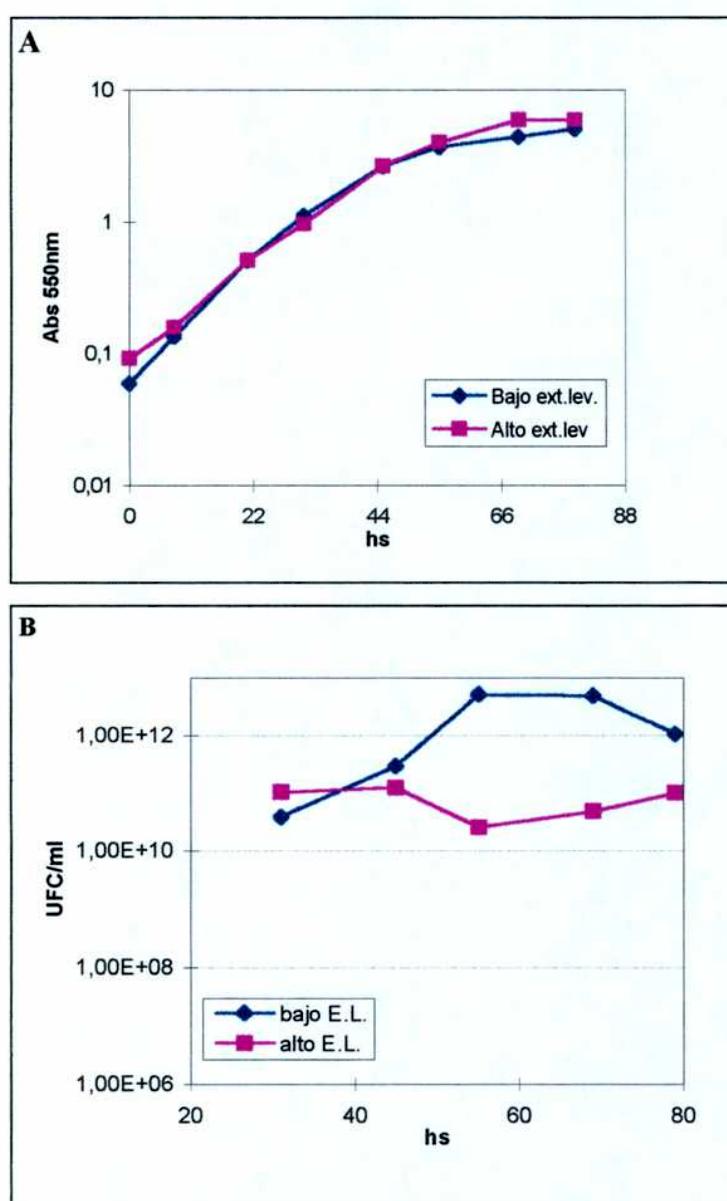


Figura 14. A-Curva de crecimiento para la cepa E45 crecida en medio APE. B-Recuentos de UFC en medio de Vincent para la cepa E45 crecida en medio APE. Los datos mostrados corresponden al promedio de triplicados realizados para cada tratamiento.

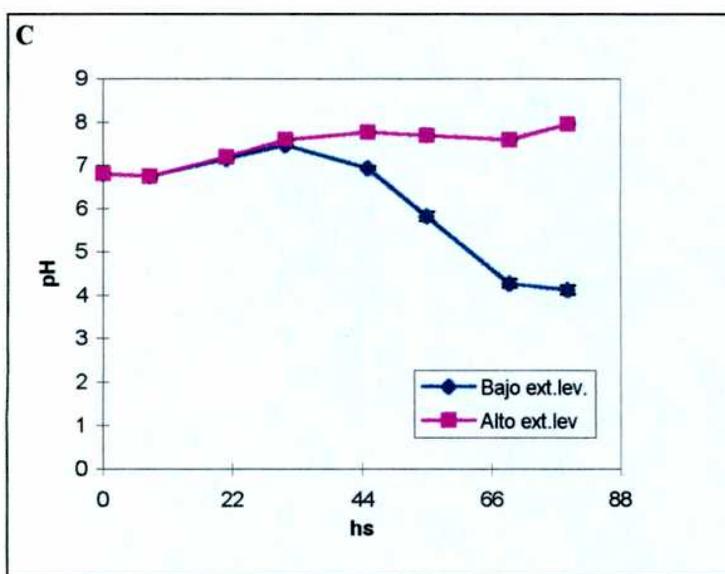


Figura 15. Curva de variación de pH para la cepa E45 crecida en medio APE. Los valores graficados corresponden al promedio de triplicados.

También se analizó la variación del pH a lo largo de la curva de crecimiento y se pudieron apreciar nuevamente diferencias importantes entre los cultivos con alta o baja concentración de extracto. Los cultivos crecidos frente a 2 g/l del extracto acidificaron el medio hasta un pH cercano a 4, mientras que los que lo hicieron frente a 6 g/l alcalinizaron hasta un pH cercano a 8 (fig.15). Comparando con lo observado en la figura 7-A se puede ver que no hay diferencias significativas entre los valores de pH obtenidos en aquel caso y en un medio con 4 g/l de glicerol.

Para caracterizar la cepa E45 creciendo en presencia de 4 g/l de glicerol realizamos determinaciones del consumo de glicerol y amino ácidos luego de 80 hs. de cultivo. Analizando primero el consumo de glicerol, podemos ver que la manera en que se consume el mismo es independiente de su concentración en el medio de cultivo. Por otra parte, en presencia de 2 o 6 g/l de extracto de levadura el consumo es de 3,57 o 3,02 g/l de glicerol respectivamente. Obsérvese que la forma de la curva de consumo de este nutriente en función del tiempo es similar a la observada para la cepa E45 en la figura 9-A, en donde la cepa fue crecida en presencia de 16 g/l de esta fuente de carbono. Nuevamente aquí las diferencias entre los valores de las concentraciones iniciales del

nutriente se atribuyen a errores experimentales (fig. 16-A). En lo que respecta a los amino ácidos, la cepa E45 mostró un consumo cercano a 1140 nmoles/ml para los cultivos con 2 g/l de extracto y cercano a 2750 nmoles/ml para los que tenían 6 g/l (fig. 16-B). Estos

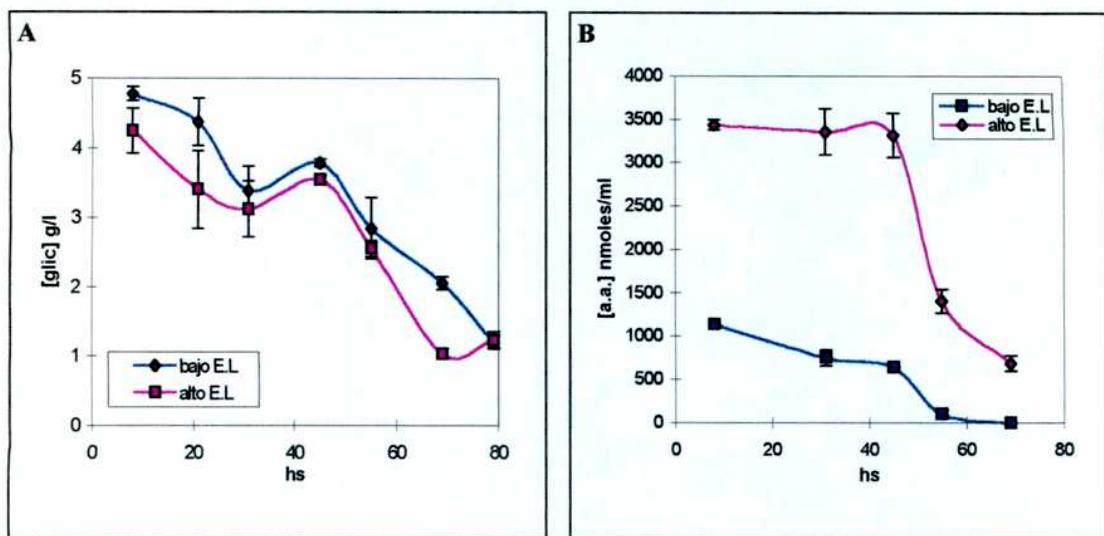


Figura 16. A-Gráfico de la concentración de glicerol vs tiempo. B-Gráfico de la concentración de amino ácidos vs tiempo. Ambas determinaciones se realizaron por triplicado para cada tratamiento, y los resultados mostrados corresponden al promedio de las mismas. Las experiencias se realizaron con la cepa E45 crecida en medio APE.

resultados difieren de los obtenidos utilizando 16 g/l de glicerol. Como puede verse, el consumo de amino ácidos por parte de los cultivos crecidos frente a la concentración mayor del extracto es mas del doble de lo que consumen aquellos con 2 g/l . Esto indicaría que al disminuir la concentración de glicerol, las células con 6 g/l de extracto de levadura utilizan mas amino ácidos como energía metabolizable para su crecimiento que cuando crecen en presencia de 16 g/l de glicerol.

6. Evaluación de las curvas de crecimiento y caracterización de la cepa E45 cultivada en medio AP + Glutamato (parte IV).

Como hemos podido ver, tanto los cultivos crecidos con 2 o 6 g/l de extracto de levadura consumen una parte importante de los amino ácidos aportados por este nutriente. Teniendo en cuenta esto, nos preguntamos si concentraciones elevadas de amino ácidos podrían afectar el estado de las células. Para responder a esta pregunta

decidimos agregar 10 % de glutamato monosódico al medio AP para evaluar si se producen respuestas similares a las observadas con 6 g/l de extracto de levadura.

Los resultados obtenidos mostraron que de manera similar a lo observado en los cultivos con 6 g/l de extracto, existe un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células cuando son crecidas frente a una elevada concentración de glutamato. Los recuentos de UFC arrojaron títulos 4 órdenes de magnitud mas bajos que los cultivos crecidos en medio AP (Tabla 1). Esta diferencia es mayor a las observadas en los recuentos realizados anteriormente, y posiblemente sea debido a que se utilizó una concentración muy elevada de glutamato.

Medios	UFC/ml	Peso seco (mg/ml)	Trat. c/nalidixico
AP+GLUTAMATO	6.58e ⁸	1.76	+
AP	3.97e ¹³	2.01	+

Tabla 1. Representación de distintos parámetros relativos a la cepa E45 crecida durante 80 hs. Los recuentos de UFC y la determinación de peso seco se hicieron por duplicado. Aquí se expresa el promedio de dichos duplicados. Para el tratamiento con ácido nalidixico el signo + significa que hubo elongación de las células. En este tratamiento se midieron la cantidad de células suficientes para que la experiencia tenga valor estadístico.

Procediendo de igual manera que en los experimentos anteriores analizamos diferentes parámetros para medir biomasa. En la determinación del número de células totales por medio de recuentos en cámara de Newbauer no se observaron diferencias significativas entre los cultivos crecidos en AP o AP + glutamato. Nuevamente pudieron observarse diferencias importantes en los tamaños de las células, siendo mas grandes aquellas crecidas en presencia de 10 % de glutamato (datos no mostrados).

Para tener mas información en lo que a biomasa se refiere decidimos determinar el peso seco , medición que no habíamos realizado anteriormente. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los cultivos, indicando una vez más que el número de bacterias totales no difiere entre los cultivos (Tabla 1).

Si bien todos estos parámetros indicaban que la cantidad de células totales presentes en uno u otro cultivo era similar, no sabíamos si el número de células viables era el mismo en ambos casos. Para comprobarlo realizamos un experimento con ácido

nalidíxico según la técnica utilizada por Kogure et.al. (1979) citada en materiales y métodos.

Los resultados obtenidos nos muestran que en ambos cultivos la longitud media de las bacterias aumentó proporcionalmente al ser tratadas con ácido nalidíxico, es decir que el número de células viables es similar en los cultivos crecidos en medio AP o en AP + glutamato (fig. 17 A-B).

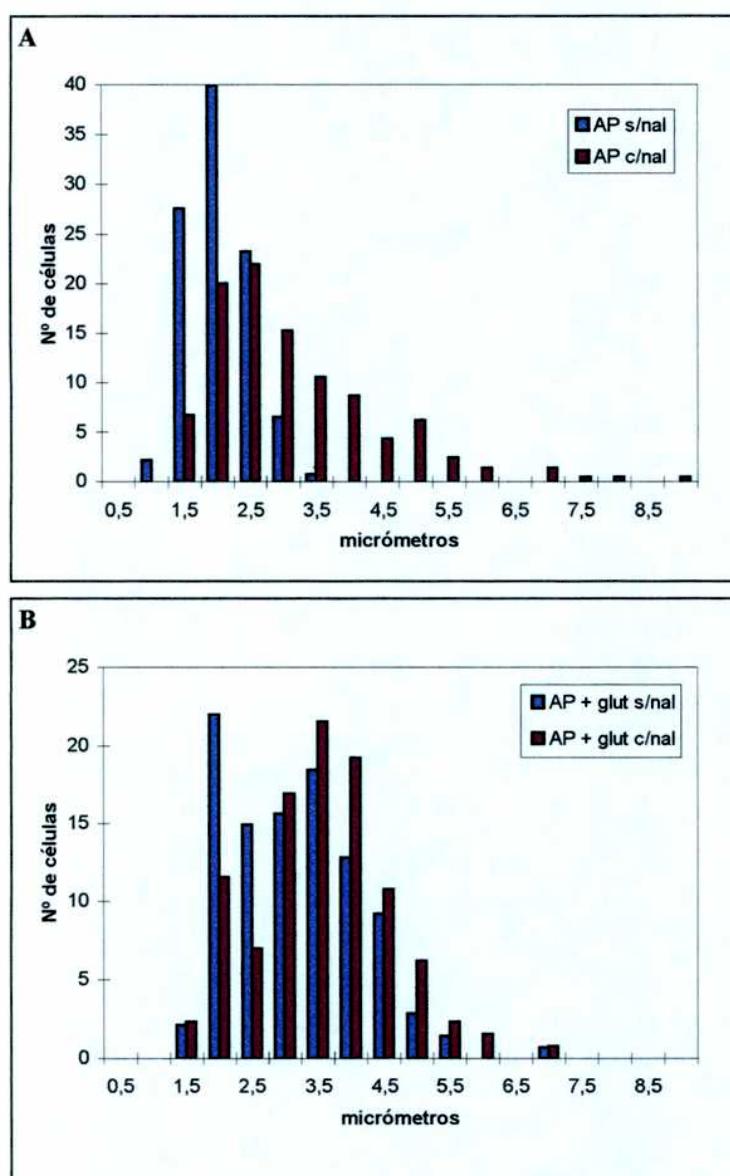


Figura 17. Longitudes medias de las células tratadas y no tratadas con ácido nalidíxico. **A**-Cultivos crecidos en medio AP. **B**-Cultivos crecidos en medio AP + glutamato. Las abreviaturas s/nal y c/nal corresponden a tratamientos sin ácido nalidíxico y con ácido nalidíxico respectivamente.

Discusión

Como se mencionó anteriormente, las cepas de los inoculantes deben competir con aquellas cepas indígenas, que por estar mejor adaptadas al medio no permiten que las primeras se consoliden en el suelo para así poder nodular eficientemente las plantas leguminosas. Por otra parte, los microorganismos deben enfrentar condiciones ambientales adversas y situaciones de estrés a fin de asegurar su supervivencia. Por estas razones, las bacterias deben llegar al suelo en el mejor estado fisiológico y con el mayor título posible para enfrentar estos desafíos. Para asegurarse de que esto así ocurra, uno debe establecer cuales son las condiciones óptimas de crecimiento, ya que el punto de partida para la obtención de un inoculante eficiente es el cultivo de las bacterias.

En este trabajo nosotros hemos evaluado diferentes diseños de medios de cultivo con el fin de hallar alguna formulación que nos permita alcanzar los títulos bacterianos mas altos posibles. Mediante un análisis estadístico comprobamos que en las condiciones de cultivo empleadas por nosotros, el extracto de levadura afectaba significativamente el crecimiento bacteriano. Decidimos entonces probar con diferentes concentraciones del extracto y finalmente obtuvimos un diseño de un medio de cultivo que denominamos AP y que contiene K_2HPO_4 0.3 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g/l; $NaCl$ 0.2 g/l; Ext. Levadura 2 g/l; Glicerol 16 g/l y $(NH_4)_2SO_4$ 0.65 g/l. En el medio AP es posible obtener 10^{12} células/ml, siendo éste un título sumamente interesante comparado con los alcanzados en otros trabajos (Balatti *et.al.*, 1991; Boiardi *et.al.*, 1983). Experimentando con este medio observamos que podíamos reducir la concentración de glicerol de 16 a 4 g/l sin que se vean afectados los títulos máximos. De esta manera rediseñamos el AP utilizando menos glicerol, con lo que se hace posible obtener títulos elevados reduciendo los costos de producción. Este último medio lo hemos denominado APE.

Por otra parte, se encontró que las células crecidas en AP conteniendo mas extracto de levadura son incapaces de alcanzar títulos tan elevados como los obtenidos en AP cuando estos se calculan por recuentos de UFC. En todos los recuentos realizados en medio de Vincent, los títulos alcanzados por las células crecidas frente a 2 g/l de extracto superaron en dos o mas órdenes de magnitud a las crecidas en medios con

6 g/l de éste nutriente. Si bien en un primer momento habíamos considerado un posible efecto inhibidor del medio de Vincent sobre el crecimiento de las células crecidas con 6 g/l de extracto, dicho efecto quedó descartado cuando al realizar los recuentos de UFC en otros medios de cultivo observamos los mismos resultados.

Estas diferencias en los títulos alcanzados frente a una u otra situación nutricional no habían sido observadas en los valores de absorbancia obtenidos en las curvas de crecimiento y esto nos llevó a considerar una posible participación de alguna sustancia que estuviera presente en los cultivos con 6 g/l de extracto de levadura y que pudiera estar absorbiendo luz. Pensamos entonces en la existencia de exopolisacáridos liberados por las células crecidas frente a 6 g/l del extracto. Los rizobios, frente a concentraciones elevadas de compuestos carbonados, son capaces de producir exopolisacáridos que son liberados al medio extracelular (Dudman and Jones, 1980). Estos exopolisacáridos pueden producir un aumentando de la turbidez del medio, de manera que cierta cantidad de estos compuestos podrían hacer que los valores de absorbancia se equiparen a pesar de que el número de células totales fuera distinto. Los resultados de los recuentos en cámara de Newbauer y los de la determinación de DNA evidenciaron que realmente el número de células totales no difería entre los distintos cultivos, ya que no observamos nunca esos dos o mas órdenes de magnitud vistos en los recuentos de UFC. De esta manera quedaba claro que no había una participación de exopolisacáridos liberados por las células crecidas frente a 6 g/l de extracto.

Un resultado curioso fue el que obtuvimos al realizar las observaciones microscópicas para los recuentos en cámara de Newbauer. Las células que crecieron frente a 6 g/l de extracto de levadura tuvieron un tamaño mucho mayor que el de las crecidas frente a 2 g/l. Estas importantes diferencias nos llevaron a pensar que las células podrían estar utilizando metabolismos diferenciales dependiendo del estado nutricional de cada cultivo. Esto quedó demostrado con lo observado en las curvas de variación de pH y en los perfiles de proteínas. El hecho de que un cultivo alcalinice el medio hasta un pH cercano a 8, y que el otro lo acidifique hasta valores cercanos a 4, habla claramente de estados metabólicos diferentes. También los patrones de bandas obtenidos en las electroforesis demuestran que algunas de las proteínas intracelulares son diferentes frente a una u otra situación nutricional y por lo tanto también lo serán los caminos metabólicos

en los cuales éstas intervienen. Al existir metabolismos bien diferenciados nos preguntábamos en que momento se producía esa diferenciación.

Analizando conjuntamente los resultados obtenidos hasta aquí uno puede apreciar que llamativamente existe un punto de inflexión, un “switch” que se produce entre las 30 y 45 hs. a partir del cual comienzan a divergir los cultivos que crecen frente a 2 o 6 g/l de extracto de levadura. Esta divergencia a la que nos referimos es la que se observa en los valores de pH de los distintos medios de cultivo, y los cambios que se producen en el número de UFC obtenidos en los recuentos de las mismas. Podríamos pensar que entre estos tiempos se produce la diferenciación metabólica dependiendo de la concentración de extracto de levadura, pero no estamos en condiciones de afirmarlo.

A esta altura aún no hemos sido capaces de explicar como es que las células crecidas frente a 6 g/l de extracto de levadura son incapaces de alcanzar los mismos títulos a los que llegan las que crecen frente a la concentración mas baja del extracto cuando se las plaquea en medios agarizados, si en los cultivos líquidos el número de células totales es el mismo. Nosotros creemos que las bacterias crecidas en medios de cultivo con concentraciones de extracto de levadura tan altas como 6 g/l sufren algún tipo de estrés nutricional, lo que no les permite crecer de manera normal cuando se las siembra en los medios agarizados que comúnmente son utilizados para realizar los recuentos de células viables en este tipo de bacterias.

La pregunta que nos hacemos es de que manera el extracto de levadura puede afectar a las células y cual es el factor presente en este nutriente que puede estresar a las células. Analizando detenidamente cada uno de los experimentos realizados hasta aquí, nos detuvimos en los resultados obtenidos en las determinaciones de amino ácidos consumidos. Una parte importante de los amino ácidos aportados por el extracto de levadura es consumida por la células y utilizada como fuente de energía metabolizable a diferencia del glicerol presente en el medio que prácticamente no se consume. Pensamos entonces que estos amino ácidos pueden estar interfiriendo en el metabolismo de las células cuando se encuentran en concentraciones elevadas. Si consideramos que una proporción importante de los mismos es glutamato, y que este amino ácido interviene en varios caminos metabólicos, no es descabellado pensar que el glutamato puede tener una importante participación en las respuestas observadas en cultivos crecidos con 6 g/l de extracto de levadura. Por otra parte, los resultados obtenidos por Pradella et.al.(1994),

también aportan datos de la importancia del este amino ácido en el crecimiento de *B. japonicum*. Los experimentos realizados con medio AP suplementado con 10 % de glutamato determinaron que efectivamente este amino ácido induce las mismas respuestas que una alta concentración de extracto de levadura, impidiendo que las células, al ser plaqueadas en medios agarizados, alcancen títulos tan altos como los cultivos crecidos en medio AP. El glutamato puede ser entonces el factor estresante presente en el extracto de levadura, el cual produce el estrés al encontrarse en concentraciones elevadas.

Aunque existen varios trabajos referidos a diferentes tipos de estrés que afectan la viabilidad de los rizobios, no hemos encontrado alguno que refiera a amino ácidos o extracto de levadura como factores estresantes. Se ha establecido que *Bradyrhizobium japonicum* es altamente susceptible a estrés por temperatura cuando se lo expone por un tiempo a 37 °C (Kennedy and Wollum, 1988). También, los rizobios en general son altamente susceptibles a estrés por desecación (Bushby and Marshall 1977a, 1977b). Otros estudios realizados en bacterias gram negativas pertenecientes a la especie *Salmonella typhimurium*, demuestran que las mismas se ven afectadas por distintos tipos de estreses medio ambientales, respondiendo a éstos con la expresión de ciertos genes específicos (Fang *et.al.*, 1996).

En lo que a estrés en bacterias gram negativas se refiere, son importantes los resultados obtenidos por Manahan and Steck (1996). Estos investigadores encontraron que *Agrobacterium tumefaciens* y *Rhizobium meliloti* son capaces de entrar en un estado viable pero no cultivable (VBNC), en respuesta a alteraciones medio ambientales. El estado VBNC es caracterizado por la incapacidad de las células viables para dar colonias cuando se las plaquea en medios de crecimiento no selectivos (Manahan and Steck, 1996).

La condición VBNC ha sido demostrada en al menos 16 géneros bacterianos, mayoritariamente pero no exclusivamente en bacterias gram negativas. El patógeno humano *Vibrio vulnificus*, al ser expuesto a temperaturas inferiores a 10 °C entra en un estado VBNC. Este estado aparece luego de algún estrés ambiental como por ejemplo bajas temperaturas, elevada salinidad, luz; y además el estado puede ser reversible cuando se elimina el estrés. La entrada en el estado VBNC varía directamente con la edad fisiológica de la células. Las células en fase estacionaria requieren 40 días o mas

para entrar en ésta condición, mientras que aquellas que se encuentran en fase exponencial de crecimiento se vuelven no cultivables dentro de los 7 o 10 días (Oliver, 1995).

Las células que se encuentran en una condición VBNC pueden recuperarse y volverse cultivables. Por otra parte se comprobó que cuando se utilizan medios nutritivos para la recuperación, la condición VBNC no puede ser revertida. Esto indicaría que elevadas concentraciones de nutrientes podrían resultar letales para la células o podrían ser inhibitorias para la división celular en las poblaciones VBNC (Whitesides and Oliver, 1997).

Teniendo en cuenta estos antecedentes nosotros hipotetizamos que las cepas E45 y E97 de *B. japonicum* podrían entrar en un estado VBNC luego de sufrir algún tipo de estrés nutricional cuando se las cultiva frente a una elevada concentración de glutamato o de extracto de levadura. Esto justificaría los resultados obtenidos en nuestro trabajo, en donde las células crecidas frente a éstas condiciones son incapaces de llegar a títulos tan altos como los alcanzados por aquellas células crecidas en presencia de 2 g/l de extracto de levadura. En lo que a viabilidad se refiere, los resultados obtenidos en los tratamientos con ácido nalidíxico demostraron que las células crecidas en medio AP + glutamato permanecen viables a las 80 hs. de igual manera que aquellas crecidas en medio AP. Esta evidencia fue confirmada por los resultados obtenidos en las determinaciones de DNA y peso seco y en los recuentos en cámara de Newbauer.

El hecho de que se hayan obtenido algunas colonias en los recuentos de UFC de los cultivos estresados, indicaría que la bacterias plaqueadas pertenecerían a una población mixta en donde un porcentaje de la misma estaría en un estado VBNC, mientras que el resto seguirían siendo bacterias cultivables.

En relación al momento en que estas células entran en el estado VBNC, creemos que el fenómeno se produce entre las 30 y 45 hs., tiempo a partir del cual comienzan a diferenciarse los metabolismos que se ponen de manifiesto en una u otra condición nutricional. Esto estaría de acuerdo con lo observado por Oliver (1995), en donde el *Vibrio vulnificus* ingresa en el estado VBNC durante la fase de crecimiento exponencial.

Cuando se plaquearon las células en un medio en el cual hubo crecimiento bacteriano durante 70 hs., los títulos obtenidos fueron inferiores a los observados en medios nutritivos donde no hubo crecimiento. Esto demostraría que el factor que

produce el estrés de la células perdura en el medio independientemente de que el mismo sea agarizado y autoclavado, y que las células plaqueadas siguen ingresando en el estado VBNC.

Las diferencias metabólicas observadas entre los cultivos son producto de los cambios que se producen a ese nivel en células VBNC. Es sabido que las células en éste estado sintetizan proteínas específicas que responden a situaciones de estrés y que afectan la supervivencia de las mismas.

Resumiendo, nosotros sugerimos que al igual que otras bacterias gram negativas, las cepas E45 y E97 de *B. japonicum* son capaces de entrar en un estado VBNC al sufrir algún efecto estresante cuando se las crece frente a elevadas concentraciones de glutamato o de extracto de levadura. Así obtenemos una población VBNC mixta, donde una parte de la misma son células estresadas que son incapaces de dar colonias cuando se las plaquea en medios utilizados rutinariamente para recuentos de rizobios.

Probablemente también sea el glutamato presente en el extracto de levadura el factor que induce esta respuesta pero debido a la complejidad de este nutriente debemos asegurarnos que el factor no sea otro. En la actualidad estamos concentrados en corroborar esto y en comprobar si existe un umbral de concentración de glutamato a partir del cual las células se estresan.

Por otra parte, estamos realizando ensayos de nodulación para determinar si bacterias en estado VBNC son capaces de nodular plantas de soja y para evaluar si existen diferencias en la nodulación de plantas inoculadas con cultivos estresados y no estresados.

Anexo

Las técnicas de diseño experimental permiten estudiar el efecto y la interacción de diversos factores sobre una variable en estudio.

En el caso de este trabajo en particular, la respuesta a estudiar es el número de células viables producidas por un medio de cultivo, y los factores considerados son las concentraciones de los siguientes nutrientes: K_2HPO_4 , Extracto de Levadura, Glicerol y $(NH_4)_2SO_4$.

La estrategia experimental mas sencilla para este tipo de trabajo es la que se conoce como “una variable por vez”. Debido a la escasa información disponible acerca de medios de cultivo apropiados para la primera fase del proceso no resultaba conveniente utilizar la estrategia “una variable por vez” usada para optimizar el medio de cultivo del cual partimos para formular los restantes medios. Una forma más conveniente de proceder es probar distintas concentraciones de nutrientes simultáneamente. Por ejemplo, si se desea encontrar la mejor concentración de dos componentes, A y B (nombramos A1, A2, A3 a las concentraciones crecientes de A probadas; lo mismo para B: B1, B2, B3) se ensayan todas las combinaciones posibles de A y B, que resultan ser 9 (3x3). Este tipo de experimentos se llama “diseño factorial”.

En la estrategia “una variable por vez” se hace variar un componente por vez. Continuando con el ejemplo del párrafo anterior, se ensayan los medios A1B1, A2B1, y A3B1, es decir se mantiene fija la concentración de B arbitrariamente en B1. Se elige la mejor combinación, por ejemplo, A2B1, y se hace un nuevo experimento donde se varía la concentración de B manteniendo A fija en A2: A2B1, A2B2 y A2B3, supongamos ahora que la mejor combinación es A2B3. Esta es la combinación que se elige como óptima por el método de una variable a la vez. A esta resultado se llega después de probar seis combinaciones diferentes, tres menos que en el diseño factorial.

Las ventajas de la estrategia “una variable por vez” son que el número de pruebas es menor y que los resultados son fácilmente interpretables. La principal desventaja es que el barrido no es exhaustivo, y quedan combinaciones donde los componentes podrían actuar sinergísticamente. Por ejemplo con las mayores concentraciones de A y B

(A3B3) se podrían obtener mejores resultados que con cualquier otra combinación analizada y esto no sería detectado.

Los experimentos factoriales permiten detectar las interacciones no detectadas por el método de una variable por vez. El principal problema es que el número de medios de cultivo a probar aumenta exponencialmente con el número de variables a ensayar. Así, si se quiere analizar el efecto de tres componentes a dos concentraciones diferentes se necesitan probar $2 \times 2 \times 2 = 8$ combinaciones diferentes. Agregar un componente más llevaría el número de combinaciones a 16. Un experimento donde se quieran probar tres concentraciones diferentes de tres componentes requiere 27 medios (3^3). En ninguno de estos casos se consideran los duplicados que habría que agregar en todos los casos. Para solucionar este problema se idearon diseños factoriales incompletos en los que se reduce el número de combinaciones manteniendo al mínimo la pérdida de información provocada por la reducción del número de ensayos.

De todos estos diseños disponibles, nosotros no inclinamos por utilizar un diseño factorial de 4 factores y 2 niveles con tres repeticiones del punto central. Se ensayaron $2^4 + 1$ tratamientos (el tratamiento correspondiente al punto central se realizó por triplicado). Este diseño permite establecer solo relaciones lineales entre los factores y las respuestas. Para modelar respuestas más complejas se necesitan muchos niveles, por ejemplo 3 niveles y 4 factores ($3^4 + 1$ tratamientos).

El fundamento de la selección del diseño utilizado en este trabajo es que al comienzo del mismo no conocíamos si las variables a estudiar tenían un efecto significativo sobre los títulos finales de las bacterias, entonces era preferible obtener menos resolución antes que hacer experimentos que eventualmente no aportaran información relevante.

En una segunda etapa, se podría haber reducido el número de variables, dejando solo aquellas significativas y estudiándolas con mayor resolución, aumentando el número de niveles con que se estudia cada variable, pero esta etapa no fue realizada en nuestro trabajo.

Bibliografía

1. Balatti, A.P., Mazza, L.A. and Pastor, M.D. (1991). **Effect of media nutrient concentrations on growth of *Bradyrhizobium japonicum*.** *Tropical Agriculture.* vol.68 3:215-218.
2. Boehringer mannheim gmbh (1989). **Methods of Biochemical Analysis and Food Analysis.** 64-67.
3. Boiardi J.L., Balatti A.P. y Mazza L.A. (1983) **Obtención de *Rhizobium phaseoli* en cultivo discontinuo alimentado “Fed Batch”.** *Rev. Lat amer. Microbiol.* 25:235-241
4. Bushby H.V.A., and Marshall K.C., (1977a) **Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on dessication.** *Soil Biol. Biochem.* 9:143-147.
5. Bushby H.V.A., and Marshall K.C., (1977b) **Water status of rhizobia in relation to their susceptibility to dessication and to their protection by montmorillonite.** *J.Gen.Microbiol.* 99:19-27.
6. Daniels, L., Hanson, R.S. and Phillips, J.A. (1994) **Methods for General and Molecular Bacteriology.** Gerhardt, Philipp Ed. Chemical Analysis 22:514-554. *ASM., Washington DC.*
7. Dowling DN y Broughton WJ (1986) **Competition for Nodulation of Legumes.** *Annual Reviews of Microbiology* 40:131-157
8. Dudman, W.F. and Jones, A.J. (1980) **The extracellular glucans of *Rhizobium japonicum*.** *Carbohydr. Res.* 84:358
9. Fang F.C., Chen C.Y., Guiney D.G. and Xu J. **Identification of σ^s -Regulated Genes in *Salmonella typhimurium*: Complementary Regulatory Interactions between σ^s and Cyclic AMP Receptor Protein** *J. of Bacteriology* 17:5112-5120
10. Fisher RF y Long SR (1992) ***Rhizobium*-plant Signal Exchange.** *Nature* 357:655-660
11. Hanson, R.S. and Phillips, J.A. (1981) **Manual of Methods for General Bacteriology.** Gerhardt, Philipp Ed. Chemical Composition, Chapter 17. *ASM., Washington DC.*
12. Hoagland D.R. and Arnon D.I. (1950) **The water culture method for growing plants without soil.** *Calif. Agrie. Exp. Stn. Cire.* 347.

13. Kennedy A.C., and Wollum A.G., II. (1988) **Enumeration of *Bradyrhizobium japonicum* in soil subjected to high temperature:** comparation of plate count, most probable number and fluorescent antibody techniques. *Soil Biol. Biochem.* 20:933-937.
14. Kogure K., Simidu U. and Taga N. (1979) **A tentative direct microscopic method for counting living bacteria.** *Can. J. Microbiol.* 25: 415-420
15. Laemmli U.K. (1970) **Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the Head of Bacteriophage T₄.** *Nature* 227, 680-685.
16. Logan, D.A., Naider, F. and Becker J.M. (1983) **Peptidases of Yeast and Filamentous Forms of *Candida albicans*.** *Experimental Microbiology* 7:116-126.
17. Long SR (1989) **Rhizobium-Legume Nodulation: Life Together in the Underground.** *Cell* 56:203-214
18. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.L. (1951) **Protein measurement with the Folin-phenol reagent.** *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
19. Manahan S.H., and Steck T.R., (1997) **The viable but nonculturable state in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti*.** *FEMS Microbiology Ecology* 22:29-37.
20. Mylona P, Pawlowski K y Bisseling T (1995) **Symbiotic Nitrogen Fixation.** *The Plant Cell* 7:869--885
21. Oliver J.D. (1995) **The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*.** *FEMS Microbiology Ecology* 133:203-308.
22. Salisbury F.B. and Ross C.W. (1992) **Plant Physiology, Fourth Edition.** Wadsworth Publishing, California. 14: 319-336.
23. Streeter JG (1994) **Failure of Inoculant Rhizobia to Overcome the Dominance of Indigenous Strains for Nodule Formation.** *Canadian Journal of Microbiology* 40:513-522
24. Verma DPS (1992) **Signals in Root Nodule Organogenesis and Endocytosis of *Rhizobium*.** *The Plant Cell* 4:373-382
25. Wall L.G. and Favelukez G. (1991) **Early Recognition in the *Rhizobium meliloti*-Alfalfa Symbiosis: Root Exudate Factor Stimulates Root Adsorption of Homologous Rhizobia.** *Journal of Bacteriology* 173: 3492-3499
26. Whitesides M.D. and Oliver J.D. (1997) **Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State.** *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1002-1005.

Agradecimientos

A los señores miembros del jurado.

Al Lic. Marcelo Soria por ser la persona que me permitió realizar esta Tesis y por seguir mi trabajo de cerca, siempre dispuesto a darme una mano ante cualquier problema. También por permitirme trabajar cómodamente, escuchando mis propuestas y mis inquietudes. Y fundamentalmente por ser un jefe que siempre se preocupó por que todo estuviera bien para que yo pueda trabajar a gusto.

A la Dra. Norma Kerber por sus consejos y sus críticas, aportando siempre para que el seminario se presente de la mejor manera.

Al Dr. Moisés Burachik por aceptar ser el coordinador de esta Tesis.

A mamá y a Ju que son las personas que mas quiero en el mundo, por tirar siempre para adelante a pesar de todas las historias que nos ha tocado vivir, por bancarme, por quererme, por todo. A mi viejo que siempre lo recuerdo con amor.

A mi abuela Poro que la quiero mucho y a mi abuela Haydeé que fue mi segunda mamá, a toda mi familia.

A mis hermanos primos Franco, Sebas y Caro.

A Tete, porque es un tipo que aprecio mucho, que se preocupa siempre por cómo me va en la vida.

A Estani porque es mi gran amigo, a Luaaaaas, Dani, Fer y Diego, porque son personas que en estos tiempos me han ayudado mucho.

A Farly, Lean, Risas, Guille, Rodri, Eze, amigos de toda la vida.

A los chicos de Paso: Joaquín, Russo, Pito, Cabe, Fechi, Diego, Pato, todos ellos fueron muy importantes en mis primeros años en Buenos Aires.

A Mati y a Agueda porque son dos amigas que quiero mucho.

A Sandra, Mariana y Claudia, con todas ellas compartí muchas horas de estudio y muchos mates, a Teko, compañero y amigo.

A Bárbara y Andy, amigas de siempre y compañeras de cualquier tipo de laburo que pegáramos durante los primeros años de estudio.

A mis más jóvenes amigas Pauli, Alex y Andre que son las mas copadas, y a Ramiro, Sebas y Matías.

A Picas, Harry y Ale porque son gente de primera que valió la pena conocer.

A toda la gente del CIByF, especialmente a Olga por interesarse en mi trabajo participando con sus ideas y aportando su experiencia. También a Graciela y Teresa por ser siempre tan amables y cordiales.

A Mones Cazón, a mi colegio y a todos aquellos que desde el pueblo se preocupan por cómo nos trata Buenos Aires.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la cual estoy orgulloso de pertenecer.



Marcos W. Steinberg
Tesista



Norma L. Kerber
Directora



Marcelo A. Soria
Codirector