

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Standardization of a complex culture media for multiplication of C50 *Rhizobium* sp. strain

Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp.

Daniel Fernando Rojas T.¹, María Fernanda Garrido R.²,
Ruth Rebeca Bonilla B.³

ABSTRACT

The indiscriminate use of chemical fertilizers, its process of production and its application had increased the costs of agricultural production and the environmental problems because of the pollution of air, soil and water sources. The alternative is the use of biological fertilizers as an economical and clean tool in order to sustainable management of ecosystems. However, in the escalation processes of a biofertilizer the costs of production could increase due to the type of formulation and the culture media used for the multiplication of the bacteria. This research, by using statistical designs sequentially, presents the standardization of an economical culture media used to multiply the strain C50 of *Rhizobium* sp. From eight nutritional sources, five were selected taking as criteria the low economical costs and the availability of above mentioned nutritional sources; from these five sources, three of them influenced the development of the strain significantly. The optimized composition of the alternative culture media included glycerol, molasses, glutamate, yeast extract and salts. There were no significantly differences in the growth of the strain C50 in the alternative culture media compared with the traditional one (yeast extract – mannitol); nor in viability of the strain growth on traditional media culture compared with the alternative one, when it was inoculated on peat. The inoculants conserved its quality in refrigeration during 30 days. The strains J01, T14 and C2 showed a better rate of growth on the alternative culture media; it was not show significant differences in the counts between the strains J01 and T14; whereas, the strain C2 growth better in the alternative culture media.

Keywords: Rhizobia, Plackett-Burman design, fractional factorial design, Box-Behnken design.

RESUMEN

El uso indiscriminado de fertilizantes químicos y su proceso de obtención y aplicación ha incrementado los costos de producción agrícola y los problemas ambientales debido a la contaminación del aire, el suelo y las aguas. Se ha planteado como alternativa la aplicación de fertilizantes biológicos como una herramienta económica y limpia para el manejo sostenible de los ecosistemas. Sin embargo, en los procesos de escalamiento de un biofertilizante pueden incrementarse los costos de producción debido al tipo de formulación y a los medios de cultivo empleados para la multiplicación de las bacterias. Esta investigación, con base en el uso secuencial de diseños estadísticos, presenta la estandarización de un medio de cultivo económico para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. De ocho fuentes nutricionales se seleccionaron cinco, teniendo como criterios los menores costos económicos y la disponibilidad de dichas fuentes; de estas cinco, tres influyeron significativamente sobre el desarrollo de la cepa. La composición optimizada del medio alterno incluyó glicerol, melaza, glutamato, extracto de levadura y sales. No se presentaron diferencias significativas en el crecimiento de la cepa C50 en el medio alterno comparado con el tradicional (levadura-mañitol), ni en la viabilidad de la cepa crecida en el medio tradicional respecto al alterno, cuando se inoculó sobre turba. El inoculante conservó su calidad en refrigeración durante 30 días. Las cepas J01, T14 y C2 mostraron buen índice de crecimiento sobre el medio alterno; no se presentaron diferencias significativas en los recuentos entre las cepas J01 y T14, mientras que la cepa C2 creció mejor en el medio alterno.

Palabras clave: rizobios, diseño Plackett-Burman, diseño factorial fraccionado, diseño Box-Behnken.

INTRODUCCIÓN

EN SUELOS TROPICALES, el elemento más limitante en el desarrollo de las plantas es el nitrógeno (Franco y Döbereiner, 1994), y para la solución de este problema se emplean indiscriminadamente fertilizantes de síntesis química con el objetivo de mejorar la producción de los cultivos (Marín *et al.*, 2003). Sin embargo, su uso está limitado por el alto costo y los efectos adversos sobre el

Radicado: 4 de mayo de 2009
Aprobado: 28 de mayo de 2009

¹ Microbiólogo Industrial. Laboratorio de Microbiología de Suelos, CBB, C.I. Tibaitatá, Corpoica, Mosquera. dfrojas@corpoica.org.co

² MA. V. M.Sc. Investigadora máster asistente. CBB, C.I. Tibaitatá, Corpoica, Mosquera. mgarrido@corpoica.org.co

³ B. Ph.D. Investigadora principal. Laboratorio de Microbiología de Suelos, CBB, C.I. Tibaitatá, Corpoica, Mosquera. rbonilla@corpoica.org.co

medio ambiente, causando contaminación de aguas subterráneas, eutrofización, erosión y, en general, cambios en la estructura físico-química del suelo y una drástica disminución de la biota edáfica (Justic *et al.*, 1995; Rabalais *et al.*, 1996; Tejada *et al.*, 2005). Dentro del concepto de agricultura sostenible surgen tecnologías limpias como es la biofertilización con bacterias fijadoras de nitrógeno, la cual se plantea como una alternativa segura, efectiva y, sobre todo, económica para recuperar la productividad de los suelos (Mahecha, 2002; Sylvia *et al.*, 2005). En los sistemas ganaderos tropicales se propende por el uso de plantas leguminosas debido a que muchas de ellas tienen el atributo de asociarse con un grupo de microorganismos denominados conjuntamente rizobios con los cuales establece una relación simbiótica, mediante la cual la bacteria provee a la planta de compuestos nitrogenados y la planta a ésta de compuestos carbonados. Esta simbiosis se lleva a cabo dentro de una estructura especializada denominada nódulo, órgano capaz de llevar a cabo el proceso de fijación. Existen evidencias que en cultivos de soya y otras leguminosas esta asociación puede proveer hasta 100% la fertilización química nitrogenada (Gage, 2004). Sin embargo, muchas veces el proceso de producción de bioinoculantes basado en este tipo de bacterias es costoso debido al medio de cultivo empleado para su multiplicación; razón por la cual, buscar alternativas representa un foco central en el proceso de investigación para la producción de biofertilizantes bacterianos (Rebah *et al.*, 2007).

El diseño de medios de cultivo económicos para el crecimiento de microorganismos para la disminución de costos en la producción de bioinoculantes es de gran importancia debido a que se crean condiciones favorables para su adopción. Así mismo, existen algunos métodos estadísticos que son utilizados como herramientas efectivas que permiten obtener una rápida aproximación hacia los factores clave que afectan el crecimiento celular (Ren *et al.*, 2008). El uso de diseños experimentales tanto para la estandarización como para la optimización de medios de cultivo está bien documentado (Altaf *et al.* 2007; Gao y Gu, 2007; John *et al.*, 2007; Lofty, 2007). No obstante, la aplicación de estos diseños debe hacerse de forma lógica y subsecuente para lograr una buena aproximación a las concentraciones que maximizan el efecto sobre la variable de respuesta (Ren *et al.*, 2008) teniendo en cuenta las diferencias fisiológicas que puedan presentar los microorganismos de interés.

El presente estudio tuvo como objetivo estandarizar un medio de cultivo complejo haciendo uso de productos y subproductos agroindustriales para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp., la cual es capaz de nodular la leguminosa forrajera *Leucaena leucocephala* y, además, probar la efectividad del medio sobre otras cepas de rizobios que nodulan leguminosas de importancia económica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción y mantenimiento de los microorganismos utilizados

Las cepas C50 y T14 de *Rhizobium* sp., y la cepa J01 de *Bradyrhizobium* sp., utilizadas en el presente estudio provinieron del Banco de germoplasma de microorganismos con potencial biofertilizante del Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Biotecnología y Bioindustria –CBB– Corpoica C.I Tibaitatá. La cepa C2 capaz de nodular la leguminosa forrajera *Clitoria ternatea* fue obtenida en estudios previos adelantados por los autores en el mismo laboratorio. Se usó la cepa C50 para todos los ensayos relacionados con el diseño del medio de cultivo. Todas las cepas fueron propagadas en medio levadura-manitol-agar (LMA) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (Vincent, 1970). La cepa C50 fue conservada en glicerol 30% a -20°C , y las otras cepas se mantuvieron en tubos con medio LMA inclinado a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ y descritas fenotípicamente (descripción macro y microscópica). El medio levadura-manitol (LM) tiene la misma composición del LMA sin adición de agar.

Estandarización del inóculo

Se tomaron 100 mL de inóculo de la cepa C50 crecida a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y 150 rpm (condiciones estándar) durante 20 h, las cuales se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min y se resuspendieron en solución salina estéril (SS) (NaCl 0,85%) a un cuarto de su volumen. La concentración de la suspensión de células fue ajustada a 2 g de células/L (peso seco) empleando SS estéril y utilizada en todos los diseños estadísticos a razón del 1% del volumen del medio.

Obtención y caracterización de las fuentes de crecimiento

Las seis fuentes de crecimiento: glicerol, sacarosa, melaza, glutamato, extracto de levadura y extracto de soya, y las sales –grado analítico– fueron provistas por el Laboratorio de Microbiología de Suelos del CBB Corpoica. El contenido de nitrógeno y carbono total de las fuentes fue determinado en el Laboratorio de Química de Suelos del C.I. Tibaitatá, Corpoica.

Determinación de la concentración celular

La concentración celular (UFC/mL) fue determinada por medio de la técnica de recuento en placa sobre medio LMA, realizando diluciones seriadas en base diez desde 10^{-3} hasta 10^{-10} . El tiempo de incubación fue de 24 h para las cepas C50 y T14, 120 h para J01 y 144 h para C2, y se aplicó una temperatura promedio de $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Estrategia experimental, métodos estadísticos y software

Se emplearon diferentes diseños estadísticos subsiguientes para seleccionar y optimizar, de forma preliminar, la concentración de varias fuentes de crecimiento sobre la multiplicación de la cepa C50. El proceso incluyó primero la identificación de los sustratos influyentes (diseño Plackett-Burman), para así enfocar la investigación sobre un subconjunto de sustratos críticos del medio (Plackett y Burman, 1946) (tabla 1). Posteriormente, se aplicaron dos diseños factoriales fraccionados para acercarse al óptimo de la respuesta de la bacteria en cuanto a producción de células sobre el medio de cultivo y, finalmente, se generó un diseño de superficie de respuesta para optimizar las concentraciones que maximizaban la respuesta: Box – Behnken (Box y Behnken, 1960). Para los ensayos de viabilidad se usó la prueba de ANOVA y el test de Tukey con una confianza del 95%.

Tabla 1. Fuentes de crecimiento, codificación y niveles para el diseño Plackett-Burman

Factores	Variables	Nivel bajo (-1) (g/L)	Nivel alto (+1) (g/L)
Glicerol	C1	1,26	3,78
Sacarosa	C2	1,58	4,75
Melaza	C3	0,99	2,96
Glutamato	N1	0,09	0,21
Extracto de levadura	N2	0,10	0,23
Extracto de soya	N3	0,13	0,30
Cloruro de amonio	N4	0,03	0,07
Sales	S	0,50	0,10

Los diseños experimentales usados y los análisis estadísticos realizados fueron generados, ejecutados y analizados mediante el software estadístico Statgraphics Plus (versión 5.1, Statistics Graphical Corporation, USA). Como control en cada uno de los diseños se empleó el medio LM.

Estandarización del inóculo para los ensayos del medio de cultivo

Se adicionó el preinóculo a razón de 1% del volumen efectivo de trabajo, correspondiente al contenido de un vial (1 mL), sobre un erlemeyer de 500 mL con relación 1/5 y se llevó a incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y 150 rpm (condiciones estándar) durante 20 horas. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min y se resuspendió a un cuarto de su volumen inicial con solución salina estéril (NaCl 0,85%). Se tomaron 3 mL de la suspensión y se determinó la absorbancia con el fin de calcular la

concentración de peso seco de biomasa usando la curva de peso seco y se ajustó así el cultivo a 2 g de células/L de suspensión. La suspensión resultante se empleó en todos los tratamientos generados en cada uno de los diseños estadísticos subsecuentes a razón del 1% del volumen.

Cinética de crecimiento en el medio de cultivo alterno y el tradicional

Un inóculo con volumen final de 250 mL fue preparado a partir de una suspensión de 2 g de células/L y a razón de 1% en medio tradicional (LM) y alterno (Rojas, Garrido, Bonilla –RGB) con relación $\frac{1}{4}$ y condiciones de incubación estándar; el ensayo se realizó por triplicado. La cinética fue determinada mediante peso seco ($\lambda = 540 \text{ nm}$).

Evaluación del medio alterno sobre el crecimiento de otras cepas de rizobios

Un cultivo crecido de las cepas T14 de *Rhizobium*, J01 de *Bradyrhizobium* y la cepa C2 de 48, 120 y 144 horas, respectivamente, fue inoculado a razón del 1% en 25 mL de medio LM y RGB, y se incubaron durante los mismos períodos de tiempo. Posteriormente, se estimó la población celular mediante la técnica de recuento en placa sobre medio LMA, realizando diluciones seriadas en base diez. Se usaron las condiciones de incubación estándar. Cada ensayo se realizó por triplicado y se empleó una prueba t con 95% de confianza para el análisis de los datos obtenidos.

Prueba de estabilidad preliminar sobre soporte (turba)

Se inocularon 400 g de turba en bolsas de polietileno de alta densidad con 100 mL de un cultivo de 20 h de la cepa C50 crecida en LM (tratamiento 1) y RGB (tratamiento 2). Las bolsas inoculadas se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h se refrigeraron a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Se hicieron recuentos a los 0, 15 y 30 días de refrigeración. El ensayo constó de dos tratamientos y cinco repeticiones, como control negativo se inoculó el soporte con medio estéril. Para este ensayo se empleó un diseño completamente aleatorio.

Análisis económico

Se realizó un análisis de los costos de producción del medio de cultivo a volumen de un litro teniendo en cuenta el costo de los reactivos empleados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción fenotípica de las cepas

Las características macroscópicas de las cepas del estudio coincidieron con la descripción registrada por Kuyken-

Tabla 2. Descripción macroscópica de las cepas

Cepa	Descripción macroscópica								
	Tamaño de las colonias (mm)	Formación de ácido o álcali ^{1/}	Tiempo de crecimiento	Color de las colonias	Transparencia	Elevación	Forma de las colonias	Formación de moco	Borde
<i>Rhizobium</i> sp. C50	3	Ac	R	T	T	C	R	P	Li
<i>Rhizobium</i> sp. T14	2-3	Ac	R	T	T	C	R	P	Li
<i>Bradyrhizobium</i> sp. J01	2	Ac	L	BL	O	C	R	P	Li
C2	1	Al	L	BL	O	C	R	A	Li

1/: Descripción de las cepas en LMA + azul de bromotimol.

Ac: ácida, Al: alcalina, N: neutra, R: rápido, L: lento, T: transparente, BL: blanca/lechosa, T: translúcida, O: opaca, C: convexa, R: redondas, P: presente, A: ausente, Li: liso.

dall (2005) y Kuykendall y colaboradores (2005) (tabla 2). Microscópicamente todas las cepas se describieron como bacilos gram-negativos.

Determinación del contenido de carbono y nitrógeno total en las fuentes de crecimiento

Los resultados de los análisis químicos en relación con las concentraciones de carbono y nitrógeno total de las fuentes usadas se encuentran relacionados en la tabla 3. Estos

Tabla 3. Contenido de carbono y nitrógeno total en las fuentes de crecimiento

Fuente	% carbono	% nitrógeno	C/N
Glicerol	52,9	< 0,01	52,9
Sacarosa	42,1	< 0,01	42,1
Melaza	67,5	0,16	421,9
Glutamato	35,4	8,27	4,3
Extracto de levadura	84,8	7,52	11,3
Extracto de soya	72,1	5,88	12,3
NH ₄ Cl	0	0,26	0

cálculos fueron empleados para obtener las cantidades a utilizar de cada una de las fuentes utilizadas sin alterar la relación carbono-nitrógeno del medio LM estándar para el crecimiento de rizobios (Vincent, 1970).

Fase de tamizaje: diseño Plackett-Burman (Diseño P-B)

El diseño P-B fue usado para identificar las variables que tenían efecto significativo sobre el crecimiento celular. Se analizaron ocho variables, los niveles: alto (+) y bajo (-) se seleccionaron de acuerdo con los criterios de aumento en la concentración celular y costo económico. Los resultados del diseño P-B que se implementó con 12 tratamientos y dos niveles de cada variable se presentan en la tabla 4.

Ninguno de los factores tuvo un efecto estadísticamente significativo ($p > 0,05$) sobre el crecimiento de la cepa C50 (tabla 5), por lo tanto, la selección de fuentes de crecimiento se realizó de acuerdo con parámetros de costo económico y disponibilidad en el mercado. Se seleccionaron dos fuentes de carbono (glicerol y melaza), dos de nitrógeno (glutamato y extracto de levadura) y sales.

Tabla 4. Diseño Plackett-Burman con ocho factores y resultados

Corrida	Factores codificados								Recuento observado	Recuento predicho
	C1	C2	C3	N1	N2	N3	N4	S		
1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	3,39X10 ¹⁰	4,322X10 ¹⁰
2	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	2,18X10 ¹⁰	2,369X10 ¹⁰
3	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	3,63X10 ¹⁰	2,690X10 ¹⁰
4	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	5,47X10 ¹⁰	4,566X10 ¹⁰
5	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	7,25X10 ¹⁰	8,159X10 ¹⁰
6	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	4,49X10 ¹⁰	4,296X10 ¹⁰
7	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	5,61X10 ¹⁰	4,680X10 ¹⁰
8	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	7,55X10 ¹⁰	6,641X10 ¹⁰
9	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	8,64X10 ¹⁰	6,990X10 ¹⁰
10	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	4,78X10 ¹⁰	4,974X10 ¹⁰
11	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	1,78X10 ¹⁰	3,431X10 ¹⁰
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4,96X10 ¹⁰	6,607X10 ¹⁰

Tabla 5. Efectos y análisis de variables por método estadístico

Fuente	GL ^{1/}	Efecto estimado	Suma de cuadrados	Radio - F	Valor p
C1	1	-10,44X10 ⁹	9,82X10 ²⁰	0,56	0,4625
C2	1	1,01X10 ⁹	9,17X10 ¹⁸	0,01	0,9431
C3	1	15,40X10 ⁹	2,13X10 ²¹	1,21	0,2816
N1	1	-4,64X10 ⁹	1,93X10 ²⁰	0,11	0,7429
N2	1	-12,60X10 ⁹	1,43X10 ²¹	0,81	0,3765
N3	1	-2,83X10 ⁷	7,22X10 ¹⁵	0,00	0,9984
N4	1	3,81X10 ⁹	1,30X10 ²⁰	0,07	0,8510
S	1	-25,10X10 ⁹	5,67X10 ²¹	3,21	0,0846

1/: GL: Grados de libertad. El error estándar fue de $\pm 4,20X10^{10}$. Las concentraciones de cada fuente se encuentran consignadas en la tabla 1.

El análisis de regresión generó la siguiente ecuación lineal:

$$Y = 4,978X10^{10} - 5,223X10^9 * C_1 + 5,047X10^8 * C_2 + 7,703X10^9 * C_3 - 2,321X10^9 * N_1 - 6,303X10^9 * N_2 - 1,416X10^7 * N_3 + 1,905X10^9 * N_4 - 1,255X10^9 * S \quad (1)$$

Fase de mejoramiento: diseño factorial fraccionado 1 (DFF1)

Se aplicó un diseño factorial fraccionado sobre las fuentes seleccionadas en el diseño P-B usando las mismas concentraciones (tabla 6).

No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los recuentos del DFF1 y los del P-B, por lo tanto la eliminación de los sustratos no afectó la viabilidad celular y se descarta cualquier tipo de interacción entre los compuestos seleccionados y los omitidos del medio de cultivo. En el DFF1 dos fuentes, el glutamato y el extracto de levadura, presentaron un efecto significativo sobre el crecimiento celular ($p < 0,05$) (tabla 7). Esto se puede atribuir a que el glutamato no sólo representa una fuente de grupos amino, sino también a que puede actuar como intermediario metabólico para la síntesis de otros aminoácidos o de bases nitrogenadas, compuestos esenciales para el desarrollo celular (Matheus *et al.*, 2002). Por otra parte,

Tabla 6. Efectos y análisis de variables por método estadístico

Corrida	Factores codificados ^{1/}					Valor observado ^{2/}	Valor predicho
	C1	C3	N1	N2	S		
1	-1	+1	-1	-1	-1	2,50X10 ⁹	-1,22X10 ¹⁰
2	+1	-1	+1	-1	-1	2,79X10 ¹⁰	4,29X10 ¹⁰
3	+1	+1	-1	+1	-1	2,56X10 ⁹	1,73X10 ¹⁰
4	-1	+1	+1	-1	+1	1,20X10 ¹⁰	2,68X10 ¹⁰
5	+1	+1	+1	+1	+1	7,11X10 ¹⁰	5,63X10 ¹⁰
6	-1	-1	-1	+1	+1	3,27X10 ¹⁰	4,77X10 ¹⁰
7	+1	-1	-1	-1	+1	3,62X10 ¹⁰	2,12X10 ¹⁰
8	-1	-1	+1	+1	-1	8,44X10 ¹⁰	6,94X10 ¹⁰

1/: En g/L las concentraciones ajustadas fueron: C1 nivel alto (+) = 5,67; nivel bajo (-) = 1,89; C3 nivel alto (+) = 4,44, nivel bajo (-) = 1,48; N1 nivel alto (+) = 0,43, nivel bajo (-) = 0,18; N2 nivel alto (+) = 0,47, nivel bajo (-) = 0,20; S nivel alto (+) = 0,50, nivel bajo (-) = 0,10.

2/: Resultado de tres mediciones.

Tabla 7. Efectos y análisis de variables por método estadístico

Fuente	GL	Efecto estimado	Suma de cuadrados	Radio - F	Valor p
C1	1	1,54X10 ⁹	1,42X10 ¹⁹	0,02	0,8998
C3	1	-23,3X10 ⁹	3,26X10 ²¹	3,73	0,0713b
N1	1	30,3X10 ⁹	5,52X10 ²¹	6,32	0,0230ab
N2	1	28,0X10 ⁹	4,71X10 ²¹	5,39	0,0338ab
S	1	8,65X10 ⁹	4,49X10 ²⁰	0,51	0,8722

a: variables con efecto significativo sobre la multiplicación de la cepa con confianza 95%.
b: variables con efecto significativo sobre la multiplicación de la cepa con confianza 92,5%.
R² corregido = 0,60.

el extracto de levadura representa no sólo una fuente de compuestos nitrogenados sino también de elementos traza, cofactores enzimáticos, vitaminas y ácidos nucleicos, entre otros, que favorecen el desarrollo de la bacteria (Takahashi *et al.*, 2006; Edens *et al.*, 2002).

Las fuentes de carbono y de sales evaluadas no tuvieron efecto significativo ($p > 0,05$) sobre el crecimiento de la cepa C50, por lo tanto en los diseños posteriores se utilizó el nivel inferior (-1) de cada una de las fuentes (tabla 7); la melaza tuvo un efecto significativo negativo, por tanto fue empleada para los estudios posteriores en el nivel inferior.

El análisis de regresión generó la siguiente ecuación lineal:

$$Y = 3,368 \times 10^{10} - 1,165 \times 10^{10} * C_3 + 7,716 \times 10^8 * C_1 + 1,517 \times 10^{10} * N_1 + 1,401 \times 10^{10} * N_2 + 4,328 \times 10^9 * S \quad (2)$$

Fase de mejoramiento: diseño factorial fraccionado 2 (DFF2)

Se modificó la concentración de glutamato, extracto de levadura y melaza en el mismo sentido del efecto estimado para la variable (tabla 8).

El análisis estadístico del DFF2 reveló que las tres fuentes tuvieron un efecto significativo sobre la variable de respuesta ($p < 0,05$), el glutamato tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento celular mientras que el extracto de levadura y la melaza tuvieron un efecto negativo (tabla 9). La melaza nuevamente tuvo el mismo efecto, lo cual obli-

gó a disminuir aún más la concentración de esta fuente. Por otra parte, el glutamato nuevamente ejerció un efecto positivo sobre el crecimiento mientras que el aumento en la concentración de extracto de levadura no favoreció el desarrollo celular. Este efecto negativo se explica porque la concentración de extracto de levadura pudo haber superado el límite de tolerancia de la cepa, lo cual provocó distorsión en las células, y por consiguiente una disminución en la viabilidad celular dentro del medio de cultivo, lo cual ha sido confirmado por diversos estudios que demuestran que existe una relación íntima entre estas variables (Skinner *et al.*, 1976).

El análisis de regresión generó la siguiente ecuación lineal:

$$Y = 4,582 \times 10^{10} - 2,288 \times 10^{10} * C_3 + 1,615 \times 10^{10} * N_1 - 2,007 \times 10^{10} * N_2 \quad (3)$$

Fase de optimización: diseño Box Behnken

Los diseños de superficie de respuesta dan un acercamiento preliminar a las concentraciones que optimizan la variable dependiente: concentración celular. En la evaluación de las 15 corridas para la optimización de tres parámetros individuales, la máxima concentración celular se obtuvo cuando la melaza se encontró en el nivel inferior y el extracto de levadura y el glutamato se encontraban en el superior. Los datos fueron analizados con el método de análisis de regresión múltiple usando Statgraphics Plus 5.1; la siguiente ecuación polinomial fue derivada para representar la producción de biomasa como una función de las variables independientes analizadas.

Tabla 8. Diseño de superficie de respuesta: Box Behnken y resultados con niveles factor

Corrida	Factores codificados ^{1/}			Factores no codificados (g/L)			Valor observado ^{2/}	Valor predicho
	C3	N1	N2	C3	N1	N2		
1	-1	1	-1	1,48	0,66	0,46	1,06X10 ¹¹	1,05X10 ¹¹
2	1	1	1	2,96	0,66	0,73	1,99X10 ¹⁰	1,90X10 ¹⁰
3	0	0	0	2,22	0,54	0,59	4,22X10 ¹⁰	4,58X10 ¹⁰
4	1	-1	-1	2,96	0,42	0,46	2,78X10 ¹⁰	2,69X10 ¹⁰
5	-1	-1	1	1,48	0,42	0,73	3,34X10 ¹⁰	3,25X10 ¹⁰

1/: En g/L: C1 = 1,89 y S = 0,10 se dejaron constantes.
2/: Resultado de tres mediciones.

Tabla 9. Efectos y análisis de variables por método estadístico

Fuente	GL	Efecto estimado	Suma de cuadrados	Radio - F	Valor p
C3	1	-4,57X10 ¹⁰	6,28X10 ²¹	10,85	0.0093a
N1	1	3,23X10 ¹⁰	3,12X10 ²¹	5,40	0.0452a
N2	1	-4,01X10 ¹⁰	4,83X10 ²¹	8,34	0.0179a

a: variables con efecto significativo sobre la multiplicación de la cepa con confianza 95%.
R² corregido = 0,76.

$$Y = 4,802X10^{10} + 1,567X10^{10} * N_1 + 1,077X10^{10} * N_2 - 1,999X10^{10} * C_3 + 1,319X10^{10} * N_1^2 + 2,542X10^{10} * N_1N_2 - 2,301X10^{10} * N_1C_3 - 8,498X10^9 * N_2^2 - 7,125X10^9 * N_2C_3 + 3,168X10^9 * C_3^2 \quad (4)$$

Las superficies de respuesta fueron graficadas usando el software Statgraphics Plus 5.1 para estudiar los efectos de los parámetros y sus interacciones sobre la producción de biomasa (tabla 10). Los gráficos de superficie de respuesta tridimensionales son presentados en las figuras 1, 2 y 3.

Se obtuvo un incremento en la concentración celular cuando el glutamato y el extracto de levadura se encontraban en el nivel superior (figura 1). Los resultados descritos están acordes con los obtenidos por Meade y colaboradores (1985), quienes en un fermentador de 200 L llevaron a cabo la multiplicación de una cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* usando un medio de cultivo basado en levadura grado industrial y obtuvieron después de 40 h recuentos superiores a 2×10^9 UFC/mL. La interacción entre estas fuentes ejerció un efecto

positivo sobre el aumento en la biomasa ($p < 0,05$) (tabla 10), lo cual pudo deberse a que algunos de los cofactores enzimáticos presentes en el extracto de levadura provocan un mejor metabolismo tanto catalítico como de síntesis del glutamato, lo que repercute en una mayor obtención

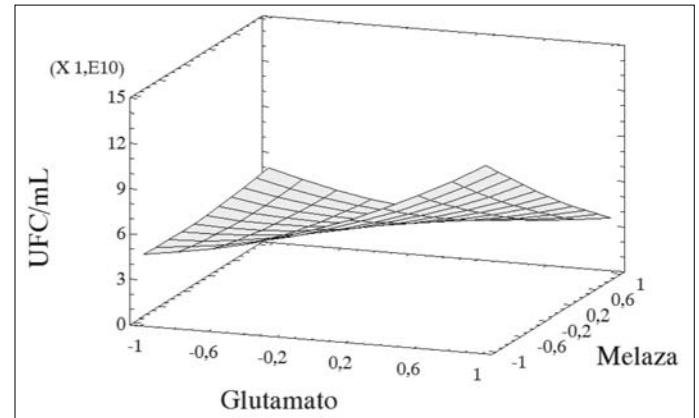


Figura 2. Gráfico de superficie de respuesta entre las variables melaza y glutamato. El máximo efecto se da cuando la concentración de extracto de levadura está en el nivel superior y la de melaza en el inferior. Confianza 95%

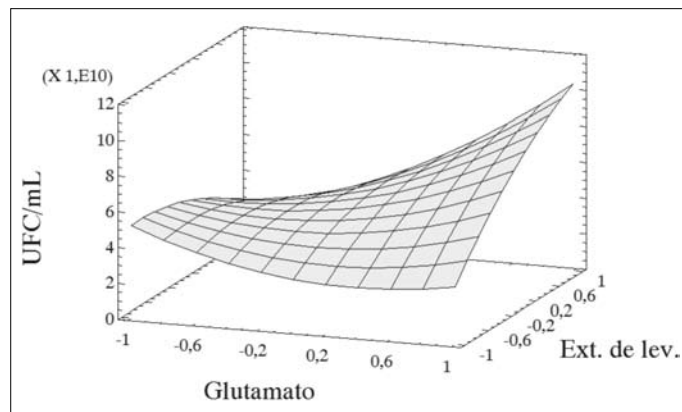


Figura 1. Gráfico de superficie de respuesta entre las variables glutamato y extracto de levadura. El máximo efecto se da cuando la concentración de glutamato y extracto de levadura están en el nivel superior. Confianza 95%

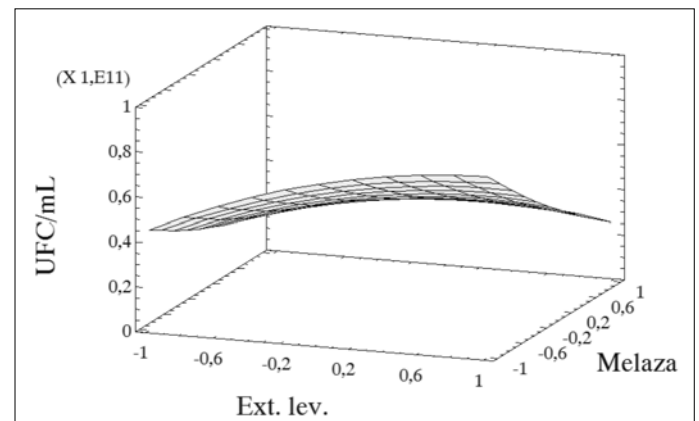


Figura 3. Gráfico de superficie de respuesta entre las variables extracto de levadura y melaza. El máximo efecto se da cuando la concentración de glutamato está en el nivel superior y la de melaza en el inferior. Confianza 95%

Tabla 10. Efectos y análisis de variables por método estadístico

Factor	GL ^{1/}	Efecto estimado	Suma de cuadrados	Radio - F	Valor p
C3	1	-3,99X10 ¹⁰	9,59X10 ²¹	8,40	0,0066 a
N1	1	3,13X10 ¹⁰	5,89X10 ²¹	5,16	0,0297 a
N2	1	2,15X10 ¹⁰	2,78X10 ²¹	2,44	0,1280
C3 X N1	1	-4,60X10 ¹⁰	6,35X10 ²¹	5,57	0,0244 a
N1 X N2	1	5,08X10 ¹⁰	7,75X10 ²¹	6,80	0,0136 a
C3 X N2	1	-1,42X10 ¹⁰	6,09X10 ²⁰	0,53	0,4714
N1 X N1	1	2,63X10 ¹⁰	1,92X10 ²¹	1,69	0,2027
N2 X N2	1	-1,69X10 ¹⁰	8,00X10 ²⁰	0,70	0,4086
C3 X C3	1	6,33X10 ⁹	1,11X10 ²⁰	0,10	0,7570

1/: GL: grados de libertad.

a: variables con efecto significativo sobre la multiplicación de la cepa con confianza 95%.

de energía y de intermediarios metabólicos clave para la síntesis de biomoléculas, y por tanto mayor productividad en biomasa (Matheus *et al.*, 2002).

Sin embargo, la interacción entre ambas fuentes de crecimiento con la melaza provocaron un efecto negativo sobre la variable respuesta (figuras 2 y 3); además, el efecto individual de ésta también fue negativo ($p < 0,05$) (tabla 10), por lo tanto se deduce que la presencia de melaza afecta el crecimiento celular. Efecto que puede atribuirse a la presencia de residuos tóxicos como pesticidas, hidrocarburos o metales pesados, que pueden haber llegado a la fuente en el transcurso de su proceso, y que pueden afectar el crecimiento celular por bloqueo de la maquinaria enzimática de la célula, daño en las membranas, alteración conformacional o estructural del material genético, inhibición de rutas metabólicas, entre otras (Atlas y Bartha, 2002; Delorme *et al.*, 2003). No obstante, aunque el efecto resultó ser significativo ($p < 0,05$), los recuentos son altos, luego es posible que estos compuestos se encuentren en bajas concentraciones (tabla 10).

Cinética de crecimiento de la cepa C50 sobre los medios de cultivo alterno y tradicional

La composición del medio de cultivo alterno RGB descrito en términos de g/L es el siguiente: glicerol 1,89, melaza 0,67, glutamato 0,90, extracto de levadura 0,60 y sales 0,10. Con éste y el medio LM se realizaron las cinéticas de crecimiento de la cepa C50 (figura 4).

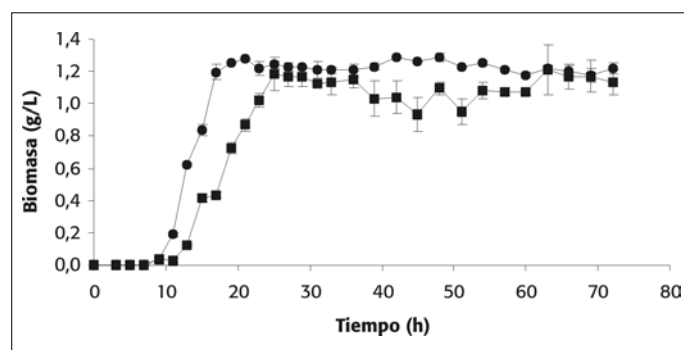


Figura 4. Cinética de crecimiento de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. en medio LM (●) y en medio alterno RGB (■). La cuantificación se realizó por peso seco

Se realizó la linealización de las fases exponenciales de crecimiento para obtener los parámetros cinéticos: tiempo de duplicación (td) y velocidad específica de crecimiento (μ_x) (tabla 11).

Los resultados muestran que la velocidad de crecimiento en el medio LM fue aproximadamente dos veces mayor que en el medio alterno RGB. Esto se pudo deber a que dentro de la composición del RGB hay sustratos

Tabla 11. Parámetros cinéticos

Parámetro	Valor	
	LM	RGB
Tiempo de duplicación	2,676 h	4,472 h
Velocidad específica de crecimiento	0,259 h ⁻¹	0,155 h ⁻¹

complejos como la melaza que crean la necesidad a las células de expresar una mayor variedad de enzimas catalíticas que puedan llevar a cabo la degradación de estos sustratos, lo que repercute en mayor gasto energético por parte de la célula y en consecuencia, menor velocidad de crecimiento.

El crecimiento de la cepa C50 sobre el medio LM fue normal y las fases de crecimiento presentaron el comportamiento característico; en contraste, en el medio RGB se presentaron varias diauxias, tanto en la fase exponencial como en la estacionaria, lo que de manera directa refleja la presencia de sustratos complejos. Una diauxia, conocida como el metabolismo de dos sustratos, es frecuentemente observada cuando dos o más fuentes de carbono son usadas en el mismo medio (Tsuji *et al.*, 1997). Además de la diauxia entre la hora 15 y 17, se observaron una serie de diauxias entre la hora 36 y la 63. Es posible que el metabolismo en la fase estacionaria de crecimiento haya sido sostenido por la melaza, lo cual es evidente por las fluctuaciones presentadas, lo que refleja cambios sucesivos en la fuente de carbono que se está metabolizando. Esto confirma lo asegurado por Oliver y colaboradores (1999), quienes afirman que uno de los inconvenientes que se generan del uso de medios de fermentación complejos es la presencia de una serie de diferentes formas de compuestos dentro del mismo macronutriente dando lugar a patrones de crecimiento crípticos.

El medio RGB tardó 25 horas en llegar a la fase estacionaria mientras que el LM, sólo 17 horas, lo cual puede ser explicado por los argumentos mencionados anteriormente acerca de la complejidad bioquímica del medio alterno. La cantidad de biomasa del medio LM siempre fue más alta que la del RGB, sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los recuentos de ambos medios en la fase estacionaria. Es posible que el medio LM induzca la producción de exopolisacáridos los cuales afectan la turbidez del medio de cultivo.

Estabilidad en turba

La evaluación de viabilidad celular tanto en el medio alterno RGB como en el tradicional LM sobre el soporte sólido (turba) mostró que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los recuentos ($p < 0,05$) inicial, a los 15 y a los 30 días de la refrigeración (figura

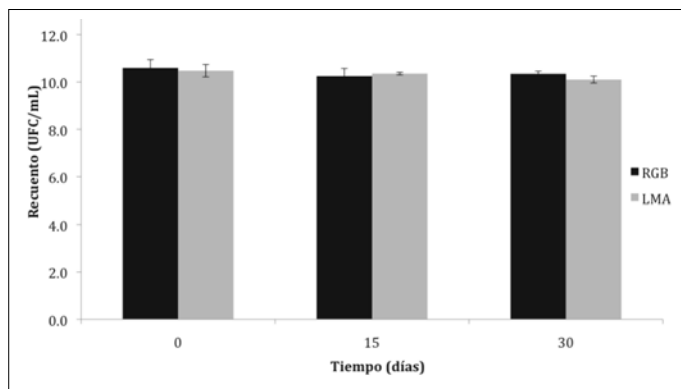


Figura 5. Estabilidad de los microorganismos en el soporte con el medio de cultivo tradicional y el alterno. En blanco el medio LM y en negro el RGB; no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los recuentos de los diferentes tratamientos ni en los diferentes tiempos

5). En el RGB, la pérdida de viabilidad a los 30 días fue cercana al 50% y en el medio LM de casi 60%, lo cual significa que los recuentos no disminuyeron ninguna unidad logarítmica. Según la prueba de comparación de muestras múltiples de Tukey HSD con 95% de confianza, no existe diferencia estadísticamente significativa entre la pérdida de viabilidad en el medio alterno y el tradicional. Esto se pudo deber a que el medio RGB presenta una alta variedad de nutrientes (Khavazi *et al.*, 2007), en especial fuentes de carbono atribuidas a la presencia de melaza y extracto de levadura, principalmente, lo que hace que el metabolismo bacteriano sea más lento debido a que el microorganismo debe sintetizar una mayor diversidad de enzimas para el mantenimiento celular (Matheus, 2002; Edens *et al.*, 2002); sumado a esto, la baja temperatura provoca un frenado parcial de la actividad celular (Matheus *et al.*, 2002), por lo tanto el efecto conjunto puede provocar el mantenimiento de la cepa en el soporte por un período prolongado de tiempo.

Evaluación del medio RGB sobre otras cepas de rizobios

No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en el valor de la concentración celular (UFC/mL) en ambos medios de cultivo, el tradicional y el alterno, cuando se trabajó con la cepa T14 de *Rhizobium* sp., que nodula trébol ni en la cepa J01 de *Bradyrhizobium* sp., que nodula soya (figura 6). Este resultado demuestra de manera preliminar, que el medio RGB es apto para el crecimiento de otras cepas de rizobios. Las cepas de *Rhizobium* sp., en general, tienen una alta variedad enzimática, lo que les permite metabolizar un amplio rango de sustratos (Stowers, 1985; Kuykendall *et al.*, 2005); esto corrobora los datos obtenidos con la cepa T14 la cual presentó recuentos levemente mayores sobre el medio RGB que sobre el LM. Las cepas del

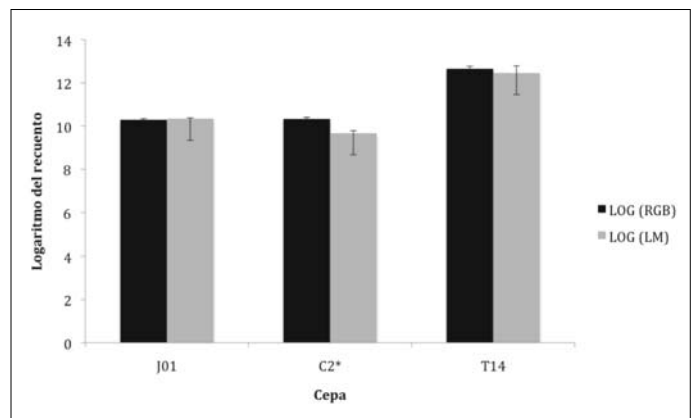


Figura 6. Crecimiento de las cepas J01, C2 y T14 sobre el medio alterno y el tradicional. Cada recuento es el equivalente de tres mediciones. El asterisco representa diferencias significativas ($p < 0,05$)

género *Bradyrhizobium* sp., por su parte, presentan menor variedad metabólica, dado que no son capaces de degradar compuestos como disacáridos, trisacáridos o algunos monómeros de carbohidratos (Stowers, 1985; Kuykendall, 2005); de esta forma, su multiplicación requiere la adición de fuentes de carbono más específicas. Sin embargo, la cepa J01 presentó recuentos celulares similares en los dos medios de cultivo, lo cual demuestra que las fuentes de crecimiento presentes en el medio RGB son aptas para su crecimiento.

Por otra parte, existió una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los recuentos de la cepa C2 en el medio LM y en el RGB (figura 6), favoreciendo así el crecimiento de ésta sobre el medio alterno. La concentración fue aproximadamente cuatro veces mayor en el medio RGB, lo cual es de gran importancia para el desarrollo del proyecto financiador, ya que el arreglo silvopastoril que se definió dentro de éste incluye plantas de *Leucaena leucocephala* y *Clitoria ternatea*, noduladas por las cepas C50 y C2, respectivamente. En consecuencia, para la producción de un bioinoculante basado en estas cepas de rizobios, se puede inferir que el medio RGB es adecuado para llevar a cabo el crecimiento de ambas, con lo cual se puede llegar a disminuir los costos de producción del biofertilizante rizobiano.

Análisis de costos

El costo de producción de un litro del medio LM fue \$2.784,30 mientras que un litro de RGB cuesta \$68,41; por lo tanto, la reducción de costos fue aproximadamente del 98% con la utilización del medio alterno. Esto contribuye a una disminución importante en los gastos de producción de un biofertilizante basado en esta cepa de rizobio, lo cual deriva en una disminución del precio del producto y por consiguiente en reducción de costos en la fertilización nitrogenada, generando beneficios a los productores.

CONCLUSIONES

La estrategia de usar diseños estadísticos de manera subsiguiente permitió estandarizar un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp.

Criterios de costo económico y disponibilidad en el mercado permitieron la selección de cinco fuentes de crecimiento, de las cuales tres mostraron influir de forma estadísticamente significativa sobre el crecimiento de la cepa. El análisis estadístico basado en el diseño Box-Behnken permitió hallar las concentraciones que maximizaban la respuesta.

El medio RGB tardó 8 horas más que el LM para lograr el máximo valor de biomasa, sin embargo la disminución en los costos de producción del medio fue cercana al 98%

y no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los recuentos de ambos medios.

El medio fue apto para el crecimiento de cepas de rizobios de crecimiento lento, intermedio y rápido, las cuales difieren metabólicamente. Finalmente, el medio mantuvo la población celular sobre turba en el primer mes de evaluación; por tanto, el medio representa de manera preliminar una opción para disminuir los costos de producción de un inoculante basado en esta cepa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –Corpoica-, al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural –MADR-, a la Gobernación del Cesar y a la Cooperativa Lechera del Cesar –Coolesar- por su financiación.

REFERENCIAS

- Altaf M, Naveena BJ, Reddy G. 2007. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L (+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. *Bioresource Technology* 98(3): 498-503.
- Atlas R, Barta R. 2002. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. 2ª ed. Madrid, España. Prentice Hall. 676 p.
- Box G, Behnken D. 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables *Technometrics*. 2(4): 455-475.
- Delorme T, Gagliardi J, Angle J, Berkum P, Chaney R. 2003. Phenotypic and Genetic Diversity of Rhizobia Isolated from Nodules of Clover Grown in a Zinc and Cadmium Contaminated Soil. *Journal of Soil Science Society American* 67(6): 1746-1754.
- Edens N, Reaves L, Bergana L, Reyzer I, O'Mara P, Baxter J, Snowden K. 2002. Yeast Extract Stimulates Glucose Metabolism and Inhibits Lipolysis in Rat Adipocytes in Vitro. *Biochemical and Molecular Actions of Nutrients* 132(6): 1141-1148.
- Franco A, Döbereiner J. 1994. A biología do solo e sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa Phytopathologica* 20: 68 -74.
- Gage, D. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(2): 280-300.
- Gao H, Gu WY. 2007. Optimization of polysaccharide and ergosterol production from *Agaricus brasiliensis* by fermentation process. *Biochemical Engineer Journal* 33(3): 202-210.
- John RP, Sukumaran RK, Pandey A. 2007. Statistical optimization of simultaneous saccharification and L (+) – lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology. *Biochemical Engineer Journal* 36(3): 262-267.
- Justic D, Rabalais NN, Turner RE, Dortch Q. 1995. Changes in nutrient structure of river-dominated coastal waters: Stoichiometric nutrient balance and its consequences. *Estuarine Coastal Shelf Sci* 40(3): 339-356.
- Khavazi K, Rejali F, Seguin P, Miransari M. 2007. Effects of carrier, sterilisation method, and incubation on survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L.) inoculants. *Enzyme and Microbial Technology* 41(6-7): 780-784
- Kuykendall D. 2005. *Bradyrhizobium* (Jordan 1982) 137VP. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, US. pp. 325-340.
- Kuykendall D, Young J, Martínez E, Kerr A, Sawada H. 2005. *Rhizobium* (Frank 1889), 338. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer US. pp. 325-340.
- Lotfy WA. 2007. The utilization of beet molasses as a novel carbon source for cephalosporin C production by *Acremonium chrysogenum*: optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Bioresource Technology* 98(18): 3491-3498.
- Mahecha L. 2002. El silvopastoreo: una alternativa de producción que disminuye el impacto ambiental de la ganadería bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 15(2): 226-231.
- Marín VA, Baldani VL, dos Santos R, Baldani, IJ. 2003. Fixacao biologica de nitrogeno de nitrogenio; bacterias fixadoras de nitrogenio de importancia para a agricultura tropical. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria*. 44 p. (Comunicado Técnico).
- Matheus CK, Van Holde KE, Ahern KG. 2002. *Bioquímica*. 2th ed. Madrid, Pearson Education, S.A. 1226 p.
- Oliver A, Anderson B, Roddick F. 1999. Factors affecting the production of L-Phenylacetylcarbinol by yeas. A case study en *Microbial Physiology*. En: Poole R (ed.). Academic Press, United Kingdom, 274 p.
- Plackett R, Burman J. 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33(4): 305-325.
- Rebah F, Prévost D, Yezza A, Tyagi RD. 2007. Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology*. 98(18): 3535-3546.
- Rabalais NN, Wisman WJ, Turner RE, Justic D, Gupta B, Dortch Q. 1996. Nutrient changes in the Mississippi River and system responses on the adjacent continental shelf. *Estuaries* 19(2): 386-407.
- Ren J, Lin W, Shen YJ, Wang JF, Luo XC, Xie MQ. 2008. Optimization of fermentation media for nitrite oxidizing bacteria using sequential statistical design. *Bioresource Technology* 99(17): 7923-7927.
- Skinner FA, Roughley RJ, Chandler, M. 1977. Effect of Yeast Extract Concentration on Viability and Cell Distortion in *Rhizobium* spp. *Journal of Applied Bacteriology* 43(2): 287-297.
- Stowers M. 1985. Carbon Metabolism in *Rhizobium* Species. *Annual Review of Microbiology* 39: 89-108
- Sylvia D, Hartel P, Fuhrmann J, Zuberer D. 2005. *Principles and Applications of Soil Microbiology*. 2ª ed. New Jersey, Editorial Prentice Hall, 644 p.
- Takahashi T, Fei Y, Zhu S, Moriya J, Sumino H, Morimoto S, Yamaguchi N, Kanda T. 2006. Beneficial Effect of Brewers' Yeast Extract on Daily Activity in a Murine Model of Chronic Fatigue Syndrome. *Advance Access Publication* 3(1): 109-115.
- Tejada M, Benítez C, González J. 2005. Effects of Application of Two Organomineral Fertilizers on Nutrient Leaching Losses and Wheat Crop. *Agronomical Journal* 97(3): 960-967.
- Tsuji K, Lijima M, Matsuzawa H, Sakamoto S. 1997. Over-production of Thermus protease in dense culture of *Escherichia coli* using two carbon sources. *Biothecnology Techniques* 11(6): 395-398.
- Vincent JM. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IPB handbook no. 15. 1ª ed., Oxford, Blackwell Scientific Publications Ltd., 164 p.