

## DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

# CULTIVO DE *AZOTOBACTER VINELANDII* EN MEDIOS LIMITADOS EN HIERRO Y MOLIBDENO

J. Moreno; A. Del Moral y A. Ramos-Cormenzana

### RESUMEN

Se cultivó *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 en medios limitados en hierro y molibdeno. Bajo estas condiciones de cultivo, se observó una inhibición del crecimiento como consecuencia de la limitación mineral. Los análisis químicos realizados mostraron que en medios limitados en hierro las células contenían mayores cantidades de ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico que en medios control. Asimismo, en condiciones de limitación mineral, *Azotobacter* mostró un incremento en la formación de quistes, con respecto a medios control. Estas observaciones fueron confirmadas por estudios de fotorreactivación.

### SUMMARY

*Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 was cultured in iron-limited and molybdenum-limited media. Under these culture conditions a growth inhibition was observed as a consequence of mineral-limitation. Chemical analyses showed that cells grown in iron-limited medium contained more large amounts of PHB than control cells. Also, when *Azotobacter* grown under mineral-limited conditions showed an increase on cyst formation compared with mineral-sufficient cultures. These observations were confirmed through photorreactivation studies.

### INTRODUCCION

La Nitrogenasa es la enzima que cataliza la reducción biológica del nitrógeno atmosférico hasta amoniaco. Esta enzima está constituida por dos componentes (I y II) de naturaleza protéica, cuya separación e identificación en *Azotobacter vinelandii*, se deben a Bulen y Le Comte (3). Estudios más recientes han proporcionado un conocimiento más exacto de los dos componentes de la Nitrogenasa y su importancia para el sistema de fijación de nitrógeno. El componente I es una Ferromolibdoproteína de peso molecular 220000-240000 d, constituida por cua-

tro subunidades ( $\alpha_2 \beta_2$ ) y que contiene dos átomos de  $\text{Mo}^{++}$ , 24-32 átomos de  $\text{Fe}^{++}$  y una cantidad de azufre ácido-lábil aproximadamente igual a la de  $\text{Fe}^{++}$  (3). El componente II es una Ferropoteína de peso molecular 57000 - 65000 d constituida por dos subunidades ( $\alpha_2$ ) que contiene un grupo sencillo no hémico 4Fe-4S (7).

Así pues, tanto  $\text{Fe}^{++}$  como  $\text{Mo}^{++}$  son parte integrante del sistema Nitrogenasa, aunque el hierro está presente también en otros sistemas enzimáticos y de transporte electrónico en la célula bacteriana. No es ese el caso del Molibdeno cuyas funciones se limitan casi por completo, en *Azotobacter*, al sistema de fijación de nitrógeno, en donde realiza un importante papel en la reducción del sustrato (5). Por lo tanto, limitaciones en la biodisponibilidad de  $\text{Fe}^{++}$  y sobre todo de  $\text{Mo}^{++}$ , afectarán a la biosíntesis de la Nitrogenasa (15), influyendo sobre los diferentes parámetros biológicos y produciéndose lógicamente, una notable disminución del crecimiento cuando el microorganismo se desarrolla en medios libres en nitrógeno.

Además de las alteraciones producidas en el sistema de fijación de nitrógeno, la deficiencia de  $\text{Fe}^{++}$  y  $\text{Mo}^{++}$  puede inducir la formación de quistes (10), que poseen una especial resistencia a los agentes físicos (21, 22, 27) y pueden permitir la supervivencia del microorganismo durante largos periodos de tiempo, en condiciones de limitación nutricional.

Este trabajo estudia la influencia de las limitaciones de  $\text{Fe}^{++}$  y  $\text{Mo}^{++}$  sobre el crecimiento de *Azotobacter vinelandii* y las posibles consecuencias de estas limitaciones sobre la producción de quistes, síntesis de proteínas, acumulación de ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico (PHB) y resistencia a las radiaciones ultravioleta en este microorganismo.

## MATERIAL Y METODOS

*Microorganismos*: El microorganismo base de nuestro estudio fue *Azotobacter vinelandii* ATCC (American Type Culture Collection) 12837, el cual fue conservado en medios de Burk, libres en nitrógeno (28).

*Medios de cultivo*: Se emplearon medios de cultivo que contenían la composición básica de sales referida por Burk (18), utilizando como fuente de carbono glucosa al 0.5 por ciento.

En medios de Burk, las concentraciones de  $\text{Fe}^{++}$  y  $\text{Mo}^{++}$  son 3 y 1 mM respectivamente. Para la determinación de las concentraciones limitantes se prepararon diferentes diluciones de estos iones, permaneciendo inalteradas el resto de las sales que constituyen el medio de Burk. Las concentraciones ensayadas fueron: 1, 0.1, 0.01  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  para el molibdeno y 3, 0.3, 0.03  $\mu\text{M}$  y 3  $\mu\text{M}$  en el caso del hierro.

*Condiciones generales de cultivo*: Todos los medios de cultivo, una vez inoculados, fueron incubados a 28°C y en agitación continua (exceso de oxígeno). El

pH fue determinado a los diferentes tiempos de la curva de crecimiento, manteniéndose constante entre 7 y 7.2.

*Curvas de crecimiento:* Una vez preparados los medios de cultivo (con un volumen final de 50 ml) a las diferentes concentraciones de  $\text{Fe}^{++}$  y  $\text{Mo}^{++}$  se inocularon con células de *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 (1 ml de inóculo conteniendo  $5 \times 10^5$  células en medios limitados en molibdeno y  $5 \times 10^6$  células en medios limitados en hierro), procedentes de un medio libre en nitrógeno, incubadas durante 48 horas según las condiciones de cultivo anteriormente reseñadas. Se realizaron las curvas de crecimiento del microorganismo cultivado en los diferentes medios, determinándose el número de células viables/ml a las 0, 8, 12, 24 y 48 horas de incubación. El recuento de las células viables se realizó siguiendo la metodología descrita por Miles y Misra (14) empleando como medio sólido para recuento el propio medio de Burk adicionado de 1.5 por ciento de Agar.

Para la elección de las concentraciones de  $\text{Fe}^{++}$  y  $\text{Mo}^{++}$  que originaran una limitación en el crecimiento, se escogió el criterio de Tsai et al. (24), según el cual se considera limitante, aquella concentración que supone una inhibición del crecimiento de un 40 por ciento aproximadamente con respecto al medio control.

*Recuento del número de quistes:* La presencia de formas quísticas se investigó en cada caso mediante la técnica descrita por Vela y Wyss (26).

#### *Determinaciones químicas*

*Proteínas:* Para la determinación de proteínas se utilizó la técnica de Lowry et al. (13).

*Ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico:* Se siguió la metodología descrita por Law y Slepecky (9) empleando la sal sódica del ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico en la curva de calibrado.

*Sensibilidad a la radiación ultravioleta y capacidad de fotorreactivación:* Las suspensiones bacterianas procedentes de medios limitados en  $\text{Fe}^{++}$  y  $\text{Mo}^{++}$  y medios control de 24 y 48 horas de incubación, una vez ajustadas a una D.O. de 0.6 (620 nm), se sometieron a la radiación ultravioleta empleando una lámpara ATOM UV-70 (320 nm) durante tiempo de exposición de 3, 6 y 12 segundos. Asimismo se investigó la capacidad de fotorreactivación usando una lámpara Philips, Argaphoto BM de 500 W, siguiendo la metodología descrita por Vela y Peterson (25).

## RESULTADOS

En la Figura 1, se pueden observar las curvas de crecimiento de *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 cultivado en medios limitados en  $\text{Fe}^{++}$  (Figura 1a) y  $\text{Mo}^{++}$  (Figura 1b). La disminución en las concentraciones de los iones limitantes, origina tasas de crecimiento progresivamente menores; asimismo, a medida que au-

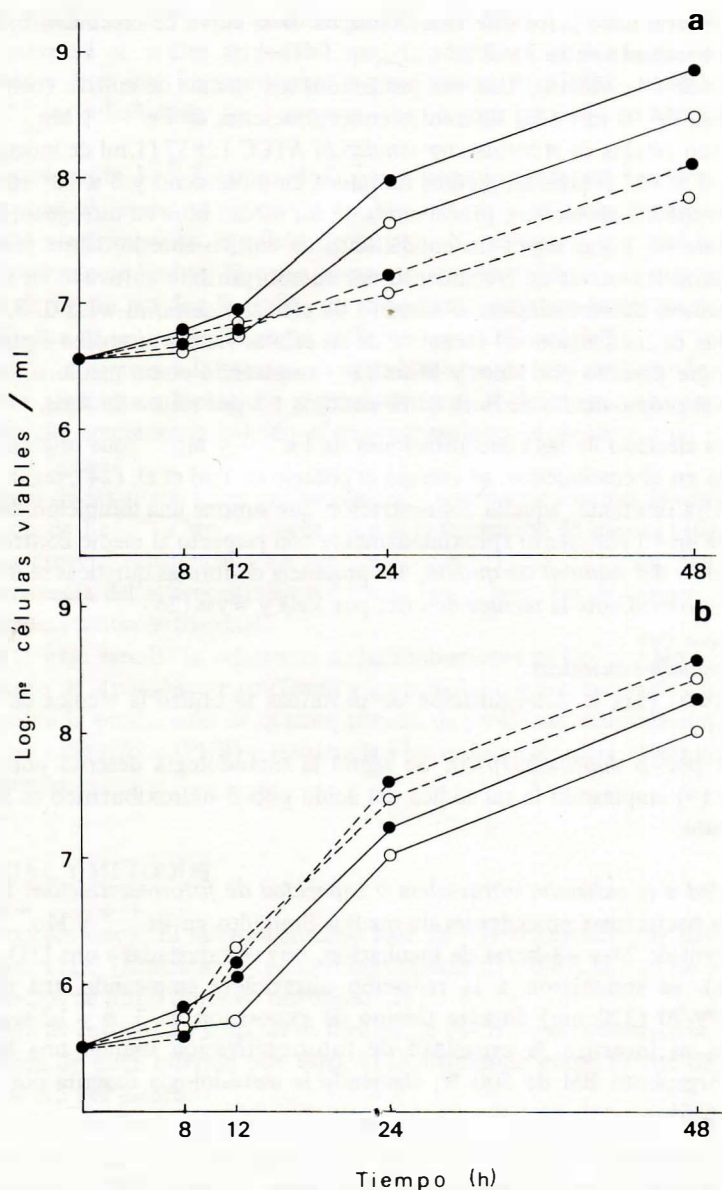


FIGURA 1.— Curvas de crecimiento de *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 cultivado en: a) Medios de Burk's adicionados de 3 mM de Fe<sup>++</sup> (control) (●—●) 0.3 mM de Fe<sup>++</sup> (○—○), 0.03 mM de Fe<sup>++</sup> (●---●) y 3 μM de Fe<sup>++</sup> (○---○). b) Medios de Burk's adicionados de 1 mM de Mo<sup>++</sup> (control) (●---●), // 0.1 mM de Mo<sup>++</sup> (○—○), 0.01 mM de Mo<sup>++</sup> (●—●) y 1 μM de Mo<sup>++</sup> (○---○).

menta la limitación mineral, el microorganismo muestra un incremento en su fase de reajuste (fase lag) en relación al medio control. De esta forma, en medios limitados en  $\text{Fe}^{++}$ , concentraciones inferiores a 0.3 mM originan periodos de adaptación próximos a las 24 horas, obteniéndose a partir de esta concentración curvas de crecimiento con pendientes muy pequeñas en fase de crecimiento. Resultados análogos se obtuvieron en medios limitados en  $\text{Mo}^{++}$ , donde por debajo de la concentración de 0.01 mM, la fase de reajuste se incrementa aunque la pendiente de la curva, en la fase de crecimiento, es semejante a la obtenida en medios control. La concentración de  $\text{Fe}^{++}$  que originó un 49 por ciento de inhibición del crecimiento, fue 0.3  $\mu\text{M}$  (Figura 1a). En el caso del  $\text{Mo}^{++}$  la concentración limitante seleccionada fue 1  $\mu\text{M}$  produciéndose una inhibición del crecimiento del 39 por ciento (Figura 1b).

Paralelamente a los recuentos de células viables se determinó el número de células quísticas presentes en los cultivos. La proporción de formas quísticas fue superior en medios limitados especialmente en  $\text{Fe}^{++}$ , donde se alcanzaron valores del 35-40 por ciento a las 48 horas de incubación.

Una vez seleccionadas las concentraciones limitantes de  $\text{Fe}^{++}$  y  $\text{Mo}^{++}$  se realizaron las determinaciones analíticas anteriormente mencionadas. En la Tabla I se muestran las concentraciones de proteínas y ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico (PHB) en los distintos medios de cultivo a las 24 y 48 horas de incubación. Según se desprende de estos resultados, no existen diferencias notables en las concentraciones de estos componentes celulares entre los medios limitados en  $\text{Mo}^{++}$  y medios control. Sin embargo, en medios limitados en  $\text{Fe}^{++}$ , la concentración de proteínas a las 24 horas de incubación es sensiblemente inferior. Este resultado podría ser debido a una menor actividad biosintética, consecuencia del incremento en la fase de reajuste que se prolonga hasta las 24 horas de cultivo (Figura 1a). Asimismo, la concentración de ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico a las 48 horas de incubación en medios limitados en  $\text{Fe}^{++}$  es considerablemente superior a la encontrada en los demás medios. Una explicación a este resultado puede establecerse en base al número de quistes que fue siempre superior bajo limitación de hierro.

Los resultados obtenidos en los estudios de sensibilidad a la radiación ultravioleta y capacidad de fotorreactivación, a las 24 y 48 horas de incubación, se muestra en las Figuras 2 y 3 respectivamente, donde se pueden observar las curvas de supervivencia del microorganismo y su capacidad de fotorreactivación en los diferentes medios estudiados.

En las Figuras 2 y 3 se puede apreciar un incremento de la sensibilidad a la radiación ultravioleta en medios control, en función de la edad del cultivo, hecho que no se manifiesta bajo limitación mineral, donde el grado de resistencia es relativamente constante con independencia del tiempo de cultivo. Esta menor sensibilidad de las células de *Azotobacter* a la radiación ultravioleta, se vio además incrementada en función del tiempo por una mayor capacidad de fotorreactivación, aunque este aumento podría atribuirse a la mayor proporción de formas quísticas.

24 h

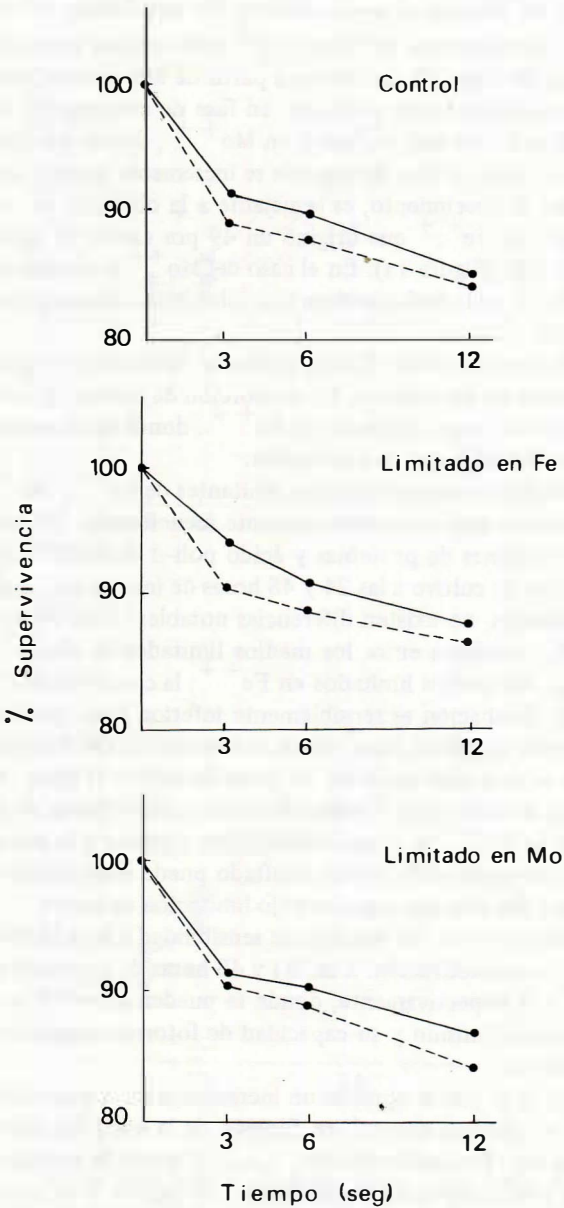


FIGURA 2.- Sensibilidad a la radiación UV (●—●) y capacidad de fotorreactivación (●—●) en cultivos de *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 a las / 24 horas de incubación.

48 h

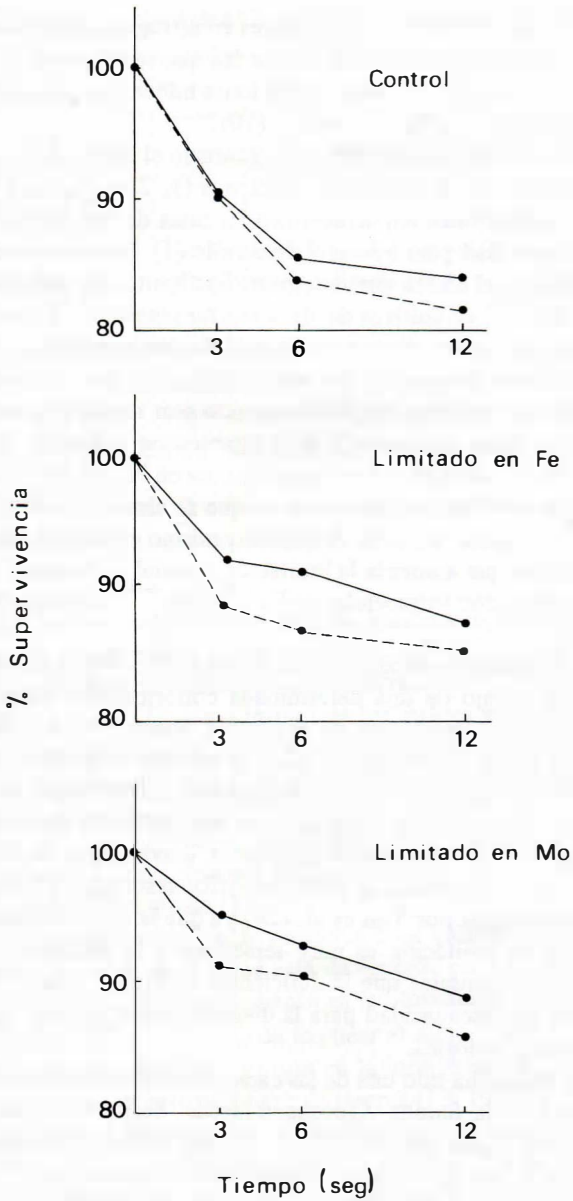


FIGURA 3.— Sensibilidad a la radiación UV (•---•) y capacidad de fotorreactivación (•—•) en cultivos de *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 a las / 48 horas de incubación.

## DISCUSION

El crecimiento de *Azotobacter* en medios libres en nitrógeno está condicionado por un mínimo de exigencias nutricionales entre las que se incluyen la presencia de una fuente hidrocarbonada y un conjunto de iones minerales, destacándose por su mayor requerimiento  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Mo}^{++}$  (10).

Han sido muchos los investigadores que han estudiado el efecto de la limitación mineral sobre el crecimiento de los microorganismos (1, 2, 4, 6, 16, 17, 20, 24, 29), encontrando disminuciones importantes en las tasas de crecimiento, incluso en algunos casos, incapacidad para iniciar el desarrollo (1). En nuestros resultados (Figura 1) queda reflejado el efecto que determina una limitación progresivamente mayor en  $\text{Fe}^{++}$  y  $\text{Mo}^{++}$ , en cultivos de *Azotobacter vinelandii*. A la vista de las curvas de crecimiento, se puede afirmar que a medida que aumenta la limitación mineral, el microorganismo encuentra una mayor dificultad para iniciar su crecimiento, y las tasas de crecimiento van disminuyendo con respecto a medios control. Una explicación a estos resultados podría establecerse pensando que el contenido en  $\text{Fe}^{++}$  y  $\text{Mo}^{++}$  intracelular va repartiéndose en las células hijas después de cada división hasta que llega un momento en que se alcanza un nivel mínimo de  $\text{Fe}^{++}$  y  $\text{Mo}^{++}$ , a partir del cual, el microorganismo es incapaz de dividirse. De esta forma, a medida que aumenta la limitación mineral, la bacteria agota más rápidamente su concentración intracelular de  $\text{Fe}^{++}$  o  $\text{Mo}^{++}$ , alcanzando tasas de crecimiento inferiores.

Tsai et al. (24), obtuvieron análogos resultados en medios limitados en fosfato, demostrando que por debajo de una determinada concentración intracelular de fósforo, la división del microorganismo no es posible. Según estos autores (24), la limitación mineral no ejerce efecto alguno sobre la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, manteniéndose dentro de valores constantes; sin embargo, la fosforilación oxidativa para la obtención de energía, se ve muy afectada por lo que la célula inhibe la síntesis de ATP y las rutas biosintéticas, desviando la degradación de la fuente carbonada hacia la síntesis de PHB. Nuestros resultados (Tabla I) están de acuerdo con los obtenidos por Tsai et al. (24) ya que la concentración de proteínas en condiciones de limitación es muy semejante a la obtenida en medios control. Así pues, podría pensarse que la deficiencia en  $\text{Fe}^{++}$  y  $\text{Mo}^{++}$  produce en el microorganismo una incapacidad para la división celular pero no impide que la célula siga su actividad biológica.

La formación de quistes ha sido una de las características más extensamente estudiadas en miembros de la familia Azotobacteraceae. Según Winogradsky (30) la formación de quistes puede ser inducida en medios libres en nitrógeno, con n-butanol como única fuente de carbono. Investigaciones posteriores (21, 22, 27) pusieron de manifiesto una mayor capacidad de resistencia a los agentes físicos (deseccación, sonicación, ruptura mecánica, radiaciones) por parte de los quistes en comparación con células vegetativas, asignándoseles el papel de formas de resistencia de *Azotobacter* en la naturaleza. Layne y Johnson (10) demostraron que



TABLA I.- Concentración de proteínas y ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico en *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 cultivado en medios limitados en  $Fe^{++}$  y  $Mo^{++}$  y medios control a las 24 y 48 horas de incubación.

Medios de cultivo	% de Peso Seco			
	Proteínas (a)		PHB (b)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Burk's control	53'7 $\pm$ 3'5	49'5 $\pm$ 3'0	13'5 $\pm$ 0'5	9'5 $\pm$ 0'5
Burk's 1 $\mu$ M $Mo^{++}$	50'0 $\pm$ 2'0	44'3 $\pm$ 3'5	12'5 $\pm$ 0'5	11'0 $\pm$ 1'0
Burk's 0'3 mM $Fe^{++}$	26 $\pm$ 1'5	46 $\pm$ 0'5	15 $\pm$ 1'0	20 $\pm$ 2'0

(a) Método de Lowry *et al.* (1951)

(b) Método de Law y Slepecky (1961)

las deficiencias minerales podían inducir, igualmente, la formación de quistes en *Azotobacter*, encontrando que la proporción de quistes varía con el tipo de ión mineral que produce la limitación. Sin embargo, parece ser que las propiedades de las cubiertas externas (exina e intina) de los quistes inducidos por deficiencia mineral son diferentes a las de los quistes obtenidos en medios con n-butanol(10); en investigaciones posteriores Layne y Johnson (11) muestran que los quistes de *Azotobacter* inducidos por deficiencia mineral poseen las mismas propiedades de resistencia a los agentes físicos que los quistes inducidos en medios con n-butanol, por lo que podría concluirse que las características de resistencia no residen en las cubiertas externas del quiste (11).

Según nuestros resultados, la proporción de quistes es muy superior en medios limitados en  $Fe^{++}$ , hecho que está de acuerdo con los resultados obtenidos por Layne y Johnson (10). Este aumento en la proporción de formas quísticas en medios limitados en  $Fe^{++}$ , puede explicar el incremento en la concentración de ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico, ya que en la formación del quiste es imprescindible una mayor síntesis de este polímero de reserva (12, 19, 23).

Con respecto a los estudios de sensibilidad a la radiación ultravioleta, según se desprende de los resultados obtenidos (Figuras 2 y 3), la limitación mineral, y en especial, la limitación de  $Fe^{++}$ , favorece la resistencia a estas radiaciones. Esta mayor resistencia, podría explicarse por el aumento en la proporción de quistes (25).

A la vista de nuestros resultados puede pensarse que una limitación en la bio-disponibilidad de  $Fe^{++}$  o  $Mo^{++}$  en la naturaleza, implica en *Azotobacter* el de-

sarrollo de una serie de mecanismos de respuesta a esta limitación. En habitat naturales, las concentraciones de los nutrientes se ven sometidas a grandes fluctuaciones de forma que en muchas ocasiones, se originan limitaciones o deficiencias que pueden determinar la supervivencia del microorganismo. En este sentido, *Azotobacter* posee la capacidad de desarrollar en condiciones de deficiencia mineral células diferenciadas que presentan un elevado grado de resistencia a los agentes físicos, los quistes. Además, la limitación mineral provoca en el microorganismo un crecimiento más lento, por lo que aumenta su resistencia a la radiación ultravioleta y se induce un sistema de fotorreactivación (Figuras 2 y 3) que permite una replicación más eficiente del material genético dañado. Aunque la bibliografía describe que la limitación en  $\text{Mo}^{++}$  posee una mayor influencia sobre *Azotobacter* que la limitación en  $\text{Fe}^{++}$ , en nuestros resultados se puede observar un mayor grado de respuesta a la limitación en  $\text{Fe}^{++}$ , lo que se refleja en las concentraciones de proteínas y ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico y en la proporción de quistes. Creemos que una explicación a estos resultados podría establecerse en base a la capacidad que posee *Azotobacter* para acumular grandes cantidades intracelulares de  $\text{Mo}^{++}$ , que podrían ser utilizadas en condiciones de limitación (18).

#### BIBLIOGRAFIA

1. ARCHIBALD, F.S. y I.N. DEVOE. *J. Bacteriol.* 136, 35-48, (1978).
2. BRILL, W.J., A.L. STEINER y V.K. SHAH. *J. Bacteriol.* 118, 986-989, (1974).
3. BULEN, W.A. y J.R. LE COMTE. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 56, 997-986, (1966).
4. CARDENAS, J. y L.E. MORTENSON. *J. Bacteriol.* 123, 978-984, (1975).
5. EADY, R.R. y J.R. POSTGATE. *Nature*, 249, 805-810, (1974).
6. FEKETE, F.A., J.R. SPENCE y T. EMERY. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1297-1300, (1983).
7. GUILLUM, W.O., L.E. MORTENSON, J.S. CHEN y R.H. HOLM. *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 584-595, (1977).
8. KENNEDY, C., R.R. EADY, E. KONDOROSI y D.K. REKOSH, *Biochem. J.* 155, 383-389, (1976).
9. LAW, J.H. y R.A. SLEPECKY, *J. Bacteriol.* 82, 33-36, (1961).
10. LAYNE, J.S. y E.J. JOHNSON. *J. Bacteriol.* 87, 684-689, (1964a).
11. LAYNE, J.S. y E.J. JOHNSON. *J. Bacteriol.* 88, 956-959, (1964b).
12. LIN, L.P. y H.L. SADOFF. *J. Bacteriol.* 95, 2336-2343, (1968).
13. LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR y R.S. RANDALL. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, (1951).
14. MILES, A.A. y S.A. MISRA, *J. Hyg.* 38, 732-736, (1983).
15. NAGATANI, H.H. y W.J. BRILL. *Biochem. Biophys. Acta.* 362, 160-166, (1974).
16. PAGE, W.J. y J.L. DORAN. *J. Bacteriol.* 146, 33-44, (1981).
17. PAGE, W.J. y M. VON TIGERSTRON, *J. Bacteriol.* 151, 237-242, (1982).
18. PIENKOS, P.T. y W.J. BRILL. *J. Bacteriol.* 145, 743-751, (1981).
19. REUSCH, R.N. y H.L. SADOFF. *J. Bacteriol.* 145, 889-895, (1981).
20. RIDDLE, G.D., J.G. SIMONSON, B.J. HALES y H.D. BRAYMER. *J. Bacteriol.* 152, 72-80, (1982).

21. SOCOLOFSKY, M.D. y O. WYSS. *J. Bacteriol.* *81*, 946-954, (1961).
22. SOCOLOFSKY, M.D. y O. WYSS. *J. Bacteriol.* *84*, 119-124, (1962).
23. STEVENSON, L.H. y M.D. SOCOLOFSKY. *J. Bacteriol.* *91*, 304-310, (1966).
24. TSAI, J.C., S.L. ALADEGBAMI y G.R. VELA. *J. Bacteriol.* *136*, 639-645, (1979).
25. VELA, G.R. y J. W. PETERSON. *Science*, *166*, 1296-1297, (1969).
26. VELA, G.R. y O. WYSS. *J. Bacteriol.* *87*, 476-477, (1964).
27. VELA, G.R. y O. WYSS. *J. Bacteriol.* *89*, 1280-1285, (1965).
28. WILSON, P.W. y S.C. KNIGHT. *Experiments in bacterio-physiology*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, p. 49, (1952).
29. WINDER, F.G. y C.O. O'HARA. *Biochem. J.* *80*, 20P, (1962).
30. WINOGRADSKY, S. *Ann. Inst. Pasteur.* *60*, 351-400, (1938).