

## Tesis de Posgrado

# Fisiología del *Azotobacter chroococcum*

Rouco, María Isabel Martina

1964

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://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 doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Rouco, María Isabel Martina. (1964). Fisiología del *Azotobacter chroococcum*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1293\\_Rouco.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1293_Rouco.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Rouco, María Isabel Martina. "Fisiología del *Azotobacter chroococcum*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1964.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1293\\_Rouco.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1293_Rouco.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

TITULO

"FISIOLOGIA DEL AZOTOBACTER CHROOCOCCUM"

AUTOR: María Isabel Martina ROUCO

Tesis presentada para optar al título de:  
Doctora en CIENCIAS NATURALES

Año 1964

1293

ef.2

---

I.- ACTIVIDAD DEL AZOTOBACTER. Inhibición por el oxígeno. Introducción.

En la bacteriología del suelo se considera de suma importancia la acción de una bacteria aerobia asimbiótica fijadora de nitrógeno, que pertenece al género Azotobacter.

Principales características del género Azotobacter: células sin endosporas, bacilos y aún cocos relativamente grandes, a veces parecidos a levaduras, móviles por medio de flagelos peritricales, Gram negativas, aerobias estrictas, que suelen crecer en películas sobre la superficie del medio de cultivo. Pueden fijar nitrógeno atmosférico si disponen de carbohidratos u otra fuente de energía. Crecen muy bien en medios escasos de nitrógeno. Bacterias terrestres y acuáticas (3).

Desde el descubrimiento del Azotobacter por Beijerinck, el problema de la influencia del oxígeno sobre su desarrollo ha sido tema de amplias investigaciones y lo es aún en la actualidad.

Los primeros investigadores que hicieron notar la influencia negativa que tenía el aumento de la presión parcial de oxígeno en la fijación del nitrógeno por el Azotobacter fueron O. Meyerhof y D. Burk (15) hace más de treinta años. Estos autores opinaban que la máxima fijación de nitrógeno tenía lugar a una presión parcial de oxígeno de 0,03-0,04 atmósferas y que la inhibición total de la fijación ocurría a presiones parciales de 0,6 atmósferas.

Dado que el Azotobacter se considera un germen aerobio estricto, estos resultados no concuerdan con lo esperado.

A las conclusiones obtenidas por O. Meyerhof y D. -

Burk, parecía no habersele dado la importancia debida. Aunque los mecanismos de fijación y de respiración son probablemente independientes, la presión parcial de oxígeno influye, no sólo sobre la intensidad de respiración del Azotobacter, sino también sobre la fijación del nitrógeno.

En cultivos prolongados, adicionados periódicamente de sustancia orgánica muestran que la oxidación se realiza, mientras que la fijación no (8). Desde el punto de vista energético, la fijación debe seguir a la respiración.

En trabajos de Wilson (23) y D.Burk (6) y (15) se muestra que en los procesos de fijación las moléculas de oxígeno y de nitrógeno no entran en juego, sólo interesa la presión parcial de oxígeno y afirman que éste no es un inhibidor específico de la fijación. P.Wilson y R.Burris (24) sostienen que la influencia negativa de la presión parcial de oxígeno sobre la fijación del nitrógeno por el Azotobacter, sería fácil de explicar por el aumento de la oxidación de la sustancia orgánica a altas presiones, ya que, entonces dicha sustancia resultaría carencial para la construcción del cuerpo bacteriano, no pudiendo por lo tanto multiplicarse. Pero si a estas altas presiones la respiración disminuye, la causa de la influencia negativa de las altas presiones parciales de oxígeno, sobre la fijación del nitrógeno, ya sería más difícil de explicar.

M.Fedorow (7) afirma que en presencia de excesivas cantidades de oxígeno esta bacteria desarrolla en el límite de las fases solución nutritiva/aire.

Otros autores afirman que el desarrollo del Azotobacter sólo se realiza en la superficie del medio, pero no debajo de ella.

Con referencia a la influencia que tienen las presiones parciales de oxígeno en la respiración de los microorganismos y en especial, en el Azotobacter chroococcum, las conclusiones son distintas.

Diversos autores opinan como O. Warburg (20) aceptan que la presión parcial de oxígeno no influye en la intensidad de respiración de las células saturadas con sustancia orgánica.

Estos investigadores sostienen que es suficiente, para mantener una respiración normal, una presión parcial muy baja, del orden de  $10^{-5}$  atmósferas (22). Otros autores, en cambio, dan valores de presiones parciales de oxígeno mucho más altas para respiraciones normales (hasta 50 mm de mercurio) (10), (19) y (25).

Luego hay investigaciones en las cuales se demostró que recién a presiones parciales mayores de 0,21 atmósferas, se realizaba la máxima actividad respiratoria (16).

R. Gerard (11) opina que la influencia de las presiones parciales depende de la relación que existe, entre las concentraciones de oxígeno y de sustancia energética.

C. Zobell y J. Stadler (26) indicaron que hasta una concentración de sustancia orgánica de 34,5 mg/L, la presión parcial de oxígeno no tenía influencia sobre la respiración.

O. Meyerhof y D. Burk (15), O. Meyerhof y W. Schulz (17) J. Blom (4) y J. Fife (9), investigaron la influencia que tenía la presión parcial de oxígeno, sobre la respiración del Azotobacter chroococcum. Estos investigadores exceptuando a J. Fife, demostraron que con el aumento de la presión parcial de oxígeno, disminuía la intensidad de respiración del Azotobacter chroococcum, siendo esta máxima a presiones parciales

de oxígeno de 0,15-0,17 atmósferas, disminuyendo su intensidad por encima o por debajo de estas presiones. J.Fife opina ba lo contrario.

Tre bajando con Rhizobium, C.Georgii y P.Wilson (12) llegaron a las mismas conclusiones que J. Fife.

Siendo el metabolismo del Azotobacter chroococcum similar al del Rhizobium, se podría suponer la validez de es todos resultados.

D.Burk (6) estableció que en la respiración del Azotobacter chroococcum tiene lugar una inhibición de concentración para los dos reactantes: glucosa y oxígeno.

Esta dependencia de la sustancia orgánica y oxígeno no se manifiesta en la formación de películas de desarrollo, del tipo de anillos de Liesegang.

Para estudiar el comportamiento del desarrollo del Azotobacter chroococcum en medios de cultivo conteniendo diferentes concentraciones de sustancia orgánica y a diferentes presiones parciales de oxígeno se hicieron los siguientes ensayos que se detallan en el punto II.

## II.- FORMACION DE LOS ANILLOS DE LIESEGANG

El primer investigador que observó el desarrollo de bacterias, en forma de líneas, fué Beijerinck (2) y las llamó líneas de respiración, porque en su formación tenía importancia el oxígeno del aire.

Tanto I. Braun (5) como J. Williams (22) observaron zonas bacteriales en sílico-gel, con soluciones nutritivas diluídas y en tubos de ensayo, trabajando con altas presiones parciales de oxígeno. Estos dos autores encontraron similitud entre este tipo de desarrollo y los conocidos anillos de Liesegang.

Trabajando con una cepa de Azotobacter chroococcum provista por el Instituto de Suelos y Agrotecnia (hoy dependiente del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), donde realicé estos ensayos, observé la formación de los anillos de Liesegang.

Se hicieron experiencias con medios conteniendo diferentes concentraciones de sustancia orgánica y trabajando con diferentes presiones parciales de oxígeno.

Se sembró el Azotobacter chroococcum, en agar nutritivo al 0,3% para obtener un agar blando y favorecer la traslación de las bacterias.

El medio usado fué el siguiente:

$K_2HPO_4$ + $KH_2PO_4$	-----	2 gr (pH=7,3)
$SO_4Ca$	-----	0,1 gr
$SO_4Mg$	-----	0,2 gr
CINa	-----	0,2 gr
$MoO_4Na_2$	-----	0,04 gr
$Cl_3Fe$	-----	trazas
$SO_4Mn$	-----	trazas
Agua destilada	-----	1000 cc.

Las experiencias se realizaron usando como sustancia energética manita en las siguientes concentraciones 50 gr/L, 1 gr/L, 0,1 gr/L, 0,05 gr/L, y 0,01 gr/L.

El medio de cultivo se envasó en tubos de ensayo con 5 cc.

Cuando se hizo la siembra, se trató de que el agar estuviera fundido y enfriado a más o menos 30°C-40°C, para distribuir uniformemente el inoculum.

Se sembraron con una gota de un cultivo de 24 horas cinco tubos de cada concentración de manita, se incubó a 30°C en estufa.

Haciendo lecturas diarias se observó a los dos o tres días, el desarrollo en forma de discos sucesivos en profundidad. Esto llamó la atención tratándose de una bacteria aerobia estricta. La profundidad de los discos de desarrollo del Azotobacter chroococcum variaba según la cantidad de manita presente en el medio.

Esta profundidad era inversamente proporcional a la concentración de sustancia energética. Los mismos resultados se obtuvieron repitiendo el ensayo cinco veces y reemplazando la concentración de manita por glucosa en cantidades energéticas equivalentes.

Se puede explicar esto debido a la difusión del oxígeno en el medio, que va aumentando su concentración, con el correr de los días y a la disminución del material energético por el consumo bacteriano, mostrando que existe una dependencia directa entre las concentraciones de oxígeno y de sustancia energética.

Los discos del Azotobacter chroococcum de desarrollo discontinuo en dirección hacia el fondo del tubo, serían



un ejemplo típico de anillos biológicos de Liesegang. Puesto que los anillos de Liesegang se forman por la difusión catión-anión de la solución superpuesta sobre gel.

Para comprobar la difusión del oxígeno en el medio, se sembraron tubos agregando Azul de metileno 1/200.000, y se observó que quedaba de color azul la porción que estaba sobre la película de cultivo, no observándose coloración por debajo de ésta.

Mirando el tubo se veía que la película dividía a éste, en dos bandas, una superior color azul que era la zona de oxidación, y otra inferior, incolora, que era la zona de reducción.

Pero se observó que a medida que se envejecía el cultivo, tomaba todo el medio color azul, pues la película no era capaz de retener el oxígeno.

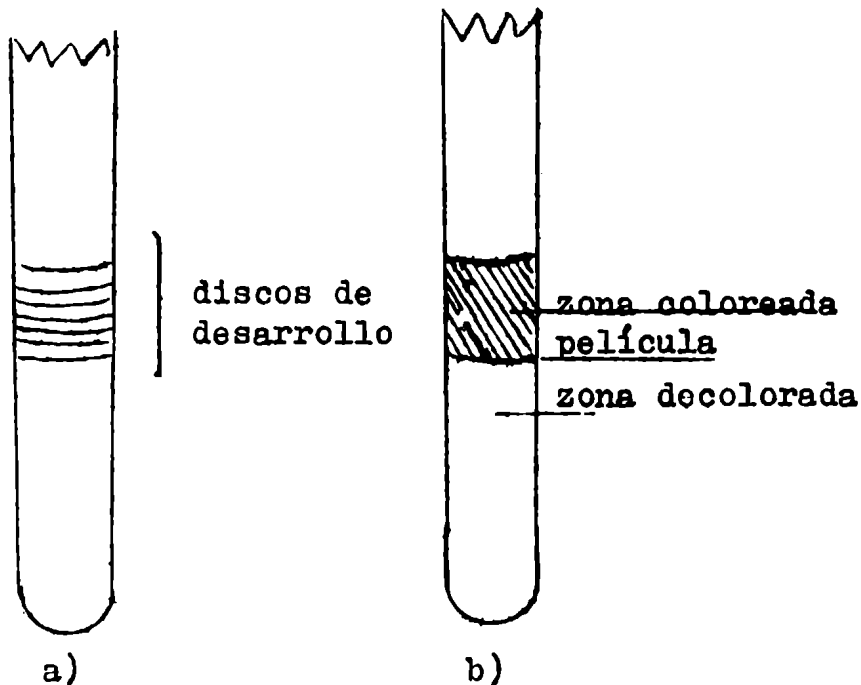


Fig.1

Fig.1- Películas de desarrollo sucesivas formadas por el Azotobacter chroococcum, a) medio de cultivo + 0,3 % de agar; b) idem + azul de metileno.

También se hicieron ensayos para tratar de determinar, la influencia de las distintas presiones parciales de oxígeno, pero trabajando con una concentración de manita de 0,1 gr/L.

Usando una técnica similar al ensayo anterior, se sembró con Azotobacter chroococcum y se incubaron cinco tubos en un desecador conteniendo una presión parcial de oxígeno de 0,1 atmósferas, que se consiguió substituyendo parte del aire por oxígeno. Se colocaron en estufa a 30°C.

Al mismo tiempo y en forma paralela se realizó un ensayo similar pero a presiones parciales de oxígeno de 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 atmósferas.

Los resultados de esta experiencia se pueden observar en la figura 2.

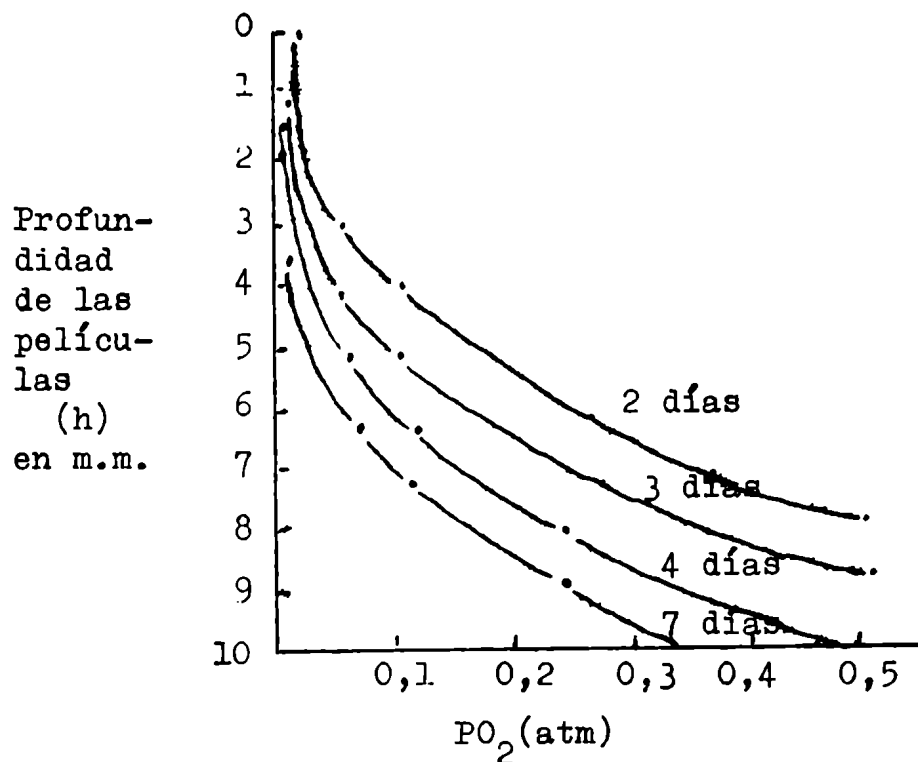


Fig.2

Fig. 2.- Influencia de la presión parcial de oxígeno (oxígeno disuelto en el medio), sobre la profundidad de desarrollo del Azotobacter chroococcum.

Para ver si se repetía el mismo resultado anterior se hizo otra experiencia a presiones parciales de oxígeno de 0,01 , 0,05 , 0,10 , 0,21 y 0,50 atmósferas, siempre con concentraciones de manita de 0,1 gr/L.

Los resultados obtenidos fueron análogos, y en el gráfico N°3, se expresan en función del tiempo.

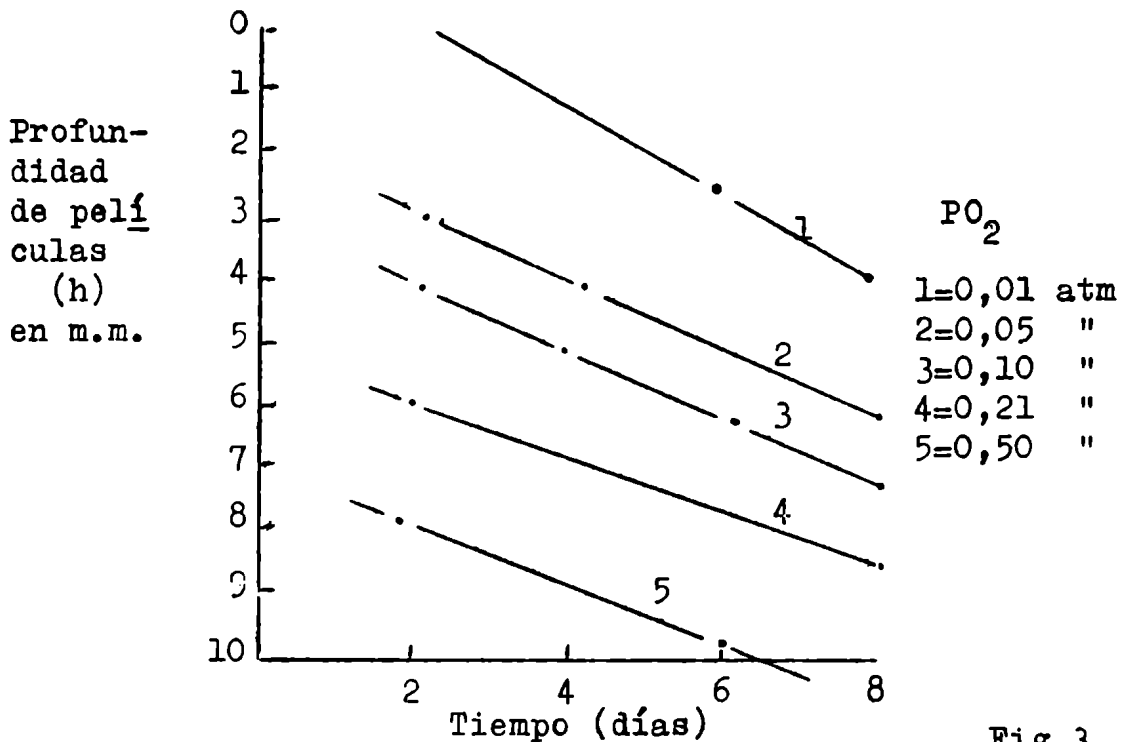


Fig.3

Fig.3- Función del tiempo en la formación de la película de desarrollo del Azotobacter chroococcum.

Luego se trató de ver la influencia de la concentración de manita, sobre la formación de los discos de desarrollo del Azotobacter chroococcum a distintas presiones parciales de oxígeno.

Para esto se usaron concentraciones de manita de 50 gr/L, 1 gr/L, 0,1 gr/L, 0,05 gr/L y 0,01 gr/L y presio -

nes parciales de 0,2 , 0,4 , 0,6 y 0,8 atmósferas.

Se sembraron cinco tubos de cada concentración de manita.

La técnica usada fué similar a las experiencias anteriores.

En la figura 4 se detallan los resultados obtenidos al cuarto día de cultivo.

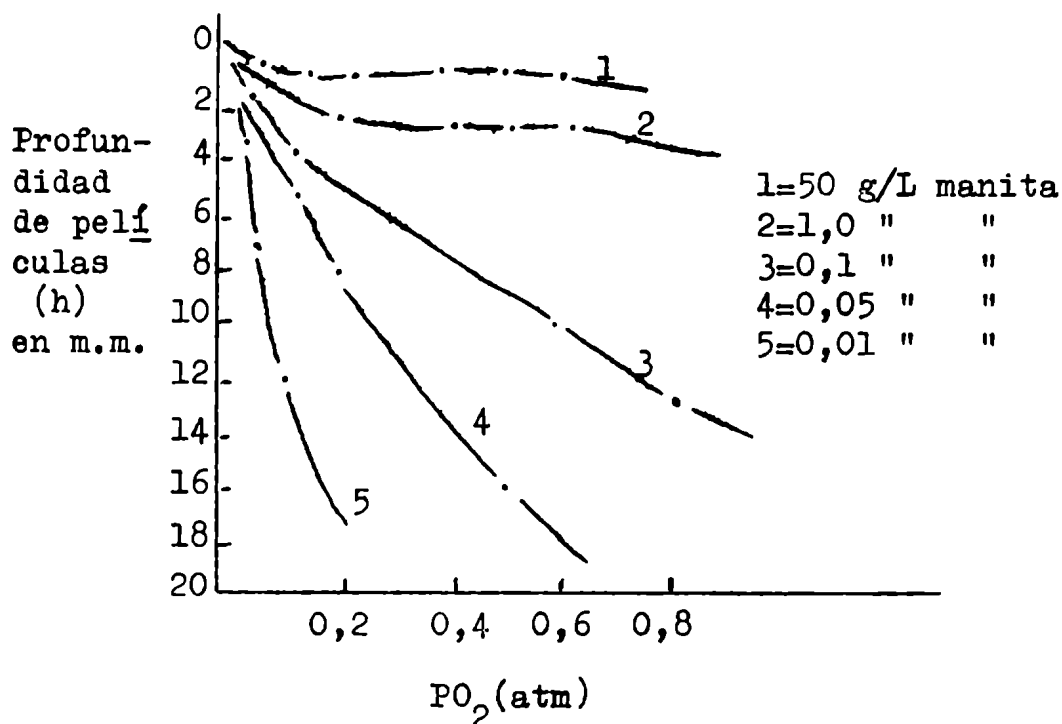


Fig.4

Fig.4- Influencia de la concentración de manita sobre la profundidad de formación de películas de desarrollo - del Azotobacter chroococcum.

En todas estas experiencias se observó también la formación de los anillos de Liesegang y se comprobó nuevamente que existe una relación directa entre la concentración de sustancia orgánica y el oxígeno disuelto en el medio (presión parcial de oxígeno), que se pone de manifiesto en la localización de las películas de desarrollo.

Sembrando diez tubos conteniendo el mismo medio, pero con 3% de agar, no se forman los anillos de Liesegang, pues

esta concentración de agar impide el movimiento de las bacterias.

Pero se forman colonias puntiformes, a una determinada profundidad, proporcional al tiempo y hacia el fondo del tubo, esmejandose a la ubicación de las películas, y desarrollando a medida que la concentración de oxígeno es la óptima.

Para averiguar si estos fenómenos era propios del comportamiento de un germen aerobio, se realizaron experiencias similares, con una bacteria aerobia estricta como lo es el Bacillus subtilis. Con un cultivo de 24 horas en caldo común de este bacilo, se sembraron tubos con caldo de carne en la siguiente dilución 1:1 , 1:2 , 1:4 , 1:8 y 1:16, conteniendo todos 0,3% de agar.

El ensayo se realizó por triplicado y se incubó a 37°C en estufa. Se hizo la primer lectura a las 24 horas, observándose que: en la dilución 1:1 no había desarrollo en ninguno de los tres tubos y en las diluciones siguientes se vió una película de desarrollo más alejada de la superficie cuanto más diluido era el medio.

La lectura realizada a las 48 horas mostró que: en la dilución 1:1 había desarrollo en la superficie y en las diluciones sucesivas, y a medida que disminuía la concentración del medio, la película de desarrollo aumentaba su grosor y su profundidad hacia el fondo del tubo. En la tabla N° 1 se dan los resultados de esta experiencia, al sexto día.

Diluciones del caldo	Profundidad de desarrollo	
	Límites (mm)	Nivel medio (mm)
1:1	0-1	0,5
1:2	0-2	1
1:4	0-3	1,5
1:8	0,5-4	2,3
1:16	2-8	5

Tabla N°1- Profundidad del nivel de desarrollo del Bacillus subtilis en tubos de medio con 0,3% de agar.

Este ensayo se repitió varias veces y se obtuvieron los mismos resultados.

La combustión de la sustancia orgánica depende de la concentración de oxígeno necesaria para su oxidación. A igual cantidad de calor de combustión, corresponde igual cantidad de oxígeno.

Cuanto más concentrada es una solución energética, más oxígeno se necesita para su combustión, por lo que se explicaría que las películas de Azotobacter chroococcum se desarrollan más cerca de la fuente de oxígeno.

De estas experiencias se comprueba que el Azotobacter chroococcum desarrolla en el límite de las fases solución nutritiva/aire cuando la concentración de sustancia orgánica es mayor o igual a 0,1 gr/L.

Debajo de esta concentración lo hace, en profundidad. Debido a esto, no puede ser considerado anaerobio facultativo porque no puede desarrollarse en ausencia de oxígeno.

Con esto se contradice la opinión de J.Fife (9) que afirmaba que el Azotobacter chroococcum desarrolla anaeróbicamente y se comprueba lo acertado del criterio sustentado por O.Meyerhof y D.Burk (15) sobre la influencia del oxígeno en el desarrollo del Azotobacter chroococcum.

III.- PROCESOS DE OXIDO-REDUCCION A DISTINTAS  
CONCENTRACIONES DE GLUCOSA

Lo demostrado en las experiencias anteriores, comprueba que a concentraciones de sustancia energética menores a 0,1 gr/L, el Azotobacter chroococcum desarrolla en profundidad en el medio. Notándose que tiene tendencia a retirarse de la fase solución nutritiva/aire, o sea, alejarse de la fuente de oxígeno, formando una serie de discos del tipo de los anillos de Liesegang.

Esto corrobora la teoría de O.Meyerhof y D.Burk (15) que sostenían que cuanto más bajas eran las presiones parciales de oxígeno, tanto mejor era utilizada la sustancia energética.

Teniendo en cuenta que las condiciones de óxido-reducción de la solución, son las que regulan la ubicación de las colonias de bacterias, según algunos investigadores (1) y (13), se realizaron ensayos para comprobar el grado de importancia que tenían estas condiciones.

En el siguiente medio de cultivo:

$K_2HPO_4$ + $KH_2PO_4$	-----	2 gr (pH=7,3)
$SO_4Ca$	-----	0,1 gr
CINa	-----	0,2 gr
$NaMoO_4$	-----	0,04 gr
$Cl_3Fe$	-----	vestigios
$SO_4Mn$	-----	vestigios
Agua destilada	-----	1000 cc.

con cantidades diferentes de glucosa 0,1 gr/L, 1 gr/L y 10 gr/L, se determinó por método electrométrico el potencial de óxido-reducción del medio con las diferentes concentraciones de glucosa que se representan en el siguiente gráfico.

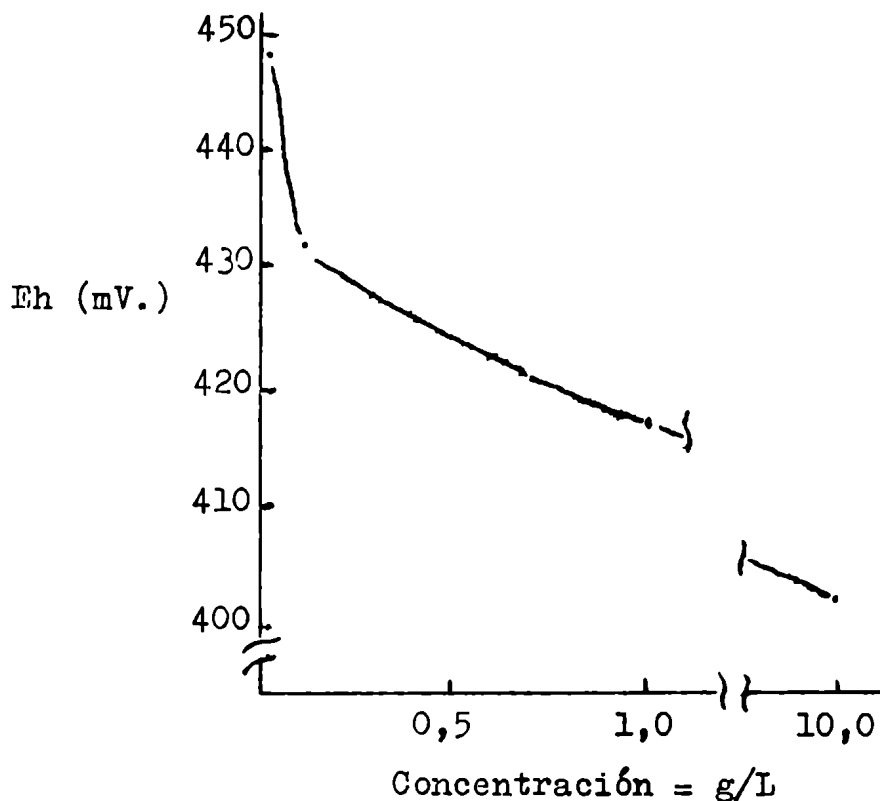


Fig N°5

Fig. 5- Potencial de óxido-reducción del medio de cultivo, con diferentes concentraciones de glucosa.

La investigación de las condiciones de óxido-reducción de un cultivo de Azotobacter chroococcum por medio de indicadores, muestra que el potencial se encuentra en la zona positiva, debido a la decoloración de los siguientes indicadores:

Azul de metileno ( +11 mV.)

Thionina ( +62 mV.)

O.Bromofenol-Indofenol ( +230 mV.)

En la experiencia no se decoloraron:

Rojo neutro ( - 340 mV.)

Verde de Jano ( - 225 mV.)

Por encima de la zona de + 230 mV. hubo que hacer una medición electrométrica directa del potencial de óxido-



reducción. Estas mediciones fueron realizadas en cultivos -  
conteniendo diferentes cantidades de glucosa: 0,1 gr/L, 1 gr/L  
y 10 gr/L y a presiones parciales de oxígeno de: 0,05, 0,21  
y 0,60 atmósferas.

Los frascos usados para el cultivo eran del tipo  
penicilina y contenían 1 cc de la solución con una altura a  
proximada de uno a dos milímetros.

Se colocaron los frascos en un desecador y las -  
presiones parciales fueron obtenidas substituyendo parte del  
aire por oxígeno, haciendo un pequeño vacío de 4 a 5 cm de  
Hg, para crear condiciones herméticas.

Durante la medición la solución no estaba en equi  
librio con la fase gaseosa.

Se calentó sobre una lámpara de alcohol el elec -  
trodo de platino antes de usarse. Las mediciones se realiza  
ron en un galvanómetro HB con 340 ohms, que tenía una sensi  
bilidad de  $2,9 \cdot 10^{-9}$  A, que sirvió como instrumento cero.

Este ensayo relacionado con la variabilidad del Eh  
de un cultivo de Azotobacter chroococcum, demuestra que la  
magnitud con que éste se realiza es directamente proporcio  
nal a la concentración de sustancia orgánica.

En la figura 6 se pueden observar los resultados  
de estas determinaciones para dos presiones parciales de o  
xígeno y dos concentraciones de glucosa.

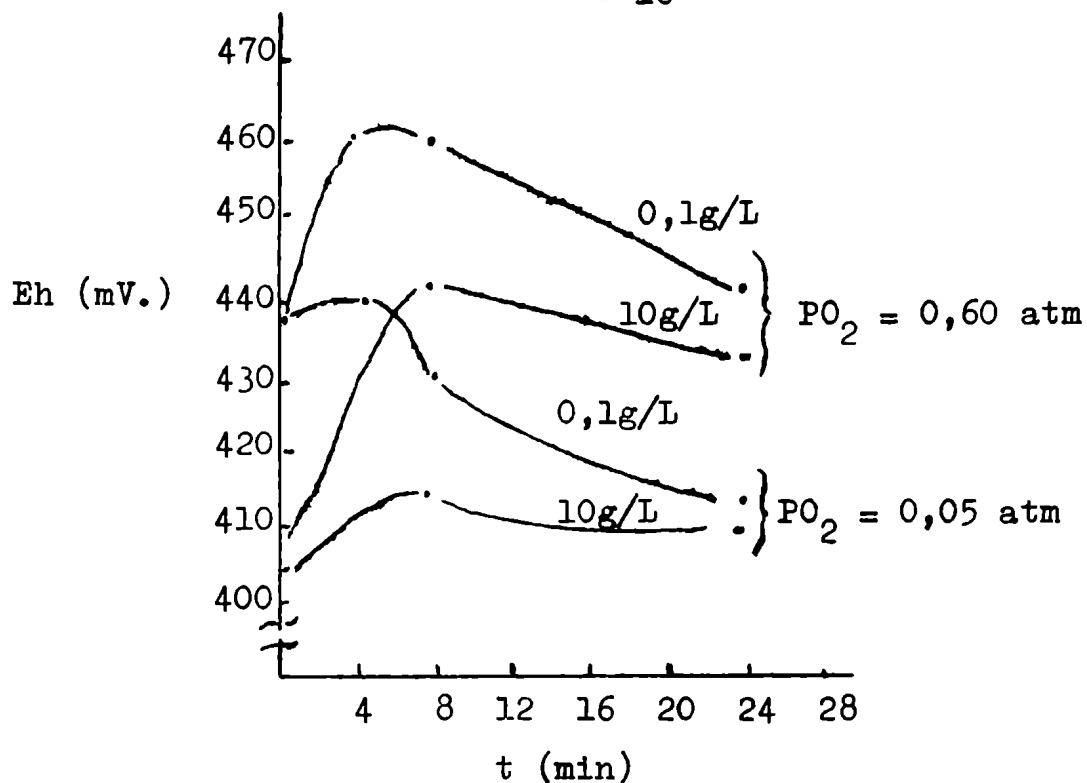


Fig. 6

De acuerdo con las curvas, el Eh de un cultivo de Azotobacter chroococcum es bastante alto y no corresponde a las características de bacteria aerobia. La variación del Eh de un cultivo de Azotobacter chroococcum recuerda a los pneumococos investigados y descritos por Hewitt (14) (bacterias que forman H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante su metabolismo).

Estas experiencias prueban que un alto Eh se observa cuando la presión de oxígeno alcanza su máximo y la concentración de glucosa, a un mínimo, mientras que un Eh bajo indica lo contrario.

*L. Isabel Mauer*

BIBLIOGRAFIA

- (1) W.P.Allyn, I.L.Baldwin - J.Bact.20 417 (1930)  
23, 399 (1932).
- (2) M.Beijerinck, Centr. für Bakt Paras. I, 14, 827 (1893).
- (3) Bergeys Manual of Determ. Bacteriology (1948) Baltimore.
- (4) J.Blom. Z.Bakt. Paras II, 84, 60, (1931).
- (5) I.Braun. Z.Bakt. Paras. I, 122, 5, (1931).
- (6) D.Burk, J.Phys Chem. 34, 1174, 1195 (1930).
- (7) M.Fedorov. Participation of heminenzyme in fixation of molecular Nitrogen by Azotobacter CR. (Doklandy) 66,113 (1949)
- (8) M.Fedorov - Biological Fixation of Nitrogen (1948), Moscow.
- (9) J.Fife, Journ. Agr. Res. 66, 229, 421, (1942).
- (10) R.Gerard e I.Falk - Biol. Bull. 60, 213, (1931).
- (11) R.Gerard, Biol. Bull. 60, 245, (1931)
- (12) C.Georgii y P.Wilson. Arch. Micr. 4, 543 (1933)
- (13) L.F.Hewitt - Oxid. Red. Potencials in Bacteriology and Biochemistry (1950) Londres.
- (14) L.F.Hewitt. The Bioch. J. 25, 169 (1931).
- (15) O.Meyerhof y D. Burk - Z. Phys. Ch. 139, 117 (1928)
- (16) O.Meyerhof - Pflüg. Arch. 164, 353, 165, 2229 (1916)  
166, 240 (1917)
- (17) O.Meyerhof y W.Schulz, Bioch. Z. 250, 35 (1932)
- (18) Szent - Györgyi - Z.Physiol. Chem. 217, 51 (1937)
- (19) P.Tang y R.Gerard - J.Cell. Comp. Phys. 1, 503 (1932)
- (20) O.Warburg, Ueber Stoffwechsel del Tumoren (1926)
- (21) O.Warburg y F.Kubowitz - Bioch Z. 214, 5 (1929)
- (22) J.Williams, Growth - 3, 21, 81 (1939)

- (23) P.Wilson y E.Fred - Proc. Nat. Ak. Sci. 23, 503 (1937)
  - (24) P.Wilson y R.Burris - An. Rev. Bact. 11, 41 (1947)
  - (25) R.Winzler - J.Cell. Comp. Phys. 17, 263 (1941)
  - (26) C.Zobell y J.Stadler - J.Bact. 39, 307 (1940)
-