

## AISLAMIENTO DE BACTERIAS EN MEDIOS DEFICIENTES EN FOSFORO

por

A. RAMOS-CORMENZANA

### INTRODUCCION

Durante una serie de experimentos y análisis de los microorganismos del suelo capaces que se empleaba el medio basal B de LOCHHEAD y CHASE (3), (cambiando el  $K_2HPO_4$  por el glicerofosfato sódico, y utilizando como control el mismo medio desprovisto de fósforo) quedamos sorprendidos al observar que en algunas ocasiones en los tubos control experimento (sin adición de fosfato) se producía desarrollo microbiano hasta diluciones del orden de  $10^{-6}$ .

Este hecho nos ha llevado al presente trabajo, en el que se pretende aislar microorganismos capaces de desarrollarse en medios deficientes en fósforo (tan solo con las impurezas que pudieran quedar con los contaminantes químicos) y a analizar comparativamente su cultivo con la posibilidad de desarrollo de otras bacterias existentes.

### MATERIAL Y METODOS

*Medio P.*—Como medio de cultivo que designamos como medio P se ha utilizado el medio basal B de LOCHHEAD y CHASE (3) modificado en el sentido de no adicionarle ningún tipo de fosfato y utilizando productos para análisis (Merck) de elevada pureza, siendo el ClNa suprapuro. Para transformarlo en medio sólido se empleaba agar purificado (BBL) a una concentración final de 1,6 por ciento.

El medio P quedaba definitivamente preparado como sigue:

Glucosa	...	...	...	...	...	1 g
KNO <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	...	...	...	...	...	0,2 g
Ca Cl <sub>2</sub>	...	...	...	...	...	0,1 g
Na Cl	...	...	...	...	...	0,1 g
Fe Cl <sub>3</sub>	...	...	...	...	...	0,01 g
H <sub>2</sub> O destilada y desionizada	...	...	...	...	...	1000 ml

*Contenido en fósforo.*—Se analizó de acuerdo con la técnica colorimétrica de FOGG y WILKINSON (2).

### *Enriquecimiento y aislamiento*

De diferentes diluciones de suelo (seriadas a 1/10) se inoculan en el medio P líquido, observándose el desarrollo por la turbidez del medio al cabo de una semana. De las diluciones más altas correspondientes a los tubos que mostraron crecimiento se aísla en el medio P sólido (fig. 1).

### *Microorganismos ensayados*

Como bacterias de laboratorio para investigar su capacidad de desarrollo en el medio P se utilizaron los descritos en la tabla I.

### *Fijación de N<sub>2</sub> atmosférico*

Fue realizado en North Texas State Univ. con la P-1 y P-10 por la técnica de la reducción de la acetanilida por cromatografía de gases.

### *Microscopía electrónica*

Se realizó por LI CHU YAO (en North Texas State Univ.) mediante la observación de cortes incluidos en Epon.

## RESULTADOS

Las cepas aisladas capaces de desarrollarse por resiembra sucesivas en el medio P (mínimo de 5 subcultivos con crecimiento

manifiesto) fueron la P-1, P-9, P-10G, P-11g y P-12g de un total de 30 bacterias recogidas en un primer aislamiento.

La capacidad de desarrollarse en el medio P de otros microorganismos va especificada en la tabla I. Considerándose como de cre-

TABLA I.—Resultado del cultivo de bacterias

Microorganismo	Incipiente	Positivo	Procedencia
<i>Azotobacter chroococcum</i> -1	+	+	Dr. Hernández (Valencia)
<i>Azotobacter chroococcum</i> -2	+	+	" " "
<i>Az. chroococcum</i> -3	+	+	" " "
<i>Az. chroococcum</i> -5	+	+	" " "
<i>Az. beijerincki</i> -6	+	+	" " "
<i>Az. croococcum</i> 7115	+	+	Dr. Darbyshire (Aberdeen) Esco.
<i>Az. choococcum</i> CCM 287	+	+	Dr. Kocur (Brno) Checoslovaquia
<i>Az. vinelandii</i> ATCC 12837	+	+	Dr. Vela (Dentos, Texas). USA
<i>Arthrobacter globiformis</i>	—	—	Dr. Kocur (Brno) Checoslovaquia
<i>Aeromonas punctata</i> CCM	—	—	" " " "
<i>Alcaligenes faecalis</i> CCM 267	—	—	" " " "
<i>Azotomonas insolita</i> CCM 2187	+	+	" " " "
<i>Bacillus megaterium</i> CCM 1462	+	—	" " " "
<i>Bacillus subtilis</i>	+	—	suelo
<i>Cellvibrio</i> sp.	+	—	suelo
<i>Cellulomas flavigena</i> CCM 1926	+	—	Dr. Kocur
<i>Citrobacter</i> 16135	+	—	Dr. Arcalis (Barcelona)
<i>Enterobacter cloaceae</i> 1	—	—	" " "
<i>Agrobacterium</i> sp. p-27	+	—	Dr. Barea (Granada)
<i>Enterobacter liquefaciens</i> 17	+	—	Dr. Arcalis (Barcelona)
<i>Enterobacter aerogenes</i> 14	+	—	" " "
<i>Escherichia coli</i> 654	—	—	" " "
<i>E. coli</i> (enterpathogen) 66	+	—	" " "
<i>E. coli</i> 39149	+	—	" " "
<i>Klebsiella</i> 286	+	—	" " "
<i>Klebsiella</i> sp	+	+	" " "
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—	—	" " "
<i>Providencia</i> 36712	—	—	Dr. Arcalis (Barcelona)
<i>Providencia</i> 17175	+	—	" " "
<i>Proteus vulgaris</i> 50704	—	—	" " "
<i>Salmonella typhi</i>	—	—	" " "
<i>Salmonella paratyphi</i>	—	—	" " "
<i>Salmonella typhimurium</i>	—	—	" " "
<i>Serratia marcescens</i> CCM303	—	—	Dr. Kocur (Brno) Checoslovaquia
<i>Micrococcus luteus</i>	—	—	suelo
<i>Shigella flexneri</i>	—	—	Dr. Arcalis (Barcelona)
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	" " "
P-1	+	+	suelo
P-9	+	+	suelo
P-10E	+	+	suelo
P-10m	+	+	suelo

cimiento ins  
primera, y catalogándose de crecimiento positivo las que fueron capaz  
el medio P.

Por lo que se refiere a la cantidad de fósforo en el medio de cultivo éste resultó ser inferior a 2.2 ppm.

#### COMENTARIOS

Como primer comentario deseamos resaltar la circunstancia de no haber detectado cantidades apreciables de P en el medio de cultivo, lo que conjuntamente con el hecho de haber trabajado con productos para análisis puros lo convierte realmente en un medio deficiente en fósforo. Circunstancia que creemos puede tener interés en posteriores investigaciones.

Algunos de los microorganismos de laboratorio se desarrollaron en los primeros subcultivos, aunque prácticamente ninguno, a excepción del género *Azotobacter*, fueron capaces de desarrollarse después de cinco resiembras. La interpretación de este hecho podría ser debido a la acumulación de fósforo, tal y como ocurre con algunas cepas del suelo, según demostró AZCON (1) utilizando técnicas de isótopos radioactivos; sin embargo la bacteria citada por AZCON solo mantuvo su desarrollo durante tres resiembras; mientras que algunas de las bacterias aisladas s  
ficiente en fósforo más de 50 veces, lo que sugiere características culturales especiales, en este tipo de microbios. Casi todos daban unas colonias lisas y ligeramente mucosas en el primer aislamiento (fig. 1).

La relación de las bacterias aisladas con el género *Azotobacter* se puso de manifiesto  
el *Azotobacter* para desarrollarse en tales condiciones, sino porque se encontró que algunas de las bacterias aisladas también eran capaces de formar estructuras semejantes a los quistes  
tales microorganismos no eran *Azotobacter*, se puso de manifiesto al demostrarse su incapacidad para fijar el nitrógeno atmosférico; por la técnica de reducción de la acetanilida por cromatografía de gases.

Rasgo común de todos estos microorganismos ais  
morfología particular en el medio P, en el que se observan formas enormemente alargadas e irregulares: algunas aparentemente vacías y otras con inclusiones muy manifiestas en contraste de fase (fig. 3).



Fig. 1.—Bacteria  
de cultivo.

#### SUMMARY

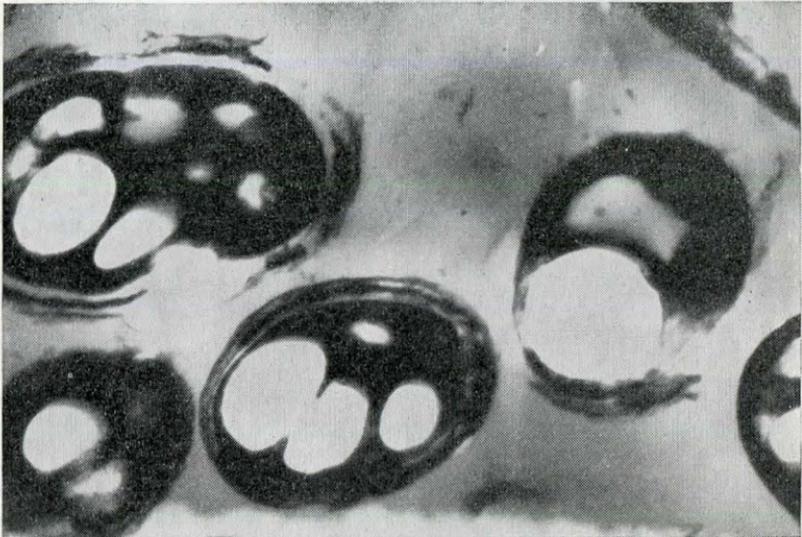


Fig. 2.—Estructuras semejantes a los quistes. Correspondientes  
P-10G (Fotografía al Microscopio electrónico 7.700 aumentos).



Fig. 3.—Formas irregulares,  
7 días de la bacteria P-12.



Fig. 4.—Cultivos de *Az. chroococcum* (7115 y CCM 287) en el medio P a los  
7 días.

Como dato curioso en esta investigación pueden destacarse la modificación de la capacidad para producir pigmentos por el género *Azotobacter*; pues mientras el *Az. vinelandi* no pigmentaba en el medio P, el *Az. chroococcum* originaba una pigmentación negra mucho más oscura que la clásica pigmentación marrón que se produce en el medio de cultivo desprovisto de nitrógeno; como puede apreciarse fácilmente en la fotografía (fig. 4).

### RESUMEN

Se aíslan una serie de microorganismos medio deficiente de fósforo (medio P) observándose conjuntamente con la característica de crecer perfectamente una morfología un tanto particular (formas alargadas, a veces con varias granulaciones en el interior) y originando formas quísticas.

Bacterias de la colección del laboratorio (38 medio mencionado apreciándose que el *Azotobacter* crecía muy bien y observándose en *Az. chroococcum* una pigmentación negra, mucho más oscura que la clásica pigmentación marrón que se produce en medios desprovistos de nitrógeno.

### SUMMARY

Bacteria able to growth by subcultures in phosphorus deficient media (P. medium) have been isolated and conserved. It was observed a peculiar morphology (like empty cells with internal particles) and the ability to form cystes like structures.

Other bacteria (38 identified strains, from culture collection) were also proved in P. medium and it was determined that *Azotobacter* shows positive growth. All the *Az. chroococcum* strains used give a black pigment, darker than the normal brown-black pigment when were cultured in nitrogen free medium.

### RÉSUMÉ

On isole une suite de microorganismes capables un milieu déficient caractéristique de formes allongée, quelque fois avec motivant des formes *kystiques*.

Bacteries de la collection du laboratoire (38 souches), on senièrent dans le milieu mentionné, et on observe en *Az. chroococcum* une pigmentation moire plus en plus obscure que la classique pigmentation brune que on produit dans lesmilieus dépourvus de azote.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) AZCON R.: Efectos de la inoculación de microorganismos movilizadores de fósforo y fijadores de nitrógeno sobre cultivos enarenados de judía y tomate.  
Tesis doctoral. Univ. de Granada (1972).
- (2) FOGG, D. N. and WILKINSON, N. T.: The colorimetric determination of phosphorus. *Analyst.* 83, 406 (1958).
- (3) LOCHHEAD, A. G. and CHASE, F. E.: Qualitative studies of soil microorganisms. V Nutritional requerimientos of the predominant bacterial Flora. *Soil. Sci.*, 55, 185 (1943).

## SUMMARY