

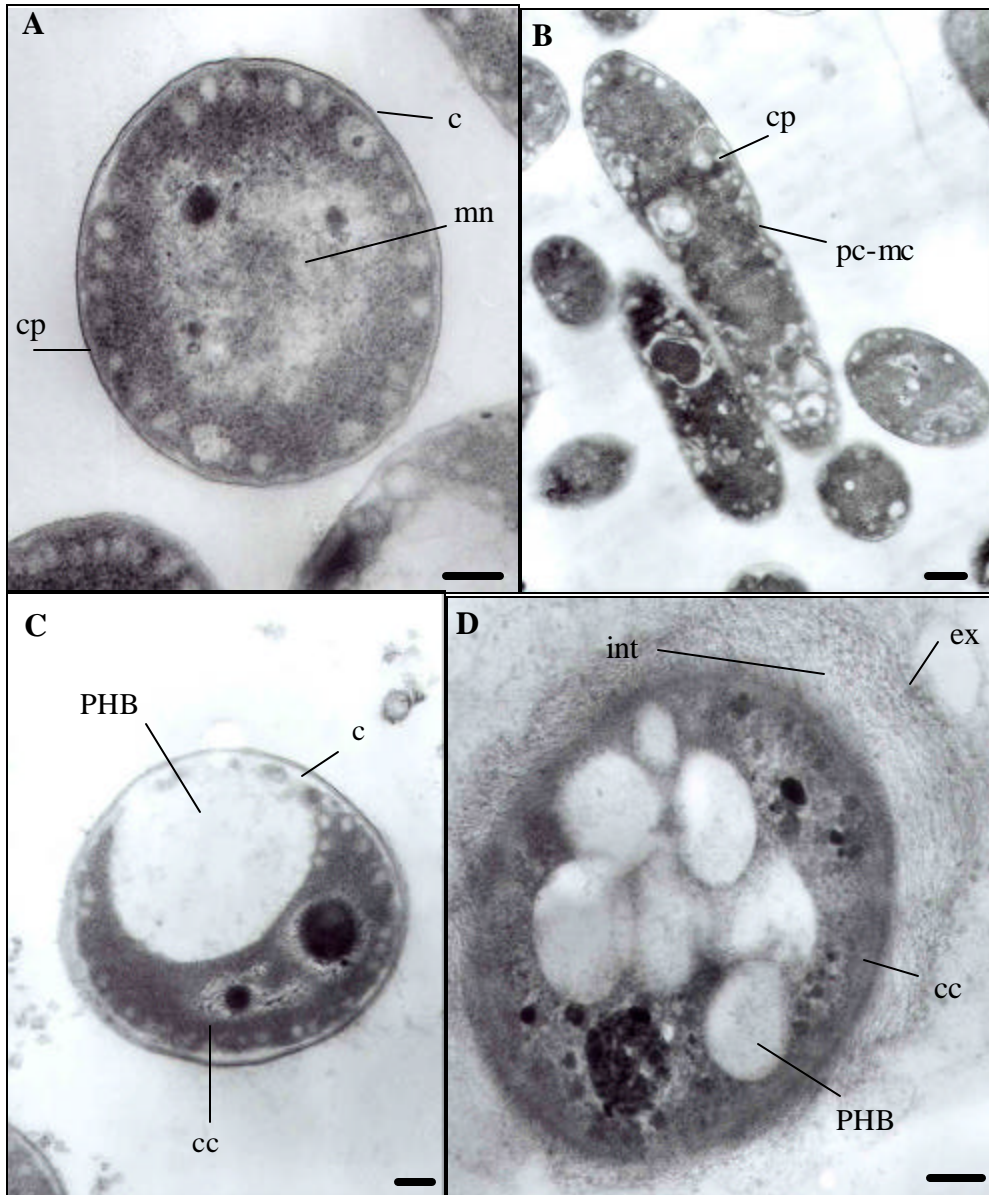
EFECTO DEL QUEROSENO EN EL ENQUISTAMIENTO DE *Azotobacter nigricans*.

Gabriela García-Esquivel (1), Victoria T. Velázquez-Martínez (1), Lourdes Rojas (1), Ronald Ferrera-Cerrato (2), Graciano Calva-Calva (1), Luis Fernández-Linares (3), Refugio Rodríguez-Vázquez (1), Fernando Esparza-García (1). (1) Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN) México, DF. (2) Colegio de Posgraduados, Estado de México, (3) Instituto Mexicano del Petróleo, México, DF.

Algunas especies vegetales tienen la capacidad de desarrollarse en suelos contaminados con hidrocarburos y en su rizósfera se encuentran presentes diversos grupos de bacterias de vida libre degradadoras de hidrocarburos que pertenecen a las bacterias fijadoras de nitrógeno (Pérez, 2000). Algunas leguminosas, como el frijol, que han podido desarrollarse en suelos contaminados con queroseno presentan en su rizósfera bacterias pertenecientes al género *Azotobacter* (García, 2001). Según Sadoff (1975) este género comprende células Gram-negativas, polimórficas que se reproducen por fisión binaria y presentan la capacidad para sintetizar dos polímeros de importancia industrial: alginato y polihidroxibutirato (PHB). Algunas especies como *A. vinelandii* y *A. chroococum* presentan además la capacidad de diferenciarse en células esféricas llamadas quistes. Este estadio se presenta cuando se remueve la glucosa del medio de cultivo y se adiciona butanol o β -hidroxibutirato (Reush y Sadoff, 1979). En nuestro laboratorio, se aisló *Azotobacter nigricans* de la rizósfera del frijol y, mediante observaciones microscópicas, se ha encontrado que cuando a esta bacteria se le cultiva en medio mineral de Rennie (1981) con queroseno (1%) como sustrato se observa la formación de células esféricas en las primeras 24 hrs de incubación. Por tanto se hizo un estudio de microscopía electrónica para conocer la morfología celular en presencia de queroseno y encontrar su relación con la remoción de este contaminante. Se obtuvieron muestras de cultivos de *A. nigricans*, crecidas en tres condiciones diferentes: medio de Rennie conteniendo sacarosa (1%) como cultivo control, medio de Rennie conteniendo butanol, conocido como inductor de enquistamiento (Lin y Sadoff, 1968) y medio de Rennie conteniendo queroseno (1%) para relacionar el posible enquistamiento con su remoción. Estas muestras se centrifugaron a 10 000 rpm por 15 min, para obtener un paquete celular desechando el medio de cultivo y se lavaron con buffer de fosfatos pH 7.4. El paquete celular se colocó en glutaraldehído al 2% por 2 h, lavando nuevamente con el mismo buffer y colocándolo después en tetróxido de osmio 2% por 90 min a 4°C. Después de deshidratarlo con diferentes concentraciones de etanol se expuso a óxido de propileno. El paquete celular se infiltró en resina Spurr a 60°C por tres días. Cortes ultrafinos contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 2000EX. Los resultados indicaron que a las 9 h de incubación (Fig. A) en medio con queroseno ya se observaron células redondas de menor tamaño al compararlas con las células vegetativas crecidas con sacarosa (Fig. B), presentando ésta última la morfología típica de células gram-negativas. En estas células se ve alrededor del citoplasma la presencia de cuerpos periféricos de material membranoso, donde se presume se efectúa la fijación de nitrógeno (Sadoff, 1975). A las 24 h (Fig. C) la presencia de cuerpos periféricos es menor y mayor la presencia de PHB además de observarse un espacio entre la cubierta y el cuerpo celular. A las 192 h se apreció una de las características típicas del enquistamiento que es la formación de una capa externa del quiste (exina) y una interna (intina) así como una notable acumulación de PHB dentro del cuerpo central (Fig. D), lo que indica el estado de madurez del quiste según Lin y Sadoff (1968). En los cultivos que crecieron en presencia de butanol se observaron características muy similares a las ya descritas pero con una mayor inducción de quistes (74.4%) comparándose con el 64.7% que se obtuvo con queroseno. También se observó que los quistes que se pusieron en medio Rennie con sacarosa (1%) germinaron tal cual lo describe Sadoff (1975). De acuerdo a los estadios observados podemos concluir que el queroseno es un inductor del enquistamiento y que la remoción de éste no se efectúa por los quistes.

REFERENCES

- [1] García-Esquivel G. Tesis de Maestría, CINVESTAV. 2001.
- [2] Lin L.P. et. al. J. Bacteriol. (1968) 95(6):2336-2343.
- [3] Pérez-Vargas J. et.al. Water Sci. Technol. (2000) 42(5-6):407-410.
- [4] Rennie R.J. Can. J. Microbiol. (1981) 27:8-14.
- [5] Reush, R.N. et. al. J. Bacteriol. (1979) 139:448-453.
- [6] Sadoff H.L. Bacter. Rev. (1975) 39(4):516-539.



Figuras: Crecimiento de *A. nigricans* en medio de Rennie con queroseno (1%). A. Células con 9 h de incubación. B. Células vegetativas. C. Células a 24 h de incubación. D. Quistes a las 192 h de incubación. cp: cuerpos periféricos; pc-mc: pared celular-membrana celular; c: cápsula; mn: material nuclear; PHB: polihidroxitirato; cc: cuerpo central; int: intina; ex: exina. En las figuras A, C y D la barra mide 200 nm. En la figura B la barra mide 500 nm.