

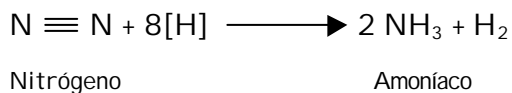
CAPITULO I

*Introducción **G**eneral y **O**jetivos*

1.1. El Nitrógeno

El crecimiento de todos los organismos depende de la disponibilidad de nutrientes minerales y ninguno es más importante que el Nitrógeno, el cual es requerido en grandes cantidades como un componente esencial de proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares. Por lo tanto, acceder a un adecuado suministro de Nitrógeno en alguna de sus formas es un prerrequisito para todas las formas de vida. Para la mayoría de los seres vivos este debe estar "fijado" (combinado) en la forma de amonio (NH_4^+) ó iones nitrato (NO_3^-) para poder ser incorporado. Cuando los organismos mueren gran diversidad de bacterias y hongos degradan la materia orgánica y convierten los compuestos nitrogenados en amonio que puede ser nuevamente empleado por otros organismos o puede ser convertido en nitrito y nitrato por un proceso llamado nitrificación. El nitrato puede ser asimilado ó puede ser transformado por microorganismos a compuestos gaseosos como óxido nítrico, óxido nitroso y Nitrógeno gaseoso (N_2). La actividad de estos últimos resulta en una sustancial pérdida de Nitrógeno a la atmósfera. Por otro lado, las rocas ígneas y sedimentarias, que constituyen un enorme reservorio de este elemento, sufren un desgaste muy lento provocando un efecto negativo en la disponibilidad de Nitrógeno fijado. El aire con un 79% de N_2 , es otro importante reservorio de Nitrógeno en la biosfera, pero éste es un compuesto muy inerte que debe sufrir una etapa de "fijación" para rendir compuestos fácilmente utilizables por los seres vivos. Tres procesos son los responsables de la fijación de N_2 : fijación atmosférica, fijación industrial y **fijación biológica**.

En la fijación atmosférica la energía lumínica rompe la molécula de N_2 y rinde Nitrógeno atómico que se combina con el oxígeno del aire formando óxidos de Nitrógeno. Estos se disuelven en el agua de lluvia dando nitratos que son llevados a la tierra. La fijación atmosférica de N_2 contribuye aproximadamente con el 5-8% del total de Nitrógeno anual fijado. En la fijación industrial, empleando elevadas presiones a una temperatura de 600°C y con el uso de catalizadores, N_2 e hidrógeno gaseoso (H_2) se combinan para formar amoníaco (NH_3). El amoníaco puede ser usado directamente para fertilizar, pero la mayoría es procesado transformándolo en urea ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) y/o nitrato de amonio (NH_4NO_3). Esta forma de fijación contribuye en un 25% del total. El porcentaje restante (aproximadamente un 65%) es debido a la **Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)** que puede ser considerada como "la habilidad que poseen algunas especies de microorganismos (bacterias y Archaea) de convertir el Nitrógeno atmosférico en amonio". Esta reducción del Nitrógeno es debida al complejo enzimático de la nitrogenasa. El sistema de la nitrogenasa transfiere un total de $6[\text{H}]$ al N_2 y libera $2[\text{H}]$ como hidrógeno molecular (H_2). El amoníaco es el primer producto identificable de esta reacción enzimática:



Al igual que las otras formas de fijación de Nitrógeno, la versión biológica del proceso requiere una elevada provisión de energía. En adición a la energía necesaria en forma de equivalentes de reducción, el sistema de la nitrogenasa requiere otra fuente de energía química, la cual es obtenida de la hidrólisis del ATP (se emplean 16 moléculas de ATP por cada molécula de N_2 reducida).

Esta conversión del Nitrógeno en la biosfera en sus diferentes formas constituye el llamado "Ciclo del Nitrógeno", donde los microorganismos juegan un papel muy importante. En ecosistemas balanceados el ciclo abastece al suelo del Nitrógeno necesario, pero cuando es perturbado gran parte del Nitrógeno no retorna al suelo y se torna un nutriente limitante. La persistente y mayor perturbación de un ecosistema natural y balanceado es la práctica de la agricultura.

En el término de 50 años se estima que la población mundial se va a duplicar y se espera que las necesidades de Nitrógeno fijado para la producción de cultivos también sea, al menos, el doble. Si este es suministrado a través de fertilizantes nitrogenados el empleo de los mismos se va a incrementar a razón de 160 millones de toneladas de Nitrógeno por año. Esta cantidad de fertilizante nitrogenado va a requerir la combustión de aproximadamente 270 millones de toneladas de carbón o algún combustible equivalente. Además de éste existen varios efectos perjudiciales sobre el medio ambiente que justifican la búsqueda de alternativas que reemplacen el uso de fertilizantes nitrogenados: estos afectan el balance del ciclo global del Nitrógeno, producen polución del agua, incrementan el riesgo de derrames químicos e incrementan el óxido nítrico atmosférico (N_2O), un potente gas productor del efecto invernadero. Por lo tanto, expandir la explotación de la FBN podría reducir, y a largo plazo reemplazar sustancialmente, la necesidad de producir industrialmente fertilizantes nitrogenados.

1.2. Sistemas biológicos fijadores de Nitrógeno

La FBN no ha sido encontrada en eucariotes, todos los organismos fijadores de N_2 (diazótrofos) son procariotes. Aquellos microorganismos que pueden vivir y fijar N_2 independientemente de otros organismos son llamados de vida libre. Otros viven en íntima simbiosis con plantas o con otros organismos. Así, plantas y animales se benefician tanto directamente, en asociación ó en simbiosis con diazótrofos, ó indirectamente después de la muerte y mineralización de estas bacterias.

Los microorganismos fijadores pueden ser aerobios, anaerobios, Gram(+), Gram(-), heterótrofos, autótrofos y fotótrofos, con una única característica común: la habilidad para fijar N_2 . Todos los sistemas enzimáticos de nitrogenasa aislados de diferentes organismos fijadores de Nitrógeno muestran amplias similitudes. Su más remarcable propiedad es la exquisita sensibilidad al oxígeno molecular (O_2) tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta es la razón por la cual para muchos procariotes la fijación tiene lugar sólo en anaerobiosis ó en condiciones de microaerofilia (por ejemplo, dentro del nódulo de las

leguminosas donde la pO_2 es muy baja por la acción de una leghemoglobina vegetal, ó en el interior del xilema del vegetal como es el caso de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (James *et al.*, 1994)). No obstante algunos procariotes pueden llevar a cabo la fijación en ambientes con elevadas pO_2 debido a la presencia de un mecanismo de protección de la nitrogenasa, como es el caso de *Azotobacter vinelandii* (Hill, 1988). En la *Tabla 1.1*. se muestran algunos ejemplos de sistemas fijadores de N_2 .

Ejemplos de bacterias fijadoras de Nitrógeno			
De vida libre		En simbiosis con plantas	
Aeróbicas	Anaeróbicas	Leguminosas	Otras plantas
<i>Azotobacter</i>	Firmibacterias (géneros	<i>Rhizobium</i> y	<i>Frankia</i>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Clostridium</i> y <i>Bacillus</i>)	<i>Bradyrhizobium</i>	Cianobacterias
<i>Klebsiella</i>	<i>Desulfovibrio</i>		(género <i>Anabaena</i>)
Cianobacterias (género <i>Nostoc</i> *)	<i>Rhodospirillum</i> *		
<i>Azospirillum</i>			

Tabla 1.1. Ejemplos de bacterias fijadoras de Nitrógeno. * denota bacterias fotosintéticas.

Los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, en relación simbiótica con plantas leguminosas infectan las raíces de las mismas y estimulan la producción de *nódulos*, dentro de los cuales las bacterias fijan N_2 y la planta responde suministrando nutrientes orgánicos que produce durante la fotosíntesis. Otra bacteria fijadora de N_2 que establece una relación simbiótica, pero con plantas no leguminosas es la cianobacteria *Anabaena azollae*, que vive en pequeños poros del helecho de agua *Azolla* formando un sistema simbiótico que es usado para enriquecer los "paddies" de arroz con Nitrógeno fijado. Otro ejemplo es el del género *Frankia*, una bacteria que se asemeja a los Estreptomicetes, que forma *nódulos* en árboles, arbustos y plantas herbáceas. La capacidad de fijar N_2 por microorganismos de vida libre está ampliamente distribuida entre las bacterias del suelo y del agua. Todos los grupos fisiológicos tienen algún representante que es capaz de realizar este proceso con mayor o menor eficiencia. Algunos de estos diazótrofos de vida libre son llamados "endófitos". Hace ya más de cuatro décadas Döbereiner y Ruschel (1958) aislaron una bacteria fijadora de N_2 de la rizosfera de la caña de azúcar creciendo en suelos tropicales de Brasil. No obstante, no fue sino hasta después de la publicación de Döbereiner y Day (1975) sobre la bacteria *Azospirillum* que el interés en bacterias diazotróficas asociadas a plantas gramíneas fue manifestado en todo el mundo. Baldani y colaboradores (1997) informaron que, en las últimas dos décadas, otras bacterias fijadoras de N_2 cercanas al género *Azospirillum* fueron aisladas, como son los géneros *Herbaspirillum*, *Acetobacter* y *Azoarcus*. Hace alrededor de 10 años atrás Döbereiner (1992) introdujo el término

bacteria endofítica diazotrófica para designar a todos los diazótrofos capaces de colonizar el interior de las raíces de plantas gramíneas y que inclusive se encuentran dentro de otros tejidos vegetales. Más recientemente, Baldani y colaboradores (1997) sugirieron los términos "endófito asociativo ó facultativo" para microorganismos que son capaces de colonizar la superficie y el interior de la raíz y sobrevivir bien en suelo y, por otro lado, los "endófitos obligados " que no sobreviven bien en suelo pero colonizan el interior de las raíces y las partes aéreas de las plantas. Otros autores, sin embargo, difieren en el empleo de la terminología "endófito obligado" ya que estas bacterias pueden crecer en medios de cultivo sin la presencia de extractos vegetales (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998). La lista de diazótrofos endófitos facultativos y obligados que colonizan plantas no-leguminosas incluye varias bacterias del género *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. irakense*), *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (anteriormente *Acetobacter*), *Azoarcus* sp. y *Burkholderia* sp. Estas bacterias fueron aisladas de caña de azúcar, pastos forrajeros, cereales y otros hospederos y son descritas en detalle en las publicaciones de Döbereiner y colaboradores (1993) y Baldani y colaboradores (1997).

Con excepción de las plantas leguminosas y los árboles actinorrízicos, ninguna otra familia de plantas en asociación con bacterias tiene la capacidad de formar estructuras nodulares donde se lleve a cabo la FBN. No obstante, con el empleo de diversas metodologías, como el balance de Nitrógeno, la dilución de N^{15} , y la abundancia natural de N^{15} , se ha demostrado que existen altos índices de FBN en plantas gramíneas de importancia económica entre las que se incluyen algunas variedades de caña de azúcar (Boddey y Döbereiner, 1995; Boddey *et al.*, 1991; Lima *et al.*, 1987; Urquiaga *et al.*, 1992; Yoneyama *et al.*, 1997), de arroz (Sherestha y Ladha, 1996) y el pasto forrajero Kallar (*Laptochloa fusca*) (Malik *et al.*, 1997). Estos hallazgos han generado un gran interés en la FBN en plantas de familias diferentes a las leguminosas. Aún cuando no se conoce cuál (o cuáles) son los microorganismos responsables de la FBN observada en las plantas gramíneas, son diversos los diazótrofos endófitos que se han aislado de estas plantas (*Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Burkholderia*). Será de gran importancia conocer la(s) función(es) que desempeñan los endófitos, incluyendo los fijadores de N_2 , en el interior de las plantas y determinar los mecanismos por los que estimulan su crecimiento. El descubrimiento de bacterias endófitas con la capacidad de contribuir con buena parte del Nitrógeno que las plantas requieren ha abierto un nuevo capítulo en la investigación de la FBN.

1.3. El Microorganismo

1.3.1. Ubicación taxonómica

Los primeros aislamientos del microorganismo utilizado en este trabajo fueron realizados por Cavalcante y Döbereiner en 1988, a partir de raíces y tallos de diferentes variedades de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) cultivadas en diversas regiones de Brasil. El microorganismo fue descrito como "una nueva bacteria fijadora de Nitrógeno tolerante al ácido" y recibió el nombre de *Saccharobacter nitrocaptans* (Cavalcante y Döbereiner, 1988). Sobre la base de experimentos de hibridación RNA/DNA y DNA/DNA posteriormente se le dio el nombre de *Acetobacter nitrocaptans*. Fue sólo algunos meses después que Gillis y colaboradores (1989), basados en estudios de hibridación de ADN-ARN ribosomal, en la presencia de flagelación peritrica y en la capacidad de oxidar acetato y lactato hasta CO₂ y agua, proponen el nombre oficial de *Acetobacter diazotrophicus*, nombre con el cual aún hoy se sigue reconociendo a esta especie, y definen la cepa tipo LMG 7603 (Döbereiner PAL 5^T = ATCC 49037). No obstante, Yamada y colaboradores (1998) propusieron un nuevo esquema en la taxonomía de la familia *Acetobacteraceae*, y actualmente el primer fijador de Nitrógeno descrito en esta familia es referido oficialmente como *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Tradicionalmente la familia *Acetobacteraceae* se ha dividido en los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* (De Ley *et al.*, 1984a; Swings, 1992). Sin embargo, la clasificación de las bacterias acéticas ha sido materia de controversia durante largo tiempo (Bulygina *et al.*, 1992; Sievers *et al.*, 1994; Swings, 1992; Urakami *et al.*, 1989). Yamada y colaboradores (1997) propusieron la división de la familia *Acetobacteraceae* en los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter* y *Acidomonas*, sobre base del análisis de secuencias parciales del gen 16S ARN-ribosomal y del tipo de ubiquinona predominante. De esta forma, en el género *Acetobacter* fueron incluidas las especies que tienen el tipo de ubiquinona Q₉, entre las que se encuentran *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*, en tanto que las otras especies de *Acetobacter* equipadas con ubiquinona Q₁₀, incluida *A. diazotrophicus*, fueron transferidas al género *Gluconoacetobacter*, con la especie tipo *Gluconoacetobacter liquefaciens*. En este género también fueron incluidas las especies *G. xylinus*, *G. hansenii*, y *G. europaeus*, mientras que la especie *A. metanolicus* se incorporaría al género ya existente *Acidomonas*. El nombre de *Gluconoacetobacter* fue corregido a *Gluconacetobacter* (Yamada *et al.*, 1998), con base en la regla 61 del código internacional de nomenclatura bacteriana. Otras cuatro posibles nuevas especies de *Acetobacter* se aislaron de vinagre u otras fermentaciones ácidas y se identificaron con los nombres *A. Polyoxogenes* (Entani *et al.*, 1985), *A. intermedius* (Boesch *et al.*, 1998), *A. oboediens* y *A. pomorum* (Sokollek *et al.*, 1998). No obstante, *Acetobacter oboediens* y *Acetobacter intermedius* han sido reasignadas al género *Gluconacetobacter* (Franke *et al.*, 1999; Yamada, 2000), junto con otra nueva especie de bacteria acética, *Gluconacetobacter sacchari* (Franke *et al.*, 1999).

Han sido descritas dos nuevas especies de *Gluconacetobacter*, *G. johannae* (en honor a Johanna Döbereiner) y *G. azotocaptans* (Fuentes-Ramírez *et al.*, 2001). La familia *Acetobacteraceae* pertenece a la subclase α -Proteobacteria (Young *et al.*, 1992). Son bacterias aeróbicas, Gram(-), ó Gram variables que se caracterizan fenotípicamente por su capacidad de oxidar etanol a ácido acético en medios de cultivo con pH neutro ó ácido (De Ley *et al.*, 1984a; Swings, 1992). Genotípicamente la familia *Acetobacteraceae* puede ser distinguida de otras α -Proteobacteria por la presencia de dos sitios de restricción *SphI* y *NcoI* internos en la secuencia del gen 16S ADN-ribosomal, excepto en *Gluconobacter oxydans* en el que falta uno de los sitios *NcoI*, correspondiente al nucleótido 110 de *G. diazotrophicus* (Caballero-Mellado *et al.*, 1999; Jiménez-Salgado *et al.*, 1997). Los géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Acidomonas*, a diferencia de *Gluconobacter*, son capaces de oxidar completamente el etanol y el lactato a CO₂ y H₂O (Swings, 1992). Aún cuando el género *Gluconacetobacter* comparte con otros miembros de la familia *Acetobacteraceae* la capacidad de oxidar el etanol, este es el único género de la familia (reconocido actualmente) que presenta especies con la capacidad de fijar Nitrógeno atmosférico (Swings, 1992; Fuentes-Ramírez *et al.*, 2001; Gillis *et al.*, 1989). Recientemente, Yamada y colaboradores (2000) introdujeron un quinto género en la familia *Acetobacteraceae*, el nuevo género *Asaia* con la especie *Asaia bogorensis*.

I.3.2. Hábitat y aislamiento a partir de huéspedes naturales

Se conoce que la caña de azúcar alberga una gran diversidad de especies endófitas fijadoras de Nitrógeno, habiendo sido descrita en 1988 la especie *Saccharobacter nitrocaptans* (Cavalcante y Döbereiner), conocida actualmente como *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Posteriormente, la asociación de *G. diazotrophicus* con caña de azúcar fue confirmada al lograrse su aislamiento de variedades cultivadas comercialmente en Australia (Li y MacRae, 1991), en México (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993), y en Canadá a partir de plantas de caña cultivadas en invernadero procedentes de Cuba (Dong *et al.*, 1995), pero no de la rizosfera de las plantas analizadas. Además de la caña de azúcar, *G. diazotrophicus* se encuentra asociado a otras plantas que se propagan vegetativamente y con alto contenido de sacarosa. Se ha aislado de la hierba camerunesa (*Pennisetum purpureum*) (Döbereiner *et al.*, 1993), de la batata (*Ipomoea batatas*) (Paula *et al.*, 1991, 1992), del sorgo (*Sorghum vulgare*) (Paula *et al.*, 1991) y se ha reportado recientemente la presencia de esta bacteria en los tejidos de la planta de piña (*Annanas* sp.) (Tapia-Hernández *et al.*, 2000). La ausencia de *G. diazotrophicus* tanto en la rizosfera de la caña (Cavalcante y Döbereiner, 1988) como en la de otras plantas (Li y MacRae, 1991), así como su ausencia en el interior de plantas diferentes a la caña que fueron colectadas entre los surcos de este cultivo (Reis *et al.*, 1994), apoyaron la idea sobre el carácter endófito obligado de esta bacteria y su asociación específica con plantas que acumulan sacarosa y que se propagan en forma vegetativa (Döbereiner *et al.*, 1993). No obstante, *G. diazotrophicus* ha sido detectado ocasionalmente

en la rizosfera de la caña de azúcar (Li y MacRae, 1991) y también se ha descrito la presencia natural de *G. diazotrophicus* en la rizosfera y en los tejidos de plantas de café (*Coffea arabica* L.) (Jiménez-Salgado *et al.*, 1997) y del cereal *Eleusine coracana* (Loganathan *et al.*, 1999), las cuales aparentemente no son ricas en sacarosa y su propagación es por semillas, así como en *Saccharococcus sacchari*, insecto plaga de la caña de azúcar (Ashbolt y Inkerman, 1990; Caballero-Mellado *et al.*, 1995).

I.3.3. Infección y colonización de la planta hospedante

Aún cuando *G. diazotrophicus* sobrevive pobremente cuando se lo inocula artificialmente en suelo (Baldani *et al.*, 1997; James *et al.*, 1998) se ha logrado su aislamiento de la rizosfera del cafeto en frecuencias hasta del 40% cuando el pH del suelo es ácido (Jiménez-Salgado *et al.*, 1997). Se ha sugerido que tal colonización se debe a la abundancia de materia orgánica presente en este ambiente, la cual contribuye con fuentes de Carbono asimilables por *G. diazotrophicus* y, además, lo protege de las condiciones fisicoquímicas adversas del suelo. Esto contrasta fuertemente con la pobreza de materia orgánica observada en los suelos cultivados con caña de azúcar debido a la quema que se lleva a cabo en este cultivo previo al corte. En condiciones de campo, la ocurrencia de la infección directa de la planta a través de su raíz es un acontecimiento poco probable, debido a la escasa supervivencia de *G. diazotrophicus* en el suelo libre (Baldani *et al.*, 1997; Reinhold-Hurek y Hurek, 1998) y a que la propagación vegetativa del propio hospedante constituye la principal vía de diseminación de la bacteria (James y Olivares, 1997). Otras posibles formas de infección natural señaladas para *G. diazotrophicus* son a través de las hifas de los hongos de los géneros *Glomus* y *Gigaspora* (Paula *et al.*, 1991,1992; Bellone y Bellone, 1994) y del insecto *Saccharococcus sacchari*, quien actúa como agente transmisor de la bacteria en la caña de azúcar (Caballero-Mellado *et al.*, 1995; Döbereiner *et al.*, 1995). A pesar de que *G. diazotrophicus* no se ha logrado aislar de especies de plantas asociadas con la caña de azúcar ó de especies de pastos, ni de plantas de arroz, maíz y sorgo cultivadas en el campo (Boddey *et al.*, 1991; Reis, *et al.*, 1994; Li y MacRae, 1991), se ha observado que esta bacteria tiene la capacidad de colonizar tanto la región de la epidermis, así como el cortex y el interior de los vasos del xilema de raíces de maíz cuando es inoculada artificialmente (Caballero-Mellado *et al.*, 1998). Los estudios de colonización y localización de un microorganismo endófito asociado con su hospedante contribuyen a confirmar la naturaleza endófito del microorganismo, así como a ubicar el sitio probable donde expresa algunas de sus funciones biológicas que pudieran contribuir con el desarrollo de la planta. Los estudios de colonización de los tejidos internos de las plantas por *G. diazotrophicus* se han llevado a cabo mayoritariamente con caña de azúcar. James y colaboradores (1994) lograron la infección *in vitro* de plántulas de caña de azúcar que se cultivaron en condiciones asépticas y observaron que *G. diazotrophicus* es capaz de colonizar la superficie de raíces de caña de azúcar y de penetrar a través de los sitios de emergencia

de las de las raíces laterales, donde han sido detectadas entre las células de la capa externa de la raíz lateral y el cortex de la raíz principal, así como a través de la región meristemática de las raíces. También se ha descrito que la entrada de *G. diazotrophicus* a la planta de caña de azúcar involucra estructuras similares a los hilos de infección formados por *Rhizobium* (Bellone *et al.*, 1997), sin embargo, estas observaciones no han sido confirmadas en ningún otro estudio posterior.

Los sitios que coloniza *G. diazotrophicus* y su distribución en el interior de la planta de caña de azúcar han sido motivo de controversia entre los diferentes grupos que han investigado esta asociación. Con el uso de diferentes estrategias fue demostrado que *G. diazotrophicus* coloniza los espacios intercelulares de células de la epidermis de la raíz y los vasos del xilema de plántulas de caña de azúcar de 15-30 días de edad, obtenidas por micropropagación (James *et al.*, 1994) ó por propagación vegetativa del tallo (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1999). En contraste, los estudios de Dong y colaboradores (1994) señalan que *G. diazotrophicus* se localiza en los espacios intercelulares del tallo correspondientes al apoplasto de plantas adultas de caña de azúcar, obtenidas a través de la propagación vegetativa de tallos, lugar donde la bacteria encuentra una atmósfera con una baja pO_2 y condiciones que le son fisiológicamente favorables para alcanzar las mayores densidades de población (Dong *et al.*, 1994; Reinhold-Hurek y Hurek, 1998). No ha sido observada ninguna reacción de tipo patogénico en plantas de caña de azúcar inoculadas con *G. diazotrophicus* (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1999; James *et al.*, 1994; Reis *et al.*, 1999). La dispersión de este organismo en el interior de la planta también ha sido motivo de controversia. En tanto que en algunos estudios se sugiere que *G. diazotrophicus* se dispersa en los tejidos internos de la planta a través de los vasos del xilema (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1999; James *et al.*, 1994; Reis *et al.*, 1999), en otros se objeta que estos vasos sean la vía de dispersión, argumentándose la existencia de barreras morfológicas que impiden la comunicación entre vasos del xilema de un internodo a otro (Dong *et al.*, 1997). Una amplia argumentación a las diferencias de resultados sobre la localización de *G. diazotrophicus* en el interior de plantas de caña de azúcar se encuentran en los trabajos de Fuentes y colaboradores (1999) y James y Olivares (1997). Otra bacteria endofítica de la caña de azúcar que coloniza la planta a través de los vasos del xilema es *Herbaspirillum rubrialbicans*, pero a diferencia de *G. diazotrophicus*, es patogénica y provoca la activación del sistema de defensa de la planta (James y Olivares, 1997; Olivares *et al.*, 1997).

I.3.4. Características Fisiológicas

Gillis y colaboradores (1989) describieron la especie *G. diazotrophicus* como bacterias Gram(-), aeróbicas, en forma de cilindros rectos de extremos redondeados, tamaño 0,7-0,9 μm y móviles con flagelación lateral ó peritrica. Su crecimiento es óptimo a 30 °C, pH 5,50 y un 10,0 % p/v de sacarosa (que corresponde a la concentración de sacarosa a la que este microorganismo esta expuesto en su principal hábitat natural, la caña de azúcar), pero

tolera hasta un 30,0 % p/v de este azúcar (Cavalcante y Döbereiner, 1988; Li y Macrae; 1991). Reduce N_2 en condiciones microaeróbicas, lo que le permite crecer en medios carentes de aminoácidos ó sales de amonio. Es capaz de crecer y fijar N_2 a valores de pH entre 2,5 y 7,0 (Stephan *et al.*, 1991). Algunas condiciones del entorno en las que se desarrollan los diazótrofes pueden afectar la capacidad de fijar N_2 , como por ejemplo la presencia de O_2 y sales de amonio. Para *G. diazotrophicus*, la concentración de O_2 a la cual ocurre la inhibición de la nitrogenasa se incrementa de 2 KPa en 1,0 % p/v de glucosa, a 4 KPa (0,4 atm) en 10,0 % p/v de sacarosa (Reis y Döbereiner, 1998). La actividad nitrogenasa es sólo inhibida parcialmente por la adición de $(NH_4)_2SO_4$ 2,65 g.l⁻¹ y varios aminoácidos muestran un efecto similar en presencia de 5,0 g.l⁻¹ de glucosa (Stephan *et al.*, 1991). Con niveles de 0,26; 0,66 y 1,32 g.l⁻¹ de $(NH_4)_2SO_4$, en presencia de 1,0 % p/v de sacarosa, la actividad nitrogenasa es inhibida parcialmente pero las células mantienen su actividad si la concentración de sacarosa es de un 10,0 % p/v (Reis y Döbereiner, 1998). En el caso del Nitrógeno combinado, la protección podría ser explicada por la baja asimilación de amonio que manifiestan las células de *G. diazotrophicus* cuando crecen con 10,0 % p/v de sacarosa. Este mecanismo resulta de gran interés considerando el hábitat de *G. diazotrophicus*, normalmente rico en sacarosa, por lo que su nitrogenasa podría estar activa aún cuando la bacteria se encuentre en un ambiente rico en amonio (Reis y Döbereiner, 1998). No consume nitratos (NO_3^-) debido a la ausencia de una nitrato reductasa. La fijación de Nitrógeno no es afectada en presencia de 10,0 mM de NO_3^- (Stephan *et al.*, 1991; Li y MacRae, 1991). No obstante, a través de la cuantificación de la concentración bacteriana se ha mostrado que en plantas de caña de azúcar fertilizadas con elevados niveles de Nitrógeno fijado hay una severa reducción del número de bacterias comparado con el número encontrado dentro de plantas fertilizadas con bajos niveles de Nitrógeno (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1999).

G. diazotrophicus es catalasa(+) y oxidasa(-). Crece en el medio LGI (Cavalcante y Döbereiner, 1988) (con azul de bromotimol) dando colonias naranja oscuro; en medios con CO_3Ca crece formando un halo de solubilización. Produce un pigmento marrón oscuro soluble en agua en el medio GYC (Stephan *et al.*, 1991). Forma una película amarilla en el medio semisólido LGI, aspecto que diferencia a esta especie de otras bacterias diazotróficas (Alvarez y Martínez-Drets, 1995). La especie *G. diazotrophicus* puede ser diferenciada de las otras especies fijadoras de Nitrógeno del género por la formación de colonias de color café oscuro (chocolate) con bordes claros, en un medio de cultivo a base de extracto de papa adicionado con 5,0; 10,0 ó 15,0 % p/v de sacarosa, después de 5 a 7 días de incubación (Fuentes-Ramírez *et al.*, 2001). Las especies *G. johannae* y *G. azotocaptans* permanecen de color "beige" ó crema aún después de 10 días de incubación.

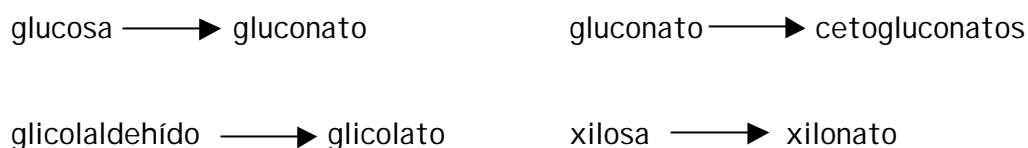
Crece bien en medios de cultivo sintéticos que contengan sacarosa, glucosa, fructosa, gluconato, lactato, piruvato, acetato, manitol, sorbitol ó glicerol como única fuente de Carbono (Gillis *et al.*, 1989; Stephan *et al.*, 1991; Ureta *et al.*, 1995). No obstante, no se observa crecimiento en sales de ácidos dicarboxílicos (succinato, fumarato, malato) como

únicas fuentes de Carbono en concentraciones de 10,0; 20,0 ó 30,0 mM (Alvarez y Martínez-Drets, 1995; Stephan *et al.*, 1991). Se ha reportado que la incapacidad de crecer en ácidos dicarboxílicos se debe a la ausencia de un sistema de transporte y no a una pérdida de las enzimas que los catabolizan, ya que Alvarez y Martínez-Drets (1995) han encontrado la presencia de las mismas en extractos celulares de cultivos de *G. diazotrophicus*. No crece en disacáridos como lactosa, melobiosa, celobiosa y maltosa (Ureta *et al.*, 1995). La sacarosa constituye la fundamental fuente de Carbono que la bacteria tiene disponible en su principal hábitat natural, el apoplasma de la caña de azúcar (Dong *et al.*, 1994, 1995). Dada la carencia de un sistema de transporte de este azúcar hacia el interior de la célula (Alvarez y Martínez-Drets, 1995), promueve su crecimiento a través de la acción de enzimas extracelulares que la hidrolizan. *G. diazotrophicus* es capaz de producir y secretar una proteína con actividad de levanasacarasa (sacarosa 6-fructosiltransferasa, EC. 2.4.1.10), la cual se expresa en forma constitutiva (Hernández *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 2000). Esta enzima hidroliza la sacarosa y transfiere el residuo fructosilo a otra sacarosa para formar fructanos intermediarios que luego se polimerizan y rinden levanos de alto peso molecular (Cote y Ahlgran, 1993). En el caso particular de la glucosa, Alvarez y Martínez-Drets (1995) encontraron, en estudios con glucosa marcada radiactivamente, que la marca era eliminada del medio de cultivo rápidamente, indicando que existe algún sistema de transporte de glucosa hacia el interior de la bacteria. No obstante, la conversión de glucosa a su correspondiente ácido aldónico, sin la entrada previa de la misma dentro de la célula, parece ser la vía más relevante en el metabolismo de este azúcar (Alvarez y Martínez-Drets, 1995; Attwood *et al.*, 1991).

I.3.5. Metabolismo del Carbono

Como todos los seres vivos, los microorganismos requieren energía para sobrevivir, la cual es necesaria para dos propósitos primordiales: el *mantenimiento*, para conservar a las células viables e intactas, y la *biosíntesis*, para permitir el crecimiento celular. Junto con la fuente de energía, una fuente de Carbono es imprescindible para proceder con el crecimiento. En organismos quimioheterótrofos, tanto la energía como el Carbono son derivados del catabolismo de compuestos orgánicos. La mayoría de los microorganismos oxidan los nutrientes orgánicos a CO₂ y H₂O vía su metabolismo respiratorio. Ya que el Carbono en el CO₂ está en su forma más oxidada, este tipo de metabolismo es referido como una "completa oxidación". En contraste a las fermentaciones clásicas que ocurren bajo condiciones anaeróbicas, aquellas que pueden proceder en presencia de oxígeno son conocidas como "fermentaciones oxidativas" u "oxidaciones incompletas". Los productos finales de estos procesos incluyen: ácido acético, ácido glucónico, cetoácidos, ácido cítrico, ácido láctico, etc. Las bacterias acéticas tienen la capacidad de formar ácidos por incompleta oxidación de azúcares o alcoholes y excretar los mismos, transitoriamente o

como productos finales no utilizables. Aldehídos, aldosas y cetosas son oxidados a sus respectivos ácidos, por ejemplo:



En el caso particular de la glucosa, y en general para bacterias Gram(-), el primer paso en el metabolismo puede ser la *oxidación directa a ácido glucónico* (Lessie y Phibbs, 1984). Alternativamente, la glucosa puede ser fosforilada previa a su oxidación. La glucosa 6-fosfato formada en esta última reacción puede ser posteriormente metabolizada a través de tres diferentes rutas metabólicas: la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas ó glicólisis, la ruta de los fosfatos de pentosas y la ruta de Entner-Doudoroff. El ácido glucónico formado por la directa oxidación de la glucosa puede ser fosforilado y subsecuentemente metabolizado vía la ruta de los fosfatos de pentosas ó la ruta de Entner-Doudoroff. En algunos casos, el ácido glucónico puede ser oxidado periplasmáticamente a 2-cetogluconato vía una gluconato deshidrogenasa FAD-dependiente (EC. 1.1.99.3) y luego transformarse en el interior de la célula (por la acción de 1 ó más enzimas) en 6-fosfogluconato e incorporarse en algunas de las rutas citadas anteriormente.

Estudios pioneros acerca del metabolismo de la glucosa en *bacterias acido-acéticas* indican que este azúcar se metaboliza principalmente por la *vía de los fosfatos de pentosa* (De Ley, 1961; Rainbow, 1966). Análisis de medidas de actividades de las enzimas claves de las rutas metabólicas, sugieren que el metabolismo de la glucosa en *G. diazotrophicus*, en concordancia con los miembros de su familia, procede exclusivamente vía la ruta de los *fosfatos de pentosas*: las enzimas claves de las rutas de Embden-Meyerhof-Parnas (6-fosfofructoquinasa y 1-fosfofructoquinasa) y Entner-Doudoroff (6-fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto-3-deoxifosfogluconato aldolasa) no han sido detectadas (Alvarez y Martínez-Drets, 1995; Attwood *et al.*, 1991). La posterior oxidación de la fuente de Carbono procede a través de una completa oxidación en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Alvarez y Martínez-Drets, 1995). Por otro lado, aunque tanto la ruta fosforilativa como la de oxidación de la glucosa a través de una glucosa deshidrogenasa NAD-dependiente soluble (EC. 1.1.1.47) (sGDH) parecen ser operativas (Alvarez y Martínez-Drets, 1995; Attwood *et al.*, 1991), se ha reportado que la oxidación periplasmática de la glucosa en *G. diazotrophicus* juega un rol muy importante en el primer paso del metabolismo de la glucosa (Stephan *et al.*, 1991; Attwood *et al.*, 1991). Se ha encontrado que una glucosa deshidrogenasa pirrolo-quinolina quinona (PQQ) dependiente (EC 1.1.99.17), perteneciente al grupo de las quinoproteínas (Duine, 1991), es la responsable de la conversión periplasmática de glucosa a gluconato en este microorganismo (Attwood *et al.*, 1991; Galar y Boiardi, 1995). Las glucosas deshidrogenasas de este tipo han sido aisladas de

microorganismos Gram(-) tales como *Acinetobacter calcoaceticus* (Duine *et al.*, 1979; Geiger y Gorisch, 1986; Dokter *et al.*, 1986), *Escherichia coli* (Ameyama *et al.*, 1986), *Gluconobacter oxydans* (Ameyama *et al.*, 1981) y *Pseudomonas fluorescens* (Matsushita y Ameyama, 1982). Esta glucosa deshidrogenasa (mGDH o GDH) junto con una gluconato deshidrogenasa de membrana (GaDH) constituyen la *ruta de oxidación directa de la glucosa* en *G. diazotrophicus* (Figura I.1).

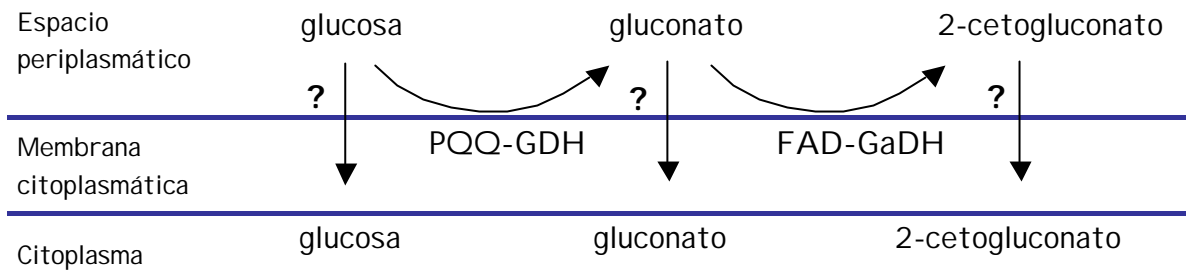


Figura I.1. Ruta de oxidación directa de la glucosa en *G. diazotrophicus*.

1.4. Quinoproteínas

Hasta hace relativamente poco tiempo solo dos clases de deshidrogenasas habían sido descritas, la $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ y la FAD^+/FMN dependientes. No obstante, se encontró que bacterias metilotróficas, las cuales usan metanol ó metano como única fuente de Carbono y energía, contenían una metanol deshidrogenasa que no era ni nicotinamida ni flavin dependiente. Duine y colaboradores (1980) determinaron la estructura de la coenzima aislada de esa enzima, y Salisbury y colaboradores (1979) aislaron un derivado y propusieron una estructura para la coenzima. Basados en su nombre químico 2,7,9-tricarboxi-1H-pirrólo (2,3,f) quinolina-4,5-diona, el nombre sistemático pirrólo-quinolina quinona (PQQ) fue propuesto (Duine *et al.*, 1980), en lugar del nombre trivial methoxantina el cual había sido sugerido en un principio (Salisbury *et al.*, 1979).

Después de la metanol deshidrogenasa, también se reportó que algunas otras deshidrogenasas poseían este cofactor. Ya en 1964 Hauge claramente mostró que la glucosa deshidrogenasa de *Bacterium anitratum* (*Acinetobacter calcoaceticus*) contenía un cofactor desconocido, que posteriormente se identificó como PQQ (Duine *et al.*, 1979). Esto demostró la existencia de una tercer clase de deshidrogenasas, las deshidrogenasas PQQ-dependientes, pertenecientes a un grupo de proteínas que a partir de allí se comenzaron a denominar Quinoproteínas (cuyo cofactor es PQQ, TPO (topaquinona) o TTO (triptofil triptofanquinona)) (Duine, 1991). Estas quinoproteínas dependientes de PQQ están presentes sólo en organismos procariotas Gram(-) (Duine *et al.*, 1999), a pesar de que previamente varias enzimas, inclusive de organismos eucariotas, habían sido clasificadas dentro de este grupo. Por otra parte, todas las quinoproteínas deshidrogenasas de bacterias Gram(-), incluida la GDH, parecen estar localizadas en la membrana

citoplasmática ejerciendo su actividad en el espacio periplasmático (Duine *et al.*, 1986), exceptuando la sGDH PQQ-dependiente de *Acinetobacter calcoaceticus* (Duine *et al.*, 1982).

I.4.1. Glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ

Desde el descubrimiento de la glucosa deshidrogenasa PQQ-dependiente en *Acinetobacter calcoaceticus* (Duine *et al.*, 1979), esta quinoproteína ha sido detectada en muchas otras bacterias (*Pseudomonas* sp. (Matsushita y Ameyama, 1982; Duine *et al.*, 1983; van Schie *et al.*, 1984), *Gluconobacter* sp. (Duine *et al.*, 1979; Ameyama *et al.*, 1981), *Klebsiella* sp. (Neijssel *et al.*, 1983); *Rhizobium* sp. (Boiardi *et al.*, 1996)). En estos organismos la GDH es una enzima ligada a la membrana, con cara hacia el periplasma, que cataliza espontáneamente la oxidación de D-glucosa a D-glucono-1,4-lactona (Figura I.2), la cual usualmente hidroliza a ácido glucónico. En algunos casos esta reacción es también catalizada por una lactonasa (Jermyn, 1960; Hucho y Wallenfels, 1972).

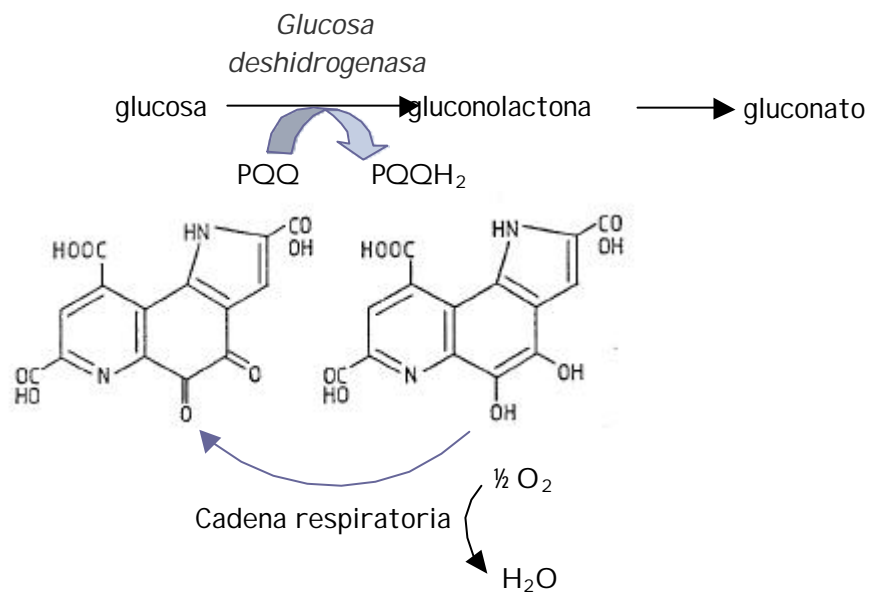


Figura I.2. Estructura y función del PQQ como grupo prostético de la glucosa deshidrogenasa.

La glucosa deshidrogenasa posee una baja afinidad por la glucosa (K_m aparente del orden de mM) y una amplia especificidad por el sustrato, convirtiendo aldohexosas y aldopentosas en sus correspondientes aldonolactonas (Ameyama *et al.*, 1986; Dokter *et al.*, 1987). Una variedad de compuestos que no son naturales tales como metasulfato de fenazina (MPS) (Olsthoorn y Duine, 1996), 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP) (Hauge, 1960), Wurster's Blue (WB) (Dokter *et al.*, 1986) y polimeros electroconductores (Ye *et al.*, 1993) actúan como aceptores de electrones de esta enzima.

Se encontró que *G. diazotrophicus* sintetiza la holoenzima activa y que, al igual que la GDH de *Acinetobacter calcoaceticus* y *Gluconobacter oxydans*, parece ser una quinoproteína del tipo II (alto punto isoeléctrico y no pierde actividad cuando se dialisa frente a buffers que contienen EDTA) (Galar y Boiardi, 1995). Entre los microorganismos fijadores de Nitrógeno, *Klebsiella pneumoniae* posee la holoenzima (Hommes *et al.*, 1985), mientras que algunas especies de *Rhizobium* y *Azotobacter* sp. poseen sólo la apoenzima (van Schie *et al.*, 1987a). En *Acinetobacter calcoaceticus* y *Pseudomonas aeruginosa* la síntesis de la apoenzima y el cofactor (PQQ) son no coordinadas (van Schie *et al.*, 1984). Bajo algunas condiciones sólo la apoenzima es sintetizada. En *P. aeruginosa* este fenotipo se expresa bajo condiciones anaeróbicas. Presumiblemente el déficit de O₂ es responsable de esta falta de síntesis de PQQ (Neijssel *et al.*, 1989). Fue encontrado que varias especies de microorganismos, tales como *Escherichia coli* (Hommes *et al.* 1984) y *Acinetobacter lwoffii* (van Schie *et al.*, 1987a) no pueden sintetizar PQQ y sólo poseen la capacidad de sintetizar la apo-enzima de la glucosa deshidrogenasa. La reconstitución de la holo-enzima *in vivo* fue posible por adición de pequeñas cantidades de PQQ al medio de cultivo. *E. Coli* no es capaz de sintetizar PQQ, debido a la ausencia de uno o más genes que codifican su síntesis (Goossens *et al.*, 1989; Meulenber *et al.*, 1990).

El significado fisiológico de la oxidación de azúcares vía la GDH PQQ-dependiente ha sido estudiado en diversos microorganismos. Se ha sugerido que la incompleta oxidación de la glucosa le confiere al microorganismo la capacidad de secuestrar el azúcar como gluconato, un compuesto que no es tan rápidamente utilizado por otros organismos que compiten por los nutrientes del medio ambiente en el que se encuentran (Dawes, 1981). No obstante, la función principal que se le ha asignado está relacionada con el metabolismo energético. Las glucosas deshidrogenasas PQQ-dependientes están acopladas a la cadena respiratoria (Beardmore-Gray y Anthony, 1986; Matsushita *et al.*, 1987, Anthony, 1998) e involucradas en los procesos de generación de energía (de Bont *et al.*, 1984; van Schie *et al.*, 1985). En el caso de bacterias entéricas, *A. calcoaceticus* y bacterias acéticas el aceptor de electrones de la GDH es una ubiquinona (Goodwin y Anthony, 1998; Anthony, 1993; Cozier y Anthony, 1995). Ha sido propuesto que la función principal de la enzima es proveer energía extra a la energía suministrada por las rutas usuales, y que esta enzima es sintetizada en elevadas concentraciones bajo circunstancias donde las demandas energéticas para las funciones de crecimiento y/o mantenimiento son altas (Hommes *et al.*, 1985). Mediante el empleo de vesículas de membrana de *A. calcoaceticus* y *P. aeruginosa*, van Schie y colaboradores (1985, 1987a) concluyeron que la oxidación de glucosa ó xilosa por la GDH PQQ-dependiente conduce el transporte de solutos a través de la membrana vía la fuerza protón-motriz, y sugieren en base a diferentes espectros de absorción de dichas vesículas, después de la reducción con glucosa, que el citocromo b sirve como el aceptor de electrones del PQQ reducido (van Schie *et al.*, 1987a). Hardy (1995), también ha demostrado que en *Pseudomonas putida*, la oxidación de aldosas a través de una GDH PQQ-dependiente contribuye *in vivo* a una generación de energía biológicamente utilizable.

1.5. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito

La diversidad y número de bacterias rizosféricas es muy grande, lo cual ocasiona que en ese ambiente (la rizosfera) exista una fuerte competencia por los nutrientes y, en consecuencia, que su disponibilidad sea limitada. Sobre esta base se ha considerado que las bacterias endófitas podrían tener algunas ventajas competitivas sobre las bacterias rizosféricas, ya que la disponibilidad de nutrientes es mayor en el interior de las plantas y el número de microorganismos endófitos es menor que el de los rizosféricos (James, 2000). Por otro lado, las bacterias endófitas se encuentran mejor protegidas que las rizosféricas de las condiciones adversas que se presentan en el medio ambiente (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998). Considerando que las bacterias endófitas se ubican en contacto íntimo con las plantas, ellas podrían brindar beneficios más directos a su hospedante en comparación con las bacterias rizosféricas. Por ejemplo, podrían excretar fitohormonas en el interior de las plantas y/o protegerlas contra la acción de los fitopatógenos. Se ha demostrado que algunas fitohormonas, tal como el ácido indol acético, producidas por los microorganismos rizosféricos pueden provocar un aumento de la superficie de la raíz, permitiendo a la planta una mayor absorción de nutrientes (Okon *et al.*, 1994). La protección podría ser a través de efectos antagonísticos, debido a la producción de sustancias que inhiben el crecimiento de los patógenos (Muthukumarasamy *et al.*, 2000) ó bien, por el desencadenamiento de una respuesta de defensa de la planta en contra de patógenos inducida por el endófito, en forma similar a la que se observa con algunas rizobacterias (Pieterse y van Loon, 1999). También se ha sugerido que el interior de las plantas es un ambiente propicio para que se lleve a cabo la FBN, ya que este ambiente es pobre en oxígeno y relativamente rico en fuentes de Carbono (James, 2000; James y Olivares, 1998; Sprent y James, 1995), por lo que las bacterias diazotróficas endófitas podrían fijar el N_2 y liberarlo directamente en el interior de las plantas (Döbereiner, 1993) contribuyendo con una parte de los requerimientos nitrogenados de las mismas (Boddey *et al.*, 1995). El descubrimiento de bacterias endófitas con capacidad de fijar N_2 , tal como *G. diazotrophicus* (1988), ha abierto un nuevo capítulo de investigación en la fijación de Nitrógeno y las interacciones planta-microorganismo en plantas no leguminosas. La colonización endofítica de la caña de azúcar por *G. diazotrophicus* representa un sistema modelo para la asociación beneficiosa entre una monocotiledónea y una especie bacteriana diazotrófica. Los estudios sobre endófitos fijadores de N_2 han tomado gran impulso en la actualidad, basados en las ideas pioneras sobre el potencial agrobiotecnológico de *G. diazotrophicus*. Las características consideradas fueron el hábitat endófito y la capacidad de fijar N_2 en presencia de nitratos (Cavalcante y Döbereiner, 1988), así como el excelente crecimiento de *G. diazotrophicus* en condiciones *in vitro* similares a las encontradas en la caña de azúcar (Boddey *et al.*, 1991). Esto significa que al multiplicarse *G. diazotrophicus* en el interior de la caña de azúcar existiría, por un lado menor competencia por los nutrientes en comparación con el ambiente rizosférico, y por otro podría disponer de abundante fuente de Carbono, producto de la

fotosíntesis para llevar a cabo la FBN, aún cuando los cultivos fueran fertilizados con este elemento. El Nitrógeno, producto de la FBN, sería excretado directamente en el interior de los tejidos de la planta, la cual los usaría para cubrir, al menos parcialmente, sus requerimientos en la síntesis de macromoléculas esenciales. El potencial agrobiotecnológico se amplió cuando se demostró que *G. diazotrophicus* tenía efectivamente la capacidad de excretar el 50% del Nitrógeno fijado (Cojho *et al.*, 1993), así como de producir diversas auxinas, especialmente ácido indol acético (Bastian *et al.*, 1998; Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993) y citoquininas (Jiménez-Salgado *et al.*, 1994) las cuales podrían ejercer efectos directos sobre la fisiología de la planta e influir sobre el crecimiento de la caña de azúcar. En el caso del cultivo de caña de azúcar, que en Brasil (a diferencia de otros países del mundo) la mayoría de las variedades presentan baja respuesta a la fertilización nitrogenada, el potencial de FBN en las variedades más eficientes alcanza un 70 % de las necesidades del cultivo (Urquiaga *et al.*, 1992). Mientras otros microorganismos fueron identificados como bacterias fijadoras de N_2 , aparentemente endofíticas de caña de azúcar ninguno, excepto *G. diazotrophicus*, ha mostrado la capacidad de contribuir con una parte significativa del Nitrógeno que las plantas requieren. Sevilla y colaboradores (1998) demostraron que *G. diazotrophicus* promueve el crecimiento de la caña de azúcar tanto a través de la fijación de N_2 como de otro mecanismo, sugiriendo la síntesis de ácido indol acético como el factor responsable. En contraste con los datos publicados por Sevilla y colaboradores (Sevilla y Kennedy, 1999; Sevilla *et al.*, 1998), los resultados de un experimento de invernadero llevado a cabo durante 6 meses, no revelaron ningún efecto sobre el crecimiento de plántulas micropropagadas de caña de azúcar inoculadas separadamente con 7 cepas diferentes de *G. diazotrophicus*, con la excepción de las plántulas inoculadas con una de las cepas (PAL 3) que mostraron mayor altura, estadísticamente significativa, en comparación con las plántulas testigo (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, resultados no publicados). La discrepancia entre los resultados observados en los experimentos de inoculación descritos podría deberse a las diferentes condiciones de experimentación.

Pasada más de una década de su descubrimiento, aunque aún no se ha demostrado exactamente el papel de *G. diazotrophicus* en las plantas que coloniza endofíticamente, esta bacteria puede ser considerada como modelo de estudio que contribuya a un mejor entendimiento de la asociación entre los endófitos y sus hospedantes. Por tales razones, la mayoría de las investigaciones realizadas sobre *G. diazotrophicus* han estado enmarcadas en el campo de la Microbiología aplicada. Sin embargo, poco se conoce acerca de los aspectos fisiológicos básicos de este microorganismo. Se ha descrito que cuando crece en un medio de cultivo con glucosa como sustrato hidrocarbonado acumula extracelularmente ácido glucónico que luego es metabolizado y, es en esta etapa, donde expresa su capacidad de fijar N_2 (en estos estudios se utilizaba un medio de cultivo que contenía una concentración inicial muy baja de Nitrógeno fijado) (Stephan *et al.*, 1990). También en ese mismo estudio se demostró que este microorganismo es capaz de crecer fijando N_2 a

valores de pH que van de 3,0 a 7,0. Posteriormente Galar y Boiardi (1995) encontraron que *G. diazotrophicus* expresa una enzima periplasmática responsable de la oxidación extracelular de glucosa a ácido glucónico denominada glucosa deshidrogenasa (GDH) dependiente de pirrolo-quinolina quinona (PQQ). Como se ha comentado anteriormente en este capítulo, está establecido para diversos microorganismos que la oxidación de glucosa a gluconato genera energía metabólicamente utilizable. En todos los casos la oxidación extracelular de glucosa vía la enzima GDH aparecía como una ruta alternativa de metabolismo de azúcares pero, en el caso de *G. diazotrophicus*, parece ser la principal vía del catabolismo de aldosas (Alvarez y Martínez-Drets, 1995). La magnitud de la contribución de la oxidación de glucosa a gluconato al rendimiento en biomasa de organismos endófitos como *G. diazotrophicus* aún no ha sido establecida. La FBN es un proceso que impone una elevada exigencia de producción de energía a la célula, de manera que esta ruta de provisión de energía podría jugar un rol muy importante en microorganismos que sean capaces de fijar N_2 . Esto conduce a analizar los factores ambientales que influyen la síntesis y la actividad de esta enzima, y las consecuencias bioenergéticas de la oxidación de aldosas vía GDH ligada a PQQ en *G. diazotrophicus*. Este conocimiento es importante tanto desde el punto de vista académico, para conocer los mecanismos biológicos empleados por el mismo para crecer y fijar N_2 en un ambiente tan especial como lo es el interior de un vegetal, como desde el punto de vista económico para lograr aprovechar su capacidad de proveedor de Nitrógeno en la agricultura.

1.6. Objetivos del trabajo de tesis

A partir de lo anteriormente expuesto los objetivos a ser cumplidos durante el desarrollo del trabajo de tesis se pueden sintetizar en:

1.6.a. Objetivo General

Caracterización fisiológica del diazótrofo endófito de caña de azúcar, *Gluconacetobacter diazotrophicus*: importancia funcional de la oxidación periplasmática de aldosas.

1.6.b. Objetivos específicos

- Caracterización fenotípica de *G. diazotrophicus* cultivado bajo diferentes condiciones ambientales. Eficiencia energética de crecimiento y rutas empleadas para el metabolismo de las fuentes hidrocarbonadas, utilizando N_2 o amonio como fuente de Nitrógeno, en función de modificaciones en diferentes condiciones de cultivo (cambios en el pH externo, naturaleza y concentración de la fuente de Carbono y energía, etc.) (Capítulo II).
- Estudio de la expresión de la ruta extracelular de oxidación de aldosas (vía la glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ) en cultivos continuos y establecimiento de su importancia fisiológica. Bioenergética de estos cultivos en condiciones de FBN y utilizando Nitrógeno fijado (Capítulo III, Capítulo IV).
- Desarrollo de un modelo metabólico para *G. diazotrophicus* que describa el crecimiento de este organismo bajo las distintas condiciones ambientales utilizadas y permita estimar la eficiencia energética de utilización de la/s fuente/s de Carbono y energía, particularmente mientras expresan actividad de GDH fijando N_2 atmosférico (Capítulo V).

1.7. Referencias

- Alvarez B and Martínez-Drets G (1995) Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. Can. J. Microbiol. 41: 918-924.
- Ameyama M, Matsushita K, Ohno Y, Shinagawa E and Adachi O (1981) Existence of a novel prosthetic group, PQQ, in membrane-bound, electron transport chain-linked, primary dehydrogenases of oxidative bacteria. FEBS Lett. 130: 179-183.
- Ameyama M, Nonobe M, Shinagawa E, Matsushita K, Takimoto K and Adachi O (1986) Purification and characterization of the quinoprotein D-glucose dehydrogenase apoenzyme from *Escherichia coli*. Agric. Biol. Chem. 50: 49-57.
- Anthony C (1993) in Principles and Application of Quinoproteins (Davidson V L ed.), pp. 223-244, Marcel Dekker, New York.
- Anthony C (1998) The pyrroloquinoline quinone (PQQ)-containing quinoprotein dehydrogenases. Biochem. Soc. Trans. Vol. 26: 413-417.
- Ashbolt N J and Inkerman P E (1990) Acetic acid bacterial biota of the pink sugarcane mealybug, *Saccharicoccus sacchari*, and its environs. Appl. Environ. Microbiol. 56: 707-712.
- Attwood M M, van Dijken J P and Pronk J T (1991) Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. J. Ferment. Bioeng. 72: 101-105.
- Baldani J I, Caruso L, Baldani V L D, Goi S R and Döbereiner J (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biol. Biochem. 29: 911-922.
- Bastian F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R and Bottini R (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ y A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. Plant Growth Reg. 24:7-11.
- Beardmore-Gray M and Anthony C (1986) The oxidation of glucose by *Acinetobacter calcoaceticus*: the interaction of the quinoprotein glucose dehydrogenase with the electron transport chain. J. Gen. Microbiol. 132: 1257-1268.
- Bellone C H and Bellone S D V C (1994) Nitrogenase, cellulase and pectinase activity in sugar cane roots inoculated together with V-A micorrhiza and nitrogen fixing bacteria. In: Nitrogen Fixation with Non-legumens, pp.69-75. Edited by N.A. Hegazi, M Fayez and M. Monib. Cairo: American University of Cairo Press.
- Bellone C H, Bellone S D V C, Pedraza R O and Monzon M A (1997) Cell colonization and infection thread formation in sugar cane roots by *Acetobacter diazotrophicus*. Soil Biol. Biochem. 29: 965-967.
- Boddey R M and Döbereiner J (1995) Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. Fertilizer Research 42: 241-250.
- Boddey R M, de Oliveira O C, Urquiaga S, Reis V M, De Olivares F L, Baldani V L D and Döbereiner J (1995) Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. Plant Soil 174:195-209.
- Boddey R M, Urquiaga S, Reis V and Döbereiner J (1991) Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. Plant Soil 137: 111-117.
- Boesch C, Trcek J, Sievers M and Teuber M (1998) *Acetobacter intermedius*, sp. nov. Systematic Appl. Microbiol. 21: 220-229.
- Boiardi J L, Galar M L and Neijssel O M (1996) PQQ-linked extracellular glucose oxidation and chemotaxis towards this cofactor in rhizobia. FEMS Microbiol. Lett. 140: 179-184.

- Bont J A M de, Dokter P, Schie van B J, Dijken van J P, Frank Jzn J, Duine J and Kuenen J G (1984) Role of the quinoprotein glucose dehydrogenase in gluconic acid production by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 50: 76-77.
- Bulygina E S, Gulikova O M, Dikanskaya E M, Netrusov A I, Tourova T P and Chumakov K M (1992) Taxonomic studies of the genera *Acidomonas*, *Acetobacter* and *Gluconobacter* by 5S ribosomal RNA sequencing. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2283-2286.
- Caballero-Mellado J, Fuentes-Ramírez L E, Reis V M and Martínez-Romero E (1995) Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3008-3013.
- Caballero-Mellado J, Jiménez-Salgado T, Tapia-Hernández A, Wang E T, Martínez-Romero E and Fuentes-Ramírez L E (1999) Polyphasic taxonomy of nitrogen-fixing acetic bacteria isolated from the rhizosphere of coffee plants. In E. Martínez and G. Hernández (ed.), *Highlights on nitrogen fixation research*, p. 271-274. Kluwer Academic Publisher. N.Y.
- Caballero-Mellado J, Martínez-Romero E, Estrada de los Santos P and Fuentes-Ramírez L E (1998) Maize colonization by *Acetobacter diazotrophicus*. In C. Elmerich, A. Kondorosi, and W. E. Newton (ed.), *Biological nitrogen fixation for the 21st century*, p. 381-382. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht.
- Cavalcante V A and Döbereiner J (1988) A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108: 23-31.
- Cojho E H, Reis V M, Schenberg A C and Döbereiner J (1993) Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amyolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 106:23-31.
- Cote G L and Ahlgran J A (1993) Metabolism in microorganism Part I. Levan and levansucrase. In *Science and Technology of Fructans*, pp. 141-168. Edited by M Susuki and Chatterton N J. Boca Raton FL: CRC Press.
- Cozier G E and Anthony C (1995) Structure of the quinoprotein glucose dehydrogenase of *E. coli* modelled on that of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. *Biochem. J.* 312: 679-685.
- Dawes E A (1981) Carbon metabolism. In: *Continuous cultures of cells*. Vo. 2: 1-38. Ed. Callcott PH CRC Press. Inc. Boca Raton Fla.
- De Ley J (1961) Comparative carbohydrate metabolism and a proposal for a phylogenetic relationship of the acetic acid bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 24: 31.
- De Ley J, Gillis M and Swings J (1984a) Family VI. *Acetobacteraceae*. In Krieg N. R., Holt J. G. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1, p. 267-278. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Döbereiner J (1992) History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis* 13: 1-13.
- Döbereiner J, Baldani V L D and Reis V M (1995) Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crop. In *Azospirillum and Related Microorganisms*, pp. 3-14. Edited by Fendrik I, del Gallo M Vanderleyden J and Zamaroczy M. Berlin: Springer-Verlag.
- Döbereiner J, Reis V M, Paula M A and Olivares F L (1993) Endophytes diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In R. Palacios, J. Mora and W. E. Newton (ed.), *New horizons in nitrogen fixation*, p. 671-676. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Döbereiner and Day (1975) Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. In "Nitrogen fixation by free-living microorganism", W.D.P. Steward, ed. Cambridge University Press: 39-56.

- Döbereiner and Ruschel (1958) Una nova espécie de *Beijerinckia*. *Revista de Biología* 1: 261-272.
- Dokter P, Frank J J and Duine J A (1986) Purification and characterization of quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* L.M.D. 79.41. *Biochem. J.* 239: 163-167.
- Dokter P, Pronk J T, Schie van B J, Dijken J P van and Duine J A (1987) The in vivo and on vitro substrate specificity of the quinoprotein glucose dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79.41. *FEMS Microbiol. Lett.* 43: 195-200.
- Dong Z, Canny M J, McCully M E, Roboredo M R, Cabadilla C F, Ortega E and Rodes R (1994) A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. *Plant Physiol.* 105: 1139-1147.
- Dong Z, Heydrich M, Bernard K and McCully M E (1995) Further evidence that the N₂-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1843-1846.
- Dong Z, McCully M E and Canny M J (1997) Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. *Ann. Bot.* 80: 147-158.
- Duine J A (1991) Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan-quinone. *Eur. J. Biochem.* 200: 271-284.
- Duine J A (1999) The PQQ story. *J. Biosci. Bioeng.* Vol. 88, 3: 231-236.
- Duine J A and Frank Jzn J (1981) Quinoproteins: a novel class of dehydrogenases. *Trends Biochem. Sci.* 6: 278-280.
- Duine J A, Frank J Jzn and Jongejan J A (1983) Detection and determination of pyrroloquinoline quinone, the coenzyme of quinoproteins. *Anal Biochem.* 133: 239-243.
- Duine J A, Frank J Jzn and Jongejan J A (1986) PQQ and quinoprotein enzymes in microbial oxidations. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 165-178.
- Duine J A, Frank Jzn. J and de Ruyter L G (1979) Isolation of a methanol dehydrogenase with a functional coupling to cytochrome c. *J. Gen. Microbiol.* 115: 523-526.
- Duine J A, Frank Jzn. J and van der Meer R (1982) Different forms of quinoprotein aldose-(glucose-) dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch. Microbiol.* 131: 27-31.
- Duine J A, Frank Jzn. J and Verwiél P E J (1980) Structure and activity of the prosthetic group of methanol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 108: 187-192.
- Entani E, Ohmori S, Masai H and Suzuki K (1985) *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *Appl. Microbiol.* 31: 475-490.
- Flores-Encarnación M, Contreras-Zentella M, Soto-Urzuza L, Aguilar G R, Baca B E and Escamilla J E (1999) The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL 5. *J. Bacteriol.* 181: 6987-6995.
- Franke I H, Fegan M, Hayward C, Leonard G, Stackebrandt E and Sly L I (1999) Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1681-1693.
- Fuentes-Ramírez L E, Bustillos-Cristales R, Tapia-Hernández A, Jiménez-Salgado T, Wang E T, Martínez-Romero E and Caballero-Mellado J (2001) Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov., and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (En prensa).

- Fuentes-Ramírez L E, Caballero-Mellado J, Sepúlveda J and Martínez-Romero E (1999) Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. FEMS Microbiol. Ecol. 29: 117-128.
- Fuentes-Ramírez L E, Jiménez-Salgado T, Abarca-Ocampo I R and Caballero-Mellado J (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, and indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. Plant Soil 154: 145-150.
- Galar M L and Boiardi J L (1995) Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 713-716.
- Geiger O and Görisch H (1986) Crystalline quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. Biochem. 25: 6043-6048.
- Gillis M, Kersters K, Hoste B, Janssens D, Kroppenstedt R M, Stephan M P, Teixeira K R S, Döbereiner J and De Ley J (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 361-364.
- Goodwin P M and Anthony C (1998) The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ containing enzymes. Adv. Microb. Physiol. 40: 1-80.
- Goossens N, Horsman H P A, Huinen R G M and van de Putte (1989) *Acinetobacter calcoaceticus* genes involved in biosynthesis of the coenzyme pyrrolo-quinoline-quinone: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 171 (1): 447-455.
- Hardy G (1992) Dual glucose metabolism of *Pseudomonas species* in chemostat culture, pp 7-105. PhD Tesis. Department of Microbiology. University of Amsterdam.
- Hauge J G (1960) Kinetics and specificity of glucose dehydrogenase from *Bacterium anitratum*. Biochim. Biophys. Acta 45: 263-269.
- Hauge J G (1964) Glucose dehydrogenase of *Bacterium anitratum*: an enzyme with a novel prosthetic group. J. Biol. Chem. 239: 3630-3639.
- Hernández L, Arrieta J, Menéndez C, Vazquez R, Coego A, Suárez V, Selman G, Petit-Glatron M F and Chambert R (1995) Isolation and enzymic properties levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. Biochem. J. 309: 113-118.
- Hernández L, Sotolongo M, Rosabal Y, Menéndez C, Ramírez R, Caballero-Mellado J and Arrieta J (2000) Structural levansucrase gene (*IsdA*) constitutes a functional locus conserved in the species *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Arch. Microbiol. 174: 111-119.
- Hill S (1988) How is nitrogenase regulated by oxygen? FEMS Microbiol. Lett. 54: 111-130.
- Hommel R W J, Neijssel O M, Tempest D W, Dokter P and Duine J A (1984) Evidence of a quinoprotein glucose dehydrogenase apoenzyme in several strains of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 24: 329-333.
- Hommel R W J, Postma P W, Neijssel O M and Tempest D W (1985) The functional significance of glucose dehydrogenase in *Klebsiella aerogenes*. Arch. Microbiol. 143: 163-168.
- Hucho F and Wallenfels K (1972) Glucono- α -lactonase from *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta 37: 78-92.
- James E K (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crops Research 65: 197-209.
- James E K and Olivares F L (1997) Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. Crit. Rev. Plant Sci. 17: 77-119.
- James E K, Reis V M, Olivares F L, Baldani J I and Döbereiner J (1994) Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. J. Exp. Bot. 45: 757-766.

- Jermyn M A (1960) Studies on the glucono- α -lactonase of *Pseudomonas fluorescens*. Biochim. Biophys. Acta 37: 78-92.
- Jiménez-Salgado T, Aparicio Fabr e R y Caballero-Mellado J (1994) Detecci n de citocininas en *Acetobacter diazotrophicus* aislado de ca a de azúcar. XVII Reuni n Latinoamericana de Rhizobiolog a. La Habana, Cuba.
- Jiménez-Salgado T, Fuentes-Ramírez L E, Tapia-Hernández A, Mascar a-Esparza M A, Martínez-Romero E and Caballero-Mellado J (1997) *Coffea arabica* L, a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3676-3683.
- Lessie T G and Phibbs P V (1984) Alternative pathways of carbohydrates utilization in *Pseudomonas*. Ann. Rev. Microbiol. 38: 359-387.
- Li R P and MacRae I C (1991) Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. Soil Biol. Biochem. 23: 999-1002.
- Lima E, Boddey R M and Döbereiner J (1987) Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N-aided nitrogen balance. Soil Biol. Biochem. 19: 165-170.
- Loganathan P, Sunlta R, Parlda A K and Nair S (1999) Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. J. Appl. Microbiol. 87: 167-172.
- Malik K A, Rakhshanda B, Mehnaz S, Rasul G, Mirza M S and Ali S (1997) Association of nitrogen-fixing plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. Plant Soil 194: 37-44.
- Matsushita K and Ameyama M (1982) D-glucose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*, membrane-bound. Methods Enzymol. 89: 149-154.
- Matsushita K, Nonobe M, Shinagawa E, Adachi O and Ameyama M (1987) Reconstitution of pyrroloquinoline quinone-dependent D-glucose oxidase respiratory chain of *Escherichia coli* with cytochrome o oxidase. J. Bacteriol. 169: 205-209.
- Meulenbergh J J M, Sellink E, Loenen W A M, Riegman N H, van Kleef M and Postma P W (1990) Cloning of *Klebsiella pneumoniae* pqq genes and PQQ biosynthesis in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 71: 337-344.
- Muthukumarasamy R, Rebathi G and Vadivelu M (2000) Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went, a causal of red-rot of sugarcane. Curr. Sci. 78: 1063-1065.
- Neijssel O M, Hommes R W J, Postma P W and Tempest D W (1989) Physiological significance and bioenergetic aspects of glucose dehydrogenase. Antonie van Leeuwenhoek 56: 51-61.
- Neijssel O M, Tempest D W, Postma P W, Duine J A and Frank Jzn. J (1983) Glucose metabolism by K⁺-limited *Klebsiella aerogenes*: evidence for the involvement of a quinoprotein glucose dehydrogenase. FEMS Microbiol. Lett. 20: 35-39.
- Okon Y and Labandera-González C A (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil. Biol. Biochem. 26: 1591-1601.
- Olivares F L, James E K, Baldani J I and Döbereiner J (1997) Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. New Phytol. 135: 723-737.
- Olsthoorn A J J and Duine J A (1996) Production, characterization and reconstitution of recombinant quinoprotein glucose dehydrogenase (soluble type; Ec 1.1.99.17) apoenzyme of *Acinetobacter calcoaceticus*. Arch. Biochem. Biophys. 336: 42-48.

- Paula M A, Reis V M and Döbereiner J (1991) Interaction of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum spp.*), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). Biol. Fertil. Soils 11: 111-115.
- Paula M A, Urquiaga S, Siqueira J O and Döbereiner J (1992) Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas*). Biol. Fertil. Soils 14: 61-66 36.
- Pieterse C M J and van Loon L C (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. Trends Plant Sci. 4: 52-58.
- Rainbow C (1966) Nutrition and metabolism of acetic acid bacteria. Wallerstein Lab. Commun. 94: 615.
- Reinhold-Hurek B and Hurek T (1998) Life in grasses: diazotrophic endophytes. Trends Microbiol. 6: 139-144.
- Reis V M and Döbereiner J (1998) Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. Arch. Microbiol. 171: 13-18.
- Reis V M, Olivares F L and Döbereiner J (1994) Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. World J. Microbiol. Biotechnol. 10: 401-405.
- Reis V M, Olivares F L, Martinez de Oliveira A L, Bueno dos Reis Jr. F, Baldani J I and Döbereiner J (1999) Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. Plant Soil 206: 205-211.
- Salisbury S A, Forrest H S, Cruse W B T and Kennard O (1979) A novel coenzyme from bacterial primary alcohol dehydrogenase. Nature 280: 843-844.
- Schie B J van, Dijken B J van and Kuenen J G (1984) Non coordinated synthesis of glucose dehydrogenase and its prosthetic group PQQ in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* species. FEMS Microbiol. Lett. 24: 133-138.
- Schie van J, Hellingwerf K J, Dijken van J P, Elferink M G L, Dijk van J M, Kuenen J G and Konings W N (1985) Energy transduction by electron transfer via a pyrrolo-quinoline-quinone-dependent glucose dehydrogenase in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter calcoaceticus* (var. Lwoffii). J. Bacteriol. 163, Nro. 2: 493-499.
- Schie van V J, O H Mooy de, Linton J D, Dijken van J P and Kuenen J G (1987a) PQQ dependent production of gluconic acid by *Acinetobacter*, *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. J. Gen. Microbiol. 133: 867-875.
- Sevilla M and Kennedy C (1999) Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane, p. 737-760. In Triplett, E.W. (ed.), Prokaryotic nitrogen fixation. A model system for the analysis of a biological process. Horizon Scientific Press. Wymondham, U.K.
- Sevilla M, De Oliveira A, Baldani I and Kennedy C (1998) Contributions of the bacterial endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition. A preliminary study. Symbiosis 25: 181-191.
- Sherestha R K and Ladha J K (1996) Genotypic variation in promotion of rice nitrogen fixation as determined by nitrogen ¹⁵N dilution. Soil Sci. Soc. Am. J. 60: 1815-1821.
- Sievers M, Ludwig W and Teuber M (1994) Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodospila* and *Acidiphilium* species as a branch of acidophilic bacteria in the alpha-subclass of proteobacteria based on 16S ribosomal DNA sequences. Syst. Appl. Microbiol. 17: 189-196.

- Sokollek S J, Hertel C and Hammes W P (1998) Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 935-940.
- Sprent J I and James E K (1995) N₂-fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation, p. 15-30. In I. Fendrik, M. del Gallo, J. Vanderleyden, M. de Zamaroczy, (ed.), *Azospirillum VI and related microorganism*. Berlin, Springer-Verlag.
- Swings J (1992) The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*, p. 2268-2286. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, Vol. III. Springer-Verlag, New York, N. Y.
- Tapia-Hernández A, Bustillos-Cristales M R, Jiménez-Salgado T, Caballero-Mellado J and Fuentes-Ramírez L E (2000) Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microb. Ecol.* 39: 49-55.
- Urakami T, Tamaoka J, Susuki K I and Komagata K (1989) *Acidomonas* gen. nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomona methanolica* comb. nov. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 39: 50-55.
- Ureta A, Alvarez B, Ramón A, Vera M A and Martínez-Drets G (1995) Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. *Plant Soil* 172: 271-277.
- Urquiaga S, Cruz K H S and Boddey R M (1992) Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Sci. Am. J.* 56: 105-114.
- Yamada Y, Hoshino K and Ishikawa T (1997) The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 1244-1251.
- Yamada Y, Hoshino K and Ishikawa T (1998) *Gluconoacetobacter* nom. corrig. (*Gluconoacetobacter* [sci]). In Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List no. 64. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 327-328.
- Yamada Y, Katsura K, Kawasaki H, Widyastuti Y, Saono S, Seki T, Uchimura T and Komagata K (2000) *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 823-829.
- Ye L, Hammerle M, Olsthoorn A J J, Schumann W, Schmidt H L, Duine J A and Heller A (1993) High current density "wired" quinoprotein glucose dehydrogenase electrode. *Anal. Chem.* 65: 238-241.
- Yoneyama T, Muraoka T, Kim T H, Dacanay E V and Nakanishi Y (1997) The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). *Plant Soil* 189: 239-244.
- Young J P W (1992) Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organism, p. 43-86. In G. Stacey, R. H. Burris and H. J. Evans (Ed.), *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman & Hall, New York.

CAPITULO II

*Caracterización General del Metabolismo de Glucosa y Acido
Glucónico en Cultivos de Gluconacetobacter diazotrophicus*

11.1. Resumen

El crecimiento, la formación de productos y la actividad de las enzimas ligadas a membrana en *Gluconacetobacter diazotrophicus* fueron estudiados en cultivos "batch", en medios mínimos, sin control de pH y con distintas fuentes de Carbono y de Nitrógeno. Cultivos con glucosa ($5,0 \text{ g.l}^{-1}$) como fuente hidrocarbonada y Nitrógeno fijado (No FBN) presentaron un crecimiento trifásico: en la primera fase los microorganismos consumen rápidamente la glucosa y liberan ácido glucónico al medio, con un concomitante y abrupto descenso de pH, pero sin un significativo aumento de biomasa. En una segunda fase, que comienza cuando la concentración de glucosa alcanza valores menores a $0,65 \text{ g.l}^{-1}$, se observa crecimiento exponencial a una velocidad específica (μ) de $0,18 \text{ h}^{-1}$ y síntesis de cetoácidos extracelulares, ambos a expensas del consumo de ácido glucónico. En una etapa final, los microorganismos crecen a una velocidad relativamente lenta consumiendo los cetoácidos producidos en la etapa anterior. Cultivos con ácido glucónico como fuente de Carbono y condiciones de No FBN, alcalinizaron el medio de cultivo hasta valores de pH cercanos a 8,0 y mostraron un patrón de crecimiento bifásico similar a las dos últimas etapas de crecimiento en glucosa. Cultivos con glicerol y condiciones de No FBN presentaron un descenso lento del pH del medio, sin registrarse producción de ácido glucónico ni de cetoácidos. Las velocidades específicas de crecimiento en condiciones de FBN, independientemente del sustrato carbonado utilizado, fueron menores que $0,10 \text{ h}^{-1}$. Las medidas de actividad de glucosa deshidrogenasa PQQ-dependiente (GDH) en todos los cultivos realizados indican que esta enzima se sintetizaría constitutivamente. En cultivos con dosis "starter" de sulfato de amonio (para iniciar la FBN) la actividad de GDH fue superior que en aquellos donde el Nitrógeno fijado estaba en exceso. Los valores de las actividades enzimáticas revelan un predominio del sistema de la GDH PQQ-dependiente en el metabolismo de glucosa, ya que la actividad hexoquinasa fue nula y la de glucosa deshidrogenasa citoplasmática NAD-dependiente significativamente inferior. Utilizando un mutante GDH(-) se demostró que el ácido glucónico extracelular es producido exclusivamente vía GDH. La cepa salvaje de *G. diazotrophicus* presentó valores de velocidades específicas de consumo de glucosa mucho más elevados que los del mutante crecido en iguales condiciones, aunque los rendimientos en biomasa resultaron más bajos. No se detectaron cetoácidos en los sobrenadantes de cultivos de dicho mutante creciendo con glucosa como fuente de Carbono y energía. La velocidad específica de crecimiento en dichos cultivos, y el perfil de pH, fue semejante al que presentaron los cultivos de la cepa salvaje creciendo en glicerol. En medios que contenían ácido glucónico el mutante produjo cetoácidos y creció a un μ similar al de la cepa salvaje. Cultivos del mutante en glucosa y bajo condiciones de FBN mostraron un patrón de crecimiento semejante al de la cepa salvaje.

11.2. Introducción

El metabolismo de azúcares en los microorganismos puede proceder a través de diferentes rutas catabólicas. Diferencias en el metabolismo bacteriano pueden encontrarse en el modo de entrada del azúcar en esas rutas. Por ejemplo, en *Escherichia coli* la fosforilación es el primer paso en el metabolismo de las aldosas mientras que *Pseudomonas* sp. puede catalizar la inicial oxidación del azúcar (fosforilado ó no) al correspondiente ácido aldónico, el que puede acumularse transitoriamente en el medio de cultivo (van Schie *et al.*, 1987). En este y en otros microorganismos la importancia de la ruta de oxidación directa respecto a la ruta fosforilativa ha sido intensamente estudiada (Dawes, 1981; Lessie y Phibbs, 1984). En *Pseudomonas* sp. la ruta de oxidación directa es obligatoria para el crecimiento en aldopentosas (Doelle, 1975) pero, durante el crecimiento en aldohexosas, esta ruta puede ser no operativa dependiendo de las condiciones ambientales (Lessie y Phibbs, 1984). La habilidad de producir gluconato a partir de glucosa ha sido encontrada en varios microorganismos entre los cuales se encuentran: *E. coli* (Hommes *et al.*, 1984), *Klebsiella aerogenes* (Neijssel *et al.*, 1983), *Acinetobacter* sp. (van Schie *et al.*, 1987), *Gluconobacter* sp. (Olijve y Kok, 1979a), *Rhizobium* sp. (van Schie *et al.*, 1987) y *Aspergillus niger* (Meiberg y Spa, 1983). Con excepción de este último (eucariote), el cual posee una glucosa oxidasa (EC 1.13.4), en todos los microorganismos procariotes la producción de ácidos aldónicos está asociada con la presencia de una aldosa-deshidrogenasa ligada a membrana (GDH) (EC 1.1.99.17) la cual contiene pirroloquinolina quinona (PQQ) como grupo prostético (Duine y Frank, 1981).

G. diazotrophicus ha sido estudiado en cultivos "batch" en medios mínimos con glucosa como fuente de Carbono y energía y condiciones de No FBN. Se observó que durante las primeras horas de cultivo consume el 90 % de la glucosa produciendo concomitantemente ácido glucónico, sin un significativo aumento de la biomasa. El pH del cultivo durante ese período disminuye de 5,7 hasta 3,5 y la fase exponencial comienza cuando al menos un 50-60 % de la glucosa fue convertida a ácido glucónico (Stephan *et al.*, 1991; Attwood *et al.*, 1991; Galar y Boiardi, 1995). Galar y Boiardi (1995) demostraron que la producción de ácido glucónico, tal como ocurre en otros microorganismos, se debe a la presencia de una elevada actividad de GDH PQQ-dependiente ligada a membrana. A diferencia de *Acinetobacter calcoaceticus*, organismo que posee una GDH soluble ligada a PQQ en adición a la GDH PQQ-dependiente asociada a membrana (Cleton-Jansen *et al.*, 1988), en *G. diazotrophicus* sólo esta última pudo ser detectada (Galar y Boiardi, 1995). *G. diazotrophicus* expresa además una GDH citoplasmática NAD-dependiente (EC. 1.1.1.47) (Attwood *et al.*, 1991; Alvarez y Martínez-Drets, 1995), al igual que *Gluconobacter oxidans*, solo que en este último microorganismo el cofactor es NADP. Ha sido detectada también actividad de hexoquinasa (EC 2.7.1.1) en extractos libres de células de *G. diazotrophicus* tanto en cultivos "batch" (Alvarez y Martínez-Drets, 1995) como en cultivos continuos creciendo en glucosa (Attwood *et al.*, 1991). No obstante, la actividad reportada es muy baja si se la

compara con las actividades de la GDH periplasmática. Análisis de los sobrenadantes de los cultivos por HPLC y medidas de enzimas de extractos celulares, revelaron la formación de ácido 2-cetogluconico, a expensas de la oxidación del ácido gluconico por una gluconato deshidrogenasa ligada a membrana, y probablemente, 2,5-dicetogluconico (ligado a la aparición de una pigmentación marrón oscura de los cultivos), producto de la actividad de una cetogluconato deshidrogenasa también asociada a la membrana (Attwood *et al.*, 1991, Alvarez y Martínez-Drets, 1995).

Alvarez y Martínez-Drets (1995) sugieren que *G. diazotrophicus* emplea glucosa, fructosa, ácido gluconico y glicerol, según las secuencias catabólicas que se muestran en la Figura II.1.

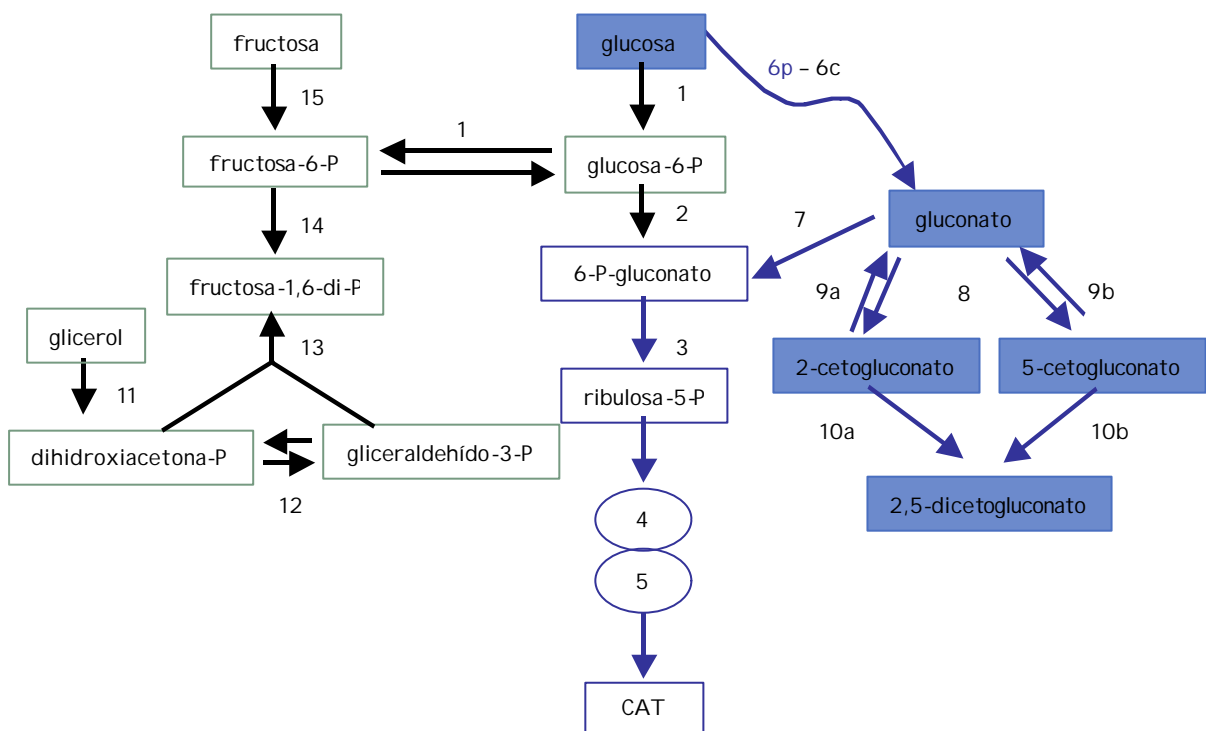


Figura II.1. Posibles rutas para el metabolismo de los Hidratos de Carbono en *Gluconacetobacter diazotrophicus*. CAT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Los números se refieren a las enzimas citadas a continuación.

1-Glucoquinasa; 2-Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa(NAD-NADP); 3-6-Fosfogluconato deshidrogenasa NAD; 4-Transcetolasa; 5-Transaldolasa; 6p-Glucosadeshidrogenasa DCIP; 6c-Glucosa deshidrogenasa NAD; 7-Gluconatoquinasa; 8-Gluonato deshidrogenasa (DCIP-NAD-NADP); 9a-2-cetogluconato reductasa NAD; 9b-5-cetogluconato reductasa NADP; 10a-2-cetogluconato deshidrogenasa DCIP; 10b-5-cetogluconato deshidrogenasa DCIP; 11-glicerolfosfato deshidrogenasa; 12-triosafosfato isomerasa; 13-fructosa difosfato aldolasa; 14-fructosa difosfatasa; 15-fructoquinasa; 16-glucosa-6-fosfato isomerasa.

No han sido presentadas aún evidencias sobre la regulación de la expresión de las enzimas relacionadas con la ruta de oxidación directa de la glucosa, ni tampoco se ha demostrado que la GDH PQQ-dependiente sea la única enzima responsable de la extensa formación de ácido glucónico en este microorganismo, para lo cual es necesario el empleo de mutantes adecuados.

En vista del significado metabólico de la GDH-quinoproteína en otras bacterias, y como una primera aproximación hacia la determinación del rol fisiológico de esta enzima en *G. diazotrophicus*, fueron estudiados en detalle el crecimiento, la formación de productos y las actividades de las enzimas directamente relacionadas con la incorporación de la glucosa en las distintas vías catabólicas, en cultivos "batch" sin control de pH, con distintas fuentes de Carbono y de Nitrógeno, tanto en la especie salvaje como en un mutante GDH(-).

Cultivos "batch"

Los cultivos "batch", ó cultivos discontinuos, son sistemas cerrados que contienen todos los nutrientes necesarios para suplir las necesidades fisiológicas del organismo y la concentración de uno de ellos está en cantidades estequiométricamente más bajas que las concentraciones de los otros componentes del medio ("nutriente limitante del crecimiento"). Una ecuación que describe aceptablemente la relación entre la velocidad específica de crecimiento (μ) y la concentración del nutriente limitante del crecimiento (S) es la ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \cdot S / (K_s + S) \quad K_s: \text{ constante de afinidad para el sustrato limitante (S)}$$

Esta nos indica que mientras el sustrato limitante esté presente en exceso en el medio de cultivo la velocidad específica de crecimiento es máxima ($\mu_{\text{máx}}$, fase exponencial) y, al ir disminuyendo su concentración, el crecimiento se hace más lento hasta llegar a la fase de no crecimiento o fase estacionaria. En este sistema de cultivo, los microorganismos producen cambios continuos e incontrolables en su medio ambiente; la concentración bacteriana se eleva, la de sustrato disminuye y aparecen productos. Los microorganismos se adaptan a esas condiciones cambiando continuamente su fenotipo, lo cual a menudo se traduce en una alteración de la velocidad de crecimiento que obviamente tiene un efecto sobre la fisiología del microorganismo.

En este capítulo se describen y se analizan sistemas de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* en los que el sustrato limitante siempre es la fuente de Carbono y energía.

II.3. Materiales y Métodos

II.3.1. Microorganismo

Gluconacetobacter diazotrophicus PAL 3 (LMG 8066 de acuerdo a la colección de cultivos BCCM/LMG, Gent, Bélgica) fue provista por la Dra. J. Döbereiner (CNPBS/EMBRAPA, Rio de Janeiro, Brasil). La misma fue mantenida en LGIM-glicerol 20 % (v/v) a - 70°C y por subcultivos mensuales en agar-papa (Stephan *et al.*, 1991).

II.3.2. Condiciones y medios de cultivo

Los cultivos "batch", se realizaron en frascos agitados de 1 l conteniendo 250 ml de medio de cultivo y fueron incubados en un shaker rotatorio a 200 rpm y a una temperatura de 30 °C. El medio mínimo definido utilizado para todos los cultivos fue LGIM (Stephan *et al.*, 1991), cuya composición es la siguiente:

LGIM	
glucosa	5,0 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
ácido cítrico	0,2 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,01 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02 g
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,002 g
H ₂ O csp	1000 ml

El pH se ajustó a 6,0 por el agregado de KOH 0,1 N ó HCl 0,1 N. Se modificó la concentración y el tipo de fuente de Carbono y energía, que en todos los casos fue el sustrato limitante, según el experimento. Se realizaron experimentos con glucosa (5,0; 10,0 y 50,0 g.l⁻¹), gluconato (5,0 g.l⁻¹) y glicerol (5,0 g.l⁻¹). Se empleó (NH₄)₂SO₄ 2,64 g.l⁻¹ como fuente de Nitrógeno para realizar experimentos en condiciones de No FBN, ya que la actividad de la nitrogenasa es inhibida por concentraciones del orden 0,66 g.l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ (Stephan *et al.*, 1991). Para lograr condiciones de FBN, se empleó una dosis "starter" de 0,132 g.l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄ (mínima concentración para lograr condiciones de FBN (Stephan *et al.*, 1991)) y la agitación se redujo a 150 rpm.

Los cultivos "batch" realizados en fermentador, se llevaron a cabo a 30°C en un biorreactor LH (Incelltech 210) de 2 L con un volumen de trabajo de 1,0-1,5 litros. El flujo

de aire fue de 0,15-0,25 VVM. La concentración de O₂ disuelto fue continuamente medida empleando un electrodo polarográfico Ingold (Wilmington, MA, USA) y se mantuvo al nivel deseado de saturación (25% para No FBN y 1,0 - 2,0 % para FBN ya que la nitrogenasa se inhibe a valores más elevados (Reis y Döbereiner, 1998) variando la velocidad de agitación (200-400 rpm).

La Densidad Óptica (D.O.) inicial de todos los cultivos se midió a una longitud de onda de 560 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640 y se mantuvo entre 0,02-0,04 (0,01-0,02 g.l⁻¹). Para ello los preinóculos fueron crecidos en erlenmeyers de 250 ml conteniendo 100 ml de medio, en las mismas condiciones que los cultivos para los cuales iban a ser empleados y fueron centrifugados después de 48 hs de crecimiento, cuando se encontraban en una fase exponencial tardía. El pH inicial en todos los experimentos fue 6,0 y los cambios de pH a lo largo de los cultivos fueron registrados con un pHmetro de laboratorio. En los experimentos que se realizaron a pH controlado, el mismo se midió con un electrodo de pH esterilizable Mettler-Toledo y fue mantenido automáticamente al valor deseado ± 0.1 por el agregado automático de Na(OH) (0,5 N) ó H₂SO₄ (0,5 N).

Todos los cultivos de una misma condición se realizaron por lo menos en dos oportunidades diferentes y por duplicado.

11.3.3. Análisis

Se tomaron muestras de fase líquida del cultivo, como de fase gaseosa en el caso de los cultivos en biorreactor, con intervalos de 1-2 horas y se realizaron los análisis correspondientes. En la muestra líquida se midió pH y D.O. a una longitud de onda de 560 nm. La concentración de glucosa fue determinada en los sobrenadantes de los cultivos (centrifugados 10 minutos a 12.000 g) con el kit enzimático de glucosa-oxidasa (Wiener, Argentina; Bergmeyer y Bernt, 1977). El gluconato fue medido con el test enzimático de Boehringer (Mannheim, Germany; test-kit 428191) y el 2-cetogluconato empleando el método de Lanning y Cohen (1951). Se utilizó el método del ácido Dinitrosalicílico (DNS; Miller, 1959) para medir conjuntamente la glucosa y los cetoácidos que fueran reductores. Las medidas de glicerol se realizaron según la técnica de Lambert y Netsch (1950). Las concentraciones de O₂ y CO₂ en las muestras gaseosas fueron determinadas empleando un analizador paramagnético de O₂ (Servomex 1100A, Norwood MA, USA) y un analizador infrarrojo de CO₂ (Horiba PIR 2000, Japón). El flujo de aire se midió con un caudalímetro de burbuja. Una curva de calibración de peso seco (g.l⁻¹) vs D.O. a 560 nm permitió determinar un factor de 0,4535 g.l⁻¹ que fue utilizado para convertir los valores de D.O. medidos a 560 nm en g.l⁻¹ de biomasa. El peso seco de la biomasa fue determinado siguiendo el procedimiento descrito por Herbert y colaboradores (1971). El amonio fue determinado por el método del Indofenol (Chaney y Marbach, 1962). El contenido de proteínas en los extractos libres de células fue medido por el método de biuret empleando albúmina bovina como patrón (Gornall *et al.*, 1949).

II.3.4. Cálculos

Las velocidades específicas de producción de biomasa (μ), de consumo de sustrato (q_s), de consumo de O_2 (q_{O_2}) y de producción de CO_2 (q_{CO_2}), fueron derivadas de los pesos secos (x), de las concentraciones de sustratos (S) y productos medidos en los sobrenadantes de los cultivos y de las velocidades de consumo y producción de O_2 y CO_2 respectivamente.

El valor de μ_{\max} se obtuvo de la pendiente de la curva $\ln D.O.$ a una longitud de onda de 560 nm en función del tiempo (t), según la siguiente ecuación:

$$\ln D.O. = \ln D.O._0 + \mu_{\max} \cdot t$$

DO_0 : densidad óptica proporcional a la concentración de biomasa inicial.

$D.O.$: densidad óptica a tiempo t .

Los valores de q_s se determinaron empleando la siguiente expresión:

$$q_s = r_s / x$$

r_s : velocidad volumétrica de consumo de sustrato (ds/dt).

x : concentración de biomasa a tiempo t .

Los valores de r_s se obtuvieron de las pendientes en un punto de la curva S en función del tiempo, se calcularon los q_s a los distintos tiempos y se promediaron para obtener un único valor.

Las velocidades de consumo de O_2 y de producción de CO_2 fueron calculadas por un método de balance de masas de acuerdo a Cooney y colaboradores (1977), con las siguientes expresiones:

$$r_{O_2} = \frac{0.79 \cdot F_1 \cdot T_{CNTP} \cdot Pt}{V \cdot Tt \cdot P_{CNTP}} \cdot \left(\frac{(X_{O_2})_2 - (X_{O_2})_1}{1 - (X_{O_2})_2 - (X_{CO_2})_2} \cdot \frac{1}{0.79} \right)$$

$$r_{CO_2} = \frac{0.79 \cdot F_1 \cdot T_{CNTP} \cdot Pt}{V \cdot Tt \cdot P_{CNTP}} \cdot \left(\frac{(X_{CO_2})_2}{1 - (X_{O_2})_2 - (X_{CO_2})_2} \right)$$

F_1 : flujo de aire que entra al biorreactor

Pt : presión de trabajo

V : volumen de cultivo

Tt : temperatura de trabajo

x_{O_2} : fracción molar de O_2 en el aire

x_{CO_2} : fracción molar de CO_2 en el aire

subíndice 1: aire que ingresa al biorreactor; subíndice 2: aire que sale del biorreactor

Las velocidades específicas de consumo y producción de O₂ y CO₂, respectivamente, se calcularon de acuerdo a las siguientes expresiones:

$$q_{O_2} = r_{O_2}/X \quad q_{CO_2} = r_{CO_2}/X$$

Los rendimientos en biomasa fueron derivados de los pesos secos y de la concentración de los sustratos medidos en el sobrenadante, según la siguiente expresión:

$$Y_{x/s} = (x - x_0)/(S_0 - S)$$

II.3.5. Ensayos enzimáticos

Los ensayos espectrofotométricos de glucosa deshidrogenasa PQQ-dependiente (EC 1.1.99.17), gluconato deshidrogenasa (EC 1.1.99.3), 2-cetogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.99.4) y 5-cetogluconato deshidrogenasa (todas enzimas ligadas a la membrana) se midieron utilizando DCIP y metosulfato de fenazina (MPS), según el método de Matsushita y colaboradores (1982) modificado para células enteras. Se midieron las actividades de las enzimas en todos los cultivos y en todas las etapas de cada uno de ellos empleando un espectrofotómetro Beckman DU 640. Cada cultivo se realizó en dos oportunidades diferentes, cada una por duplicado, y sus actividades fueron promediadas. Para todos los ensayos, un volumen apropiado (50-100 ml) fue tomado de cultivos a distintas D.O., las cuales coincidían con distintas etapas de crecimiento. Se centrifugó a 12.000 g y 4 °C, y el pellet fue lavado dos veces con buffer fosfato 10 mM (pH: 6,0) conteniendo MgCl₂ 5 mM y Tritón 0,1 % v/v y resuspendido en el mismo buffer a una concentración final de aproximadamente 4,5 mg de células.ml⁻¹. Las medidas de actividad en células enteras se realizaron a 25 °C, pH 6,0. El peso seco de células en la mezcla de reacción fue de 0,10 mg.ml⁻¹. El coeficiente de extinción molar del DCIP (ϵ_{DCIP}) a 600 nm y pH 6,0 empleado para los cálculos de actividad, fue de 10,0 mM⁻¹ cm⁻¹. No fue necesaria la incubación con PQQ en las medidas de actividad de GDH, ya que en *G. diazotrophicus* este cofactor está unido covalentemente a la apoenzima (Galar y Boiardi, 1995). La glucosa ó gluconato fueron adicionados a una concentración final de 200 mM para las medidas de actividad de GDH y GaDH respectivamente, y para las medidas de las otras deshidrogenasas de membrana la concentración final de cetoácidos fue de 100 mM en la mezcla de reacción. En todos los ensayos enzimáticos la velocidad de reacción fue linealmente proporcional a la cantidad de extracto celular adicionado. La actividad específica de la enzima se expresó en nmoles de DCIP reducidos . mg proteína⁻¹ . min⁻¹, según el siguiente cálculo:

$$\text{Actividad específica} = \text{Actividad enzimática} / [\text{prot}]$$

$$\text{Actividad enzimática} = V_o \cdot V_M \cdot 10^6 \cdot (\epsilon_{DCIP} \cdot V_m)^{-1}$$

V_0 : $\Delta A \cdot \Delta t^{-1}$ Velocidad inicial de consumo de DCIP.

ΔA : disminución de Absorbancia a 600 nm en un Δt .

Δt : intervalo de tiempo (primeros 10-15 segundos).

V_M : Volumen de mezcla de reacción en ml.

V_m : Volumen de muestra en μ l.

$[prot]$: concentración de proteínas en $mg \cdot ml^{-1}$, considerando un contenido de proteínas del 60 % en la biomasa.

Las medidas de actividad de glucosa deshidrogenasa NAD-dependiente (EC. 1.1.1.47) y de hexoquinasa se realizaron en extractos libres de células (ELC) según las técnicas propuestas por De Ley (1996 modificada) y por Romanov y Martínez-Romero (1994), respectivamente. Las muestras fueron tomadas de cultivos "batch" tanto de la especie salvaje como del mutante GDH(-), crecidos ambos con glucosa $5,0 g \cdot l^{-1}$ y condiciones de No FBN, de igual manera que para las medidas enzimáticas en células enteras. Un volumen de 2 ml de células lavadas ($0,25 g \cdot ml^{-1}$) provenientes de los distintos cultivos, fue sometido a rotura por sonicación a $4^\circ C$ en un Sonicador Soniprep 150, de acuerdo a lo reportado por Atwood y colaboradores (1991). El extracto celular se centrifugó 2 veces 20 minutos a $15.000 g$. El sobrenadante se llevó a una concentración de proteínas de $1 mg \cdot ml^{-1}$ con el buffer de lavado y se empleó como ELC. La concentración de proteínas en la mezcla de reacción fue de $0,05 mg \cdot ml^{-1}$. En la medida de actividad de glucosa deshidrogenasa NAD-dependiente se empleó buffer KH_2PO_4 $50 mM$ pH 7.6 en lugar del buffer propuesto en la técnica de De Ley (1996).

II.3.6. Cinética de la oxidación de glucosa por células intactas

La cinética de oxidación de glucosa por células intactas de *G. diazotrophicus* fue investigada a través de medidas de velocidad de consumo de DCIP, empleando metosulfato de fenazina (PMS), según Matsushita y colaboradores (1982), a concentraciones apropiadas de glucosa. Las células empleadas fueron provenientes de cultivos "batch" y se procesaron según se describió anteriormente en *Ensayos enzimáticos*. Con los resultados obtenidos se realizó un gráfico para la determinación de K_m aparente y V máxima.

II.4. Resultados

II.4.1. Determinación de parámetros cinéticos de los cultivos "batch"

G. diazotrophicus fue crecido en cultivos "batch" sin control de pH, con diferentes fuentes de Carbono y de Nitrógeno, a fin de estudiar detalladamente los cambios en los perfiles de crecimiento causados por modificaciones en el medio de cultivo. Como muestra la *Figura II.2.*, cultivos con glucosa ($5,0 \text{ g.l}^{-1}$) y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($2,64 \text{ g.l}^{-1}$) (No FBN) presentaron un patrón de crecimiento trifásico. Durante la primera fase se registró una rápida desaparición de glucosa conjuntamente con una elevada producción de ácido glucónico y un abrupto descenso del pH, sin registrarse aumento significativo en la concentración de biomasa. La velocidad específica de crecimiento fue muy baja ($0,06 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$) (*Figura II.3.*) en la primera etapa de esta fase (hasta que la D.O. alcanzó valores de aproximadamente 0,07-0,08), a pesar de haberse consumido un 50-70 % de la fuente de Carbono y energía. Desde este momento y hasta que la glucosa alcanzó valores de concentración menores a $1,0 \text{ g.l}^{-1}$ (menos de un 20 % de la concentración inicial), el microorganismo creció a una velocidad específica de $0,12 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ (*Figura II.3.*), y el pH disminuyó a valores del orden $3,15 \pm 0,05$ (fin de la primera fase). En una segunda fase de crecimiento se registró un consumo neto de ácido glucónico con una concomitante acumulación de cetoácidos hasta valores de $1,5 \text{ g.l}^{-1}$ en el sobrenadante de los cultivos. No se registró producción de cetoácidos hasta que la concentración de glucosa fue menor que $1,0 \text{ g.l}^{-1}$. En este período la velocidad específica de crecimiento fue de $0,17 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ (*Figura II.3.*). El pH del medio continuó bajando, no tan rápidamente como en la primera fase, hasta alcanzar valores de $2,75 \pm 0,05$. La tercera fase comenzó cuando el ácido glucónico alcanzó valores de concentración del orden $1,0-1,6 \text{ g.l}^{-1}$ y se inició el consumo del 2-cetoglucónico producido, lo que fue acompañado con un leve ascenso del pH del medio hasta el final del cultivo.

El rendimiento en biomasa fue de $0,13 \pm 0,02 \text{ g.g}^{-1}$, valor relativamente bajo si se lo compara con los normalmente reportados para otras bacteria aerobias cultivadas en condiciones similares (Heijnen y van Dijken, 1992).

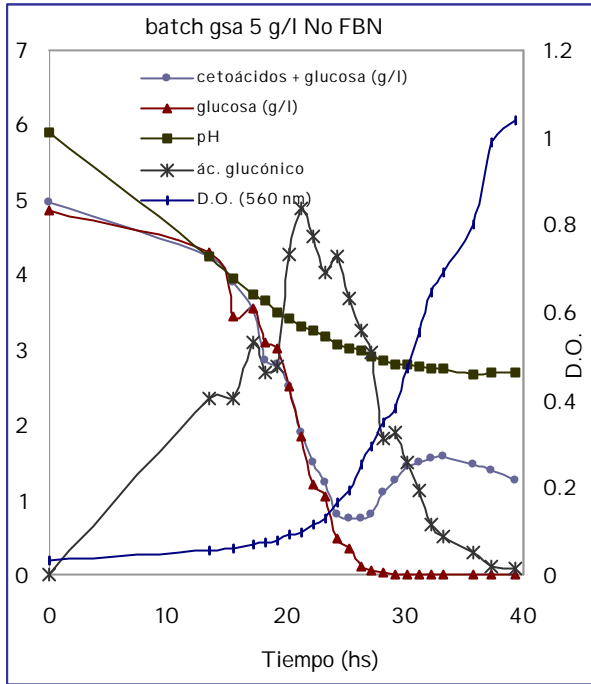


Figura II.2. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de producto de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* creciendo en glucosa 5 g.l⁻¹ y condiciones de No FBN.

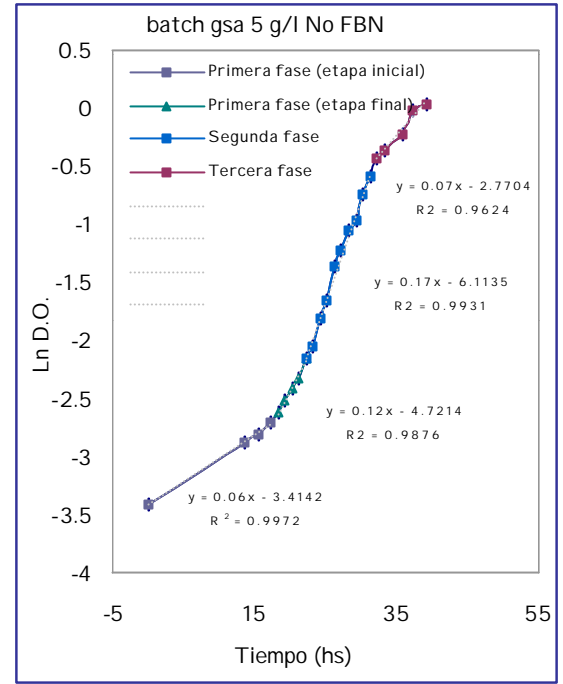


Figura II.3. Ln D.O. vs. Tiempo. A cada lado de la curva se muestran las ecuaciones de recta correspondientes a las líneas de tendencia. La pendiente de cada recta es la velocidad específica de crecimiento del microorganismo (*i*) en esa etapa.

Cultivos realizados con glucosa 10,0 g.l⁻¹ (Figura II.4.) mostraron los mismos perfiles que los realizados anteriormente con glucosa 5,0 g.l⁻¹ y, al igual que estos últimos, se registró producción de cetoácidos (concentración máxima aprox. de 3,0-4,0 g.l⁻¹) cuando la concentración de glucosa alcanzó valores inferiores a 1,0 g.l⁻¹ aproximadamente.

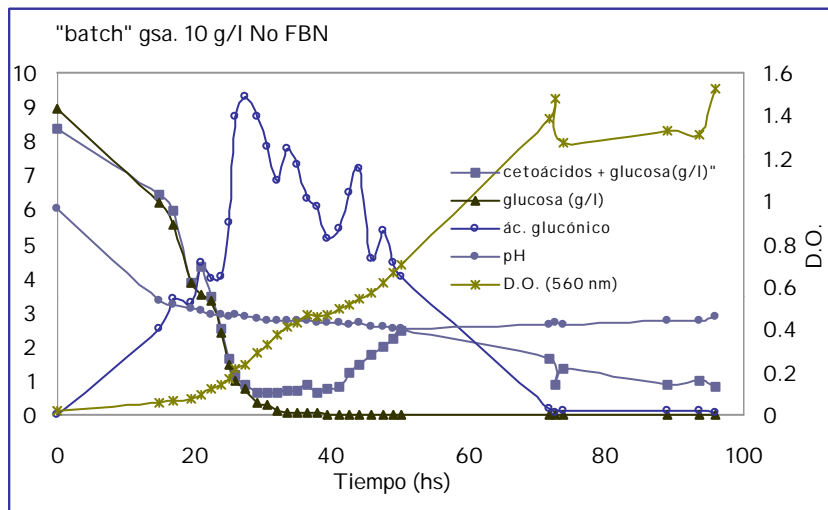


Figura II.4. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de producto de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* creciendo en glucosa 10 g.l⁻¹ y condiciones de No FBN.

G. diazotrophicus también fue cultivado con $5,0 \text{ g.l}^{-1}$ de ácido glucónico y Nitrógeno fijado (No FBN), para estudiar el comportamiento del microorganismo en condiciones donde no presentara una GDH activa. En estos cultivos mostró un patrón de crecimiento bifásico similar a las dos últimas etapas de crecimiento de los cultivos crecidos con glucosa, con la diferencia que con ácido glucónico como fuente de Carbono y energía el pH del medio aumentó. La primera fase correspondió a un crecimiento ($\mu = 0,19 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$) con un consumo neto de ácido glucónico y una concomitante producción de cetoácidos; y la segunda fase correspondió al crecimiento ($\mu = 0,20 \pm 0,08 \text{ h}^{-1}$) a expensas de los cetoácidos producidos (Figura 11.5). Se registró producción de cetoácidos desde el inicio del cultivo, los cuales llegaron a valores de concentración de $3,0 \text{ g.l}^{-1}$, y no comenzó su consumo hasta que la concentración de glucónico disminuyó a valores del orden $1,5 \text{ g.l}^{-1}$ (al igual que los cultivos con glucosa). El rendimiento en biomasa fue superior al alcanzado en cultivos con glucosa ($0,26 \pm 0,01 \text{ g.g}^{-1}$), a pesar de haberse desarrollado en condiciones de alcalinidad alcanzando valores de pH cercanos a 8,0 (Figura 11.5).

Un cultivo en condiciones de No FBN y con glicerol (como única fuente de Carbono y energía) fue llevado a cabo con el fin de estudiar el crecimiento del microorganismo en un sistema en el que ninguna enzima de la ruta periplasmática se encontrara activa. Estos cultivos presentaron valores de μ de $0,12 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ y un descenso lento del pH del medio, ya que no hubo producción de ácido glucónico ni de cetoácidos, hasta un valor final aproximadamente de 2,8-2,9 (Figura 11.6).

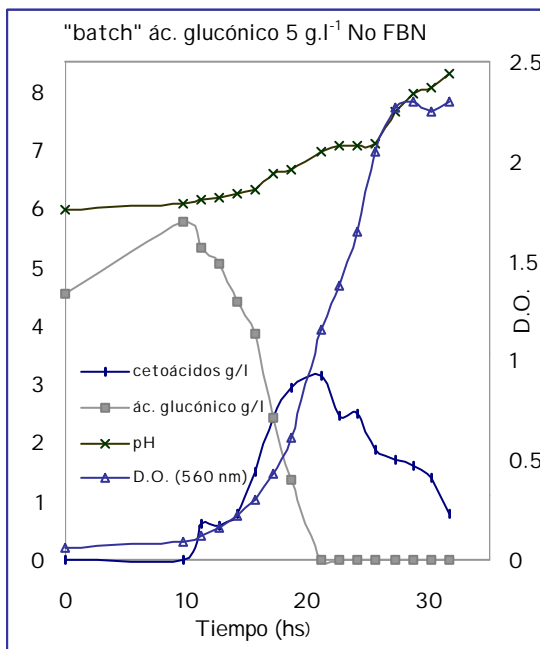


Figura 11.5. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de producto de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* creciendo en ácido glucónico 5 g.l^{-1} y condiciones de No FBN.

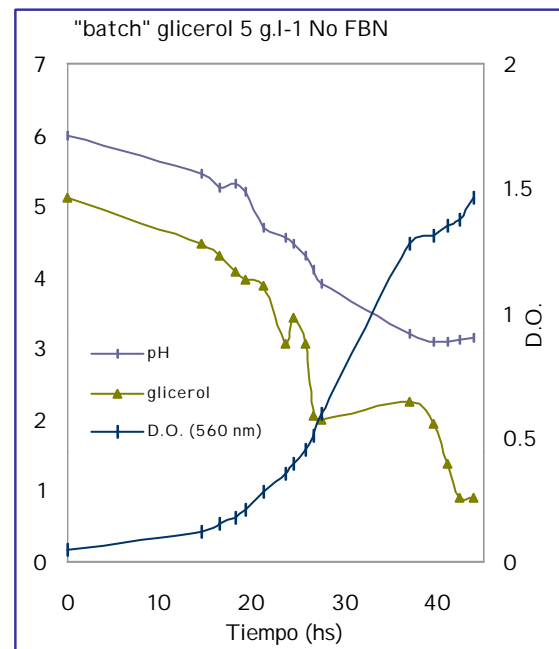


Figura 11.6. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de producto de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* creciendo en glicerol 5 g.l^{-1} y condiciones de No FBN.

Posteriormente se realizaron cultivos semejantes a los anteriores sólo que se lograron condiciones de FBN empleando una dosis "starter" de $0,132 \text{ g.l}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Estos cultivos "batch" con glucosa se comportaron cinéticamente como aquellos creciendo en condiciones de No FBN hasta que la concentración de microorganismos alcanzó valores de $0,2\text{-}0,3 \text{ g.l}^{-1}$, que es la concentración de biomasa que se podía generar a partir de la dosis de Nitrógeno fijado empleada (como lo indican los balances de masa en donde se considera que la biomasa posee un 11 % de contenido de Nitrógeno). Luego los cultivos pasaron por una etapa de no-crecimiento y aparente fase de acomodamiento a las nuevas condiciones de cultivo y, finalmente, crecieron fijando N_2 a velocidades específicas del orden $0,07 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$, y a expensas del consumo de los cetoácidos producidos, ya que la glucosa y en la mayoría de los casos también el ácido glucónico producido, se consumieron mucho más rápido que los $0,132 \text{ g.l}^{-1}$ de dosis "starter" de sulfato de amonio (antes de comenzar a fijar N_2) (Figura 11.7). Estos cultivos presentaron los mismos perfiles de pH que aquellos realizados en condiciones de No FBN, sólo que en la etapa de fijación de N_2 el pH del medio aumentó hasta aproximadamente 3,5 (Figura 11.7. etapa final).

En condiciones de FBN, y con ácido glucónico como fuente de Carbono y energía (Figura 11.8), el comportamiento del cultivo, mientras consumía la dosis "starter" de Nitrógeno fijado para crecer, fue igual al que presentaba en condiciones de No FBN, y luego fue semejante a la etapa de fijación de N_2 de los cultivos llevados a cabo con glucosa. El pH final alcanzado fue en general algo superior comparado con el de los mismos cultivos llevados a cabo con Nitrógeno fijado (Figura 11.5).

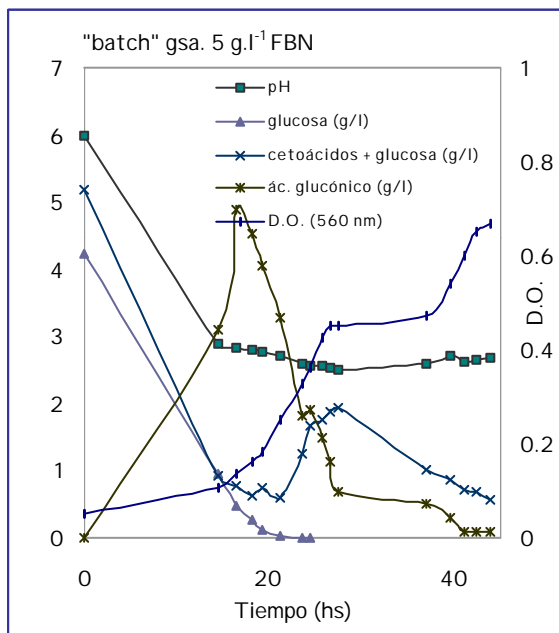


Figura 11.7. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de producto de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* creciendo en glucosa 5 g.l^{-1} y condiciones de FBN.

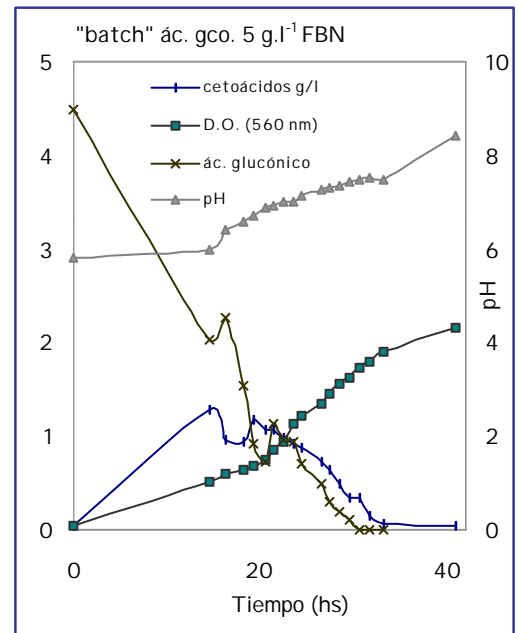


Figura 11.8. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de producto de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* creciendo en ácido glucónico 5 g.l^{-1} y condiciones de FBN.

Se realizaron cultivos utilizando concentraciones iniciales de glucosa más elevadas que en los experimentos indicados anteriormente para observar que ocurría cuando los microorganismos fijaban N_2 en condiciones de exceso de glucosa ya que, al expresar un consumo de glucosa tan rápido en los experimentos realizados con glucosa $5,0 \text{ g.l}^{-1}$, la fijación de N_2 ocurría a expensas de los metabolitos producidos a partir de la glucosa y no debido al consumo de este azúcar por una GDH activa. Los cultivos que se realizaron con glucosa $50,0 \text{ g.l}^{-1}$ y en condiciones de FBN, se comportaron de manera semejante a los cultivos anteriores mientras crecían en presencia de Nitrógeno fijado, sólo que acidificaban más (y más rápidamente) el medio, y por lo tanto en el momento que comenzaban a fijar N_2 , el crecimiento ya estaba frenado por la extrema acidez. Comenzó a producir cetoácidos cuando la concentración de glucosa alcanzó concentraciones del orden $10,0\text{-}11,0 \text{ g.l}^{-1}$, pero continuó consumiendo la glucosa hasta su totalidad. Cultivos con $50,0 \text{ g.l}^{-1}$ de glucosa y Nitrógeno fijado tuvieron un comportamiento semejante y dejaron de crecer al llegar a valores de pH de 2,5. Por tal motivo, se llevaron a cabo cultivos con glucosa $50,0 \text{ g.l}^{-1}$ y condiciones de FBN pero controlando el pH a 6,0. Estos cultivos tuvieron el mismo comportamiento que los anteriores realizados con glucosa $50,0 \text{ g.l}^{-1}$ y sin control de pH, sólo que después de la etapa de acomodamiento, pudieron fijar N_2 ya que la acidez del medio fue neutralizada. En la etapa inicial de FBN los microorganismos crecieron a expensas del consumo neto de glucosa (que en ese momento había llegado a una concentración de aproximadamente $15,0 \text{ g.l}^{-1}$) a una velocidad específica de $0,09 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$, hasta que la concentración de la misma fue menor de $10,0 \text{ g.l}^{-1}$. Luego comenzaron a consumir el ácido glucónico produciendo cetoácidos y continuaron creciendo a una velocidad específica baja ($0,08 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$). La máxima concentración de cetoácidos alcanzada fue de $2,5 \text{ g.l}^{-1}$ y, al finalizar el cultivo, después de haberlos consumido por completo, la concentración de biomasa fue de $2,0 \text{ g.l}^{-1}$. Por tanto los rendimientos fueron tan bajos como $0,045 \pm 0,001 \text{ g.g}^{-1}$.

La obtención de un mutante no productor de ácido glucónico, es decir fenotípicamente GDH(-), que fue capaz de crecer en glucosa como única fuente de Carbono, permitió estudiar con más profundidad la ruta periplasmática de oxidación directa de la glucosa (Ver Obtención del mutante en el *Apéndice 1*). En cultivos del mutante GDH(-) llevados a cabo con glucosa y Nitrógeno fijado, no se registró producción de ácido glucónico ni de cetoácidos (*Figura 11.9*). La velocidad específica de crecimiento en dichos cultivos fue de $0,12 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ durante todo el cultivo. El descenso de pH fue muy lento comparado con cultivos de la cepa salvaje llevados a cabo en las mismas condiciones y fue semejante al obtenido con cultivos de esta última creciendo en glicerol (*Figura 11.6*). Los rendimientos en biomasa fueron superiores a los de la cepa salvaje ($0,24 \pm 0,02 \text{ g.g}^{-1}$). En medios que contenían ácido glucónico y Nitrógeno fijado, el mutante produjo cetoácidos (concentraciones entre $1,5$ y $2,5 \text{ g.l}^{-1}$) y creció a una velocidad específica similar a la de la cepa salvaje (*Figura 11.10*).

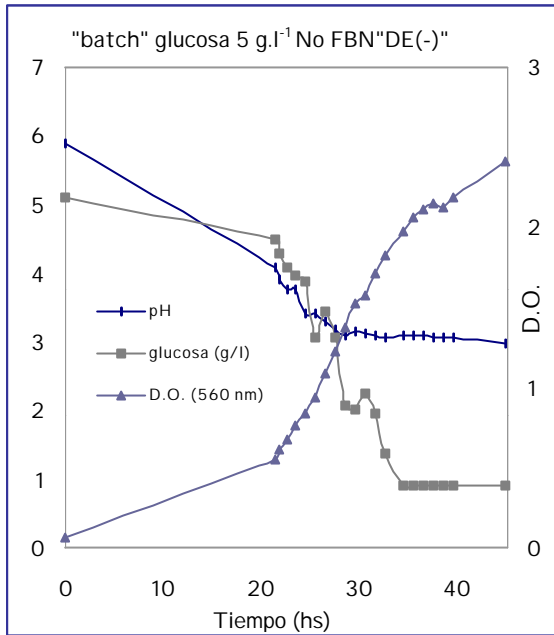


Figura II.9. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de producto de cultivos "batch" del mutante "DE" de *G. diazotrophicus* creciendo en glucosa 5 g.l⁻¹ y condiciones de No FBN.

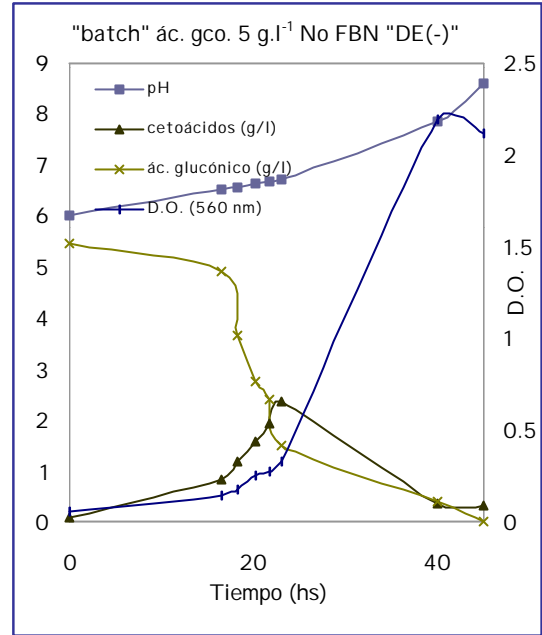
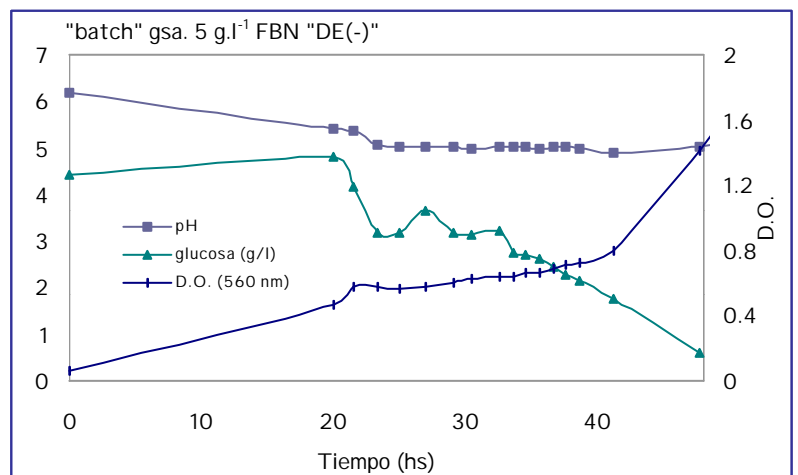


Figura II.10. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de producto de cultivos "batch" del mutante "DE" de *G. diazotrophicus* creciendo en ác. gluc.ónico 5 g.l⁻¹ y condiciones de No FBN.

Cultivos del mutante con glucosa y en condiciones de FBN crecieron lentamente, al igual que la cepa salvaje. En dichos cultivos se registró sólo un leve descenso de pH (una unidad) al comienzo del cultivo debido al consumo de la dosis "starter" de amonio y luego, en la etapa de fijación de N₂, permaneció prácticamente constante (Figura II.11).

Figura II.11. Curvas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de producto de cultivos "batch" del mutante "DE" de *G. diazotrophicus* creciendo en glucosa 5 g.l⁻¹ y condiciones de FBN.



Los cambios de pH que se registraron en todos los cultivos "batch", coincidieron perfectamente con la producción y/o consumo de ácidos (ácido glucónico y cetoácidos) y con la liberación de H⁺ que ocurría para mantener la electroneutralidad a través de la membrana celular en medios donde el amonio (NH₄⁺) era la fuente de Nitrógeno.

En relación a la producción de cetoácidos, cabe aclarar que al no poseer una metodología específica para cuantificar a todos ellos por separado, sólo podemos asegurar si hay producción de cetoácidos y cuantificar su concentración total (por el método de DNS). La producción de 2-cetoglucónico se siguió por el método de Cohen y estuvo de acuerdo con los resultados obtenidos por Atwood y colaboradores (1991). Este parecería ser el cetoácido mayormente producido en las condiciones de cultivo estudiadas. En la mayoría de los cultivos con glucosa, la diferencia entre la medida de las sustancias reductoras por DNS y la medida de glucosa por glucosa oxidasa, coincidió perfectamente con los valores obtenidos por el método de Lanning y Cohen (1951). De igual manera, en los cultivos con ácido glucónico el valor de concentración de 2-cetoglucónico por el método de Lanning y Cohen fue el mismo que el obtenido por el método de azúcares reductores. En las etapas finales de los cultivos tanto en glucosa como en ácido glucónico apareció coloración marrón en los sobrenadantes atribuida a la producción de ácido 2,5-dicetoglucónico (Stephan *et al.*, 1991), solo que en los cultivos con ác. glucónico se observaba antes y con mayor intensidad.

En cuanto a las velocidades específicas de oxidación de glucosa (q_s , *Tabla II.1.*), se observó que los cultivos de la cepa salvaje tenían elevados valores de q_s y éstos fueron mayores en condiciones de FBN. Los cultivos del mutante con glucosa arrojaron valores de q_s significativamente más bajos que los de la cepa salvaje.

	q_s salvaje		q_s mutante DE(-)	
	No FBN	FBN	No FBN	FBN
D.O. < 0.1	952	1400	130	117
D.O. 0.1-0.2	612	320	130	117

Tabla II.1. Velocidades específicas de consumo de glucosa *in situ* de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido con glucosa (5,0 g.l⁻¹ y 10,0 g.l⁻¹) y sulfato de amonio 2,64 g.l⁻¹ ó 0,132 g.l⁻¹. Las velocidades están expresadas en nmoles glucosa . min⁻¹. mg proteína⁻¹ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %).

Algunos de los cultivos realizados anteriormente se repitieron en fermentadores para poder estudiar el consumo de O₂ y la producción de CO₂. Los valores de q_{O_2} y de q_{CO_2} de los cultivos se muestran en la *Tabla II.2.* y *Tabla II.3.*

	salvaje/glucosa		salvaje/glucónico		DE(-)/glucosa	
	q _{O₂}	q _{CO₂}	q _{O₂}	q _{CO₂}	q _{O₂}	q _{CO₂}
1ra fase	70	15	Nc*	Nc	11,6	9,7
2da fase	36	24	24	13	11,6	9,7
3ra fase	11	9	14	13	11,6	9,7

Tabla II.2. Velocidades específicas de consumo de O₂ y producción de CO₂ in situ de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido con glucosa o ácido glucónico (5,0 g.l⁻¹) y en condiciones de No FBN. La primera fase corresponde al consumo neto de glucosa, la segunda al de ácido glucónico y la tercera al de cetoácidos. Las velocidades están expresadas en mmoles de O₂ o de CO₂ . min⁻¹. mg proteína⁻¹ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %). *Nc: no corresponde.

	salvaje/glucosa		salvaje/glucónico		salvaje/glucosa 50 g.l ⁻¹ pH 6.0		DE(-)/glucosa	
	q _{O₂}	q _{CO₂}	q _{O₂}	q _{CO₂}	q _{O₂}	q _{CO₂}	q _{O₂}	q _{CO₂}
1ra fase	50	12	Nc*	Nc	nd	nd	nd	nd
2da fase	34	24	nd**	nd	32	13	nd	nd
3ra fase (FBN)	11	11	11	10	24	12	13,7	11,4
4ta fase (FBN)	7	7,5	5,5	5,6	13	10	13,7	11,4
5ta fase (FBN)					8,5	7,8		

Tabla II.3. Velocidades específicas de consumo de O₂ y producción de CO₂ in situ de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido con glucosa o ácido glucónico 5,0 g.l⁻¹ y en condiciones de FBN. La primera fase corresponde al consumo neto de glucosa, la segunda al de glucónico, la tercera al de glucónico fijando N₂ y la cuarta al de cetoácidos fijando N₂. En el cultivo de glucosa 50 g.l⁻¹ y pH controlado hasta la 3ra etapa (incluida) el consumo neto es sólo de glucosa, y luego que la concentración de glucosa es menor que 10,0 g.l⁻¹ comienza el consumo neto de glucónico (4ta fase). Las velocidades están expresadas en mmoles de O₂ o de CO₂. min⁻¹. mg proteína⁻¹ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %). Nc*: denota no corresponde. nd**: denota no dosado.

Como muestran las Tablas II.2. y II.3. se observaron elevados valores de q_{O₂} en cultivos creciendo en glucosa en la primera etapa donde la GDH oxidaba sustrato activamente. Las medidas de las velocidades específicas de producción de CO₂ en esa misma etapa de crecimiento (exceso de glucosa) fueron mucho menores que las de consumo de O₂, resultando un cociente respiratorio de 0,2-0,4 aproximadamente. En etapas posteriores el cociente respiratorio (CR) fue aumentando. En cultivos con glucosa y FBN (en ausencia ya de glucosa) el CR se mantuvo cercano a la unidad y las velocidades específicas de consumo y producción de O₂ y CO₂ fueron más bajas que en condiciones de No FBN ya que la velocidad

específica de crecimiento fue baja. En cultivos fijando N_2 en presencia de glucosa y pH 6,0 (50,0 g.l⁻¹ de glucosa inicial y pH controlado) si bien el CR fue menor que 1, la velocidad de consumo de O_2 no fue muy elevada. En el caso de cultivos con glucónico y FBN el CR también fue cercano a 1 durante la etapa de fijación de N_2 , y los valores de q_{O_2} y q_{CO_2} fueron semejantes a los de los cultivos con glucosa, inclusive a los realizados con glucosa 50,0 g.l⁻¹ y control de pH. Los valores de q_{O_2} del mutante fueron semejantes en los distintos cultivos realizados y constantes en el tiempo, al igual que los valores de q_{CO_2} , y se registró un cociente respiratorio de alrededor de 0,8. Los cambios en las velocidades específicas de consumo y producción O_2 y CO_2 coincidieron, en todos los casos, con cambios en la velocidad específica de crecimiento, a causa de un cambio en el metabolismo.

11.4.2. Determinación de actividades enzimáticas

Con el fin de estudiar el significado funcional de la GDH en *G. diazotrophicus* bajo la influencia de diferentes condiciones ambientales, se llevó a cabo un estudio de la actividad de esta enzima en cultivos "batch" con distintas fuentes de Carbono y de Nitrógeno. También se realizaron medidas de actividad de las restantes enzimas de la ruta de oxidación directa de la glucosa (GaDH, 2 y 5-cetoGaDH). Todas las medidas de actividad enzimática fueron realizadas con células enteras, ya que al emplear extractos libres de células, tanto la muestra como la referencia (sin sustrato carbonado) decoloraban al DCIP inespecíficamente.

11.4.2.1. Cultivos "batch" de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

11.4.2.1.a. Con glucosa

Las actividades enzimáticas se midieron primero en células enteras provenientes de cultivos "batch" con Nitrógeno fijado, en diferentes etapas de crecimiento y, de acuerdo a lo expuesto anteriormente, a cada etapa le correspondió un determinado intervalo de densidades ópticas:

1ra fase: D.O. menor que 0,1-0,15; 2da fase: D.O. entre 0,15-0,6; 3ra fase: D.O. mayor que 0,6.

Acorde con investigaciones previas (Alvarez y Martínez-Drets, 1995), se registró la presencia de todas las enzimas de la ruta oxidativa de la glucosa (*Tabla 11.4*). Se encontró que tanto GDH como GaDH presentaban una disminución de su actividad conforme el cultivo se acercaba a la fase estacionaria. Resultados similares fueron encontrados para cultivos de *Gluconobacter oxydans* en condiciones semejantes, en los cuales la actividad de GDH disminuía profundamente entre las 20 y 40 hs de fermentación, no obstante continuaba el crecimiento (Quazi *et al.*, 1991).

	GDH		GaDH		2 y 5-ceto GaDH
	5.0 g.l ⁻¹	10.0 g.l ⁻¹	5.0 g.l ⁻¹	10.0 g.l ⁻¹	5.0 – 10.0 g.l ⁻¹
1ra fase	255	300	204	215	77-176
2da fase	214	100	74	220	nd*
3ra fase	76	55	0	23	nd

Tabla II.4. Actividades enzimáticas de células provenientes de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido con glucosa y en condiciones de No FBN. Las actividades están expresadas en nmoles DCIP red . min⁻¹. mg proteína⁻¹ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %). *nd: denota no dosado.

Los cultivos realizados con glucosa 10,0 g.l⁻¹ mostraron el mismo perfil enzimático que aquellos crecidos en glucosa 5,0 g.l⁻¹ (Tabla II.4). En los distintos cultivos realizados, si bien hubo variación en los valores absolutos de las actividades enzimáticas y de las velocidades específicas, siempre se mantuvieron las relaciones.

En los cultivos realizados en condiciones de FBN, los valores de actividad de GDH y GaDH fueron superiores a aquellos donde el Nitrógeno estaba en exceso y no había FBN (Tabla II.5). Elevados valores de actividades enzimáticas coincidieron con elevadas velocidades específicas de consumo de glucosa, pero sólo se pudieron comparar en la primera fase del cultivo donde aún no había fijación de N₂ ya que la concentración de glucosa no fue suficiente como para alcanzar la etapa de fijación en presencia de dicho azúcar (Tabla II.5). Los valores de actividad de GDH en la primera etapa del cultivo, donde se consumió la glucosa rápidamente y no hubo prácticamente crecimiento, estuvieron en concordancia con las velocidades de oxidación de glucosa (q_s) "in vivo" en cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* (Tabla II.5).

	No FBN			FBN		
	GDH	q _s	GaDH	GDH	q _s	GaDH
1ra fase	255	952	204	470	1400	340
2da fase	214	612	74	450	320	337
3ra fase	76	Nc*	0	335	Nc	350

Tabla II.5. Actividades enzimáticas y velocidades específicas de consumo de glucosa in situ de células provenientes de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido con glucosa 5,0 g.l⁻¹ y en condiciones de No FBN ó glucosa 10,0 g.l⁻¹ y FBN. Las actividades están expresadas en nmoles DCIP red . min⁻¹. mg proteína⁻¹ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %). *Nc: no corresponde.

Posteriormente se llevaron a cabo cultivos con $50,0 \text{ g.l}^{-1}$ de glucosa con la intención de registrar los valores de actividad de GDH en condiciones de fijación de N_2 y en presencia de exceso de glucosa, pero según lo expuesto anteriormente, fue necesario para ello realizar cultivos a pH controlado. Los resultados se muestran en la *Tabla 11.6*.

	No FBN		FBN		FBN/pH controlado	
	GDH	GaDH	GDH	GaDH	GDH	GaDH
1ra fase	373	80	515	135	541	128
2da fase	113	0	360	120	314	134
3ra fase	0	0	205	17	261	133
D.O. 1.0					129	81
D.O. 2.0					115	54

Tabla 11.6. Actividades enzimáticas de células provenientes de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido con glucosa $50,0 \text{ g.l}^{-1}$ y bajo condiciones de No FBN ó FBN, con y sin control de pH. Las actividades están expresadas en $\text{nmoles DCIP red. min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %).

En estos experimentos nuevamente se observó que en condiciones de FBN se estimuló la síntesis de GDH (y también de GaDH), ya que los valores de actividades fueron superiores a los de los cultivos en exceso de amonio. En los cultivos a pH controlado y glucosa $50,0 \text{ g.l}^{-1}$ se observó que la actividad de GDH se mantuvo elevada durante gran parte del cultivo, al igual que los cultivos en los que la glucosa inicial fue $5,0 \text{ g.l}^{-1}$. No obstante, no se registraron diferencias en los valores de actividad de cultivos fijando N_2 sin control de pH con aquellos realizados a pH controlado, a pesar de ser esta última la única condición lograda de cultivo en la que glucosa y GDH (por lo tanto, una GDH activa) estuvieron presentes conjuntamente en el momento de fijar N_2 . También en todos estos cultivos las actividades enzimáticas tuvieron relación directa con los valores de q_s .

Además de medir actividades de las enzimas de la ruta de oxidación directa de la glucosa en células enteras, se obtuvieron extractos libres de células según se indicó en Materiales y Métodos, y se midió tanto la actividad de hexoquinasa como la de glucosa deshidrogenasa NAD-dependiente en ELC de cultivos con glucosa como sustrato limitante. Al igual que en reportes previos (Alvarez y Martínez Drets, 1991), prácticamente no se encontró actividad hexoquinasa ($20 \text{ nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$) y la actividad de la glucosa deshidrogenasa NAD-dependiente fue muy baja ($25 \text{ nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$) a todas las densidades ópticas ensayadas correspondientes a las distintas etapas de los cultivos, excepto en aquellos cultivos llevados a cabo con glucosa $50,0 \text{ g.l}^{-1}$ ($1250 \text{ nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$). Como se mencionó con anterioridad las medidas de actividad para la GDH PQQ-dependiente en extractos libres de células fueron difíciles de interpretar empleando tanto

DCIP como WB como aceptores de electrones, ya que sin el agregado del sustrato (glucosa) aparecía una rápida e inespecífica decoloración del indicador.

II.4.2.1.b. Con ácido glucónico

Las actividades enzimáticas se midieron en células enteras provenientes de cultivos "batch" en diferentes etapas de crecimiento y de acuerdo a lo expuesto anteriormente, a cada etapa le correspondió un determinado rango de densidades ópticas: 1ra fase: D.O. menor que 1,15-1,5; 2da fase: D.O. superior a 1,15-1,5

Se encontró que están presentes las enzimas de la ruta oxidativa del ácido glucónico: gluconato deshidrogenasa, 2-cetogluconato deshidrogenasa y 5-cetogluconato deshidrogenasa (*Tabla II.7*).

Etapas de crecimiento	GaDH	2-cetoGaDH	5-cetoGaDH	GDH
1ra fase D.O. 0.10	328	nd*	nd*	556
1ra fase D.O. 0.30	290	122	145	600
1ra fase D.O. 0.50	308	172	155	479
2da fase D.O. 1.15	166	156	199	470
2da fase D.O. 2.00	20	20	20	20

Tabla II.7. Actividades enzimáticas de células provenientes de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* PAL 3 cultivado con glucónico 5,0 g.l⁻¹ y condiciones de No FBN. Las actividades están expresadas en nmoles DCIP red . min⁻¹. mg proteína⁻¹ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %). *nd denota no dosado.

Como muestra la *Tabla II.7.*, también se registró actividad GDH en todos los cultivos, (a pesar de ser el ácido glucónico la fuente de Carbono y energía) y con valores elevados que permanecieron hasta la fase exponencial tardía.

II.4.2.1.c. Con glicerol

Las actividades enzimáticas se midieron en células enteras provenientes de cultivos "batch" en diferentes etapas de crecimiento y, de acuerdo a lo expuesto anteriormente, en este caso no hubo producción de ácidos y durante todo el cultivo el microorganismo creció a expensas del glicerol. Por lo tanto, las etapas en las que se tomó muestra de células fueron exponencial temprana (D.O. 0,1), exponencial media (D.O. 0,35) y exponencial tardía (D.O. 0,5-1,0). Se encontró actividad de GDH así como de GaDH en todos los cultivos realizados con glicerol como fuente de Carbono y energía (*Tabla II.8*).

D.O	GDH	GaDH
0.1	312	214
0.35	385	143
0.59	491	165
1.09	129	114

Tabla II.8. Actividades enzimáticas de células provenientes de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido con glicerol 5,0 g.l⁻¹ y condiciones de No FBN. Las actividades están expresadas en nmoles DCIP red . min⁻¹. mg proteína⁻¹ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %).

II.4.2.2. Cultivos "batch" de un mutante de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3 (DE(-)) no productor de ácido glucónico

II.4.2.2.a. Con glucosa

En medios que contenían glucosa y en condiciones de No FBN el mutante GDH(-) presentó un crecimiento exponencial que siempre se debió al consumo de glucosa y a pesar de no producir ácido glucónico pues no presentó actividad de GDH, se encontró actividad de GaDH FAD-dependiente (Tabla II.9). Cultivos del mutante con glucosa y fijando N₂ arrojaron resultados semejantes.

En estos cultivos, al igual que para la cepa salvaje, se midió la actividad de las 3 enzimas ligadas al consumo de glucosa. No se encontró actividad de GDH ni de hexoquinasa y se encontró una elevada actividad de glucosa deshidrogenasa NAD-dependiente (437-287 nm NAD⁺ red . min⁻¹. mg proteína⁻¹), así como también se registró actividad de GaDH NAD-dependiente (562-723 nm NAD⁺ red . min⁻¹. mg proteína⁻¹).

II.4.2.1.b. Con ácido glucónico

Creciendo con ácido glucónico el mutante DE(-) presentó mayor actividad de GaDH FAD-dependiente que en los cultivos crecidos en glucosa como fuente de Carbono y energía (Tabla II.9).

D.O.	glucosa		glucónico	
	GDH	GaDH	GDH	GaDH
0.1	0	86	0	174
0.3	0	88	0	181

Tabla II.9. Actividades enzimáticas de células provenientes de cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* PAL 3 mutante DE(-), crecido con glucosa o ácido gluconico ($5,0 \text{ g.l}^{-1}$) y condiciones de No FBN. Las actividades están expresadas en $\text{nmoles DCIP red} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %).

II.4.3. Cinética de la oxidación de glucosa por células intactas

La cinética de oxidación de glucosa por células intactas de *G. diazotrophicus* fue investigada a través de medidas de velocidad de consumo de DCIP a varias concentraciones de glucosa. Un gráfico de los resultados indicó que los mismos respondieron a una cinética de Michaelis-Menten, con un K_m aparente de $4,5 \text{ mM}$ y una $V_{\text{máx}}$ de $236 \text{ nmoles de DCIP} \cdot \text{mg proteína}^{-1} \cdot \text{minuto}^{-1}$ (Figura II.10).

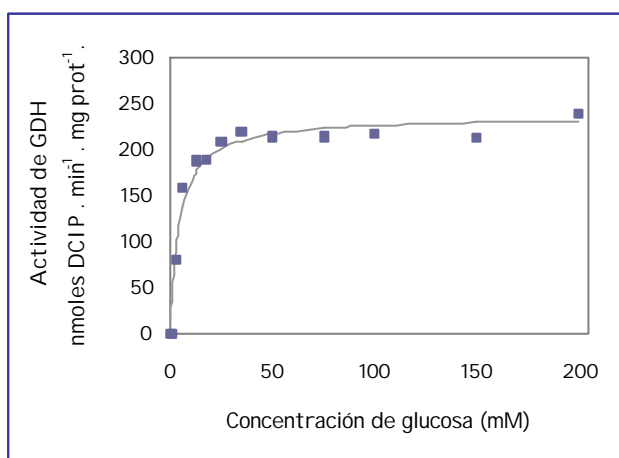


Figura II.10. Determinación del K_m y la V máxima de GDH en células lavadas de *G. diazotrophicus* PAL 3 a través de medidas de actividad enzimática. La gráfica responde a la ecuación de Michaelis-Menten $V_0 = K_m \cdot (S)/V_{\text{máx}} + (S)$.

11.5. Discusión

Es evidente que un valor de K_m aparente *in vitro* para la glucosa deshidrogenasa de 4,5 mM, con glucosa y células enteras de *G. diazotrophicus*, correspondería a un sistema de baja afinidad y es comparable con las constantes de afinidad de GDH-quinoproteínas de *A. calcoaceticus* (Dokter *et al.*, 1987), *P. fluorescens* (Matsushita y Ameyama, 1982) y *G. suboxidans* (Adachi y Ameyama, 1982). El análisis de los parámetros cinéticos de los cultivos "batch" de *G. diazotrophicus* con glucosa como fuente de Carbono y energía indica que este microorganismo crece a velocidades bajas comparadas con otros microorganismos que poseen semejantes rutas de asimilación de glucosa (Weenk *et al.*, 1984), a pesar de presentar elevadas velocidades específicas de consumo de glucosa y de oxígeno. Whiting y colaboradores (1976) han sugerido para *P. aeruginosa* que la rápida conversión de glucosa a 2-cetogluconato podría ser considerada una estrategia de secuestro de la fuente de Carbono en una especie química no tan rápidamente utilizable por bacterias que sí compitieran por glucosa. Por lo anteriormente expuesto, parece ser que para *G. diazotrophicus* creciendo en su habitat natural (interior de plantas ricas en azúcares) esta ruta de baja afinidad podría operar como un mecanismo de competición y, eventualmente, también podría funcionar como un mecanismo protector de la nitrogenasa tal como el reportado para *Azotobacter* sp. (Boiardi, 1994), dados los elevados consumos de oxígeno medidos en condiciones en que la GDH es activa.

Los resultados de las actividades enzimáticas sugieren que la síntesis de glucosa deshidrogenasa PQQ-dependiente no es regulada por el nivel de glucosa en el medio de cultivo, ya que cultivos realizados con ácido glucónico como única fuente de Carbono y energía presentan elevados valores de actividad enzimática. Estas conclusiones son reforzadas por aquellos experimentos donde células crecidas en glicerol también sintetizan activamente no sólo GDH PQQ-dependiente, sino también GaDH de membrana, indicando que ambas enzimas se sintetizan constitutivamente. Cultivos "batch" del mutante GDH(-) con ácido glucónico, presentaron valores de actividad de GaDH más elevados que aquellos realizados en presencia de glucosa, sugiriendo que a pesar de expresarse esta enzima constitutivamente, su síntesis puede ser estimulada por elevadas concentraciones de su propio sustrato. A través de un análisis detallado de las actividades de las enzimas de membrana en células de *G. diazotrophicus* creciendo en glucosa, se puede concluir que la GDH PQQ-dependiente es significativamente más activa en condiciones de FBN que en condiciones de No FBN. Lo mismo se observa con la GaDH, ambas medidas con células creciendo en medios mínimos con glucosa como única fuente de Carbono y energía (*Tabla 11.5*). Las actividades de estas enzimas en condiciones de No FBN son aproximadamente un 60-70 % de las actividades enzimáticas en condiciones de FBN y en este último caso, además, se mantuvieron altas a lo largo de todo el cultivo. En ambas condiciones la actividad de GDH mostró una relación directa con la velocidad específica de consumo de glucosa (q_s

"*in vivo*" en presencia de exceso de glucosa, primera etapa de crecimiento), con las velocidades específicas de consumo de O_2 (q_{O_2}) y de producción de ácido glucónico, y con un rápido decrecimiento del pH. Estos resultados son coincidentes con aquellos encontrados por Galar y Boiardi (1995) y por Flores-Encarnación y colaboradores (1999). Estos últimos proponen para *G. diazotrophicus* PAL 5 que los niveles de glucosa deshidrogenasa, citocromo c y oxidasas alternativas ba y bd son fuertemente afectados por la concentración de amonio en el medio. La oxidación extracelular de glucosa rinde energía biológicamente utilizable (PQQ reducido) que fluye directamente a la cadena respiratoria (van Schie *et al.*, 1985). Una rápida y directa oxidación de la glucosa por la GDH PQQ-dependiente puede contribuir a satisfacer las demandas energéticas de la célula, y más necesaria aún es dicha conversión si el microorganismo debe fijar N_2 , ya que la demanda energética en este caso es muy elevada. Los resultados de nuestros experimentos indican que solamente con cultivos "batch" a pH controlado y glucosa $50,0 \text{ g.l}^{-1}$ se consiguió fijar N_2 en presencia de una GDH activa, y los valores de actividad indican que en exceso de glucosa, aunque se esté fijando N_2 , no se estimula la síntesis de GDH PQQ-dependiente comparada con la registrada en cultivos limitados en glucosa y fijando N_2 . Analizando los valores de actividad de todos los cultivos realizados en condiciones de FBN concluimos que a pesar de no estar fijando N_2 al comienzo de los mismos (ya que crecen a expensas de una dosis "starter" de amonio), pareciera que los microorganismos de alguna forma registran el déficit de fuente de Nitrógeno fijado ya que responden aumentando la actividad de las enzimas ligadas directamente a la cadena respiratoria y las mantienen elevadas hasta el final del cultivo.

Asumiendo que la diversidad en la bioquímica microbiana es originada por una óptima adaptación de la maquinaria celular al estrés impuesto sobre el organismo por el ambiente natural, la diversidad en catálisis de una cierta reacción es de difícil interpretación (Duine *et al.*, 1986). Con este criterio, las quinoproteínas como la GDH deberían tener características que no se encuentren en otros grupos de oxidoreductasas, características que beneficien al organismo sólo en condiciones ambientales especiales. La GDH es una enzima periplasmática y está acoplada a la cadena respiratoria lo que le otorga una característica distintiva frente a otras enzimas que catalizan la misma reacción, tal como la GDH NAD-dependiente citoplasmática. En concordancia con los resultados obtenidos por Alvarez y Martínez-Drets (1995), los valores de las actividades enzimáticas en extractos libres de células de *G. diazotrophicus*, revelan una predominancia del sistema de la GDH dependiente de PQQ, ya que prácticamente no hay actividad hexoquinasa y la actividad de la GDH NAD-dependiente es comparativamente baja. Estos resultados coinciden con los obtenidos para *G. oxydans* creciendo en condiciones semejantes (Quazi *et al.*, 1991) e indican que la rápida oxidación de glucosa a gluconato y cetogluconatos ocurre a través de una vía de oxidación directa que no está ligada con el metabolismo de las pentosas fosfato. Por otro lado, la cepa salvaje de *G. diazotrophicus* presentó valores de velocidades específicas (q_s , q_{O_2}) mucho más elevados que los del mutante crecido en iguales condiciones,

el cual posee una elevada actividad de GDH NAD-dependiente citoplasmática. En cuanto a los rendimientos en biomasa de *G. diazotrophicus* creciendo en cultivos "batch" con sulfato de amonio, tanto limitados en glucosa como en gluconato, fueron más bajos que los comúnmente reportados para otras bacterias heterótrofas (Heijnen y van Dijken, 1992). No obstante, cultivos del mutante creciendo en iguales condiciones (en los que no se observó formación de producto) dieron rendimientos mayores que aquellos del organismo salvaje. Todo lo expuesto concuerda con que frente a una misma oferta de nutrientes no sobrevive el microorganismo al que le rinde más el sustrato (eficiencia energética) sino el que más rápido lo consume, indicando la posible importancia fisiológica de la GDH PQQ-dependiente para *G. diazotrophicus*.

Este microorganismo exhibe bajos rendimientos en cultivos "batch" ($0.12-0.15 \text{ g.g}^{-1}$) con glucosa comparados con aquellos realizados con glucónico como única fuente de Carbono y energía, y esto es acorde con que la eficiencia energética y la velocidad de producción de metabolitos en microorganismos son, en general, inversamente proporcionales (Linton y Rye, 1989). La lentitud de su crecimiento y las condiciones de extrema acidez a las que estuvieron sometidos los microorganismos durante el cultivo, son también probablemente causantes de los bajos valores de los rendimientos de los cultivos realizados con glucosa.

Observando los resultados de las medidas enzimáticas obtenidos con la cepa salvaje y con el mutante GDH(-), creciendo en glucosa como única fuente de Carbono y energía, se deduce claramente que la GDH ligada a membrana es la única enzima responsable de la rápida y extensa conversión de glucosa en gluconato por *G. diazotrophicus*. Si la GDH NAD-dependiente soluble está involucrada en la producción extracelular de gluconato, su contribución es cuantitativamente insignificante.

Los resultados de los experimentos también se analizaron desde el punto de vista de los mecanismos regulatorios, fundamentalmente en lo que se refiere a la producción secuencial de gluconato y cetogluconato a partir de glucosa. Al igual que *G. oxydans*, este fenómeno presumiblemente no es causado por represión de las enzimas relevantes, ya que éstas son sintetizadas constitutivamente. Aparentemente, la ausencia de acumulación de cetoácidos en los cultivos donde la glucosa está presente en exceso (*Figuras 11.2. y 11.4.*), no se puede atribuir a una baja concentración de gluconato en el cultivo durante la primera fase de crecimiento, sino más bien a la glucosa por sí misma. Experimentos llevados a cabo para establecer si la concentración de glucosa y/o gluconato determinan la producción secuencial de gluconato y cetogluconatos (cultivos "batch" con glucosa $50,0 \text{ g.l}^{-1}$) concluyen en que no es una determinada concentración de gluconato la desencadenante de la producción de cetoácidos y aparentemente tampoco una determinada concentración de glucosa, ya que en los cultivos con $50,0 \text{ g.l}^{-1}$ de glucosa inicial, la producción de cetoácidos comienza cuando la concentración de glucosa alcanza valores de $10,0 \text{ g.l}^{-1}$ y no de $0,5-1,0 \text{ g.l}^{-1}$ como en los casos donde la glucosa inicial es de $5,0$ ó $10,0 \text{ g.l}^{-1}$. Hay algunas evidencias circunstanciales que indican que la velocidad actual de oxidación de glucosa es uno de los mayores factores que controlan la acumulación de cetogluconatos. Weenk y colaboradores (1984) reportaron que

en *G. oxidans* el inicio de la formación de cetogluconato durante el crecimiento en cultivos "batch" con glucosa coincidía con una disminución de la velocidad específica de oxidación de glucosa de los cultivos. Simultánea formación de gluconato y cetogluconato fue también observada, cuando *G. oxydans* ATCC 621-H fue crecido en cultivos continuos limitados en glucosa y se encontró que la relación de estos productos fue dependiente de la velocidad de dilución empleada (Olijve y Kok, 1979b). En general, las deshidrogenasas ligadas a membrana donan sus electrones, directamente a la cadena de transporte de electrones. En el caso de las flavoproteínas, como la gluconato deshidrogenasa, usualmente estos componentes son ubiquinona y citocromo b (Matsushita *et al.*, 1979). Hay evidencias que indican que las glucosas deshidrogenasas PQQ-dependientes están también ligadas a la cadena respiratoria a nivel de ubiquinona ó citocromo b (Beardmore-Gray y Anthony, 1986; Duine *et al.*, 1984; Matsushita *et al.*, 1980, 1982; van Schie *et al.*, 1985). Levering y colaboradores (1988) reportaron que para *G. oxydans*, se podría especular que, durante la primer fase del crecimiento en cultivos "batch" con glucosa (exceso), la oxidación de la misma mediada por la GDH procede tan rápidamente que la cadena respiratoria se satura con electrones. Consecuentemente, los componentes redox serían incapaces de aceptar electrones de la GaDH, resultando en el retardo de las células para oxidar gluconato bajo estas condiciones. Tal modelo regulatorio de competición de varios componentes de la cadena respiratoria por los electrones parece ajustarse a los resultados indicados en este trabajo con *G. diazotrophicus*. No obstante, la elucidación de este mecanismo requerirá de futuras investigaciones.

II.5. Referencias

- Adachi O and Ameyama M (1982) D-Glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxidans*. *Methods Enzymol.* 89: 159-163.
- Alvarez B and Martínez-Drets G (1995) Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can. J. Microbiol.* 41: 918-924.
- Attwood M M, van Dijken J P and Pronk J T (1991) Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Ferment. Bioeng.* 72: 101-105.
- Beardmore-Gray M and Anthony C (1986) The oxidation of glucose by *Acinetobacter calcoaceticus*: the interaction of the quinoprotein glucose dehydrogenase with the electron transport chain. *J. Gen. Microbiol.* 132: 1257-1268.
- Bergmeyer H U and Bernt E (1977) *Methods Enzym. Anal.* Vol. 11: 1205-1212.
- Boiardi J L (1994) Metabolic cost of nitrogen incorporation by N₂-fixing *Azotobacter vinelandii* is affected by the culture pH. *Biotechnol. Lett.* 16: 1195-1198.
- Chaney A L and Marbach E P (1962) Modified Reagents for determination of urea and amonio. *Clin. Chem.* Vol. 8: 130-132.
- Cleton-Jansen A M, Goosen N, Wenzel T and van de Putte P (1988) Cloning of the gene encoding quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: evidence for the presence of a second enzyme. *J. Bacteriol.* 170: 2121-2125.
- Cooney C, Wang H and Wang D (1977) Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. *Biotechnol. Bioeng.* 19: 55-67.
- Dawes E A (1981) Carbon metabolism. In *Continuous Cultures of cells*, Vol. 2: 1-38. Edited by P. H. Calcott. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- De Ley (1966) Dehydrogenases and reductases: 2-ketogluconic acid reductase. *Methods Enzymol.* Vol. 9: 196-206.
- Doelle H W (1975) *Bacterial metabolism*: 274-278. London: Academic Press.
- Dokter P, Pronk J T, van Schie B J, van Dijken J P and Duine J A (1987) The in vivo and in vitro substrate specificity of quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79.41. *FEMS Microbiol. Lett.* 43: 195-200.
- Duine J A and Frank Jzn J (1981) Quinoproteins: a novel class of dehydrogenases. *Trends Biochem. Sci.* 6: 278-280.
- Duine J A, Frank J Jzn and Jongejan J A (1986) PQQ and quinoprotein enzymes in microbial oxidations. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 165-178.
- Duine J A, Frank J Jzn, Jongejan J A and Dijkstra M (1984) Enzymology of the bacterial methanol oxidation step. In *Microbial growth on C1 compounds*: 91-96 (Crawford R L and Hanson R S, eds). American Society for Microbiology, Washington DC.
- Flores-Encarnación M, Contreras-Zentella M, Soto-Urzuza L, Aguilar G R, Baca B E and Escamilla J E (1999) The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL 5. *J. Bacteriol.* Vol. 181 Nro 22: 6987-6995.
- Galar M L and Boiardi J L (1995) Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 713-716.
- Gornall A G, Bardawill C J and David M A (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-766.
- Heijnen J J and van Dijken J P (1991) In search of thermodynamic description of biomass yields for the chemotropic growth of microorganisms. *Biotechnol Bioeng* 39: 833-858.

- Herbert D, Phipps P J and Strange R E (1971) Chemical analysis of microbial cells. *Methods Microbiol.* 5B: 265-272.
- Hommel R W J, Postma P W, Neijssel O M, Tempest D W, Dokter P and Duine J A (1984) Evidence of quinoprotein glucose dehydrogenase apoenzyme in several strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 24: 329-333.
- Lambert M and Netsch A C (1950) Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions. *Can. J. Res.* Vol. 28: 83-89.
- Lanning M C and Cohen S S (1951) The detection and estimation of 2-ketohexonic acids. *J. Biol. Chem.* 189: 109-114.
- Lessie T G and Phibbs P V (1984) Alternative pathways of carbohydrates utilization in *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Microbiol.* 38: 359-387.
- Levering P R, Weenk G, Olijve W, Dijkhuizen L and Harder W (1988) Regulation of gluconate and ketogluconate production in *Gluconacetobacter oxydans* ATCC 621-H. *Arch. Microbiol.* 149: 534-539.
- Linton J D and Rye A J (1989) The relationship between the energetic efficiency in different microorganisms and the rate of metabolite overproduced. *J. Ind. Microbiol.* 4: 85-96.
- Matsushita K and Ameyama M (1982) D-Glucose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*, membrane-bound. *Methods Enzymol.* 89: 149-155.
- Matsushita K, Ohno Y, Shinagawa E, Adachi O and Ameyama M (1980) Membrane-bound D-glucose dehydrogenase from *Pseudomonas sp.*: solubilization, purification and characterization. *Agric. Biol. Chem.* 44: 1505-1512.
- Matsushita K, Shinagawa E and Ameyama M (1982) D-gluconate dehydrogenase from bacteria, 2-keto-D-gluconate yielding membrane bound. *Methods Enzymol.* 89: 187-193.
- Matsushita K, Shinagawa E, Adachi O and Ameyama M (1979) Membrane-bound D-glucose dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. Its kinetic properties and a reconstitution of gluconate oxidase. *J. Biochem.* 86: 249-256.
- Meiberg J B M and Spa M A (1983) Microbial production of gluconic acid and gluconates. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 89-90.
- Miller G L (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* Vol. 31, No. 3: 426-428.
- Neijssel O M, Tempest D W, Postma P W, Duine J A and Frank Jzn J (1983) Glucose metabolism by K^+ -limited *Klebsiella aerogenes*: evidence for the involvement of a quinoprotein glucose dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* 20: 35-39.
- Olijve W and Kok J J (1979a) Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. *Arch. Microbiol.* 121: 283-290.
- Olijve W and Kok J J (1979b) An analysis of the growth of *Gluconobacter oxydans* in chemostat cultures. *Arch. Microbiol.* 121: 291-297.
- Quazi G N, Parshad V, Verma V, Chopra C L, Buse R, Trager M and Onken U (1991) Diketo-gluconate fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 504-507.
- Reis V and Döbereiner J (1998) Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.* 171: 13-18.
- Romanov and Martínez-Romero (1994) Carbon metabolism enzymes of *Rhizobium tropici* cultures and bacteroids. *Appl. Env.* 60: 2339-2342

- Schie van B J, De Mooy O H, Linton J D, van Dijken J P y Kuenen J G (1987a) PQQ-Dependent Production of Gluconic Acid by *Acinetobacter*, *Agrobacterium* and *Rhizobium* Species. *J. Gen. Microbiol.* 133: 867-875.
- Schie van B J, Hellingwerf K J, van Dijken J P, Elferink M G L, van Dijk J M, Kuene J G and Konings W N (1985) Energy transduction by electron transfer via a pyrrolo-quinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter calcoaceticus* (var *Iwoffii*). *J. Bacteriol.* 163: 493-499.
- Stephan M P, Oliveira M, Teixeira K R S, Martínez-Drets G, Döbereiner J (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 67-72.
- Weenk G, Olijve W and Harder W (1984) Ketogluconate formation by *Gluconobacter* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 400-405.
- Whiting P H, Midgley M and Dawes E A (1976) The regulation of transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate, and of glucose catabolism, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* 154: 659-668.

CAPITULO III

*Expresión de la Ruta Extracelular de Oxidación de Glucosa en
Gluconacetobacter diazotrophicus en Cultivos Continuos*

III.1. Resumen

Cuando *Gluconacetobacter diazotrophicus* fue cultivado en quimiostato con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de Nitrógeno y glucosa ó ácido glucónico como sustratos limitantes, se obtuvieron bajos valores de rendimientos en biomasa comparados con otros microorganismos cultivados en las mismas condiciones. Cuando se realizaron cultivos con glucosa bajo condiciones de FBN, los rendimientos no fueron significativamente afectados por el elevado costo de energía que demanda la FBN. *G. diazotrophicus* fue capaz de crecer en quimiostato empleando Nitrógeno atmosférico (N_2) como única fuente de Nitrógeno, independientemente de la fuente de Carbono y energía empleada, mientras la concentración de O_2 disuelto fuera mantenida en 1-2 % de saturación de aire. Estos cultivos se "lavarón" (la velocidad de dilución fue mayor que la de síntesis de biomasa) cuando la concentración de O_2 disuelto alcanzó valores del orden 4-5 % de saturación. *G. diazotrophicus* presentó actividad de las enzimas de la ruta de oxidación directa de la glucosa en todas las condiciones ensayadas (glucosa ó ácido glucónico como fuentes de Carbono y energía, con Nitrógeno fijado o bajo FBN). No obstante, las actividades de glucosa deshidrogenasa fueron siempre más elevadas que las observadas para las otras enzimas de la vía oxidativa periplasmática, e indicaron que se estimula su síntesis en condiciones de alta demanda energética (FBN y limitación por Carbono). En cultivos realizados con exceso de glucosa y condiciones de FBN, la actividad enzimática respondió a un aumento de la concentración del azúcar en el influente con un aumento de síntesis, pero sin alcanzar los valores de actividad de los cultivos limitados en Carbono. La actividad de hexoquinasa fue prácticamente nula. Se registró actividad de glucosa deshidrogenasa NAD-dependiente intracelular en todos los cultivos siendo los valores más elevados en cultivos llevados a cabo con exceso de glucosa.

III.2. Introducción

III.2.1. Glucosa deshidrogenasa periplasmática y la regulación de su expresión

En la mayoría de los microorganismos quimioheterótrofos el sustrato carbonado debe atravesar la membrana celular para ser metabolizado. Para el caso de la glucosa, en muchas especies microbianas (*K. pneumoniae*, *E. coli* y enterobacterias en general) se expresa un sistema de transporte activo mediado por una glucosa fosfoenolpiruvatofosfotransferasa (PTS) (Neijssel *et al.*, 1980; Postma y Lengeler, 1985) que incorpora y fosforila simultáneamente la glucosa, la cual es luego metabolizada intracelularmente. En *Pseudomonas* sp., en cambio, una permeasa es la que se ocupa de la entrada de la glucosa a la célula, dentro de la cual es luego fosforilada (Dawes, 1981). En el caso de *G. diazotrophicus* se sabe que la glucosa es capaz de ingresar a la célula (aunque no se conoce aún el mecanismo involucrado) y que luego es metabolizada principalmente por una glucosa deshidrogenasa intracelular NAD-dependiente (Alvarez y Martínez-Drets, 1995). Esto se comprobó a través de estudios con la cepa salvaje en los que se mostró que la actividad hexoquinasa (otra posible enzima capaz de fosforilar la glucosa que ingresa a la célula) es despreciable (Attwood *et al.*, 1991; Alvarez y Martínez-Drets, 1995; Capítulo II de esta Tesis). Además, cuando se cultivó un mutante GDH(-) en glucosa se encontró actividad significativa de glucosa deshidrogenasa NAD-dependiente pero no se detectó expresión de hexoquinasa (Capítulo II de esta Tesis). No obstante, *G. diazotrophicus*, al igual que *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Gluconobacter* sp., *E. coli* y otros microorganismos, posee un sistema enzimático alternativo para metabolizar glucosa que es la vía periplasmática de oxidación, en la que la glucosa se oxida a ácido glucónico por la acción de una GDH dependiente de PQQ (tal como se describió en capítulos anteriores de esta Tesis). En algunas bacterias la GDH es sintetizada constitutivamente (de Bont *et al.*, 1984; Hardy, 1992), mientras que en otras la síntesis de enzima es inducida (ó desreprimida) dependiendo de las condiciones de crecimiento (Dawes, 1981; Hommes *et al.*, 1985). En *K. pneumoniae* la GDH PQQ-dependiente funciona como un sistema de baja afinidad, ya que no se registra actividad en cultivos limitados en glucosa y se encuentran los mayores valores en células provenientes de cultivos continuos con exceso de esta fuente de Carbono (creciendo bajo limitación por Fosfato ó Potasio (Hommes *et al.*, 1985)). Mientras tanto el sistema PTS se comporta como sistema de alta afinidad, ya que se registran los mayores niveles de actividad en condiciones donde hay bajas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo. En base a estas observaciones Hommes y colaboradores (1985) propusieron que la ruta oxidativa periplasmática funciona como un sistema auxiliar de producción de energía involucrado en el mantenimiento de elevados gradientes iónicos transmembrana en células creciendo limitadas en sustratos para los que se requiere mantener un elevado gradiente de

concentración de los mismos entre el interior y exterior celular. En el caso de *P. putida*, a pesar de presentar los mayores valores de actividad de GDH en cultivos continuos con exceso de Carbono, también se observan valores significativos de actividad de GDH en condiciones de limitación por Carbono en cultivos continuos a elevados valores de velocidad de crecimiento (Hardy, 1992).

En este capítulo se estudia la influencia de diversas condiciones de crecimiento sobre la expresión de la ruta periplasmática de oxidación de glucosa en *G. diazotrophicus* creciendo en cultivos continuos.

III.2.2. Cultivos "batch" vs. Cultivos Continuos

En un cultivo "batch", tal como se describió y mostró en el Capítulo II, el ambiente sufre continuos e incontrolados cambios a los cuales los microorganismos se adaptan modificando continuamente su fenotipo. Este tipo de cultivo es una primera aproximación al estudio de las características fisiológicas de un organismo. No obstante, claramente se aprecia que el empleo de cultivos "batch" para estudiar la respuesta fisiológica de un microorganismo con la alteración de alguna condición de cultivo es dificultosa debido a la variación temporal del ambiente en su conjunto y a la respuesta adaptativa del cultivo. Por ende es difícil separar la respuesta fisiológica a la modificación de una variable determinada de los cambios inherentes a este sistema de cultivo. Un ambiente de crecimiento constante en el tiempo, reproducible y bien definido puede ser creado empleando la técnica de cultivos continuos (Herbert *et al.*, 1958, 1965; Tempest, 1970) (ver Materiales y Métodos). En este tipo de cultivo, llevado a cabo en un quimiostato, es posible estudiar la influencia de una simple variable ambiental sobre la fisiología de un microorganismo, mientras el resto de las condiciones permanecen constantes. El crecimiento en un quimiostato ocurre bajo limitación por algún nutriente, una situación que es usualmente encontrada en ecosistemas naturales. En quimioheterótrofos generalmente ocurre que la naturaleza de la limitación afecta fuertemente la eficiencia de producción de biomasa. La utilización más eficiente de la fuente de Carbono ha sido invariablemente encontrada bajo condiciones de limitación por Carbono. Bajo estas condiciones la fuente de Carbono es utilizada sólo para producción de energía y síntesis de biomasa no detectándose, por lo general, otros productos en los cultivos. En contraste, la adaptación a condiciones ambientales donde la fuente de Carbono está en exceso a menudo involucra la activación de mecanismos que incrementan la capacidad de asimilación del sustrato limitante. Este incremento en capacidad es acompañado por un gasto de energía. Bajo condiciones en las cuales el cultivo no está limitado por Carbono, la velocidad de catabolismo de la fuente de Carbono es incrementada, es decir, catabolismo y anabolismo se muestran desacoplados. En muchas especies de microorganismos este desacople se traduce en la excreción de intermediarios del metabolismo parcialmente oxidados que son denominados, por algunos autores, "metabolitos de sobreflujo" (Neijssel y Tempest, 1979).

III.3. Materiales y Métodos

III.3.1. Microorganismo

G. diazotrophicus PAL 3 (LMG 8066 de acuerdo a la colección de cultivos BCCM/LMG, Gent, Bélgica) fue provista por la Dra. J. Döbereiner (CNPBS/EMBRAPA, Rio de Janeiro, Brasil). La misma fue mantenida en LGIM-glicerol 20 % (v/v) a - 70°C y por subcultivos mensuales en agar papa (Stephan *et al.*, 1991).

III.3.2. Cultivo continuo

Todo cultivo continuo (C.C.) se inicia con un cultivo "batch" que en fase exponencial comienza a ser alimentado continuamente con medio fresco a una velocidad constante (F) de manera que el crecimiento no cese, sino que continúe indefinidamente. En un quimiostato el volumen de medio (V) se mantiene constante por continua remoción de cultivo (que contiene además de células los productos de la actividad metabólica del microorganismo) a igual caudal que el de la alimentación.

Para un componente cualquiera del cultivo, incluida la biomasa, se puede plantear el siguiente balance de materia en el bioreactor:

Velocidad de acumulación = velocidad de ingreso - velocidad de salida + velocidad de formación - velocidad de consumo

$$d(V \cdot C)/dt = F_1 \cdot C_1 - F_2 \cdot C_2 + V \cdot r_f - V \cdot r_c$$

(Ecuación 1)

C : concentración del componente

r_f y r_c : velocidades volumétricas de formación y consumo

Con F₁ y F₂ iguales y V cte., la ecuación anterior se reduce a la siguiente:

$$V \cdot dC/dt = F \cdot (C_1 - C_2) + V \cdot (r_f - r_c)$$

(Ecuación 2)

Logradas las condiciones de "estado estacionario" (E.E.) las concentraciones de biomasa, sustratos y productos dentro del bioreactor permanecen constantes en el tiempo, lo que significa igualar a cero la ecuación anterior. Si se plantea este balance para la biomasa (X), resulta que el valor de la velocidad de dilución D (definido como D = F/V), es igual a la velocidad específica de crecimiento del microorganismo μ (ecuación 3). De esta forma en un C.C. se puede imponer el valor de μ que uno desee mientras sea menor que el $\mu_{\text{máx}}$ del cultivo "batch" del microorganismo crecido en un medio de igual composición, ya que los cultivos se

lavan si la velocidad de dilución es mayor a la de síntesis de biomasa. Si el balance de masa se plantea para algún sustrato (S) ó para algún producto (P), resultan las ecuaciones 4 y 5.

$$rf_x = D \cdot (x_2 - x_1) = \mu \cdot x_{EE}$$

(Ecuación 3)

$$rc_S = D \cdot (S_1 - S_2) = \mu \cdot (S_R - S_{EE})$$

(Ecuación 4)

Con $S_{EE} = 0$ si se trata del sustrato limitante del crecimiento.

S_R : concentración del sustrato en el Reservorio de alimentación.

$$rf_P = D \cdot (P_2 - P_1) = \mu \cdot P_{EE}$$

(Ecuación 5)

III.3.3. Condiciones y medios de cultivo

G. diazotrophicus PAL 3 fue cultivado en quimiostato en un bioreactor L.H. de 2 L (Incelltech 210) con un volumen de trabajo de 1 litro, a pH 6,0 y 30^aC. Como medio de alimentación se empleó el medio mínimo definido LGIM modificado para C.C. (ver más adelante) con glucosa ó ácido glucónico como única fuente de Carbono y energía, y con 2,50 g.l⁻¹ (No FBN) ó 0,132 g.l⁻¹ (dosis "starter") de (NH₄)₂SO₄ ó sin Nitrógeno fijado (FBN). Cultivos "batch" fueron crecidos en LGIM según Stephan y colaboradores (1991) con glucosa ó glucónico 10,0 g.l⁻¹ (según corresponda) a pH 6,0 y 30^aC, y se utilizaron como inóculos para el "batch" que se realizó en el fermentador previo al inicio de la alimentación con medio fresco. Una vez que el cultivo alcanzó una biomasa de 1,5 -2,0 g.l⁻¹ en fase exponencial se inició la alimentación a un 50 % del caudal final y el mismo se aumentó lentamente hasta alcanzar un caudal de aproximadamente 50 ml.h⁻¹ (D = 0,05 h⁻¹). En el caso de los cultivos que se llevaron a cabo bajo FBN, primero se comenzaron a alimentar con medio de cultivo fresco con una dosis "starter" de Nitrógeno a un 50 % del caudal final y manteniendo el O₂ disuelto en 1,0 - 2,0 % para impedir la inhibición de la nitrogenasa por el O₂ (Reis y Döbereiner, 1998). Luego se cambió la alimentación a medio de cultivo sin Nitrógeno fijado (libre de Nitrógeno) y se aumentó el caudal de alimentación lentamente hasta llegar a la velocidad de dilución deseada. La concentración de O₂ disuelto fue continuamente medida empleando un electrodo polarografico Ingold (Wilmington, MA, USA) y se mantuvo al nivel deseado de saturación (25 % con N fijado y 1,0 - 2,0 % en condiciones de FBN) variando la velocidad de agitación (200-400 rpm). El pH fue mantenido automáticamente al valor deseado ± 0,1 usando 0,5 N NaOH. La velocidad de dilución fue 0,05 ± 10 % h⁻¹ y el flujo de aire fue de 0,15 VVM.

El medio mínimo definido utilizado para todos los cultivos fue LGIM (Stephan *et al.*, 1991) modificado para C.C., cuya composición es la siguiente:

LGI M para C.C.	
glucosa*	5.0 g
KCl	0.745 g
NaH ₂ HPO ₄ .H ₂ O	1.37 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ **	2.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3 g
ácido cítrico	0.2 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.01 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.02 g
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.002 g
H ₂ O csp	1000 ml

*ó la fuente de Carbono correspondiente

**ó sin Nitrógeno fijado en el caso de FBN

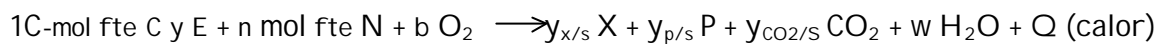
III.3.4. Análisis

Se tomaron muestras del cultivo, tanto de fase líquida como de fase gaseosa, y se procesaron los datos para verificar si se había alcanzado el E.E. Para ello se decidió que cuando la concentración de biomasa y la velocidad específica de consumo de O₂, al menos, se mantuvieron constantes (variando menos de un 5 %) se había llegado a dicha condición. Una vez alcanzado el E.E. las muestras se tomaron cada 24 hs durante 7 días como mínimo y se realizaron los análisis correspondientes. Después de la modificación de alguna condición de cultivo fueron requeridos aproximadamente 5 cambios de volumen para volver a obtener un nuevo E.E. (ó bien 5 tiempos de retención, $t_R: D^{-1}$). En la muestra líquida se midieron pH y D.O. a una longitud de onda de 560 nm y se la centrifugó a 12.000 g por 10 minutos para determinar peso seco y medir sustratos y productos en el sobrenadante. El peso seco de la biomasa fue determinado siguiendo el procedimiento descrito por Herbert y colaboradores (1971). La concentración de glucosa en el reservorio y en los sobrenadantes fue determinada con el Kit enzimático de glucosa-oxidasa (Wiener, Argentina; Bergmeyer y Bernt, 1977). El gluconato fue medido con el test enzimático de Boehringer (Mannheim, Germany; test-kit 428191) y el 2-cetogluconato por el método de Lanning y Cohen (1951). Se utilizó el método del ácido Dinitrosalicílico (DNS; Miller, 1959) para medir conjuntamente la glucosa y los cetoácidos que fueran reductores. Las concentraciones de O₂ y CO₂ en las muestras gaseosas fueron determinadas empleando un analizador paramagnético de O₂ (Servomex 1100A, Norwood MA, USA) y un analizador infrarojo de CO₂ (Horiba PIR 2000, Japan). El flujo de aire se midió con un caudalímetro de burbuja. El contenido de proteínas en los extractos libres de células fue medido por el método de biuret empleando albúmina bovina como patrón (Gornall *et al.*, 1949).

III.3.5. Cálculos

Teniendo en cuenta que las concentraciones de sustratos y productos en E.E. no sólo dependen de la actividad específica celular sino también de la concentración de biomasa en el quimiostato, es fisiológicamente más relevante considerar velocidades específicas de producción y de consumo, antes que velocidades volumétricas, para poder comparar los distintos E.E.. Las velocidades específicas han sido definidas ya en el Capítulo II (velocidades volumétricas/unidad de biomasa) y las velocidades volumétricas en C.C. están dadas por las ecuaciones 3, 4 y 5. Las velocidades de consumo de O_2 y de producción de CO_2 se calcularon de la misma manera que para un cultivo "batch" (ver Capítulo II).

Para todos los cultivos se realizaron balances de materia y energía, tratando al cultivo de microorganismos como si fuera una reacción química simple, representada por la siguiente ecuación:



El C-mol se define como la cantidad de compuesto que contiene un átomo gramo de Carbono, y en la ecuación anterior todos los coeficientes estequiométricos quedan expresados en C-mol por C-mol de fuente de Carbono y energía. Tanto el parámetro b como los rendimientos fueron calculados como cocientes de velocidades específicas según las ecuaciones 6.

$$Y_{X/S} = \mu/q_s \quad Y_{CO_2/S} = q_{CO_2}/q_s \quad Y_{O_2/S} = b = q_{O_2}/q_s \quad Y_{P/S} = q_p/q_s$$

(Ecuaciones 6)

Los balances de Carbono y de grado de reducción fueron calculados de acuerdo a Roels (1983).

Balance ó Recuperación de Carbono:

$$Y_{X/S} + Y_{CO_2/S} + Y_{P/S} = 1$$

(Ecuación 7)

Balance ó Recuperación de energía ó de grados de reducción:

$$4 \cdot b + Y_{X/S} \cdot \tilde{a}_s + Y_{P/S} \tilde{a}_p = \tilde{a}_s$$

(Ecuación 8)

El grado de reducción de un compuesto (\tilde{n}) se define como el número de electrones que 1 C-mol de dicho compuesto puede ceder al oxígeno.

III.3.6. Ensayos enzimáticos

Los ensayos espectrofotométricos de glucosa deshidrogenasa PQQ-dependiente (EC 1.1.99.17), gluconato deshidrogenasa (EC 1.1.99.3) y 2-cetogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.99.4) (todas enzimas ligadas a la membrana) fueron realizados utilizando DCIP y metosulfato de fenazina (MPS), según el método de Matsushita y colaboradores (1982) modificado para células enteras. Para ello un volumen apropiado (100-250 ml) fue tomado de C.C. en estado estacionario. Se centrifugó a 12.000 g y 4 °C, y el pellet fue lavado dos veces con buffer fosfato 10 mM (pH: 6,0) conteniendo MgCl₂ 5 mM y Tritón 0,1 % v/v y resuspendido en el mismo buffer a una concentración final de aproximadamente 4,5 mg de células . ml⁻¹. Las medidas de actividad en células enteras se realizaron a 25°C, pH 6,0, tal como se describió en el Capítulo II.

Las medidas de actividad de enzimas citoplasmáticas se realizaron en ELC. Para todos los ensayos, un volumen apropiado (300-500 ml) fue tomado de los distintos cultivos realizados. Se centrifugó a 12.000 g y el pellet fue lavado dos veces con buffer fosfato 10 mM (pH: 6,0) conteniendo MgCl₂ 5 mM y Tritón 0,1 % v/v y resuspendido en aproximadamente 10 ml del mismo buffer. Estas suspensiones de células lavadas (40 mg.ml⁻¹) provenientes de los distintos cultivos, fueron congeladas a -20 °C y se procedió a la ruptura celular a través de 3 pasajes por una Prensa de extrusión sólida X25 (AB Biox, Sweden). El extracto celular se centrifugó 2 veces 20 minutos a 12.000 g para remover células intactas y restos de membrana. El sobrenadante se empleó como ELC para las determinaciones enzimáticas. La medida de actividad de glucosa deshidrogenasa NAD-dependiente se determinó según la técnica propuesta por De Ley (1966 modificada) tal como se describió en el Capítulo II. Las medidas de actividad de hexoquinasa, 6Pgluconato deshidrogenasa (NAD/NADP), glucosa6Pdeshidrogenasa (NADP) y gluconatoquinasa se realizaron empleando las técnicas propuestas por Romanov y Martínez-Romero (1994). La actividad de 2-cetogluconato reductasa (NADH/NADPH) se determinó en ELC según la técnica propuesta por Neijssel (1991). Las medidas de actividad de 6PG dehidratasa y de KDPG aldolasa (enzimas claves de la vía de Entner-Doudoroff) se llevaron a cabo según la técnica de Lessie y Vanderwyk (1972). También se realizaron las medidas de actividad de enzimas citoplasmáticas en la fracción soluble resultante de ultracentrifugar el ELC a 120.000 g por 90 minutos.

III.3.7. Incubaciones con suspensiones de células lavadas

Un volumen apropiado (200-250 ml) fue tomado de C.C. en E.E. Se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos y el pellet fue lavado dos veces con buffer fosfato 10 mM pH 6,0

conteniendo MgCl_2 5 mM y Tritón 0,1 % v/v y resuspendido en 2,0-2,5 ml del mismo buffer. Las incubaciones con células lavadas se llevaron a cabo en erlenmeyers a 30 °C y 100 rpm, en buffer fosfato 100 mM pH 6,0, MgCl_2 2,5 mM y glucosa, adicionada a una concentración final de 4,5 g.l⁻¹. El peso seco de las células en cada incubación fue de 0,5-1,0 mg.ml⁻¹. Se tomaron muestras cada 2 minutos (hasta 20 minutos), las células fueron centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos y los sobrenadantes mantenidos a 4 °C hasta realizar las medidas de concentración de gluconato.

III.4. Resultados

III.4.1. Rendimientos en biomasa y velocidades específicas

Se llevaron a cabo C.C. de *G. diazotrophicus* con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de Nitrógeno (Nitrógeno fijado) ó bajo condiciones de FBN y, en ambos casos, con limitación por la fuente de Carbono y energía. También se realizaron cultivos con exceso de fuente de Carbono bajo FBN. Teniendo en cuenta que la velocidad específica máxima de crecimiento de cultivos de *G. diazotrophicus* crecidos en condiciones de FBN en frascos agitados fue de aproximadamente $0,10 \text{ h}^{-1}$, independientemente del sustrato empleado (ver Capítulo II), se decidió estudiar el crecimiento de *G. diazotrophicus* en quimiostato a una velocidad de dilución de $0,05 \text{ h}^{-1}$. Por otro lado, a diferencia de lo observado en cultivos "batch", en los que para obtener cultivos que fijaran N_2 era imprescindible utilizar una dosis "starter" de sulfato de amonio en el medio (ver Capítulo II), en cultivos en quimiostato una vez alcanzadas las condiciones de fijación de N_2 (expresión de la nitrogenasa), *G. diazotrophicus* pudo mantenerse en E.E. con medio de alimentación que no contenía Nitrógeno fijado. Los cultivos crecieron a expensas únicamente del N_2 atmosférico.

III.4.1.1. Cultivos con glucosa ó ácido glucónico limitados en Carbono

Se llevaron a cabo C.C. de *G. diazotrophicus* limitados en Carbono, en los que se empleó una concentración de $10,0 \text{ g.l}^{-1}$ de fuente de Carbono en el reservorio para cultivos bajo FBN. Cuando se empleó sulfato de amonio como fuente de Nitrógeno, la concentración de O_2 disuelto fue mantenida por encima de 20 % de saturación de aire para inhibir la posible inducción de la síntesis de la nitrogenasa.

En los cultivos bajo condiciones de FBN, la velocidad de disolución de O_2 fue ajustada a la velocidad de consumo por variación de la velocidad de agitación, manteniendo una concentración de oxígeno disuelto de 1-2 % de saturación de aire. Este procedimiento fue realizado para que la nitrogenasa no fuera inhibida por el O_2 (Reis y Döbereiner, 1998) pero que, al mismo tiempo, el crecimiento procediera sin limitación por O_2 . Estos cultivos con glucosa como fuente de Carbono se "lavarón" (la velocidad de dilución fue mayor que la de síntesis de biomasa) cuando la concentración de O_2 disuelto alcanzó valores del orden 4-5 % de saturación de aire.

Cuando *G. diazotrophicus* fue crecido en C.C. limitado en la disponibilidad de la fuente de Carbono y energía, la concentración residual (en el sobrenadante del cultivo) de los sustratos empleados (glucosa ó gluconato) estuvo por debajo de los límites de detección de los métodos empleados para medir su concentración (ver Materiales y Métodos). No obstante, para corroborar que el crecimiento procedía realmente limitado en Carbono, se realizaron adiciones de la correspondiente fuente de Carbono al cultivo. Al adicionar glucosa, ó gluconato, un inmediato incremento en la biomasa en E.E. fue observado. En

cultivos fijando N_2 la concentración de O_2 disuelto fue ajustada, variando la velocidad del agitador, a 1-2 % de saturación después del agregado de la correspondiente fuente de Carbono. Bajo condiciones de no FBN, los valores de rendimiento en biomasa de los cultivos no fueron significativamente afectados por la naturaleza de la fuente de Carbono (glucosa ó gluconato) con valores de 41,00 y 37,33 $g \cdot mol^{-1}$ respectivamente (*Tabla III.1*). Por otro lado, en condiciones de FBN, los valores de rendimiento en biomasa con gluconato fueron 37% más bajos que con esta fuente de Carbono y Nitrógeno fijado (24,63 y 37,33 $g \cdot mol^{-1}$ respectivamente, *Tabla III.1*). Este resultado era predecible ya que la fijación de N_2 es un proceso de elevada demanda energética. Sorpresivamente este no fue el caso de los cultivos con glucosa como fuente de Carbono y energía. Los rendimientos en biomasa de cultivos creciendo con glucosa bajo condiciones de FBN fueron sólo 14 % más bajos que aquellos observados en cultivos que contenían el azúcar y Nitrógeno fijado (35,19 vs. 41,00 $g \cdot mol^{-1}$ respectivamente), a pesar de la demanda extra de energía para la FBN. En los cultivos realizados con glucosa hubo oxidación completa de la misma hasta CO_2 y H_2O (no se registró producción de glucónico ni de cetoácidos), al igual que en los cultivos con glucónico como única fuente de Carbono (no se registró producción de cetoácidos) (*Tabla III.1*).

Condición	$y_{x/s}$	$y_{p/s}$	$Y_{CO_2/s}$	b	Rec C	Rec E
glucosa/No FBN	41,00	0	0,785	0,842	1,05	1,12
glucosa/FBN	35,19	0	0,733	0,811	0,96	1,05
glucónico/No FBN	37,33	0	0,819	0,867	1,06	1,12
glucónico/FBN	24,63	0	0,751	0,853	0,91	1,02

Tabla III.1. Parámetros de diferentes C.C. de *G. diazotrophicus* limitados en Carbono con distintas fuentes de Carbono y energía ($10,0 g \cdot l^{-1}$) y $SO_4(NH_4)_2$ $2,5 g \cdot l^{-1}$ ó N_2 como fuentes de Nitrógeno. $Y_{x/s}$, $Y_{CO_2/s}$ y b están expresados en g de biomasa $\cdot mol$ de sustrato $^{-1}$, mol $CO_2 \cdot C \cdot mol$ de sustrato $^{-1}$ y mol de $O_2 \cdot C \cdot mol$ de sustrato $^{-1}$, respectivamente. Se consideró biomasa de composición estandar. Los datos de esta tabla son promedios de al menos 5 muestras de 2 C.C. independientes realizados en iguales condiciones.

C.C. realizados con un mutante GDH(-) de *G. diazotrophicus* limitados en glucosa y con Nitrógeno fijado, arrojaron valores de rendimiento en biomasa similares a los obtenidos con la cepa salvaje en iguales condiciones de cultivo ($y_{x/s} = 40,0 g \cdot mol^{-1}$). No obstante, cultivos de dicho mutante limitados en glucosa pero en condiciones de FBN, dieron muy bajos rendimientos en biomasa ($y_{x/s} = 18,0 g \cdot mol^{-1}$). La velocidad específica de consumo de glucosa para la cepa salvaje fue mayor en cultivos crecidos bajo FBN ($q_s = 46,51$ nmoles $g_{sa} \cdot mg$ células $^{-1} \cdot min^{-1}$) que en aquellos con Nitrógeno fijado ($q_s = 18,65$ nmoles $g_{sa} \cdot mg$ células $^{-1} \cdot min^{-1}$). El valor de q_s para cultivos bajo FBN fue mayor para la cepa salvaje que para el

mutante GDH(-) creciendo en iguales condiciones (46,51 nmoles gsa . mg células⁻¹ . min⁻¹ vs 22,24 nmoles gsa . mg células⁻¹ . min⁻¹, respectivamente).

III.4.1.2. Cultivos con glucosa en exceso de Carbono

G. diazotrophicus fue cultivado en C.C. bajo diferentes concentraciones de glucosa y en condiciones de FBN. Los rendimientos en biomasa decrecieron para concentraciones de glucosa por encima de 20,0 g.l⁻¹ (Tabla III.2). Cultivos con 10,0 y 20,0 g.l⁻¹ de glucosa, fueron limitados por Carbono mientras que con concentraciones de azúcar más elevadas los cultivos estuvieron bajo condiciones de exceso de Carbono, ya que al aumentar la concentración de azúcar en el reservorio conjuntamente con el suministro de O₂ (debido a que estos cultivos se mantuvieron a bajas concentraciones de O₂ disuelto para impedir la inhibición de la nitrogenasa), la concentración de biomasa en estado estacionario permaneció constante. Sin embargo, la glucosa en estos últimos cultivos fue consumida casi en su totalidad (concentración de glucosa residual en el sobrenadante 0,3 - 0,8 g.l⁻¹), y gluconato y cetogluconatos fueron los principales productos de sobreflujo.

	q _{O₂}	q _{CO₂}	q _{gco}	q _{gsa}	X _{EE}	y _{x/s}
[glucosa] g.l ⁻¹	mmol.g ⁻¹ . h ⁻¹	mmol.g ⁻¹ . h ⁻¹	nmol.mg ⁻¹ . min ⁻¹	nmol.mg ⁻¹ . min ⁻¹	g.l ⁻¹	g.mol ⁻¹
10	5,93 ± 0,775	5,50 ± 0,775	0	19,0 ± 2,10	1,9 ± 0,10	35,2 ± 1,98
20	6,52 ± 0,915	6,15 ± 0,844	0,0256±0,031	22,2 ± 1,06	3,9 ± 0,44	34,9 ± 3,5
30	8,39 ± 2,34	6,90 ± 1,88	7,27 ± 3,84	34,5 ± 2,22	3,4 ± 0,60	23,4 ± 3,8
40	9,57 ± 1,71	7,66 ± 1,19	21,4 ± 5,31	48,2 ± 8,41	3,0 ± 0,45	20,5 ± 4,5
50	13,21 ± 1,05	10,91 ± 1,05	3,58 ± 2,25	38,0 ± 3,50	4,9 ± 0,70	20,7 ± 2,3

Tabla III.2. Velocidades específicas de consumo de oxígeno (q_{O₂} mmol de O₂ . g de biomasa⁻¹ . h⁻¹) y de glucosa (q_{gsa} nmoles glucosa . min⁻¹ . mg biomasa⁻¹) y de producción de dióxido de carbono (q_{CO₂} mmol de CO₂ . g de biomasa⁻¹ . h⁻¹) y de glucónico (q_{gco} nmoles glucónico . min⁻¹ . mg biomasa⁻¹) in situ, de C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 3 con distintas concentraciones de glucosa y en condiciones de FBN. El rendimiento en biomasa (y_{x/s}) está expresado en g biomasa . mol de sustrato⁻¹. X_{EE}: concentración de biomasa en estado estacionario.

Una mayor conversión de glucosa a gluconato vía GDH al aumentar la concentración de azúcar en el medio de cultivo, no sólo fue evidente por el aumento de concentración de ácido glucónico en los sobrenadantes de los cultivos, sino también por los valores de la relación q_{CO₂}/q_{O₂} la cual fue 0,93 en cultivos limitados en Carbono (10,0 y 20,0 g.l⁻¹ de

glucosa) y 0,79 en cultivos crecidos con exceso de fuente de Carbono y energía. Esto es consistente con una dehidrogenación de glucosa en ausencia de decarboxilación.

La velocidad específica de consumo de sustrato (q_{gsa}) fue invariablemente más alta bajo condiciones de crecimiento con exceso de carbono comparada con los valores obtenidos en cultivos limitados en Carbono.

III.4.2. Actividades enzimáticas

Bajo limitación por Carbono la GDH PQQ-dependiente fue sintetizada en todas las condiciones ensayadas, inclusive en cultivos creciendo en gluconato (al igual que lo expuesto en el Capítulo II sobre actividades enzimáticas en cultivos "batch"). No obstante, los valores de actividad fueron significativamente más elevados en cultivos crecidos en glucosa, limitados en Carbono y en condiciones de FBN (Tabla III.3).

	glucosa/No FBN	glucosa/FBN	gluconato/No FBN	gluconato/FBN
GDH	274	553	272	367

Tabla III.3. Actividades enzimáticas de células provenientes de C.C. (limitados en Carbono) de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido con glucosa ó ácido glucónico como sustratos limitantes. Las actividades están expresadas en $\text{nmol DCIP red} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ (considerando un contenido de proteínas en la biomasa de un 60 %).

En relación a los C.C. no limitados en Carbono, además de los nombrados anteriormente (glucosa 30,0; 40,0 y 50,0 g.l^{-1}) se realizó un cultivo con exceso de glucosa pero con una concentración de azúcar en el reservorio de 10,0 g.l^{-1} . Esta condición de exceso de Carbono se logró suministrando menos agitación de la que se empleó en el cultivo llevado a cabo en condiciones de limitación por Carbono, bajo FBN y glucosa 10,0 g.l^{-1} . En todos los cultivos realizados bajo FBN y en condiciones de exceso de glucosa (10,0; 30,0; 40,0 y 50,0 g.l^{-1}) la GDH PQQ-dependiente presentó valores de actividad que fueron en aumento a medida que aumentó la concentración de azúcar, pero no llegaron a valores tan elevados como aquellos en donde los cultivos se encontraban limitados por Carbono (Tabla III.4). El mismo perfil de actividades se obtuvo a través de medidas de producción de glucónico por células enteras provenientes de los distintos C.C. incubadas con glucosa (Tabla III.4).

	gsa. 10 g.l^{-1} ltdo. C	gsa. 10 g.l^{-1} exc. C	gsa. 30 g.l^{-1} exc. C	gsa. 40 g.l^{-1} exc. C	gsa. 50 g.l^{-1} exc. C
GDH <i>in vitro</i>	553	165	200	238	234
GDH <i>in vivo</i>	710	216	352	464	544

Tabla III.4. Actividades enzimáticas de células provenientes de cultivos continuos de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido con glucosa y bajo FBN. Las actividades están expresadas en nmoles DCIP red . min⁻¹ . mg proteína⁻¹ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %) para la actividad in vitro o bien en nmoles de glucónico producidos . min⁻¹ . mg proteína⁻¹ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %) para la actividad in vivo.

En relación a las otras posibles vías de incorporación de glucosa que se encuentran en *G. diazotrophicus*, y de acuerdo con investigaciones previas en C.C. (Attwood *et al.*, 1991), los valores de actividad quinasa para glucosa fueron muy bajos (comparados con las actividades enzimáticas de las GDHs) en todas las condiciones de cultivo ensayadas, inclusive en los cultivos realizados con el mutante GDH(-). En cuanto a la oxidación directa de la glucosa, al igual que en *Gluconobacter oxydans*, y a pesar de que la GDH PQQ-dependiente se considere la enzima clave en el metabolismo de la glucosa en *G. diazotrophicus* (Attwood *et al.*, 1991) se registró actividad de GDH NAD-dependiente en todos los cultivos, siendo más elevada en cultivos con exceso de glucosa, tanto para la cepa salvaje como para el mutante GDH(-) (Tabla III.5). En cultivos limitados en glucosa la cepa salvaje al igual que el mutante GDH(-) presentaron valores de actividad GDH NAD-dependiente semejantes, independientemente de la fuente de Nitrógeno empleada.

	GDH NAD (ELC)	GDH PQQ (cél enteras)	hexoquinasa (ELC)
gsa. 5 lim. C/No FBN	340	274	23
gsa. 10 lim. C/FBN	400	553	28
gsa. 10 exc. C/FBN	720	165	0
gsa. 30 exc. C/FBN	1100	225	nd*
gsa. 50 exc. C/FBN	670	234	0
gco. 5 lim. C/No FBN	180	272	14
gco. 5 lim. C/FBN	284	380	nd
DE(-) gsa 5 lim. C/No FBN	414	0	0
DE(-) gsa. 5 lim. C/FBN	406	0	40
DE(-) gsa. 5 exc C/FBN	853	0	20

Tabla III.5. Actividades enzimáticas de células provenientes de C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 3 (cepa salvaje y mutante DE(-)) crecido con distintas fuentes de Carbono (g.l⁻¹) y de Nitrógeno. La actividad de GDH PQQ dependiente está expresada en nmoles DCIP red . min⁻¹ . mg proteína⁻¹, la de GDH NAD dependiente esta expresada en nmoles de NAD⁺ consumido . min⁻¹ . mg proteína⁻¹ y la de hexoquinasa en nmoles de NADP⁺ reducidos . min⁻¹ . mg proteína⁻¹ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %). *nd: no dosado.

En cuanto a las vías de asimilación de gluconato, la actividad de gluconatoquinasa (a pesar de expresarse en general con bajas actividades) fue mayor en cultivos limitados en glucónico o crecidos en exceso de glucosa comparada con la actividad de cultivos limitados en glucosa. La actividad de GaDH de membrana mostró valores semejantes en todas las condiciones ensayadas, a diferencia de la GaDH NAD-dependiente, que presentó un perfil de actividades semejante al de la gluconatoquinasa. En cultivos de *G. diazotrophicus* con exceso de glucosa (30,0; 40,0 ó 50,0 g.l⁻¹) hasta un 30 % de la glucosa se transformó en ácido glucónico y sólo un 7 % en cetoácidos de acuerdo a lo medido en los sobrenadantes de los cultivos. Esto último coincide con bajas actividades de GaDH FAD-dependiente (de membrana) y GaDH NAD-dependiente (citoplasmática) y con elevadas actividades de 2-cetogtoreductasa NAD-dependiente (citoplasmática) (Tabla III.6). No se encontró actividad de 2-cetogtoreductasa NADP-dependiente, así como tampoco se registraron actividades de 5-cetogtoreductasa NAD ni NADP-dependiente.

	gco/No FBN	gco/FBN	gsa 5/No FBN	gsa 10-50 FBN	gsa 10/DE(-) FBN
GaDH DCIP	57	80	42	60/52	54
GaDH NAD	157	106	44	68/84	40
Gtoquinasa	40	70	8	18/30	13
2-CGaDH DCIP	50	70	36	40/53	28
2-CGaR NAD	nd*	nd	1490	1356/2082	1921
G6PDH NADP	131	521	375	675/1585	329
6-PGaDH NAD	1184	416	588	866/727	544

Tabla III.6. Actividades enzimáticas de células provenientes de C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido con distintas fuentes de Carbono (g.l⁻¹) y de Nitrógeno.. La actividad de GaDH y 2-cetoGaDH de membrana están expresadas en nmoles DCIP red . min⁻¹. mg proteína⁻¹; las actividades de las enzimas NAD/NADP dependientes están expresadas en nmoles de NAD/NADP consumido . min⁻¹. mg proteína⁻¹ y la actividad gluconatoquinasa está expresada como nmoles de NADP producidos . min⁻¹. mg proteína⁻¹ (en todos los casos se consideró un contenido de proteínas de 60 %).*nd: denota no dosado.

Acorde con investigaciones previas (Alvarez y Martínez-Drets, 1995; Attwood *et al.*, 1991), se pudieron observar elevados niveles de actividad de las enzimas claves del metabolismo de la ruta de los fosfatos de pentosas (PP), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGADH), en todos los cultivos. Los valores de G6PDH fueron más elevados en cultivos que se encontraban en exceso de glucosa. No se

encontraron actividades de 6PGdehidratasa ni de KDPG aldolasa, enzimas claves de la vía de Entner-Doudoroff, en ELC de los diferentes cultivos de *G. diazotrophicus*.

Se realizaron medidas de actividad de varias de las enzimas citoplasmáticas en fracción soluble (después de ultracentrifugar) y, aunque en general dieron valores más elevados, todos fueron coincidentes con las actividades medidas en ELC (datos no mostrados).

III.5. Discusión

Los resultados obtenidos indican que *G. diazotrophicus* es capaz de crecer en quimiostato empleando N_2 como única fuente de Nitrógeno mientras la concentración de oxígeno disuelto sea mantenida en 1-2 % de saturación de aire. Stephan y colaboradores (1991) habían reportado que *G. diazotrophicus* no era capaz de crecer a expensas de N_2 sin el agregado de una dosis "starter" de Nitrógeno fijado en el medio de cultivo. Esto parece ser debido a la condición de cultivo empleada por estos autores ya que, en nuestros experimentos, una vez alcanzadas las condiciones de FBN (síntesis de nitrogenasa), *G. diazotrophicus* pudo ser cultivado continuamente sin la necesidad del suministro de Nitrógeno fijado e independientemente de la fuente de Carbono y energía empleada.

En los experimentos realizados en condiciones de FBN limitados por Carbono los cultivos se mantuvieron a una saturación de O_2 de 1-2 % (aproximadamente 0,07-0,14 mg $O_2 \cdot l^{-1}$). Esta concentración de O_2 asegura un máximo de actividad de nitrogenasa (Reis y Dobereiner, 1998). Cuando la velocidad de disolución de O_2 fue incrementada, como para exceder la velocidad de consumo de oxígeno, la concentración de oxígeno disuelto aumentó en forma continua, dando lugar a la inhibición de la nitrogenasa por O_2 y al consiguiente "lavado" de los cultivos. Esta respuesta de *G. diazotrophicus* frente al O_2 en condiciones de fijación de N_2 está de acuerdo con los resultados obtenidos por Reis y Dobereiner (1998). Estos autores observaron que la nitrogenasa de este organismo es protegida contra la inhibición por oxígeno por elevadas concentraciones de sacarosa (10%), pero es más sensible a la inhibición si la concentración de azúcar es del 1 % (nuestras condiciones de cultivo). Los resultados de los C.C. limitados en Carbono sugieren la no existencia de un mecanismo de protección respiratoria de la nitrogenasa de la naturaleza del postulado originalmente por Dalton y Potsgate (1969), al menos en esas condiciones. Si tal mecanismo existiera, *G. diazotrophicus* hubiera incrementado su velocidad respiratoria, para responder al incremento de O_2 disuelto, a expensas de una disminución del rendimiento en biomasa, tal como fue observado con *Azotobacter vinelandii* (Boiardi, 1994).

Un aumento de la velocidad específica de consumo de O_2 se registró para cultivos que se encontraban creciendo bajo condiciones de FBN pero con exceso de fuente de Carbono y energía (30,0; 40,0 y 50,0 g.l⁻¹ de glucosa). Esto coincidió con elevadas velocidades específicas de consumo de sustrato y de producción de metabolitos de sobreflujo (ácido glucónico y cetoácidos) y con un descenso en los rendimientos en biomasa. De esta manera, dentro de la planta donde el organismo vive en un ambiente rico en azúcar (probablemente a bajas velocidades de crecimiento), *G. diazotrophicus* pareciera ser capaz de oxidar la glucosa a elevadas velocidades, siempre que el O_2 no sea limitante. Como se comentó en Capítulos anteriores de esta Tesis, la oxidación extracelular de glucosa rinde energía biológicamente utilizable (PQQ reducido) que puede ser usada para la FBN y, probablemente, podría también funcionar como un mecanismo de protección respiratoria de nitrogenasa. No obstante, futuras investigaciones serán necesarias para clarificar el (ó

los) mecanismos de protección respiratoria de la nitrogenasa, si los hay, en *G. diazotrophicus*.

En cultivos creciendo con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, limitados tanto en glucosa como en ácido glucónico, los rendimientos en biomasa para ambas fuentes de Carbono y energía resultan comparables, pero sensiblemente más bajos que los comúnmente reportados para otras bacterias heterótrofas (Heijnen y van Dijken, 1992). El menor rendimiento en biomasa obtenido con gluconato ($37,3$ vs $41,0$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, *Tabla III.1.*) es razonable, ya que el ácido glucónico es una molécula más oxidada que la glucosa. Los valores de rendimiento en condiciones de FBN con glucónico como fuente de Carbono y energía fueron inferiores a aquellos realizados con Nitrógeno fijado, lo cual era predecible debido a la elevada demanda energética que implica la FBN. En cambio con glucosa como única fuente de Carbono y energía y fijando N_2 , los cultivos no respondieron de manera semejante ya que, si bien presentaron rendimientos en biomasa más bajos que los que se llevaron a cabo con Nitrógeno fijado y glucosa, no resultaron notablemente afectados por la FBN. Con el propósito de encontrar posibles respuestas a estos resultados se realizó un análisis más profundo de los mismos que se detallará en el Capítulo V. De los rendimientos obtenidos con cultivos limitados en glucosa del mutante GDH(-) y de la especie salvaje, tanto en condiciones de No FBN ($40,0$ vs $41,0$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ respectivamente) como bajo FBN ($18,0$ vs $35,19$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ respectivamente) podemos concluir que la presencia de una GDH activa tiene algún efecto sobre la eficiencia energética de producción de biomasa, ya que los cultivos del mutante dieron valores significativamente más bajos que los de la cepa salvaje en condiciones donde la demanda energética fue alta, tal como es la FBN.

Los resultados sobre actividades enzimáticas de los C.C. crecidos bajo limitación por glucosa coinciden con aquellos registrados para cultivos "batch" (Capítulo II). Se registraron valores de actividad de GDH mucho más elevados en cultivos llevados a cabo en condiciones de FBN que con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de Nitrógeno (Capítulo II). Si bien en los cultivos "batch" indicados en el Capítulo II, en general la GDH no fue activa mientras el microorganismo fijaba N_2 , porque la glucosa había sido totalmente oxidada a ácido glucónico cuando se iniciaba la FBN (Capítulo II), no es este el caso de los cultivos continuos. En este caso pareciera que los cultivos responden a una situación de alta demanda energética, como lo es la fijación de N_2 , aumentando su capacidad de oxidación a través de un aumento de síntesis de GDH.

Podemos concluir que en *G. diazotrophicus* la GDH PQQ-dependiente es sintetizada constitutivamente ya que, además de los resultados ya mostrados en cultivos "batch" (Capítulo II), se encontró actividad de GDH en todos los C.C. llevados a cabo (incluso en aquellos con ácido glucónico como única fuente de Carbono (*Tabla III.3.*)). Por otro lado, en contraste a lo que ocurre con *Klebsiella pneumoniae* (Hommes, 1985), y a pesar de poseer un bajo K_m para la glucosa ($4,5$ mM), la GDH no se comporta como un "sistema de baja afinidad" ya que se encontraron los mayores niveles de actividad bajo limitación por Carbono en condiciones de FBN. Se podría especular que la inherente baja afinidad por la

glucosa de esta ruta metabólica podría ser compensada por la síntesis de grandes cantidades de la enzima involucrada en la misma, particularmente bajo condiciones donde la concentración extracelular de glucosa es baja, tal como ocurre con *Gluconobacter oxydans* creciendo limitado en glucosa (Olijve y Kok, 1979b). En *K. pneumoniae* la vía principal del metabolismo de glucosa en condiciones de limitación de Carbono es la ruta fosforilativa, pues a diferencia de *G. diazotrophicus*, posee una elevada actividad hexoquinasa y se reportó que la síntesis de GDH en ese microorganismo está regulada principalmente por el "status" energético de las células. En *Pseudomonas putida* los mayores valores de actividad de GDH se encontraron en condiciones de exceso de fuente de Carbono, donde las diferentes limitaciones tenían en común que la asimilación del nutriente limitante era energía-dependiente (Hardy, 1992). No obstante, *P. putida* creciendo en C.C. a elevados valores de velocidad de crecimiento presentó valores significativos de actividad de GDH en condiciones de limitación por Carbono. Asumiendo que en *G. diazotrophicus* la vía principal del metabolismo de la glucosa, al igual que en *Gluconobacter oxydans* (Attwood *et al.*, 1991), es la oxidación directa mediada por la GDH PQQ-dependiente, y que junto con la GaDH periplasmática pueden participar en la entrada de la fuente de Carbono a la célula, no es sorprendente que la regulación de la síntesis y de la actividad difieran de la de otros microorganismos como por ejemplo *K. pneumoniae* organismo que además, como consecuencia de represión por catabolito, no consume ni gluconato ni 2-cetogluconato (Hommes, 1988). Por lo tanto se podría concluir que la síntesis de GDH dependiente de PQQ pareciera estar regulada por la necesidad de una eficiente utilización de la fuente de Carbono y energía en situaciones donde la demanda energética es alta, como es el caso de la FBN, o bien donde la fuente de Carbono es escasa, ya que bajo condiciones de FBN y limitación por Carbono se observan los mayores valores de actividad. Este patrón de síntesis es característico de enzimas que están involucradas en la captura ("scavenging") del sustrato limitante del crecimiento en ambientes donde el mismo es escaso, o bien deben competir con otros organismos para su incorporación (Meers *et al.*, 1970; O'Brien *et al.*, 1980; Streekstra *et al.*, 1987).

De los valores registrados de actividad de GDH NAD-dependiente, concluimos que aparentemente no es una situación de demanda energética la que induce la síntesis de la enzima citoplasmática, ya que tanto la cepa salvaje como el mutante GDH(-) presentan valores de actividad semejantes en aquellos cultivos realizados limitados en glucosa, independientemente de fijar N_2 . Dicha enzima parece ser constitutiva ya que se registran valores de actividad en cultivos donde no existe sustrato para la misma, tales como cultivos con ácido glucónico. De acuerdo a los valores de actividad de GDH NAD-dependiente que presentaron todos los cultivos llevados a cabo en exceso de glucosa (tanto con $(NH_4)_2SO_4$ como bajo FBN y tanto para la cepa salvaje como para el mutante GDH(-)) se podría decir que su síntesis se induce en presencia de elevadas concentraciones de sustrato y que respondería como si fuera un "sistema de baja afinidad" (independientemente de su valor

de Km), ya que es bajo esas condiciones donde se encuentran los mayores valores de actividad.

Las medidas de actividades enzimáticas de los cultivos mostrados en este Capítulo (y en el Capítulo II) indican que el metabolismo de glucosa en este organismo procede fundamentalmente por una vía extracelular, a través de la GDH PQQ-dependiente, en un primer paso. Luego el ácido glucónico formado puede seguir diferentes caminos dependiendo de las condiciones de cultivo: parte del mismo es oxidado extracelularmente a 2 y 5-cetoglucónico, pero también puede ser incorporado y fosforilado intracelularmente. Los ácidos formados por la oxidación del gluconato pueden ser también incorporados (dependiendo de las condiciones ambientales) y reducidos a ácido glucónico en el interior celular. Luego los intermediarios carbonados intracelulares (en la forma que se encuentren) son metabolizados por la ruta de los fosfatos de Pentosas y TCA. Tal cual lo reportado para otras bacterias acéticas (Matsushita *et al.*, 1994), el ácido glucónico es el intermediario más importante en el metabolismo de los hidratos de Carbono.

III.6. Referencias

- Alvarez B and Martínez-Drets G (1995) Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. Can. J. Microbiol. 41: 918-924.
- Attwood M M, van Dijken J P and Pronk J T (1991) Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. J. Ferment. Bioeng. 72: 101-105.
- Bergmeyer H U and Bernt E (1977) Methods Enzym. Anal. Vol. 11: 1205-1212.
- Boiardi J L (1994) Metabolic cost of nitrogen incorporation by N₂-fixing *Azotobacter vinelandii* is affected by the culture pH. Biotechnol. Lett. 16: 1195-1198.
- Bont J A M de, Dokter P, Schie van B J, Dijken van J P, Frank Jzn J, Duine J and Kuenen J G (1984) Role of the quinoprotein glucose dehydrogenase in gluconic acid production by *Acinetobacter calcoaceticus*. Antonie van Leeuwenhoek 50: 76-77.
- Dalton H and Postgate J R (1969) Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous cultures. J Gen Microbiol 54: 463-473.
- Dawes E A (1981) Carbon metabolism. In: Continuous cultures of cells. Vo. 2: 1-38. Ed. Callcott PH CRC Press. Inc. Boca Raton Fla.
- De Ley (1966) Dehydrogenases and reductases: 2-ketogluconic acid reductase. Methods Enzymol. Vol. 9: 196-206.
- Galar M L and Boiardi J L (1995) Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 713-716.
- Gornall A G, Bardawill C J and David M A (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177: 751-766.
- Hardy G (1992) Dual glucose metabolism of *Pseudomonas species* in chemostat culture pp 7-105. PhD Tesis. Department of Microbiology. University of Amsterdam.
- Heijnen J J and van Dijken J P (1991) In search of thermodynamic description of biomass yields for the chemotropic growth of microorganisms. Biotechnol. Bioeng. 39 : 833-858.
- Herbert D (1958) Some principles of continuous culture. In: Recent progress in Microbiology. Symp.VII Int. Congr. Microbiol., pp 381-396.
- Herbert D, Phipps P J and Strange R E (1971) Chemical analysis of microbial cells. Methods Microbiol. 5B: 265-272.
- Herbert D, Phipps P J and Tempest D W (1965) The chemostat: Design and instrumentation. Lab. Pract. 14: 1150-1161.
- Homes R W J (1988) The role of the PQQ-linked glucose dehydrogenase in the physiology of *Klebsiella aerogenes* and *Escherichia coli*. pp 1-104. PhD Tesis. Department of Microbiology. University of Amsterdam
- Homes R W J, Postma P W, Neijssel O M and Tempest D W (1985) The functional significance of glucose dehydrogenase in *Klebsiella aerogenes*. Arch. Microbiol. 143: 163-168.
- Lanning M C and Cohen S S (1951) The detection and estimation of 2-ketohexonic acids. J. Biol. Chem. 189: 109-114.
- Lessie and Vanderwyk (1972) Multiple forms of *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases: differences in size, pyridine-nucleotide specificity and susceptibility to inhibition by adenosine-5'-triphosphate. J. Bacteriol. 110: 1107-1117.
- Matsushita K and Ameyama M (1982) D-Glucose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*, membrane-bound. Methods Enzymol. 89: 149-155.

- Matsushita K, Shinagawa E and Ameyama M (1982) D-gluconate dehydrogenase from bacteria, 2-keto-D-gluconate yielding membrane bound. *Methods Enzymol.* 89: 187-193.
- Matsushita K, Toyama H and Adachi O (1994) Respiratory chains and bioenergetics of acid acetic bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* Vol. 36: 247-301.
- Meers J, Tempest D W and Brown C M (1970) Glutamine-(amide): 2-oxoglutarate amino transferase oxidoreductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64: 187-194.
- Miller G L (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* Vol. 31, No. 3: 426-428.
- Neijssel O M (1991) Aerobic 2-ketogluconate metabolism of *Klebsiella pneumoniae* NCTC 418 grown in chemostat culture. *J. Gen. Microbiol.* 137: 1479-1483.
- Neijssel O M and Tempest D W (1979) The physiology of metabolite over-production. In: *Microbial technology: current state, future prospects*, pp 53-82. Ed: Bull A T, Ellwood D C and Ratledge C, Cambridge University Press Cambridge.
- Neijssel O M Hardy G, Lansbergen J C, Tempest D W and O'Brien (1980) Influence of growth environment on the phosphoenolpyruvate glucosephosphotransferase activities of *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: a comparative study. *Arch. Microbiol.* 125: 175-179.
- O'Brien R W, Neijssel O M and Tempest D W (1980) Glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase activity and glucose uptake rate of *Klebsiella aerogenes* growing in chemostat culture. *J. Gen. Microbiol.* 116: 305-314.
- Olijve W and Kok J J (1979b) An analysis of the growth of *Gluconobacter oxydans* in chemostat cultures. *Arch. Microbiol.* 121: 291-297.
- Postma P W and Lengeler J W (1985) Phosphoenolpyruvate carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol. Rev.* 49: 232-269.
- Reis V and Döbereiner J (1998) Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.* 171: 13-18.
- Roels J A (1983) *Energetics and kinetics in biotechnology*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Romanov and Martínez-Romero (1994) Carbon metabolism enzymes of *Rhizobium tropici* cultures and bacteroids. *Appl. Env.* XX: 2339-2342
- Stephan M P, Oliveira M, Teixeira K R S, Martínez-Drets G, Döbereiner J (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 67-72.
- Streekstra H, Teixeira De Mattos M J, Neijssel O M and Tempest D W (1987). Overflow metabolism during anaerobic growth of *Klebsiella pneumoniae* NCTC 418 on glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture. *Arch. Microbiol.* 147: 268-275.
- Tempest D W (1970) The continuous cultivation of micro-organisms. I. Theory of the chemostat. In: Norris J R, Ribbons D W (eds) *Methods in Microbiology*, Acad. Press, London, New York, pp 259-276.

CAPITULO IV

*Efecto del pH Externo sobre el Crecimiento y la Expresión de la Ruta
Extracelular de Oxidación de Glucosa en Gluconacetobacter
diazotrophicus*

IV.1. Resumen

Gluconacetobacter diazotrophicus PAL 3 fue cultivada en C.C. ($D = 0,05 \text{ h}^{-1}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$) con glucosa como única fuente de Carbono y energía y en condiciones de FBN. El efecto del pH del cultivo sobre la producción de biomasa y sobre la actividad de las enzimas involucradas en la ruta de oxidación extracelular de glucosa fue examinado. Los rendimientos en biomasa fueron mayores dentro del intervalo de pH 4,5-6,5 y decrecieron a valores de pH extremos. Las producciones de ácidos glucónico y 2-cetoglucónico *in vitro* presentaron pHs óptimos similares. El intervalo de pH donde la glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ (GDH) presentó *in vitro* su máxima actividad (5,0-6,0), fue coincidente con los mayores valores de concentración de biomasa de los cultivos en estado estacionario. Se encontró que el pH externo ejerció una profunda influencia sobre ambas, la actividad y la síntesis de la GDH: mientras a valores de pH dentro del intervalo 4,5-6,5 la actividad enzimática fue máxima y la síntesis fue mínima, a valores de pH extremos, tanto ácidos como alcalinos, el resultado fue exactamente el opuesto. Se detectó síntesis de GDH y GaDH en todos los valores de pH investigados (3,5-7,5).

IV.2. Introducción

El comportamiento de los microorganismos es fuertemente influenciado por factores ambientales. El ambiente donde los microorganismos se desarrollan condiciona notablemente la expresión fenotípica de los mismos dada su gran versatilidad metabólica. En *Klebsiella aerogenes*, la síntesis y la actividad de la enzima clave del metabolismo extracelular de glucosa, la GDH dependiente de PQQ, son fuertemente influenciadas por la naturaleza del sustrato limitante del crecimiento, siendo elevadas bajo condiciones en las que la demanda energética para el crecimiento y/o mantenimiento son altas (Hommes *et al.*, 1985). Estudios con *Pseudomonas sp.* mostraron que la actividad de GDH dependía también de otros factores ambientales tales como, oxígeno disuelto (Mitchell y Dawes, 1982), actividad acuosa (Prior y Kenyon, 1980) y temperatura (Lynch *et al.*, 1975a, 1975b).

La ruta oxidativa extracelular de aldosas descrita en *G. diazotrophicus* también se manifiesta muy activa en condiciones de alta demanda energética, como es la FBN (Galar y Boiardi, 1995; Capítulos II y III de esta Tesis). Para la mayoría de los diazótrofos la FBN ocurre mejor a valores de pH cercanos a la neutralidad y es mínima a pH 5,0 (Burriss, 1994). Tal es el caso de *Azotobacter sp.* pH 7,3 (Newton *et al.*, 1953); bacterias metanogénicas pH 7,6 (Belay *et al.*, 1984); *Desulfovibrio sp.* pH 7,6 (Postgate and Kent, 1985); *Azospirillum haloprofens* pH 8,5 (Reinhold *et al.*, 1987). En contraste, se ha encontrado que *G. diazotrophicus* tiene la capacidad de crecer y fijar N₂ en condiciones de extrema acidez (Stephan *et al.*, 1991). Cultivos "batch" de esta bacteria en medios conteniendo glucosa requieren de la oxidación extracelular del azúcar a ácido glucónico, vía GDH, como un paso previo al inicio del crecimiento exponencial y fijación de N₂. Esta oxidación ocurre en el espacio periplasmático, como se describe para todos los procariotes que poseen esta ruta metabólica (Duine *et al.*, 1986). Considerando que la GDH y la gluconato deshidrogenasa (enzimas claves de la oxidación de aldosas en *G. diazotrophicus*) están ubicadas en la cara externa de la membrana y orientadas hacia el espacio periplasmático, el pH del medio ambiente aparece como un importante factor ambiental a tener en cuenta por su posible influencia sobre la síntesis y, fundamentalmente, la actividad de las mismas, tal como sucede con otros microorganismos. Estudios pioneros con extractos libres de células de *P. fluorescens* (Wood y Schwerdt, 1953) y *Aerobacter aerogenes* (Dalby y Blackwood, 1955), como otros posteriores con *K. aerogenes* (Hommes, 1988) y *Pseudomonas sp.* (Hardy, 1992), demostraron que la oxidación extracelular de glucosa es altamente dependiente del pH extracelular.

En este capítulo se ha estudiado el efecto del pH del ambiente sobre el crecimiento de cultivos de *G. diazotrophicus* PAL 3 y sobre la actividad y síntesis de las enzimas que catabolizan la glucosa bajo condiciones de alta demanda energética, tal como es la FBN.

IV.3. Materiales y Métodos

IV.3.1. Microorganismo

Gluconacetobacter diazotrophicus PAL 3 (LMG 8066 de acuerdo a la colección de cultivos BCCM/LMG, Gent, Bélgica) fue provista por la Dra. J. Döbereiner (CNPBS/EMBRAPA, Rio de Janeiro, Brasil). La misma fue mantenida en LGIM-glicerol 20 % (v/v) a - 70°C y por subcultivos mensuales en agar-papa (Stephan *et al.*, 1991).

IV.3.2. Condiciones y medios de cultivo

G. diazotrophicus PAL 3 fue cultivada en cultivo continuo (C.C.) a diferentes valores de pH (desde 3,5 hasta 7,5) en condiciones de FBN, en el medio mínimo definido LGIM modificado para continuo (ver Capítulo II) con glucosa (10,0 g.l⁻¹) como única fuente de Carbono y energía. Todos los cultivos se realizaron con exceso de fuente de Carbono (entre 0,50 y 1,00 g.l⁻¹ de glucosa residual en el sobrenadante). Los C.C. se llevaron a cabo a 30°C en un bioreactor LH (Incelltech 210) de 2 L con un volumen de trabajo de 1 litro. Cultivos "batch" fueron crecidos en LGIM (Stephan *et al.*, 1991) con glucosa 5,0 g.l⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 0,132 g.l⁻¹, a pH 6,0 y 30 °C, y se utilizaron como inóculos para el "batch" previo que se realizó en el fermentador. Para obtener un E.E en condiciones de FBN se procedió tal como se describió en el Capítulo III. La concentración de oxígeno disuelto fue continuamente medida empleando un electrodo polarografico Ingold (Wilmington, MA, USA) y se mantuvo al nivel deseado de saturación (1,0 - 2,0 % para asegurar condiciones de FBN) variando la velocidad de agitación (200-400 rpm). El pH fue mantenido automáticamente al valor deseado ± 0,1 usando 0.5 N NaOH. La velocidad de dilución fue 0,05 ± 10 % h⁻¹ y el flujo de aire fue de 0,15 VVM.

El medio empleado para observar los fenotipos GDH(+) y GDH(-) fue el reportado por Gupta y colaboradores (1997) (ver *Apéndice I*).

IV.3.3. Análisis

Se tomaron muestras del cultivo, tanto de fase líquida como de fase gaseosa, y se procesaron los datos para verificar si se había alcanzado el E.E. tal como se describió en el Capítulo III. En la muestra líquida se midió pH y D.O. a 560 nm y se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos para determinar peso seco y medir sustratos y productos en el sobrenadante. El peso seco de la biomasa fue determinado siguiendo el procedimiento descrito por Herbert y colaboradores (1971). La concentración de glucosa en los reservorios y en los sobrenadantes fue determinada con el Kit enzimático de glucosa-oxidasa (Wiener, Argentina; Bergmeyer and Bernt, 1977). El gluconato fue medido con el test enzimático de Boehringer (Mannheim, Germany, test-kit 428191) y el 2-cetogluconato

por el método de Lanning y Cohen (1951). Las concentraciones de O₂ y CO₂ en las muestras gaseosas fueron determinadas empleando un analizador paramagnético de O₂ (Servomex 1100A, Norwood MA, USA) y un analizador infrarrojo de CO₂ (Horiba PIR 2000, Japón). El flujo de aire se midió con un caudalímetro de burbuja. El contenido de proteínas en los ELC fue medido por el método de biuret empleando albúmina bovina como standard (Gornall *et al.*, 1949).

IV.3.4. Cálculos

Los rendimientos en biomasa y las velocidades específicas de consumo de sustrato y O₂ y de producción de CO₂ fueron derivados de los pesos secos, de la concentración de sustratos medidos en el sobrenadante y de las velocidades de consumo y producción de O₂ y CO₂ (respectivamente), tal como se indicó en Materiales y Métodos del Capítulo III.

IV.3.5. Ensayos enzimáticos

Los ensayos espectrofotométricos de GDH PQQ-dependiente (EC 1.1.99.17) y gluconato deshidrogenasa periplasmáticas (EC 1.1.99.3) utilizando DCIP y metosulfato de fenazina (MPS) fueron llevados a cabo según el método de Matsushita y colaboradores (1982) modificado para células enteras. Para todos los ensayos, un volumen apropiado (100-250 ml) fue tomado de C.C. en E.E. crecidos a los distintos valores de pH. Se centrifugó a 12.000 g y 4 °C, y el pellet fue lavado dos veces con buffer fosfato 10 mM (pH: 6.0) conteniendo MgCl₂ 5 mM y Tritón 0,1 % y resuspendido en el mismo buffer a una concentración final de aproximadamente 4.5 mg de células . ml⁻¹. Las medidas de actividad en células enteras se realizaron a 25°C, pH 6.0, tal como se describió en el Capítulo II. Cada cultivo se realizó en dos oportunidades diferentes, y los valores de las actividades enzimáticas fueron promediados.

Las medidas de actividad de GDH NAD-dependiente, hexoquinasa, 6Pgluconato deshidrogenasa (NAD/NADP) y glucosa6Pdeshidrogenasa (NADP) se realizaron en ELC empleando las técnicas que se reportan en el Capítulo III. Las muestras fueron tomadas de los diferentes E.E. y fueron sometidas a ruptura para obtener el ELC empleando una Prensa extrusión sólida X25 (AB Biox, Sweden) tal como se describe en Materiales y Métodos del Capítulo III.

IV.3.5. Incubaciones con suspensiones de células lavadas

Un volumen apropiado (200-250 ml) fue tomado de C.C. en E.E. crecidos a los distintos valores de pH. Se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos y el pellet fue lavado dos veces con buffer fosfato 10 mM conteniendo MgCl₂ 5 mM y Tritón 0,1 % y resuspendido en 2-2.5 ml del mismo buffer. Las incubaciones con células lavadas se llevaron a cabo en erlenmeyers a

30 °C y 100 rpm, en buffer fosfato 100 mM, MgCl₂ 2.5 mM y glucosa, adicionada a una concentración final de 25 mM. El peso seco de las células en cada incubación fue de 0,5-1,0 g.l⁻¹. Se tomaron muestras cada 2 minutos (hasta 20 minutos), que fueron centrifugadas 10 minutos a 12.000 g y los sobrenadantes mantenidos en hielo hasta realizar las medidas de concentración de gluconato. El pH del buffer se ajustó al pH del cultivo continuo de procedencia de las células o al pH donde la actividad de la enzima fue máxima (pH: 6,0).

IV.4. Resultados

IV.4.1. Efecto del pH sobre el crecimiento en C C

Se realizaron C.C. en condiciones de FBN con glucosa como fuente de Carbono y energía que diferían solamente en el pH externo mantenido durante el crecimiento en E.E. Se observó que en el intervalo de pH que va de 4,5 a 6,5 el rendimiento celular no presentó mayores variaciones. No obstante, la *Figura IV.1.* muestra que los rendimientos en biomasa decrecieron hacia valores de pH ácidos ó alcalinos.

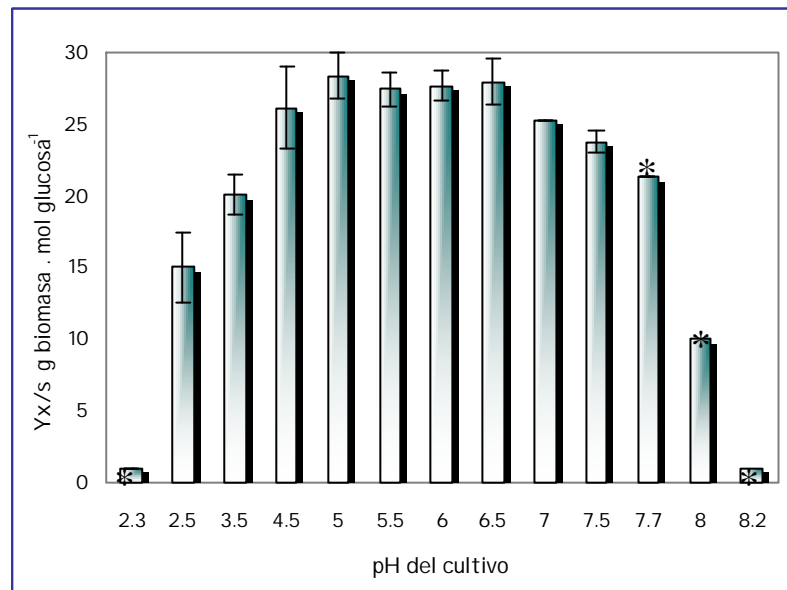


Figura IV.1. Efecto del pH del medio de cultivo sobre el rendimiento en biomasa ($y_{x/s}$) de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido en C.C. en condiciones de FBN con glucosa. Los datos de esta tabla son promedios de al menos 5 muestras de 2 C.C. independientes realizados en iguales condiciones. Para cada valor de pH, el rendimiento en biomasa va acompañado de su desviación estándar (líneas sobre las barras). *Cultivos inestables. Los datos son de cuasi estados estacionarios (no SD).

Todos los cultivos fueron llevados a cabo en condiciones de exceso de glucosa (0,5-1,0 g.l⁻¹ en el sobrenadante de los cultivos) y, acorde con los resultados presentados en el Capítulo III, en todos se registró producción de ácido glucónico (entre 1,0 y 2,5 g.l⁻¹) y cetoácidos (entre 0,2 y 0,5 g.l⁻¹). Los cultivos se "lavarón" (la velocidad de dilución fue mayor que la de síntesis de biomasa) a valores de pH 7,7 ó superiores e inferiores a 2,5.

Por otro lado, se calcularon las velocidades específicas de consumo y de producción de O₂ y de CO₂ respectivamente (*Tabla IV.1.*). Se observó que a valores por debajo y por encima de pH 5,5 y 6,0 respectivamente, estas velocidades aumentaban, no obstante el cociente respiratorio se mantuvo alrededor de 0,7-0,8.

pH del cultivo	2,5	3,5	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	6,87	7,5	7,7
q_{O_2}	196	211	169	180	143	140	159	167	188	196
q_{CO_2}	165	169	133	106	99	112	117	117	125	149

Tabla IV.1. Velocidades específicas de consumo de O_2 (q_{O_2}) y de producción de CO_2 (q_{CO_2}) *in situ*, de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido en C.C. a distintos pHs en condiciones de FBN y con glucosa. Las velocidades están expresadas en $nmoles\ O_2\ o\ CO_2 \cdot min^{-1} \cdot mg\ de\ células^{-1}$.

IV.4.2. Dependencia de la actividad de GDH y GaDH periplasmáticas con el pH (*in vitro*)

El pH óptimo de actividad de la GDH se determinó a través de medidas de producción de ácido glucónico por suspensiones de células lavadas (provenientes de C.C. a pH 6,0) e incubadas en presencia de glucosa (ver Materiales y Métodos). Como muestra la *Figura IV.2. Curva A*, la máxima actividad enzimática fue obtenida entre 5,0 y 6,0, resultado idéntico al obtenido para la GDH ligada a membrana de *K. aerogenes* y claramente distinto del pH óptimo de otras deshidrogenasas tales como las NADH-deshidrogenasas de enterobacterias (Hommes, 1988).

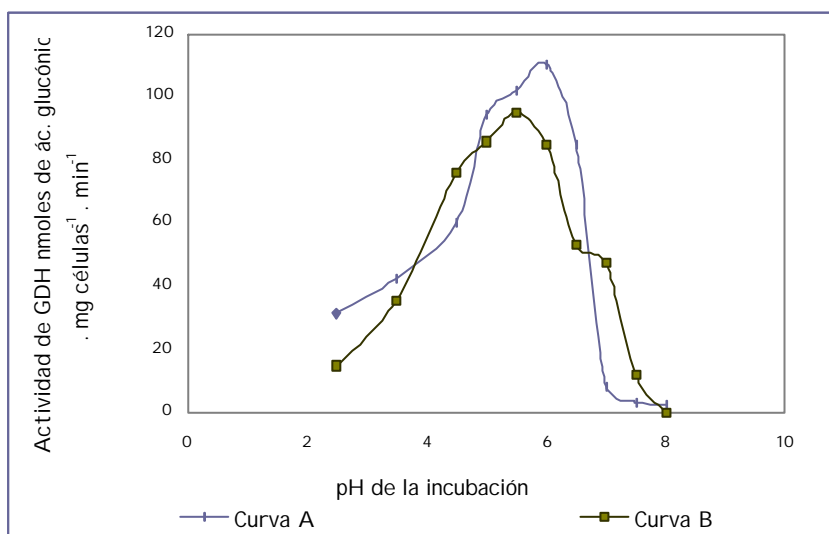


Figura IV.2. Efecto del pH de incubación sobre la producción de ácido glucónico por suspensiones de células lavadas provenientes de C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido en glucosa a pH 6,0 (Curva A) y a pH 3,5 (Curva B).

Con el objeto de verificar que el valor de pH óptimo *in vitro* obtenido en los experimentos precedentes no había sido una consecuencia de que los microorganismos

utilizados provenían de un C.C. a pH 6,0, se repitieron las incubaciones a los distintos valores de pH con células tomadas de un C.C. a pH 3,5. Como muestra la *Figura IV.2. Curva B* la máxima actividad de esta enzima es independiente del pH del cultivo del cual proviene y se encuentra entre 5,0 y 6,0.

También se estudió el efecto del pH sobre la actividad enzimática de la GaDH in vitro. Las muestras fueron las mismas que las empleadas para medir actividad de GDH, pero se empleó ácido glucónico como sustrato en las incubaciones. Se midió el ácido 2-cetoglucónico producido y se observó que se registró mayor producción de este ácido en el intervalo de pH 4,5-6,0 y que hacia valores de pH alcalinos la actividad enzimática decrecía rápidamente (*Figura IV.3.*).

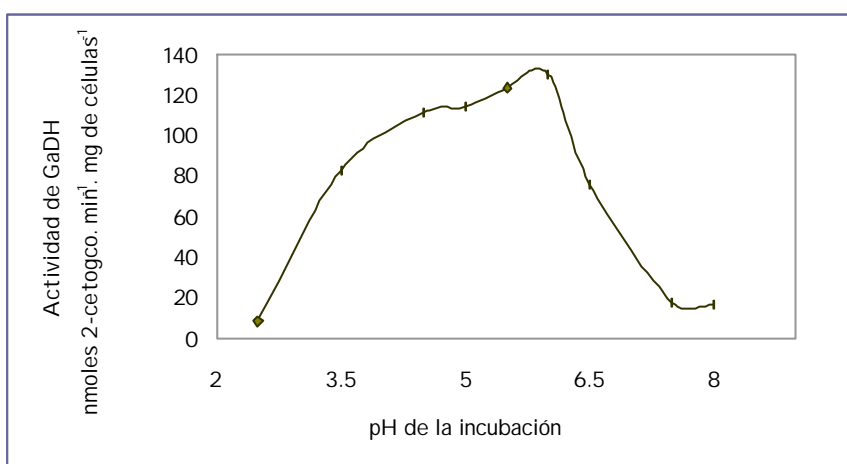


Figura IV.3. Efecto del pH de incubación sobre la producción de ácido 2-cetoglucónico por células lavadas provenientes de C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido en glucosa a pH 6,0.

IV.4.3. Dependencia de la actividad de las enzimas de la ruta periplasmática de oxidación de glucosa con el pH del medio de cultivo

IV.4.3.a. Actividad de GDH medida como ácido glucónico producido por células enteras

La *Figura IV.4.* muestra el crecimiento de alícuotas de C.C. que fueron sembradas en el medio sólido GYG que contiene CO_3Ca (medio GYC de Gupta *et al.*, 1997 modificado). La presencia de una zona de solubilización, característica de un fenotipo GDH(+), fue observada con muestras procedentes de cultivos con valores de pH por debajo de 7,5. No hubo solubilización (fenotipo GDH(-)) con muestras de cultivos crecidos a pH 7,5 y superiores.

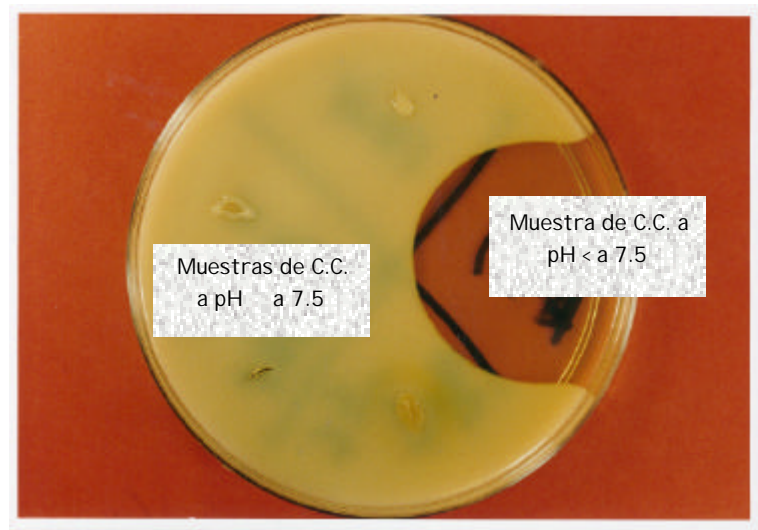


Figura IV.4. Crecimiento de muestras de *G. dizotrophicus* PAL 3 provenientes de C.C. a distintos pHs, en el medio GYG que contiene CO_3Ca .

Para estudiar la causa de la ausencia del halo de solubilización a pHs alcalinos, muestras de cultivos se lavaron con buffer fosfato al pH del cultivo del cual provenían y se incubaron (con glucosa) a ese mismo valor de pH, como se indica Materiales y Métodos. Se midió producción de ácido glucónico y se obtuvieron los valores de actividad de GDH que se muestran en la *Figura IV.5. - Curva A*. Como podemos observar, a pHs entre 4,5 y 6,5 no se encuentran considerables diferencias entre los valores de actividad medidos. No obstante, a valores de pH distantes del óptimo, y particularmente bajo ambientes relativamente alcalinos, una muy baja actividad enzimática pudo ser detectada.

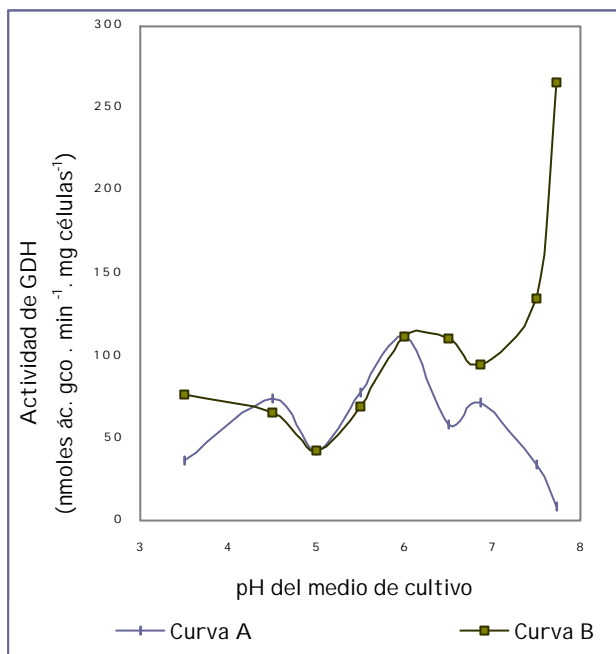


Figura IV.5. Efecto del pH del medio de cultivo sobre la actividad de la GDH, medida como producción de ácido glucónico por suspensiones de células lavadas de *G. diazotrophicus* PAL 3 provenientes de C.C., incubadas tanto al pH del cultivo del cual proceden (Curva A) como a pH 6 (Curva B).

Estas diferencias en los valores de actividad de GDH obtenidos a los distintos pHs podrían deberse a una disminución de actividad enzimática ó a una disminución de la síntesis in vivo en esas condiciones de cultivo. Con el fin de esclarecer esta situación, células provenientes de cultivos continuos realizados a distintos pHs y lavadas a esos mismos valores de pH, se incubaron al pH óptimo de la enzima (pH: 6,0). Los resultados se muestran en la *Figura IV.5.* - *Curva B.*

Incubaciones de células lavadas (provenientes de C.C. a pH 6,0) con glucosa y expuestas durante 15 minutos a cloramfenicol (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), arrojaron iguales valores de actividad enzimática que aquellas incubaciones llevadas a cabo sin el agregado del antibiótico, indicando que el ácido glucónico producido refleja la actividad de la enzima que ya estaba sintetizada en las muestras provenientes del C.C., es decir, no se debe a síntesis de novo.

IV.4.3.b. Actividades de GDH y GaDH medidas en células enteras con DCIP

La actividad de las enzimas de la ruta directa de oxidación de la glucosa fue medida, con DCIP como aceptor de electrones (ver Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla IV.2.*

	GDH	GDH	GaDH
pH del cultivo	nmoles DCIP . mg proteína ⁻¹ . min ⁻¹	nmoles gco. mg proteína ⁻¹ . min ⁻¹	nmoles DCIP . mg proteína ⁻¹ . min ⁻¹
3,5	267	128	80
4,5	137	109	47
5,0	95	71	45
5,5	105	116	28
6,0	154	186	20
6,5	153	184	50
6,7	202	159	23
7,5	282	225	50
7,7	375	444	43

Tabla IV.2. Actividades enzimáticas de células provenientes de C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido a distintos valores de pH, con glucosa y bajo FBN. Las actividades están expresadas en nmoles DCIP red o glucónico producido. min⁻¹. mg proteína⁻¹ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %). Todas las medidas de actividad se realizaron a pH 6.0.

En la *Tabla IV.2.* se incluyeron los valores de ácido glucónico producido por suspensiones celulares provenientes de los estados estacionarios a los distintos valores de pH. Se obtuvieron resultados comparables en las medidas de actividad tanto con DCIP en células enteras (columna 1, *Tabla IV.2.*) como a través de medidas de producción de ácido glucónico por suspensiones celulares (columna 2, *Tabla IV.2.*), registrándose en ambos casos los mayores valores de actividad de GDH a pHs alcalinos. Estos resultados son razonables de acuerdo a la metodología empleada, ya que por cada mol de glucosa que se oxida para producir 1 mol de ácido glucónico, se pone en juego 1 par de electrones que es aceptado por 1 mol de DCIP cada vez que este se reduce (Matsushita *et al.*, 1982). Se encontró actividad (síntesis) de las 2 enzimas periplasmáticas que reducen el DCIP a todos los valores de pH de los cultivos analizados, no obstante los valores de GaDH fueron siempre mucho menores que aquellos registrados para la GDH. Por otro lado, la síntesis de GaDH no fue notablemente afectada con los cambios de pH a diferencia de lo ocurrido con GDH. También se observó que, a pesar de registrarse variabilidad en las medidas de actividad de GDH a valores de pH menores que 6,5 (*Tabla IV.3.*, columna 1), la velocidad específica de consumo de glucosa para esos cultivos (*Tabla IV.3.*, columna 2) no sufrió mayores cambios, y fue siempre menor que la actividad *in vitro*. Por otro lado, a valores de pH alcalinos la actividad de GDH disminuyó frente a un aumento de qs.

	GDH	q glucosa
pH del cultivo	nmoles ác. gco. mg biomasa ⁻¹ . min ⁻¹ *	nmoles glucosa . mg biomasa ⁻¹ . min ⁻¹ *
2,5	-----	-----
3,5	35,88	42,00
4,5	73,98	30,96
5,0	42,52	27,55
5,5	77,81	27,70
6,0	111,4	28,12
6,5	58,67	26,87
6,87	71,43	34,69
7,5	33,78	35,51
7,7	8,25	38,01

Tabla IV.3. Actividades enzimáticas de *G. diazotrophicus* PAL 3 cultivado en C.C. a distintos valores de pH, con glucosa y bajo FBN. Las actividades están expresadas en nmoles de glucónico producido. min⁻¹. mg proteína⁻¹ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %). *Todas las incubaciones se realizaron al mismo pH que el cultivo del cual provenían. Las velocidades específicas de consumo de glucosa in situ (q_s) están expresadas en nmoles glucosa . min⁻¹. mg de biomasa.

Con respecto a la otra vía alternativa para metabolizar la glucosa que posee *G. diazotrophicus*, podemos decir que la GDH NAD-dependiente se sintetizó activamente a pHs ácidos pero a valores de pH cercanos a 7,7 no se detectó actividad. La síntesis de hexoquinasa fue prácticamente nula a todos los valores de pH analizados.

La síntesis de las enzimas claves de la glicólisis (G6Pdeshidrogenasa) y de la vía de los fosfatos de pentosa (6Pgluconatodeshidrogenasa) disminuyó a medida que el pH del medio se tornaba más alcalino (Tabla IV.4.).

pH del cultivo	GDH NAD	Glu6PDesh	6PGtoDesh
3,5	185	1327	1600
5,0	421	1261	900
6,0	700	nd	nd*
6,5	610	867	634
7,0	467	353	389
7,5	0	nd	nd
7,7	0	116	115

Tabla IV.4. Actividades enzimáticas de células provenientes de C.C. de *G. diazotrophicus* PAI 3 crecido a distintos valores de pH, con glucosa y bajo FBN. Las actividades están expresadas en nmoles del producto correspondiente. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$. *denota no dosado

Como se mencionó anteriormente, se produjo ácido glucónico en todas las condiciones de cultivo indicadas en la *Figura IV.1*. La concentración del mismo en los sobrenadantes de pHs cercanos a 8,0 no llegó a ser nula, a pesar de que la GDH era totalmente inactiva en esas condiciones *in vitro*. Por otro lado, y con el objeto de ver si el cambio al fenotipo GDH(-) era reversible *in vivo*, una vez alcanzados valores de pH alcalinos donde los cultivos se tornaban inestables y se "lavarban" (lo cual coincidía con una disminución de actividad de GDH), se disminuyó el pH del cultivo desde 7,7 hasta 6,8 lentamente y muestras de cada estado estacionario a los distintos pHs reflejaron que el fenotipo GDH(+) reaparecía en el medio sólido con carbonato de calcio en las muestras de cultivos crecidos a pHs inferiores a 7,5. Lo extraño en este punto es que muestras tomadas de cultivos continuos a pHs mayores que 7,5, y que presentaban fenotipo GDH(-) en los medios con carbonato, continuaron manteniendo el fenotipo GDH(-) después de sucesivos repiques en el medio sólido LGIL (ver *Apéndice 1*) a pH 6,0.

IV.5. Discusión

Del análisis de los resultados obtenidos en este Capítulo, concluimos que este microorganismo es capaz de crecer y fijar N_2 en C.C. sin una dosis "starter" de $(NH_4)_2SO_4$ en el intervalo de pH 2.5-7.5 (*Figura IV.1*). Los valores de rendimiento en biomasa están de acuerdo con aquellos obtenidos en cultivos "batch" con amonio como fuente de Nitrógeno y glucosa como fuente de Carbono y energía: a un pH inicial de 3,5 los rendimientos en biomasa fueron la mitad de aquellos obtenidos a pH 5,5 y no hubo crecimiento a 7,5 ó superiores (Stephan *et al.*, 1991). Por otra parte, *G. diazotrophicus* exhibe un elevado coeficiente de mantenimiento (ms: $1 \text{ mmol glucosa} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g biomasa}^{-1}$ (Attwood *et al.*, 1991)) durante el crecimiento en cultivos continuos limitados en glucosa, en condiciones de acidez (pH 3,5) y amonio como fuente de Nitrógeno. Por lo tanto, es de esperar que la concentración de biomasa en E.E. disminuya a pHs extremos y en condiciones de FBN (*Figura IV.1*), debido al elevado gasto de fuente de Carbono y energía en mantenimiento celular en detrimento de la síntesis de material celular. El mayor consumo de O_2 respecto de la producción de CO_2 de los cultivos estudiados en este capítulo (todos con exceso de fuente de Carbono y energía) que se muestra en la *Tabla IV.1.*, es coincidente con los resultados registrados para cultivos crecidos con exceso de fuente de Carbono y energía y condiciones de FBN (Capítulo III de esta Tesis), que presentaron una mayor conversión de glucosa a gluconato vía GDH, consistente con una dehidrogenación de glucosa en ausencia de decarboxilación.

Tal como ha sido descrito para *K. pneumoniae* (Hommes *et al.*, 1988) y para *Pseudomonas sp.* (Hardy *et al.*, 1992), las oxidaciones *in vitro* de glucosa y de ácido glucónico por la GDH y la GaDH de membrana en *G. diazotrophicus*, son dependientes del pH (*Figuras IV.2.* y *IV.3*). El intervalo en el cual se registró la mayor actividad de GDH fue independiente del pH al que habían sido cultivadas las bacterias (*Figura IV.2*) y coincidió con el intervalo de pH óptimo para el crecimiento (*Figura IV.1*). Considerando la oxidación extracelular de glucosa a ácido glucónico como el primer paso del metabolismo de la glucosa y, estando la GDH ligada a la membrana y orientada hacia el periplasma, es de esperar que la actividad de la misma responda a modificaciones en el pH externo. Los valores donde se hace inactiva son coincidentes con aquellos donde se obtuvieron disminuciones en el rendimiento celular. Por tanto, pareciera que la inactivación de GDH fue, al menos en parte, una de las causantes de la disminución de rendimiento en biomasa a pHs extremos, principalmente a pHs alcalinos.

De los resultados obtenidos de incubaciones celulares tanto al pH óptimo de la GDH (pH 6,0) como al pH del cultivo, se observa claramente que este último afecta no solo la actividad de GDH sino también la síntesis de la misma (*Figura IV.5*). Por debajo de pH 6,5 los valores de actividad de ambas incubaciones (pH 6,0 y pH del cultivo) son semejantes. En cambio a valores de pHs superiores se observa que la síntesis de la enzima aumenta considerablemente (*Curva B de la Figura IV.5*) mientras que la actividad *in situ* es cada vez

menor (*Curva A de la Figura IV.5.*), confirmando que la enzima se torna inactiva a pHs ligeramente alcalinos y que este comportamiento determina una estimulación de su propia síntesis. A valores de pH ácidos el efecto, si bien semejante, no es tan marcado. Con respecto a la regulación de la síntesis de la GDH, podemos decir que al aumentar el pH del medio de cultivo se induce la síntesis de GDH-PQQ dependiente, a pesar de que la misma se torna prácticamente inactiva.

Hommes y colaboradores (1988) reportaron para *K. pneumoniae* una elevada actividad del sistema oxidativo de la glucosa a valores de pH entre 5,5 y 6,0, y no registraron actividad a valores de pH por encima de 7,5. No obstante, registraron bajas cantidades de GDH a pH 8,0 comparado con pH 6,0 y no detectaron actividad de gluconato deshidrogenasa a pH 8,0. Las diferentes metodologías para medir actividad de GDH (producción de ácido glucónico o bien empleando DCIP), ambas en células enteras provenientes de C.C. a distintos pHs, arrojaron resultados comparables (*Tabla IV.1.*). Por otro lado, la GaDH periplasmática que oxida el glucónico a 2-cetoglucónico no presenta variaciones significativas de actividad conforme cambia el pH del cultivo. Estos resultados sugieren que, en las condiciones de trabajo utilizadas en este estudio, la GDH es la enzima clave en la vía de oxidación directa de la glucosa.

En cultivos realizados a valores de pH inferiores a 7,5, siempre se encuentra una cantidad de GDH suficiente como para satisfacer las exigencias de consumo de glucosa, expresadas como velocidad específica (q_s) (*Tabla IV.2.*, columna 1 y 2). No obstante, a partir de pH 6,5 los valores de actividad decrecen conforme aumenta el pH del cultivo y paralelamente la velocidad específica de consumo de glucosa aumenta, alcanzando valores mayores que aquellos de actividad de GDH registrados para los cultivos realizados a pHs superiores a 7,5. Esto nos indica que a valores de pH alcalinos, mayores que 7,5, el metabolismo de la glucosa debiera proceder por otra vía. Una ruta alternativa para metabolizar la glucosa es la de la GDH NAD-dependiente, pero prácticamente no se registra síntesis de dicha enzima a pHs alcalinos. Por tanto podemos concluir que los cultivos se tornan inestables (se "lavan") a esos valores de pH porque la vía más importante del metabolismo de la glucosa, la GDH, si bien responde con un aumento de síntesis al aumento de pH, el mismo no es suficiente y no es reemplazada su función por otras rutas alternativas. Estos resultados refuerzan los reportados por otros autores que indican que el metabolismo de glucosa en *G. diazotrophicus* sigue fundamentalmente un camino extracelular vía GDH.

IV.6. Referencias

- Alvarez B and Martínez-Drets G (1995) Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. Can. J. Microbiol. 41: 918-924.
- Attwood M M, van Dijken J P and Pronk J T (1991) Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. J. Ferment. Bioeng. 72: 101-105.
- Belay N, Sparling R and Daniels L (1984) Dinitrogen fixation by a thermophilic methanogenic bacterium. Nature 312: 286-288.
- Bergmeyer H U and Bernt E (1977) Methods Enzym. Anal. Vol. II: 1205-1212.
- Burris R H (1994) Comparative study of the response of *Azotobacter vinelandii* and *Acetobacter diazotrophicus* to changes in pH. Protoplasma 183: 62-66.
- Dalby A and Blackwood A C (1955) Oxidations of sugar by an enzyme preparation from *Aerobacter aerogenes*. Can. J. Microbiol. 1: 733-742.
- Duine J A, Frank J Jzn and Jongejan J A (1986) PQQ and quinoprotein enzymes in microbial oxidations. FEMS Microbiol. Rev. 32: 165-178.
- Galar M L and J L Boiardi (1995) Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 713-716.
- Gornall A G, Bardawill C J and David M A (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177: 751-766.
- Gupta A, Verma V y Qazi G (1997) Transposon induced mutation in *Gluconobacter oxydans* with special reference to its direct-glucose oxidation metabolism. FEMS Microbiol. Lett. 147: 181-188.
- Hardy G (1992) Dual glucose metabolism of *Pseudomonas species* in chemostat culture pp 7-105. Phd Tesis. Department of Microbiology. University of Amsterdam.
- Herbert D, Phipps P J and Strange R E (1971) Chemical analysis of microbial cells. Methods Microbiol. 5B: 265-272.
- Hommel R W J (1988) The role of the PQQ-linked glucose dehydrogenase in the physiology of *Klebsiella aerogenes* and *Escherichia coli*. pp 1-104. Phd Tesis. Department of Microbiology. University of Amsterdam.
- Hommel R W J, Hell B van, Postma P W, Neijssel O M and Tempest D W (1985) The functional significance of glucose dehydrogenase in *Klebsiella aerogenes*. Arch. Microbiol. 143: 163-168.
- Lanning M C and Cohen S S (1951) The detection and estimation of 2-ketohexonic acids. J. Biol. Chem. 189: 109-114.
- Lynch W H, MacLeod J and Franklin M (1975a) Effect of growth temperature on the accumulation of glucose-oxidation products in *Pseudomonas fluorescens*. Can. J. Microbiol. 21: 1553-1559.
- Lynch W H, MacLeod J and Franklin M (1975b) Effect of temperature on the activity and synthesis of glucose-catabolizing enzymes in *Pseudomonas fluorescens*. Can. J. Microbiol. 21: 1560-1572.
- Matsushita K and Ameyama M (1982) D-Glucose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*, membrane-bound. Methods Enzymol. 89: 149-155.
- Matsushita K, Shinagawa E and Ameyama M (1982) D-gluconate dehydrogenase from bacteria, 2-keto-D-gluconate yielding membrane bound. Methods Enzymol. 89: 187-193.
- Miller G L (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. Vol. 31, No. 3: 426-428.
- Mitchell C G and Dawes E A (1982) The role of oxygen in the regulation of glucose metabolism, transport and the tricarboxylic acid cycle in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microb. 128: 49-59.

- Newton J W, Wilson P W and Burris R H (1953) Direct demonstration of ammonia as an intermediate in nitrogen fixation by *Azotobacter*. *J. Biol. Chem.* 204: 445-451.
- Postgate J R and Kent H M (1985) Diazotrophy within *Desulfovibrio*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2119-2122.
- Prior B A and Kenyon C P (1980) Water relations of glucose-catabolizing enzymes in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 112: 291-298.
- Reinhold B, Hurek T, Fendrik I, Pot B, Gillis M, Kesstens K, Thielemans S and De Ley J (1987) *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 43-51.
- Stephan M P, Oliveira M, Teixeira K R S, Martínez-Drets G, Döbereiner J (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 67-72.
- Wood W A and Schwerdt R F (1953) Carbohydrate oxidation by *Pseudomonas fluorescens*. I. The mechanism of glucose and gluconate oxidation. *J. Biol. Chem.* 201: 501-511.

CAPITULO V

*Eficiencia Energética de la Cadena Respiratoria de **Gluconacetobacter diazotrophicus***

V.1. Resumen

En la primera parte de este capítulo se reporta el estudio del crecimiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3, en quimiostato, con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ó con Nitrógeno atmosférico (N_2) como única fuente de Nitrógeno, en condiciones de limitación por Carbono. Los rendimientos en biomasa de *G. diazotrophicus* creciendo con glucosa ó gluconato con Nitrógeno fijado fueron muy bajos comparados con los de otras bacterias heterotróficas. Bajo condiciones de FBN los rendimientos en biomasa fueron un 30 % menores que con amonio usando gluconato como fuente de Carbono y energía pero, sorpresivamente, fueron sólo aproximadamente un 14 % más bajos cuando la fuente de Carbono fue glucosa. Posteriormente *G. diazotrophicus* PAL 3 fue cultivado en quimiostato con N_2 como única fuente de Nitrógeno y mezclas de gluconato y xilosa como fuentes de Carbono y energía. La xilosa fue oxidada al ácido correspondiente (xilónico) vía la GDH dependiente de PQQ. El Carbono oxidado periplasmáticamente vía GDH fue recuperado cuantitativamente en los sobrenadantes de los cultivos, indicando que no fue incorporado a la biomasa. Los rendimientos de *G. diazotrophicus* se incrementaron a medida que aumentaba la concentración de xilosa en el medio de cultivo. El Carbono proveniente del gluconato incorporado a la biomasa incrementó paralelamente con la velocidad de oxidación de xilosa.

Del estudio detallado de los flujos de Carbono en los cultivos anteriormente citadas surgieron las siguientes conclusiones: (1) Una de las causas del bajo rendimiento en biomasa de *G. diazotrophicus* es la baja estequiometría de la translocación de protones asociada a la cadena respiratoria; (2) La cadena respiratoria de este microorganismo mostró una diferente eficiencia en la producción de ATP (relación P:O) bajo distintas condiciones de cultivo; (3) la fijación de N_2 fue una (pero no la única) condición bajo la cual se observó un incremento en la relación P:O; (4) la otra condición fue la expresión de una activa GDH dependiente de PQQ.

El contenido de este Capítulo ha sido publicado con menores alteraciones en:

- > Luna M F, Mignone C F and Boiardi J L (2000) The carbon source influences the energetic efficiency of the respiratory chain of N_2 -fixing *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54: 564-569.
- > Luna M F, Bernardelli C E, Mignone C F and Boiardi J L (2002) Energy generation by extracellular aldose oxidation in N_2 -fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, Vol 4: 2054-2056.

V.2. Introducción

Como se ha mencionado en capítulos previos de este trabajo, una glucosa deshidrogenasa PQQ-dependiente es la responsable de la conversión periplasmática de glucosa en *G. diazotrophicus* (Galar y Boiardi, 1995). Esta enzima está ampliamente distribuida entre microorganismos aeróbicos Gram(-) y su rol fue un acertijo durante largo tiempo. Estudios pioneros realizados con *Pseudomonas aeruginosa* crecida en glucosa y gluconato (Campbell *et al.*, 1956; Mackechnie y Dawes, 1969), así como estudios hechos en *Gluconobacter oxydans* (Uspenskya y Loitsyanskaya, 1979), condujeron a que la producción periplasmática de ácido glucónico a partir de glucosa no rendía energía biológicamente utilizable. Esta conclusión fue basada en investigaciones con organismos que poseían varias rutas alternativas para metabolizar la glucosa, lo cual complicó la evaluación de la energética de la oxidación de este azúcar a ácido glucónico por la GDH. Desde entonces fueron varios los estudios que indicaron que, no sólo la GDH PQQ-dependiente sino las deshidrogenasas de membrana en general, constituyen un sistema auxiliar de conservación de energía ligado directamente a la cadena respiratoria (*Klebsiella pneumoniae*, Hommes *et al.*, 1985; *Acinetobacter calcoaceticus* y *P. aeruginosa*, van Schie *et al.*, 1985, 1987a; *Pseudomonas sp.*, Hardy *et al.*, 1992; *Acetobacter pasteurianus*, Luttk *et al.*, 1997).

Según lo reportado por Attwood y colaboradores (1991), los rendimientos en biomasa de *G. diazotrophicus* creciendo en cultivos continuos limitados en glucosa son bajos comparados con aquellos informados para otras bacterias crecidas aeróbicamente en glucosa. Para *A. pasteurianus* se postula que sus bajos rendimientos en biomasa, cuando crece en C.C. limitado en etanol, son causados por una baja estequiometría de la translocación de protones acoplada a la respiración (por lo tanto una baja relación P:O de la cadena respiratoria) (Luttk *et al.*, 1997). Estos autores especularon que, al menos en teoría, la misma explicación podría ser aplicada a *G. diazotrophicus*.

La mayoría de las GDH dependientes de PQQ tienen una baja especificidad por los sustratos (Duine *et al.*, 1986) y pueden ser consideradas más bien como aldosas deshidrogenasas (Matsushita *et al.*, 1980; Dokter *et al.*, 1987). De esta manera, las GDHs son capaces de oxidar, entre otras pentosas, xilosa a su correspondiente ácido aldónico. No obstante, *G. diazotrophicus* no puede crecer con xilosa como única fuente de Carbono y energía (Ureta *et al.*, 1999). Considerando que la xilosa podría servir como fuente de energía, ya que puede proveer PQQ reducido a la cadena respiratoria, se consideró interesante emplear este compuesto como co-sustrato de cultivos limitados en ácido glucónico (en los que de otra manera no podría expresarse una GDH activa) para estudiar la bioenergética de la ruta de oxidación periplasmática de este organismo.

En este capítulo se reporta el análisis de los resultados obtenidos de C.C. de *G. diazotrophicus* realizados bajo limitación por Carbono (glucosa ó glucónico), tanto con amonio o N₂ como fuente de Nitrógeno. Se trata de investigar la causa de los bajos

rendimientos en biomasa de los cultivos y los comparativamente mayores rendimientos en biomasa de cultivos fijando N_2 y que expresan una GDH activa.

V.3. Materiales y Métodos

V.3.1. Microorganismo

Gluconacetobacter diazotrophicus PAL 3 (LMG 8066 de acuerdo a la colección de cultivos BCCM/LMG, Gent, Bélgica) fue provista por la Dra. J. Döbereiner (CNPBS/EMBRAPA, Rio de Janeiro, Brasil). La misma fue mantenida en LGIM-glicerol 20 % (v/v) a - 70°C y por subcultivos mensuales en agar-papa (Stephan *et al.*, 1991).

V.3.2. Condiciones y medios de cultivo

G. diazotrophicus PAL 3 fue cultivado en quimiostato en un bioreactor L.H. de 2 L (Incelltech 210) con un volumen de trabajo de 1 litro, a pH 6,0 y 30^a C. Como medio de alimentación se empleó el medio mínimo definido LGIM modificado para C.C. (ver Capítulo II) con glucosa ó glucónico como única fuente de Carbono y energía, y con Nitrógeno fijado o en condiciones de FBN, según se describió en el Capítulo III. Los cultivos que se emplearon como inóculos para el "batch" que se realizó en el fermentador previo al inicio de la alimentación con medio fresco se prepararon como se detalló en el Capítulo III. Para obtener cada E.E también se procedió tal como se indicó previamente en dicho Capítulo. La concentración de O₂ disuelto fue continuamente medida empleando un electrodo polarográfico Ingold (Wilmington, MA, USA) y se mantuvo al nivel deseado de saturación (25 % con N fijado y 1.0 - 2.0 % para asegurar condiciones de FBN) variando la velocidad de agitación (200-400 rpm). El pH fue mantenido automáticamente al valor deseado ± 0.1 usando 0.5 N NaOH. La velocidad de dilución fue 0,05 ± 10 % h⁻¹ y el flujo de aire fue de 0,15 VVM.

V.3.3. Análisis

Se tomaron muestras del cultivo, tanto de fase líquida como de fase gaseosa, y se procesaron los datos obtenidos para verificar las condiciones de E.E. tal como se describió en el Capítulo III. En la muestra líquida se midió pH y D.O. a 560 nm y se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos para determinar peso seco y medir sustratos y productos en el sobrenadante. El peso seco de la biomasa fue determinado siguiendo el procedimiento descrito por Herbert y colaboradores (1971). La concentración de glucosa en los reservorios y en los sobrenadantes fue determinada con el Kit enzimático de glucosa-oxidasa (Wiener, Argentina; Bergmeyer and Bernt, 1977). El gluconato fue medido con el test enzimático de Boehringer (Mannheim, Germany; test-kit 428191) y el 2-cetogluconato por el método de Lanning and Cohen (1951). Se utilizó el método del ácido Dinitrosalicílico (DNS; Miller, 1959) para medir la concentración de xilosa en los reservorios y en los sobrenadantes de los cultivos. Las concentraciones de O₂ y CO₂ en las muestras gaseosas

fueron determinadas empleando un analizador paramagnético de O₂ (Servomex 1100A, Norwood MA, USA) y un analizador infrarrojo de CO₂ (Horiba PIR 2000, Japan). El flujo de aire se midió con un caudalímetro de burbuja.

V.3.4. Cálculos

Las velocidades específicas de consumo de sustrato y O₂, las velocidades específicas de producción de biomasa y CO₂ y los balances de Carbono y de Grado de reducción fueron derivados de la concentración de sustratos medidos en el sobrenadante y en los reservorios, de los pesos secos y de las velocidades de consumo y producción de O₂ y CO₂ (respectivamente), tal como se indicó en Materiales y Métodos del Capítulo III. Las velocidades de consumo de O₂ y producción de CO₂ fueron calculadas según el método de balance de masas de Cooney y colaboradores (1977). Los balances de Carbono y de grado de reducción fueron calculados de acuerdo a Roels (1983).

V.3.5. Determinación de Carbono Total por Microanálisis

En los sobrenadantes y en el reservorio de los C.C. se realizaron medidas de Carbono orgánico Total (C-Total). Muestras de aproximadamente 5 mg liofilizadas se combustionaron a 800 °C. El CO₂ liberado se adsorbió en Ascarita (asbesto saturado en NaOH) y el H₂ se adsorbió (como H₂O) en perclorato de Mg. Las cantidades de CO₂ y H₂O adsorbidos se obtuvieron por diferencia de peso antes y después de la adsorción y luego se calculó la cantidad de Carbono e Hidrógeno que poseían las muestras. Estas mediciones fueron realizadas en UMIMFOR, Dto. de Química Orgánica, Fac. de Cs. Exactas y Naturales, UBA.

V.3.6. Ensayos enzimáticos

Los ensayos espectrofotométricos de glucosa deshidrogenasa PQQ-dependiente (EC 1.1.99.17) y gluconato deshidrogenasa (EC 1.1.99.3) utilizando DCIP y metosulfato de fenazina (MPS), fueron llevados a cabo según el método de Matsushita y colaboradores (1982) modificado para células enteras. Para ello un volumen apropiado (100-250 ml) fue tomado de cada uno de los diferentes E.E. Se centrifugó a 12.000 g y 4 °C, y el pellet fue lavado dos veces con buffer fosfato 10 mM (pH: 6.0) conteniendo MgCl₂ 5 mM y Tritón 0,1 % y resuspendido en el mismo buffer a una concentración final de aproximadamente 4.5 mg de células . ml⁻¹. Las medidas de actividad en células enteras se realizaron a 25°C, pH 6,0, tal como se describió en el Capítulo II. Cada cultivo se realizó en dos oportunidades diferentes, y los valores de las actividades enzimáticas fueron promediados.

V.3.7. Cinética de la oxidación de xilosa por células intactas

La cinética de oxidación de xilosa por células intactas de *G. diazotrophicus* fue investigada a través de medidas de velocidad de consumo de DCIP, empleando metosulfato de fenazina (PMS), según Matsushita y colaboradores (1982), a apropiadas concentraciones de xilosa. Las células empleadas provenían de C.C. y se procesaron según se describió en *Ensayos enzimáticos* en el Capítulo II. Con los resultados obtenidos se realizó un gráfico para la determinación de K_m aparente y V máxima.

V.4. Resultados

V.4.1. Cultivos continuos con glucosa ó gluconato

V.4.1.a. Características generales

G. diazotrophicus PAL 3 fue crecido en C.C. limitado en la disponibilidad de la fuente de Carbono y energía (glucosa ó gluconato), con amonio o bajo condiciones de FBN, tal como se describió en el Capítulo III. Los rendimientos en biomasa de *G. diazotrophicus* creciendo en C.C. con Nitrógeno fijado fueron muy bajos comparados con los de otras bacterias heterotróficas, coincidentemente con lo reportado por Attwood y colaboradores (1991), y no fueron significativamente afectados por la naturaleza de la fuente de Carbono (glucosa y gluconato). Por otro lado, los rendimientos en biomasa de los cultivos con gluconato bajo condiciones de FBN fueron mucho más bajos (34 %) que aquellos en los que se utilizó Nitrógeno fijado. Estos resultados fueron predecibles, considerando que la FBN es un proceso de elevada demanda energética. Sorpresivamente, este no fue el caso de los cultivos crecidos con glucosa. En cultivos con glucosa bajo condiciones de FBN los rendimientos en biomasa fueron sólo 14 % más bajos que aquellos observados en cultivos conteniendo este azúcar y sulfato de amonio, a pesar de la demanda extra de energía necesaria para la fijación de N_2 (Tabla V.1).

Condición de cultivo	$y_{x/s}$	Balance de Carbono	Balance de energía
Glucosa/No FBN	41,00 ± 2,12	1,05	1,12
Glucosa/FBN	35,19 ± 1,98	0,96	1,05
Glucónico/No FBN	37,33 ± 4,11	1,06	1,12
Glucónico/FBN	24,63 ± 2,65	0,91	1,02

Tabla V.1. Balances de Carbono y energía y rendimientos en biomasa ($y_{x/s}$, g biomasa . mol de fuente de Carbono⁻¹) de *G. diazotrophicus* PAL 3 cultivado en C.C. en diferentes condiciones. Los datos son promedios de, al menos, cinco muestras de dos diferentes C.C. en E.E. bajo las mismas condiciones de cultivo.

V.4.1.b. Cálculos y modelo de crecimiento

Los datos de estos cultivos fueron analizados posteriormente desarrollando un modelo en donde el crecimiento es descrito por una serie de reacciones que dan cuenta de como la fuente de Carbono y energía se asimila en biomasa, catabolismo, formación de producto y respiración (Roels, 1983; de Hollander, 1991). Mediante el empleo de un apropiado set de ecuaciones es posible obtener una relación entre los flujos metabólicos internos y el

crecimiento, los cuales están ligados a la producción y consumo de energía (ATP y poder reductor).

Basados en estudios previos sobre el metabolismo del Carbono en *G. diazotrophicus* (Attwood *et al.*, 1991; Alvarez y Martínez-Drets, 1995; Galar y Boiardi, 1995) se propuso un esquema metabólico simplificado para este organismo (*Figura V.1.*). De acuerdo con este esquema, el crecimiento de *G. diazotrophicus* en glucosa y N_2 pudo ser descrito empleando el set de reacciones que están representadas por las ecuaciones que se muestran en la *Tabla V.2.* Con el fin de facilitar futuros cálculos, los compuestos conteniendo Carbono fueron expresados en base a un C-mol (Erikson *et al.*, 1978).

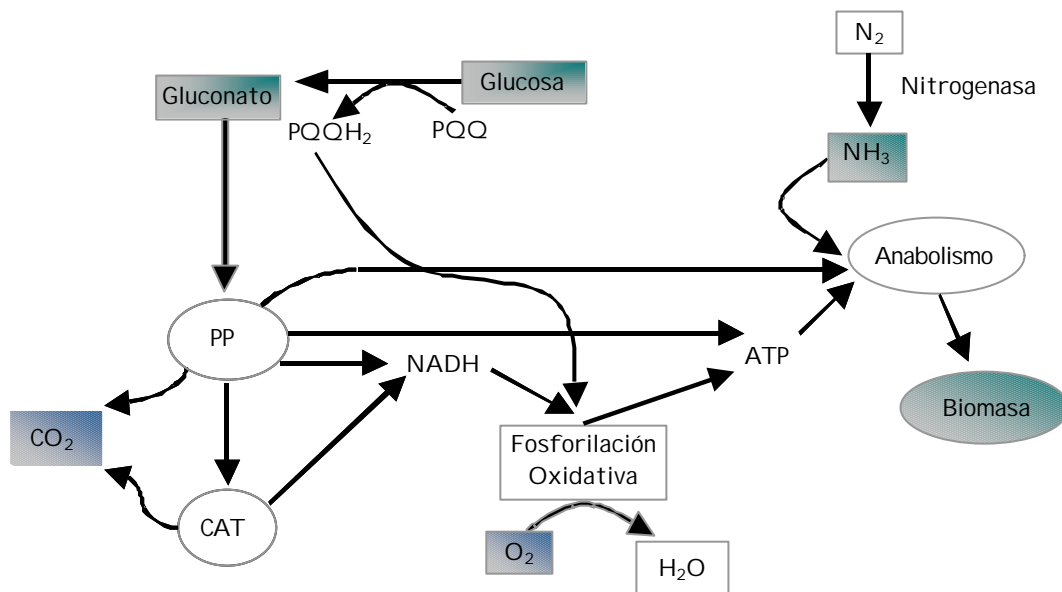


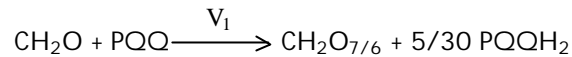
Figura V.1. Esquema metabólico simplificado para el metabolismo del Carbono y crecimiento de *G. diazotrophicus* PAL 3. Las sustancias indicadas en recuadros de color son aquellas que han sido medidas experimentalmente. PP: vía de los fosfatos de pentosa; CAT: ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

En la *Tabla V.2.*, V_1 a V_5 indican los flujos específicos (en base a un C-mol) de las respectivas reacciones. Estos flujos pueden ser estimados de las medidas experimentales indicadas en la *Tabla V.3.* y de otras velocidades específicas calculadas. Un balance de masas rindió las relaciones entre flujos y velocidades específicas indicadas en la *Tabla V.2.* (Nótese que las velocidades específicas de consumo tienen valores negativos, mientras que las velocidades de producción son positivas).

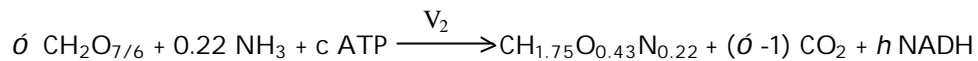
Tabla V.2. Reacciones que describen el metabolismo energético en *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

a. Reacciones metabólicas:

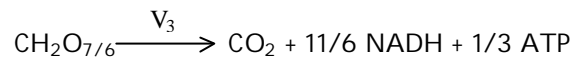
1- Oxidación de glucosa a gluconato via GDH PQQ-dependiente (Ecuación 1):



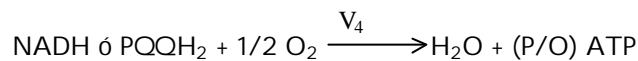
2- Síntesis de biomasa a partir de gluconato (Ecuación 2):



3- Oxidación de gluconato vía la ruta de los fosfatos de pentosa (PP) y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) (Ecuación 3):



4- Respiración (Ecuación 4):



5- Fijación de N_2 (Ecuación 5):



b. Balance de masas:

$$6- q_{S_1} = - V_1$$

$$7- q_{S_2} = V_1 - \text{ó } V_2 - V_3$$

$$8- \mu = D = V_2$$

$$9- q_{\text{CO}_2} = (\text{ó} - 1) V_2 + V_3$$

$$10- q_{\text{O}_2} = -1/2 V_4$$

$$11- q_{\text{NH}_3} = -0.22 V_2 + 2 V_5$$

$$12- q_{\text{N}_2} = - V_5$$

$$13- q_{\text{ATP}} = - 1/y_{\text{ATP}} V_2 + 1/3 V_3 + (\text{P/O}) V_4 - 16 V_5$$

q = velocidades específicas de consumo o producción de la correspondiente sustancia.

μ = velocidad específica de crecimiento

D = velocidad de dilución

S_1 = glucosa

S_2 = gluconato

En el esquema metabólico de la *Figura V.1.*, descrito por las reacciones de la *Tabla V.2.*, se asumió que en *G. diazotrophicus* la glucosa es oxidada primero a gluconato (por una GDH PQQ-dependiente) y posteriormente metabolizada vía PP (Attwood *et al.*, 1991; Alvarez y Martínez-Drets, 1995). Para esta vía se ha reportado que la eficiencia de conversión de Carbono a biomasa (ECC) es de 50 % (Babel y Muller, 1985). Estos autores encontraron que el efecto de la composición elemental de la biomasa sobre la ECC era despreciable. Por lo tanto, podemos asumir que este valor de ECC es, en principio, válido para cualquier microorganismo que use dicha ruta catabólica. De aquí que el valor de ϕ (ecuación 2 *Tabla V.2.*) tenga un valor de 2. Un balance de grados de reducción (Erikson *et al.*, 1978; Roels, 1983) rindió un valor para h de 1.555 (ecuación 2 *Tabla V.2.*), el cual corresponde a los moles de poder reductor producido cuando 1 C-mol de biomasa es sintetizado a partir de gluconato y amonio. Finalmente c , en la misma ecuación, representa los moles de ATP necesarios para sintetizar 1 C-mol de biomasa. Entonces c es $1/y_{ATP}$. La relación P:O indica los moles de ATP sintetizados por par de electrones transferidos al O_2 por la cadena respiratoria.

Según lo reportado por Beardmore-Gray y Anthony (1986), los electrones del PQQ reducido entran a la cadena respiratoria a nivel de la ubiquinona y, si consideramos una cadena respiratoria altamente acoplada, es de esperar que el NADH sea más eficiente en la generación de ATP que el PQQ reducido. Pero, para una cadena de transporte de electrones pobremente acoplada (como es el caso de *G. diazotrophicus*, ver a continuación), NADH y PQQ podrían ser considerados equivalentes en términos de eficiencia para la generación de energía, tal como fue anteriormente reportado para *Pseudomonas putida* (Hardy *et al.*, 1993). Por tal motivo, en la reacción representada por la ecuación 4 de la *Tabla V.2.*, se asumió que el PQQ reducido y el NADH rindieron la misma cantidad de ATP por cada par de electrones transferidos al oxígeno a través de la cadena respiratoria.

La fórmula de la biomasa, $CH_{1.75}O_{0.43}N_{0.22}$, con 7 % de sales, ha sido reportado para *Klebsiella aerogenes* (Roels, 1983). Esta fórmula fue considerada de acuerdo con el contenido de Nitrógeno de la biomasa de *G. diazotrophicus* que está en el orden de 12.0 a 14.0 % p/p. El uso, en nuestros cálculos, de otras fórmulas de biomasa ya reportadas para otros organismos Gram(-) no modificó significativamente nuestros resultados (datos no mostrados).

Bajo condiciones de FBN no se detectó amonio en los sobrenadantes de los cultivos. Además, los balances de Carbono y energía mostraron que no hubo producción significativa de otros productos más que biomasa y CO_2 (*Tabla V.1.*). Por esto se puede asumir que todo el N_2 fijado a través de la FBN fue incorporado a la biomasa. Por tanto en la ecuación 11, q_{NH_3} es igual a cero, y de la ecuaciones 8, 11 y 12 se deduce que:

$$q_{N_2} = -0.11 \mu$$

(Ecuación 14)

En experimentos donde la glucosa fue empleada como fuente de Carbono, no se detectó acumulación de glucónico en los sobrenadantes de los cultivos, por lo que se puede asumir que $q_{S_2} = 0$. Valores derivados y medidos de velocidades específicas para cada una de las condiciones de cultivo se muestran en la *Tabla V.3*.

	q_s^*	μ^\dagger	$q_{CO_2}^\ddagger$	q_{O_2}	q_{N_2}
Condición					
Glucosa/No FBN	-0,181	0,0484	0,142	-0,153	0
Glucosa/FBN	-0,200	0,0461	0,145	-0,154	$-5,76 \cdot 10^{-3}$
Gluconato/No FBN	-0,193	0,0471	0,158	-0,166	0
Gluconato/FBN	-0,316	0,0508	0,237	-0,234	$-6,35 \cdot 10^{-3}$

Tabla V.3. Velocidades específicas de consumo de la fuente de Carbono (q_s), de O_2 (q_{O_2}), N_2 (q_{N_2}) y de formación de biomasa (μ) y de CO_2 (q_{CO_2}) de *G. diazotrophicus* PAL 3 cultivado en C.C. en diferentes condiciones. Los datos son promedios de, al menos, cinco muestras de dos C.C. independientes. La SD nunca fue mayor que $\pm 2\%$. * q_s es expresado en C-mol de sustrato $\cdot (C\text{-mol biomasa})^{-1}$. $\dagger \mu$ es expresado en h^{-1} . $\ddagger q_{CO_2}$, q_{O_2} y q_{N_2} son expresados en mol $\cdot C\text{-mol}^{-1}$.

Por otro lado, en cultivos en condiciones de E.E. no hay acumulación intracelular neta de ninguna sustancia, por lo que $q_{ATP} = 0$ (ecuación 13). Si se introducen las ecuaciones 6,7, 8 y 10 en la ecuación 13, el balance de ATP puede ser expresado como:

$$\mu \cdot (1/y_{ATP} + \delta / 3) - 16 q_{N_2} + 1/3 q_s + 3 q_{O_2} (P/O) = 0$$

(Ecuación 15)

Otra expresión para el balance de ATP puede ser obtenida por combinación de las ecuaciones 6,8, 9 y 10 con la ecuación 13:

$$\mu \cdot (1/y_{ATP} + (\delta - 1)/3) - 16 q_{N_2} - q_{CO_2}/3 + 2 q_{O_2} (P/O) = 0$$

(Ecuación 16)

Ecuaciones equivalentes a la 15 y 16 pueden ser derivadas para el caso que el gluconato sea la fuente de Carbono.

Para el cálculo del y_{ATP} para cultivos con gluconato y amonio ($q_{N_2} = 0$), empleando las ecuaciones 15 ó 16, se empleó un valor de 0.5 para la relación P/O, según lo indicado por Luttk y colaboradores (1997). Estos autores han reportado tal valor para *Acetobacter pasteurianus* y propusieron que el bajo rendimiento en biomasa de *G. diazotrophicus* podría también ser explicado por una baja relación P:O. Pequeños cambios en al relación P:O realizados para estimar el valor del y_{ATP} empleando las ecuaciones 15 y 16 no modificaron

significativamente el incremento relativo de la relación P/O calculada para cultivos creciendo en glucosa y N₂ (cálculos no mostrados). El valor de y_{ATP} calculado fue 0.235 (ecuación 15) y 0.232 (ecuación 16) C-mol biomasa (mol ATP)⁻¹. Para posteriores cálculos se empleó 0.235 C-mol biomasa (mol ATP)⁻¹. Se utilizó este mismo valor de y_{ATP} para todas las condiciones de cultivo analizadas en este estudio, ya que en todos los casos se consideró (ecuación 2 *Tabla V.2.*) que la biomasa derivaba de gluconato y amonio. La *Tabla V.4.* muestra los valores de las relaciones P:O calculadas para esos cultivos, empleando la ecuación 15 ó la ecuación 16. La relación P:O calculada para los cultivos fijando N₂ con glucosa como única fuente de Carbono y energía, fue más alta que las calculadas para las otras condiciones de cultivo.

Condición de cultivo	P/O (ec. 15)	P/O (ec. 16)	Condición de cultivo	P/O (ec. 15)	P/O (ec. 16)
Glucosa/No FBN	0,58 ± 0,100	0,56 ± 0,099	Gluconato/No FBN	0,50 ± 0,086	0,49 ± 0,086
Glucosa/FBN	0,78 ± 0,065	0,79 ± 0,063	Gluconato/FBN	0,50 ± 0,045	0,52 ± 0,044

Tabla V.4. Relaciones P/O calculadas (mol de ATP por átomo g de O₂) de *G. diazotrophicus* PAL 3 cultivado bajo diferentes condiciones de cultivo. Las SD de los valores de P/O fueron calculadas de las SD de los diferentes valores de q de la *Tabla V.3.* (Box et al., 1989).

V.4.2. Cultivos continuos con gluconato y xilosa

V.4.2.a. Características generales

Se realizaron cultivos "batch" con xilosa como única fuente de Carbono y energía, que confirmaron los resultados presentados por Ureta y colaboradores (1995). *G. diazotrophicus* no fue capaz de crecer utilizando xilosa como fuente de Carbono, pero fue capaz de metabolizar esta pentosa disminuyendo el pH del medio de cultivo en 2 unidades en menos de 24 hs, alcanzando valores entre 3,5 y 4,0.

En los C.C. se analizó el contenido de GDH y GaDH periplasmáticas. Los mismos respondieron de manera semejante a los cultivos con exceso de glucosa, con un aumento en la actividad de GDH dependiente a medida que aumentaba la concentración del sustrato de esta enzima.

	glucónico/No FBN	glucónico/FBN	glucónico/FBN xilosa 5 g.l ⁻¹	glucónico/FBN xilosa 10 g.l ⁻¹	glucónico/FBN xilosa 20 g.l ⁻¹
GDH PQQ-dep	272	267	290	327	346
GaDH memb.	57	28	41	57	60

Tabla V.5. Actividades enzimáticas de células provenientes de C.C. de *G. diazotrophicus* PAL 3 crecido en LGIM modificado para C.C. con ácido glucónico y concentraciones crecientes de xilosa. Las actividades están expresadas en nmoles DCIP red . min⁻¹. mg proteína⁻¹ (considerando un contenido de proteínas de un 60 %).

En este trabajo se asumió que la xilosa es oxidada a ácido xilónico por la GDH, tal cual ha sido reportado para todas las GDH dependientes de PQQ hasta ahora descritas (Hommes *et al.*, 1995; Hardy *et al.*, 1995). Además se investigó la cinética de células intactas de *G. diazotrophicus* a través de medidas de velocidad de consumo de DCIP a varias concentraciones de xilosa. Un gráfico de los resultados indicó que los mismos respondieron a una cinética de Michaelis-Menten, con un Km de 98 mM aproximadamente y una V_{máx.} de 221 nmoles de DCIP.mg de proteína⁻¹.minuto⁻¹ (Figura V.2), coincidentes con valores de Km reportados anteriormente para GDH y xilosa en otros microorganismos (Hommes *et al.*, 1988; Hardy *et al.*, 1992). Evidentemente, la GDH periplasmática de *G. diazotrophicus* oxida xilosa produciendo el ácido aldónico correspondiente el cual no puede ser incorporado a la biomasa. Fue necesario obtener este dato ya que, para el estudio de la bioenergética de la GDH, nos permitió emplear la xilosa únicamente como fuente de energía. Como dato adicional, el mutante GDH(-), al igual que la cepa salvaje, no creció cuando la xilosa fue la única fuente de Carbono y energía y, como era de esperar, tampoco acidificó el medio.

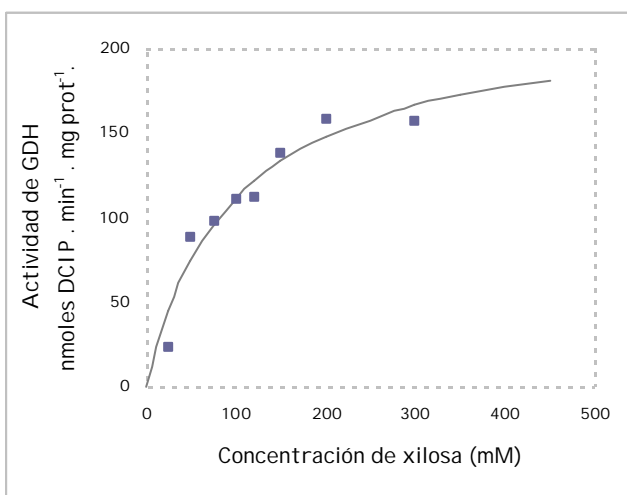


Figura V.2. Determinación del Km y la V_{máx.} de GDH en células lavadas de *G. diazotrophicus* PAL 3 a través de medidas de actividad enzimática. La gráfica responde a la ecuación $V_0 : Km . (S)/V_{máx} + (S)$.

Para estudiar el efecto de la oxidación de xilosa por la GDH periplasmática sobre el metabolismo del glucónico, se llevaron a cabo C.C. limitados en glucónico con y sin xilosa

como co-sustrato y N₂ como fuente de Nitrógeno. Se obtuvieron los resultados que se muestran en la *Tabla V.6.*

[xilosa en el Res.] (g.l ⁻¹)	y _{glc} (g.mol ⁻¹)	q _{glc} (mmol.g.h ⁻¹)	q _{xil} (mmol.g.h ⁻¹)	q _{co2} (mmol.g.h ⁻¹)	q _{o2} (mmol.g.h ⁻¹)	Balace de C*
0	26,2 ± 2,1 a	1,92 ± 0,08 a	-	8,39 ± 0,77 a	7,76 ± 0,78 a	96
5	29,2 ± 1,9 b	1,69 ± 0,08 b	0,86 ± 0,14 a	8,40 ± 0,78 a	8,00 ± 1,10 a	106
10	32,4 ± 1,1 c	1,48 ± 0,10 c	1,53 ± 0,20 b	7,35 ± 0,64 ab	7,60 ± 1,09 a	110
20	34,5 ± 1,0 d	1,47 ± 0,07 c	2,74 ± 0,22 c	6,85 ± 0,35 b	7,76 ± 0,50 a	108

Tabla V.6. Rendimientos en biomasa (*y*), velocidades específicas de consumo (*q*) de gluconato, xilosa y O₂ y de producción de CO₂ y balances de carbono de *G. diazotrophicus* PAL 3 cultivado en C.C. con mezclas de gluconato (10,0 g.l⁻¹) y xilosa. Los cultivos fueron llevados a cabo a una velocidad de dilución (*D*) de 0,050 - 0,003 h⁻¹. Los datos son los promedios de, al menos, cinco muestras de diferentes C.C. en E.E. bajo las mismas condiciones de cultivo. Los promedios seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes, con un valor de *P* < 0.05.* La recuperación de Carbono fue calculada teniendo en cuenta la velocidad de consumo de gluconato y la de producción de biomasa y CO₂.

Como lo indica la *Tabla V.6.*, todos los cultivos convirtieron la fuente de Carbono (glucónico) completamente en CO₂ y biomasa. No se registró producción de cetoácidos.

Análisis de Carbono-Total por microanálisis, junto con medidas de azúcares totales (DNS) y de ácido glucónico por colorimetría, tanto de los reservorios como de los correspondientes efluentes de los C.C., resultaron en una recuperación de compuestos de 5 C del 100 %. Los resultados de dichos estudios sobre muestras liofilizadas y líquidas se detallan a continuación.

Análisis	Reservorio*	Sobrenadante
% C por microanálisis	31.79	29.22
% H por microanálisis	5.90	5.98
Peso liofilizado (g.l ⁻¹)	34.48	23.92
C-total por microanálisis (g.l⁻¹)	10.96	6.99
Glucónico por colorim. (g.l ⁻¹)	8.62	0.39
Xilosa por colorim. (g.l ⁻¹)	15.48	8.79
C-total por colorimetría (g.l⁻¹)	9.36	3.66

Tabla V.7. Medidas de Carbono total en muestras liofilizadas y líquidas de sobrenadante y reservorio de un C.C. de *G. diazotrophicus* creciendo en glucónico y xilosa. *Las muestras se procesaron por duplicado y se analizaron 2 muestras de cada una de las 4 condiciones de cultivo que se estudiaron en este trabajo, junto con duplicado del reservorio correspondiente, aunque en esta Tabla solamente se muestra el resultado de 1 de ellas ya que los resultados fueron coincidentes.

Con los datos de la *Tabla V.7.* podemos calcular la diferencia entre el C-total del Reservorio determinado por colorimetría (9,36 g.l⁻¹) y el Carbono consumido como ácido glucónico (3,03 g.l⁻¹). Este valor de 6,33 g.l⁻¹ es coincidente con el dato de Carbono del sobrenadante determinado por microanálisis, siempre que la xilosa o su ácido aldónico correspondiente (con igual contenido de Carbono), no fueran incorporados a la biomasa. Entre este último valor (6,33 g.l⁻¹) y el C-total del sobrenadante obtenido por microanálisis que muestra la *Tabla V.7.* (6,99 g.l⁻¹) hay una pequeña diferencia que podríamos atribuir a errores experimentales comparada con la gran diferencia existente entre el C-total del sobrenadante medido por microanálisis (6,99 g.l⁻¹) y el C-total del sobrenadante medido por colorimetría (3,66 g.l⁻¹), es decir, si la xilosa fuera incorporada a la biomasa. En los sobrenadantes de cultivos con glucónico como fuente de Carbono y energía, el C-total prácticamente resultó nulo ya que en estos cultivos limitados en Carbono el único componente que se registró fue el glucónico no utilizado por los microorganismos, cuya concentración fue del orden de ppm. Con este experimento se verificó que *G. diazotrophicus* no utilizó ni la xilosa (ni su producto de oxidación) como fuente de Carbono, es decir, no los incorporó a la biomasa, dato necesario para poder analizar los resultados de los C.C. llevados a cabo con glucónico y concentraciones crecientes de xilosa.

Como muestra la *Tabla V.6.*, los rendimientos en biomasa con respecto a gluconato (y_{glc}) incrementaron a medida que aumentaba la concentración de xilosa en el medio de cultivo. Las velocidades específicas de producción de CO₂ disminuyeron con el incremento de la concentración de xilosa. Esto indica que más gluconato se incorporaba a la biomasa (menos gluconato oxidado a CO₂) a medida que más xilosa era oxidada. Esto estuvo de acuerdo con el incremento observado de y_{glc} . Por otro lado, las velocidades específicas de consumo de O₂ permanecieron relativamente constantes para todas las condiciones estudiadas, como era de esperar, ya que la misma cantidad de energía fue requerida para la síntesis de

biomasa. Pero, la disminución en la producción de energía procedente de la menor oxidación de gluconato debió ser compensada de alguna manera.

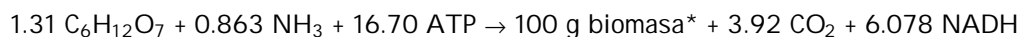
V.4.2.b. Cálculos y modelo de crecimiento

Como fue varias veces mencionado precedentemente, la oxidación periplasmática de aldosas conduce a algunos organismos a incrementar la eficiencia de generación de energía, en una magnitud tal que no puede ser atribuída solamente a la producción de poder reductor extra proveniente del PQQ reducido (Hardy *et al.*, 1993; van Schie *et al.*, 1987). Con el fin de dilucidar si este era también el caso para *G. diazotrophicus* los datos de la *Tabla V.6.* fueron analizados desarrollando un modelo donde el crecimiento fue descrito por una serie de reacciones tal como se describió en la primera parte de este capítulo. Basados en estudios previos sobre el metabolismo de Carbono en *G. diazotrophicus* (Alvarez y Martínez-Drets, 1995; Attwood *et al.*, 1991) el crecimiento de este microorganismo fijando N₂ en mezclas de gluconato y xilosa podría ser descrito por el set de reacciones representadas por las ecuaciones que se muestran en la *Tabla V.8.*

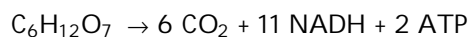
Tabla V.8. Reacciones que describen el metabolismo energético en *Gluconacetobacter diazotrophicus* creciendo en mezclas de gluconato y xilosa y fijando N₂.

Reacciones metabólicas:

1- Síntesis de biomasa a partir de gluconato (Ecuación 17):



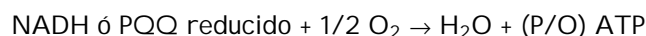
2- Oxidación de gluconato vía la ruta de los fosfatos de pentosa (PP) y el Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) (Ecuación 18):



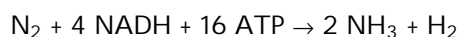
3. Oxidación de xilosa a xilonato vía GDH PQQ-dependiente (Ecuación 19):



4- Respiración (Ecuación 20):

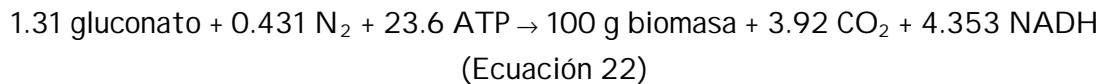


5- Fijación de N₂ (Ecuación 21):



* Formula para la biomasa: CH_{1.75}O_{0.43}N_{0.22}.

En los cultivos indicados en la *Tabla V.6.* no se detectó amonio ni gluconato en los sobrenadantes. Además, los balances de Carbono para gluconato mostraron que no se detectó otro producto más que biomasa y CO₂. Por ello se pudo asumir que la velocidad de fijación de N₂ (ecuación 21, *Tabla V.8.*) es directamente proporcional a la velocidad de síntesis de biomasa (ecuación 17, *Tabla V.8.*). Esto significa que todo el N₂ fijado fue incorporado a la biomasa. De este último razonamiento surge que la síntesis de biomasa puede ser expresada como:



El poder reductor generado por la síntesis de biomasa (4.353 mol NADH) y el producido por la oxidación de gluconato y de xilosa (ecuaciones 18 y 19, *Tabla V.8.*) contribuyeron a la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa. Si llamamos *glc* y *xil* a los moles de gluconato y de xilosa oxidados cuando se producen 100 g de células secas de *G. diazotrophicus*, entonces el Balance de ATP es:

$$23.6 \text{ ATP} = 2 \text{ glc} + 11 \text{ glc (P/O)} + \text{xil (P/O)} + 4.353 \text{ (P/O)}$$

(Ecuación 23)

Para resolver esta ecuación es necesario plantear otra relación. Llamemos K a la relación entre el consumo de xilosa y gluconato ($K = q_{\text{xil}}/q_{\text{glc}}$). Por otro lado, K está relacionado con *glc* y *xil* (según las ecuaciones 17, 18 y 19 *Tabla V.8.*) como sigue:

$$K = \text{xil}/(1.31 + \text{glc})$$

Ecuación 24)

De acuerdo a esto, la Ecuación 23 puede ser reescrita como:

$$2 \text{ glc} + 11 \text{ glc (P/O)} + K (1.31 + \text{glc}) \text{ (P/O)} + 4.353 \text{ (P/O)} = 23.6 \text{ ATP}$$

(Ecuación 25)

Adjudicándole un valor a la relación P/O la Ecuación 25 puede ser resuelta para calcular *glc*. Entonces, el rendimiento en biomasa puede ser calculado como:

$$y_{\text{glc}} = 100/(1.31 + \text{glc})$$

(Ecuación 26)

Las ecuaciones 25 y 26 indican claramente que el rendimiento en biomasa respecto al gluconato (y_{glc}) depende de la relación de consumo xilosa a gluconato y de la relación P/O.

La *Tabla V.9.* muestra una comparación entre los y_{glc} experimentales y los calculados empleando datos experimentales para K y dos diferentes relaciones P/O tomadas para que concuerden con los datos experimentales. En ésta se puede observar que, cuando no hay xilosa presente en el medio de cultivo el rendimiento calculado es semejante al obtenido experimentalmente empleando para el cálculo una relación P:O de 0.6. No obstante, cuando la concentración de xilosa fue de 10.0 ó 20.0 g.l⁻¹, los rendimientos calculados coincidían más con los experimentales usando para el cálculo un valor más alto de la relación P:O (0.75).

xilosa en el reservorio (g.l ⁻¹)	$K_{exp} = q_{xil}/q_{glc}$ mol.mol ⁻¹	y_{glc} (g.mol ⁻¹) experimental	y_{glc} (g.mol ⁻¹) calculado	
			P/O=0.6	P/O=0.75
0	0	26,2 ± 2,1	26,7 ± 0,19 *	30,4 ± 0,23
5	0,51	29,2 ± 1,9	27,6 ± 0,16 *	31,2 ± 0,19 *
10	1,03	32,4 ± 1,1	28,7 ± 0,28	32,1 ± 0,33 *
20	1,86	34,5 ± 1,1	30,1 ± 0,32	34,5 ± 0,38 *

Table V.9. Rendimientos en biomasa calculados y experimentales de *G. diazotrophicus* PAL3 en C.C. P/O: mol de ATP formados por átomo g de O₂ consumido. Las SD de los valores de rendimiento calculados fueron derivadas de las SD de q_{xil} y q_{glc} de la *Tabla V.8.* (Box et al., 1989). Los valores de y_{glc} calculados seguidos por* no son estadísticamente diferentes ($P > 0.05$) del correspondiente y_{glc} experimental.

De esto se concluye que los aumentos de rendimientos en biomasa de los cultivos con xilosa no pueden ser explicados solamente en la base de un poder reductor extra suministrado por la oxidación de la aldosa vía GDH; en adición a ello una más eficiente cadena respiratoria (incremento de la relación P:O) debe ser considerada.

V.5. Discusión

Los rendimientos en biomasa de cultivos fijando N_2 , con gluconato como fuente de Carbono y energía, fueron mucho más bajos que aquellos obtenidos con amonio (*Tabla V.1.*). Estos resultados eran de esperar debido a la demanda extra de energía que se requiere para la fijación de N_2 . Esto también se vio reflejado en los valores de las velocidades de consumo de O_2 (*Tabla V.3.*). No obstante, no ocurrió lo mismo cuando se utilizó glucosa como fuente de Carbono y energía. En este último caso los rendimientos en biomasa fueron mucho menos afectados por la fijación de N_2 . Más aún, los cultivos fijando N_2 con glucosa mostraron velocidades específicas de consumo de oxígeno similares a aquellas obtenidas con amonio (*Tabla V.3.*). Como el consumo específico de oxígeno es una medida de la energía requerida para la síntesis de biomasa (Calhoun *et al.*, 1993), parece ser que cultivos creciendo en glucosa y empleando N_2 usan similares cantidades de energía para producir biomasa y para fijar N_2 que cultivos con amonio para sintetizar sólo biomasa. Por tanto los cultivos creciendo en glucosa y N_2 fueron, de alguna manera, más eficientes en la utilización de la fuente de Carbono que los llevados a cabo con amonio, y que cultivos fijando N_2 con gluconato. Para que este fenómeno tenga lugar al menos dos posibilidades pueden ser consideradas: (1) los cultivos fijando N_2 con glucosa fueron más eficientes en la síntesis de biomasa (es decir, más biomasa pudo ser sintetizada con la misma cantidad de ATP), por lo tanto incrementó el y_{ATP} , ó (2) estos cultivos mostraron una mayor eficiencia energética de la cadena respiratoria (es decir, una relación P:O más elevada). De acuerdo al esquema metabólico propuesto (*Figura V.1.*, *Tabla V.2.*), la biomasa es sintetizada a partir de gluconato y amonio independientemente de la fuente de Carbono o de Nitrógeno utilizada para el crecimiento. Por lo tanto, no parece razonable pensar que el y_{ATP} pudiera haberse modificado bajo las diferentes condiciones de cultivo llevadas a cabo en este estudio. Es comúnmente aceptado que diferencias en rendimientos en biomasa de organismos crecidos bajo condiciones similares son un reflejo de la eficiencia de sus sistemas generadores de energía (Calhoun *et al.*, 1993). Aplicando el modelo de crecimiento descrito anteriormente (*Tabla V.2.*), se pudo calcular la relación P:O para *G. diazotrophicus* creciendo bajo las condiciones usadas en este estudio (*Tabla V.4.*). Se encontró que una de las causas de los bajos rendimientos en biomasa de cultivos de *G. diazotrophicus*, es la baja estequiometría de la translocación de protones asociada a la cadena respiratoria y que *G. diazotrophicus* creciendo en glucosa y N_2 incrementa su relación P:O, probablemente redireccionando el flujo de electrones por alguna rama alternativa de su cadena respiratoria. El empleo de ramas alternativas de la cadena respiratoria como una adaptación fenotípica a diferentes condiciones ambientales se encuentra comúnmente en bacterias (Stouthamer, 1979) y particularmente en diazótrofos (Liu *et al.*, 1995; Hennecke, 1998). Condiciones de bajas concentraciones de O_2 , para poder llevar a cabo la FBN, no fueron suficientes para la expresión de una rama más eficiente de la cadena respiratoria de *G. diazotrophicus*, ya que cultivos creciendo con gluconato y N_2 no presentaron un incremento en la relación P:O tal

como se observó con glucosa (Tabla V.4.). La única diferencia entre el metabolismo de glucosa y gluconato es la conversión extracelular de la glucosa vía una GDH dependiente de PQQ. El descubrimiento que la oxidación extracelular de glucosa, podría estar relacionada con un incremento en la eficiencia de generación de energía, la cual no puede atribuirse solamente a una producción extra de poder reductor proveniente del PQQ reducido, ha sido reportada para otros microorganismos (van Schie *et al.*, 1987; Hardy *et al.*, 1992).

Flores-Encarnación y colaboradores (1999) reportaron la composición y organización del sistema respiratorio de *G. diazotrophicus*, así como también sus variaciones de acuerdo a la concentración de amonio empleada, en cultivos "batch" bien aireados, según se muestra en la Figura V.3.

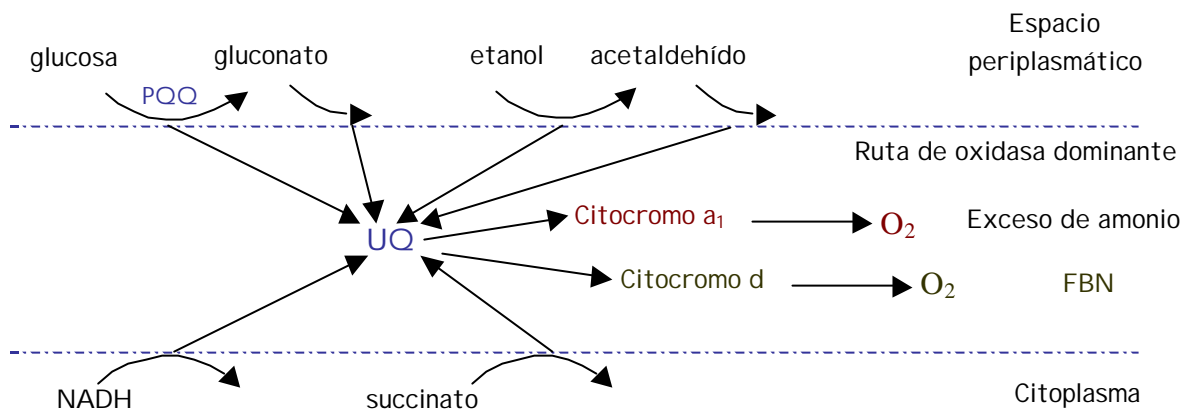


Figura V.3. Composición y organización de la cadena respiratoria para *G. diazotrophicus* creciendo en el medio LGIM (Stephan *et al.*, 1991), propuestas por Flores-Encarnación y colaboradores (1999).

Estos autores sugieren que la concentración de amonio en el medio de cultivo juega un rol determinante en la expresión de los componentes del sistema respiratorio de *G. diazotrophicus*. También proponen que los niveles de glucosa deshidrogenasa, citocromo c y las oxidasas alternativas ba y bd son fuertemente afectados por la concentración de amonio en el medio y sugieren que esto conduce a un único estilo de vida de *G. diazotrophicus* entre las bacterias ácido acéticas. Los resultados mostrados en este capítulo, donde se observaron cambios en la relación P:O de los cultivos respondiendo a modificaciones ambientales, indican que bajo estas condiciones *G. diazotrophicus* fue capaz de expresar diferentes ramificaciones de su cadena respiratoria, en semejanza con lo propuesto por Flores-Encarnación y colaboradores (1999) para cultivos "batch" con distintas concentraciones de NH₄⁺.

Los experimentos con xilosa como co-sustrato de cultivos limitados en glucónico confirmaron que ambas, la condición de fijación de N₂ y la expresión de una activa oxidación de aldosas vía la GDH periplasmática, fueron necesarias para que los cultivos de *G. diazotrophicus* manifiesten una mayor eficiencia en la generación de energía a través de dirigir el flujo de electrones por alguna ramificación mejor acoplada de su cadena

respiratoria. Se había propuesto en la literatura que la oxidación de aldosas ví GDH conduce a ciertos organismos a un incremento en la generación de energía en una magnitud tal que no puede ser atribuída solamente a la generación de PQQ reducido. Este trabajo es el primero en cuantificar el incremento de generación de energía.

Estos resultados sugieren que, aunque ineficiente en la generación de energía comparado con otros microorganismos heterótrofos, *G. diazotrophicus* en presencia de aldosas y condiciones de FBN (tal como se encuentra en el interior de las plantas que coloniza), es capaz de adaptarse fenotípicamente expresando rutas de transporte electrónico que la conducen a una (comparativamente) mayor producción de energía.

V.6. Referencias

- Alvarez B and Martínez-Drets G (1995) Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. Can. J. Microbiol. 41: 918-924.
- Attwood M M, van Dijken J P and Pronk J T (1991) Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. J. Ferment. Bioeng. 72: 101-105.
- Babel W and Müller R H (1985) Correlation between cell composition and carbon conversion efficiency in microbial growth: a theoretical study. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 201-207.
- Beardmore-Gray M and Anthony C (1986) The oxidation of glucose by *Acinetobacter calcoaceticus*: the interaction of the quinoprotein glucose dehydrogenase with the electron transport chain. J. Gen. Microbiol. 132: 1257-1268.
- Bergmeyer H U and Bernt E (1977) Methods Enzym. Anal. Vol. 11: 1205-1212.
- Box G E P, Hunter W G and Hunter J S (1989) Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building. Spanish Edition. Editorial Reverté SA, Barcelona, Spain.
- Calhoun M W, Oden K L, Gennis R B, Teixeira de Mattos M J and Neijssel O M (1993) Energetic efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. J. Bacteriol. 175: 3020-3025.
- Campbell J J R, Ramakrishnan T, Linnes AG and Eagles B A (1956) Evaluation of the energy gained by *Pseudomonas aeruginosa* during the oxidation of glucose to 2-ketogluconate. Can. J. Microbiol. 2: 304-310.
- Cooney C, Wang H and Wang D (1977) Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. Biotechnol. Bioeng. 19: 55-67.
- de Hollander J A (1991) The use of stoichiometric relations for the description and analysis of microbial cultures. Antonie van Leeuwenhoek 60: 257-273.
- Dokter P, Pronk J T, Schie van B J, Dijken J P van and Duine J A (1987) The in vivo and in vitro substrate specificity of the quinoprotein glucose dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79.41. FEMS Microbiol. Lett. 43: 195-200.
- Duine J A, Frank J Jzn and Jongejan J A (1986) PQQ and quinoprotein enzymes in microbial oxidations. FEMS Microbiol. Rev. 32: 165-178.
- Erickson L E, Minkevich I G and Eroshin V K (1978) Application of mass and energy balance regularities in fermentation. Biotechnol. Bioeng. 10: 1595-1621.
- Flores-Encarnación M, Contreras-Zentella M, Soto-Urzuza L, Aguilar G R, Baca B E and Escamilla J E (1999) The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL 5. J. Bacteriol. 181: 6987-6995.
- Galar M L and Boiardi J L (1995) Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 713-716.
- Gornall A G, Bardawill C J and David M A (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177: 751-766.
- Hardy G (1992) Dual glucose metabolism of *Pseudomonas species* in chemostat culture pp 7-105. PhD Tesis. Department of Microbiology. University of Amsterdam.
- Hardy G, Teixeira de Mattos M J and Neijssel O M (1993) Energy conservation by pyrroloquinoline quinol-linked xylose oxidation in *Pseudomonas putida* NCTC 10936 during carbon-limited growth in chemostat culture. FEMS Microbiol. Lett. 107: 107-110.
- Heijnen J J and van Dijken J P (1991) In search of thermodynamic description of biomass yields for the chemotrophic growth of microorganisms. Biotechnol. Bioeng. 39 : 833-858.

- Hennecke H (1998) Rhizobial respiration to support symbiotic nitrogen fixation. In Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century, pp. 429-434. Edited by C.Elmerich, A. Kondorosi & W. E. Newton. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- Herbert D, Phipps P J and Strange R E (1971) Chemical analysis of microbial cells. *Methods Microbiol.* 5B: 265-272.
- Hommel R W J, Postma P W, Neijssel O M and Tempest D W (1985) The functional significance of glucose dehydrogenase in *Klebsiella aerogenes*. *Arch. Microbiol.* 143: 163-168.
- Lanning M C and Cohen S S (1951) The detection and estimation of 2-ketohexonic acids. *J. Biol. Chem.* 189: 109-114.
- Liu J K, Lee F T, Lin C S, Yao X T, Davenport J W and Wong T Y (1995) Alternative function of the electron transport system in *Azotobacter vinelandii*: removal of excess reductant by the cytochrome d pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3998-4003.
- Luttik M A H, van Spanning R, Schipper D, van Dijken J P and Pronk J T (1997) The low biomass yields of the acetic acid bacterium *Acetobacter pasteurianus* are due to a low stoichiometry of respiration-coupled proton translocation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3345-6651.
- Mackechnie I and Dawes E A (1969) An evaluation of the pathways of metabolism of glucose, gluconate and 2-oxogluconate by *Pseudomonas aeruginosa* by measurement of molar growth yields. *J. Gen. Microbiol.* 55: 341-349.
- Matsushita K and Ameyama M (1982) D-Glucose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*, membrane-bound. *Methods Enzymol.* 89: 149-155.
- Matsushita K, Ohno Y, Shinagawa E Adachi O and Ameyama M (1980) Membrane-bound D-glucose dehydrogenase from *Pseudomonas sp.*: solubilization, purification and characterization. *Agric. Biol. Chem.* 44: 1505-1512.
- Matsushita K, Shinagawa E and Ameyama M (1982) D-gluconate dehydrogenase from bacteria, 2-keto-D-gluconate yielding membrane bound. *Methods Enzymol.* 89: 187-193.
- Miller G L (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* Vol. 31, No. 3: 426-428.
- Roels J A (1983) Energetics and kinetics in biotechnology. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Schie van B J, Rouwenhorst R J, Bont A M, van Dijken J P and Kuenen J G (1987) An *in vivo* analysis of aldose oxidation by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 560-567.
- Schie van J, Hellingwerf K J, Dijken van J P, Elferink M G L, Dijk van J M, Kuenen J G and Konings W N (1985) Energy transduction by electron transfer via a pyrrolo-quinoline-quinone-dependent glucose dehydrogenase in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter calcoaceticus* (var. Lwoffii). *J. Bacteriol.* 163, 2: 493-499.
- Schie van V J, O H Mooy de, Linton J D, Dijken van J P and Kuenen J G (1987a) PQQ dependent production of gluconic acid by *Acinetobacter*, *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *J. Gen. Microbiol.* 133: 867-875.
- Stephan M P, Oliveira M, Teixeira K R S, Martínez-Drets G, Döbereiner J (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 67-72.
- Stouthamer AH (1979) The search for correlation between theoretical and experimental growth yields. *Int. Rev. Biochem.* 21 : 28-47.
- Ureta A, Alvarez B, Ramón A, Vera M A and Martínez-Drets G (1995) Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. *Plant Soil* 172: 271-277.

Uspenskya S N and Loitsyanskaya M S (1979) Effectiveness of the utilization of glucose by *Gluconobacter oxydans*. Microbiology 48: 306-310.

Resumen General

Gluconacetobacter diazotrophicus puede oxidar glucosa según la siguiente serie de reacciones: glucosa → gluconato → 2-cetogluconato. Dichas oxidaciones se llevan a cabo en el espacio periplasmático por enzimas ligadas a membrana. La primera oxidación de esta serie es llevada a cabo por una glucosa deshidrogenasa que tiene PQQ como grupo prostético. La finalidad del estudio descrito en esta Tesis fue investigar el rol fisiológico de este sistema de oxidación directa de la glucosa en *G. diazotrophicus*, con la GDH PQQ-dependiente como enzima clave de esta ruta.

Una caracterización fenotípica de *G. diazotrophicus* cultivado bajo diferentes condiciones ambientales en cultivos "batch" nos brindó información sobre la eficiencia energética de crecimiento y rutas empleadas para el metabolismo de las fuentes hidrocarbonadas, utilizando N₂ ó sulfato de amonio como fuente de Nitrógeno, en función de modificaciones en diferentes condiciones de cultivo (naturaleza y concentración de la fuente de Carbono y energía, etc.) (Capítulo II). En estos cultivos los rendimientos en biomasa con sulfato de amonio, tanto limitados en glucosa como en ácido glucónico, fueron más bajos que los comúnmente reportados para otras bacterias heterótrofas. Los cultivos presentaron bajas velocidades específicas de crecimiento, comparadas con otros microorganismos creciendo en condiciones semejantes, pero elevados valores de velocidades específicas de consumo de glucosa y O₂ (en presencia de una GDH activa). Cultivos de un mutante GDH(-) creciendo en iguales condiciones (en las que no se observó formación de producto y se registró elevada actividad de GDH NAD-dependiente) dieron rendimientos mayores que los mismos cultivos con la especie salvaje y presentaron valores de velocidades específicas de consumo de glucosa mucho más bajos. Teniendo en cuenta que frente a una misma oferta de nutrientes no sobrevive el microorganismo al que le rinde más el sustrato (eficiencia energética) sino el que más rápido lo consume, esto nos estaría indicando la posible importancia de la GDH PQQ-dependiente, cuya función podría ser considerada como una estrategia de secuestro de la fuente de Carbono en una especie química no tan rápidamente utilizable por otras bacterias que sí competirían por glucosa. En condiciones de FBN, independientemente del sustrato hidrocarbonado empleado, el crecimiento fue más lento y las velocidades específicas fueron menores que para cultivos del microorganismo creciendo con Nitrógeno fijado. Un análisis de las actividades de las enzimas de membrana en células de *G. diazotrophicus* creciendo en glucosa, conduce a concluir que las mismas son significativamente más activas en condiciones de FBN (470 nmoles DCIP red. mg prot.⁻¹.min⁻¹) que en condiciones de No FBN (255 nmoles DCIP red. mg prot.⁻¹.min⁻¹). En ambas condiciones (No FBN y FBN) la actividad enzimática de GDH mostró una relación directa con la velocidad específica de consumo de glucosa (q_s "in vivo" en presencia de exceso de glucosa), con la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}), y con un rápido decrecimiento del pH. Los valores de las actividades enzimáticas en extractos libres de células de *G. diazotrophicus*, indican que el flujo de glucosa es dirigido

cuantitativamente a través de la GDH dependiente de PQQ, ya que prácticamente no hay actividad hexoquinasa y la actividad de la GDH NAD-dependiente es comparativamente baja. Observando los resultados de las medidas enzimáticas obtenidos con la cepa salvaje y con el mutante GDH(-), creciendo en glucosa como única fuente de Carbono y energía, se deduce claramente que la GDH ligada a membrana es la única enzima responsable de la rápida y extensa conversión de glucosa en ácido glucónico por *G. diazotrophicus*.

La ausencia de acumulación de cetoácidos en los cultivos donde la glucosa está presente en exceso no se puede atribuir a una baja concentración de gluconato en el cultivo durante la primera fase de crecimiento, sino más bien a la glucosa por sí misma. Experimentos llevados a cabo para establecer si la concentración de glucosa y/o gluconato determinaban la producción secuencial de gluconato y 2-cetogluconato mostraron que no es una determinada concentración de gluconato la desencadenante de la producción de cetoácidos y tampoco una determinada concentración de glucosa. Se podría especular que, durante la primera fase del crecimiento en cultivos "batch" con glucosa (exceso), la oxidación de la misma mediada por la GDH procede tan rápidamente que la cadena respiratoria se satura con electrones. Consecuentemente, los componentes redox serían incapaces de aceptar electrones de la GaDH, resultando en el retardo de las células para oxidar gluconato bajo estas condiciones. Tal modelo regulatorio de competición de varios componentes de la cadena respiratoria por los electrones parece ajustarse a los resultados indicados en este trabajo (Capítulo II) con *G. diazotrophicus*.

G. diazotrophicus fue capaz de crecer en quimiostato empleando N_2 como única fuente de Nitrógeno, mientras la concentración de O_2 disuelto se mantuviera en 1-2 % de saturación de aire: una vez alcanzadas las condiciones de FBN (síntesis de nitrogenasa), *G. diazotrophicus* pudo ser cultivado continuamente sin la necesidad del suministro de Nitrógeno fijado e independientemente de la fuente de Carbono y energía empleada (Capítulos III y IV). Cuando la velocidad de disolución de O_2 fue incrementada, como para exceder la velocidad de consumo de O_2 , la concentración de O_2 disuelto aumentó en forma continua, dando lugar a la inhibición de la nitrogenasa por O_2 y al consiguiente "lavado" de los cultivos, indicando que es sensible a la inhibición al menos cuando la concentración de azúcar es del 1 % (nuestras condiciones de cultivo). Los resultados de los C.C. limitados en Carbono sugieren la no existencia de un mecanismo de protección respiratoria de la nitrogenasa de la naturaleza del postulado originalmente por Dalton y Potsgate (1969), al menos en esas condiciones. Si tal mecanismo existiera, sería de esperar que *G. diazotrophicus* hubiera incrementado la velocidad respiratoria, para responder al incremento de O_2 disuelto, a expensas de una disminución del rendimiento en biomasa. Los C.C. en los que se registró un aumento de la velocidad específica de consumo de O_2 fueron aquellos que crecían bajo condiciones de FBN pero con exceso de fuente de Carbono y energía (30,0; 40,0 y 50,0 $g.l^{-1}$ de glucosa). Esto coincidió con elevadas velocidades específicas de consumo de sustrato y de producción de metabolitos de sobreflujo (ácido glucónico y cetoácidos) y con un descenso en los rendimientos en biomasa. De esta manera,

en el interior de la planta donde el organismo vive en un ambiente rico en azúcar (probablemente a bajas velocidades de crecimiento), *G. diazotrophicus* pareciera ser capaz de oxidar la glucosa a elevadas velocidades, siempre que el O₂ no sea limitante. La oxidación extracelular de glucosa rinde energía biológicamente utilizable (PQQ reducido) que puede ser usada para la FBN y, probablemente, podría también funcionar como un mecanismo de protección respiratoria de nitrogenasa. No obstante, futuras investigaciones serán necesarias para clarificar el (ó los) mecanismos de protección respiratoria de la nitrogenasa, si los hay, en *G. diazotrophicus*.

Podemos concluir que en *G. diazotrophicus* la GDH PQQ-dependiente es sintetizada constitutivamente ya que se encontró actividad de GDH en todos los C.C. llevados a cabo (incluso en aquellos con ácido glucónico como única fuente de Carbono). Los resultados sobre actividades enzimáticas de los C.C. crecidos bajo limitación por glucosa coinciden con aquellos registrados para cultivos "batch": los cultivos responden a una situación de alta demanda energética, como lo es la fijación de N₂, aumentando su capacidad de oxidación a través de un aumento de síntesis de GDH. Por otro lado, y a pesar de poseer un bajo Km para la glucosa (4,5 mM), la GDH no se comporta como un "sistema de baja afinidad" ya que se encontraron los mayores niveles de actividad en cultivos limitados por glucosa en condiciones de FBN. Se podría especular que la inherente baja afinidad por la glucosa de esta ruta metabólica podría ser compensada por la síntesis de elevadas concentraciones de la enzima, particularmente bajo condiciones donde la concentración extracelular de glucosa es baja. Por lo tanto, se podría concluir que la síntesis de GDH dependiente de PQQ pareciera estar regulada por la necesidad de una eficiente utilización de la fuente de Carbono y energía en situaciones donde la demanda energética es alta, como es el caso de la FBN, ó bien donde la fuente de Carbono es escasa, ya que bajo condiciones de FBN y limitación por Carbono se observaron los mayores valores de actividad. Este patrón de síntesis es característico de enzimas que están involucradas en la captura ("scavenging") del sustrato limitante del crecimiento en ambientes donde el mismo es escaso, ó bien deben competir con otros organismos para su incorporación. De los valores registrados de actividad de GDH NAD-dependiente intracelular, concluimos que aparentemente no es una situación de demanda energética la que induce la síntesis de la enzima citoplasmática, ya que tanto la cepa salvaje como el mutante GDH(-) presentan valores de actividad semejantes en aquellos cultivos realizados limitados en glucosa, independientemente de fijar N₂. Dicha enzima parece ser constitutiva ya que se registran valores de actividad en cultivos donde no existe sustrato para la misma. De acuerdo a los valores de actividad de esta enzima observados en los C.C. llevados a cabo con exceso de glucosa se puede concluir que su síntesis se induce en presencia de elevadas concentraciones de sustrato y que responde como si fuera un "sistema de baja afinidad", ya que bajo dichas condiciones es donde se encuentran los mayores valores de actividad.

El rango de pH óptimo para la actividad de GDH fue 5,0-6,0. A través de medidas de producción de ácido glucónico "in vitro" por células lavadas provenientes de C. C. llevados a

cabo a diferentes pHs, incubadas tanto al pH óptimo de la GDH (pH 6,0) como al pH del cultivo, se observó claramente que este último afecta no solo la actividad de GDH sino también la síntesis de la misma. Al aumentar el pH del medio de cultivo se induce la síntesis de GDH, a pesar de que la misma se torna prácticamente inactiva. En cultivos realizados a valores de pH inferiores a 7,5, se encuentra una cantidad de GDH suficiente como para satisfacer las exigencias de consumo de glucosa, expresadas como velocidad específica (qs). Esto nos indica que a valores de pH alcalinos, mayores que 7,5, el metabolismo de la glucosa debiera proceder por otra vía. Una ruta alternativa para metabolizar la glucosa es la de la GDH NAD-dependiente, pero prácticamente no se registra síntesis de dicha enzima a pHs alcalinos. Por tanto podemos especular que los cultivos se tornan inestables a esos valores de pH (se "lavan") porque la vía más importante del metabolismo de la glucosa, la GDH, si bien responde con un aumento de síntesis al aumento de pH, el mismo no es suficiente y no es reemplazada su función eficientemente por otras rutas alternativas. Estos resultados refuerzan que el metabolismo de glucosa en *G. diazotrophicus* sigue fundamentalmente un camino extracelular vía GDH.

En cuanto a la bioenergética de estos cultivos (Capítulos III y V), los rendimientos en biomasa de C.C. limitados en Carbono y fijando N₂, con gluconato como fuente de Carbono y energía, fueron mucho más bajos que aquellos obtenidos con amonio. Estos resultados eran de esperar debido a la demanda extra de energía que se requiere para la fijación de N₂. No obstante, no ocurrió lo mismo cuando se utilizó glucosa como fuente de Carbono y energía. En este caso, los rendimientos en biomasa fueron mucho menos afectados por la fijación de N₂. Más aún, los cultivos fijando N₂ con glucosa mostraron velocidades específicas de consumo de oxígeno similares a aquellas obtenidas con amonio. Mediante el desarrollo de un modelo metabólico que describió el crecimiento de *G. diazotrophicus* bajo las distintas condiciones ambientales utilizadas, pudimos cuantificar la eficiencia energética de utilización de la/s fuente/s de Carbono y energía, particularmente mientras expresan actividad de GDH fijando N₂ atmosférico (Capítulo V). Se encontró que una de las causas de los bajos rendimientos en biomasa de cultivos de *G. diazotrophicus*, es la baja estequiometría de la translocación de protones asociada a la cadena respiratoria y que *G. diazotrophicus* creciendo en glucosa y N₂ incrementa su relación P:O, probablemente redireccionando el flujo de electrones por alguna rama alternativa de su cadena respiratoria. Condiciones de bajas concentraciones de O₂, para poder llevar a cabo la FBN, no fueron suficientes para la expresión de una rama más eficiente de la cadena respiratoria de *G. diazotrophicus*, ya que cultivos creciendo con gluconato y N₂ no presentaron un incremento en la relación P:O, tal como el observado con glucosa. Los experimentos con xilosa como co-sustrato de cultivos limitados en glucónico confirmaron que ambas, la condición de fijación de N₂ y la expresión de una activa oxidación de aldosas vía la GDH periplasmática, fueron necesarias para que los cultivos de *G. diazotrophicus* manifiesten una mayor eficiencia en la generación de energía a través de dirigir el flujo de electrones por alguna ramificación mejor acoplada de su cadena respiratoria. Estos

resultados sugieren que, aunque ineficiente en la generación de energía comparado con otros microorganismos heterótrofos, *G. diazotrophicus* en presencia de aldosas y condiciones de FBN (tal como se encuentra en el interior de las plantas que coloniza), es capaz de desarrollar mecanismos que conducen a una (comparativamente) mayor producción de energía.

Apéndice 1

Construcción de un mutante de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3 defectivo en la expresión de la glucosa deshidrogenasa PQQ-dependiente

Para profundizar en el estudio de la fisiología de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3, en relación a la oxidación extracelular de aldosas, se construyó un mutante deficiente en la expresión de la enzima glucosa deshidrogenasa PQQ-dependiente (fenotípicamente GDH(-)). En el momento de seleccionar la estrategia a seguir se descartó la mutagénesis insercional sitio específico ya que Ureta y colaboradores (comunicación personal) habían obtenido resultados negativos. Estos autores diseñaron diferentes pares de primers en base a secuencias consenso de GDHs de membrana de *Escherichia coli* (NC000913), *Acinetobacter calcoaceticus* (E28182) y *Gluconobacter oxydans* (X62710), obtenidas de un banco de datos ("GENBANK"). El objetivo era lograr amplificar una región interna del gen de GDH de *G. diazotrophicus* para luego clonarla en el vector pK18mob, vector replicativo en *E. coli* S17-1 y suicida en *G. diazotrophicus*. Esta construcción se movilizaría de la cepa donadora de *E. coli* (Kn^r) a la cepa receptora de *G. diazotrophicus* (Sm^r) y posteriormente se seleccionarían cepas que hubieran integrado al vector a través de recombinación homóloga (simple "crossing-over") por medio de resistencia a antibióticos (Nm y Sm) codificados por el vector y la cepa receptora, respectivamente. Los autores ensayaron diferentes combinaciones de primers, diferentes condiciones de ciclado (variando temperatura de "annealing"; tiempo, concentración de Mg⁺², etc.) y en todos los casos los resultados que obtuvieron fueron negativos.

En base a lo anteriormente expuesto decidimos aplicar otras estrategias cuyos resultados se describen a continuación.

1.1. Mutagénesis por transposición empleando al transposón Tn5

Antes de abordar la técnica de transposición se puso a punto en nuestro laboratorio una metodología de selección del fenotipo buscado, es decir una metodología que nos permitiera detectar una cepa defectiva en la expresión de la GDH (método de "screening"). Como base para nuestro trabajo empleamos la técnica descrita por Gupta y colaboradores (1997) para detectar en medios sólidos la oxidación de glucosa a ácido glucónico. La misma consistió en el crecimiento de los transconjugantes en medios suplementados con CaCO₃ y en la observación de ausencia de halo claro alrededor de las colonias carentes de actividad GDH. Sólo las colonias GDH(+) presentarían un halo claro debido a la acidificación del medio por acción del ácido glucónico proveniente de la oxidación de la glucosa, con la consecuente solubilización del CaCO₃ (Figura 1.1). El medio de cultivo empleado fue el utilizado por Gupta y colaboradores (1999) con algunas modificaciones. La composición del mismo se

detalla a continuación: glucosa ($50,0 \text{ g.l}^{-1}$), extracto de levadura ($5,0 \text{ g.l}^{-1}$), $\text{SO}_4\text{Mg.7H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ g.l}^{-1}$), CO_3Ca ($10,0 \text{ g.l}^{-1}$), glicerol ($30,0 \text{ g.l}^{-1}$) y agar ($15,0 \text{ g.l}^{-1}$) (GYG). Teniendo en cuenta que la glucosa se metaboliza principalmente vía GDH (Attwood *et al.*, 1991; esta Tesis), para lograr que un mutante GDH(-) pudiera desarrollarse adicionamos al medio original que contenía glucosa ($100,0 \text{ g.l}^{-1}$), glicerol como fuente de Carbono. En la puesta a punto del método de "screening" ensayamos el empleo de glicerol como única fuente de Carbono y no se observó halo de solubilización. Este resultado sugiere que la acidez del medio sólo proviene del ácido glucónico producido por la oxidación de la glucosa.

Una vez finalizada la puesta a punto del método de selección de mutantes, se procedió a obtener al mutante defectivo en la expresión de GDH por transposición empleando al transposón Tn5. El transposón fue incorporado a la cepa receptora *G. diazotrophicus* Sm^r ($400 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$) por conjugación empleando como cepa donadora a *E. coli* S17-1 conteniendo el plásmido pSUP 1021 (pSUP102::Tn5). Luego de la conjugación los transconjugantes obtenidos se seleccionaron por resistencia a los siguientes antibióticos: Sm $400 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ otorgada por la cepa receptora y Kn $100 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ contenida en el transposón. En la conjugación se ensayaron diferentes relaciones de concentración de la cepa donadora a receptora, diferentes medios de conjugación, diferentes tiempos, etc. En todos los casos ensayados el número de transconjugantes obtenidos fue muy bajo.

Es por esta razón que se decidió entonces recurrir a otra estrategia alternativa empleando etil metano sulfonato como agente mutagénico siguiendo la técnica descrita por Miller (1972).

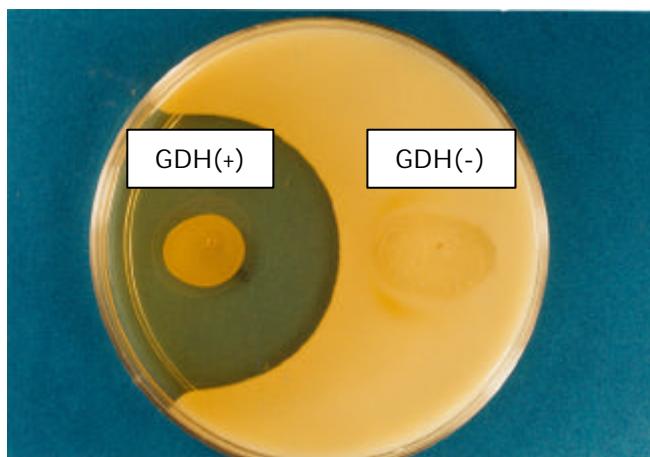


Figura 1.1. Crecimiento de *G. diazotrophicus* PAL 3 GDH(+) (halo(+)) y GDH(-) (halo(-)) en el medio GYG que contiene CO_3Ca .

1.2. Inducción de mutagénesis con etil metanosulfotano (EMS)

Para la mutagénesis química se empleó la técnica de Miller (1972) modificada (Arrieta *et al.*, 1996), que utiliza etil metano sulfonato (EMS) como agente mutagénico. La misma consistió en exponer a la cepa salvaje de *G. diazotrophicus* diferentes concentraciones de EMS y a distintos tiempos de exposición al mismo. La selección de los posibles mutantes GDH(-) se realizó en el medio GYG anteriormente descrito, ya que en este medio la aparición de un halo de solubilización de CO_3Ca alrededor de las colonias del microorganismo es indicativo de la presencia de actividad GDH (fenotipo GDH(+)) (Figura 1.1). Se empleó una suspensión bacteriana proveniente de un cultivo líquido de la cepa salvaje de *G. diazotrophicus* PAL 3 Sm^r (4 ml) en fase exponencial (40 hs), la cual fue centrifugada a 10.000 g por 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se resuspendió en 0.5 ml de una solución de EMS en Tris/HCl 0.2 M (pH: 7.4) y se incubó a 30 °C. Después de 90 minutos de incubación esta suspensión se centrifugó a 10.000 g por 5 minutos y el "pellet" celular se lavó con 1 ml de $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ al 5% (p/v) en Tris/ClH 0.2 M (pH: 7.4). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el "pellet" celular en 2 ml de LGIM (Stepan *et al.*, 1991). La suspensión celular se cultivó a 30 °C y 100 rpm con aireación durante 24 hs con el objeto de fijar las mutaciones ocurridas en el genoma bacteriano. Luego se plaquearon diluciones seriadas de c/u de los experimentos (10^{-2} hasta 10^{-5}) en LGIM suplementado con 1.0 g.l^{-1} de extracto de levadura (LI GL) y se dejaron crecer durante 48 hs. Posteriormente, las colonias fueron repicadas en el medio GYG.

La *Tabla 1.1.* muestra los resultados obtenidos después del tratamiento de la cepa salvaje de *G. diazotrophicus* con distintas concentraciones de EMS y distintos tiempos de exposición a dicho agente mutagénico.

Concentración de EMS (p/v)	2 %	2 %	5 %	5 %	Control sin EMS
Tiempo de exposición	1.5 hs	4 hs	1.5 hs	4 hs	4 hs
% sobrevivientes al tratamiento	80 %	10 %	0.1%	0 %	100 %
Colonias con fenotipo GDH(-)	0	2	0	0	0

Tabla 1.1. % de sobrevivientes de *G. diazotrophicus* PAL 3 al tratamiento con EMS cultivados en LGIL. En la última fila se muestra la cantidad de UFC (de un total de 1000) que repicadas en el medio de "screening" dieron fenotipo GDH(-) (halo(-)).

Como se puede observar en la *Tabla 1.1.*, al emplear EMS en una concentración del 2 % p/v durante 4 hs de exposición, el número de células que sobrevivieron al tratamiento correspondió al 10 % de la concentración inicial. De las células que sobrevivieron se pudieron aislar 2 mutantes fenotípicamente GDH(-) de 1000 UFC que se repicaron en el medio GYG. Los mutantes así obtenidos se denominaron AN y DE. Mientras que la cepa salvaje de *G. diazotrophicus* PAL 3, que posee GDH, dió un halo de solubilización, tal como se observa en la *Figura 1.1*, los mutantes GDH(-) no mostraron halo de solubilización de CO_3Ca ya que no produjeron ácido glucónico.

Para analizar cómo afectaba este defecto en la producción de GDH sobre la fisiología del microorganismo se analizó el crecimiento bacteriano en el medio LGIM (Stephan *et al.*, 1991) con glucosa como única fuente de Carbono y energía y en presencia de dos concentraciones diferentes de fuente de Nitrógeno: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.32 g.l^{-1} (No FBN) ó 0.132 g.l^{-1} (FBN). Se observó que en las dos condiciones ensayadas los mutantes crecían de la misma manera que la cepa parental, aunque presentaron como característica fenotípica particular un crecimiento celular con formación de "pellets". Estos mutantes no produjeron ácido glucónico a partir glucosa y no presentaron actividad GDH (con y sin PQQ) ni en el ELC ni en la fracción soluble (según técnicas descriptas en el Capítulo II).

El mutante DE, defectivo en la expresión de GDH, y la cepa parental fueron analizados en ensayos de fingerprint por PCR empleando las secuencias oligonucleotídicas descriptas en la *Tabla 1.2.* Los ensayos de PCR se realizaron en un ciclador térmico capilar Idaho 1605 (Idaho Technology). La composición de la mezcla de reacción utilizada se detalla a continuación: 50 mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 g.ml^{-1} albúmina bovina (BSA); 3 mM MgCl_2 ; 200 μM dNTPS; 1 U Taq DNA polimerasa (Promega Corp.) y 10 μM de cada primer. Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes para los MboREP: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C 7 minutos y 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C 10 segundos, "annealing" a 65°C 70 segundos y elongación a 72°C 2 minutos. Como etapa final se incubó la mezcla a 72°C 4 minutos. Para los primers ERIC: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C 7 minutos y 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C 10 segundos, annealing a 52°C 70 segundos, y elongación a 72°C 2 minutos. Como etapa final se incubó la mezcla a 72°C 4 minutos.

Denominación	Secuencia	Referencia
ERIC 1	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	Versaslovic <i>et al.</i> , (1991)
MboREP 1	5'-CCG CCG TTG CCG CCG TTG CCG CCG-3'	Versaslovic <i>et al.</i> , (1991)

Tabla 1.2. Secuencia de los primers empleados para realizar el "finger-printing" del mutante DE(-).

Las muestras obtenidas después de la amplificación del DNA de la cepa parental y el mutante DE(-) con ambos primers se corrieron en un gel de agarosa 1,5 % p/v. El patrón de bandas se muestra en la *Figura 1.2*.

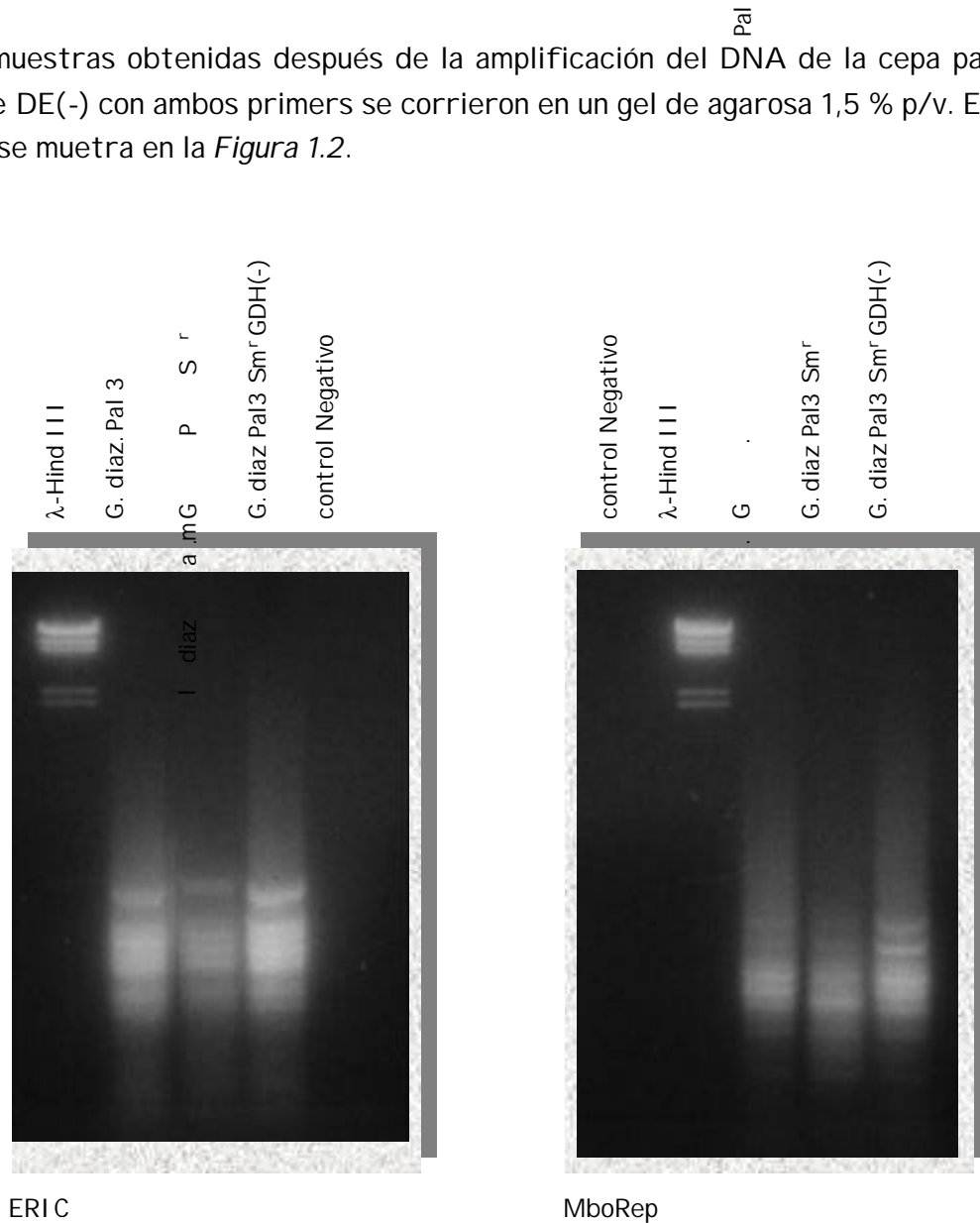


Figura 1.2. Patrón de bandas de la cepa salvaje de *G. diazotrophicus* PAL 3 y del mutante DE(-) en un gel de agarosa 1,5 % después de la amplificación del DNA total con los primers ERIC y Mbo rep.

Como se puede observar en la *Figura 1.2*, los perfiles obtenidos para los distintos moldes no presentaron bandas diferenciales entre ellos para ambos juegos de primers.

Al término de este trabajo se logró obtener dos mutantes de *G. diazotrophicus* PAL 3 defectivos en la producción de ácido glucónico y en la expresión de glucosa deshidrogenasa PQQ-dependiente. Aunque estos mutantes aún no pudieron ser caracterizados genéticamente, se pudo estudiar la fisiología de uno de ellos (DE), tal como se describió en los Capítulos II, III y V de esta Tesis.

1.3. Referencias

- Arrieta J, Hernández L, Coego A, Suárez V, Balmori E, Menéndez C, Petit-Glatron M, Chambert R y Selman-Housein G (1996) Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Microbiol.* 142: 1077-1085.
- Attwood M M, van Dijken J P and Pronk J T (1991) Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Ferment. Bioeng.* 72: 101-105.
- Gupta A, Verma V y Qazi G (1997) Transposon induced mutation in *Gluconobacter oxydans* with special reference to its direct-glucose oxidation metabolism. *FEMS Microbiol. Lett.* 147: 181-188.
- Miller J H (1972) *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.A.
- Stephan M P, Oliveira M, Teixeira K R S, Martinez-Dretz G and Döbereiner J (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 67-7.
- Versalovic J, Koeth T and Lupski J R (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831.