

ESTUDIO SOBRE INHIBIDORES DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN *AGROBACTERIUM AZOTOPHILUM*

TEÓFILO HERRERA *

JAVIER TABOADA **

RESUMEN

Con cultivos de *A. azotophilum* se hizo un estudio sobre la influencia de varias sustancias nitrogenadas principalmente sales y aminoácidos, sobre la fijación de N_2 (reducción del acetileno).

Por el interés que tienen los ácidos glutámico y aspártico en el proceso de la fijación de N_2 , se estudió la acción de dos isómeros ópticos de cada uno de ellos en diferentes concentraciones, la cual se sintetiza en sendas curvas que expresan la disminución de la fijación de N_2 al aumentar la concentración del aminoácido en el medio a partir del óptimo estimulante del mismo (3 mg para el ácido aspártico y 6 mg para el ácido glutámico). Se estudió también el efecto de diferentes proporciones de oxígeno en la atmósfera de experimentación. Al aumentar la tensión de oxígeno disminuyó la fijación de nitrógeno.

ABSTRACT

With cultures of *A. azotophilum* a study was done on the influence of several nitrogenous substances specially salts and aminoacids, on the fixation of N_2 (acetylene reduction).

Considering the interest of glutamic and aspartic acids in the process of N_2 fixation, the action of two optical isomers of each in different concentrations was studied, which is shown in curves expressing the decrease in atmospheric N_2 fixation when the concentration of the aminoacid in the medium increases from the optimum value (3 mg for aspartic acid and 6 mg for glutamic acid). The effect of different proportions of oxygen in the experimentation atmosphere was also studied. Increasing concentrations of oxygen reduced nitrogen fixation.

INTRODUCCIÓN

En este trabajo se pretende continuar el estudio del metabolismo de *Agrobacterium azotophilum* Ulloa y Herrera en relación con la fijación de nitrógeno atmosférico, tema sobre el cual ya han sido publicados algunos trabajos (Ulloa, Herrera y de la Lanza, 1971; Taboada, Herrera y Ulloa, 1971; Ulloa y Herrera, 1972). Con el objeto de encontrar las

substancias que tuvieran acción inhibidora sobre la fijación de N_2 , se investigó en primer lugar el medio mínimo para el desarrollo del citado microorganismo. Se comprobó que el medio adecuado era el 77 de Fred y Waksman (Allen, 1951; Ulloa, Herrera y de la Lanza, 1971) con sacarosa al 10% como fuente energética.

Entre los inhibidores utilizados se dio

* Del Instituto de Biología UNAM.

** Del Instituto de Química UNAM. Contribución N° 357.

particular atención a los aminoácidos por haber observado los autores de la presente comunicación que algunos de ellos inhibían la fijación de N_2 y otros no interferían en este proceso cuando eran adicionados al pozol o al medio mínimo indicado. Otros autores mencio-

nan que algunas sustancias, entre ellas ciertos aminoácidos, modifican la fijación de N_2 en *Klebsiella pneumoniae* (Yoch y Pengra, 1966), en *Clostridium pasteurianum* (Daesch y Mortenson, 1968) y *Rhodospirillum rubrum* (Munson y Burris, 1969).

MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las sustancias que se usaron aparecen en la Tabla 1.

El medio mínimo 77 de Fred y Waksman con sacarosa (77S) fue seleccionado para observar la acción de diversas sustancias en la fijación de N_2 por *Agrobacterium azotophilum* después de ensayar el medio de Burk (Taboada, Herrera y Ulloa, 1971) y el 77 de Fred y Waksman con otras fuentes energéticas diferentes a la sacarosa; éstas fueron: etanol, manitol y glucosa. Se observó que con las dos primeras sustancias no hubo fijación de N_2 (reducción de acetileno) y con la última la fijación fue menor que con sacarosa.

Al medio 77S se le agregaron las sustancias en estudio que podrían actuar como factores limitantes, en una propor-

ción de 50 a 100 mg por cada 20 ml de medio. Los aminoácidos L-ácido glutámico, DL-ácido glutámico, L-ácido aspártico, DL-ácido aspártico, L-alanina, D-alanina y DL-alanina fueron adicionados en proporciones variables, desde 3 mg por 20 ml de medio hasta 100 mg por 20 ml de medio.

La fijación del N_2 se investigó por el método de la reducción de acetileno a etileno (Dilworth, 1966; Schöllhorn y Burris, 1967; Bergersen, 1970; Taboada, Herrera y Ulloa, 1971). El acetileno se inyectó a los cultivos y a los medios usados como testigos después de una incubación de 5 días a 26° C y en ambiente de la atmósfera natural. A las 24 horas de agregado el acetileno se investigó la presencia de etileno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se indican los resultados obtenidos añadiendo al medio una cantidad fija de la sustancia en estudio (50 mg en el caso de sustancias orgánicas y 20 mg de las sustancias inorgánicas). Dado el interés que tienen los ácidos glutámico y aspártico en el proceso de la fijación del N_2 , se estudió la acción de dos formas ópticas de cada uno de ellos en diferentes concentraciones y los resultados se expresan en la Figs. 1 y 2.

Por ser *Agrobacterium azotophilum* una bacteria anaerobia facultativa, fue estudiada también la acción de diferentes tensiones de oxígeno durante la reduc-

ción del acetileno. Los resultados se consiguan en la Fig. 3.

Las sustancias que se enlistan en la Tabla 1 fueron probadas también en suspensión de masa (atole) al 20%; en este caso los resultados obtenidos fueron muy semejantes a los que se expresan en dicha tabla, aunque con algunos aminoácidos que inhiben la reducción del acetileno (ácido glutámico, ácido aspártico) los resultados fueron variables. Esto indujo, a los que esto escriben, a buscar el medio mínimo que resultó ser el 77S como se indicó antes.

Es interesante anotar que en unos cultivos de *Agrobacterium azotophilum* en

TABLA 1

	<i>Aerobiosis</i>	<i>Anaerobiosis</i>
Cloruro de amonio	—	—
Nitrito de sodio	—	—
Nitrato de sodio	—	—
Hidroxilamina	—	—
Tioglicolato de sodio	—	—
Mezcla de aminoácidos (de los aquí anotados)	—	—
Glicina	—	—
DL-ácido aspártico	—	—
D-ácido aspártico	—	—
DL-ácido glutámico	—	—
L-ácido glutámico	—	—
L-prolina	—	—
DL-glicina	—	—
DL-alanina	—	—
L-alanina	—	—
D-alanina	—	—
L-asparagina	—	—
L-histidina	—	—
DL-tirosina	+	+
DL-metionina	+	+
DL-leucina	+	+
L-leucina	+	+
DL-isoleucina	+	+
DL-triptofano	+	+
DL-fenilalanina	+	+
Trifosfato de adenosina (ATP)	+	+
Extracto de levadura *	+	+
Peptona *	+	+

Medio: 77S

— No hay reducción de acetileno.

+ Hay reducción de acetileno.

* Muy poca reducción de acetileno a la concentración usada.

medio de 77S a los que se había añadido acetileno tanto en aerobiosis como en anaerobiosis y donde se había producido etileno, se reemplazaron esos gases por helio hasta no encontrar etileno ni acetileno. En estas condiciones, a unos frascos se agregó cloruro de amonio, a otros glicina y a todos acetileno; se pudo detectar la presencia de etileno 12 horas después de haber añadido el acetileno.

De los resultados anotados en la Tabla 1, es interesante comentar que los sistemas enzimáticos para la fijación de N_2 en *Agrobacterium azotophilum*, también son inhibidos por sustancias nitrogenadas, como ha sido registrado para

otros microorganismos (Pengra y Wilson, 1958). Algunos de los aminoácidos probados, no inhiben la reducción de acetileno, aun a concentraciones de 50-100 mg/20 ml de medio. Esto puede ser debido a que dichos aminoácidos no entran a la célula, como en el caso registrado por Yoch y Pengra (1966) para la isoleucina, en *Klebsiella pneumoniae*. De los aminoácidos que inhiben la reducción de acetileno, en particular los ácidos glutámico y aspártico, dicho fenómeno depende de la concentración del aminoácido en el medio: hay concentraciones (menores de 25 mg/20 ml de medio) en las cuales la presencia

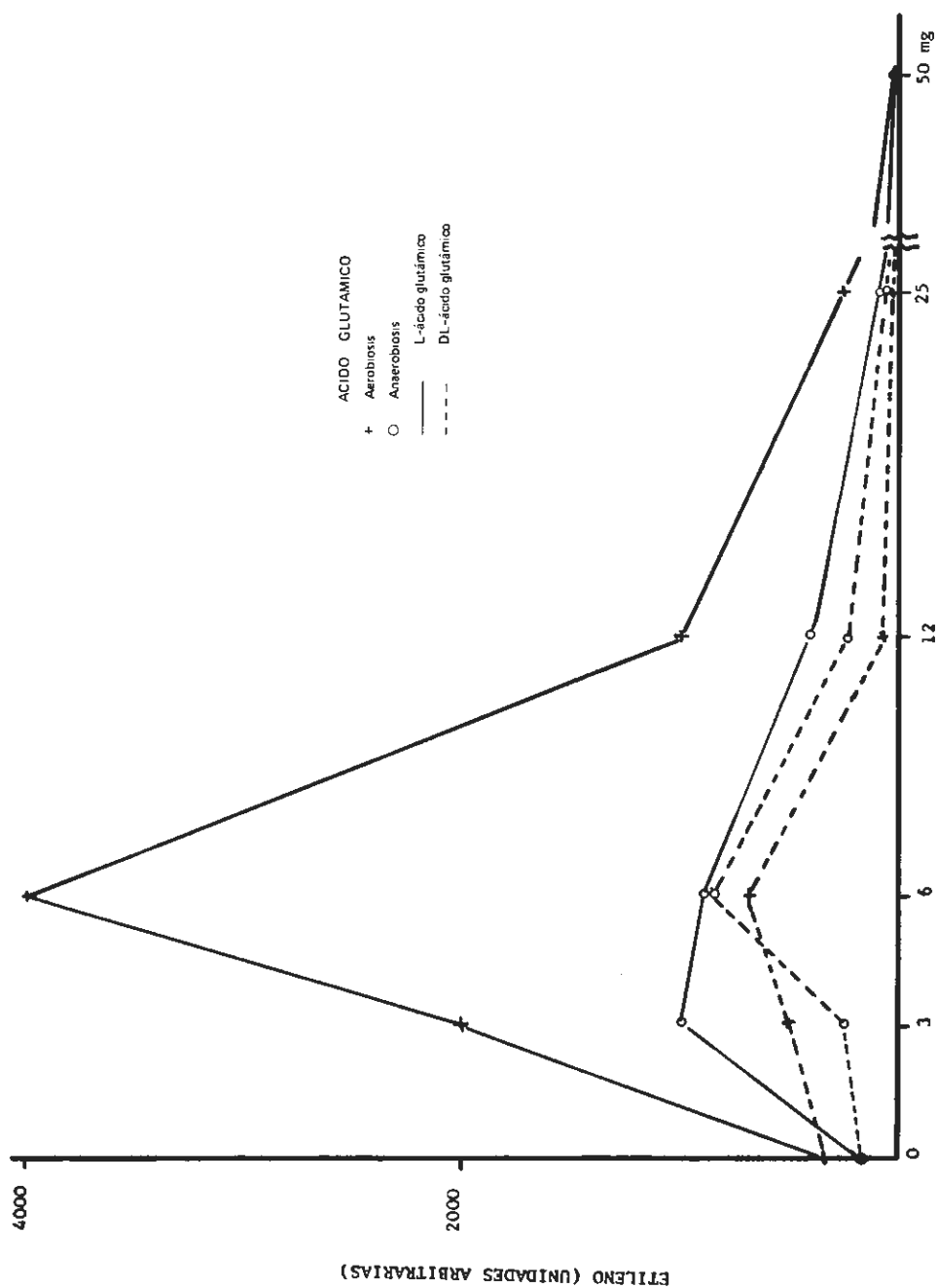


Fig. 1. Efecto de distintas concentraciones de ácido glutámico en la reducción de acetileno a etileno.

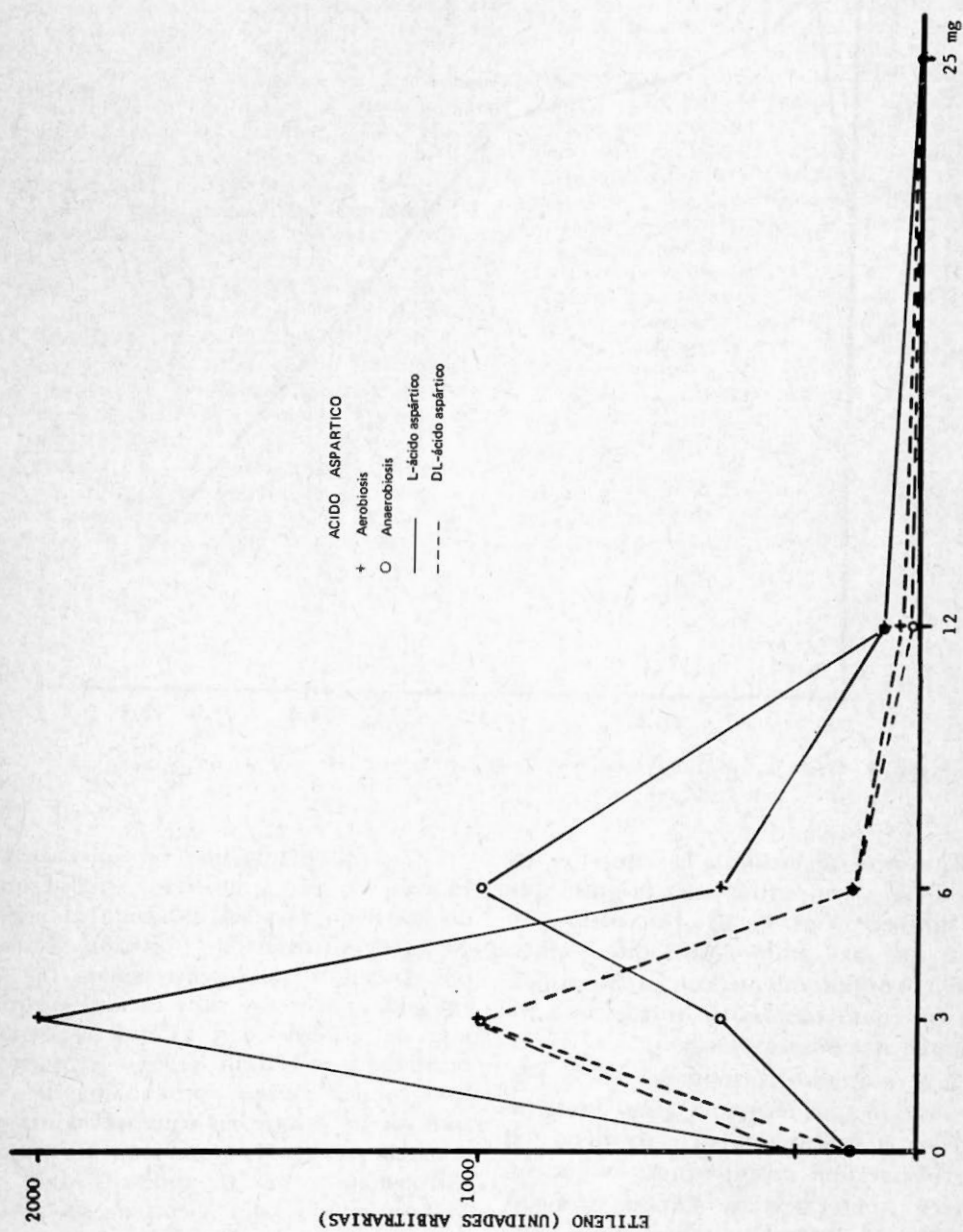


Fig. 2. Efecto de distintas concentraciones de ácido aspártico en la reducción de acetileno a etileno.

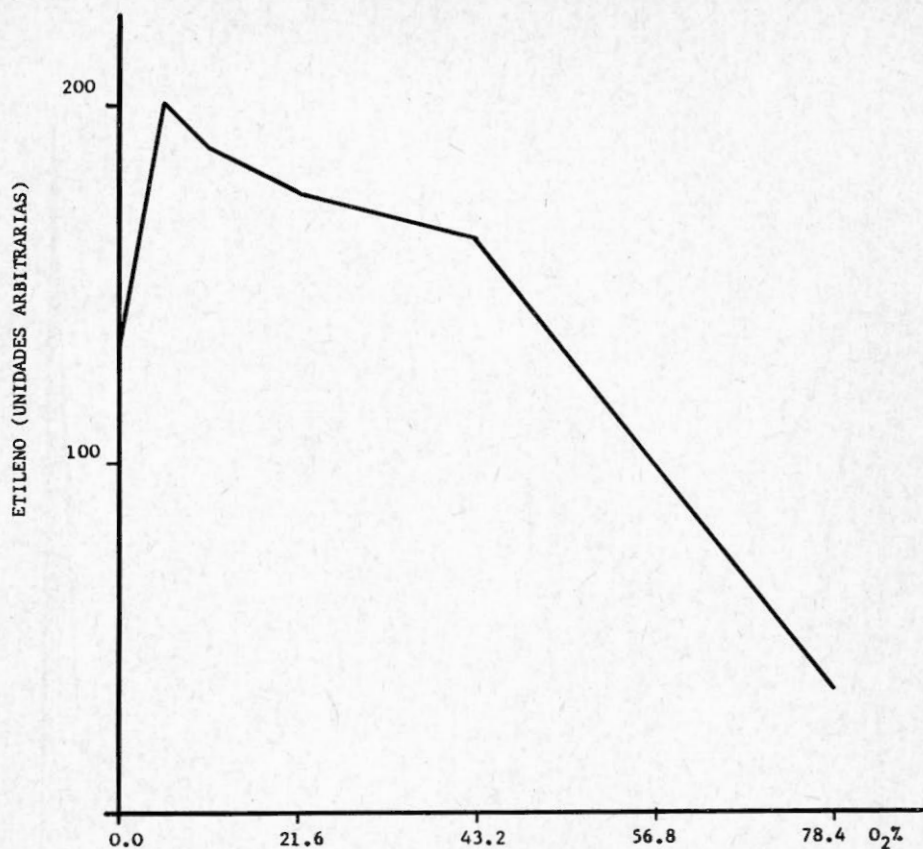


Fig. 3. Efecto de distintas tensiones de O_2 en la reducción de acetileno a etileno.

del aminoácido estimula la reducción del acetileno y concentraciones mayores que la inhiben (Figs. 1 y 2). Esto último indica que hay aminoácidos que pueden servir, conjuntamente con el N_2 atmosférico, como fuentes de nitrógeno para *Agrobacterium azotophilum*.

Los resultados consignados en la Fig. 3, indican que tensiones altas de O_2 inhiben la reducción del acetileno en *Agrobacterium azotophilum*, lo que sugiere, como señalan Parker y Scutt (1959) en *Azotobacter vinelandii*, que el O_2 y el N_2 compiten como aceptores finales de hidrógeno en el proceso de fijación de N_2 .

El hecho de que una vez iniciada la fijación de N_2 atmosférico (reducción de acetileno) no sea inhibida al agregar sales nitrogenadas o glicina, indica que la acción de la nitrogenasa no es inhibida por estas sustancias, lo que está de acuerdo con lo que registran Strandberg y Wilson (1967) para *Azotobacter vinelandii*; probablemente lo que sucede es que las sustancias nitrogenadas inhiben la formación de nueva nitrogenasa como lo indican Mahl y Wilson (1967) para *Klebsiella pneumoniae*; por este motivo no se encontró reducción cuando se inocula, con *Agrobacterium azotophilum*, un medio que contenga estas sustancias nitrogenadas.

LITERATURA

- ALLEN, O. N., 1951. *Experiments in soil bacteriology*. Burgess, Minneapolis; pp. 58-59.
- BERGERSEN, F. J., 1970. The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene-reduction assay. *Aust. J. biol. Sci.* 23: 1015-1025.
- DAESCH, G. y L. E. MORTENSON, 1968. Sucrose catabolism in *Clostridium pasteurianum* and its relation to N_2 fixation. *J. Bact.* 96: 346-351.
- DILWORTH, M. J., 1966. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. biophys. Acta* 127: 285-294.
- MAHL, M. C. y P. W. WILSON, 1968. Nitrogen fixation by cell-free extracts of *Klebsiella pneumoniae*. *Can. J. Microbiol.* 14: 33-38.
- MUNSON, T. O. y R. H. BURRIS, 1969. Nitrogen fixation by *Rhodospirillum rubrum* grown in nitrogen-limited continuous culture. *J. Bact.* 97: 1093-1098.
- PARKER, C. A. y P. B. SCUTT, 1960. The effect of oxygen on nitrogen fixation by *Azotobacter*. *Biochim. biophys. Acta* 38: 230-238.
- PENGRA, R. M. y P. W. WILSON, 1958. Physiology of nitrogen fixation by *Aerobacter aerogenes*. *J. Bact.* 75: 21-25.
- STRANDBERG, G. W. y P. W. WILSON, 1968. Formation of the nitrogen-fixing enzyme system in *Azotobacter vinelandii*. *Can. J. Microbiol.* 14: 25-31.
- SCHÖLLHORN, R. y R. H. BURRIS, 1967. Acetylene as a competitive inhibitor of N_2 fixation. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 58: 213-216.
- TABOADA, J., T. HERRERA y M. ULLOA, 1971. Prueba de la reducción del acetileno para la determinación de microorganismos fijadores de nitrógeno aislados del pozol. *Rev. lat.-amer. Quim.* 2: 188-191.
- ULLOA, M. y T. HERRERA, 1972. Descripción de dos nuevas especies de bacterias: *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter pozolis* aisladas del pozol. *Rev. lat.-amer. Microbiol.* 14 (en prensa).
- ULLOA, M., T. HERRERA y G. DE LA LANZA, 1971. Fijación de nitrógeno atmosférico por microorganismos del pozol. *Rev. lat.-amer. Microbiol.* 13: 113-124.
- YOCH, D. C. y R. M. PENGRA, 1966. Effect of amino acids on the nitrogenase system of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bact.* 92: 618-622.