

EFFECTO DE AMINOÁCIDOS SOBRE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO POR *AGROBACTERIUM AZOTOPHILUM*

JAVIER TABOADA *
TEÓFILO HERRERA **

RESUMEN

Utilizando *Agrobacterium azotophilum* Ulloa y Herrera, en un medio mínimo de cultivo libre de N_2 , se hizo un estudio sobre el efecto de varios aminoácidos, tanto a bajas concentraciones (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de medio), como a concentraciones mayores equimoleculares (0.05 mM/ml). Se encontró que la fijación de nitrógeno es inhibida o incrementada según el tipo de aminoácido y la concentración del mismo. Los resultados están resumidos en las gráficas y tabla incluidos en el trabajo.

ABSTRACT

By culturing *Agrobacterium azotophilum* Ulloa and Herrera in a minimal N_2 free medium, a study was done on the effect of several amino acids, both at low concentrations (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of medium), and higher equimolecular concentrations (0.05 mM/ml). It was found that nitrogen fixation is inhibited or increased according to the type of amino acid and its concentration. The results are summarized in the graphs and table included in this paper.

INTRODUCCIÓN

En un trabajo anterior (Herrera y Taboada, 1971) se describió y discutió la influencia de varias sustancias sobre la fijación de nitrógeno en *Agrobacterium azotophilum* Ulloa y Herrera, bacteria que ya en varias ocasiones ha sido objeto de investigación (Ulloa, Herrera y de la Lanza, 1971; Taboada, Herrera y Ulloa, 1971; Ulloa y Herrera, 1972). En la presente comunicación se demuestra el efecto de diversos aminoácidos sobre

la fijación de nitrógeno, en dicha bacteria, adicionando a un medio mínimo de cultivo, libre de N_2 , diferentes concentraciones de los mismos. Otros autores han mencionado también el efecto de aminoácidos sobre la fijación de nitrógeno en varias especies de bacterias diferentes a la utilizada en el presente trabajo (Yoch y Pengra, 1966; Daesch y Mortenson, 1968; Munson y Burris, 1969).

* Del Instituto de Química, UNAM.

** Del Instituto de Biología, UNAM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los aminoácidos que se utilizaron aparecen enlistados en el capítulo de resultados del presente trabajo.

A 20 ml de medio 77S (Taboada, Herrera y Ulloa, 1971), en matraces Erlenmeyer de 50 ml, se agregaron 10 $\mu\text{g/ml}$ ó 0.05 mM/ml de cada aminoácido probado. En el caso de la asparagina, además de las cantidades anteriores, se usó la de 0.025 mM/ml, por ser un aminoácido dibásico.

A los medios así preparados se les

agregó 1 ml de un cultivo incubado a 26 C durante 48 horas en medio 77S. Cada uno de los tratamientos fue hecho por duplicado, con el objeto de determinar en uno de ellos el crecimiento del cultivo mediante el grado de absorbencia o densidad óptica (D. O.) y en el otro, fueron agregados acetileno y oxígeno según el método ya descrito en un trabajo anterior (Taboada, Herrera y Ulloa, 1971) para medir la formación de etileno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 1 muestra la diferencia que hay en el crecimiento del cultivo usando medio 77S únicamente (testigo) y medio 77S con un aminoácido. Puede apreciarse que la fase log se presenta en el lapso de 32 a 70 horas; en el medio con alanina se hizo la medición de la absorbencia tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis, encontrándose que no había diferencias considerables, por lo que el estudio de los otros aminoácidos, usados en este trabajo, sólo se hizo en aerobiosis. En la misma figura está indicado también el efecto del triptofano sobre el crecimiento del cultivo.

En la tabla 1 están concentrados los datos de otros experimentos en donde se compara la formación de etileno y la absorbencia del cultivo (D. O.) a las 8, 24, 32 y 56 horas de haber añadido el inóculo. Puede deducirse que, en general, las dosis de 10 μg de aminoácido no inhiben la reducción del acetileno y por lo tanto, la fijación de nitrógeno, sino que por el contrario, siempre fue mayor que la del testigo excepto en la dl-metionina y, no obstante, el crecimiento de la colonia no es mucho mayor que el del testigo. Esto nos permite concluir que en estas dosis hay tanto fijación de N_2 como utilización de aminoácidos, tal

como lo comunican otros autores (Yoch y Pengra, 1966).

La dosis de 0.05 mM/ml inhibe la fijación de N_2 y, por el contrario, aumenta notablemente la densidad óptica del cultivo. Esto se ilustra con la asparagina: dosis crecientes de aminoácido tienen efecto inverso en la fijación de N_2 y en el crecimiento de la colonia (Fig. 2). Por otra parte, la isoleucina y la metionina a dosis de 0.05 mM/ml no tienen efecto pronunciado sobre el crecimiento del cultivo y en cambio, aumentan notablemente la fijación de N_2 . Con la isoleucina, la fijación de N_2 es estimulada aun a dosis de 0.05 mM/ml, concentración a la cual, con otros aminoácidos, aumenta la densidad óptica del cultivo y se inhibe la fijación de N_2 . Con la metionina, no hay fijación de N_2 ni aumento en la densidad óptica del cultivo a dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$; en cambio, a la dosis de 0.05 mM/ml no hay aumento en la densidad óptica del cultivo pero sí hay incremento en la fijación de N_2 (Tabla 1 y Figs. 3 y 4).

Por los datos obtenidos, puede pensarse que tanto la isoleucina como la metionina, no son utilizadas en la multiplicación de los individuos de la colo-

nia; no obstante, su efecto es favorable en la fijación de N_2 que, en el caso de la metionina, sólo se manifiesta a dosis altas. Según esto, quedaría por ser acla-

rado cuál es el destino de las sustancias producidas como consecuencia de la fijación de N_2 favorecida por estos dos aminoácidos. Aunque otros autores

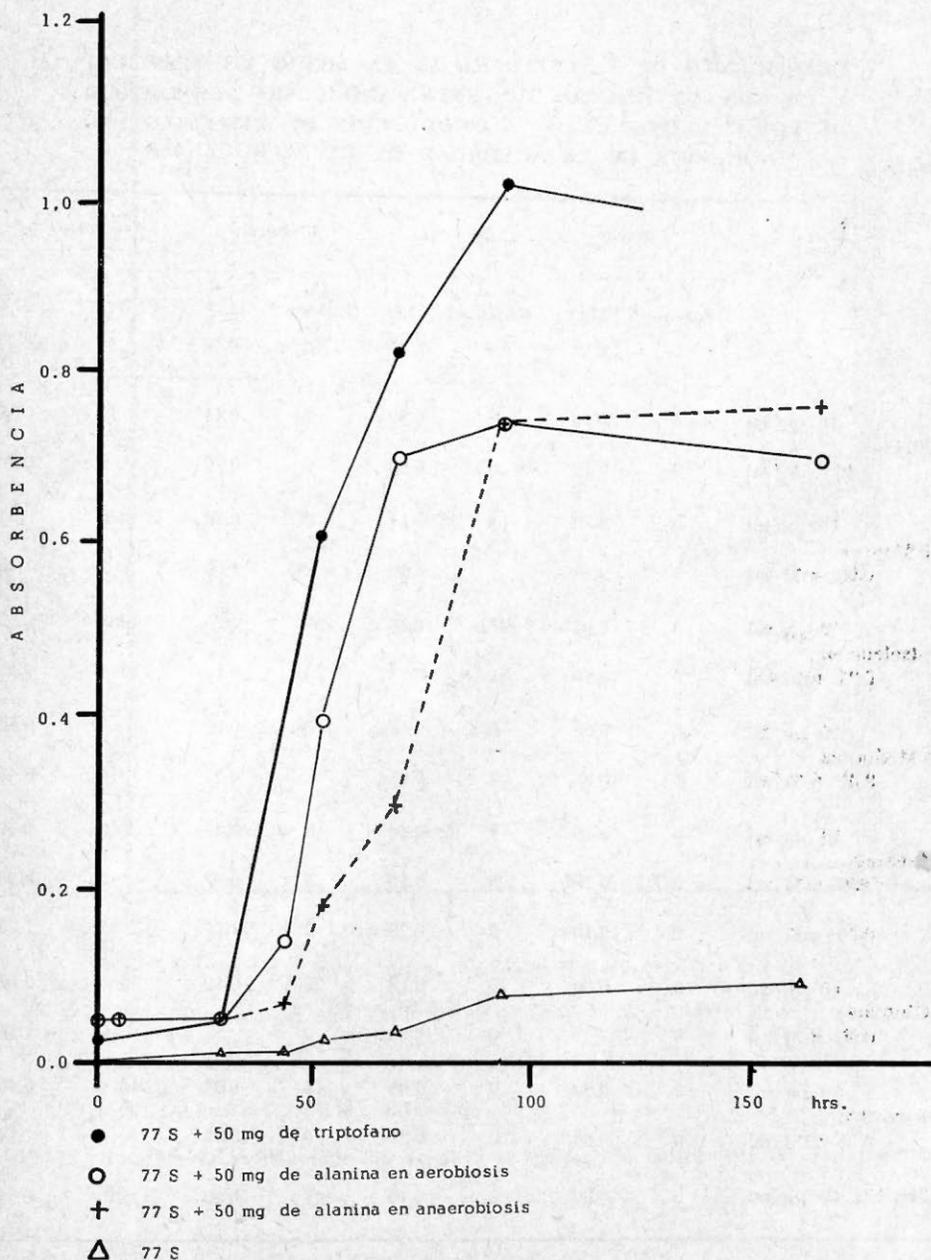


Fig. 1. Crecimiento de *A. azotophilum* en condiciones de aerobiosis y de anaerobiosis.

(Yorch y Pengra, 1966) señalan que el nitrógeno de isoleucina no puede ser utilizado por las células a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, en el presente trabajo se indica que, de algún modo, la isoleucina interviene en la actividad de la nitrógenasa con las dosis anotadas en la tabla 1.

TABLA 1

CRECIMIENTO DE *A. AZOTOPHILUM* EN MEDIO 77S (TESTIGO) Y 77S CON UN AMINOÁCIDO, EXPRESADO COMO ABSORBENCIA DE LOS CULTIVOS (D. O.) Y PRODUCCIÓN DE ETILENO COMO INDICADOR DE LA ACTIVIDAD DE LA NITROGENASA

		8 horas		24 horas		32 horas		56 horas	
		Etileno *	D.O.						
Testigo		0	0.00	4	0.10	4	0.10	40	0.45
Glicina	10 $\mu\text{g/ml}$	0	0.10	4	0.30	4	0.44	70	0.56
	0.05 mM/ml	0	0.10	0	0.30	0	0.70	0	0.90
dl-Alanina	10 $\mu\text{g/ml}$	0	0.10	3	0.24	3	0.33	280	0.57
	0.05 mM/ml	0	0.10	1	0.50	2	1.60	2	1.80
dl-Isoleucina	10 $\mu\text{g/ml}$	0	0.08	43	0.13	34	0.15	1200	0.53
	0.05 mM/ml	0	0.10	31	0.13	100	0.19	1440	0.49
dl-Metionina	10 $\mu\text{g/ml}$	0	0.08	0	0.08	0	0.08	0	0.46
	0.05 mM/ml	0	0.08	4	0.05	37	0.05	1240	0.46
l-Asparagina	10 $\mu\text{g/ml}$	0	0.10	9	0.30	10	0.44	800	0.57
	0.025 mM/ml	0	0.10	3	0.55	0	0.83	10	0.98
	0.05 mM/ml	0	0.10	0	0.78	0	1.17	3	1.29
l-Glutámico	10 $\mu\text{g/ml}$	0	0.00	22	0.12	22	0.12	400	0.62
	0.05 mM/ml	0		0		0		0	1.15
l-Aspártico	10 $\mu\text{g/ml}$	0	0.00	9	0.05	44	0.05	1600	0.45
	0.05 mM/ml	0	0.00	0	0.24	3	0.39	3	1.10
l-Leucina	10 $\mu\text{g/ml}$	0	0.00	9	0.10	41	0.20	1240	0.54

* Unidades arbitrarias.

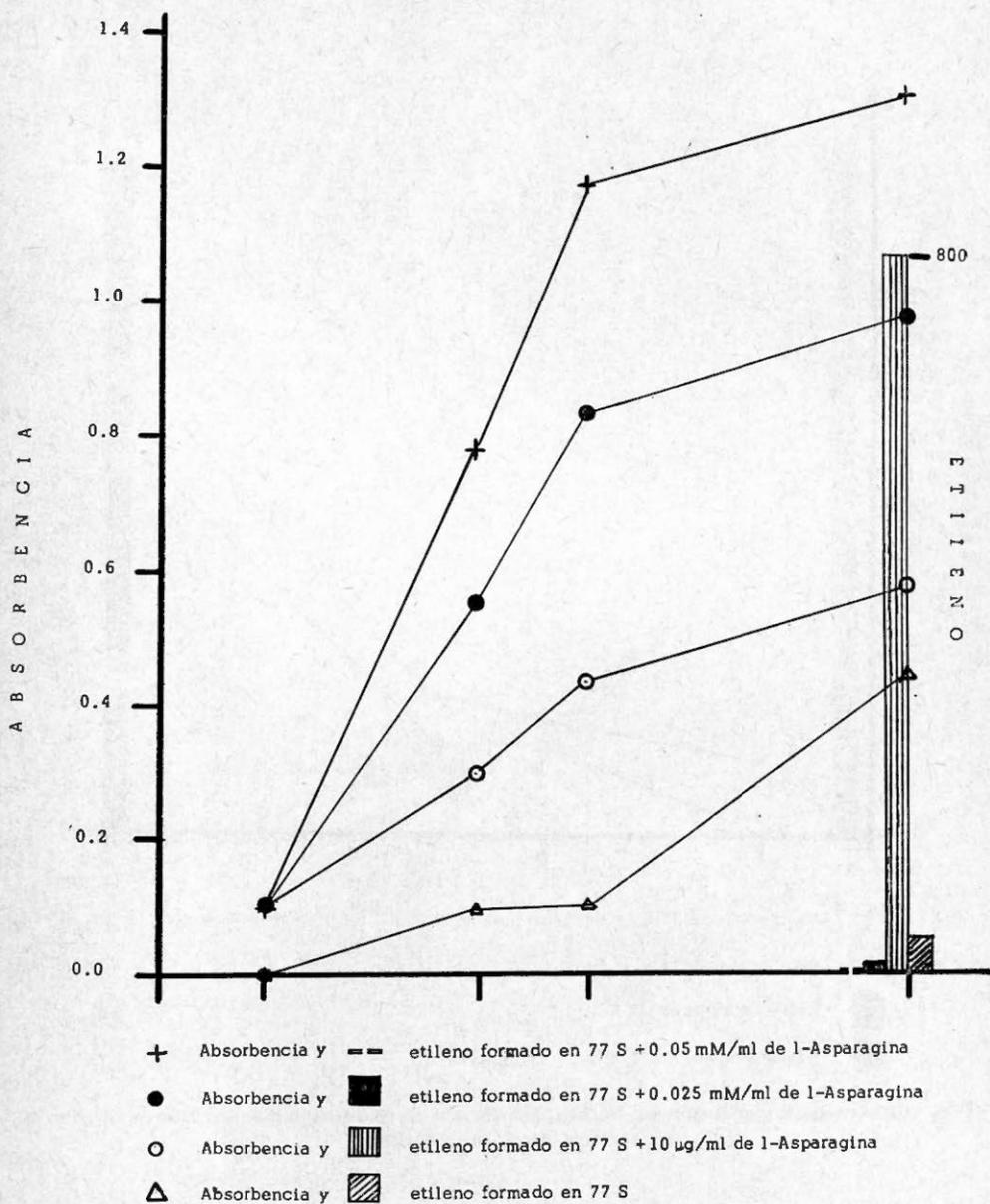


Fig. 2. Absorbancia y reducción del acetileno a etileno en cultivos de *A. azotophilum*.

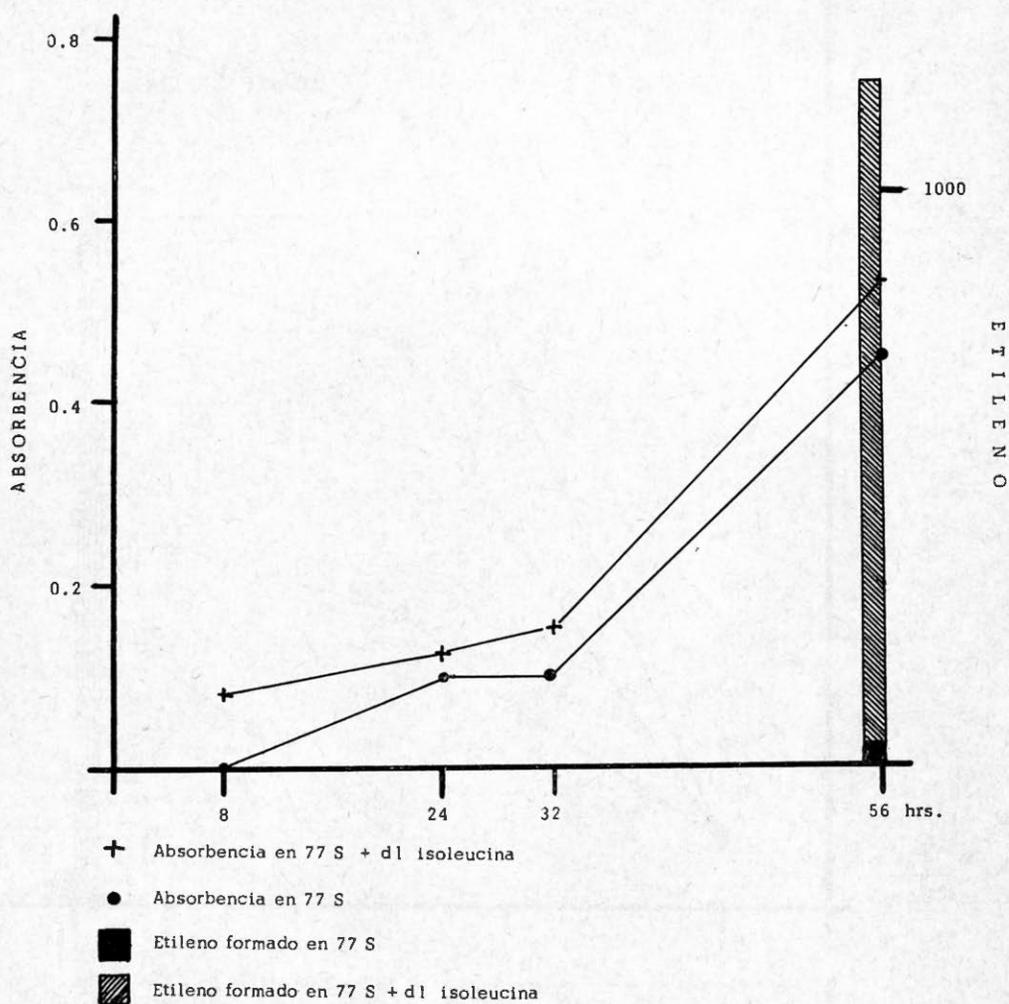


Fig. 3. Efecto de la isoleucina sobre la absorbancia y la reducción del acetileno a etileno en cultivos de *A. azotophilum*.

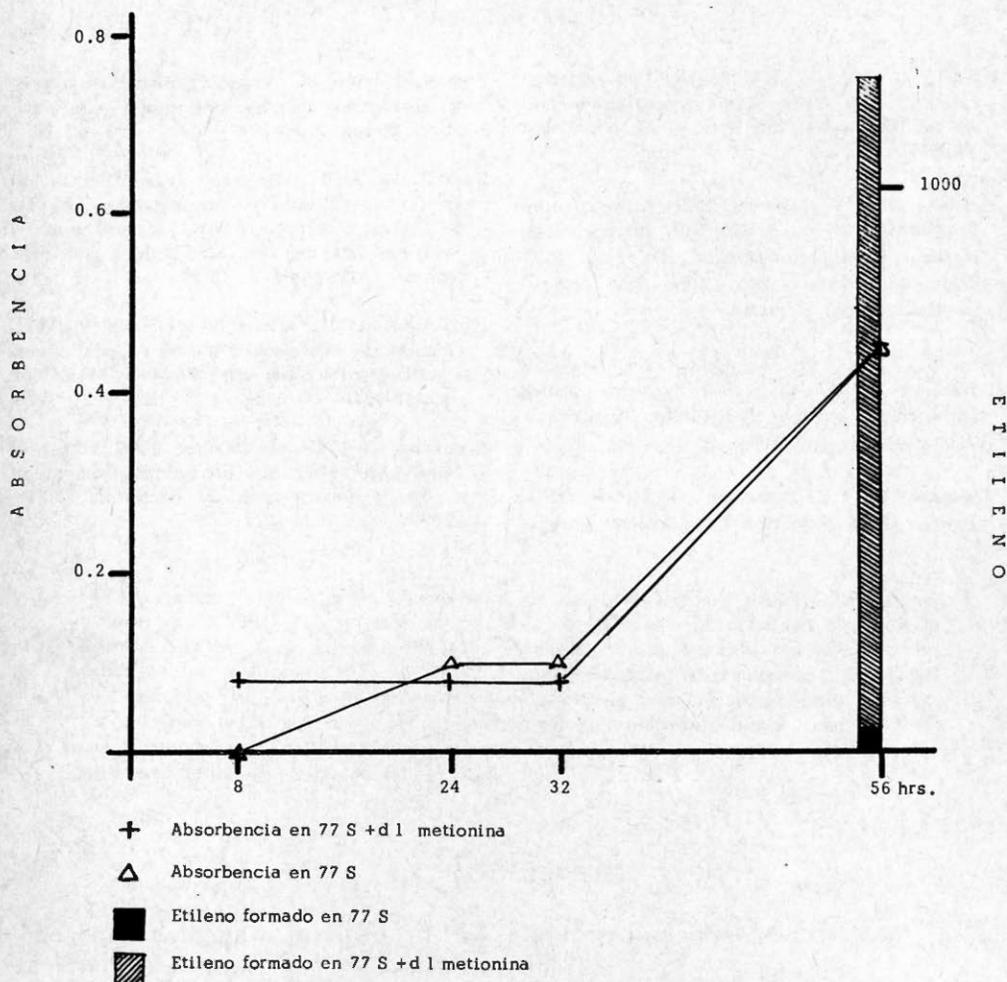


Fig. 4. Efecto de la metionina sobre la absorbancia y la reducción del acetileno a etileno en cultivos de *A. azotophilum*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la revisión del manuscrito del presente trabajo, al biólogo Miguel Ulloa, del Instituto de Biología de la UNAM.

LITERATURA

- DAESCH, G. y L. E. MORTENSON, 1968. Sucrose catabolism in *Clostridium pasteurianum* and its relation to N_2 fixation. *J. Bacteriol.* 96: 346-351.
- HERRERA, T. y J. TABOADA, 1971. Estudio sobre inhibidores de la fijación de nitrógeno en *Agrobacterium azotophilum*. *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. Méx. Serie Biol. Experimental*, 42 (en prensa).
- MUNSON, T. O. y R. H. BURRIS, 1969. Nitrogen fixation by *Rhodospirillum rubrum* grown in nitrogen-limited continuous culture. *J. Bacteriol.* 97: 1093-1098.
- 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. Quím.* 2:188-191.
- ULLOA, M. y T. HERRERA, 1972. Descripción de dos nuevas especies de bacterias aisladas del pozol: *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter pozolis* aisladas del pozol. *Rev. lat-amer. Microbiol.* 14:15-24.
- 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. Bacteriol.* 92:618-622.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la revisión del manuscrito del presente trabajo, al biólogo Miguel Ulloa, del Instituto de Biología de la UNAM.

LITERATURA

- DAESCH, G. y L. E. MORTENSON, 1968. Sucrose catabolism in *Clostridium pasteurianum* and its relation to N_2 fixation. *J. Bacteriol.* 96: 346-351.
- HERRERA, T. y J. TABOADA, 1971. Estudio sobre inhibidores de la fijación de nitrógeno en *Agrobacterium azotophilum*. *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. Méx. Serie Biol. Experimental*, 42 (en prensa).
- MUNSON, T. O. y R. H. BURRIS, 1969. Nitrogen fixation by *Rhodospirillum rubrum* grown in nitrogen-limited continuous culture. *J. Bacteriol.* 97: 1093-1098.
- 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. Quím.* 2:188-191.
- ULLOA, M. y T. HERRERA, 1972. Descripción de dos nuevas especies de bacterias aisladas del pozol: *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter pozolis* aisladas del pozol. *Rev. lat-amer. Microbiol.* 14:15-24.
- 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. Bacteriol.* 92:618-622.