

# EL PROBLEMA DE LA FIXACIÓ DEL N<sub>2</sub> PER ORGANISMES LLIURES

per J. VIVES-REGO

Departament de Microbiologia. Facultat de Ciències  
(Universitat de Barcelona)

## INTRODUCCIÓ

La fixació del nitrogen elemental per bacteris no simbiòtics i aerobis és un fenomen continuadament revisat en el transcurs dels darrers 50 anys <sup>4, 12, 13, 18</sup>. Té una importància extraordinària, perquè constitueix gairebé l'únic mecanisme d'incorporació absoluta del nitrogen en la biomassa d'un ecosistema aïllat. Malgrat l'esforç dut a terme, hom no ha arribat a una situació consistent, sobretot després d'haver obtingut sistemes solubles actius, per la dificultat de mesurar el nitrogen elemental fixat.

D'altra banda, en els últims anys hi ha citacions de microorganismes aerobis i no simbiòtics, trobats reiteradament, que són capaços de créixer en medis teòricament lliures de nitrogen combinat i, per tant presumptivament fixadors <sup>1, 3, 8, 10, 16, 20</sup>, però que, en molts casos, amb les tècniques més modernes existents avui hom no demostra que siguin veritables fixadors <sup>5</sup>.

L'objecte del present treball és la presentació de dues soques aïllades per nosaltres, presumptivament fixadores, i de l'estudi de llur capacitat fixadora.

## MATERIAL I MÈTODES

### Soques

*Pseudomonas azotogenis* CCB 1568 (actualment inclosa en l'ATCC núm. 25850) <sup>16</sup>.

*Pseudomonas fluorescens* D-56 aïllada d'una terra de vinya de Vilafranca del Penedès <sup>19</sup>.

### Medis

El medi lliure de nitrogen combinat que és emprat, és el d'agar manitol<sup>6</sup>. Per fer més crític el creixement sobre plaques, hom incuba dins un dessecador que conté l'atmosfera a pressió normal, que prèviament ha estat rentada en un flascó rentador que conté sulfúric concentrat, a fi i efecte d'eliminar el nitrogen combinat contaminant.

Hom estudia la dependència del creixement de la presència de nitrogen, amb una atmosfera artificial del tipus «barreja precisa», envasada a una pressió de 150 kg/cm<sup>2</sup> i fornida per Oxígeno y Suministros S. A., que té la composició centesimal següent:

Argó	75 % ± 0,1 %	d'una riquesa del	99,996 %
Oxigen	20 % ± 0,1 %	»	»
CO <sub>2</sub>	5 % ± 0,1 %	»	»

### Valoració de la fixació

L'increment del nitrogen total és determinat pel mètode Kjeldahl, prèviament descrit a<sup>9</sup>. La reducció d'acetilè com a tècnica per a determinar la presència de nitrogenasa és un mètode molt emprat en els laboratoris especialitzats, després dels treballs de DILWORTH<sup>2</sup> i de SCHÖLLHORN<sup>17</sup>. És considerat com a altament sensible i significatiu després de la revisió feta per POSTGATE<sup>14</sup>. Trametérem les dues soques al Professor Dr. J. R. Postgate (A. R. C. Unit of Nitrogen Fixation, Universitat de Sussex, Brighton BN1 9QJ, Anglaterra), per tal que dugués a terme aquest tipus d'experiències. Els assaigs de creixement difàsic han estat duts a terme sobre el medi següent:

- a) sacarosa, 20 g; Cl<sub>2</sub>Ca.2H<sub>2</sub>O, 0,1 g; SO<sub>4</sub>Mg.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g; Cl<sup>3</sup>Fe solució aquosa a 1 %, 1 ml; MoO<sub>3</sub> solució aquosa a 0,1 %, 1 ml; aigua destil·lada, 600 ml.
- b) Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H, 12,5 g; K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H, 1,5 g; aigua destil·lada, 400 ml.

Les parts a) i b) són esterilitzades per separat en autoclau a 120° C i ajuntades quan són fredes. El medi és inoculat amb un cultiu crescut sobre el mateix medi que a més conté 0,1 g/l de ClNH<sub>4</sub>. La proporció de l'inòcul és de 5-10 % i la temperatura d'incubació és de 30° C. Les lectures del creixement són fetes per terbolesa a 400 nm amb un Spectrochem de la casa Hilger Watts.

## RESULTATS

Ambdós microorganismes són capaços de créixer en resembres successives, incubats en un dessecador que contingui atmosfera prèviament rentada amb sulfúric.

Els increments del nitrogen total obtinguts, en cap cas no han estat superiors a 6 µg N/ml, en les dues soques estudiades. Aquest increment no pot ésser considerat significatiu, pel fet que pot ocórrer només per efecte del nitrogen combinat existent en l'atmosfera del laboratori, com ja ha estat apuntat per d'altres autors<sup>5</sup>.

En el quadre 1, hom copsa el grau de dependència del creixement respecte a la presència de nitrogen gasós, a 30° C. En el cas de *Pseudomonas azotogensis* CCB 1568 es manifesta una dependència molt més crítica que en cas de *Pseudomonas fluorescens* D-56. En aquest darrer cas, hom pot apreciar un creixement important en l'atmosfera artificial sense nitrogen, bé que sigui inferior a l'obtingut en la incubació en atmosfera normal. Això fa pensar que el creixement ha estat a les despeses del nitrogen contaminant del medi i del provinent de l'inòcul, considerant el microorganisme, aleshores, com a oligonitròfil més que no pas com a un fixador.

En el cas de *Pseudomonas azotogensis* CCB 158, l'absència del nitrogen no en permet el creixement, i es presenta un descens de la terbolesa, atribuïble a la lisi cel·lular i a la manca de desenvolupament.

Totes dues soques foren trameses al professor Dr. J. R. POSTGATE, tal com ja ha estat esmentat, per ésser sotmeses a les proves de reducció d'acetilè. Segons ens comunicaren, ambdues soques donaren resultats negatius en totes les experiències portades a terme.

En la soca *Pseudomonas fluorescens* D-56 no ha pogut ésser observada una diàxia significativa, mentre que en el cas de *Pseudomonas azotogensis* CCB 1568 els resultats obtinguts manifesten un creixement difàsic, tal com es representa en la figura 1.

## DISCUSSIÓ

La determinació de la nitrogenasa pel mètode de la reducció de l'acetilè és considerada de molta sensibilitat i significació<sup>14</sup>. Així i tot, cal no perdre de vista que es tracta d'un mètode indirecte i que per aquest motiu hi ha la possibilitat de l'existència d'una nitrogenasa no detectable pel mètode de la reducció de l'acetilè. D'altra banda, l'existència d'una

diàuxia a concentració limitant de nitrogen combinat, es fa difícilment explicable si no s'esdevé com a conseqüència d'un període d'inducció o desrepressió de la nitrogenasa. Aquest criteri de creixement difàsic, ja ha estat emprat amb anterioritat per a demostrar la capacitat fixadora d'alguns microorganismes aerobis i facultatius<sup>11, 15, 21</sup>; i restà demostrat posteriorment, pel mètode de la reducció de l'acetilè i la fixació del N<sup>15</sup>, que eren veritables fixadors.

Les dues soques presenten un creixement espectacular en el medi d'agar manitol. És un tipus de desenvolupament mucós-viscós, que ocorre

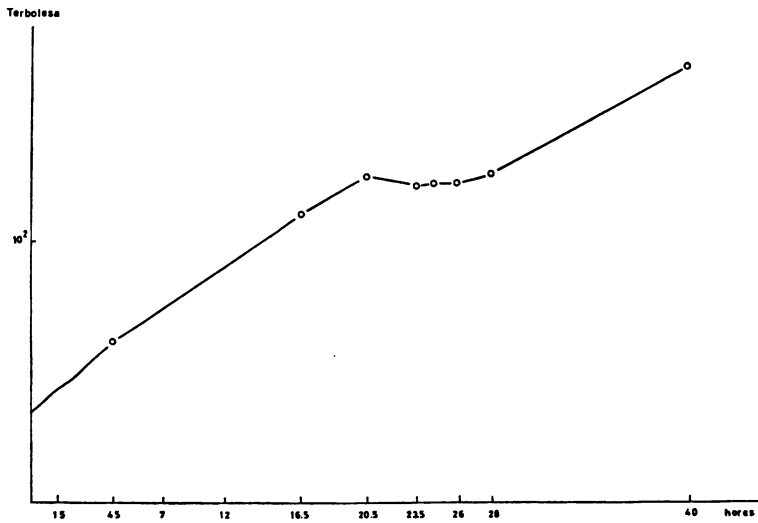


FIG. 1. — Creixement difàsic de *Pseudomonas azotogensis* CCB 1568

en totes les Azotobacteriàcies quan fixen N<sub>2</sub> i que pot ésser identificat com de polisarcàrids capsulars. Aquesta producció només s'esdevé quan les condicions del medi són adequades per a la fixació, i cal atribuir-la a un creixement no equilibrat<sup>7</sup>, degut a un diferent requeriment energètic per a abastar-se de nitrogen utilitzable per a la biosíntesi. Així aquest creixement de les nostres soques és clarament similar al dels veritables fixadors. En cas de no ésser-ho, caldria pensar en bacteris oligonitròfils o bé fixadors heterotròfics; és a dir que, per a créixer, poden utilitzar quantitats relativament petites de nitrogen combinat, que prenen de les contaminacions del medi o l'atmosfera i que poden arribar a ésser importants<sup>5</sup>

En el quadre I, hom pot apreciar també una forta evidència de la

necessitat del nitrogen elemental per al creixement de *Pseudomonas azotogensis* CCB 1568 especialment, bé que tampoc no pot ésser descartada la possibilitat que el creixement esdevingut en l'atmosfera normal sigui degut al nitrogen combinat contaminant. Sembla, doncs, que hi ha una certa evidència acumulada a favor de suggerir que *Pseudomonas azotogensis* CCB 1568 és capaç de fixar nitrogen elemental, bé que la nitrogenasa que sintetitzi no sigui detectable pel mètode de l'acetilè. D'altra banda, el creixement de la soca *Pseudomonas fluorescens* D-56, cal atribuir-lo a un creixement oligonitròfil, en absència d'evidència a favor de la seva capacitat fixadora; i cal fer esment, tanmateix, de la similitud d'ambdós tipus culturals en el medi d'agar manitol.

## QUADRE 1

Creixement en atmosfera normal i en atmosfera artificial controlada sense nitrogen, als quatre dies d'incubació a 30 °C i a la pressió final de 760 mm de Hg. Lectures de terbolesa a 400 nm.

	Lectura inicial amb inòcul	Ar-O <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub>	Atmosfera normal
<i>Pseudomonas azotogensis</i> CCB 1568	0.270	0.230	0.310
<i>Pseudomonas fluorescens</i> D-56	0.140	0.300	0.390

## BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, G. R.: *Nitrogen fixation by Pseudomonas-like soil bacteria*. «J. of Bacteriol.», 70, 129-133 (1955).
2. DILWORTH, M. J.: «Biochem. Biophys. Acta», 127, 285 (1966).
3. EVANS, H. J., CAMPBELL, N. E. R. i HILL, S.: *Asymbiotic nitrogen-fixing bacteria from the surfaces of nodules and roots of legumes*. «Can. J. Microbiol.», 18, 13-21 (1972).
4. HANIF, A. H. i ROBERTS, J. P.: *Views and reviews on Azotobacter*. «Parkistan Journal of Science», 22, 210-212 (1970).
5. HILL, S. i POSTGATE, J. R.: *Failure of putative nitrogen-fixing bacteria to fix nitrogen*. «J. of Gen. Microbiol.», 58, 277-285 (1969).
6. LORD, T. H.: *Determinative Bacteriology*. Burgess Publishing Co., Minnesota (1962).
7. MAALOE, O. i KJELDGAARD, N. O.: *Control of Molecular Synthesis*. Ed. Benjamin, Nova York (1965).
8. MEIKLEJOHN, J. i WEIR, J. B.: *Nitrogen-fixers pseudomonas and other aerobic bacteria from rhodesian soils*. «J. Gen. Microbiol.», 50, 487-496 (1968).

9. MEYNELL, M. D. i MEYNELL, E.: *Bacteriología Experimental. Teoría y Práctica*. Ed. Omega, Barcelona (1969).
10. PAUL, E. A. i NEWTON, J. D.: *Studies of aerobic nonsymbiotic nitrogen-fixing bacteria*. «Can. J. Microbiol.», 7, 7 (1961).
11. PENGRA, R. M. i WILSON, P. W.: *Physiology of nitrogen fixation by Aerobacter aerogenes*. «J. of Bacteriol.», 75, 21-25 (1958).
12. POSTGATE, J. R.: *Nitrogen fixation*. «Spectrum», 68, 14-16 (1970).
13. POSTGATE, J. R.: *Relevant aspects of the physiological chemistry of nitrogen fixation*. 21-Symposium. The Soc. for Gen. Microbiol., 287 (1971).
14. POSTGATE, J. R.: *The Acetylene Reduction Test for Nitrogen Fixation. Methods in Microbiology*, 6 B. Editat per J. R. Norris i D. W. Ribbons. Academic Press, Londres i Nova York (1972).
15. PROCTOR, M. H. i WILSON, P. W.: *Nitrogen fixation by Gram negative bacteria*. «Nature», 182, 891 (1958).
16. SANCHO, J. i PARÉS-FARRÀS, R.: *Identificación taxonómica de Pseudomonas azotogensis*. «Microbiología Española», 22, 1-5 (1969).
17. SCHÖLLHORN, R. i BURRIS, R. H.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.», 57, 213 (1967).
18. STEWART, W. D. P.: *Biological and ecological aspects of nitrogen fixation by free-living microorganisms*. «Proc. Roy. Soc. B.», 127, 367-388 (1969).
19. VIVES-REGO, J.: Tesi Doctoral. Facultat de Ciències. Universitat de Barcelona (1973).
20. VOETS, J. B. i DEBACHER, J.: *Pseudomonas azotogensis nov. sp. a new free living nitrogen fixing bacterium* (1965).
21. YOCH, D. C. i PENGRA, R. M.: *Effect of amino acids on the nitrogenasa sistem of Klebsiella pneumoniae*. «J. of Bacteriol.», 92, 618-622 (1966).