INHIBICIÓ PER AMINOÀCIDS DURANT EL CREIXEMENT DE MICROORGANISMES EN MEDIS SIMPLES

Comunicació presentada el dia 24 de maig de 1974
per

M. LLORET i BALANYÀ

del Departament de Microbiologia. Facultat de Biologia.
Universitat de Barcelona.

Antecedents

Com a resultat d'una sèrie de treballs encaminats a trobar una òptima producció d'aminoàcids pel bacteri *Citrobacter intermedium* C3, R. Clotet trobà que, en medis de nitrogen mineral, l'augment de l'inòcul comporta disminució de la velocitat de multiplicació i del creixement total segons una funció exponencial [1].

Experiències posteriors han demostrat que aquest efecte és degut a la presència, en el medi, de factors solubles segregats pel bacteri, en relació amb el nombre de cèl·lules presents i el temps d'incubació. Com a components fonamentals d'aquesta fracció inhibidora, han estat identificats uns certs aminoàcids [5, 6].

El fet que compostos com aminoàcids siguin responsables, totalment o parcialment, de fenòmens de limitació del creixement, ha semblat prou interessant per a aprofundir-lo.

Material i mètodes

1. *Microorganismes i medis de cultiu.* La major part d'experiències han estat fetes sobre *Citrobacter intermedium* C3.

Els medis de cultiu, podem agrupar-los en: medis simples, amb nitrogen mineral, i medis complexos, amb N orgànic. En el primer grup tenim el medi Ml, amb glucosa i sals amòniques, el medi de Czapek-Dox (Oxoid) i el medi L per a llevats. El segon grup inclou brou de cultiu

ordinari (Nutrient Broth Oxoid), Ml-glutàmic i medi de Sabouraud (Oxoid). Tots ells han estat descrits detalladament [6].

2. *Determinació del creixement.* El creixement com a massa total és determinat per lectura de la terbolesa a 400 nm i fent servir com a blanc el mateix medi de la prova sense inocular. La dada obtinguda és transformada en valor de pes sec mitjançant una corba prèviament obtinguda que relaciona ambdós valors.

3. *Determinació de la inhibició.* La inhibició és determinada per comparació del creixement obtingut en un moment donat en dues sèries de tubs, una sèrie control, amb el medi de la prova, i una sèrie assaig, que conté els compostos en estudi. La inhibició s'expressa numèricament amb l'índex I, calculat segons:

$$I_t = 1 - (C_{It}/C_{Nt})$$

on I_t és l'índex d'inhibició en el temps t, C_{It} és el creixement a la sèrie assaig i C_{Nt} és el creixement a la sèrie control.

Resultats

1. *Efecte inhibidor dels aminoàcids en el creixement.*

• *Efecte de cada aminoàcid individualment.* És comprovada l'acció dels aminoàcids més representatius sobre el creixement de C_3 en medi Ml. Els resultats corresponents a la concentració de 0,2 gr/l, podem veure'ls al quadre I. Hi observem que hi ha aminoàcids amb evident efecte inhibidor (alanina i cisteïna), alguns que causen inhibició lleugera (valina, leucina, glicina), d'altres que estimulen el creixement (glutàmic, serina, tirosina) i, finalment, la resta mostra resultats poc significatius a la concentració emprada.

• *Efecte de més d'un aminoàcid.* Ja que existeixen, com hem vist, alguns aminoàcids, la presència dels quals resulta negativa sobre el creixement, hom pensà en la possibilitat d'un efecte tòxic acumulatiu entre ells, i d'un efecte protector per la presència d'aminoàcids no inhibidors. Tres grups fonamentals d'experiències han estat fetes en aquesta direcció:

a) Un aminoàcid inhibidor junt amb un de no inhibidor: Hem treballat amb medis de cultiu preparats segons composició idèntica al Ml, però substituint la font nitrogenada ($ClNH_4$) per un aminoàcid no inhibidor, de manera que la molaritat del N del medi resti constant. Sobre

aquests medis, hom assaja l'acció d'un aminoàcid inhibidor (hi ha hagut proves amb alanina i glicina) a la concentració de 0,1 gr/l.

El creixement i la inhibició són determinats per comparació amb el resultat obtingut en cada medi corresponent sense addicionar-hi l'aminoàcid inhibidor.

QUADRE I. — *Efecte de diversos aminoàcids en el creixement de* C3

Aminoàcid	Índex d'inhibició 0,1 gr/l	0,2 gr/l
Alanina	0,25	0,34
Cisteïna	0,06	0,21
Aspàrtic	0,06	0,09
Glicina	0,06	0,08
Valina	0,07	0,10
Leucina	0,06	0,07
Isoleucina	0,05	0,07
Fenilalanina	0,10	0,04
Arginina	0,09	0,05
Metionina	—0,02	0,02
Prolina	0,01	0,02
Treonina	0,03	0,03
Histidina	—0,04	0,01
Hidroxiprolina	—0,01	—0,09
Glutàmic	—0,14	—0,15
Lisina	0,05	—0,00
Triptòfan	—0,02	—0,08
Tirosina	—0,11	—0,14
Serina	—0,25	—0,32

Hom ha trobat que un 25 % de la concentració molar del N del medi en forma d'un aminoàcid no inhibidor (glutàmic, lisina, histidina) protegeix eficaçment de l'efecte inhibidor de l'alanina, i un 10 % de la glicina.

b) Dos aminoàcids inhibidors: La tècnica és la mateixa que s'ha descrit a l'apartat anterior, però en aquest cas és substituït el $ClNH_4$ del Ml per valina (que es mostrà inhibidora sobre C3), de tal manera, que representa respectivament un 10, 25 i 50 % del N del medi. L'addició, a aquests medis, d'alanina a la concentració de 0,08 gr/l (a la qual es mostra ja clarament inhibidora) no ens dóna, en cap cas, efecte tòxic acumulatiu. Mai no és sobrepassat l'índex obtingut amb un de sol.

c) Més de dos aminoàcids: Hom determina, en aquest cas, l'índex d'inhibició per uns quants aminoàcids individualment i per llur presència simultània en combinacions successivament més complexes. La concentració de cadascun d'ells és mantinguda sempre fixa a 2 mM/l. Com

podem observar a la figura 1, com més aminoàcids s'afegeixen al medi, més lleu és la inhibició, i qualsevol barreja és d'activitat inferior a la del més actiu dels seus components aïlladament.

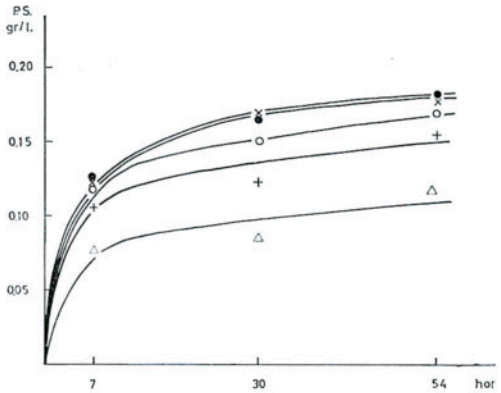

FIG. 1

2. *Relacions de la inhibició per un aminoàcid amb alguns paràmetres, ambientals i metabòlics.*

Aquest grup d'experiències té per objecte obtenir algunes dades sobre el mecanisme inhibitori. En totes elles, hom treballa amb alanina, que és un dels aminoàcids més fortament inhibidors sobre C_3.

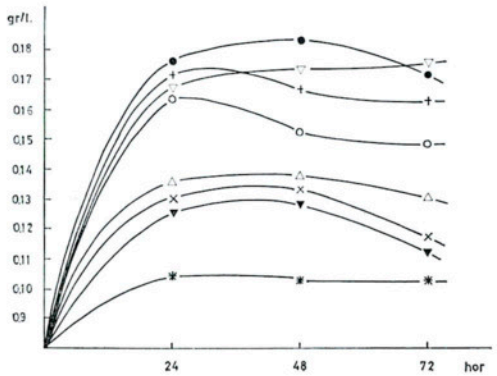

FIG. 2

• *Efecte del medi.* Si el creixement es desenvolupa sobre medi M1, l'alanina es mostra intensament inhibidora a molt petites concentracions, ja que 0,1 gr/l dóna índex d'inhibició de l'ordre de 0,40. Si aquesta mateixa concentració d'alanina s'afegeix a brou ordinari, el creixement obtingut no difereix gens del control i cal augmentar-ne

molt la concentració perquè hi aparegui inhibició. Fins a prop dels 10 gr/l no s'arriba a un índex d'inhibició de l'ordre de 0,40, com el que abans hem esmentat per al Ml (fig. 2).

• *Dependència de l'oxigen.* Incubem C3 en presència d'alanina en dues condicions clarament diferenciades quant a la tensió d'oxigen; així es desenvolupa en condicions oxidatives o fermentatives. Veiem que en condicions anaeròbies apareix inhibició, però en condicions d'oxigenació intensa per agitació, la inhibició baixa a nivells extremament petits (quadre II).

QUADRE II. — *Index d'inhibició de* C3 *en medi M1 amb 0,2/l d'alanina, en condicions aeròbies i anaeròbies*

Temps	Índex d'inhibició	
	Aerobiosi	Anaerobiosi
24 h.	0,10	0,20
48 h.	0,08	0,24
72 h.	0,08	0,23

• *Velocitat de multiplicació.* Partint d'inòculs controlats rigorosament, determinem la velocitat de multiplicació de C3 en Ml a les 24, 48 i 72 hores, en presència de 0,04 i 0,08 gr/l d'alanina. Al quadre III podem veure com disminueix la velocitat de multiplicació en augmentar la concentració d'aminoàcid.

QUADRE III. — *Velocitat de multiplicació (R) de* C3 *en medi M1 amb diferents quantitats d'alanina*

Medi	Valors de R		
	24 h.	48 h.	72 h.
Ml	0,291	0,152	0,101
Ml + 0,04 gr/l d'alanina	0,276	0,142	0,094
Ml + 0,08 gr/l d'alanina	0,267	0,130	0,085

• *Subcultius.* Realitzant subcultius successius de C3 crescut en presència d'alanina, a medis amb idèntica composició, hom obté sempre inhibició del mateix ordre. Això indica la no existència de mecanismes d'adaptació enzimàtica ni de selecció de mutants, sinó que es tracta d'un fenomen que depèn de la presència de l'aminoàcid.

3. *Efecte d'aminoàcids inhibidors sobre d'altres soques.*

Al quadre IV donem els resultats obtinguts de l'efecte d'aminoàcids sobre el creixement d'algunes soques bacterianes i de llevats.

QUADRE IV. — *Sensibilitat d'alguns microorganismes a alanina i cisteïna*

Soca	Alanina	Cisteïna
Escherichia coli ATCC 11303	+	+
E. coli CCB 27	+	+
P. intermedium ATCC 11606	+	
Bacillus megatherium CICC 1023	+	
Azotobacter chroococcum CCB 2568	+ —	
Acetobacter aceti B-999 USDA	+ —	
Pseudomonas aeruginosa CCB 442	—	
Ps. fluorescens CCB 129	—	
Sacharomyces cerevisiae ATCC 7752	—	+
Candida albicans L-65	—	

DISCUSSIÓ

És evident que uns certs aminoàcids posseeixen acció inhibidora del creixement, en concentracions petites. Els resultats exposats a l'apartat 1 mostren un efecte aparentment protector per aminoàcids no inhibidors, però hom no ha trobat sinergia, ni suma d'efectes tòxics quan hi ha presents diversos inhibidors, sinó, ben al contrari, una disminució de la inhibició com més va augmentant el nombre d'aminoàcids en el medi. És a dir, l'efecte protector és degut no a la presència d'un determinat aminoàcid, com s'esmenta en alguns treballs [8, 9], sinó d'un més gran nombre d'aquests compostos, encara que individualment siguin inhibidors.

Per això podem dir que la inhibició depèn de dos paràmetres: la identitat de l'aminoàcid i la seva proporció relativa en el balanç dels aminoàcids totals del medi. En els casos d'inhibició, aquesta és màxima quan l'aminoàcid que la causa és l'únic compost amínic del medi. L'acció inhibidora depèn d'una desproporció de la fracció amínica del medi a favor d'un sol component.

Aquesta hipòtesi es veu confirmada pels resultats exposats a l'apartat 2, ja que si la quantitat d'alanina que causa inhibició en un medi mineral s'addiciona a un medi complet, que ja conté aminoàcids, no apareix cap efecte; però si n'augmentem convenientment la concentració, aconseguirem inhibició. És a dir, la toxicitat de l'alanina no depèn de la concentració absoluta sinó de la proporció respecte a la resta de compostos nitrogenats.

La tensió d'oxigen té una influència decisiva en el fenomen d'inhibició, que sembla que va lligat a la via fermentativa. Aquest postulat concorda amb els resultats de l'apartat 3. En efecte, tots els aerobis estrictes que s'han fet créixer amb alanina, o no s'han mostrat gens inhibits (cas de *Pseudomonas*), o bé hi ha hagut retard del creixement però no limitació del creixement total, ja que tots han arribat a la mateixa massa final que els controls (*Acetobacter, Azotobacter, C. intermedium* S–).

Podem concloure que, en el cas d'inhibició de C3 per alanina, hi ha una disminució de la velocitat de multiplicació i un menor creixement total, quan es desenvolupa en condicions fermentatives. Aquest efecte pot ésser aconseguit per desproporció de l'aminoàcid en qualsevol medi.

El fenomen sembla que no es limita a aquesta soca, sinó que, com s'ha vist a l'apartat 3, d'altres soques poden també inhibirse per desproporció d'un aminoàcid, sigui alanina o un altre (cas de cisteïna per *Sacharomyces*).

BIBLIOGRAFIA

1. CLOTET, R. — *Influencia del inóculo en el crecimiento de* Citrobacter intermedium C3 *en cultivo discontinuo.* «Microb. Españ.»; *22,* 271 (1969).
2. ECCLESTON, M. i KELLY, D. P. — *Competition among aminoacids for incorporation into* Methylococcus capsulatus. «J. Gen. Microb.»; *73,* 303-314 (1972).
3. ECCLESTON, M. i KELLY, D. P. — *Inhibition by L-threonine of aspartokinase as a cause of threonine toxicity to* Methylococcus capsulatus. «J. Gen. Microb.»; *75,* 223 (1973).
4. HALVORSON, H. — *Utilization of single L-aminoacids as a sole source of carbon and nitrogen by bacteria.* «Canad. J. Microb.»; *18,* 1647-1650 (1972).
5. LLORET, M. — *Autorregulación y regulación cruzada del tiempo de generación por factores solubles excretados al medio durante el crecimiento bacteriano.* Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Barcelona, 1973.
6. LLORET, M. i CLOTET, R. — *Efecto inhibidor de la alanina sobre el crecimiento de* C. intermedium C3 *con nitrógeno mineral.* III Congreso Nacional de Microbiología. Barcelona, 1971.
7. ROBERT-GERO, M., LE BORGNE, L. i COHEN, G. N. — *Concerted feed-back inhibition of the aspartokinase of* Rhodospirillum tenue *by threonine and methionine.* «J. Bacteriol.»; *112,* 251 (1972).
8. ROWLEY, D. — *Interrelationships between aminoacids in the growth of coliform organisms.* «J. Gen. Microb.», *9,* 37-43 (1953).
9. UMBARGER, H. E. i BROWN, B. — *Isoleucine and valine metabolism in* Escherichia coli. *V. Antagonism between isoleucine and valine.* «J. Bacter.»; *70,* 241-248 (1955).
10. URGELL, J. B. — *Activitat isocitric-deshidrogenàsica en preparats solubles de diferents poblacions de* C. intermedium C3. «Treb. Soc. Catal. Biol.», *27,* 91-99 (1970).
11. VARGA, J. M. i HORVARTH, I. — *Growth inhibition of* Pseudomonas aeruginosa *by valine.* «J. Bacteriol.»; *92,* 1569 (1966).