

CONTRIBUCIÓ AL DESENVOLUPAMENT DE TÈCNiques ADIENTS PER A L'ESTUDI DE LA FIXACIÓ DE NITROGEN EN ORGANISMES LLIURES

Comunicació presentada el dia 13 de desembre de 1973
pel senyor

FERRAN VALLESPINÓS i RIERA

CoHaborador de l'Institut d'Investigacions Pesqueres. Barcelona

S U M M A R Y

Contribution for developing appropriate methods to study the nitrogen fixation by free organisms

Tests for acetylene reduction were made with several strains of nitrogen fixing bacteria Azotobacter. The objective is preparing methods for studying other possible nitrogen fixing strains isolated the cruise ATLOR II.

INTRODUCCIÓ

Els darrers anys, les mesures de fixació de nitrogen, àdhuc en ecosistemes naturals, han rebut un gran estímul gràcies a una colla de mètodes nous que hom recull en el quadre 1, juntament amb d'altres d'eficàcia dubtosa. Així, és molt difícil de controlar la manca total de nitrogen combinat en un medi de cultiu, i, per tant, el creixement d'una soca en un medi que hom creu lliure de nitrogen pot representar només el desenvolupament d'un metabolisme micronitròfil, com han demostrat HILL i POSTGATE⁶.

La nitrogenasa, l'enzim que fixa el nitrogen molecular, és molt versàtil; SCHÖLLHORN i BURRIS⁸ comprovaren que és capaç de reduir un ampli espectre de substrats. És particularment interessant la reducció de l'acetilè; aprofitant-ho, STEWART i col·lab.⁹ posaren a punt un mètode per a quantificar la capacitat de fixació de nitrogen. Nosaltres hem emprat aquesta tècnica, amb unes soques d'*Azotobacter* isolades del sòl pel doctor VIVES, del Departament de Microbiologia de la Universitat de Barcelona. Hom creu interessant de discutir-ne alguns punts.

QUADRE 1

PRINCIPALS TÈCNiques EMPRADES PER A L'ESTUDI DE LA FIXACIÓ DE NITROGEN

-
- a) MORFOLÒGIQUES
 - a.1) Heterocists en les cianofícies (VALLESPINÓS ¹¹)
 - a.2) Increment de D.O. d'un cultiu sense nitrogen combinat inicial
 - b) INCREMENT DEL NITROGEN PARTICULAT/DISSOLT
 - c) ESTUDI MANOMÈTRIC DE L'INTERCANVI DE GASOS QUE TÉ LLOC DURANT LA FIXACIÓ (COBB i MYERS ³)
 - d) INCORPORACIÓ D'ISÒTOP RADIOACTIU ¹⁵N (CAMPBELL i col·lab. ²)
 - e) TÈCNiques ESPECTROMÈTRIQUES
 - e.1) Relació N/Ar o bé ¹⁴N/¹⁵N (FAY i FOGG ⁴)
 - e.2) Incorporació d'isòtop estable ¹⁵N (NEESS i col·lab. ⁷)
 - f) REDUCCIÓ DE L'ACETILÈ I CIANURS PER LA NITROGENASA (STEWART i col·lab. ⁹)
-

MÈTODES

Hom fa créixer les soques en un medi sense nitrogen combinat i amb manitol com a font de carbó. Conté també Fe, Ca, Mo i Mg a més de fosfat (medi AM); el pH s'ajusta a 7,2 i la temperatura de creixement és de 30° C. Hom fa les lectures de les densitats òptiques a fi d'obtenir un control de la població, amb un espectrofotòmetre i a 500 nm de longitud d'ona. Hom fa la mesura del pH en continu durant el temps de l'experiència. La quantificació de l'activitat nitrogenasa és duta a terme en erlenmeyers de 30 ml de capacitat, amb tap del tipus «d'antibiòtic». Hom posa una mica de greix de silicona al tap a fi d'aconseguir una bona estanqueïtat. Si treballem amb un cultiu, n'hi ha prou amb 5 ml de mostra. Hem comprovat que si la tensió d'acetilè és superior a 0,1 atm, no hi ha pèrdua en la capacitat de reduir-lo, encara que resti nitrogen en el recipient d'incubació.

Injectem el volum precís d'acetilè a fi que l'atmosfera final sigui més o menys: 76 % N₂, 20 % de O₂ i 3 % de C₂H₄. Hom obté l'acetilè a partir de carbur de calci i és preparat immediatament abans; conté quantitats variables però molt petites d'etilè i metà, detectables cromatogràficament, per la qual cosa cal fer un «blanc» abans de la incubació de cada

mostra. La separació de l'acetilè i de l'etilè és molt senzilla d'aconseguir cromatogràficament. Nosaltres emprarem un cromatògraf amb detecció per flama d'hidrogen amb una columna de Porapak R i nitrogen de molta

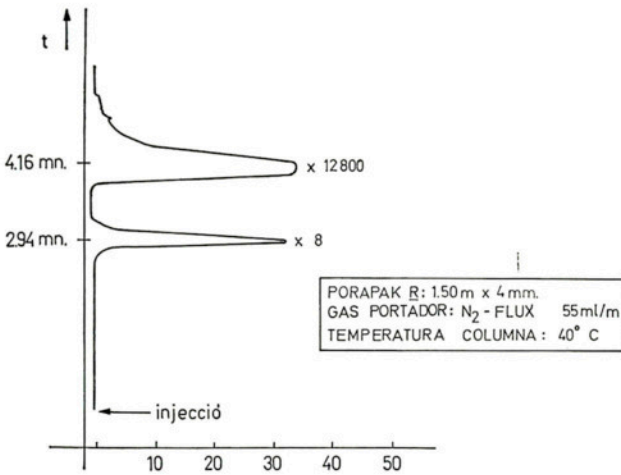


FIG. 1. — Hom pot veure les condicions emprades per a la separació d'acetilè i etilè. L'etilè tarda a ésser detectat 2,94 minuts i l'acetilè 4,16. La quantitat d'acetilè sempre és comparativament molt gran i per això convé canviar l'atenuació de l'enregistrador (els numerets dels pics fan referència a l'atenuació). És possible de conèixer el volum d'etilè produït injectant quantitats conegudes i mesurant l'àrea del pic corresponent

puresa com a gas portador. La temperatura de la columna fou de 40° C. Hom pot veure a la fig. 1 les condicions de separació.

El període d'incubació s'atura amb la injecció d'1 ml d'àcid fosfòric al 50 %.

RESULTATS

Hi ha un punt que ens convé d'aclarir a causa de la confusió que hom troba en la bibliografia: és el que es refereix al temps d'incubació adequat per a dur a terme el test de l'acetilè. Alguns autors (SUGAHARA i KAWAI¹⁰) empen temps molt curts —mitja hora o una hora—; per contra, d'altres, fins i tot 48 hores (BREZONIK i HARPER¹). Tanmateix no pot ésser establerta una llei general, sinó que depèn del tipus de material. Nosaltres hem treballat en diverses soques d'*Azotobacter* (clarament diferenciables per llur diferent capacitat de produir etilè) i podem concloure que, almenys durant les primeres dotze hores, la quantitat d'acetilè reduïda al llarg del temps s'ajusta prou bé a una recta (fig. 2). Aquest fet, d'altra banda, ens dóna confiança en el mètode, perquè hem treballat amb soques de capacitat fixadora, reconeguda per d'altres mitjans, i hem assegurat els resultats obtinguts amb bacteris isolats en el curs de la campanya oceanogràfica ATLOR II (març 1973).

Però no convé d'allargar més el temps d'incubació: la cinètica de la reacció es pot ajustar a una equació de les del tipus de Michaelis-Menten (HARDY i collab. ⁵), com podíem preveure. Temps massa llargs ens donaran valors d'etilè relativament baixos.

A la fig. 3 ha estat representada la corba de creixement de la soca 20, en el medi AM líquid i a 30° C, el pH del medi al llarg del temps i l'etilè

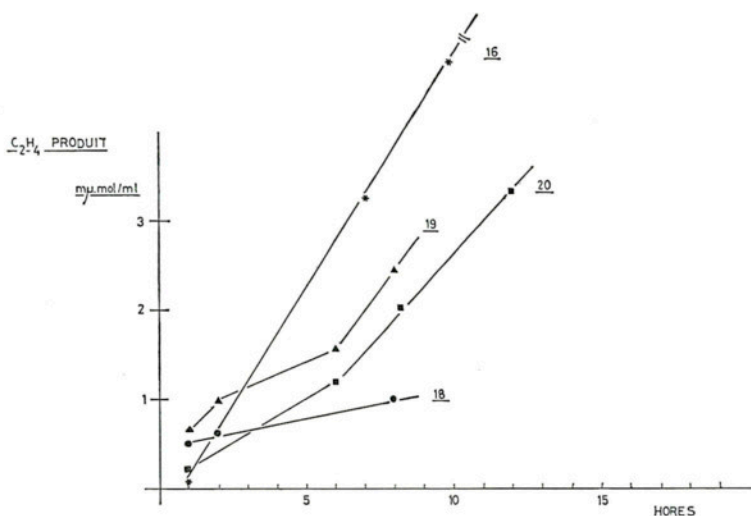


FIG. 2.— Aparició d'etilè al llarg del temps. Hi ha diferències entre les soques d'*Azotobacter* (assenyalades amb els nùms. 16, 18, 19 i 20). Hom pot veure que s'ajusta prou bé a una recta durant les dotze primeres hores d'incubació

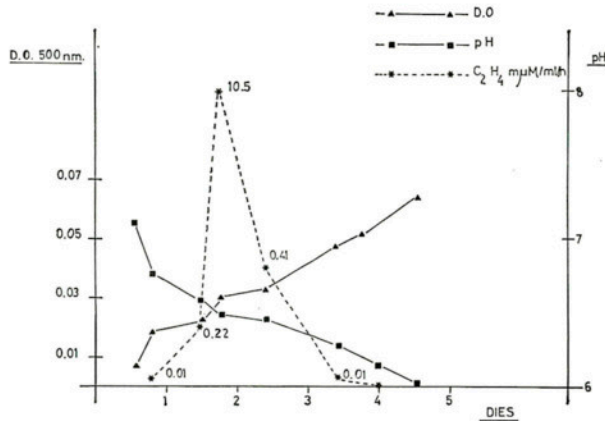
produït. Hom trobà el valor màxim durant les primeres fases del creixement logarítmic de la soca. Després, i coincidint amb la baixa del pH, es perdia la capacitat de reduir l'acetilè i, per tant, de fixar nitrogen. D'acord amb la bibliografia, hom no introdueix un error gaire gran si divideix per 3 els μM d'etilè per tal de deduir-ne la quantitat de nitrogen fixat.

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Tot això ens porta a plantejar algunes preguntes per a tractar d'esbrinar l'activitat fixadora dels bacteris en els ecosistemes, a més de confirmar que el mètode de l'acetilè és una bona mesura indirecta per a copsar els nivells d'actuació del cicle del nitrogen en la natura. Hom troba els

valors més elevats de fixació en la fase logarítmica del creixement. Ho hem trobat repetidament en d'altres espècies de bacteris i àdhuc en llevats. Llargors, cal pensar com porten a terme llur activitat en la natura. És difícil d'imaginar que siguin trobats en fase logarítmica de creixement, bé que,

FIG. 3. — Increment de la població i disminució del pH al llarg del temps. Periòdicament, hom prenia 5 ml de cultiu i mesurava la densitat òptica i feia la determinació de l'acetilè reduït. Creixement a 30° C



en sistemes amb forts fluxos de matèria i d'energia, hom pot suposar que s'estableix una mena de quemostat (cas dels llocs d'afiorament a l'oceà). Només per mitjà de l'aplicació de tècniques adients hom pot arribar a assolir informació per a explicar les aparents paradoxes que establím en extrapolar fets ben comprovats al laboratori. Però això ens porta a una problemàtica que s'aparta del propòsit de la present comunicació.

BIBLIOGRAFIA

1. BREZONIK, P. L. i HARPER, C. L. — Nitrogen fixation in some anoxic lacustrine sediments. «Science», 164, 1277 (1969).
2. CAMPBELL, N. E. R., DULAR, R., LEES, H. i STANDING, K. G. — The production of ¹⁵N₂ by 50 MeV protons for use in biological nitrogen fixation. «Can. J. Microbiol.», 13, 387 (1967).
3. COBB, D. H. i MYERS, J. — Comparative studies of nitrogen fixation and photosynthesis in *Anabaena cylindrica*. «Amer. Jour. Bot.», 51 (7), 753 (1964).
4. FAY, P. i FOGG, G. E. — Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. III. Growth and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii* Mitra. «Arch. Mikrobiol.», 42, 310 (1962).
5. HARDY, R. W. F., HOLSTEN, R. D., JACKSON, E. K. i BURNS, R. C. — The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation laboratory and field evaluation. «Plant. Physiol.», 43, 1185 (1968).
6. HILL, S. i POSTGATE, J. R. — Failure of putative nitrogen-fixing bacteria to fix nitrogen. «J. Gen. Microbiol.», 58, 277 (1969).

7. NEESS, J. C., DUGDALE, R. C., DUGDALE, V. A. i GOERING, J. J. — *Nitrogen metabolism in lakes. I: Measurement of nitrogen fixation with ^{15}N* . «Limnol. Oceanogr.», 7, 163 (1962).
8. SCHÖLLHORN, R. i BURRIS, R. H. — *Study of intermediates in nitrogen fixation*. «Fed. Proc.», 25, 710 (1966).
9. STEWART, W. D. P., FITZGERALD, G. P. i BURRIS, R. H. — *In situ studies on N_2 — fixation using the acetylene reduction technique*. «Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.», 58, 2071 (1967).
10. SUGAHARA, I. i KAWAI, A. — *Microbiological studies on nitrogen fixation in aquatic environments. V. Modification of acetylene method for the measurement of in situ rate of nitrogen fixation*. «Bull. Jap. Soc. Fis.», 37, 1088 (1971).
11. VALLESPINÓS, F. — *Influència del nitrogen en el medi sobre les formes de creixement de Nostoc*. «Treb. Soc. Cat. Biol.», XXXII, 157 (1973).