

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



FIJACION DE NITROGENO ATMOSFERICO POR
CULTIVO MIXTO DE BACTERIAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

P R E S E N T A

DAVID MUÑOZ GONZALEZ

México, D. F.

6400

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. TEOFILO HERRERA SUAREZ
VOCAL: M.en C. NICOLAS AGUILERA HERRERA
VOCAL: M.en C. ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN
VOCAL: M.en C. JAVIER ANTONIO TABOADA RAMIREZ
SECRETARIO: DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ
SUPLENTE: M.en C. RUBEN GUAJARDO VIERA
SUPLENTE: M.en C. NORMA GARCIA CALDERON

SITIO DONDE SE DESARROLLO EN TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA. UAM-IZTAPALAPA.

SUSTENTANTE:

DAVID MUÑOZ GONZALEZ

ASESOR DEL TEMA:

DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ.

AL RECUERDO MAS BONITO DE MI
INFANCIA Y QUE SIEMPRE VA CON
MIGO: MI PADRE

JESUS MUÑOZ +

AL AMIGO DE SIEMPRE

ROBERTO ORDOÑEZ ARELLANO +

A ESA CHULADA DE MUJER QUE ES
MI MADRE

CELIA GONZALEZ

AL RECUERDO MÀS BONITO DE MI
INFANCIA Y QUE SIEMPRE VA CON
MIGO: MI PADRE

JESUS MUÑOZ +

AL AMIGO DE SIEMPRE

ROBERTO ORDOÑEZ ARELLANO +

A ESA CHULADA DE MUJER QUE ES
MI MADRE

CELIA GONZALEZ

A MARICELA GARZON CHAPA.

MI RECONOCIMIENTO GENERAL PARA
EL DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ.

ESTE TRABAJO FUE PARCIALMENTE
FINANCIADO POR EL CENTRO INTER
NACIONAL DE INVESTIGACION Y DE
SARROLLO (CIID) CANADA.

DURANTE LA REALIZACION DE ESTE --
TRABAJO SE ME OTORGO UNA BECA DEL
CONACYT.

CONTENIDO

	Páginas
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	4
a) Necesidad de nitrógeno fijado para cultivos de granos de cereales y de leguminosas.	
b) Avances en la Biología de la fijación de nitrógeno.	
c) Composición y funcionamiento de la nitrógenasa.	
d) Sensibilidad al oxígeno.	
METODOLOGIA.....	15
a) Medio de cultivo, aislamiento e identificación de un microorganismo fijador de nitrógeno.	
b) Cuantificación de proteína microbiana mediante el método de Lowry.	
c) Medio de cultivo, aislamiento e identificación de un microorganismo productor de ácido láctico.	
d) Cuantificación de ácido láctico producido por fermentación, mediante cromatografía de gases.	

Páginas

e) Cuantificación del nitrógeno total mediante el método de Microkjeldahl.

RESULTADOS.....	26
DISCUSION.....	37
CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	45

INTRODUCCION

Actualmente todo el mundo está enterado sobre el creciente problema del aumento de la población mundial, de la escasez de alimentos o de la insuficiencia proteica en la dieta nutricional. También ya son del conocimiento general los datos sobre la cada vez mayor crisis energética y por lo tanto los costos crecientes para la elaboración de fertilizantes nitrogenados.

Uno de los factores que pueden contribuir a mejorar los rendimientos de las cosechas agrícolas, y por lo tanto el aumento de la producción de alimentos es la fijación biológica del nitrógeno atmosférico.

Se ha estimado que anualmente se fijan cerca de 175 millones de toneladas de nitrógeno mediante procesos biológicos, de los cuales, 90 millones de toneladas son fijados en suelos agrícolas, mientras que industrialmente se fijan cerca de 40 millones de toneladas mediante el proceso reductivo Haber-Bosch (1).

Estas necesidades de nitrógeno progresivamente aumentarán, y así aparecen publicaciones que señalan cifras de cerca de 200 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados que serán necesarios anualmente para finales de éstos últimos 25 años (2). De ahí la importancia cada vez mayor de aumentar la eficiencia de los microorganismos fijadores de nitrógeno,

tanto simbióticos como de vida libre o asimbióticos, los cuales aparte de actuar como fertilizantes biológicos, podrían ser utilizados en la fermentación de sustratos energéticos de bajo costo con el objeto de obtener proteína unicelular, que se pueda utilizar como suplemento alimenticio para el ganado en lugar de las pastas de oleaginosas que comúnmente consumen y las cuales se pueden emplear en su totalidad para la alimentación humana..

Dentro de las principales limitantes de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico, ocupa un lugar importante el daño que sufre la enzima nitrogenasa bajo el efecto de altas concentraciones de oxígeno. Este efecto nocivo está relacionado directamente con los rendimientos de la fijación de nitrógeno; de ahí el interés cada vez mayor de estudiar la manera de abatir la oxidación excesiva de la nitrogenasa en el cultivo de estos microorganismos fijadores de nitrógeno.

El presente trabajo se orientó hacia el estudio del efecto de la fuente de carbono y energía sobre un microorganismo fijador de nitrógeno (Azotobacter chroococcum). Observando la inhibición del efecto del oxígeno sobre dicho microorganismo cuando se suministraron diferentes volúmenes de aireación al medio de fermentación y utilizando como sustrato energético las sales del ácido láctico (litio y calcio),

tanto comercial, como el obtenido mediante la fermentación de la glucosa por Lactobacillus buchneri. Este sustrato fue seleccionado por su capacidad potencial para generar el doble de equivalentes reducidos de las coenzimas derivadas de la ni cotinamida, a comparación de un sustrato muy utilizado como es el manitol, y con la hipótesis que de esta forma se podría contrarrestar mejor el efecto nocivo del exceso de oxígeno. El ácido láctico fue escogido por no ser volátil como el etanol y por poderse producir con facilidad a través de la fermentación de muy diversos azúcares.

ANTECEDENTES

A) NECESIDADES DE NITROGENO FIJADO PARA CULTIVOS DE GRANOS DE CEREALES Y DE LEGUMINOSAS (3).

Los cereales son la mayor fuente de alimento, con una producción mundial cercana a 1300 millones de toneladas al año.

Mientras que la producción en el mundo de granos de leguminosas es cerca de 115 millones de toneladas, siendo la soya caso la mitad de esta producción y seguida por cacahuates, frijoles etc.

Los granos de leguminosas son importantes fuentes de proteínas para el consumo humana en países menos desarrollados y también para consumo animal en los más desarrollados. El contenido de proteínas en las semillas de leguminosas es de un 20 a 45%, a diferencia de los granos de cereal que contienen de un 8 a 20 %.

No obstante esto, la producción de granos de leguminosas es solamente 10 % de la de granos de cereal en el mundo.

Indudablemente, el desarrollo de una tecnología para incrementar la entrada de nitrógeno a estas cosechas será una llave para aumentar los rendimientos, porque las leguminosas requieren hasta 4 veces más nitrógeno por unidad con respecto a los cereales. La capacidad de las leguminosas para fijar biológicamente al menos una parte de sus necesidades de nitrógeno no sería ignorada en la busca de soluciones a incrementar la entrada de nitrógeno, ya que el alto contenido de proteína debida al nitrógeno fijado en contra del no fijado puede ser significativo (4).

B) AVANCES EN LA BIOLOGIA DE LA FIJACION DE NITROGENO *

Desde 1960 se han intensificado los estudios sobre la fijación biológica del nitrógeno; estas investigaciones proporcionaron una variedad de informaciones incluyendo la identificación de nuevos organismos que fijan nitrógeno, descripción morfológica de la infección de la simbiosis Rhizobium-leguminosas; especificada en la interacción Rhizobium-leguminosa; el contenido de la leghemoglobina en su relación directa dentro del nódulo con la actividad de fijar nitrógeno; la alta proporción (cerca de 40:1) de carbohidratos consumidos a la cantidad de nitrógeno fijado por microorganismo de vida libre; la indirecta identificación de amoníaco como el producto de la fijación de nitrógeno; la inhibición de la actividad de fijar nitrógeno por amoníaco e hidrógeno; la co-ocurrencia de nitrogenasa e hidrogenasa; el requerimiento de molibdeno y fierro para la fijación de nitrógeno así como la baja de la constante de Michaelis (km) de la nitrogenasa, por nitrógeno.

Investigaciones posteriores fueron enfocadas a nivel de estudios moleculares, entre ellos la composición química y el comportamiento bioquímico de la enzima nitrogenasa, así como su sensibilidad y formas de protección ante presiones elevadas del oxígeno. Esto se describirá a continuación más detalladamente.

* Tomada de referencia No. (4).

C) COMPOSICION Y FUNCIONAMIENTO DE LA NITROGENASA *

La enzima consiste de dos proteínas, que se denominan: Componente I y Componente II (figura A). El componente I tiene un peso molecular de 220,000 y está formado de 4 subunidades, que son, cada una de ellas, una simple cadena de aminoácidos; además, el Componente I contiene 24 átomos de hierro y 2 átomos de molibdeno. El componente II tiene un peso molecular de 55,000 y consiste de dos subunidades proteínicas que incluyen 4 átomos de hierro. En realidad, se conoce poco acerca de cómo se acomodan estas proteínas y los átomos de los metales para formar la enzima. La estructura completa de la molécula podrá ser conocida a través del análisis de difracción de rayos X. Mientras tanto, métodos menos directos han dado alguna información sobre el ambiente químico de los átomos de los metales. En la nitrogenasa, los dos átomos de molibdeno parece ser que ocupan parte del sitio activo de la enzima. El molibdeno no está unido a las proteínas grandes del Componente I sino a un pequeño cofactor que Vinod K. Shah llegó a purificar en la Universidad de Wisconsin (5). También se sabe ya, que el molibdeno es el único capaz de transferir dos electrones y dos protones, tanto en estados de alta como de baja oxidación y puede que esta sea la función de la nitrogenasa.

* Tomando de referencia No. (5)

Mucho del progreso logrado en los pasados quince años para entender la bioquímica de la fijación de nitrógeno se ha debido a dos técnicas experimentales de importancia poco común. Una de estas técnicas es el análisis de la reducción del acetileno (figura B). En 1965, Robert Schöllhorn y Robert H. Burris, de la Universidad de Wisconsin, y Michael J. Dilworth (5) de la Universidad de Murdoch en Australia, descubrieron que el gas acetileno inhibe la actividad de la nitrogenasa. Posteriormente se demostró que la enzima reduce al acetileno (C_2H_2) a otro gas: el etileno (C_2H_4). La actividad de la nitrogenasa puede por lo tanto medirse, incubando un organismo con acetileno y luego midiendo la producción de etileno por cromatografía de gases. Otros métodos para estimar la fijación del nitrógeno requieren de isótopos pesados como marcadores de nitrógeno.

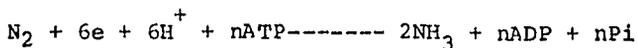
A principios de 1960 se descubrió que extractos libre de células podrían fijar el nitrógeno si se les añadían pequeñas cantidades de ATP junto con un agente reductor como el ditionito de sodio. Con este sistema in vitro, la fijación de nitrógeno se convierte en un proceso de laboratorio que puede ser manipulado y medido con bastante facilidad.

El estado actual respecto a la bioquímica de la nitrogenasa ha sido resumido por William H. Orme-Johnson, de la Universidad de Wisconsin, Leonard E. Mortensen, de la Universidad de Purdue, y Barry E. Smith y sus colegas de la Universidad de Sussex.

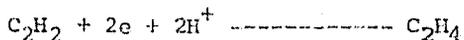
Ellos han mostrado que el primer paso en la secuencia que lleva a la fijación es la reducción del Componente II de la enzima por medio de una proteína externa a la nitrogenasa transportadora de electrones (Ferredoxina). El Componente II reducido reacciona con el ATP y después reduce al Componente I. El componente I reduce al nitrógeno molecular para dar finalmente amoníaco (6).

La misma secuencia de etapas puede ser descrita de otra manera: El componente II acepta primero un electrón de una proteína transportadora, el electrón es entonces transferido al Componente I y finalmente al nitrógeno. No se han descubierto sustancias intermedias entre el nitrógeno y el amoníaco, de tal modo deben permanecer unidos a la nitrogenasa. Hay pruebas que corroboran la suposición intuitiva de que los electrones son transferidos por los átomos de hierro y molibdeno, aunque el mecanismo real de transferencia todavía no es muy claro. Una hipótesis consiste en que uno de los estados intermedios involucrados es una dimida: $NH=NH$. Se supone, que cuando menos un átomo de hidrógeno se une a cada nitrógeno, antes de que el enlace entre los átomos de nitrógeno se disuelve.

Aunque existen diferencias tanto morfológicas como fisiológicas entre los diferentes organismos fijadores de nitrógeno, la reacción enzimática que cataliza la conversión de nitrógeno a amoníaco es similar en todos los casos:



La nitrogenasa también cataliza la reacción de acetileno a etileno:



En la primera ecuación el costo energético es cerca de 24 moléculas de ATP (9 moléculas de ATP por cada 3 pares de electrones usados para la reducción y 15 moléculas de ATP para la reacción de la nitrogenasa).

Un corolario de estos cálculos teóricos es la proporción de 4: 1 de carbohidratos consumidos a la cantidad de nitrógeno fijado, es decir: 250 mg. de nitrógeno por gramo de carbohidrato. Parte del ATP es utilizado en reacciones de competencia, como es la formación de hidrógeno. Se ha establecido que en muchas asociaciones de Rhizobium con leguminosas se desperdicia la mitad de electrones que llega a la nitrogenasa por la formación de hidrógeno, si se pudiera anular el efecto de formación de este gas, se mejoraría la eficiencia de la fijación de nitrógeno (7).

D) SENSIBILIDAD AL OXIGENO *

La nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno y esta limitación puede ser una de las mayores barreras para aumentar la eficiencia de la fijación biológica del nitrógeno. Este efecto de oxidación se manifiesta principalmente en el Componen-

* Tomado de referencia No. (8)

tá II' (ferro-proteína) de la nitrogenasa, ésta cuando es expuesta por muy corto tiempo a altas tensiones de oxígeno, su actividad puede ser eliminada completamente pero bajando la presión del oxígeno a un valor óptimo para la enzima, puede ser restaurada la actividad de ésta (9, 10).

La mayoría de los microorganismos fijadores de nitrógeno se protegen del exceso de oxígeno mediante diversos mecanismos, ejemplo: las algas contienen células especializadas llamadas heterocistos donde se encuentra la nitrogenasa, estos proporcionan un medio más reducido en el cual la reacción del oxígeno proveniente de la fotosíntesis no ocurre (11). En el caso de Azotobacter, un microorganismo aerobio fijador de nitrógeno, actúa un mecanismo más de protección a la nitrogenasa contra las altas presiones de oxígeno y consiste en un fuerte incremento en la utilización del sustrato para remover el exceso de oxígeno presente (protección respiratoria) (9). Esto permite un mayor incremento de la velocidad respiratoria. Como un resultado de este mecanismo, Azotobacter puede consumir considerables cantidades de sustrato (carbohidratos) el cual no es directamente usado para síntesis de material celular o para fijación de nitrógeno, dando como resultado un fuerte decremento en la eficiencia de la fijación de nitrógeno (10,12,13).

La formación de cantidades excesivas de goma extracelular, la cual favorece la formación de grumos, y probablemente

también, el gran tamaño de la célula de muchos Azotobacter, puede ser otro mecanismo que impida la entrada de oxígeno en exceso (13).

En otro estudio reciente sobre la respuesta de Azotobacter chroococcum a los efectos del oxígeno, Buchanan (8) explica la alteración que sufre la nitrogenasa provocados por el exceso de oxígeno de la siguiente forma:

1) Daño estructural a las membranas que rodean a la nitrogenasa.

Tal daño es producido por interacción del oxígeno con los lípidos de la membrana, alterando la integridad de éstas (14).

2) Alteración de los componentes de la nitrogenasa por la interacción con el oxígeno.

La simple reducción de electrones de los componentes de la nitrogenasa de Azotobacter mostró inactividad de la proteína de la enzima (15); O_2^- (oxígeno univalente reducido) actuando como un simple reductor de electrones podría por lo tanto inactivar a la nitrogenasa. La nitrogenasa contiene numerosos componentes azufrados asociados a grupos de metales a través de los cuales ocurre la reducción (16). Durante la catálisis de la nitrogenasa, alguna alteración en esos grupos, particularmente si no va acompañada por algo que contribuya a un cambio conformacional, podría producir inactivación la cual adquiere significancia en vista de la interacción de los grupos de azufre con O_2^- (17,18).

3) Interferencia del flujo de electrones a los componentes de la nitrogenasa.

El flujo adecuado de electrones a los componentes de la nitrogenasa está controlado por su actividad metabólica. Una extraña preponderancia de especies químicas cargadas en el sitio de esos componentes, podría desorganizar seriamente este necesario flujo de electrones. Debe de notarse que el O_2^- es una especie cargada (19).

En la simbiosis del Rhizobium con las leguminosas, existe una barrera más sofisticada hacia el oxígeno, el cual es atrapado antes de que llegue a la bacteria por medio de una proteína conocida como Leg-hemoglobina; ésta es la única forma de hemoglobina encontrada en el reino vegetal, la planta contiene la información genética para la globina mientras que el microbio hace la porción heme (20). Esta proteína tiene la gran capacidad de fijar el oxígeno fuertemente y de cederlo cuando el metabolismo lo requiera. Como resultado, la bacteria adopta un metabolismo aerobio eficiente y al mismo tiempo protege a la nitrogenasa del oxígeno.

4) El efecto del sustrato hidrocarbonado sobre la eficiencia de la fijación de nitrógeno.

Diversos autores (26,27) han estudiado el efecto de diversas fuentes de carbono tales como: azúcar, sales de sodio de ácidos grasos y sus correspondientes alcoholes (cuadro A), sobre los

parámetros que influyen en la eficiencia de la fijación de nitrógeno por microorganismo del género Azotobacter. En el capítulo correspondiente a la discusión de este trabajo se comenta más ampliamente el efecto del sustrato sobre la fijación de nitrógeno atmosférico.

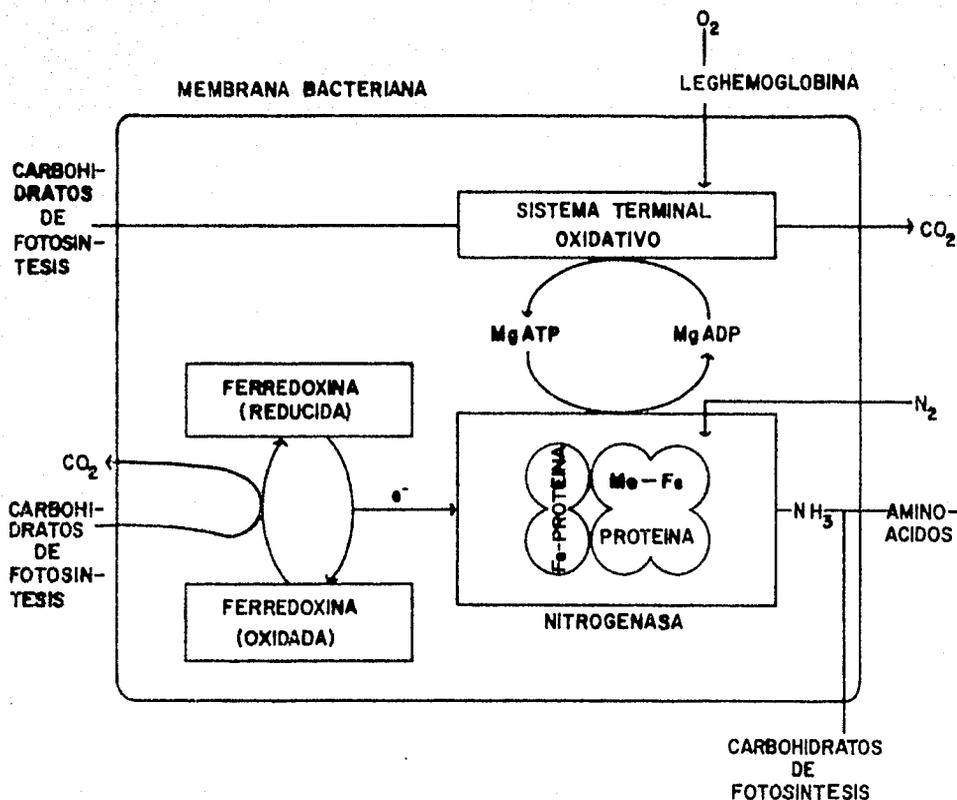


Fig. A La bioquímica de la fijación de nitrógeno involucra la transferencia de átomos de hidrógeno proveniente de moléculas orgánicas como la glucosa la cual dona los electrones y por lo tanto se oxida. El nitrógeno que es el receptor se reduce (20).

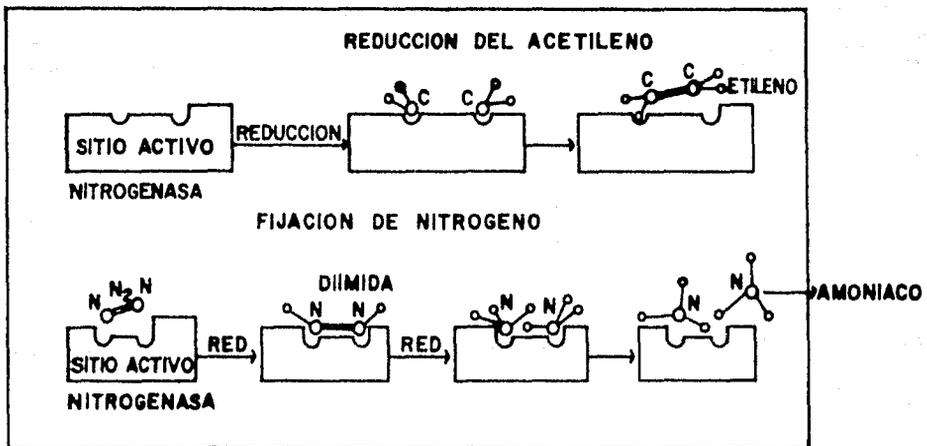


Fig. B Secuencia hipotética de etapas en la fijación del nitrógeno. En parte, la secuencia está basada en el mecanismo de análisis en la reducción del acetileno también hipotético. - Poco se sabe sobre el sitio activo de la nitrogenasa, - tampoco se ha detectado ni las diimidias ni otros intermedios (5).

Cuadro A Eficiencia de la fijación de nitrógeno por A. chroococum, cepa A10, cultivadas con sales de sodio de ácidos grasos y los correspondientes alcoholes^(a).

Compuesto de Carbono ^(b)	Eficiencia de la fijación de Nitrógeno (mg N/g de substrato)
Estanol	15.9
Propanol	2.3
Butanol	4.2
Acetato de sodio	11.0
Propinato de sodio	12.4
Butirato de sodio	12.5
Glucosa	10.2
(a) Valores promedios de 3 replicaciones	(b) Concentración final 10^{-2} M

METODOLOGIA

Aislamiento del microorganismo

Se aisló del suelo un microorganismo fijador de nitrógeno atmosférico en un medio de cultivo de la siguiente composición (21):

Manitol	-----	10 gr
K ₂ HPO ₄	-----	5 "
MgSO ₄	-----	2.5 "
NaCl	-----	2.5 "
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-----	0.03 "
MnSO ₄	-----	0.5 "
CaCl ₂	-----	0.5 "
Oligoelementos	-----	0.1ml
Agar	-----	20. gr
Agua dest	-----	1000 ml
pH de 7		

Se esterilizó durante 15 min a 121 grados centígrados y 15 libras de presión.

La solución de oligoelementos tuvo la siguiente composición:

Molibdato de potasio	-----	0.05 gr
Borato de sodio	-----	0.05 "
Sulfato de cadmio	-----	0.05 "
Sulfato de cobre	-----	0.05 "

Sulfato de zinc -----0.05 "

Sulfato de magnesio-----0.05 "

Solución concentrada de percloruro de hierro -----una
gota

Agua destilada ----- 1000 ml.

De acuerdo a sus características morfológicas y tintoriales, el microorganismo fue identificado como Azotobacter chroococcum, Beijerinck 1901, ratificando lo anterior mediante pruebas bioquímicas como son la fermentación de almidón y manitol así como la aparición de pigmento en el medio de cultivo (22).

A) Crecimiento de Azotobacter en medios sólidos con diferentes fuentes de carbono

En medio de cultivo solido similar a (1) pero utilizando diferentes fuentes de carbono como son : almidón, acetato de sodio, benzoato de sodio, celobiosa, dextrosa, lactato de litio, manitol, piruvato sodio, propionato de sodio y sacarosa, fue sembrado Azotobacter mediante el método de estría e incubando a 30 grados centígrados, con observaciones del crecimiento cada 12 horas.

B) Cuantificación de proteína microbiana

En un experimento de II día de duración, se cuantifico

la producción de proteína de Azotobacter mediante el método de Lowry en tres medios de cultivo líquidos, sin fuente nitrogenada con una agitación de 250 rpm en un agitador mecánico (Giratory Shaker Model G2), los cuales contenían como fuente de carbono: acetato de sodio, dextrosa y lactato de litio. Todos a una concentración de 1% y una temperatura de 30 °C y un pH de 6.9 a 7.

La cuantificación de proteína se llevó a cabo de la siguiente manera: se tomaron 10 ml de medio de fermentación y se precipitó la proteína mediante la adición de 5 ml de ácido tricloroacético al 5%, se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm, el sedimento se disolvió en 0.5 ml de hidróxido de sodio 1N y se llevó a 1 ml con agua. Se adicionaron 5 ml de una sol. D preparada de la siguiente manera:

Sol. A.- 20 gr de Na_2CO_3

4 gr de NaOH

Agua c.b.p. 1000 ml

Sol. B.- Tartrato de sodio y potasio al 2%

Sol. C.- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%

Sol. D.- Sol. A ----- 100 ml

Sol. B ----- 1 ml

Sol. C ----- 1 ml

Una vez adicionados los 5 ml de la sol. D, se agitó y se dejó en reposo durante 10 min. Luego se adicionaron 0.5 ml del

reactivo de Folin-Fenol-Ciocalteu diluido 1 : 3, se agitó y se dejó en reposo durante 30 min para el desarrollo del color y después se leyó a 625 nanómetros en un colorímetro (Bausch & Lomb - Spectronic 20). Se desarrolló una curva standard utilizando Albúmina Sérica Bovina (BSA, Sigma) (23).

C) Crecimiento con distintos niveles de lactato

Se optimizó la cantidad de lactato para producir la mayor cantidad de proteína de Azotobacter; para esto, se midió la proteína producida durante 16 días en matraces de 250 ml y conteniendo 0, 1, 2, 3 y 4 % de lactato de litio como fuente de carbono y el resto de componentes utilizados en el medio (I), además de 0.5% de CaCO_3 . Las condiciones del experimento fueron: pH de 7, temperatura de 30 °C y agitación de 250 rpm. La proteína igualmente se cuantificó por el método de Lowry.

D) Cultivos con aireación forzada

En esta siguiente etapa se procedió a estudiar el efecto de aireación sobre el cultivo de Azotobacter chroococcum. En un manifermentador (Brunswick Scientific; New Brunswick N.J., USA) con 600 ml de medio de cultivo líquido, se aplicaron diferentes volúmenes de aereación que fueron desde: 0, 0.4, 0.8 y 1.6 VVM (gasto de aire/volumen de fermentación). El fermentador (Fig C) fue agitado con una barra magnética aprox. a 250 rpm. y utilizando 2 medios de cultivos similares a (I) pero siendo la fuente

te de carbono y energía en uno dextrosa, y en el otro lactato de litio. La duración del experimento fue de 48 hrs, las demás condiciones fueron igual al experimento anterior. También se cuantificó la producción de proteína mediante el método colorimétrico de Lowry.

E) Aislamiento de una bacteria láctica.

Posteriormente, se procedió a producir ácido láctico por fermentación y para esto; se aisló del estiercol de bovino un microorganismo productor de ácido láctico utilizando el medio de Rogosa (24) y cuya composición es la siguiente:

Peptona-----	10 gr	Medio (II)
Extracto de carne-----	10 "	
Extracto de levadura-----	5 "	
Glucosa-----	20 "	
KH_2PO_4 -----	2 "	
Acetato de sodio-----	5 "	
Tricitrato de amonio-----	2 "	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	0.2"	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -----	0.2"	
Tween 80-----	1 ml	
Agar-----	15 gr	
Agua-----	1000 ml	

pH de 6, esterilizado en autoclave durante 15 min a 15 li

bras de presión y 121 °C.

Igual que en el caso de Azotobacter, este microorganismo fue identificado mediante sus características morfológicas y tintoriales así como por pruebas bioquímicas, esto es, la fermentación de carbohidratos, tales como arabinosa, fructosa, glucosa, gluconato, maltosa, melezitosa y rhamnosa. Resultó ser un microorganismo heteroláctico conocido como Lactobacillus buchneri Henenberg, 1903, (22).

F) Fermentación láctica de la glucosa

En seguida se procedió a cuantificar la cantidad de ácido láctico producido en el medio de fermentación utilizando 3 diferentes relaciones C/N (12.5, 25 y 50), utilizando dos fuentes nitrogenadas diferentes; nitrógeno inorgánico proveniente de sulfato de amonio y nitrógeno orgánico proveniente de caseína. Este experimento se llevó a cabo durante 72 hrs. en matraces agitados de 250 ml, con un pH de 6, una temperatura de 32 °C. El ácido láctico producido se cuantificó mediante un cromatógrafo de gases (Analytical Gas Chromatograph Mod 3II. Metodología de Basic Gas Chromatography, Varian Aerograph, by Mc Nair and E.J. Bonelli Varian Instrument Division Offices).

G) Desarrollo de cultivos mixtos de Azotobacter chroococum y Lactobacillus buchneri

Debido a los resultados del experimento anterior (ver re

sultados y discusión en las páginas 26 y 37 respectivamente) un nuevo experimento se realizó de la siguiente manera: en matraces de 250 ml conteniendo medio de cultivo con una relación C/N de 50, se inocularon con los dos microorganismos (Azotobacter y Lactobacillus) así como también por separado. Se hicieron observaciones microscópicas y se cuantificó la proteína mediante el método colorimétrico de Lowry. La duración de estas fermentaciones fué de 5 días llevándose a cabo por duplicado, en condiciones de agitación a 250 rpm, pH de 6.5, temperatura de 30 °C.

H) Eficiencia de la fijación nitrogenada en cultivos puros o mixtos

En la siguiente serie de experimentos se midió la cantidad de nitrógeno fijado por gramo de fuente carbonada consumida y se efectuaron de la siguiente manera: en matraces de 250 ml de volumen y utilizando medios de cultivo con una relación C/N de 50, ajustados a un pH de 7, temperatura ambiente y agitación de 250 rpm. Fueron inoculados con Azotobacter chroococcum y durante 7 días se midió la cantidad de nitrógeno total del medio de fermentación.

En otro experimento similar al anterior, pero introduciendo al medio de fermentación 800 ml de aire estéril también se midió el nitrógeno total mediante el método de Microkjeldahl, y para esto; a 5 ml del medio de fermentación se colocan en un matraz Microkjeldahl de 30 ml y se adicionaron 2 ml de ácido sulfú

rico concentrado así como 0.3 gr de mezcla catalizadora (sulfato de potasio 20 gr, sulfato de cobre 2 gr y óxido de selenio 0.5 gr) y perlas de vidrio para controlar la ebullición. Se colocan los matraces en la parrilla de digestión del aparato y se digie re hasta que la solución sea totalmente transparente. Después de esto se procede a la destilación; la solución sulfúrica se enfría con 10 ml de agua destilada fría, agregando ésta por las paredes del matraz, se deja enfriar nuevamente y se añaden de 3 a 5 gotas de fenolftaleína (1% en alcohol), se agregan cuidadosamente por estratificación 10 ml de hidróxido de sodio al 50% (es importante que la sosa y el matraz estén fríos, la cantidad de sosa debe ser suficiente para neutralizar el sulfúrico y quedar un exceso el cual detecte la fenolftaleína). Se conecta el sistema de destilación inmediatamente, el refrigerante posee una alargadera la cual va introducida a un matraz que contiene ácido clorhídrico 0.1N adicionado de 5 gotas de indicador rojo de metilo al 1%. Se destila un volumen de 30 ml aproximadamente. Se titula el exceso de HCl con solución valorada de NaOH 0.1N hasta el vire del indi cador. El N_t se calcula por la siguiente fórmula: (ref. 25).

$$\% N_t = \frac{(A-B) \times 0.014 \times 100}{\text{ml. de muestra}}$$

donde:

A = (N x V) del HCl

B = (N x V) del NaOH

N = Normalidad (m-moles/ml)

V = Volumen (ml)

0.014 = meq. del nitrógeno

100 = %

En este penúltimo experimento se corrió una fermentación láctica durante 3 días, posteriormente se centrifugaron las células de L.buchneri y en el sobrenadante donde quedó el ácido láctico producido, se neutralizó y se adicionó inóculo de Azoto bacter a la vez que se introducía 800 ml/min de aire estéril. Las condiciones de este experimento fueron las mismas que en los anteriores; la duración fue de 4 días y en todos los casos se determinó el N_t existente en el medio de fermentación.

Finalmente, se llevó a cabo otra fermentación de glucosa con inóculo de L.buchneri durante 3 días, se neutralizó el medio de fermentación y se adicionó inóculo de A.chroococcum y 800 ml de aire estéril/min. La fermentación continuó durante otros 4 días y se hicieron determinaciones de nitrógeno total para medir la eficiencia de la fijación de nitrógeno.

En este penúltimo experimento se corrió una fermentación láctica durante 3 días, posteriormente se centrifugaron las células de L.buchneri y en el sobrenadante donde quedó el ácido láctico producido, se neutralizó y se adicionó inóculo de Azotobacter a la vez que se introducía 800 ml/min de aire estéril. Las condiciones de este experimento fueron las mismas que en los anteriores, la duración fue de 4 días en todos los casos se determinó el N_t existente en el medio de fermentación.

Finalmente, se llevó a cabo otra fermentación de glucosa con inóculo de L.buchneri durante 3 días, se neutralizó el medio de fermentación y se adicionó inóculo de A.chroococcum y 800 ml de aire estéril/min. La fermentación continuó durante otros 4 días y se hicieron determinaciones de nitrógeno total para medir la eficiencia de la fijación de nitrógeno,

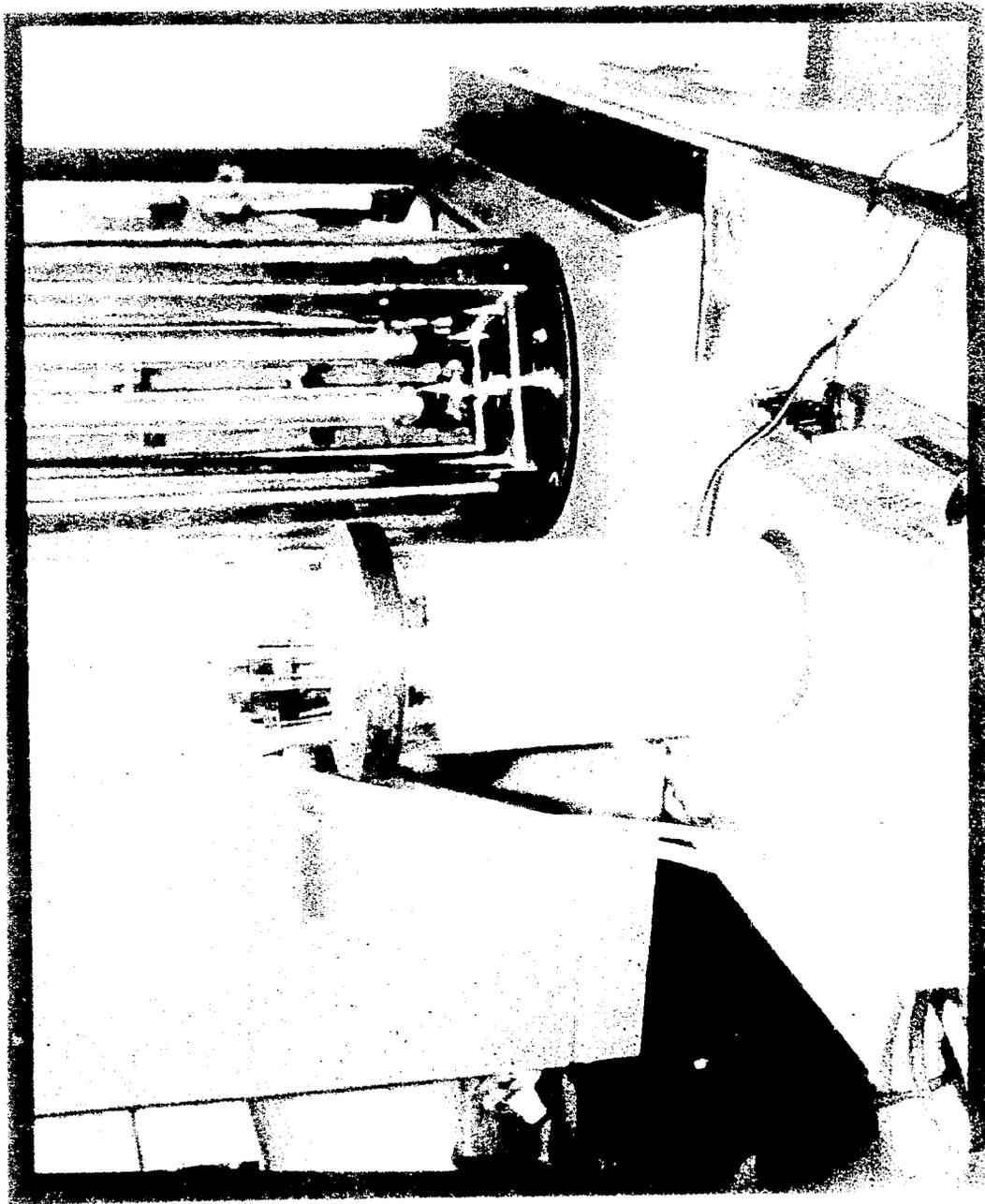


FIGURA C. Minifermentador empleado para el crecimiento de A.chroococcum en cultivos aireados, temperatura controlada a 30°C y pH de 6.8.

RESULTADOS

A) Crecimiento en medio sólido de A. chroococcum con distintos sustratos.

De las 10 fuentes de carbono utilizadas (cuadro No. 1), y en un tiempo inicial de 12 hrs. se observó gruesamente un mayor desarrollo de colonias en el medio que contuvo lactato de litio. En comparación de los restantes donde el crecimiento fue menor, e incluso no se observó crecimiento en los medios de cultivo cuya fuente carbonada fue benzoato y propionato de sodio.

B) Crecimiento en medio líquido con acetato de sodio, glucosa o lactato de litio.

En los 3 medios de cultivo líquido hechos con base en una solución de sales inorgánicas (excepto de nitrógeno) y cuya fuente carbonada fue: acetato de sodio, glucosa y lactato de litio todos al 1%. La síntesis de proteína al final del experimento fue de 3.8, 5.6 y 26 mg/lt respectivamente.

El cuadro No. 2 muestra claramente las diferencias significativas en la biosíntesis de la proteína de A. chroococcum durante el transcurso de este experimento cuando el sustrato es el lactato de litio. Sin embargo, con acetato de sodio o con glucosa los resultados decrecieron notablemente. Este efecto del sustrato se observa de una forma más objetiva en la figura No. 1 donde se graficaron los valores anteriores; ahí se aprecia

desde las primeras 24 hrs. de iniciado el experimento, el mayor efecto que tiene el lactato de litio sobre el crecimiento de este microorganismo fijador de nitrógeno.

C) Efecto de la concentración de lactato de litio sobre el crecimiento de *A. chroococcum*

En este experimento se estudio el efecto de la concentración de la fuente carbonada (lactato de litio). Se obtuvieron los siguientes resultados de proteína precipitada de *A. chroococcum*: 27.6 mg/lt cuando el medio de cultivo contuvo un 3% de lactato de litio, 26.4 mg/lt cuando se adicionó un 2% de lactato de litio al medio de cultivo líquido y disminuyendo notablemente cuando hubo en el medio de cultivo un 4% de lactato de litio. El cuadro No 3 nos muestra los valores obtenidos en este experimento y son graficados en la figura No 2, donde se observa un mayor crecimiento con un 3% de lactato de litio, aunque no se apreció una diferencia notable con respecto a un 2% y de este a un 1%. Sin embargo, con un 4%, la curva de crecimiento de *A. chroococcum* baja a partir del cuarto día. En la figura No 2 se observa el efecto de inhibición causada por el exceso de dicho sustrato.

D) Efecto de la aireación forzada sobre *A. chroococcum* crecido con lactato de litio o glucosa

Por medio de la aireación se obtuvo una acentuada activación en el medio de cultivo que tuvo un 2% de lactato de litio y

0.8 VVM (lt de aire/lt de medio x min), obteniendo en tan sólo 72 hrs. 38.2 mg/lt de proteína, En contraste con el medio de cultivo que tuvo glucosa al 2% donde se pudo observar una inhibición en la síntesis de proteína ya que sólo se obtiene 2.0 mg/lt como se muestra en el cuadro No 4. Es decir que con glucosa, el microorganismo no tolera altos niveles de aireación. A diferencia con el lactato donde aún aplicando 1.6 VVM de aire hubo un lento crecimiento. Estas diferencias entre el lactato y la glucosa se observan claramente en la figura No 3, en donde el lactato demostró ser una molécula con una mejor capacidad para amortiguar mayores cantidades de oxígeno.

E) Efecto de la relación C/N sobre la producción de ácido láctico por *L.buchneri*

El cuadro No 5 muestra las cantidades obtenidas de ácido láctico mediante la fermentación de la glucosa por *Lactobacillus buchneri* y utilizando relaciones C/N que van desde 12.5, 25 y 50. Obteniendo los mayores resultados con una relación C/N de 12.5, donde se obtuvo hasta 1.5% de ácido láctico, aunque no hubo demasiada diferencia con una relación C/N de 25, obteniendo hasta 1.45% cuando la fuente nitrogenada fue inorgánica en su totalidad, al igual que en la relación C/N de 50 donde se obtuvo 1.4% de ácido láctico. Esta última relación C/N de 50 fue la que se escogió para nuestros propósitos y el porqué de esto se comenta más ampliamente en el capítulo de discusiones.

F) Crecimiento mixto de L.buchneri y A.chroococcum.

En este experimento en el cual se llevó a cabo una fermentación mixta con inóculo de A.chroococcum y L.buchneri, se observó mediante el microscopio la persistencia de los dos microorganismos durante las primeras 18 hrs. Sin embargo, después sólo se observó la presencia del microorganismo fijador de nitrógeno. La mezcla de los dos microorganismos resultó ser la más eficiente en la síntesis de proteína microbiana, como se puede ver en el cuadro No 6, en donde al cabo del quinto día se obtuvieron 860 mg de proteína por litro de medio de cultivo mediante inoculación mixta y utilizando una relación C/N de 50. A diferencia de los otros dos monocultivos puros de los cuales se obtuvieron 720 mg/lit de proteína del microorganismo fijador de nitrógeno contra 330 mg/lit de proteína del microorganismo heteroláctico.

G) Eficiencia de la fijación de nitrógeno por A.chroococcum cuando el sustrato fue la glucosa

En dos experimentos con y sin aireación, se estudió la eficiencia de la fijación de nitrógeno por A.chroococcum por cada gramo de glucosa consumido. El cuadro No 7 muestra como valor máximo obtenido 3.5 mg de nitrógeno total/gr de azúcar durante 5 días. Cuando se adicionaron al medio de cultivo 800 ml de aire estéril y al cabo de 4 días se obtuvieron 5.75 mg de N_t / gr de azúcar consumido (cuadro No 8). Estos resultados obtenidos son inferiores a los que se obtienen usando ácido láctico como fuente de energía

como se observará en el siguiente experimento.

H) Eficiencia de la fijación de nitrógeno mediante cultivo mixto de *A.chroococcum* y *L.buchneri*

Los resultados de esta serie de experimentos mostraron el efecto positivo del ácido láctico producido por fermentación de la glucosa, como fuente energética para *A.chroococcum*. El cuadro No 9 nos muestra los mg de N_t por gramo de fuente carbonada, obtenidos mediante la fijación de nitrógeno por *Azotobacter* cuando este microorganismo se adicionó al medio de cultivo al igual que 800 ml/lt-min de aire estéril. El medio de cultivo tuvo ácido láctico producido por *L.buchneri* cuando fermentó a la glucosa, pero separando las células de este microorganismo por centrifugación, se pudo observar que en sólo cuatro días se obtuvieron rendimientos de 14 mg de N_t /gr de azúcar,

La fermentación mixta de *L.buchneri* y *A.chroococcum* resultó ser la más eficiente, ya que produjo 16 mg de nitrógeno total por gramo de azúcar en sólo 4 días, como se observa en el cuadro No 10. Este experimento aparte de ser el más efectivo en cuanto a rendimientos se refiere, también resultó ser el más simple ya que aquí no hay separación de las cepas microbianas, pues, primero se corre una fermentación láctica y después se adiciona el inóculo del fijador de nitrógeno así como aire estéril, permaneciendo ambos microorganismos en el medio de fermentación.

Cuadro N°1.

Diversas Fuentes de Carbono Probadas en el crecimiento de
Azotobacter chroococcum.

1.- Dextrosa.

2.- Manitol.

3.- Almidón.

4.- Celobiosa.

5.- Sacarosa.

6.- Piruvato de sodio.

7.- Acetato de sodio.

8.- Lactato de litio.

9.- Propionato de sodio.

10.- Benzoato de sodio.

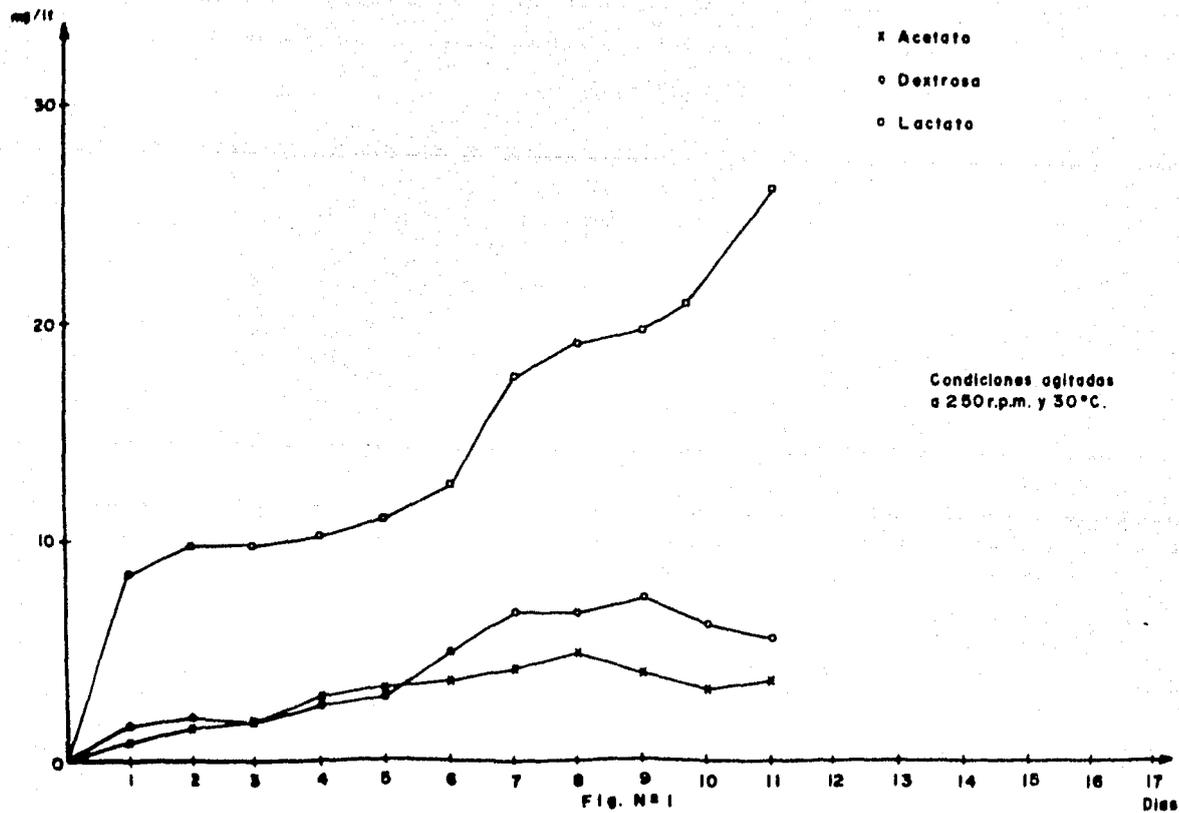
Cuadro N° 2

(1)
 Cuantificación de la proteína de A. chroococcum en 3 medios de cultivo
 (2)
 agitados y con diferentes fuentes de carbono.

Días	Acetato de sodio 1%	Dextrosa 1%	Lactato de litio 1%
	mg. de proteína / lt. de medio de cultivo		
0	0.5	0.1	0.5
1	1.0	1.75	6.6
2	1.75	2.0	9.85
3	2.0	2.0	9.85
4	2.0	3.8	10.2
5	3.4	3.0	11.0
6	3.8	5.0	12.6
7	4.3	6.8	17.6
8	5.0	6.8	19.0
9	4.0	7.4	19.6
10	3.4	6.2	20.8
11	3.8	5.6	26.0

(1) Método de Lowry

(2) 250 r.p.m.



* Curvas de producción de proteínas por Azotobacter chroococcum con tres diferentes fuentes de carbono

Cuadro N° 3

Producción de proteína por A. chroococcum en el medio de cultivo variando la concentración del sustrato.

Lactato %	Días								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
0	3.0	3.0	3.0	1.8	1.8	2.0	1.8	2.0	1.8
1	3.0	7.4	9.7	12.0	16.4	19.0	21.6	23.7	25.8
2	4.3	8.0	10.0	12.6	15.8	19.6	22.2	24.2	26.4
3	5.0	13.2	16.4	17.6	21.5	22.2	24.8	26.7	27.6
4	5.0	17.6	18.4	18.4	17.6	17.0	18.4	17.0	17.6

Método de Lowry
 Agitación a 280 r.p.m.
 Temp. de 30 °C

mg. de proteína / lit de medio de cultivo

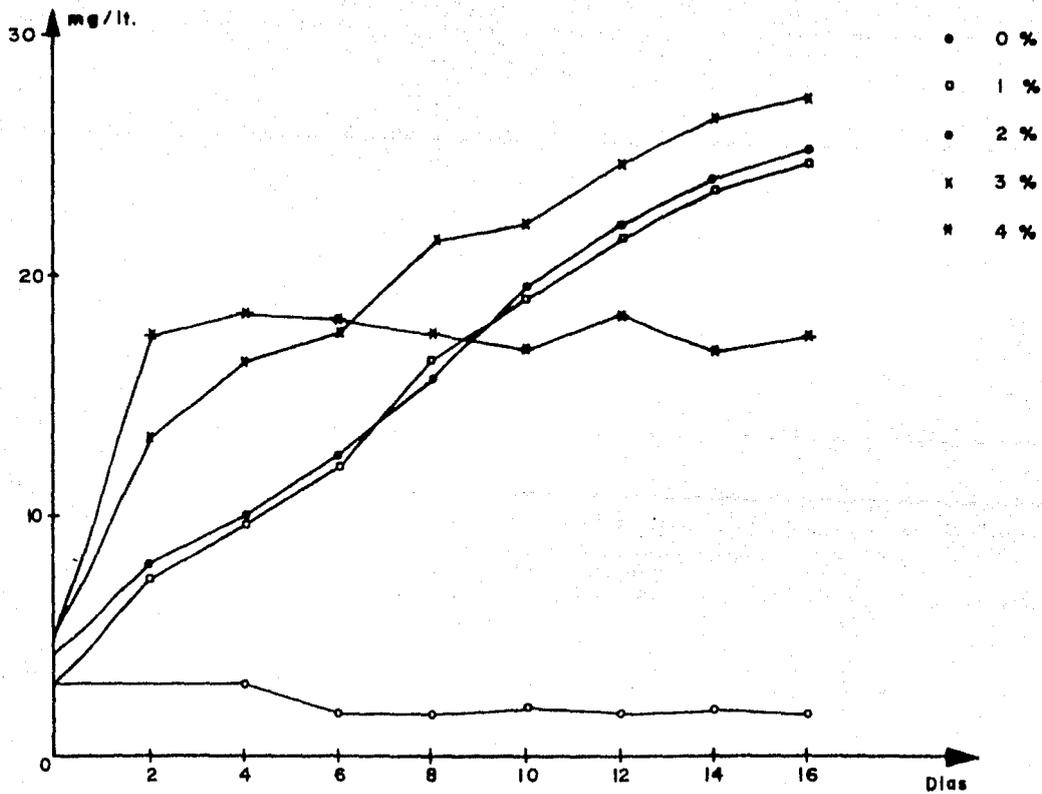


Fig. N° 2
 "Curvas de medición de la proteína Azotobacter chroococcum crecido en diferentes concentraciones de Lactato."

Cuadro N° 4

Efecto de los diferentes volúmenes de aeración sobre el crecimiento de A. chroococcum con dos fuentes de carbono diferentes.

Horas	VVM*							
	0.0		0.4		0.8		1.6	
	Lactato 2%	Dextrosa 2%	Lac.	Dex.	Lac.	Dex.	Lac.	Dex.
0	4.3	3.0	5.0	3.0	5.0	2.8	5.0	
24	6.2	3.6	6.8	2.6	25.4	2.6	8.1	
48	6.2	4.3	7.5	2.6	30.4	2.0	5.0	
72					38.2		4.4	

mg. de proteína / lt. de medio de cultivo

* Gasto de aire

volumen de fermentación

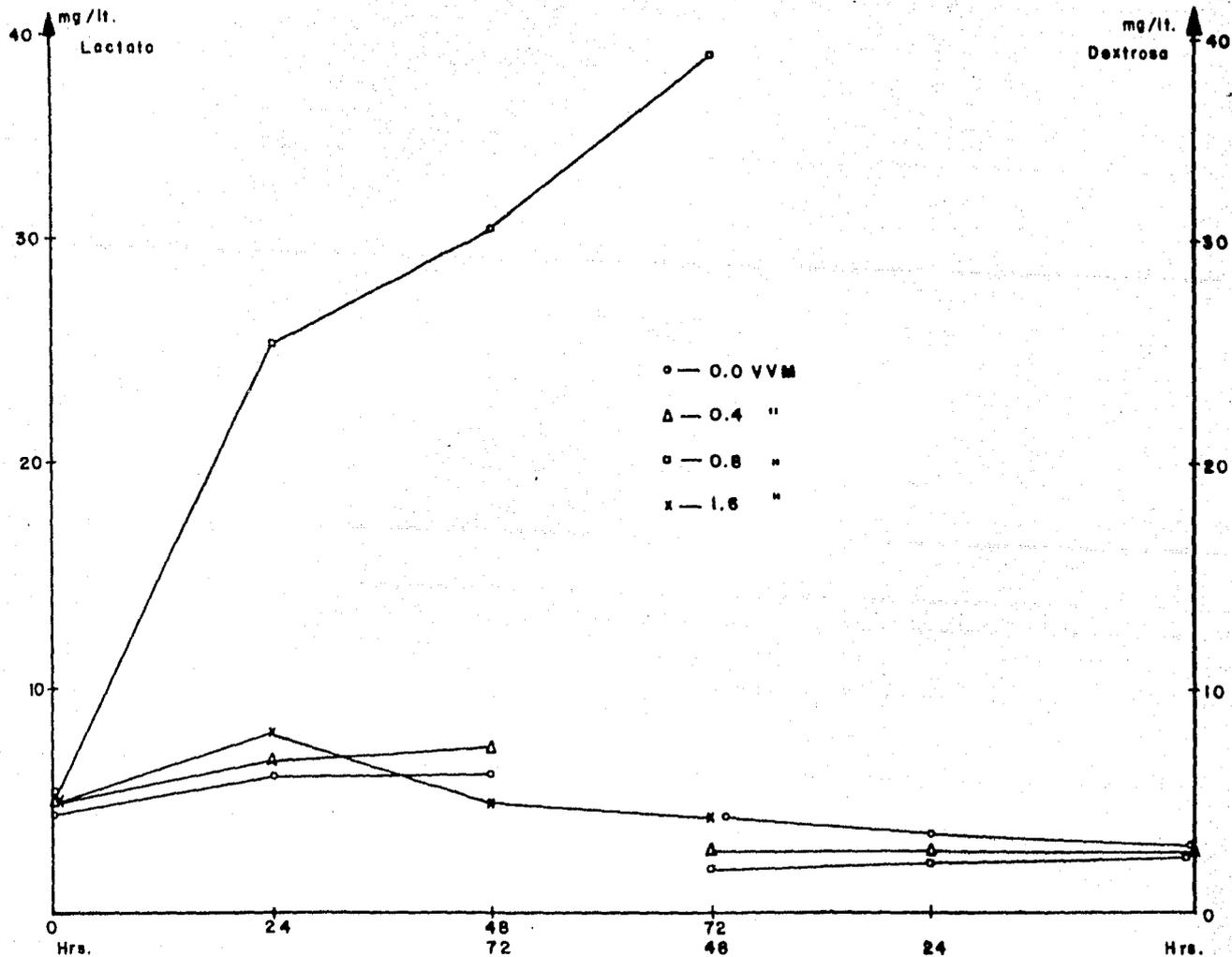


Fig. Nº 3

"Inhibición del efecto de aereación mediante el sustrato en la producción de la proteína de A. chroococcum."

C U A D R O No 5

Efecto de la relación C/N y la proporción de nitrógeno proteico y no proteico sobre la fermentación láctica de una solución glucosada al 2%.

C/N	% N _p	% Ni	Lactato (g/100 ml) (72 hrs)
12.5	0	100	1.5
	50	50	1.35
	100	0	1.50
25	0	100	1.45
	50	50	1.42
	100	0	1.06
50	0	100	1.40
	50	50	0.40
	100	0	0.35

N_p = Nitrógeno de caseína

Ni = Nitrógeno de Sulfato de amonio

C U A D R O No 6

Biosíntesis de proteína de un cultivo mixto de A. chroococum y L. buchneri crecido en un medio de cultivo con una relación C/N de 50.
*

Inóculo	0	3	5
	(días)		
	mg de proteína/lt de medio		
Lactobacilo (a)	3.6	420	330
Azotobacter (b)	3.4	730	720
(a) + (b)	3.0	700	860

* Glucosa al 2% y Sulfato de amonio al 0.075%

C U A D R O No 7

Incremento del nitrógeno total (mg) por gramo de glucosa consumida en el medio de cultivo * utilizando A. chroococcum.

	dias			
	0	2	5	7
<u>A. chroococcum</u>	0	2	3.5	3

* 250 r.p.m.

Temp. ambiente

pH de 6.9

N_t fue cuantificado por Microkjeldahl

C U A D R O No 8

Incremento del nitrógeno total (mg) por gramo de glucosa consumida en medio de cultivo aireado*.

	dias			
	0	2	4	7
<u>A. chroococcum</u>	0	4	5.75	6

* 800 ml de aire/min/lt

250 r.p.m.

Temp ambiente

pH de 6.9

C U A D R O No 9

Incremento del N_t^* (mg) de Azotobacter chroococcum crecido en medio de cultivo conteniendo ácido láctico producido por fermentación ** .

	dias		
	0	2	4
<u>A. chroococcum</u>	0	5.5	14

* mg de nitrógeno/gr de glucosa

** Las condiciones de la fermentación fueron:

fermentación láctica de la glucosa durante 3 días, separación de las células de L. buchneri y al sobrenadante se le adicionó inóculo de Azotobacter a la vez que 800 ml de aire/min/lt. Temp ambiente y pH de 6.9.

C U A D R O No 10

**

Incremento del N_t^* (mg) en la fermentación mixta entre
A.chroococcum (a) y Lactobacillus buchneri (b).

	dias		
	0	2	4
(a) + (b)	0	5	16

* mg de nitrógeno/gr de fuente carbonada consumida

** Primeramente se llevó a cabo una fermentación láctica durante 3 días, luego se adicionó inóculo de A.chroococum y 800 ml/min de aire estéril. Corriendo por 4 días más la fermentación.

DISCUSION

La elección de una adecuada fuente de carbono y energía así como su asimilación por Azotobacter sp, es de vital importancia en la eficiencia de la fijación de nitrógeno.

Brotonegoro (26), indicó que ya en 1935 Winogradsky señaló que el uso de glucosa o manitol como nutrimentos para Azotobacter sp no son apropiados desde un punto de vista ecológico, a pesar de que en su hábitat natural estos organismos pueden estar en contacto con glucosa o manitol esto se debe a que derivan su energía de la descomposición de productos obtenidos por fermentación de glucosa (u otros azúcares), como son: etanol, ácido acético, propanol, butanol, ácido butírico, etc.

Mulder y Brotonegoro en 1974 (27), demostraron el efecto de diferentes fuentes de carbono (acetato de calcio, propionato de calcio, butirato de calcio y glucosa) sobre el crecimiento de A.chroococcum, obteniendo los mayores resultados de nitrógeno fijado cuando la fuente carbonada fue el butirato de calcio, atribuyendo esto a la mayor capacidad reductora de este compuesto (un mayor equivalente de "electrones aprovechables") o a la producción de más ATP por unidad de peso de sustrato.

En este trabajo se confirma la utilidad de una fuente carbonada reducida (lactato) en el crecimiento de A.chroococ---

ccum; tal y como se indica en el cuadro No. 2 y en la Figura No. 1 donde la producción de la proteína unicelular de Azotobacter en cultivos agitados es muy superior cuando la fuente energética es el lactado de litio, en comparación de cuando se utiliza glucosa o acetato de sodio.

El cuadro No. 3 y la Figura No. 2 no muestran importantes diferencias en la cantidad de proteína producida sobre todo cuando existe 2 y 3% de lactato en el medio de cultivo, sin embargo, con un 4% mostró efecto inhibitorio por exceso de sustrato.

El oxígeno produce un marcado y complicado efecto en el crecimiento de Azotobacter ya que altas tensiones de este gas inhiben la capacidad de fijar nitrógeno por esta bacteria. Por lo tanto, no es sorprendente encontrar muchos resultados contradictorios y diferentes explicaciones encontradas en la literatura (26).

Cuando en el medio de cultivo se encuentran altas concentraciones de oxígeno, la actividad de la nitrogenasa decrece; posiblemente como un resultado de la competencia entre el oxígeno y la nitrogenasa con la participación de coenzimas reductoras (NADPH_2 o NADH_2). Con altos niveles de oxígeno la velocidad de respiración celular se incrementa (Azotobacter tiene una excepcional alta velocidad de respiración, o sea, un

Q_{O_2} de 4000 a 5000 microlitros de oxígeno por mg de células secas por hora. Según: Williams y Wilson, 1954 ref No. 28). Con este incremento respiratorio también se incrementa la oxidación del sustrato celular, protegiendo en parte a la nitrogenasa del daño que le causaría el exceso de oxígeno (Protección respiratoria) (29).

El sustrato aquí utilizado (lactato) tiene más capacidad porcentual para generar $NADH_2$ que otros sustratos como la glucosa o el acetato, y por lo tanto, tolera altas presiones del mismo en el medio de cultivo, a diferencia de la glucosa, la cual fue suministrada en la misma concentración que el lactato como se observa claramente en el cuadro No. 4 y en la figura No. 3, donde la producción de proteína de A. chroococcum es superior cuando se suministraron al medio de cultivo, 800 ml de aire/min; estando presente el lactato como fuente de carbono, sin embargo, cuando glucosa fue la fuente energética, los resultados fueron inferiores.

Lo anterior se ratificó en los experimentos de medición del nitrógeno total fijado por cada gramo de fuente carbonada consumida (cuadro No. 7 y 8 vs el No. 9), donde incluso ya se utilizó el sobrenadante que contenía lactato producido por la fermentación de la glucosa mediante L. buchneri.

Un alto valor en la relación C/N (v.gr. de C/N = 50)

es importante ya que de otra forma, un exceso de nitrógeno inhibiría la nitrogenasa de Azotobacter y le daría ventajas a Lactobacillus ya que la nitrogenasa en presencia de altos contenidos de iones amonio disminuye su actividad debido a una competencia entre la asimilación de NH_3 y la actividad de nitrogenasa por NADPH_2 y o ATP, así como a una represión de síntesis enzimática (30).

Si cantidades moderadas de nitrógeno combinado y cantidades excesivas de compuestos de carbono están presentes, como en las relaciones C/N altas, los microorganismos no fijadores de nitrógeno agotarían el suplemento de nitrógeno y cesarían de multiplicarse, dejando cantidades adecuadas de compuestos de carbono para los fijadores de nitrógeno (27).

Por lo anterior, primero se estudió la producción de ácido láctico con niveles escasos de nitrógeno (C/N mayor de 12) usando glucosa al 2% como sustrato de L.buchneri como agente fermentador. Afortunadamente, los resultados de fermentación fueron positivos, probablemente porque L.buchneri es un bacilo heteroláctico cuyos requerimientos nutricionales no son exigentes, a diferencia de los homolácticos que requieren relaciones C/N muy bajas (menores de 5) necesitando proteínas como fuente nitrogenada (31). En este estudio la principal fuente nitrogenada utilizada fue el sulfato de amonio en niveles muy bajos (v.gr. para C/N de 50 y glucosa al 2%, se requiere 0.075%

de sulfato de amonio) como se puede observar en el cuadro No. 5.

Algunos investigadores han registrado la estimulación de la fijación de nitrógeno en cultivos mixtos mediante Azotobacter sp y otros microorganismos como Rhodotorula. Diferentes explicaciones como son: (a) descomposición parcial de un sustato que inicialmente no podría ser aprovechado por Azotobacter, (b) remoción del exceso de nitrógeno fijado, (c) síntesis de factores de crecimiento requeridos por Azotobacter, (d) remoción del exceso de oxígeno (26).

En este trabajo se observó el efecto positivo del cultivo mixto entre Azotobacter chroococcum y Lactobacillus buchneri, como es demostrado en el cuadro No. 6 en donde la biosíntesis de proteína es mayor cuando se combinan estos dos microorganismos que cuando el cultivo es puro. Sin embargo, mediante observaciones microscópicas sólo se notó la persistencia de los dos microbios en las primeras 18 horas, después de las cuales sólo se observó la morfología característica de Azotobacter. Una restricción de esta mezcla microbiana es el pH óptimo en el cual funcionan estos dos microorganismos.

La cantidad de nitrógeno total fijado mediante este cultivo mixto se muestra en el cuadro No. 10, donde al término de 4 días se obtuvieron 16 mg de N_t /gr de fuente carbonada.

Estos resultados todavía no son prácticos desde el punto de vista industrial, para producir proteína unicelular por fermentación, pero queda abierta la posibilidad de aumentar estos rendimientos mediante una mejor selección de cepas fijadoras de nitrógeno así como de otros microorganismos lácticos que den mayores rendimientos de ácido láctico, ya que de esta manera aumentaría también el rendimiento del nitrógeno fijado.

Cabe hacer la aclaración que aún no se han hecho estudios del balance de la fermentación de cultivos puros de L.bu-chneri y que sólo se tienen datos de su producción de ácido láctico. Otros estudios de Gómez y Viniegra en 1978, han mostrado que la flora mixta heteroláctica del estiércol produce cerca del 60 a 70% de ácido láctico a pH de 6.5 usando glucosa como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente nitrogenada (32).

CONCLUSIONES

1.- El mecanismo de la fijación microbiana del nitrógeno atmosférico por ser un proceso principalmente reductivo parece ser beneficiado mediante una selección de fuentes reducidas de carbono como es el lactato, en comparación con otras fuentes como la glucosa y el acetato.

2.- La selección de fuentes de carbono reducidas, como el lactato, parece ser más significativa cuando el medio está sujeto a una aireación forzada, en comparación con cultivos líquidos no aireados.

3.- Con la presencia de nitrógeno inorgánico (sulfato de amonio) en bajas concentraciones (C/N de 50) y usando glucosa como sustrato, se puede promover la fermentación heteroláctica de la glucosa, adicionando carbonato de calcio y manteniendo el pH a 6.0.

4.- El cultivo mixto de A.chroococcum y L.buchneri, tiene más eficiencia que los cultivos puros de A.chroococcum medida ésta como mg de N/gr de sustrato aun en los casos en que el sustrato sea lactato de litio o de calcio.

5.- Se plantea la posibilidad tecnológica para el desarrollo de biosíntesis de proteínas por medio de cultivos mixtos de bacterias heterolácticas (v.gr. L.buchneri) y de

fijadores de nitrógeno asimbióticos (v.gr. A.chroococcum) usan do azúcares de caña, almidones u otras fuentes baratas de car^{bono}. Esta posibilidad podría llevarse a cabo mediante el aco^{plamiento} de digestores anaerobios de subproductos agrícolas, con reactores microbianos para la fijación de nitrógeno, me^{diante} un fermentador heteroláctico intermedio.

6.- Se requiere ampliar el estudio de la ecología de cultivos mixtos, usando microorganismos fijadores de nitróge^{no} que actúen a distintos valores de pH v.gr.: especies del g^énero Beijerinckia que crece en pH ácido (desde 3) y que se ^{acoplen} mejor con bacterias heterolácticas.

7.- Los estudios de la ecología de cultivos mixtos, fi^{ja}dores de nitrógeno, puede ampliar nuestro conocimiento so^{bre} el sinergismo necesario para la fijación óptima del nitró^{geno} por medio de los microorganismo de vida libre.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Burns, R.C. and Hardy, R.W.F. (1975) Nitrogen fixation in Bacteria and Higher Plants. Springer-Verlag, New York.
- 2.- Hardy, R.W.F. and Havelka, U.D. (1975) Nitrogen Fixation Research: A Key to world Food?. Science 138: 633-643.
- 3.- FAO Production Yearbook, vol 26 (FAO, Rome, Italy, 1972); R. Ewell, in Hearings before the Select Committee of the United States. 93rd Congress, 2nd session, part 2 "Nutrition and the international situation", 18 June 1974, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 1974) p. 354.
- 4.- Havelka, U.D. and Hardy, R.W.F. (1974) In Symposium on · Symposium on Dinitrogen Fixation, Eds. W.E. Newton and D. J. Nyman, (Washington State Univ. Press, Pullman, in Press) Agron. Abstract. p. 133.
- 5.- Brill, W.J. (1977) Biological Nitrogen Fixation. Scientific American. September p. 68-81.
- 6.- Burris, R.H. and Orme, W.H. (1974) Survey of Nitrogenase and its EPR Properties: A comprehensive treatise. In Microbial Iron Metabolism, edited by J.B. Neilands. Academic Press.

- 7.- Evans, H.J. and Russell, S.A. (1971) Physiological chemistry of symbiotic nitrogen fixation by legumes. In The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen fixation. Ed. J.R. Postgate. p. 191-244, Plenum Press: London, New York.
- 8.- Buchanan, A.C. (1977) The response of Azotobacter chroococcum to oxygen: superoxide mediated effects. Can.J. Microbiol., 23: 1548-1553.
- 9.- Dalton, H. and Postgate, J.R. (1969). Effect of oxygen on growth of Azotobacter chroococcum in batch and continuous cultures. J. gen. Microbiol., 54: 463-473.
- 10.- Postgate, J.R. (1971) Microbes and Biological Productivity. Eds by D.E. Hughes and A.H. Rose, (Cambridge Univ. Press, London) p. 287.
- 11.- Fay, P. (1973) In the biology of Blue-Green Algae. Eds. N.G. Caw and B.A. Whitton. Blackwell, Oxford) p. 238.
- 12.- Dalton, H. and Postgate, J.R. (1969) Growth and Physiology of Azotobacter chroococcum in continuous culture. J. gen. Microbiol., 56: 307-319.
- 13.- Mulder, E.G. (1974) Physiology and ecology of free-living, nitrogen-fixing bacteria. International Biological Programme 6. Edited by W.D.P. Stewart. Cambridge University

- Press London. p. 3-28.
- 14.- Oppenheim, J., Fisher, R.J., Wilson, P.W. and Marcus, L. (1970) Properties of a soluble nitrogenase in Azotobacter. J. Bacteriol., 101: 292-296.
- 15.- Thorneley, R.N.F., Yates, M.G. and Lowe, D.J. (1976) Nitrogenase of Azotobacter chroococcum. Kinetics of the reduction of oxidized iron protein by sodium dithionite. Biochem. J., 155: 137-144.
- 16.- Burris, R.H. (1975) Preparation and properties of nitrogenase proteins. In Nitrogen fixation by free living microorganisms. Edited by W. D. Stewart. Cambridge University Press. London. p. 333-349.
- 17.- Barron, E.S.G. (1955) Oxidation of some oxidation-reduction systems by oxygen at high pressures. Arch. Biochem. Biophys. 59: 502-510.
- 18.- Lavalley, F., Michelson, A.M. and Dimitrijevic, L. (1973) Biological protection by superoxide dismutases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 55: 350-357.
- 19.- Dilworth, M.J. (1969) Biochem Biophys. Acta. 184: 432: J.A. Cutting and H.M. Shulman, ibid. 192: 486.
- 20.- Skinner, K.J. (1976) Nitrogen Fixation. Key to brighter -

future for Agriculture?. Chemical Engineering News. October. p. 22-35.

- 21.- Jensen, H.L. (1954) The Azotobacteriaceas. Bacteriol.Rev., 18: 195-214.
- 22.- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edn. (1974) Edited by R.E. Buchannan and N.E. Gibbons, Baltimore: Williams and Wilkins.
- 23.- Lowry, O.H. and Rosebrough, N. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol.Chem., 193: 265-274.
- 24.- Rogosa, M.S. and M.E. Sharpe (1954) An Approach to the Classification of the Lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 22: 329-340.
- 25.- Williams, H.J. and Fisher, E. (1955) Methods of Analysis A.O.A.C. 8ava. Ed., 805-806.
- 26.- Brotonegoro, S. (1974) "Nitrogen fixation and Nitrogenase activity of Azotobacter chroococcum". Meded. Landbouwhogeschool Wageningen, 74-10. p. 3-58. North Holland: Amsterdam.
- 27.- Mulder, E.G. and Brotonegoro, S. (1974) Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria. In the Biology of Ni-

trogen Fixation (Ed. A. Quispel), pp. 37-85. North-Holland Amsterdam.

- 28.- Williams, A.M. and Wilson, P.W. (1954) Adaptation of Azotobacter cells to Tricarboxylic acid substrates. J. Bact. 67: 353.
- 29.- Hill, S., Drozd, J.W. and Postgate, J.R. (1972) J. Appl. Chem. Biotechnol. 22: 541-558.
- 30.- Drozd, J., and J.R. Postgate. 1970. Effects of oxygen on Acetylene reduction, cytochrome content and respiratory activity of Azotobacter chroococcum. J. Gen. Microbiol. 63: 63-73.
- 31.- Prescott, S.C. and Dunn, C.G. (1962) Microbiología Industrial. Ed. Aguilar. p. 324-352.
- 32.- Gómez, G.J. and Viniegra, G. (1978) The role of acidity and form of nitrogen in glucose fermentation inoculated with manure. Abstracts of II International Conference of Sugar Cane in Animal Production. CoNaCyT, Oaxtepec, Morelos (México).