

ESTUDIO DE LA FIJACION DE NITROGENO EN BEBIDAS Y  
ALIMENTOS MEXICANOS

Tesis para obtener la  
MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

Javier Antonio Taboada Ramírez



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.

## RESUMEN

En este trabajo se hace el estudio de la fijación de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en alimentos y bebidas de los antiguos mayas y mexicanos, que aún son consumidos en algunas zonas del país, principalmente por la población aborigen.

La fijación de nitrógeno se pone en evidencia por medio de la reducción de acetileno a etileno usando el método de cromatografía en fase de vapor.

Se estudiaron tres bebidas mexicanas: pozol, teagüino y pulque, y un alimento: "cocollin" o "cocol de agua". Se encontró que en los cuatro hay microorganismos que fijan  $N_2$ .

Solamente del pozol se hace un estudio extenso, el teagüino, el pulque y el "cocollin" se están estudiando y solo se presentan resultados preliminares.

De los microorganismos aislados del pozol, se determinó que la bacteria Agrobacterium azotophilum Ulloa y Herrera, es la responsable de la fijación del  $N_2$ . Se determinó que el medio en que esta bacteria progresa y donde hay mayor reducción de acetileno es su medio natural: masa de maíz. Se encontró que el medio mínimo en que A. azotophilum fija  $N_2$  es el medio 77 de Fred y Waksman con sacarosa (77S).

Se estudiaron los compuestos que inhiben la fijación de  $N_2$  por A. azotophilum, encontrándose que los compuestos que tienen  $-NH_2$  inhiben la fijación. Lo mismo ocurre con las sales inorgánicas de amonio. La inhibición de la fijación de  $N_2$  cuando se agregan aminoácidos al medio 77S depende de la cantidad de aminoácido agregado; si a 20 ml de medio 77S se agrega 10 ul de aminoácido la bacteria utiliza el aminoácido y fija  $N_2$ , a mayores cantidades de aminoácido agregado al medio, A. azotophilum utiliza el aminoácido, lo que se refleja en un mayor crecimiento de la colonia que en el testigo (77S) pero la reducción del acetileno, o sea la fijación del  $N_2$ , se inhibe.

## INTRODUCCION

Se entiende por fijación de nitrógeno la reducción de nitrógeno atmosférico. La fijación biológica del nitrógeno es la reducción de nitrógeno atmosférico a amoníaco efectuada por organismos vivos.

Además del interés científico en sí, la fijación de nitrógeno es de importancia tanto agrícola como ecológica puesto que el nitrógeno es indispensable para todos los organismos vivos.

De los procesos metabólicos que ocurren en las células, los dos más importantes para mantener la productividad de la tierra, la fotosíntesis y la fijación del nitrógeno, son característicos del reino vegetal únicamente. La fijación de nitrógeno solo se ha encontrado en microorganismos.

El gran aumento de población demanda no solamente una mayor producción de carbohidratos sino también, y quizá en forma más apremiante, una mayor producción de proteínas. Alrededor del 50% de la población mundial está desnutrida y la deficiencia de proteínas es aún más grave que la deficiencia de carbohidratos. La deficiencia en proteínas resulta de la incapacidad para convertir eficientemente y a bajo costo el nitrógeno gaseoso del aire a nitrógeno combinado que pueda ser asimilado por plantas y animales.

La fijación del nitrógeno puede llevarse a cabo por agentes biológicos, tales como bacterias libres y asociadas o por algas, o químicamente como en las instalaciones industriales que producen fertilizantes químicos, o por medio de descargas eléctricas en la atmósfera. La contribución total de nitrógeno fijado a la superficie de la tierra se estima en alrededor de 100 millones de toneladas de nitrógeno por año, 90% del cual es considerado de origen biológico (Stewart, 1967). Del nitrógeno incorporado a la tierra solo un pequeño porcentaje está representado por el nitrógeno que se agrega en forma de fertilizantes. En nuestro país el problema de la deficiencia de nitrógeno en la dieta es grave, más aún en las personas de escasos recursos que si acaso consumen carne es una vez a la semana. En nuestro medio rural, el campesino en muchas ocasiones sólo ingiere proteínas de tipo animal cuando caza algún animal comestible. Por esta razón, es de gran importancia la búsqueda de microorganismos fijadores de nitrógeno en los alimentos de nuestros aborígenes, en los alimentos que aún se consumen en amplias zonas del país y que fueron originariamente alimentos habituales de los pobladores indígenas.

Existen referencias históricas del uso que de estos alimentos hacían los pobladores de América antes de la llegada de los españoles, por ejemplo del complejo de algas llamado "cocollin" (Ortega, 1972), alimento que en ciertas ocasiones llegó a ser el único con que contaron los aborígenes en épocas de hambre. Otro alimento, de origen maya, es el pozol o pozole, el cual se usa en una amplia región del sureste de México sobre todo por algunos grupos indígenas como los Chamulas y Lacandones; como ha sido demostrado (Cravioto *et al.*, 1955) el valor alimenticio del pozol es mayor que el de la masa de maíz, encontrando un aumento considerable de nitrógeno total en esta masa fermentada en relación al maíz con el que se prepara.

En estos alimentos mencionados, y en algunos otros que iremos describiendo se encuentra una multitud de microorganismos, que forman microfloras características aún poco estudiadas. Consideramos que tiene gran interés el aislar los microorganismos causantes de la fijación del nitrógeno y que originan ese aumento de nitrógeno total en dichos alimentos. El aislar e identificar los microorganismos permitirá determinar si el aumento del nitrógeno total en los alimentos se debe al aumento de aminoácidos y especialmente interesa determinar si son los aminoácidos indispensables, por ejemplo lisina y triptofano, en los cuales casi todos los maíces son deficientes. Si así fuera, el valor alimenticio del pozol fermentado sería mayor que el del pozol sin fermentar lo cual daría la indicación de que es más conveniente el consumo del pozol fermentado por la población que habitualmente ingiere esta bebida. Tiene interés también el determinar en qué condiciones estos microorganismos fijan nitrógeno, en qué cantidades, si sería conveniente usarlos como inóculos en alimentos para el ganado (ensilados), si sería conveniente agregarlos a la tierra para aumentar su fertilidad y qué productos que actualmente son desechos de industrias o bien materiales inútiles pueden servir como fuentes de carbono para estos microorganismos, lo que permitiría usar los materiales mencionados inoculados con fijadores de nitrógeno para agregarlos a suelos pobres en nitrógeno.

El presente trabajo refiere algunos de los estudios llevados a cabo sobre organismos fijadores de nitrógeno aislados de algunos alimentos mexicanos y persigue los fines mencionados con anterioridad. Se ha dividido en: fijación de  $N_2$  en el pozol, fijación de  $N_2$  en el "cocollin"

y fijación de  $N_2$  en el tesgüino y el pulque. Solamente del pozol se hace un estudio extenso, el tesgüino, el pulque y el "cocolin" se están estudiando y solo se presentan resultados preliminares.

BIOQUIMICA DE LA FIJACION DE  $N_2$ 

La fijación de nitrógeno que el hombre efectúa para producir fertilizantes se hace en su mayor parte por el proceso Haber-Bosch, mediante el uso de catalizadores (generalmente complejos de óxidos de hierro), temperaturas cercanas a los  $500^{\circ}C$  y altas presiones, aproximadamente 1000 atmósferas. En cambio la fijación biológica del  $N_2$  que efectúan los microorganismos es llevada a cabo a temperatura ambiente, sin el uso de grandes cantidades de energía o de altas presiones. En consecuencia es interesante conocer cómo los vegetales lleva a efecto esta reducción del nitrógeno para aprender posibles mecanismos de producción de amoníaco a precios reducidos.

En los microorganismos la fijación de  $N_2$  es catalizada por la nitrogenasa la cual requiere energía en la forma de ATP y un reductor para la formación de amoníaco. Hay, por lo tanto, flujo de electrones desde un sustrato donador de electrones hacia el  $N_2$  molecular. Los diferentes grupos de microorganismos fijadores de  $N_2$  varían en cuanto a la naturaleza del reductor, de los transportadores de electrones y de las enzimas que intervienen.

Hasta 1960, se habían establecido los siguientes hechos (Benemann *et al.*, 1972).

- 1.- Fijación de  $N_2$  es una propiedad que sólo se ha encontrado en procariontes.
- 2.- El amoníaco es el primer producto de la fijación de  $N_2$ .
- 3.- Existe relación entre la fijación de  $N_2$  y el metabolismo de  $H_2$ .
- 4.- Se requiere Fe y Mo para la fijación de  $N_2$ .
- 5.- Un gran número de compuestos ( $NH_3$ ,  $H_2$ ,  $-CN$ ,  $NO_2$ ,  $O_2$ , etc) inhiben la fijación de  $N_2$ .

A partir de 1960, en que se logró preparar extractos libres de células que fijaban nitrógeno de *Clostridium pasteurianum* (Carnahan *et al.*, 1960) se encontró que era necesario: para que los extractos fijaran  $N_2$ : piruvato como donador de electrones (reductor) y como fuente de trifosfato de adenosina (ATP); un transportador de electrones que fue aislado y se le dio el nombre de ferredoxina (Mortenson *et al.*, 1962). Se encontró también otro transportador de electrones, la flavodoxina (Knight *et al.*, 1966).

Posteriormente se encontró que para la reducción de  $N_2$  no era necesario el piruvato, en realidad en presencia de ATP, cualquier sustra

te que pueda ceder los electrones requeridos en capas de intervenir en la fijación de  $N_2$ .

Estos electrones no reducen directamente al  $N_2$  sino a través de un intermediario que es la ferredoxina.

El sistema enzimático presente en los extractos y que cataliza la reducción del  $N_2$  a amoníaco en presencia de un reductor y de ATP es el llamado Nitrogenasa. La nitrogenasa une el nitrógeno molecular y lo convierte en amoníaco por medio de una serie de reacciones redox, requiriendo para ello seis electrones y alrededor de 12 a 15 moléculas de ATP. Además de la reducción del nitrógeno molecular la nitrogenasa cataliza las siguientes reacciones: a.- hidrólisis del ATP a ADP + Pi (Kennedy et al., 1968) que es dependiente de la oxidación de un reductor, oxidación que solo ocurre durante la hidrólisis del ATP, en cambio puede haber alguna hidrólisis del ATP independiente de la presencia del reductor (Jeng et al., 1970); b.- reducción de varios compuestos con triple ligadura tales como acetileno, cianuro, azidas, etc; en ausencia de un sustrato reducible la nitrogenasa puede continuar hidrolizando ATP y oxidando el reductor, en estas condiciones, se libera hidrógeno molecular (Burns y Buleu, 1965) y c.- cataliza el intercambio  $D_2O - H_2$  el que ocurre cuando hay reducción de  $N_2$  y no cuando hay formación de  $H_2$  (Hoch et al., 1960).

El proceso de fijación de  $N_2$  por los extractos libres de células es un proceso estrictamente anaerobio (Parker y Scott, 1960; Stewart y Pearson, 1970; Smith y Evans, 1971).

La fijación del  $N_2$  esta sujeta a control metabólico. Se ha demostrado que la nitrogenasa no se encuentra en los microorganismos que crecen en medios de cultivo con amoníaco o con otros compuestos nitrogenados y aparece cuando el amoníaco ha sido consumido (Wilson et al., 1943; Buleu et al., 1964; Daesch y Mortenson, 1968). La nitrogenasa es una enzima inducible cuya síntesis es reprimida por compuestos nitrogenados especialmente amoníaco (Munson y Burris, 1969). La inhibición de la fijación de  $N_2$  por los compuestos nitrogenados varía en los distintos microorganismos estudiados, en algunos, no se inhibe la fijación pero sí la síntesis de la nitrogenasa (Daesch y Mortenson, 1968; Bergersen 1969). La fijación de  $N_2$  también es dependiente de la disponibilidad de carbono, en su ausencia se acumula amoníaco y se inhibe la fijación. Otros sustratos también inhiben la



fijación de  $N_2$ ; el  $H_2$ ,  $CO$ ,  $N_2O$  y  $NO$  inhiben competitivamente la fijación de  $N_2$  en extractos de C. pasteurianum, lo que es una indicación más de que la nitrogenasa es una metalo-enzima.

Examinemos ahora particularmente los requerimientos para la actividad de la nitrogenasa.

#### Donadores de Electrones.

El origen y naturaleza de los donadores de electrones usados en la fijación de  $N_2$  varía en los diferentes grupos de microorganismos, pero tiene en común que son agentes reductores fuertes capaces de reducir a los acarreadores de electrones (ferredoxinas y flavodoxinas) que tienen bajo potencial.

Los siguientes son donadores de electrones encontrados por diferentes autores en distintos microorganismos.

	Donador de electrones	
<u>Clostridium</u>	Piruvato	Carnahan <u>et al.</u> (1960)
<u>pasteurianum</u>	$NADPH_2$ y $NADH_2$	D'Eustachio y Hardy (1964)
<u>Klebsiella</u>	Formato	Benemann <u>et al.</u> (1971)
<u>pneumoniae</u>	$NADPH_2$	Nagatani (no publicado)
<u>Bacillus</u>		
<u>polymyxa</u>	$NADPH_2$	Yoch (no publicado)
<u>Anabaena</u>		
<u>cylindrica</u>	$NADPH_2$	Bothe (no publicado)
Algas Verde-azules y bacterias fotosintetizantes	reducción fotoquímica (?)	Arnon (1967)

ACARREADORES DE ELECTRONES.- Los reductores naturales de la nitrogenasa son los acarreadores de electrones del tipo de las ferredoxinas y flavodoxinas. Además de reducir a la nitrogenasa, tienen muchas otras funciones en el metabolismo celular. En sí no tienen una función catalítica, solo transportan electrones de una enzima a otra.

A continuación se presenta en la tabla número 1 un resumen de las propiedades de las ferredoxinas y de las flavodoxinas encontradas en algunos de los organismos fijadores de  $N_2$ .

### Nitrogenasa

La nitrogenasa es un complejo de dos metaloproteínas que tiene características muy semejantes en todos los organismos de que se ha aislado. Las nitrogenasas más estudiadas son de Clostridium pasteurianum y de Azotobacter vinelandii.

Si se hace la cromatografía de extractos de proteínas de estos microorganismos en estrictas condiciones de anaerobiosis y DEAE - celulosa se separan dos fracciones proteicas, en forma de dos bandas de color café que corresponden a la nitrogenasa. Contiene hierro no hemo y azufre en cantidades equivalentes. Una fracción es más pesada y contiene además molibdeno, por esta razón se le denomina MoFe proteína y la otra fracción, que no contiene molibdeno y de menor peso molecular, se denomina Fe proteína. Separadamente ninguna de las fracciones tiene actividad, necesitan ser re combinadas, en la relación 2:1 Fe: MoFe; para que catalicen las reacciones características de la nitrogenasa. La Fe proteína es labil a temperaturas bajas y extremadamente sensible al oxígeno, contiene 4 átomos de hierro y 4 grupos sulfuro, puede ser disociada en dos subunidades idénticas. La MoFe proteína, con peso molecular de alrededor de 270,000 contiene dos moléculas de molibdeno, 34, 38 moléculas de hierro y 26 a 28 grupos sulfuro, puede ser disociada en varias subunidades de diferente tipo.

El mecanismo de acción de la nitrogenasa ha sido un tema de gran interés tanto científico como por sus aplicaciones prácticas. La nitrogenasa cataliza la transferencia de electrones desde un reductor a distintos aceptores de electrones ( $N_2$ ,  $H^+$ ,  $CN^-$ ) en una reacción que depende de la hidrólisis del ATP. Aunque cataliza otras reacciones, la reacción fundamental es la reducción del  $N_2$ .

En relación con el papel del ATP y la nitrogenasa se han establecido los siguientes hechos: 1.- La rapidez de hidrólisis del ATP por la nitrogenasa es independiente de cuál sustrato sea reducido, pero depende de la presencia del reductor. (Bui y Mortenson, 1969) 2.- En ausencia de reductor la nitrogenasa hidroliza ATP especialmente a pH bajos, alrededor de 5. (Bui y Mortenson, 1969) 3.- La estequiometría de ATP utilizado es compleja; la relación de ATP hidrolizado por cada

TABLA I.\* PROPIEDADES DE LOS TRANSPORTADORES DE ELECTRONES  
ENCUENTRADOS EN FIJADORES DE N<sub>2</sub>

FERREDOXINAS		FLAVODOXINAS								
Organismo	Peso molecular	Fe y (S)	Maximo en espectro visible (nm).	Cloro- plastos- NADP	Referencias	Nombre	Peso molecular	Coenzima plastos- NADP	Referencia	
<i>Clostridium pasteurianum</i>	6000	8(8)	390	+	Lovenberg <u>et al.</u> (1963)	Flavodoxina	14600	FMN	+	Knight y Hardy (1966)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	14500	8(8)	375-415	+	Yoch (comunicación personal)	Azotoflavina	31000	FMN	-	Benemann <u>et al.</u> (1969)
<i>Rhizobium japonicum</i>	10000	?	hombro 300-400	-	Burton <u>et al.</u> (1970)	Rhizoflavina	?	?	-	Yoch y R.C. Valentine (no publicado)
<i>Anabaena cylindrica</i>	10000	2(1)	330,420 463	+	Yamanaka <u>et al.</u> (1969)	Fitoflavina	-	FMN	+	Smilie (1965)
<i>Bacillus polymyxa</i>	11000	4-5(4-5)	385	+	Shethna (1970)	-	-	-	-	-
<i>Chromatium</i>	5600	8(8)	385	+	Buchanan (comunicación personal)	-	-	-	-	-
<i>Desulfovidrio gigas</i>	6500	4(4)	400	-	Laishley <u>et al.</u> (1969)	Flavodoxina	16000	FMN	-	Dubourdieu y LeGall (1970)

\*Tomado de Benemann, 1972

par de electrones transferido ( $\text{ATP}/2e^-$ ) es del orden de 4 a 5, depende del pH y de la temperatura. Si se hidroliza ATP pero no hay transferencia de electrones la relación ( $\text{ATP}/2e^-$ ) es del orden de dos (Jeng et al., 1970). 4.- Ambas proteínas pueden unir ATP (Biggins y Kelly, 1970).

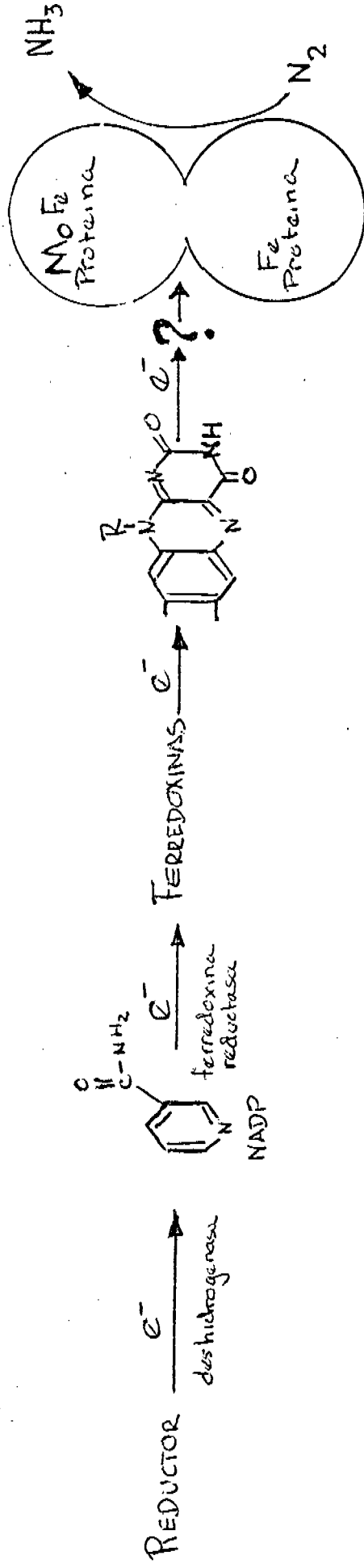
Se ha propuesto que en la reacción catalizada por la nitrogenasa el ATP interviene: 1.- Como fuente de protones para la nitrogenasa (Brintzinger, 1966); 2.- Como activador de protones (Mortenson, 1964); 3.- Como fuente de electrones hidratados (Bui y Mortenson, 1969); y 4.- Como inductor de cambios conformacionales (Bulen et al., 1965). De hecho falta mucho por aclarar como funciona el ATP en esta reacción.

Hay evidencia de que la nitrogenasa reduce al  $\text{N}_2$  en varias etapas. Los sustratos son reducidos a productos que han aumentado sus electrones en pares; así, el acetileno es reducido a etileno en dos pasos, el nitrógeno a amoníaco en tres pasos. Sin embargo no se han podido aislar los productos intermedios de la reducción del  $\text{N}_2$  y se piensa que esto se debe a que quedan fuertemente unidos a la enzima (Burriss et al., 1965).

La nitrogenasa tiene varios sitios activos puesto que la hidrólisis del ATP, la oxidación del reductor y la reducción del sustrato son afectados por diferentes inhibidores.

Muchos investigadores, basandose en consideraciones teóricas, afirman que el fierro es el metal clave en la unión del  $\text{N}_2$  a la nitrogenasa en el sitio de la reducción del sustrato; otros investigadores consideran que el molibdeno es el que tiene la función primordial. En apoyo de este último criterio está el hecho de que la nitrogenasa preparada con vanadio en vez de molibdeno (McKenna et al., 1970), obtenida de A. vinelandii que creció en un medio carente de molibdeno pero que contenía vanadio, difiere de la natural en cuanto a afinidad por el sustrato y la cinética de la reducción.

Resumiendo se podría proponer el siguiente esquema para la vía y los grupos funcionales que intervienen en la reducción del nitrógeno molecular:



Benemann, 1972

No obstante los muchos hechos conocidos, todavía no se sabe el mecanismo detallado de la acción de la nitrogenasa. Todavía no se conoce cómo esta enzima reduce el nitrógeno molecular; no se ha llegado a establecer cuál es el mecanismo de acción de la nitrogenasa que pueda relacionar todos los hechos conocidos y conciliar las distintas explicaciones propuestas.

## MATERIALES Y METODOS

I.- Medios de Cultivo Empleados.

- 1.- Extracto de malta agar (Malt extract agar Difco).
- 2.- Papa dextrosa agar (Potatoe dextrose agar Difco).
- 3.- Tioglicolato agar (Thioglycolat Bouillon Merck más agar Merck en la proporción de 1.5%).
- 4.- Atole de maíz al 20% (masa de maíz 20 g agua destilada 80 ml. La masa de maíz fue comprada en un molino de masa de maíz en la Ciudad de México. También se usó masa deshidratada marca Minsa al 10%).
- 5.- Atole de maíz-peptona (masa de maíz 20 g, peptona Difco 5 g, agua destilada 80 ml).
- 6.- Atole de maíz-extracto de levadura (masa de maíz 20 g, extracto de levadura Difco 1 g, agua destilada 80 ml).
- 7.- Atole de maíz-peptona-extracto de levadura (masa de maíz 20 g, peptona 5 g, extracto de levadura 1 g, agua destilada 80 ml).
- 8.- Atole de maíz con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 0.5%.
- 9.- Medio 77G de Fred y Waksman (Allen, 1951; Ulloa, Herrera y de la Lanza, 1971) tanto líquido como sólido; en este último caso se añade agar purificado (ion-agar, Oxoid) en la proporción de 1.5%, glucosa 10 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4$  0.2 g,  $\text{NaCl}$  0.2 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  trazas,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  trazas, agua destilada 1000 ml.
- 10.- Medio 77G-masa (masa de maíz 20 g, medio 77G líquido de Fred y Waksman 80 ml).
- 11.- Medio 77S líquido (sacarosa al 10% en medio 77 de Fred y Waksman ; Taboada, Herrera y Ulloa, 1971).
- 12.- Medio de Burk líquido y sólido (este último contiene además de las sustancias que se indican a continuación, ion-agar Oxoid, en la proporción de 1.5%). Se prepararon dos variantes: una sin extracto de levadura y otra con una pequeña cantidad de esta sustancia (Wilson y Knight, 1952): sacarosa 20 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g, agua destilada 1000 ml, solución Fe-Mo 1 ml, extracto de levadura (Difco) (opcional) 150 mg. La solución Fe-Mo se preparó en la siguiente proporción (0.1 mg de Fe y 0.1 mg de Mo/ml)  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{MoO}_3$  (85%) 17.5 mg, agua destilada 100 ml.
- 13.- Al medio 77S se le agregaron diferentes sustancias en estudio que podrían actuar como factores en la fijación de nitrógeno en una proporción de 50 a 100 mg por cada 20 ml de medio. Los aminoácidos fueron adicionados en proporciones variables desde 10 ug hasta 100 mg por 20 ml de medio. Las sustancias que se usaron aparecen enlistadas en el capítulo de resultados del presente trabajo.
- 14.- Solución Detmer (pH7) (Bold, 1949): 2% fosfato monobásico de potasio 72.5 ml, 2% fosfato dibásico de potasio 21.0 ml, 2% nitrato de calcio 140 ml, 2% sulfato de magnesio 85.5 ml, 2% cloruro de potasio 85.5 ml, 0.1% sulfato férrico 19.5 ml, agua 6572 ml.

## II.- Cepas aisladas que se sometieron a la prueba de la reducción del acetileno.

### a.- Cepas aisladas del pozol.

#### Bacterias.

- 1.- Agrobacterium azotophilum Ulloa y Herrera.
- 2.- Achromobacter pozolis Ulloa y Herrera.
- 3.- Escherichia coli var. neapolitana.
- 4.- Pseudomonas sp.

#### Levaduras.

- 5.- Candida krusei (Cast.) Berkhout.
- 6.- Hansenula fabiani Wick.
- 7.- Hansenula pozolis Herrera, Ulloa y Fuentes.

#### Mohos.

- 8.- Cladosporium herbarum (Pers.) Link
- 9.- Paecilomyces fumosoroseus (Wize) Brown y Smith
- 10.- Geotrichum candidum Link.
- 11.- Trichosporon cutaneum (de Beurm., Gougerot et Vaucher) Ota.

### b.- Cepa aislada del "cocollin".

- 1.- Phormidium tenue (Keweg.) Gom.

## III.- Inoculación e Incubación de los medios de cultivo.

- 1.- Todos los medios de cultivo fueron distribuidos en frascos serológicos de 50 ml, colocando 20 ml en cada frasco. Estos se taparon con algodón y se esterilizaron en autoclave a 120°C. durante 20 minutos.
- 2.- Los medios se inocularon con 1 ml de una suspensión de microorganismos tomando éstos con una asa estéril de un cultivo puro en papa dextrosa agar o extracto de malta agar.
- 3.- La incubación de todos los cultivos se hizo a 26°C. Los cultivos se dividieron en dos series: a) aerobios b) anaerobios. Los cultivos en anaerobiosis se incubaron dentro de frascos de tapón de rosca, sellados con cinta plástica impermeable, conteniendo en su interior la siguiente mezcla reductora, en la cantidad de 35g para cada frasco de tapón de rosca de 5 l de capacidad: pirogalol 5 g, carbonato de potasio 5 g, tierra silíceo (Kieselgur G) 25 g.
- 4.- Para el estudio de la fijación de nitrógeno molecular por el complejo biológico llamado "cocollin", se pusieron 20 ml de suspensión de al-



gas libres de rotíferos, crustáceos y nemátodos en frascos serológicos de 50 ml a los que se trató en la forma descrita en el apartado IV de Materiales y Métodos. Veinte mililitros de cultivo unialgal de Phormidium tenue en medio Detmer (pH 7) se colocaron en frascos serológicos de 50 ml y se trataron de igual manera.

B.- En todos los casos se incubaron controles representados por medios sin inocular.

#### IV.- Cromatografía en Fase Gaseosa.

La nitrogenasa reduce, además del  $N_2$ , acetileno, cianuro, óxidos nitrosos, azidas y muchas otras moléculas con triple ligadura. Se hace uso de las reacciones que cataliza la nitrogenasa para determinar su presencia y estudiar sus características. Las reacciones más comúnmente usadas con estos propósitos son: formación de amoníaco (Mortenson, 1961), incorporación de  $^{15}N_2$  (Burriss y Wilson, 1957), reducción del acetileno (Dilworth, 1966; Schöllhorn y Burriss, 1967; Hardy et al., 1968) y, finalmente, el desprendimiento de hidrógeno dependiente de ATP (Burriss, 1965).

En nuestras investigaciones hemos hecho uso de la reducción del acetileno con formación de etileno porque la cromatografía en fase gaseosa es un método fácil, rápido y con gran sensibilidad ( $10^{-12}$  g) y que puede usarse en estudios in vivo, in vitro e in situ.

Se define la cromatografía como un método de separación en el que la mezcla que va a ser separada se distribuye en dos fases, una que es móvil y la otra estacionaria; la fase móvil percuela a través de la fase estacionaria. La fase estacionaria, que puede ser sólida o líquida, se distribuye sobre un soporte inerte, lo que le da una gran superficie. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa pero en ningún caso es miscible con la fase estacionaria.

Se distinguen cuatro tipos de cromatografía: Líquido-sólido, líquido-líquido, gas-sólido y gas-líquido.

En este trabajo se usó la cromatografía gas-sólido, o cromatografía de adsorción y nos limitaremos a describir brevemente este método.

La mezcla por separar se pasa a través de una columna llena con la fase estacionaria y es arrastrada por la fase móvil que puede ser helio, nitrógeno, o cualquier otro gas inerte. Los componentes de la mezcla se separan debido a su diferente afinidad por la fase sólida.

Las moléculas de cualquier sustancia sólomente se mueven a lo largo de la columna cuando se encuentran en la fase móvil, por lo tanto, la velocidad de flujo de una sustancia será proporcional a la cantidad de sus moléculas que estén presentes en la fase móvil. La velocidad de transporte será mayor cuanto mayor sea la proporción del compuesto en la fase móvil. En el caso ideal, el estado de equilibrio se establece en un tiempo infinitamente pequeño, la difusión a lo largo de la columna es despreciable y la velocidad de flujo de la fase móvil se supone constante en toda la sección transversal; bajo estas condiciones las distintas sustancias de la mezcla se moverán a lo largo de la columna en bandas estrechas. Las condiciones ideales no se encuentran en la práctica y, por lo tanto, las bandas se ensanchan y a mayor tiempo de retención en la columna, se aproximan a la forma de una curva de distribución de Gauss.

Los componentes de una mezcla aparecen uno después de otro a la salida de la columna y se pueden registrar por medio de un sistema detector que puede ser de varios tipos. En nuestro caso se usó el detector de hidrógeno. En este tipo de detector, las muestras eluidas por el gas acarreador se ionizan por medio de una flama (hidrógeno + aire) y los iones resultantes son registrados por un electrómetro y graficados en forma de picos en el papel registrador. Este detector es sensible a los compuestos orgánicos y no sensible a los gases inorgánicos ni a los cambios de temperatura.

La separación de las sustancias depende de la temperatura, sección transversal y longitud de la columna, de la velocidad de flujo del gas acarreador y, muy particularmente, del tipo de la fase estacionaria. Dependiendo de la polaridad de esta última, los compuestos pueden ser separados de acuerdo con su punto de ebullición o su estructura química. Experimentalmente se ha encontrado que la mejor fase estacionaria es aquella de polaridad semejante a las sustancias que se van a separar.

El método usado por nosotros fue:

- 1.- Cromatógrafo Aerograph modelo 600-D con detector de hidrógeno, acoplado a un registrador Leeds y Northrup modelo H.
- 2.- Columna de vidrio de 5' x 1/8" rellena con Chromosorb 104 (Johns-Manville).
- 3.- Columna de vidrio de 6' x 1/8" rellena con Porapak Q (Waters Associates).
- 4.- Columna de vidrio de 6' x 1/8" rellena con Porapak N (Waters Associates).
- 5.- Gas acarreador usado; nitrógeno.
- 6.- Condiciones de trabajo: Temperatura de la columna: Chromosorb 104,

35°C; Porapak Q y Porapak N 80°C; temperatura del inyector: 35°C para Chromosorb 104 y 100°C para Porapak Q y N; Flujo de nitrógeno 28 ml/min; flujo de hidrógeno 28 ml/min; flujo de aire 300 ml/min; presión de entrada 2 K/cm<sup>2</sup>; presión de salida atmosférica.

V.-Gases utilizados: acetileno, oxígeno y helio de los disponibles en el comercio.

VI.-Mezcla de gases: a los frascos serológicos con los cultivos se les trató con los dos tipos siguientes de mezclas de gases:

- 1.- Aerobiosis: acetileno 21.6%, oxígeno 21.6%, helio 56.8%.
- 2.- Anaerobiosis: acetileno 21.6%, helio 78.4%.
- 3.- El tratamiento se hizo en la siguiente forma: el aire de los frascos se desalojó con helio y en seguida se cerraron con tapones serológicos de hule. A los frascos destinados a una condición aerobia se les extrajeron con una jeringa, 16 ml de gas y se les inyectaron 8 ml de oxígeno y 8 ml de acetileno. A los frascos destinados a una condición anaerobia sólo se les extrajeron 8 ml de gas y se les inyectaron 8 ml de acetileno. En estas condiciones se mantuvieron todos los frascos a temperatura ambiente (alrededor de 25°C) o en estufa a 25°C.
- 4.- De cada frasco de cultivo, tratado en la forma anteriormente descrita, se extrajeron 500 ul, para determinar en el cromatógrafo la presencia y la cantidad acumulada de etileno. En frascos con medio sin inocular se hicieron los mismos tratamientos indicados y se analizaron los gases para determinar la presencia de etileno (frascos testigos). Para obtener los datos con que se construyó la Gráfica 1 se prepararon dos series de 9 frascos cada una. Una serie se trató en la forma indicada para aerobiosis y otra serie en la descrita para anaerobiosis. Se numeraron los frascos en orden progresivo de manera que al frasco No. 1, de cada serie, se le extrajeron 500 ul de gas a las 24 horas de haberle agregado la mezcla de gases para determinar la cantidad de etileno acumulado; a los frascos No. 2 se les extrajeron 500 ul de gas a cada uno, a las 48 horas; a los No. 3 a las 72 horas y así sucesivamente.
- 5.- En el cromatógrafo se analizaron gases tipos para determinar los tiempos de retención del acetileno y del etileno (en Chromosorb 104, etileno: 42seg; acetileno: 135 seg. En Porapak Q, etileno: 120 seg.: acetileno 120 seg. En Porapak N, etileno: 94.5 seg.; acetileno: 146.4 seg).

VII.- Densidad óptica de los cultivos de *A. azotophilum*.

La medida de la absorbencia de los cultivos de *A. azotophilum* se hizo en un espectrofotómetro para ultravioleta-visible Perkin-Elmer 202. Se corrió el espectro en toda la amplitud del visible y se seleccionó la longitud de onda de 600 nm para hacer las comparaciones. Se usó cubeta de 1 cm y las lecturas se hicieron a las 8, 24, 32 y 56 horas de haber inoculado el medio con 1 ml de un cultivo de *A. azotophilum* incubado a 26°C durante 48 horas en medio 77S. A 20 ml de medio 77S en matraces Erlemeyer de 50 ml, se agregaron 10 ug/ml ó 0.05 mM/ml de cada aminoácido que se probó. En el caso de la asparagina, además de las cantidades anteriores, se usó la de 0.025 mM/ml, por ser la amida del aminoácido.

## RESULTADOS Y DISCUSION

FIJACION DE N<sub>2</sub> EN EL POZOL.

En trabajos anteriores (Ulloa, Herrera y de la Lanza, 1972) se ha hecho referencia al aumento considerable del contenido del nitrógeno total en cultivos de microorganismos aislados del pozol. Debido a esto, se determinó cuál o cuáles de esos microorganismos eran capaces de fijar nitrógeno atmosférico molecular (N<sub>2</sub>).

Primeramente se determinó que el pozol natural tiene la capacidad de reducir el acetileno a etileno tanto en condiciones aerobias como anaerobias, siendo más acentuado el fenómeno en la última condición. Posteriormente, se estudiaron once especies de microorganismos del pozol, las cuales habían presentado, en mayor o menor grado, un cierto crecimiento en medios carentes o deficientes de nitrógeno. De ellas, la única que redujo el acetileno fue Agrobacterium azotophilum Ulloa y Herrera; por este motivo, esta especie se ha estudiado con más detalle.

Se procedió a determinar la reducción de acetileno por A. azotophilum en diferentes medios de cultivo; los resultados se expresan en la tabla 2.

TABLA 2

Reducción de acetileno por Agrobacterium azotophilum en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	Aerobiosis	Anaerobiosis
Atole	+	+
PDA	+	+
77G + masa	+	+
Burk	+	+
Burk + trazas de ext.lev.	+	+
77S	+	+
77G	-	-
77G agar	±	-
Atole + peptona	-	-
Atole + levadura	-	-
Atole + peptona + ext.lev.	-	-
Atole + NH <sub>4</sub> Cl	-	-
Tioglicolato agar	-	-

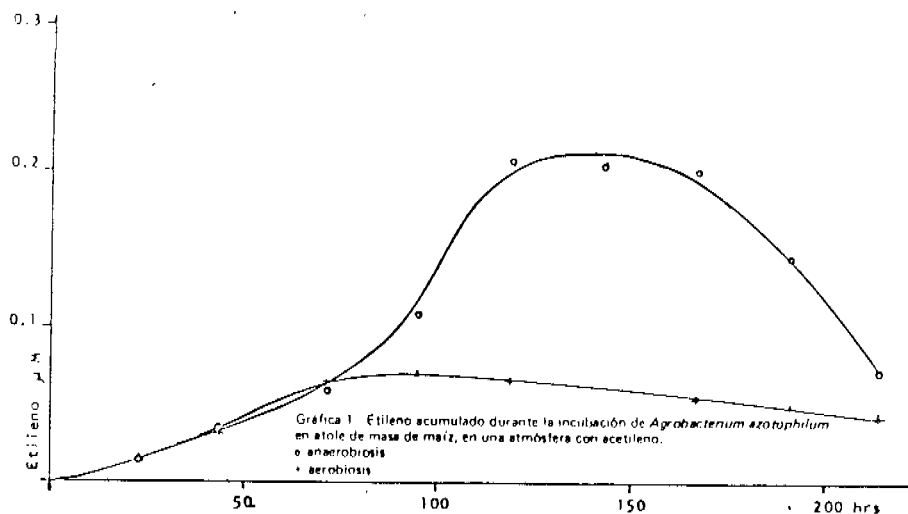
Según los datos de la tabla anterior, puede deducirse que, los medios que contuvieron masa, pero no peptona ni extracto de levadura favorecieron la reducción del acetileno a etileno por A. azotophilum. De los medios muy pobres o deficientes en nitrógeno, el de Burk, tanto con trazas de extracto de levadura como sin ellas, permitió la reducción del acetileno; en tanto que en los medios 77G líquido y 77G agar no hubo producción de etileno en los cultivos correspondientes. En el medio de papa - dextrosa agar (PDA) se registró mediana producción de etileno en los cultivos, menor que en el medio de Atole; en todos los medios con un alto contenido de nitrógeno proveniente de otros materiales diferentes al maíz, se inhibió la reducción del acetileno. También se encontró que la reducción del acetileno se inhibe si se agrega peptona y extracto de levadura al medio de atole de maíz y se inocula con pozol.

Se comprobó que cuando hay reducción de acetileno únicamente se produce etileno y no etano. No apareció pico de etano en los cromatogramas que se obtuvieron con las diferentes columnas usadas.

El atole de maíz fue el medio en donde se produjo la reducción del acetileno con mayor constancia e intensidad que en los otros medios probados. Es precisamente el pozol (que se prepara con masa de maíz) el medio natural de A. azotophilum, lo que explica la mayor reducción de acetileno en el atole de maíz. Resultados semejantes han sido reportados por Klevenskaya (1968), para ciertas cepas de Micrococcus, Mycobacteria y Pseudomonas, que fijan más nitrógeno en su medio natural que en medios artificiales.

Se procedió a estudiar la acumulación del etileno en el transcurso del tiempo, en cultivos de A. azotophilum en atole de masa de maíz. Se hicieron varias determinaciones de etileno, de las cuales sólo anotamos el resultado de uno de los experimentos en la gráfica 1, debido a que los datos de las otras investigaciones efectuadas fueron comparables a éste.

En la gráfica 1 puede observarse que la actividad del sistema de la nitrógenasa es mayor en anaerobiosis que en aerobiosis, resultados que concuerdan con los registrados para Klebsiella aerogenes, y otros microorganismos (Kalininskaya, 1968; Pengra y Wilson, 1958).



Es notable que en la primera condición a partir de las cien horas de incubación hubo un sensible aumento en la producción de etileno que disminuyó después de las ciento cincuenta horas; esto último posiblemente se debió a que, además de la menor producción de etileno, se acumulan otros gases producto del metabolismo de los microorganismos, tales como  $\text{CO}_2$ , lo que hace que disminuya la concentración de etileno en la muestra que se inyecta al cromatógrafo. En aerobiosis, el aumento en la producción de etileno no fue tan notable por otra parte, el descenso en la curva fue muy lento.

Tanto el pozol como la masa de maíz inoculada con *A. azotophilum* se analizó por el método descrito para ver si había producción de etileno. Se buscó etileno por cromatografía en fase de vapor en el aire contenido en frascos con: pozol con atmósfera de helio, pozol con aire, pozol con aire y acetileno, masa inoculada con *A. azotophilum* con aire, con helio y con aire y acetileno. En ninguno de estos frascos fue detectado etileno, lo que demuestra que el etileno encontrado es el que se forma como resultado de la reducción del acetileno. Se puede asegurar que tanto la flora del pozol como *A. azotophilum* fijan  $\text{N}_2$ .

El hecho de que en medios con peptona y con extracto de levadura *A. azotophilum* no redujera al acetileno, probablemente sea debido a que en estos medios se encuentra nitrógeno como  $\text{NH}_2$  que ha sido reportado

por varios autores como inhibidor de la fijación de nitrógeno (Wilson et al., 1943; Kamen y Gest, 1949) en otros microorganismos.

Con el objeto de encontrar las sustancias que tuvieran acción inhibidora sobre la fijación de nitrógeno, se investigó en primer lugar el medio mínimo para el desarrollo de A. azotophilum, habiéndose encontrado que el medio mínimo 77 de Fred y Waksman con sacarosa (77S) fue el más adecuado para observar la acción de diversas sustancias en la fijación de nitrógeno por dicho microorganismo. Se ensayaron también los medios de Burk y de Fred y Waksman con otras fuentes de carbono diferentes a la sacarosa y que fueron: etanol, manitol y glucosa. Se observó que con las dos primeras sustancias no hubo fijación de nitrógeno (reducción de acetileno) en las primeras 24 horas y con la última la fijación fue menor que con sacarosa.

Al medio 77S se le agregaron las sustancias en estudio, que podrían actuar como factores limitantes, en una proporción de 50 a 100 ml por cada 20 ml de medio. Los aminoácidos L-ácido glutámico, DL-ácido glutámico, L-ácido aspártico, DL-ácido aspártico, L-alanina, D-alanina, D-alanina y DL-alanina fueron adicionados en proporciones variables, desde 3 mg por 20 ml de medio hasta 100 mg por 20 ml de medio.

En la tabla 3 se indican los resultados obtenidos añadiendo al medio una cantidad fija de la sustancia en estudio (50 mg en el caso de las sustancias orgánicas y 20 mg de las sustancias inorgánicas). Dado el interés que tienen los ácidos glutámico y aspártico en el proceso de la fijación del  $N_2$ , estudiamos la acción de dos formas ópticas de cada uno de ellos en diferentes concentraciones y los resultados se expresan en las Figs. 2 y 3.

Por se A. azotophilum una bacteria anaerobia facultativa, estudiamos también la acción de diferentes tensiones de oxígeno durante la reducción del acetileno. Los resultados se consignan en la figura 4.

Es interesante anotar que en unos cultivos de A. azotophilum en medio de 77S a los que añadimos acetileno tanto en aerobiosis como en anaerobiosis y donde se había producido etileno, se reemplazaron esos gases por helio hasta no encontrar etileno ni acetileno. En estas condiciones, a unos frascos agregamos cloruro de amonio, a otros glicina y a todos acetileno; pudimos detectar la presencia de etileno 12 horas después de que añadimos el acetileno.

De los resultados anotados en la Tabla 3, es interesante comentar que los sistemas enzimáticos para la fijación de  $N_2$  en A. azotophilum, también



T A B L A No. 3 \*\*

	Aerobiosis	Anaerobiosis
Cloruro de amonio	-	-
Nitrito de sodio	-	-
Nitrato de sodio	-	-
Hidroxilamina	-	-
Tioglicolato de sodio	-	-
Mezcla de aminoácidos (de los aquí anotados)	-	-
Glicina	-	-
DL-ácido aspártico	-	-
D-ácido aspártico	-	-
DL-ácido glutámico	-	-
L-ácido glutámico	-	-
L-prolina	-	-
DL-glicina	-	-
DL-alanina	-	-
L-alanina	-	-
D-alanina	-	-
L-asparagina	-	-
L-histidina	-	-
DL-tirosina	+	+
DL-metionina	+	+
DL-leucina	+	+
L-leucina	+	+
DL-isoleucina	+	+
DL-triptofano	+	+
DL-fenilalanina	+	+
Trifosfato de adenosina (ATP)	+	+
Extracto de levadura*	+	+
Peptona*	+	+

Medio.- 77S

- No hay reducción de acetileno

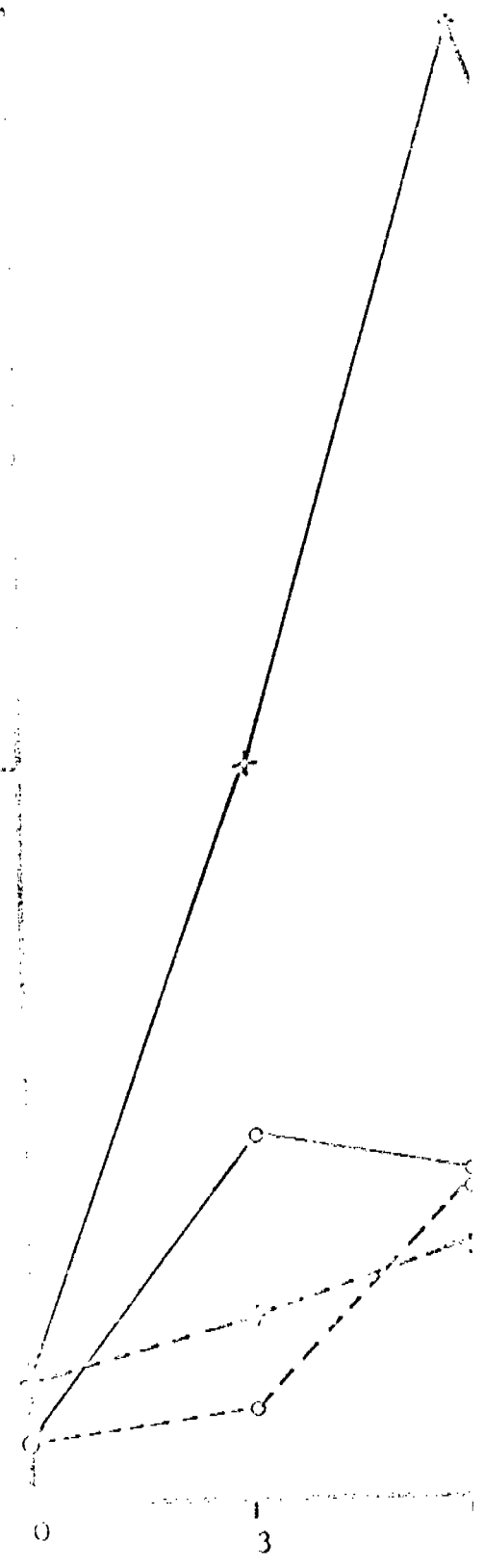
+ Hay reducción de acetileno

\* Muy poca reducción de acetileno a la concentración usada.

\*\* Herrera y Taboada, 1972.

100% OF HYDRANTS ARBITRARY UNIT

2000



Percentage Conversion of Acetylacetone

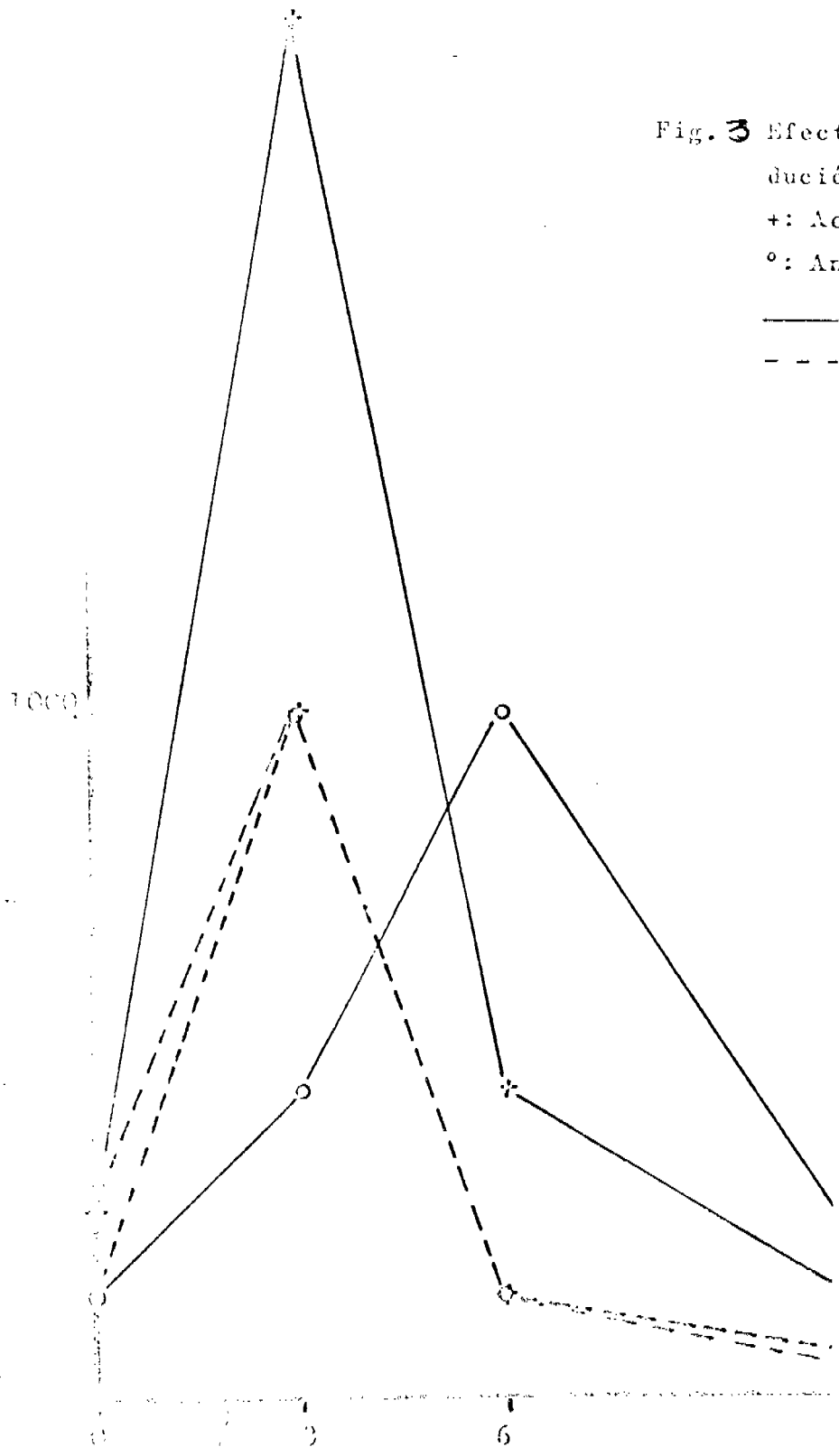


Fig. 3 Effect  
of  
+ : Ac  
o : Ar

T A B L A No. 3\*\*

	Aerobiosis	Anaerobiosis
Cloruro de amonio	-	-
Nitrito de sodio	-	-
Nitrato de sodio	-	-
Hidroxilamina	-	-
Tieglicolato de sodio	-	-
Mezcla de aminoácidos (de los aquí anotados)	-	-
Glicina	-	-
DL-ácido aspártico	-	-
D-ácido aspártico	-	-
DL-ácido glutámico	-	-
L-ácido glutámico	-	-
L-prolina	-	-
DL-glicina	-	-
DL-alanina	-	-
L-alanina	-	-
D-alanina	-	-
L-asparagina	-	-
L-histidina	-	-
DL-tirosina	+	+
DL-metionina	+	+
DL-leucina	+	+
L-leucina	+	+
DL-isoleucina	+	+
DL-triptofano	+	+
DL-fenilalanina	+	+
Trifosfato de adenosina (ATP)	+	+
Extracto de levadura*	+	+
Peptona*	+	+

Medio.- 77S

- No hay reducción de acetileno

+ Hay reducción de acetileno

\* Muy poca reducción de acetileno a la concentración usada.

\*\* Herrera y Taboada, 1972.

Fig. 2 efecto de distintas concentraciones de ácido glutámico en la producción de acetileno a etileno.

+: Aerobiosis  
 o: Anaerobiosis  
 — : L-ácido glutámico  
 - - - : DL-ácido glutámico

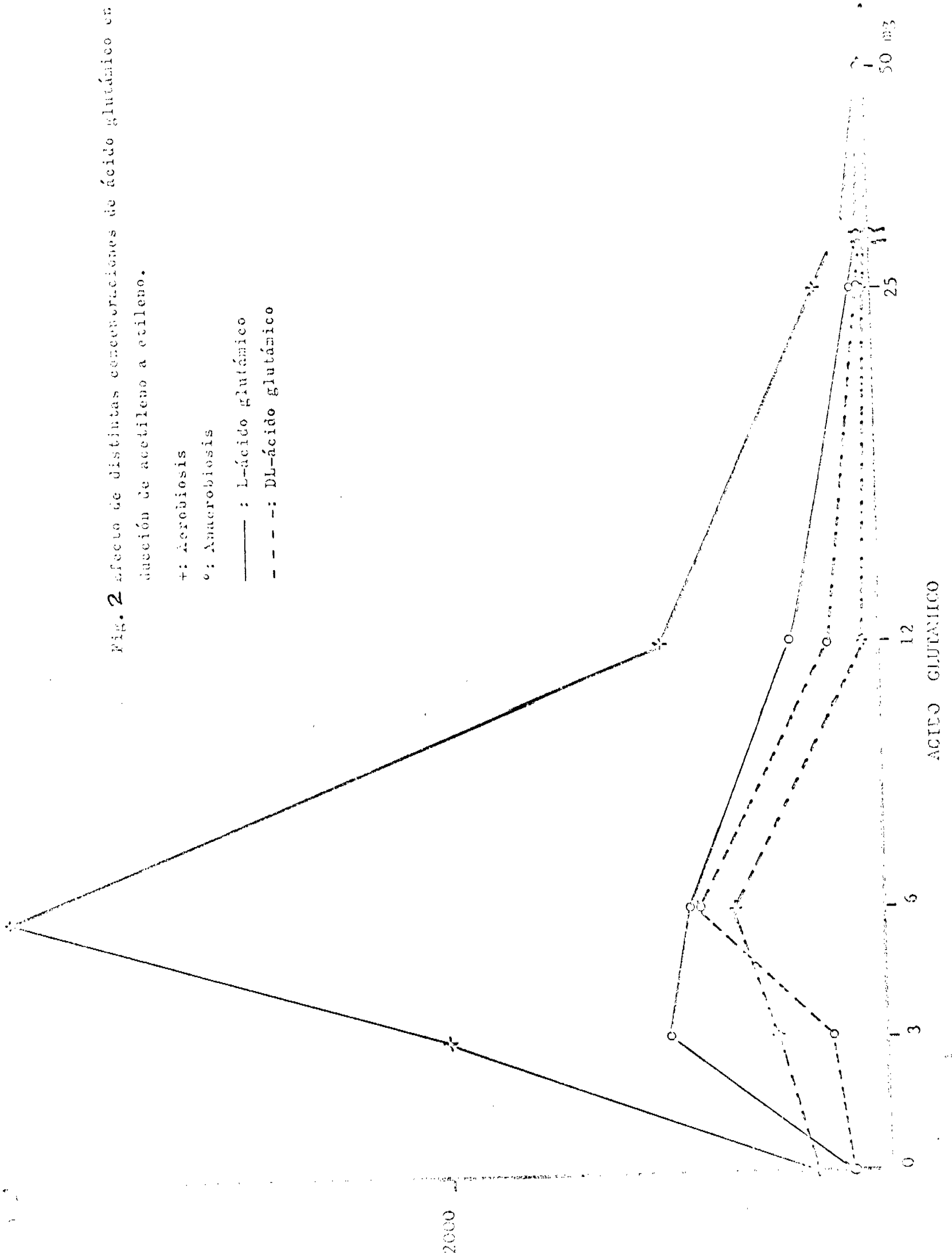


Fig. 3 Efecto de distintas concentraciones de ácido aspártico en la reducción de acetileno a etileno.

+ : Aerobiosis

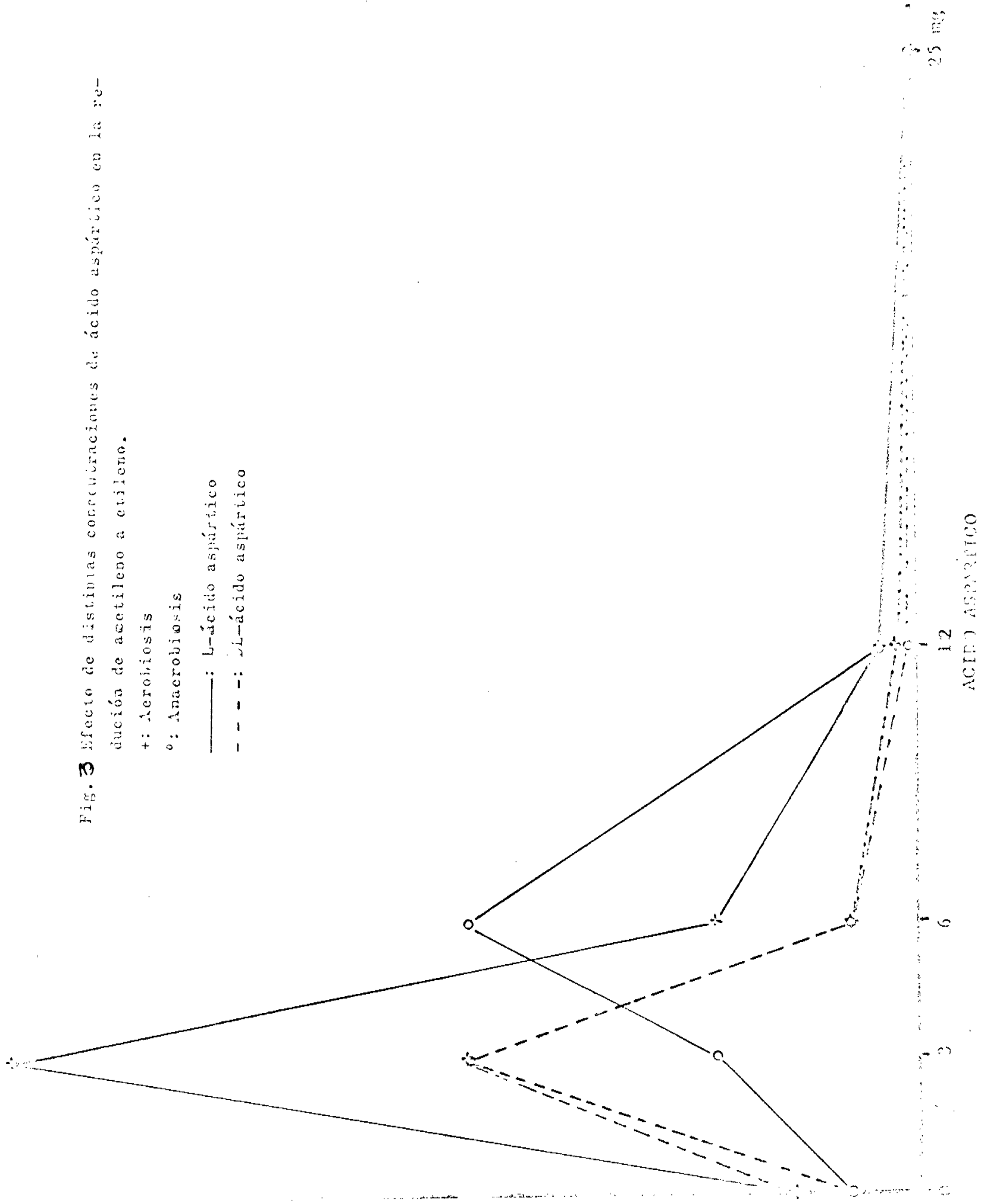
o : Anaerobiosis

— : L-ácido aspártico

- - - : DL-ácido aspártico

PERCENTO (ENLINDRES AMPLIFICADO)

1000



ACIDO ASPARTICO

25 mg

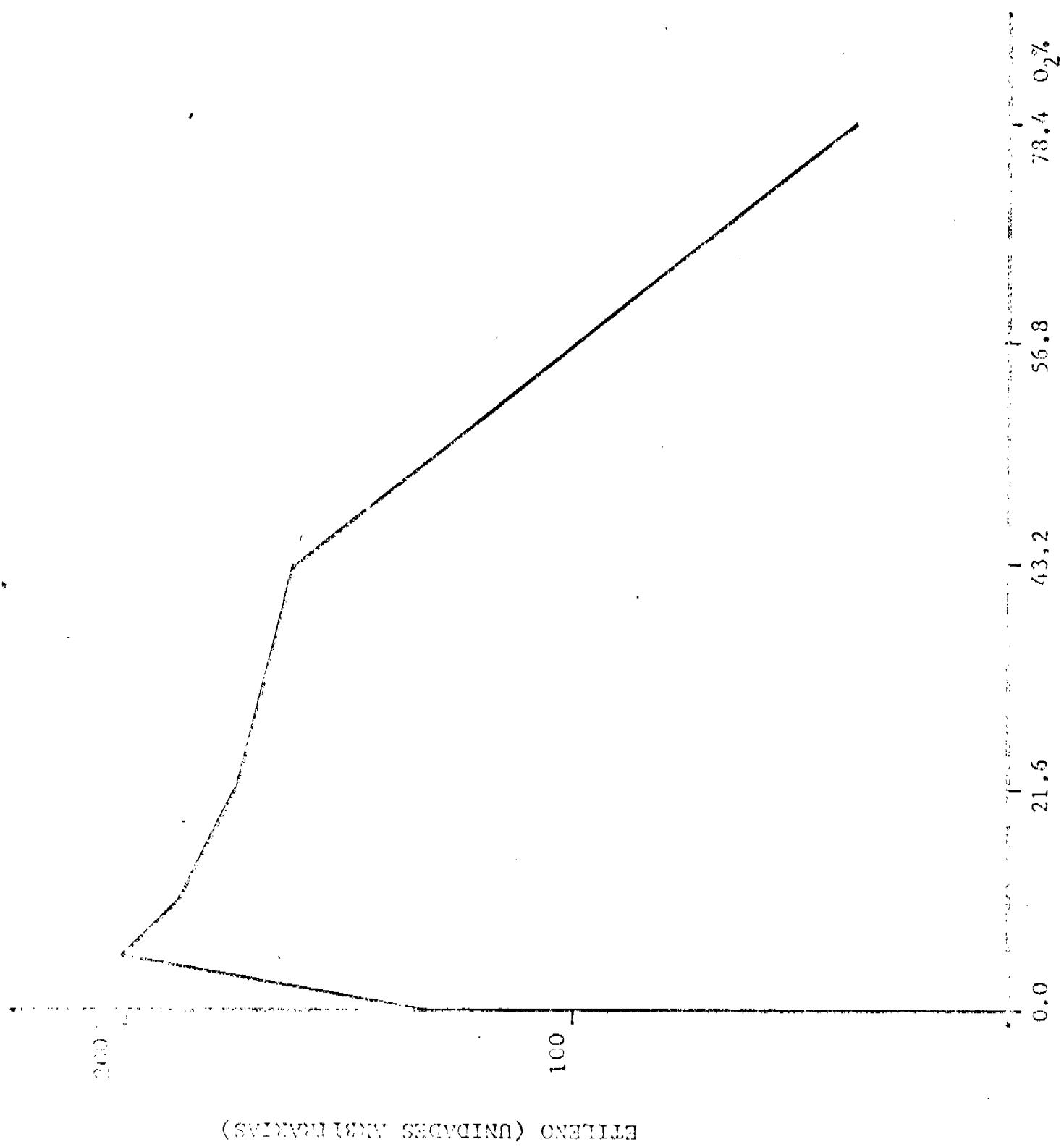


Fig. 4. Efecto de distintas tensiones de O<sub>2</sub> en la reducción de acetileno a etileno.

son inhibidos por sustancias nitrogenadas, como ha sido registrado para otros microorganismos (Pengra y Wilson, 1958). Algunos de los aminoácidos probados, no inhiben la reducción de acetileno, aun a concentraciones de 50-100 mg/20 ml de medio. Pensamos que esto es debido a que dichos aminoácidos no entran a la célula, como en el caso registrado por Yoch y Pengra (1966) para la isoleucina, en Klebsiella pneumoniae. De los aminoácidos que inhiben la reducción de acetileno, en particular los ácidos glutámico y aspártico, dicho fenómeno depende de la concentración del aminoácido en el medio: hay concentraciones (menores de 25 mg/20 ml de medio) en las cuáles la presencia del aminoácido estimula la reducción del acetileno y concentraciones mayores que la inhiben (Figuras 2 y 3). Esto último indica que hay aminoácidos que pueden servir, conjuntamente con el  $N_2$  atmosférico, como fuentes de nitrógeno para A. azotophilum.

Los resultados consignados en la figura 4, indican que tensiones altas de  $O_2$  inhiben la reducción del acetileno en A. azotophilum, lo que sugiere, como señalan Parker y Scott (1960) en Azotobacter vinelandii, que el  $O_2$  y el  $N_2$  compiten como aceptores finales de hidrógeno en el proceso de fijación de  $N_2$ .

El hecho de que una vez iniciada la fijación de  $N_2$  (reducción de acetileno) no sea inhibida al agregar sales nitrogenadas o glicina indica que la acción de la nitrogenasa no es inhibida por estas sustancias, lo que está de acuerdo con lo que registran Strandberg y Wilson (1968) para A. vinelandii; probablemente lo que sucede es que las sustancias nitrogenadas inhiben la síntesis de nueva nitrogenasa como lo indican Mahl y Wilson (1967) para K. pneumoniae; por este motivo no encontramos reducción cuando inoculamos, con A. azotophilum, un medio que contiene estas sustancias nitrogenadas.

En K. pneumoniae han demostrado que diferentes aminoácidos en dosis muy pequeñas, 10  $\mu g$ , añadidos al medio de cultivo no inhiben la fijación de nitrógeno molecular (Yoch y Pengra, 1966).

A 20 ml de medio 77S en matraces Erlenmeyer agregamos las cantidades de aminoácidos descritas en materiales y métodos. A los medios así preparados les determinamos el crecimiento del cultivo mediante el grado de absorbencia y también la reducción del acetileno a etileno, con objeto de investigar el efecto de diversos aminoácidos sobre la fijación de nitrógeno en A. azotophilum adicionando a un medio mínimo de cultivo libre de  $N_2$ ,



diferentes concentraciones de los mismos.

La figura 5 muestra la diferencia que hay en el crecimiento del cultivo usando medio 77S únicamente (testigo) y medio 77S con un aminoácido. Podemos apreciar que la fase log se presenta en el lapso de 32 a 70 horas; en el medio con alanina hicimos la medición de la absorbencia tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis, encontramos que no había diferencias considerables, por lo que el estudio de los otros aminoácidos, usados en este trabajo, sólo lo hicimos en aerobiosis. En la misma figura está indicado también el efecto del triptofano sobre el crecimiento del cultivo.

En la tabla 4 están concentrados los datos de otros experimentos en donde comparamos la formación de etileno y la absorbencia del cultivo (D.O.) a las 8, 24, 32 y 56 horas de haber añadido el inóculo. Podemos deducir que, en general, las dosis de 10 ug de aminoácido no inhiben la reducción del acetileno y, por lo tanto, la fijación de  $N_2$ , sino que por el contrario, siempre fue mayor que la del testigo excepto en la DL-metionina y, no obstante, el crecimiento de la colonia no es mucho mayor que el del testigo. Esto nos permite concluir que en estas dosis hay tanto fijación de  $N_2$  como utilización de aminoácidos, tal como lo comunican otros autores (Yoch y Pengra, 1966).

Las dosis de 0.05 mM/ml inhiben la fijación de  $N_2$  y, por el contrario, aumenta notablemente la densidad óptica del cultivo. Esto lo ilustramos con la asparagina: dosis crecientes de este compuesto tienen efecto inverso en la fijación de  $N_2$  y en el crecimiento de la colonia (figura 6). Por otra parte, la isoleucina y la metionina a dosis de 0.05 mM/ml no tienen efecto pronunciado sobre el crecimiento del cultivo y, en cambio, aumentan notablemente la fijación de  $N_2$ . Con la isoleucina, la fijación de  $N_2$  es estimulada aun a dosis de 0.05 mM/ml concentración a la cual, con otros aminoácidos, aumenta la densidad óptica del cultivo y se inhibe la fijación de  $N_2$ . Con la metionina, no hay fijación de  $N_2$  ni aumento en la densidad óptica del cultivo a dosis de 10 ug/ml, en cambio, a la dosis de 0.05 mM/ml no hay aumento en la densidad óptica del cultivo pero sí hay incremento en la fijación de  $N_2$  (tabla 4 y figuras 7 y 8).

Por los datos obtenidos, pensamos que tanto la isoleucina como la metionina no son utilizadas en la multiplicación de los individuos de la colonia, no obstante su efecto favorable en la fijación de  $N_2$  que, en el caso de la metionina sólo se manifiesta a dosis altas. Según esto, quedaría por ser aclarado cuál es el destino de las sustancias producidas como con-

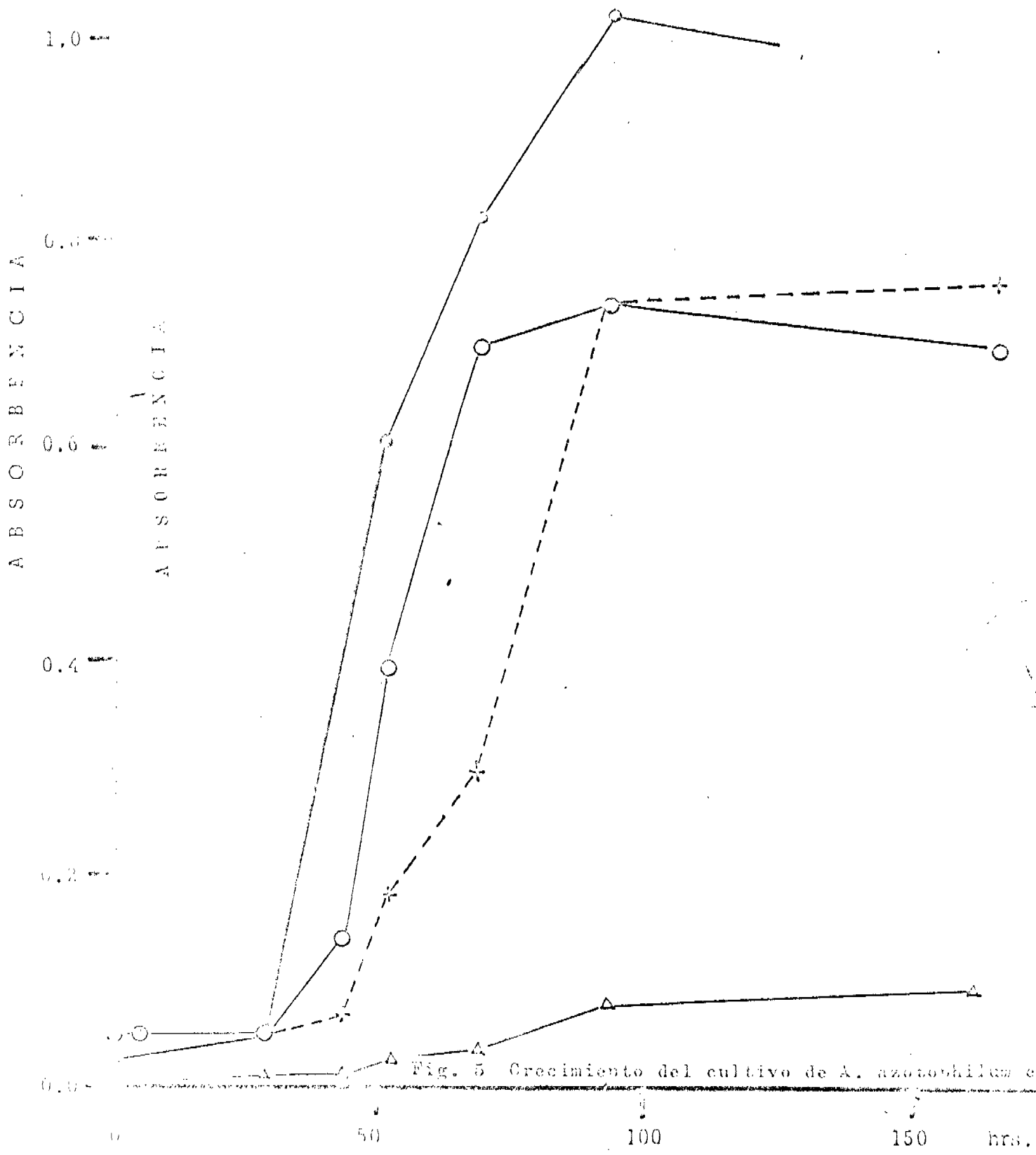


Fig. 5 Crecimiento del cultivo de *A. azotophilum* en

○ 77.5 + 50 mg de almidón en aerobiosis

○ 77.5 + 50 mg de almidón en anaerobiosis

	8 HORAS		24 HORAS		32 HORAS		56 HORAS	
	Etileno*	D.O.	Etileno*	D.O.	Etileno*	D.O.	Etileno*	D.O.
Testigo	0	1.00	4	0.10	4	0.10	40	0.15
10 µg/ml	0	1.10	4	0.30	4	0.44	70	0.56
Glicina 0.05 mM/ml	0	0.10	0	0.30	0	0.71	0	0.99
10 µg/ml	0	0.10	3	0.24	3	0.30	260	0.57
Al-Alantina 0.05 mM/ml	0	0.10	1	0.50	2	1.10	2	1.33
10 µg/ml	0	0.08	13	0.13	34	0.19	1200	0.53
Di-Isola 1.05 mM/ml	0	0.10	31	0.13	100	0.19	1440	0.19
10 µg/ml	0	0.08	0	0.08	0	0.08	0	0.15
Di-Metab 1.05 mM/ml	0	0.08	4	0.05	37	0.05	1240	0.16
10 µg/ml	0	0.10	9	0.30	10	0.44	600	0.57
Di-Aspar 0.025 mM/ml	0	0.10	3	0.55	0	0.83	10	0.93
10 µg/ml	0	0.10	0	0.78	0	1.17	3	1.29
1-Gluta 10 µg/ml	0	0.00	22	0.12	22	0.12	400	0.52
1-mico 0.05 mM/ml	0		0		0.		0	1.15
1-m. pari 10 µg/ml	0	0.00	9	0.05	44	0.05	1600	0.15
co 0.05 mM/ml	0	0.00	0	0.21	3	0.21	3	1.10
1-Isocla 10 µg/ml	0	0.00	9	0.10	41	0.20	1200	0.54

3 100 15 100 15.

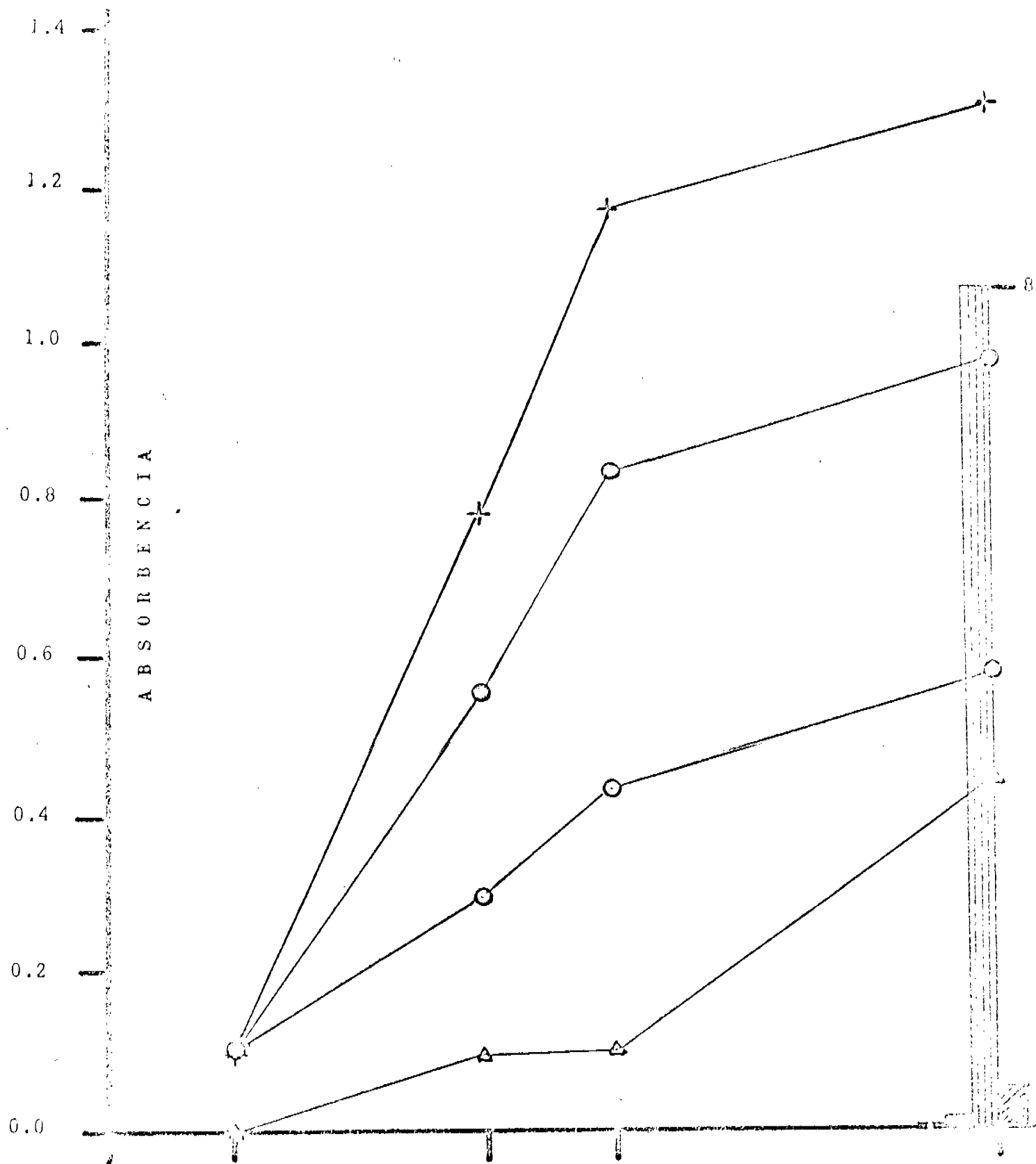


Fig. 6

- + Absorbencia y  etileno formado en 77 S + 0.05 mM/ml de 1-Asparagina
- Absorbencia y  etileno formado en 77 S + 0.025 mM/ml de 1-Asparagina
- Absorbencia y  etileno formado en 77 S + 10 µg/ml de 1-Asparagina
- △ Absorbencia y  etileno formado en 77 S

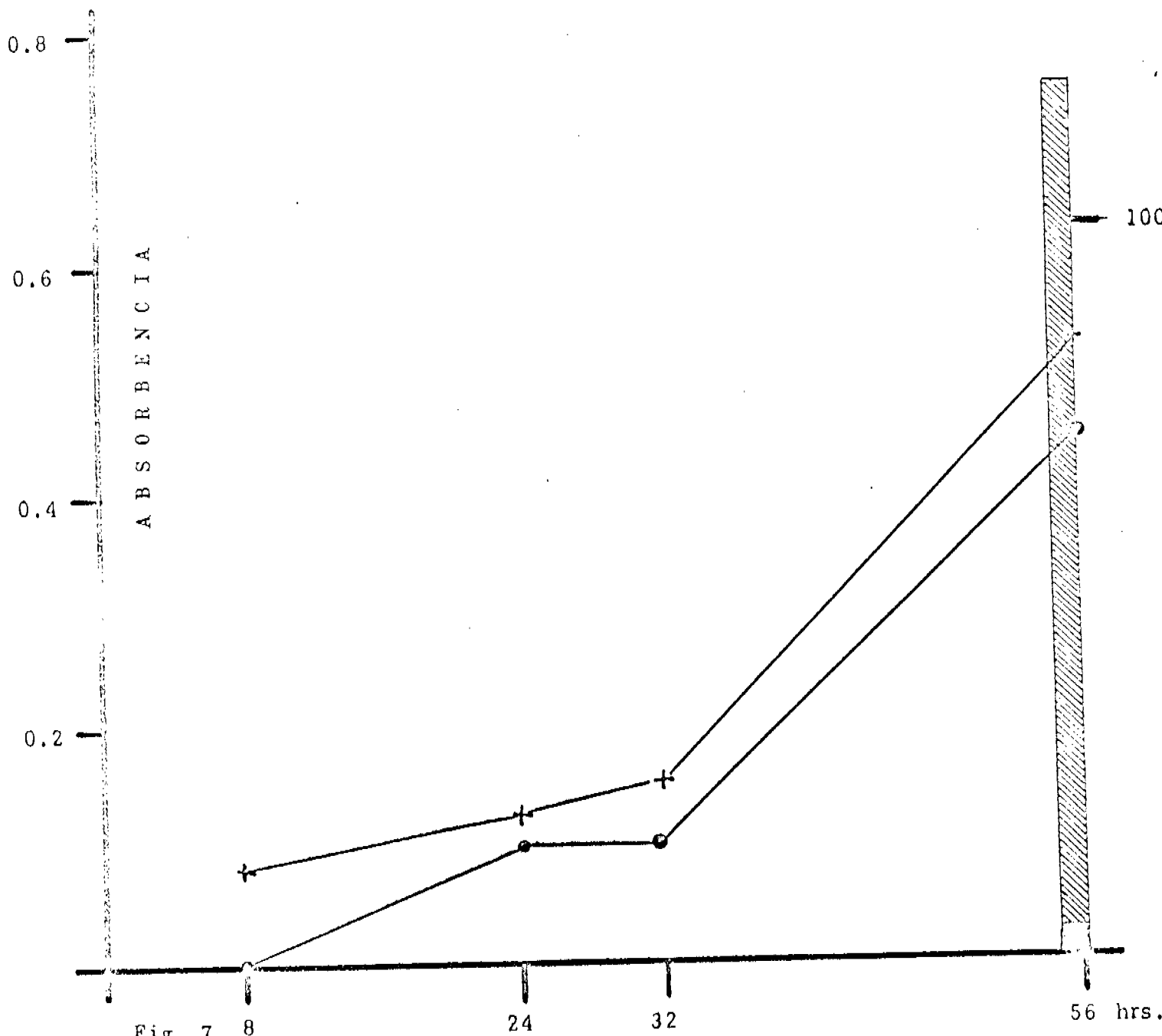


Fig. 7

+ . Absorbencia en 77 S + dl isoleucina

o Absorbencia en 77 S

□ Etileno formado en 77 S

▨ Etileno formado en 77 S + dl isoleucina

y la conveniencia de agregar la o las algas fijadoras de nitrógeno en cultivos de arroz lo cual sería una manera de agregar nitrógeno al suelo en una forma barata.

Se ha logrado obtener el cultivo unialgal de P. tenue en medio Detmer (Ortega, 1972). 20 ml de este cultivo se trataron como indicamos en materiales y métodos para analizar gases en cromatografía en fase de vapor. No se encontró reducción del acetileno, y por lo tanto no es esta alga la responsable de la fijación del  $N_2$  por el "cocollin".

FIJACION DE N<sub>2</sub> EN EL TEGÜINO Y EL PULQUE.

El "tesgüino" es una bebida alcohólica preparada por fermentación de granos de maíz germinados (Zea mays L.), propia de los indios Tarahumaras del Estado de Chihuahua, México, aunque es también consumida, principalmente por la población indígena, en otras regiones del oeste de México. El "pulque" es también una bebida alcohólica, pero es preparada por fermentación del aguamiel o secreción azucarada del maguey (Agave atrovirens Karw.) y es consumida, generalmente también por la población indígena, en la parte central del país (Santamaría, 1959).

Se encontró fijación de nitrógeno (Herrera, 1973), tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, en una muestra de tesgüino de Yerba Buena, Barranca de Batopilas, Chihuahua, México, y en muestras de pulque procedente de Santa Rosa, México D. F.

La fijación de nitrógeno, tanto por los microorganismos del tesgüino como del pulque, ocurrió en las siguientes condiciones experimentales: en matraces Erlenmeyer de 50 ml, conteniendo cada uno 20 ml de una suspensión de harina de maíz al 10% (marca Miosa) o 20 ml de medio de Burk, carente de nitrógeno, y esterilizados en el autoclave durante 20 minutos a 120°C, se inoculó por duplicado tesgüino o pulque, utilizando una asa microbiológica de 3 mm de diámetro; se incubó 72 horas, se agregó entonces la mezcla de gases y se hizo el análisis de la reducción de acetileno a etileno por cromatografía en fase de vapor siguiendo el método descrito en Materiales y Métodos.

Se considera de interés el haber encontrado microorganismos fijadores de nitrógeno en las muestras de tesgüino y pulque estudiadas, ya que, de los alimentos o bebidas fermentadas, sólo se conocía este fenómeno en el pozol y en el cocol de agua.

## BIBLIOGRAFIA

- Allen, O. N.. 1951. Experiments in soil bacteriology. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn. pp. 58, 59, 64.
- Arnon, D. I.. 1967. Physiol. Rev. 47, 317
- Benemann, J. R., Yoch, D. C., Valentine, R. C. y Arnon, D. I.. 1971. Biochim. biophys. Acta 226, 205
- Benemann, J. R. y Valentine, R. C.. 1972. Adv. Microbiol. Physiol. 8, 59
- Bergersen, F. J.. 1969. Proc. R. Soc. B. 172, 401
- Biggins, D. R. y Kelly, M.. 1970. Biochim. biophys. Acta 205, 288
- Bold, H. C.. 1949. Bull. Torrey. Bot. Club 76, 101
- Brintzinger, H.. 1966. Biochemistry, N. Y. 5, 3947
- Bui, P. T. y Mortenson, L. E.. 1969. Biochemistry, N. Y. 8, 2462
- Bulen, W. A., Burns, R. C. y LeComte, J. R.. 1964. Biochem. biophys. Res. Commun. 17, 265
- Bulen, W. A., Burns, R. C. y LeComte, J. R.. 1965. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 53, 532
- Burns, R. C. y Bulen, W. A.. 1965. Biochim. biophys. Acta 105, 437
- Burris, R. H. y Wilson, P. W.. 1957. In "Methods in Enzimology" (S. P. Colowick y N. O. Kaplan, eds.), Vol IV, p. 355, Academic Press, New York.
- Burris, R. H., Winter, H. C., Munson, T. O. y Garcia-Rivera, J.. 1965, "Nonheme Iron Proteins", Ed. A. San Pietro, p. 315, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio.
- Carnahan, J. E., Mortenson, L. E., Mower, H. F. y Castle, J. E.. 1960. Biochim. biophys. Acta 44, 521
- Cravioto, O. R., Cravioto, Y. O., Massieu, H. G. y Guzmán, G. J.. 1955. Ciencia, Méx., 15, 27
- Daesch, G. y Mortenson, L. E.. 1968. J. Bact. 96, 341
- D'Eustachio, A. J. y Hardy, R. W. F.. 1964. Biochem. biophys. Res. Commun. 15, 319
- Dilworth, M. J.. 1966. Biochim. biophys. Acta 127, 285
- Hardy, R. W. F. y Knight, E., Jr.. 1968. In "Progress in Phytochemistry" (L. Reinhold y Y. Lipschitz, eds), Vol. I, p. 407, Interscience Publishers, New York.



- Herrera, T. y Taboada, J.. 1972. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México. En prensa.
- Herrera, T., Taboada, J. y Ulloa, M.. 1973. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México. En prensa.
- Hech, G. W., Schneider, K. C. y Burris, R. H.. 1960. Biochim. Biophys. Acta **37**, 273
- Jeng, D. Y., Morris, J. A. y Mortenson, L. E.. 1970. J. Biol. Chem. **245**, 2 2809
- Kalinovskaya, T. A.. 1968. Mikrobiologika **37** (6), 1086
- Kamen, M. D. y Gest, H.. 1949. Science, N. Y. **109**, 560
- Kennedy, I. R., Morris, J. A. y Mortenson, L. E.. 1968. Biochim. biophys. Acta, **153**, 777
- Klevenskaya, I. L.. 1968. IZV SIB OTD AKAD NAUK SSSR SER. BIOL MED NAUK **L**, 31
- Knight, E., Jr. y Hardy, R. W. F.. 1966. J. Biol. Chem. **241**, 2752
- Lhotsky, S., 1946. Studia Botan. Cechoslov., **7**, 20
- Mahl, M. C. y Wilson, P. W.. 1968. Can. J. Microbiol. **14**, 32
- Mckeena, E. C., Beuemann, J. R. y Traylor, T. G.. 1970. Biochem. biophys. Res. Commun. **41**, 1501
- Mortenson, L. E.. 1961. Analyt. Biochem. **2**, 216
- Mortenson, L. E., Valentine, R. C. y Carnahan, J. E.. 1962. Biochem. biophys. Res. Commun. **7**, 448
- Mortenson, L. E., 1964. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. **52**, 272
- Munson, T. O. y Burris, R. H.. 1969. J. Bact. **97**, 1093
- Ortega, M.. 1972. Rev. lat-amer. de Microbiol. **14**, 85
- Ortega, M.. 1972. Comunicación personal.
- Parker, C. A. y Scott, P. B.. 1960. Biochim. biophys. Acta **38**, 230
- Pengra, R. M. y Wilson, P. W.. 1958. J. Bacteriol. **75**, 21
- Santamaría, F. J.. 1959. Diccionario de mexicanismos. Editorial Porrúa, S. A. México, pp. 894, 1020 y 1039.
- Schöllhorn, R. y Burris, R. H.. 1967. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. **48**, 213
- Smith, R. V. y Evans, M.C.W.. 1971. J. Bact. **105**, 913
- Stewart, W. D. P.. 1967. Science, **19**, 1426
- Stewart, W. D. P., Fitzgerald, G. P. y Burris, R. H.. 1968. Arch. Mikrobiol. **62**, 336

- Stewart, W.D.P. y Pearson, H. W.. 1970. Proc. R. Soc. B. 175, 293
- Strandberg, G. W. y Wilson, P. W.. 1968. Can. J. Microbiol. 14, 25
- Taboada, J., Herrera, T. y Ulloa, M.. 1971. Rev. lat-amer. de Química  
2, 188
- Taboada, J., Herrera, T.. 1973. An. Inst. Biol. Univ. Nat. Auton.  
México. En prensa.
- Ulloa, M., Herrera, T. y de la Lanza, G.. 1971. Rev. lat-amer. Micro-  
biol. 13, 113
- Wilson, P. W., Hull, J. F. y Burris, R. H.. 1943. Proc. natn. Acad.  
Sci. U.S.A. 29, 289
- Wilson, P. W. y Knight, S. G.. 1952. Experiments in Bacterial Physio-  
logy. Burgess Publishing Co., p. 53
- Yoch, D. C. y Pengra, R. M.. 1956. J. Bact. 92, 618