

Tesis de Posgrado

Fijación de nitrógeno por cianofíceas aisladas de arrozales de Argentina

Zaccaro de Mule, María Cristina

1981

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Zaccaro de Mule, María Cristina. (1981). Fijación de nitrógeno por cianofíceas aisladas de arrozales de Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1682_ZaccarodeMule.pdf

Cita tipo Chicago:

Zaccaro de Mule, María Cristina. "Fijación de nitrógeno por cianofíceas aisladas de arrozales de Argentina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1981.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1682_ZaccarodeMule.pdf

1682

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

" FIJACION DE NITROGENO POR CIANOFICEAS AISLADAS DE ARROZALES DE ARGENTINA "

AUTOR: MARIA CRISTINA ZACCARO DE MULE

DIRECTOR: Dra. DELIA R. DE HALPERIN

TRABAJO REALIZADO EN LOS LABORATORIOS DE FISILOGIA VEGETAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES (UBA).

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS.

-1981-

1682
2

A Delia R. de Halperin,
a quien debo mi formación.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Delia R. de Halperin, por su calidad humana y por su apoyo científico desde mi trabajo de seminario has ta hoy, y especialmente por brindarme su afecto.

Al Dr. Juan Accorinti por la supervisión de mi formación de post-grado.

Al Departamento de Estadística de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por la colaboración prestada.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron para que esta investigación pudiera realizarse.

INDICE

INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	4
1- <u>Cianofceas fijadoras de nitrógeno</u>	4
1.1 Período 1889-1953	4
1.2 Período 1954-1966	8
1.3 Estudios recientes: 1967-1980	10
1.4 N6mina de cianofceas axénicas fijadoras de N ₂	15
2- <u>Bioquímica de la fijación de N₂</u>	19
2.1 Filamentosas con heterocistos	19
2.1.1 Estructura del heterocisto	19
2.1.2 Bioquímica de los heterocistos	23
a) Actividades fotosintéticas	23
b) Metabolismo del carbono	25
c) Fuente de poder reductor	26
d) Metabolismo del nitrógeno	28
2.2 Unicelulares y filamentosas sin heterocistos	28
3- <u>Importancia agrícola de las algas azules</u>	31
MATERIAL Y METODOS	39
1- <u>Material</u>	39
1.1 Muestras	39
1.2 Cepas	40
1.3 Medios de cultivo	41
1.4 Luz ultravioleta (U.V.)	41

2- <u>Métodos</u>	43
2.1 Obtención de cultivos axénicos	43
a) Irradiación con luz ultravioleta	43
b) Controles de pureza	44
2.2 Determinación de porcentaje de N, contenido proteico y N fijado	44
2.3 Tratamiento estadístico de los datos obtenidos	47
RESULTADOS Y CONCLUSIONES	49
1- Obtención de cepas axénicas por irradiación con luz U.V. de 2537 Å	54
2- Modificaciones en el pH del medio de cultivo	62
3- Comprobación de la capacidad de fijar N ₂ de las cepas estudiadas	65
4- Correlación entre aumento de peso seco y capacidad de fijación.	69
5- Selección de cepas con mayor contenido proteico	73
a) No tratadas con U.V.	74
b) Tratadas con U.V. (axénicas)	74
6- Influencia del tratamiento con luz U.V. sobre el contenido proteico (% N x 6,25)	76
7- Selección de cepas buenas fijadoras de N ₂	79
a) No irradiadas	79
b) Irradiadas (axénicas)	79
8- Influencia del tratamiento con luz U.V. sobre el N fijado	80
BIBLIOGRAFIA	86

INTRODUCCION

El nitrógeno gaseoso (N_2) constituye aproximadamente el 80% de la atmósfera terrestre, pero en esa condición de gas inerte no puede ser utilizado por la mayoría de los organismos.

Sólo algunos microorganismos procariotas (bacterias y algas azules o cianofíceas) tienen la capacidad de fijar el nitrógeno molecular. La fijación biológica de N_2 es la conversión enzimática de dinitrógeno de la atmósfera a NH_3 mediante la actividad de la nitrogenasa. Todos los organismos que fijan N_2 contienen esta enzima, cuya estructura no parece diferir significativamente de una especie fijadora a otra. Ningún organismo superior presenta esta capacidad, si bien algunos participan indirectamente a través del establecimiento de asociaciones simbióticas obligatorias o asociativas con bacterias o algas azules fijadoras de N_2 .

A diferencia de la mayoría de las bacterias fijadoras que necesitan energía exógena para fijar nitrógeno, las algas azules convierten fotoautotróficamente la energía solar en la energía requerida para la fijación de N_2 . Por lo tanto, su empleo representa la forma más directa de utilizar energía solar para incrementar el nitrógeno disponible, de donde derivan sus posibilidades agrícolas como biofertilizantes y alimenticias como fuente de proteínas.

Con respecto a su aplicación como biofertilizante la experiencia obtenida en los arrozales de la India indica que el agregado de algas al suelo (algalización) equivale a fertilizar con 20-30 kg. de N comercial/ha/cosecha; y que en el caso de utilizar fertilizantes comerciales, se puede reemplazar un 30% de los mismos por inoculación algal, lo que ya representa una economía

considerable. Si además se tiene en cuenta que el precio de estos fertilizantes está directamente relacionado con el de los combustibles fósiles, todo ahorro en el consumo de nitrógeno químico, sin afectar la productividad, implicaría una ventaja significativa en estos momentos de crisis energética mundial.

Cabe destacar por otra parte, que el costo de los biofertilizantes algales no sólo es considerablemente más bajo que el de los productos químicos sino que además aumentan el rendimiento del cultivo por acción de las sustancias biológicamente activas que liberan al medio.

A los efectos de asegurar una mejor implantación de las algas en el suelo, es de fundamental importancia conocer la flora algal indígena, composición e incidencia relativa de formas útiles (fijadoras de N_2), sobre todo cuando se requiere reforzar la flora autóctona con especies locales seleccionadas por su elevada capacidad de fijación, o implantarlas en regiones pobres en formas útiles.

En base a estas consideraciones, nos pareció de interés iniciar en nuestro país la selección de algas azules fijadoras N atmosférico con miras a su aplicación en la agricultura como biofertilizantes.

El presente trabajo de tesis se realizó a partir de cepas unialgales aisladas por Delia R. de Halperin de arrozales de Argentina (Entre Ríos, Concepción del Uruguay, 1966) en un medio selectivo carente de nitrógeno combinado, en el cual se mantienen por trasplantes sucesivos.

Un requisito indispensable para asegurar fehacientemente la capacidad de fijar N_2 de las algas en estudio, fue medir esta propiedad en condición de cultivo axénico. De acuerdo a nuestra experiencia, el método más eficaz para lograr dicha condición es la irradiación con luz ultravioleta (U.V.), pero dadas las propieda-

des mutagénicas de este agente físico, consideramos oportuno de terminar estadísticamente si este tratamiento afecta la capacidad de fijar N_2 .

La selección de buenas fijadoras se realizó a nivel de cepas unialgales y de las correspondientes irradiadas en condición axénica.

Este trabajo se llevó a cabo de acuerdo al siguiente plan:

1.- Obtención de cultivos axénicos a partir de cianofíceas en condición unialgal, aisladas de arrozales de Argentina en un medio carente de nitrógeno combinado.

a- Irradiación de las cepas con luz U.V. durante distintos intervalos.

b- Preparación de subcultivos y determinación de su viabilidad.

c- Controles de pureza para verificar axenidad.

2.- Comparación de la capacidad de fijar nitrógeno de las cepas originales, sin irradiación y de las axénicas (efecto de la irradiación con U.V.).

3.- Selección de buenas fijadoras de N_2

Para cada cepa estudiada se determinaron los siguientes parámetros: peso seco de la masa algal inicial y final (a los 60 días); pH inicial y final de medio de cultivo; volumen final del mismo y N fijado en mg de N/100 ml de medio de cultivo libre de N combinado, porcentaje de N de la masa algal y contenido proteico de la misma a los 60 días.

ANTECEDENTES

1- Cianofíceas fijadoras de nitrógeno: El estudio de la fijación de N_2 en algas azules (cianofíceas) puede dividirse en tres períodos (Stewart, 1974).

1.1-Período 1889-1953

Desde los primeros estudios sobre la fijación biológica de N_2 , se señaló la posibilidad de que las algas realizaran este proceso. Ya en 1889, Frank afirmó que ellas eran capaces de aprovechar el nitrógeno del aire de acuerdo a resultados obtenidos en suelos que contenían una mezcla de algas azules y verdes. A partir de dicha fecha, se logró evidenciar esta propiedad en diversas cepas de algas azules, pero los trabajos fueron cuestionados dado que se utilizaron técnicas químicas inapropiadas o cultivos no axénicos, es decir que no quedaba descartada la posibilidad de que los organismos responsables de la fijación de N_2 , fueran las bacterias asociadas con las algas. Por otra parte, en muchos casos los resultados fueron negativos debido a que se intentaba demostrar fijación de N_2 en algas no cianofíceas, en particular algas verdes. Actualmente se sabe que las cianofíceas son las únicas algas que poseen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, siendo junto con las bacterias fotosintéticas los dos grupos con especies que además de fijar CO_2 , fijan N_2 .

En 1914, Pringsheim diseñó el primer método que asegura la obtención de cultivos puros de algas azules. En estas condiciones, obtuvo algunas *Oscillatoriaceae* y una especie de *Nostoc*, pero no pudo demostrar fijación de N_2 en estos cultivos axénicos.

La prueba definitiva de que algunas especies de algas azules poseen la capacidad de fijar N_2 se obtuvo en 1928, cuando Drewes demostró que dos cepas de cianofíceas en cultivo puro (*Anabaena variabilis* y *Nostoc punctiforme*⁽¹⁾), fijaban N elemental.

Allison y colaboradores (1930-1937) confirmaron la capacidad de fijación de otra cepa con heterocistos⁽²⁾: *Nostoc muscorum* aislada del suelo, y obtenida en condición axénica mediante luz U.V. Además determinaron las condiciones que favorecen la fijación de N_2 , entre ellas la aireación de los cultivos con aire conteniendo 1% de CO_2 .

En 1932, Copeland obtuvo evidencias de fijación de N_2 en cepas sin heterocistos provenientes de aguas termales, pero sus trabajos fueron cuestionados por no ser axénicas.

Las investigaciones de Fritsch y De (1938) y De (1939) demostraron la fijación de N_2 en tres especies de *Anabaena* aisladas de suelos de arrozales de la India y fueron los primeros en reconocer la importancia de las algas azules en la economía del N de dichos suelos.

Bortels (1940) aisló de muestras de suelo, varias cepas de *Nostocaceae* pertenecientes a los géneros *Nostoc*, *Anabaena* y *Cylindrospermum* y estudió la influencia del molibdeno (Mo) sobre la capacidad de fijación de cepas axénicas y no axénicas. Los valores de fijación de N_2 obtenidos para los dos últimos géneros citados, en condición axénica sin y con agregado de Mo demostraron el requerimiento de este elemento para una mayor eficacia en dicho pro-

(1) Los valores de fijación de las cepas axénicas mencionadas de aquí en adelante y que han sido determinados por el método de Kjeldahl, se consignan en el punto 1.4 de Cianofíceas fijadoras de N_2 .

(2) Célula vegetativa diferenciada típica de las algas azules, cuya estructura y función se verá más adelante.

ceso.

En el año 1940, se suponía en general, que las algas intervenían en el proceso de fijación en 2 formas diferentes: directamente, fijando N_2 e indirectamente, suministrando a las bacterias fijadoras de N_2 , en especial *Azotobacter*, los compuestos de carbono necesarios como fuente de energía para el proceso de fijación. Stokes (1940;1941), concluyó de sus experiencias que el rol indirecto es pequeño o inexistente y que las algas azules deben ser consideradas como participantes directos en la fijación de N_2 en el suelo.

Fogg (1942), observó que la fijación de N_2 en *Anabaena cylindrica*, como en otros organismos fijadores, no ocurre en presencia de un cierto nivel de N combinado. Para la cepa mencionada, la inhibición de la fijación ocurría con una concentración mayor de 4 ppm de nitrato en el medio de cultivo. Obtuvo resultados comparables en una experiencia similar con cloruro de amonio.

En 1946, Hérisset, determinó fijación de N_2 en un cultivo puro de *Nostoc muscorum* no indicando los métodos utilizados para verificar la axenidad del mismo.

Se debe a Fogg (1947) la primera reseña sobre la fijación de N_2 por algas azules. Como hasta esa fecha sólo había pruebas convincentes de dicha capacidad en especies de los géneros *Nostoc*, *Anabaena*, *Cylindrospermum* y *Aulosira*, todas pertenecientes a las *Nostocaceae*, se pensó que la fijación de N_2 estaría confinada a dicha familia. El autor indica además las condiciones necesarias, conocidas hasta entonces, para que ocurra fijación de N_2 : crecimiento activo del cultivo, ausencia de N combinado, presencia de Mo en el medio y pH relativamente alcalino. Destaca también: 1- que las algas azules son los organismos autotróficos más completos por sintetizar las sustancias biológicas necesarias a partir de CO_2 , agua, N_2 y sales minerales y 2- que el nitrógeno fijado por

ellas puede ser asimilado por organismos no fijadores. Considera también la importancia de las cianofíceas en los distintos hábitats donde residen, especialmente en suelos tropicales.

Al año siguiente, Virtanem (1948) publicó también una revisión referida principalmente a la fisiología y bioquímica de la fijación de N_2 .

La primera cita de fijación por una cianofícea axénica no perteneciente a las *Nostocaceae*, le correspondió a Fogg (1951), quien demostró dicha capacidad en un cultivo de *Mastigocladus laminosus* (*Stigonemataceae*) especie característica de aguas termales.

Watanabe (1951) y Watanabe et al. (1951) determinaron la capacidad de fijación de cuatro cepas axénicas: *Tolypothrix tenuis* (primera cita de una *Scytonemataceae* fijadora), *Calothrix brevissima* (primera cita de una *Rivulariaceae* fijadora), *Anabaenopsis* sp. y *Nostoc* sp.

Henriksson (1951), aisló en condición axénica una cepa de *Nostoc* del líquen *Collema tenax* determinando su capacidad de fijación de N_2 .

Es decir que a principios de la década del 50 se confirmó la fijación de N_2 en cultivos axénicos de diversas cianofíceas heterocísticas mediante técnicas de análisis de N total (método de Kjeldahl) y la técnica del ^{15}N . Esta última fue utilizada por primera vez por Burris y colaboradores en 1943, en un cultivo puro de *Nostoc muscorum*. Williams y Burris (1952), utilizaron también la marcación con ^{15}N para determinar la capacidad de fijación en cultivos axénicos de: *Calothrix parietina*; una cepa tentativamente identificada como *Nostoc* sp. y *Nostoc muscorum*. En esta última especie y con la misma técnica, Magee y Burris (1954) estudiaron el metabolismo del nitrógeno.

En 1954, Fogg y Wolfe en una extensa revisión sobre el metabolismo del N en las algas azules, destacaron como carac-

terística del mismo la flexibilidad de este grupo de algas que pueden utilizar para su crecimiento tanto N elemental (N_2), nitratos, nitritos y amonio, como caseína (N orgánico). Incluyeron una lista de especies fijadoras (21 cepas correspondientes a 8 géneros incluidos en las familias *Nostocaceae*, *Rivulariaceae*, *Scytonemataceae* y *Stigonemateceae*).

Vemos pues, que hasta 1954 todas las algas azules fijadoras correspondían a especies heterocísticas, cuya capacidad de fijación se determinó en condiciones aeróbicas.

1.2 Período 1954-1966

Este período corresponde a la consolidación de los conocimientos relacionados con la capacidad de fijación de las cianofíceas. Durante estos años se confirmó esta propiedad en una serie de especies correspondientes a géneros ya conocidos como fijadores de N_2 y de nuevos géneros tales como: *Scytonema* (Cameron y Fuller, 1960), *Hapalosiphon* (Taha, 1963) y *Stigonema* (Venkataraman, 1961 a), todos ellos filamentosos con heterocistos.

También se aislaron algas azules endofíticas como *Anabaena cycadeae* de las raíces coraloides de *Cycas revoluta* (Venkataraman et al., 1964; Goyal y Venkataraman, 1964), y *Anabaena azollae* de *Azolla pinnata* (Venkataraman, 1962), determinándose en cultivo la capacidad de fijación.

Con respecto a especies unicelulares, obviamente no heterocísticas, ya en 1941 Odintzova había observado que una cianofícea de este grupo, *Gloeocapsa minor* fijaba N_2 . Por su parte Cameron y Fuller (1960), habían informado sobre la capacidad de fijación de otra unicelular, *Chroococcus rufescens*, pero ambos resultados fueron cuestionados por no utilizar cultivos axénicos. En 1962, Fay y Fogg demostraron que *Chlorogloea fristchii* cianofícea considerada unicelular (Mitra, 1950) fijaba N_2 en cultivo puro lo cual representaba la primera cita fehaciente de una unicelular fijadora de N_2 . Pero en estudios taxonómicos posteriores se reve-

ló en dicha especie la presencia de heterocistos, reclasificándola como *Nostoc fristchii* (Mitra) Schwabe et Ayouty (1966). Esta circunstancia robusteció la idea de que en las algas azules la capacidad de fijación estaba confinada a las especies heterocísticas.

Además de la búsqueda de nuevas algas fijadoras de N_2 , gran parte del esfuerzo durante este período fue dedicado al estudio de la fisiología del grupo, en particular las interrelaciones entre fotosíntesis y fijación de N_2 (Allen, 1956; Fay y Fogg, 1962), el crecimiento heterotrófico (Kratz y Myers, 1955; Watanabe y Yamamoto, 1967), la fijación de N_2 en oscuridad (Fogg, 1960), la nutrición mineral del grupo (Allen, 1952; Kratz y Myers, 1955) y el rol de los distintos iones sobre la fijación de N_2 (Taha y El Refai, 1962). También se logró obtener fijación de N_2 en extractos libres de células de 5 cepas de algas azules (Schneider et al., 1960).

Fogg en 1956 señaló que sólo unos pocos microorganismos, entre ellos ciertas algas azules, pueden realizar fotosíntesis y fijación de N_2 y destacó la importancia ecológica de los mismos. En una revisión posterior (Fogg, 1962) se refirió a la distribución en las algas azules de la capacidad de fijar N_2 así como a la bioquímica y fisiología de esta función.

También durante estos años, se destacó la importancia de las algas fijadoras de N_2 en hábitats naturales. Mitra (1961), entre otros, consideró que las algas cumplen un papel preponderante tanto en suelos vírgenes como en la recuperación de N en suelos tropicales. Varias técnicas se usaron para medir fijación de N_2 "in situ": medida de N total (Singh, 1961), análisis gasométrico (De y Mandal, 1956), aumento en el rendimiento total de la cosecha (De y Sulaiman, 1950; Watanabe et al., 1951) y la marcación con $^{15}N_2$. Esta última técnica aunque más costosa, es la más exacta según Stewart (1974) y fue utilizada para medir la fijación de N_2 en lagos, suelos y ambientes marinos.

Fogg y Stewart en 1965 resumen el estado de los conocimientos al finalizar este período indicando que "la investigación de los mecanismos del proceso (fijación de N_2) ha progresado en forma lenta y sorprendentemente se obtuvo poca información cuantitativa acerca de las velocidades de fijación en ambientes naturales."

1.3 Estudios recientes: 1967-1980

A partir de 1967 se avanzó rápidamente en el conocimiento de las algas fijadoras de N_2 . Esto se debió no sólo a un mayor esfuerzo en la investigación por fisiólogos, bioquímicos, ecólogos y microscopistas electrónicos sino también a mejores métodos de laboratorio tanto para el cultivo de algas en condición axénica como a nuevas técnicas para la medición de la fijación de N_2 .

El avance metodológico más importante, se basó en el descubrimiento de que la enzima nitrogenasa reduce acetileno a etileno. Stewart et al. (1968), aplicaron por primera vez en algas azules esta técnica de reducción del acetileno tanto en laboratorio como "in situ". Cabe destacar por otra parte, que ella ha favorecido notablemente la creciente comprensión del proceso de fijación N_2 .

Al comienzo de este período se conocían más de 40 especies (Stewart, 1970) y cerca de 90 cepas (Laporte y Pourriot, 1967) de algas azules heterocísticas fijadoras de N_2 en condición axénica, en aerobiosis. La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico parecía estar correlacionada únicamente con la presencia de heterocistos, tanto es así que en 1968 Fay et al. consideran al heterocisto como el único sitio probable de fijación de N_2 .

Sin embargo, este concepto fue prontamente reconsiderado a la luz de los trabajos de Wyatt y Silvey (1969), quienes informaron que una cepa unicelular axénica de *Gloeocapsa alpicola*

(795) reducía acetileno a etileno, en aerobiosis. Este mismo año se demostró positivamente que el heterocisto es asiento de la fijación de N_2 (Stewart et al., 1969).

Luego del descubrimiento de Wyatt y Silvey, hubo opiniones opuestas al concepto de Fay y Stewart como las de Ohmori y Hattori (1971), para quienes todas las algas azules tienen nitrogenasa y los heterocistos no están relacionados con la fijación de N_2 .

A partir del año 1971, diversos investigadores informaron sobre la fijación de N_2 por cianofíceas unicelulares. Así, Rippka et al. en 1971 probaron la capacidad de fijación de 20 cepas axénicas de *Chroococcaceae* en condición aeróbica y en un medio sin N combinado, de las cuales solamente *Gloeocapsa alpicola* (Nº 6501) mostró un buen crecimiento, siendo mantenida a través de repetidos trasplantes en el mismo medio. Dado que esta cepa junto con la de Wyatt y Silvey (l.c.) eran las únicas algas unicelulares conocidas que mostraban actividad de nitrogenasa, Rippka y colaboradores concluyeron que la fijación aeróbica de N_2 , por algas unicelulares, era de rara ocurrencia.

Posteriormente se probó que otras 3 cepas axénicas pertenecientes a ese mismo género, eran fijadoras de N_2 en condiciones aeróbicas (Rippka y Stanier, 1976 según Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Singh (1973, 1977), demostró la capacidad de fijar N_2 en condición aeróbica de dos cepas de *Aphanothece*: *Aphanothece pallida* y *Aphanothece castagnei* aisladas de arrozales de la India.

Por nuestra parte (Halperin et al., 1977), hemos observado que un cultivo axénico de *Aphanothece stagnina* aislada de arrozales de Argentina, crece continuamente en un medio libre de N combinado bajo condiciones aeróbicas.

En resumen, la fijación de N_2 aeróbica por algas azules unicelulares fue demostrada para 5 cepas de *Gloeocapsa* y para 3 cepas de *Aphanothece*.

Además, Rippka y Stanier (l.c.) encontraron que sólo 3 de las 51 cepas de *Chroococcaceae* probadas producen nitrogenasa anaeróbicamente excluyendo las cepas de *Gloeocapsa* que fijan N_2 aeróbicamente.

Es decir, que de 59 cepas de *Chroococcaceae* probadas, 8 fijan en condiciones aeróbicas y sólo 3 en anaerobiosis, de lo cual puede concluirse que la fijación de N_2 en las unicelulares parece estar confinada a un grupo reducido.

Las algas azules son microorganismos característicamente fotoautótrofos que liberan oxígeno molecular durante la fotosíntesis.

Stewart y Pearson (1970) observaron que si el O_2 libre se acumula en altas concentraciones puede inhibir procesos metabólicos importantes tales como la fotosíntesis, fijación N_2 y respiración. Esto no parece deberse sólo a un efecto sobre la fijación de N_2 ya que altos niveles de pO_2 inhiben el metabolismo de una especie no fijadora de N_2 (*Phormidium*) y también de una fijadora, (*Anabaena flos-aquae*) cuando crecen en un medio con N combinado. *Anabaena flos-aquae* podía fijar N_2 a mayores velocidades si los cultivos crecían anaeróbicamente o microaeróbicamente (3) con respecto a los cultivos aeróbicos. Si bien la razón de esta diferencia es incierta, una posibilidad es que las células vegetativas puedan producir nitrogenasa activa sólo en condiciones microaeróbicas o anaeróbicas (Smith y Evans, 1970). Debido a la controversia sobre las técnicas para separar células vegetativas y heterocistos de un mismo cultivo, Stewart y Lex

(3)- El término microaeróbico fue usado por Stewart y Pearson (1970) en el caso de cultivos insuflados con una mezcla de gases que no contiene O_2 , pero que lo producen como resultado de la fotosíntesis.

(1970) decidieron usar una cianofícea filamentosa sin heterocistos para probar si desarrollaba nitrogenasa en sus células vegetativas bajo condiciones microaeróbicas. Eligieron *Plectonema boryanum* (*Oscillatoriaceae*) la cual presenta falsas ramificaciones, característica de muchas algas fijadoras de N_2 con heterocistos. Encontraron que desarrollaba actividad de nitrogenasa bajo condiciones anaeróbicas pero no en los cultivos burbujeados con aire. Tales resultados probaron que las células vegetativas de *P. boryanum* tienen nitrogenasa, activa bajo condiciones anaeróbicas o microaeróbicas pero no en aire. Aunque estos resultados no demostraron la presencia de nitrogenasa activa en las células vegetativas de las algas con heterocistos, permitieron revelar la existencia de un grupo de algas fijadoras de N_2 semejantes a las bacterias fotosintéticas, dado que son capaces de fijar N_2 bajo condiciones anaeróbicas pero no en aerobiosis.

Desde entonces, otras algas filamentosas sin heterocistos han sido confirmadas como fijadoras de N_2 únicamente en anaerobiosis. Con estas características, se han encontrado 22 de 42 *Oscillatoriaceae* y 18 de 29 Pleurocapsales examinadas (Rippka y Stanier 1976, según Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Los descubrimientos de fijación de N_2 por ciertas formas sin heterocistos sólo bajo condiciones anaeróbicas, son también de interés desde un punto de vista ecológico. Como Stewart y Pearson (l.c.) señalaron, las algas azules son características de muchos hábitats donde pueden prevalecer condiciones reductoras o de bajas tensiones de O_2 , por ejemplo: campos de arroz inundados, regiones de aguas termales, pantanos salobres, etc.

En resumen, si bien desde 1889 se sospechaba que las algas fuesen fijadoras de N_2 , la prueba definitiva la obtuvo Drewes en 1928. A partir de esta fecha, muchos estudios se encaminaron a demostrar esta capacidad en el mayor número posible de especies. Con respecto a la distribución de esta propiedad, hasta 1953 todas las algas azules fijadoras conocidas pertenecían a especies heterocísticas cuya capacidad de fijación se determinó en condición aeróbica.

En el período comprendido entre 1954 y 1966, además de la búsqueda de nuevas especies fijadoras, gran parte del esfuerzo de los investigadores estuvo dedicado al estudio de la fisiología de este grupo de algas. Pero, con respecto a las especies capaces de fijar N atmosférico se seguía considerando que esta propiedad estaba correlacionada únicamente con la presencia de heterocistos (Fay et al., 1968; Stewart et al., 1969). Las determinaciones se hicieron sólo en aerobiosis,

A partir de 1968 se avanzó muy rápidamente en el conocimiento de la fijación de N_2 , debido en gran parte a la utilización de la técnica de reducción del acetileno a etileno en el estudio de este proceso en las algas azules (Stewart et al., 1968). Wyatt y Silvey en 1969 descubrieron la primera cepa unicelular axénica fijadora de N_2 en aerobiosis y Stewart y Lex en 1970, la primera filamentosa no heterocística, la cual fijaba bajo condiciones de anaerobiosis o microaerobiosis. Estos trabajos condujeron a una serie de estudios para determinar la posible capacidad de numerosas especies pertenecientes a ambos grupos (unicelulares y filamentosas sin heterocistos) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

Hasta la fecha, se conocen más de 100 especies fijadoras de N_2 (filamentosas con heterocistos, filamentosas no heterocísticas y unicelulares). Además, se lograron grandes avances en el conocimiento de la bioquímica del proceso de fijación, sobre todo a nivel del heterocisto (Haselkorn, 1978, Haselkorn et al., 1980; Wolk, 1980).

1.4 Nómina de cianofíceas axénicas fijadoras de N₂

La lista que se presenta a continuación, de acuerdo a la información bibliográfica, consigna la capacidad de fijación de cepas axénicas de cianofíceas determinada por la técnica de Kjeldahl, técnica que hemos utilizado en el presente trabajo.

ESPECIES	N FIJADO (mg)	MEDIO MINE- RAL (ml)	TIEMPO (dias)	AUTORES
NOSTOCALES				
NOSTOCACEAE				
* <i>Anabaena azollae</i>	3,49	100	30	Venkataraman, 1962.
* <i>Anabaena cycadeae</i>	3,11	100	15	Venkararaman et al. 1964.
° <i>Anabaena cylindrica</i>	1,56	100	50	Fogg, 1942.
* <i>Anabaena cylindrica</i>	17,5	100	20	Fogg, 1951.
° <i>Anabaena flos-aquae</i>				Davis et al., 1966
* <i>Anabaena gelatinicola</i>	1,47	50	50	Taha y El Refai, 1963
° <i>Anabaena gelatinosa</i>	3,5	100	60	De, 1939.
* <i>Anabaena halensis</i>	4,75 y 7,45	100	31	Bortels, 1940 (Mo; +Mo)
* <i>Anabaena humicola</i>	6 y 8,45	100	31	Bortels, 1940 (Mo; +Mo)
° <i>Anabaena levanderi</i>				Cameron y Fuller, 1960
° <i>Anabaena naviculoides</i>	2,65	100	60	De, 1939
° <i>Anabaena spiroides</i>				Cameron y Fuller, 1960
* <i>Anabaena torulosa</i>	10,2 y 18,15	100	60	Bortels, 1940 (Mo; +Mo)
° <i>Anabaena variabilis</i>	2,4 y 2,64	250	60	Drewes, 1928 (medio 1 y 2)
° <i>Anabaena variabilis</i>	4,1	100	60	De, 1939
* <i>Anabaena variabilis</i>	8,4 y 12,2	100	60	Bortels, 1940 (Mo; +Mo)
* <i>Anabaena variabilis</i>	27	1000	15	Taha, 1963
+ <i>Anabaena variabilis</i>	2,75	100	35	Singh, 1979
* <i>Anabaenopsis circularis</i>	2,12	100	60	Watanabe, 1959 a
* <i>Anabaenopsis sp.</i>	3,4	100	60	Watanabe, 1951 (+glucosa)
* <i>Cylindrospermum maius</i>	8,65 y 10,95	100	60	Bortels, 1940 (-Mo; +Mo)
* <i>Cylindrospermum sphaerica</i>	3,92	75	55	Venkataraman et al., 1959.

ESPECIES	N FIJADO (mg)	MEDIO MI- NERAL (ml)	TIEMPO (días)	AUTORES
* <i>Nodularia harveyana</i>	1,33	100	45	Tiwari y Pandey, 1976
+ <i>Nostoc commune</i>	1,8	50	28	Taha y El Refai, 1962
* <i>Nostoc commune</i>	1,7	50	50	Taha y El Refai, 1963
* <i>N. (Chlorogloea) fritschii</i>	9,49	400	30	Fay y Fogg, 1962
* <i>Nostoc muscorum</i>	10	100	45	Allison et al., 1937
* <i>Nostoc muscorum</i>	1,30	50	50	Taha y El Refai, 1963
° <i>Nostoc punctiforme</i>	2,98 y 2	250	60	Drewes, 1928 (medio 1 y 2)
* <i>Nostoc sp.</i>	3,1	100	60	Watanabe, 1951 (+glucosa)
* <i>Nostoc sp.</i>	1,07	100	60	Watanabe, 1959 a
* <i>Nostoc sp.</i>				Henriksson, 1951
° <i>Nostoc sp.</i>				Cameron y Fuller, 1960.
+ <i>Wollea bharadwajae</i>	2,8	50	20	Singh, P.K., 1976
RIVULARIACEAE				
* <i>Calothrix brevissima</i>	5,2	100	60	Watanabe, 1951 (+glucosa)
* <i>Calothrix brevissima</i>	3,4	100	60	Watanabe, 1959 a
* <i>Calothrix elenkinii</i>	57	1000	15	Taha, 1963
+ <i>Gloeotrichia sp.</i>	2,87	50	25	Pattnaik y Singh, 1978
SCYTONEMATACEAE				
° <i>Scytonema archangelli</i>				Cameron y Fuller, 1960
° <i>Scytonema hofmanni</i>				Cameron y Fuller, 1960
* <i>Tolypothrix tenuis</i>	9,6	100	60	Watanabe, 1951 (+glucosa)
* <i>Tolypothrix tenuis</i>	5,2	100	60	Watanabe, 1959 a

ESPECIES	N FIJADO (mg)	MEDIO MI- NERAL (mI)	TIEMPO (días)	AUTORES
STIGONEMATALES				
STIGONEMATACEAE				
* <i>Fischerella muscicola</i>	0,212	10	90	Pankaw, 1964
* <i>Hapalosiphon fontinalis</i>	22	1000	15	Taha, 1963
* <i>H. welwitschii</i>				Bharati y Bongale, 1976
* <i>Stigocladus laminosus</i>	2,48	100	20	Fogg, 1951
* <i>Stigonema dendroideum</i>	3,24	100	20	Venkataraman, 1961 a
* <i>Westiopsis prolifica</i>	13,75	500	30	Pattnaik, 1966
CHROOCCALES				
CHROOCCOCACEAE				
+ <i>Aphanothece castagnei</i>	1,5	50	30-35	Singh, 1977
+ <i>Aphanothece pallida</i>	2	50	25	Singh, 1973; 1977
* <i>Aphanothece stagnina</i>	5,065	100	60	Halperin et al., 1977

* Purificada con U.V.

° Purificada por otro método

+ No cita el método de purificación

No se consignan los valores de fijación expresados por los autores en otras unidades

2- Bioquímica de la fijación de N₂

2.1 Filamentosas con heterocistos

El heterocisto es una célula vegetativa especializada, característica de las familias *Nostocaceae*, *Rivulariaceae*, *Scytonemataceae* y *Stigonemataceae*.

A pesar de la amplia distribución de las algas azules con heterocistos, hasta hace poco tiempo, se desconocía la función de estas células diferenciadas. En 1950, Fritsch (Según Fay, 1973) las consideró un enigma botánico. Se le atribuyeron diversas funciones (Wolk, 1966; Stewart, 1972), pero recién en 1968, Fay y colaboradores presentaron una hipótesis coherente para la función del heterocisto, apoyada por una serie de evidencias circunstanciales, según las cuales podría ser el sitio de fijación del nitrógeno atmosférico. Las primeras pruebas positivas al respecto fueron dadas por Stewart y colaboradores en 1969.

Actualmente se conocen más de 50 especies de cianofíceas con heterocistos, que fijan N₂ fundamentalmente en aerobiosis (Stewart, 1973). Los requerimientos conocidos para la fijación de N₂ son comunes para todos los organismos fijadores: nitrogenasa, ATP, poder reductor y un ambiente anaerobio o bien algún mecanismo o estructura que proteja la nitrogenasa de la acción del O₂, dado que esta enzima es O₂ lábil. Es decir que el heterocisto debe poseer características particulares para poder fijar N₂ en aerobiosis. Como veremos, se trata de una célula altamente especializada, morfológica, fisiológica y bioquímicamente, para dicho proceso.

2.1.1. Estructura del heterocisto

Morfológicamente, el heterocisto difiere de la célula ve-

getativa que le da origen en 5 puntos principales: 1-sus conexiones con las células vecinas son mucho menos extensas que las que muestran las células vegetativas entre sí; 2- está rodeado por una gruesa envoltura; 3-contiene en los polos grandes tapones de un material bastante homogéneo; 4- la disposición de los tilacoides es peculiar y 5-tiene mucho menos material "nuclear", o tal vez ninguno (Fig. 1).

El septo que separa el heterocisto de la célula vegetativa está atravesado por un conjunto de perforaciones llamadas microplasmodesmos que parecen conectar los citoplasmas de las dos células (Lang y Fay, 1971). Los canales son de 400 Å de largo y de 50 Å de diámetro aproximadamente. Se sabe muy poco acerca de su estructura, número preciso, composición y aún si todos son idénticos. Los microplasmodesmos son muy importantes puesto que deben estar íntimamente relacionados con las bombas que controlan el transporte de sustancias entre el heterocisto y la célula vegetativa (Haselkorn, 1978).

La cubierta o envoltura que rodea al heterocisto tiene tres capas externas a la pared celular que se interrumpen a nivel de los polos (Lang y Fay, 1971). La primera que aparece durante la diferenciación, cuya composición aún no se conoce, es llamada "capa fibrosa" debido a su apariencia en las secciones teñidas y fijadas (Lang y Fay, l.c.). La segunda o intermedia es la "capa homogénea" y está compuesta por polisacáridos (Cardemil y Wolk, 1976, según Haselkorn, 1978). La "capa laminada", más interna, es la última en agregarse. Tiene una composición química inusual dado que está compuesta enteramente de glicolípidos que se encuentran únicamente en el heterocisto (Lambein y Wolk, 1973). Es probable que esta capa laminada sea impermeable al agua, iones, solutos hidrofílicos neutros y posiblemente a los gases disueltos (N_2 , O_2 , CO_2), aunque estas propiedades aún no han sido medidas (Haselkorn, 1978, 1980).

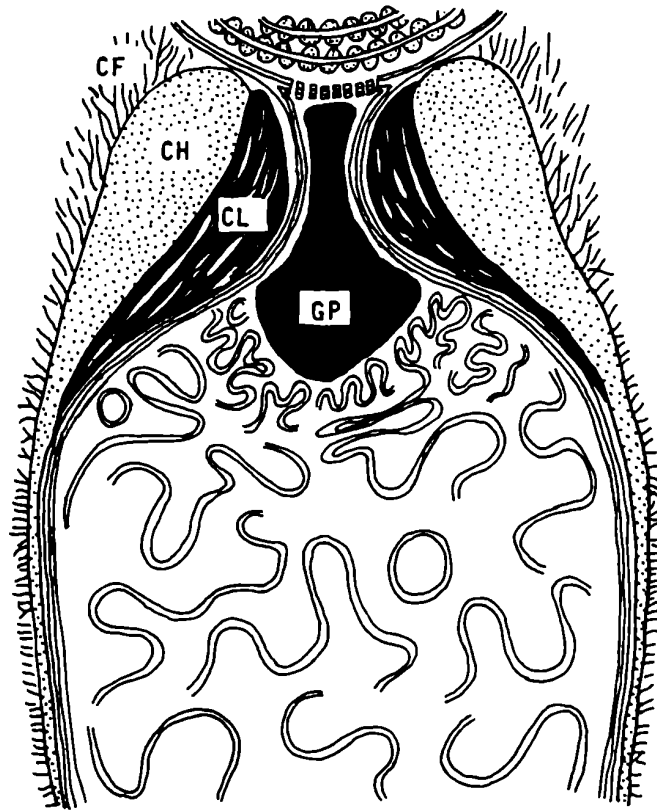


Fig. 1- Diagrama esquemático de parte de un heterocisto maduro, mostrando la conexión polar con la célula vegetativa adyacente (arriba) a través de una serie de finos poros. GP, gránulo polar de cianoficina; CF, capa fibrosa; CH, capa homogénea; CL, capa laminada de la envoltura del heterocisto. (Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Los heterocistos intercalares contienen dos gránulos polares y los terminales uno (Fay, 1973). Lang y Fisher, 1969 (según Lang y Fay, 1. c.) consideraron que estarían compuestos por cianoficina, sustancia de reserva constituida por copolímeros de arginina y ácido aspártico (Simon, 1971), si bien Haselkorn en 1978 señaló que estos tapones aún no han sido purificados.

La reorganización de los tilacoides durante la diferenciación de los heterocistos ha sido descripta sobre la base de estudios de microscopía electrónica (Lang y Fay, 1971). Durante los primeros estadios de diferenciación, se han observado pocos cambios tanto en cantidad como en disposición de los tilacoides (Wildon y Mercer, 1963; Lang y Fay, 1.c.). Luego de la disposición de la envoltura de 3 capas, aparecen configuraciones tilacoidales reticuladas (Wildon y Mercer, 1.c.; Lang y Fay, 1.c.), observándose además un incremento pronunciado en la cantidad de membranas en el heterocisto maduro, una síntesis "de novo" de membranas así como una posible reorganización de tilacoides preexistentes (Lang y Fay, 1.c.). En el heterocisto maduro usualmente se observa una cierta polarización del sistema de membranas acompañado por un mayor enrollamiento de los tilacoides (Grilli, 1964 según Fay, 1973). Los tilacoides de los heterocistos no tienen ficobilisomas⁽⁴⁾ asociados (Fay, 1969 según Lang y Fay, 1.c.). Fig. 1. Alberte et al. (1980), han demostrado que la unidad fotosintética⁽⁵⁾ se modifica durante la diferenciación del heterocisto para así poder suplir los requerimientos energéticos especiales de estas células fijadoras de N₂.

(4)- Organelas de localización extratilacoidal que contienen ficobiliproteínas, presentes en las células vegetativas, (Chapman, 1973; Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

(5)- Número mínimo de pigmentos necesarios para llevar a cabo las reacciones fotoquímicas, la evolución de O₂ y el transporte electrónico fotosintético (ficobilipigmentos, clorofila a colectora de luz y centros de reacción fotoquímicos).

Los heterocistos maduros carecen de inclusiones citoplasmáticas tales como cuerpos poliédricos o carboxisomas⁽⁶⁾, gránulos de polifosfato, de cianoficina, etc. (Lang y Fay, l.c.).

Las células vegetativas tienen típicas regiones "nucleoides" procarióticas que en las microfotografías electrónicas aparecen como fibrillas. Tales fibrillas no son visibles en el heterocisto, lo que sugiere que puede carecer de DNA. Además, los heterocistos muestran una reducida absorción al U.V. y, cuando aislados, la relación DNA/célula es mucho menor que la de las vegetativas (Fogg, 1951, según Haselkorn, 1978).

2.1.2. Bioquímica de los heterocistos

a) Actividades fotosintéticas

Las células vegetativas de las cianofíceas tienen, como las del clorénquima de las plantas superiores, dos fotosistemas (Krogmann, 1973; Tel-Or y Stewart, 1977). El flujo de electrones se muestra en la Fig. 2.

En el heterocisto el fotosistema II (FS II) es inactivo (Donze et al, 1972) debido a la pérdida parcial o total de los pigmentos accesorios, en especial ficobilinas (no tienen ficobilisomas), de clorofila a 670 y fundamentalmente a una deficiencia del ión Mn^{2+} el cual es indispensable para que se produzca

(6)- Organelas compuestas por moléculas estrechamente empaquetadas de ribulosa 1-5 difosfato carboxilasa, enzima responsable de la fijación de CO_2 vía ciclo de Calvin (vía reductiva de las pentosas fosfato).

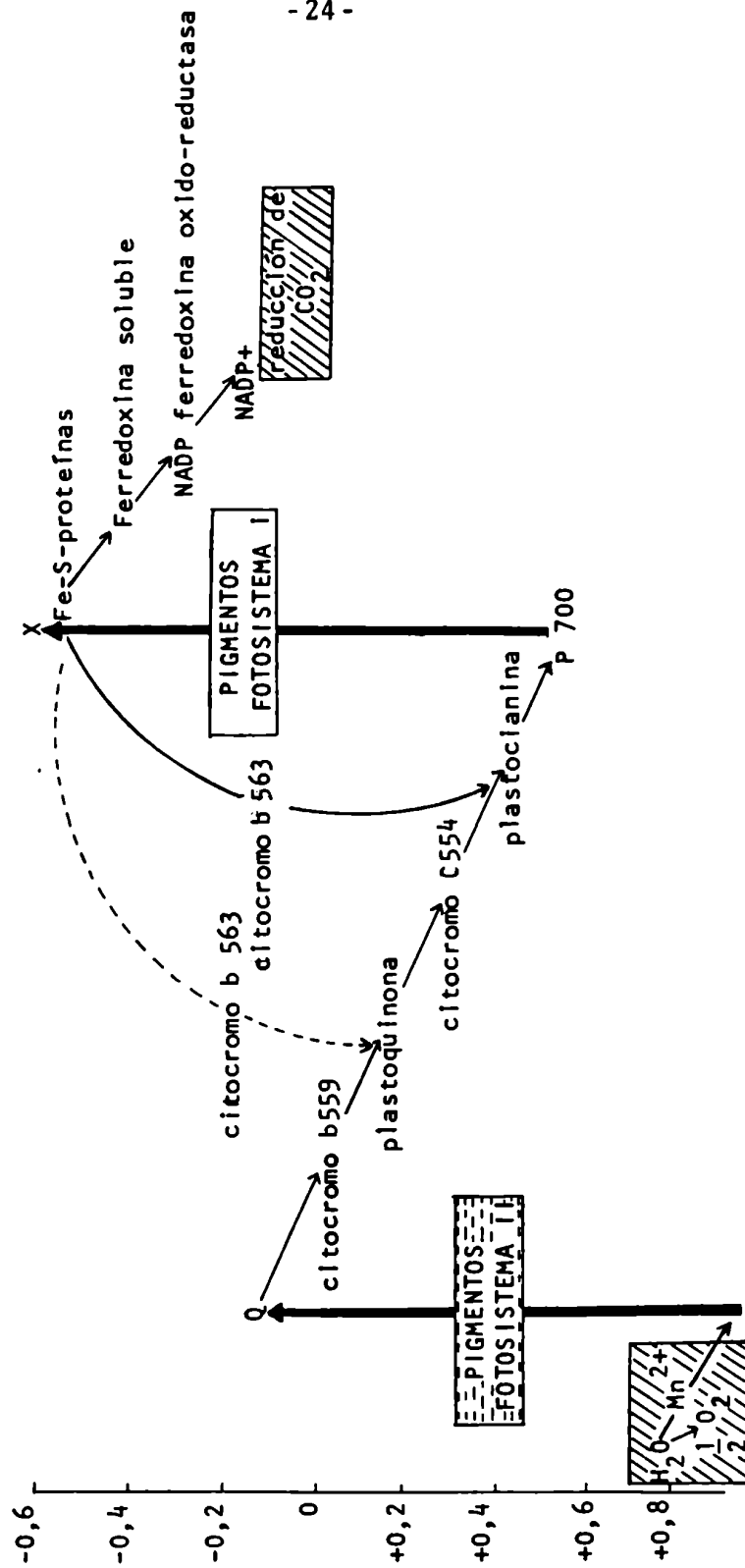


Fig. 2. Componentes y actividades de la cadena fotosintética de transporte de electrones de los heterocistos de *Anabaena cylindrica*, con dos rutas posibles de flujo cíclico de electrones. [Reducción de CO₂], presente en el heterocisto en forma modificada. [Reducción de CO₂], ausente en el heterocisto (Tel-Or y Stewart, 1977).

la fotólisis del agua (Tel-Or y Stewart, 1975,1977). Es decir que en el curso de su diferenciación a partir de una célula vegetativa, el heterocisto ha sufrido una lesión bioquímica que condujo a la inactivación del F S II. Los heterocistos por lo tanto, no liberan O_2 , lo cual les permite mantener condiciones anaeróbicas o de muy baja tensión del O_2 a lo cual contribuye también la gruesa envoltura externa. Los resultados de Singh (1976) de que mutantes con formación incompleta de dicha envoltura no crecieron en un medio sin N ni fijaron N_2 , podrían ser considerados como una prueba indirecta de la impermeabilidad de las envolturas agregadas del heterocisto con respecto al O_2 . Es decir que una cianofícea heterocistae creciendo en aerobiosis tiene células diferenciadas que permanecen prácticamente en condición anaeróbica.

Dado que el F S II es inoperante, el fotosistema I (F.S.I), a través de una cadena de transferencia de e^- acortada, fosforila ADP en forma cíclica (fotofosforilación cíclica). Es decir, que en la luz tiene un mecanismo eficiente de producción de la energía necesaria para la fijación. Se ha visto que el ATP producido por dicho proceso es suficiente como para sustentar las máximas velocidades de fijación. En la oscuridad también se produce fijación de N_2 pero a velocidades mucho menores y en este caso el ATP provendría de fosforilación oxidativa. Además se ha visto que la fosforilación a nivel de sustrato es poco importante como fuente de ATP (Stewart, 1976; Bottomley y Stewart, 1977).

b) Metabolismo del Carbono

El heterocisto no puede fijar CO_2 , debido a una segunda lesión bioquímica: no posee actividad de ribulosa 1-5 difosfato (RuDP) carboxilasa, enzima clave del ciclo de Calvin. Esto está corre-

lacionado con la ausencia en dichas células, de cuerpos poliédricos o carboxisomas (Stewart y Codd, 1975).

Se ha comprobado, por experiencias de marcación, que las células vegetativas vecinas proveen al heterocisto el C fijado necesario (Wolk, 1968), estando un 60% del mismo bajo la forma del disacárido maltosa o bien sacarosa y en menor proporción como glutamato (Haselkorn, 1978, 1980; Wolk, 1980).

c) Fuente de poder reductor

Se considera actualmente que la ferredoxina (Fd) es el compuesto que cede electrones para reducir a la nitrogenasa. Dado que en el heterocisto no ocurre fotólisis del agua, no hay foto-reducción directa del N_2 por los electrones generados en dicho proceso. Las fuentes de poder reductor en el heterocisto, tanto en luz como en oscuridad, son los compuestos carbonados transportados desde las células vegetativas vecinas. Aún no están totalmente aclaradas las rutas que siguen los electrones, dentro del heterocisto, desde los compuestos carbonados hasta la nitrogenasa. Si bien hay varias teorías, una de las que reúne mayores evidencias "in vivo" ha sido propuesta por Apte, Rowell y Stewart (1978) y es la siguiente: en los heterocistos se ha observado que las actividades de hexoquinasa, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (Glu 6 P desh.) y de 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6 P gluc. desh.) son mayores que en las células vegetativas (Winkenbach y Wolk, 1973). Estas enzimas intervienen en la vía oxidativa de las pentosas fosfato en los pasos que siguen: glucosa (glu) hexoquinasa → glucosa 6 fosfato glu 6 P desh. → 6 fosfogluconico 6 P gluc. desh. → Ribulosa 5 fosfato. $NADPH_2$

El nicotinamín adenín² dinucleótido reducido ($NADPH_2$) puede ser usado para reducir la Fd, que como dijimos se considera

el donante de electrones más probable para la nitrogenasa, o bien entrar en la cadena respiratoria. La glu 6 P deshidrogenasa y la 6 P gluconato deshidrogenasa son fotoinhibidas en las células vegetativas o sea que actúan en oscuridad, pero en los heterocistos Apte, Rowell y Stewart (l.c.) han visto que la glu 6 P deshidrogenasa no es inhibida por la luz o sea que produce NADPH_2 en luz y oscuridad.

En los heterocistos, la Fd-NADP oxidoreductasa (enzima reversible) puede transferir los electrones del NADPH_2 a la Fd tanto en luz como en oscuridad, a diferencia de la de las células vegetativas que sólo realiza este camino inverso en la oscuridad, ya que su función normal es producir NADPH_2 para reducir CO_2 . Así el heterocisto obtiene Fd reducida para reducir a su vez a la nitrogenasa.

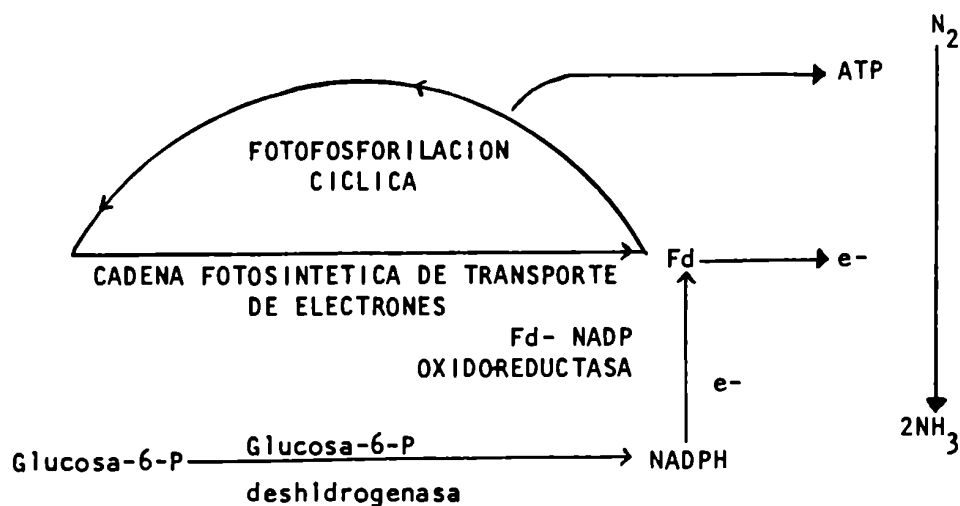
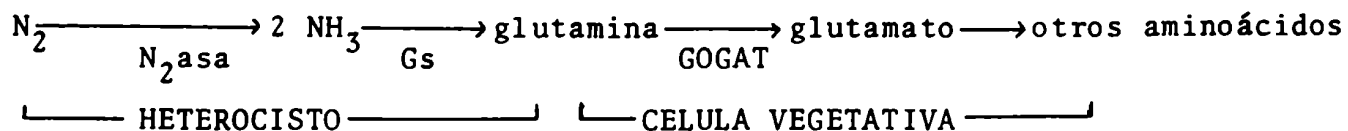


Fig. 3- Una vía de producción de ferredoxina reducida para la nitrogenasa, en heterocistos de *Anabaena cylindrica* (Stewart, Rowell y Apte, 1977 según Stewart, 1977).

d) Metabolismo del nitrógeno

Los heterocistos maduros difieren de las células vegetativas con respecto al metabolismo del nitrógeno en 3 puntos importantes: 1- poseen nitrogenasa; 2- contienen niveles altos de glutamin sintetasa (G.S.) y 3- carecen o poseen niveles muy bajos de glutamina oxoglutarato amido transferasa (GOGAT) o glutamato sintetasa.

En experiencias con nitrógeno marcado se ha visto que la asimilación de NH_3 en el filamento completo es vía GS/GOGAT. Además se ha comprobado que el heterocisto exporta el nitrógeno fijado como glutamina e importa glutamato (Haselkorn 1978). Es decir:



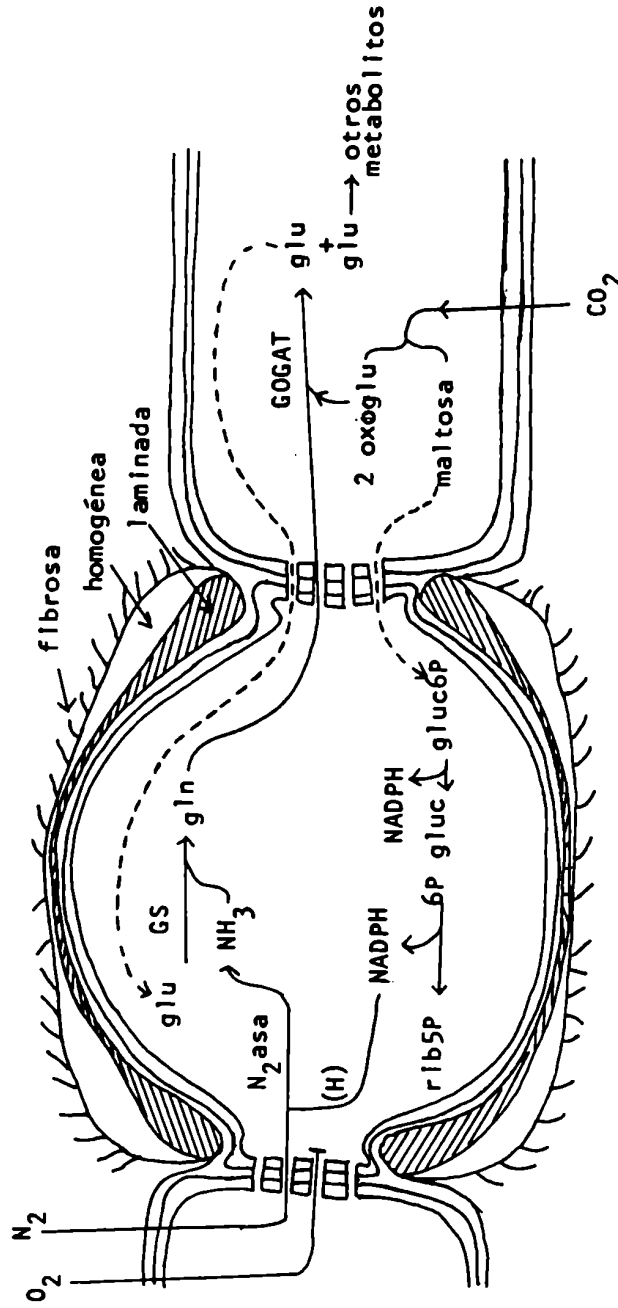
Haselkorn (1978, 1980) ha propuesto un modelo del flujo de carbono desde la célula vegetativa hacia el heterocisto y del flujo de nitrógeno desde el heterocisto a la célula vegetativa, que resume los conocimientos actuales de la bioquímica de la fijación de N_2 en el heterocisto, esquematizado en la Fig. 4.

En las células vegetativas el nitrógeno fijado previamente en el heterocisto es usado en el metabolismo celular general, o excretado, o almacenado como ficobiliproteínas, ficocianina, o gránulos estructurados o de cianoficina (Stewart, 1976).

2.2 Unicelulares y filamentosas sin heterocistos

Se sabe muy poco acerca de la bioquímica de la fijación de N_2 en estos dos grupos de cianofíceas.

Con respecto a las unicelulares fijadoras en aerobiosis



HETEROCISTO

GELULA VEGETATIVA

Fig. 4. Modelo del flujo del carbono y nitrógeno entre el heterocisto y la célula vegetativa en cianofitas fijadoras de nitrógeno. Enzimas: N_2asa =nitrogenasa, GS= glutamin sintetasa, GOGAT= glutamina-oxoglutarato amidotransferasa. La maltosa debería ser reemplazada probablemente por sacarosa. El mecanismo de transporte de maltosa es desconocido, así como los pasos desde maltosa a glucosa-6-fosfato. El NADPH probablemente reduce a la ferredoxina. La envoltura del heterocisto (capas: fibrosa, homogénea y laminada) se cree que limita la difusión de N_2 , CO_2 y O_2 . Se observan microplasmodesmos conectando las dos células. Se han omitido los cuerpos polares del heterocisto. El heterocisto carente de fotosistema II, no fija CO_2 ni produce O_2 (Haselkorn, 1978, 1980).

algunos autores consideran, dada la morfología de estas cepas, que el mucílago o las vainas pueden disminuir la tensión de O_2 permitiendo la actividad de nitrogenasa. Además en el caso especial de *Gloeocapsa*, Stewart (1974) consideró la posibilidad de una eficiente compartimentalización a nivel celular como para mantener separados el sistema que libera O_2 y el que fija N_2 . Para Stanier y Cohen-Bazire (1977) en cambio, el mecanismo de protección de la enzima es aún desconocido.

En el caso de las filamentosas sin heterocistos y en condición aeróbica, se conoce una sola especie, *Trichodesmium erythraeum* (= *Oscillatoria erythraea*) agente de floraciones marinas que puede fijar N_2 (Carpenter y Price, 1976; Bryceson y Fay, 1981). Dado que los tricomas se disponen en haces, estos autores consideran que las células diferenciadas del centro del haz aparentemente no producen O_2 y serían las responsables de la fijación de N_2 observada "in situ". Sin embargo Stanier y Cohen-Bazire (l.c.) señalan que como este organismo no ha sido aún obtenido en cultivo, estos resultados "in situ" serían solamente presuntivos.

Actualmente se considera que la fijación de nitrógeno atmosférico en las cianofíceas es de 2 tipos: anaeróbica y aeróbica.

En condiciones anaeróbicas es llevada a cabo por algunas cepas unicelulares y por varias filamentosas sin y con heterocistos. En estas últimas es posible, pero aún no ha sido comprobado, que la nitrogenasa esté localizada en todas las células (Haselkorn et al., 1980).

En aerobiosis unas pocas unicelulares y aproximadamente todas las filamentosas con heterocistos pueden fijar N_2 . En este último caso la nitrogenasa está confinada a los heterocistos (Wolk, 1980).

3- Importancia agrícola de las algas azules

La importancia agrícola de las algas azules reside en que éstas pueden usarse como biofertilizantes, debido principalmente a la capacidad de algunas especies de fijar N_2 además de sintetizar sustancias orgánicas.

Cuando se utilizan fertilizantes inorgánicos, uno de los requisitos importantes es la adecuada suplementación con materia orgánica a fin de evitar el desbalance nutricional del suelo. En cambio, la incorporación de algas seleccionadas, proceso denominado algalización por Venkataraman en 1961 (según Venkataraman, 1966), no solo aumenta el nivel de N de los suelos por el proceso de fijación de N_2 sino que también provee materia orgánica. La algalización presenta además otras ventajas con respecto a los fertilizantes comerciales. Así, el abono químico nutre solamente una cosecha en tanto que la población algal seleccionada una vez implantada en el suelo continúa su actividad año tras año. Además otros efectos benéficos del agregado algal, son: liberación de oxígeno, necesario para la aireación de las raíces y la oxidación de sulfuros (Jacq y Roger, 1977); prevención del lavado y pérdida de amonio y nitratos mediante su conversión en nitrógeno orgánico; producción de sustancias extracelulares biológicamente activas (aminoácidos, vitaminas, péptidos, hormonas vegetales, etc.) para el crecimiento de las plantas y solubilización de fosfatos por algunas especies.

El nitrógeno algal provenga de la atmósfera o del suelo, llega a éste por excreción o por muerte y desintegración celular, bajo la forma de péptidos y otros compuestos nitrogenados. Para ser aprovechados por las plantas u otros organismos que comparten el hábitat, deben ser mineralizados por una flora bacteriana adecuada hasta llegar a formas de nitrógeno inorgánico, fácilmente asimilables (Venkataraman, 1966).

Antes de algalizar un suelo, es conveniente considerar los siguientes aspectos: 1- Flora algal autóctona: conocer su composición y la incidencia relativa de las formas útiles (buenas fijadoras); como la capacidad de fijación varía a nivel de cepa, la selección de buenas fijadoras debe hacerse también a este nivel; 2- Competencia: la introducción exitosa de una cepa eficiente en un área o el refuerzo de ciertas formas útiles depende principalmente de su capacidad para sobrevivir y competir con los otros microorganismos del hábitat. Si bien se conoce muy poco sobre los cambios producidos en los otros microorganismos por la introducción de algas al suelo, ciertas observaciones indican que el número de bacterias y hongos disminuye por la algalización (Venkataraman, 1966). Dado que el nitrógeno algal es utilizado por la planta después de su conversión a una forma inorgánica (NO_3^- , NO_2^- o NH_4) por la actividad de las bacterias del suelo, la preservación de la flora bacteriana local asume gran importancia (Watanabe y Kiyohara, 1960). En este sentido no debe olvidarse que ciertas algas producen sustancias tóxicas para hongos y bacterias de modo que no deben ser inoculadas en cantidades excesivas; 3- pH: los suelos que serán algalizados deben tener pH levemente alcalino; si éste fuera bajo deberán alcalinizarse por aplicación de cal (Watanabe, 1973), ya que muchas algas azules crecen mejor en esas condiciones, (Brock, 1973); 4- Temperatura: Los suelos a inocular deberán estar preferiblemente en regiones cálidas, dado que la temperatura óptima para el crecimiento de las cianofíceas varía entre 25 y 35 °C; 5- Obtención de cultivos masivos de especies previamente seleccionadas por su crecimiento y fijación de N_2 (Venkataraman, 1966; Watanabe, 1959 b y c, 1973). 6- Preservación del material algal en forma adecuada hasta su utilización en el campo (Venkataraman, l.c.; Watanabe, l.c.).

Donde realmente las algas azules desempeñan un papel im-

portante, es en el cultivo del arroz que se realiza en regiones tropicales y subtropicales entre los 45° LN y 40° LS. El 90 % del área dedicada al arroz está ubicada en la franja tropical del Sud y Sud-Este de Asia. Este cultivo representa el alimento principal de más del 60 % de la población mundial, cubriendo una superficie superior a 135 millones de hectáreas. En la India es el cultivo más importante como alimento; cubre unos 38 millones de hectáreas (casi el 37% de la superficie total dedicada al cultivo de cereales), con un rendimiento aproximado de 1.134 kg de arroz/ha. Se cultiva en pequeñas parcelas: el 87% de 1-4 ha (aproximadamente un 50 % bajo riego) y el 13% restante de menos de 1ha. Estos datos reflejan el nivel económico de los agricultores así como sus recursos y posibilidades de inversión en fertilizantes químicos (Venkataraman, 1977 a y b).

El cultivo de arroz es el que ha respondido más significativamente a la algalización, debido a que las condiciones imperantes en un campo de arroz proveen un ambiente ideal para el crecimiento lujurioso de estas algas. Muchos arrozales permanecen inundados gran parte de su ciclo, es decir bajo condiciones inadecuadas para el crecimiento de leguminosas y *Azotobacter* y en las cuales las algas azules, en cambio, crecen abundantemente (Stewart, 1967). Los principales agentes naturales de fijación biológica de N₂ en un campo de arroz son: 1- algas azules de vida libre; 2- algas azules en simbiosis con *Azolla*; 3- bacterias heterotróficas en la rizósfera de arroz (tipo *Spirillum*) y 4- bacterias heterotróficas en el suelo anaeróbico más alejado de las raíces de arroz (I. Watanabe et al., 1978).

Fritsch y De (1938) y De (1939) fueron los primeros en destacar la importancia de las algas como principales agentes de la fijación de N₂ en los arrozales.

Posteriormente, se estudiaron en el laboratorio algas azules fijadoras de N₂ provenientes de suelos de arrozales, pero se contaba aún con poca información sobre la magnitud de la fijación

algal "in situ". Las experiencias en maceta, demostraron que las algas aumentaban el N del suelo (De y Sulaiman, 1950), con una fijación correspondiente a 20 Kg N/ha en una de las experiencias (Watanabe et al., 1951) y que la cantidad de N_2 fijado es suficiente para sustentar una buena cosecha de arroz y dejar en el suelo aproximadamente 70 kg de N/ha después de levantar la misma (Willis y Green, 1948 según De y Mandal, 1956). De y Sulaiman (1950) concluyeron de sus estudios que el crecimiento y la fijación de N_2 algal, en suelos de arrozales, aumentan en presencia de las plantas de arroz debido principalmente a un mayor aporte de CO_2 liberado por las plantas como resultado de la respiración y descomposición de sus raíces, aporte que favorecería la actividad fotosintética del alga y por ende la fijación de N_2 .

Sundara Rao et al. (1963), en ensayos con plantas de arroz en maceta, observaron que la inoculación algal aumentó el rendimiento del cultivo posiblemente por la liberación de sustancias promotoras del crecimiento.

De y Mandal (1956) estudiaron la fijación de N_2 por análisis gasométrico de la atmósfera del suelo. En los suelos cosechados, no fertilizados químicamente, la fijación algal variaba de 13,8 a 44,4 kg de N/ha.

Las investigaciones de De (1939) fueron el punto de partida de nuevas líneas de investigación. Los grupos de trabajo más importantes son: Watanabe y colaboradores en Japón (1951-1975); R.N. Singh (1961) y Venkataraman y colaboradores (1959-1977) en la India. Estos investigadores se abocaron en primer término a realizar muestreos en extensas áreas arroceras, a fin de estudiar la flora y en especial las algas azules, cuya capacidad de

fijación se midió en condición de cultivo axénico siempre que les fue posible, con el objeto de seleccionar "buenas fijadoras" a utilizar posteriormente como abono.

Actualmente en Japón, Watanabe utiliza *Tolypothrix tenuis* (aislada de arrozales de Borneo), su mejor fijadora (Watanabe 1951; 1959a). Con dicha especie prepara cultivos masivos que luego incorpora a un sustrato inerte o grava, donde los deja crecer durante un mes bajo iluminación. Después de secado al aire, este material inoculado se guarda en bolsas de nylon, conservándolo a temperatura ambiente hasta su envío a los arrozales. Allí se agrega en la proporción de 130-650 kg de peso fresco/ha/ estación que corresponde a 2-10 kg de peso seco de algas/ha/estación (Watanabe, 1959b). Las algas mantenidas en estas condiciones conservan su viabilidad durante más de 2 años (Watanabe, 1959c y 1966). Antes de la siembra se asegura que el pH del suelo sea ligeramente alcalino (pH 7,5).

Los resultados obtenidos al cabo de 4 años de inoculaciones anuales con la misma proporción de algas (ensayos en 11 arroceras), indicaron un aumento promedio del rendimiento del arroz, aumento que fue de 2,7 % el primer año; 8,4% el segundo y 19%-21,8% el tercer y cuarto año respectivamente. Al 5º año el incremento del rendimiento bajó a un 10,6%, descenso no explicado por el autor. Los aumentos progresivos durante 4 años indicarían la implantación de la flora que ya se manifiesta a partir del 2º año, de allí la ventaja de reforzarla con agregados periódicos de material algal. Según Watanabe (1962), de los resultados obtenidos en estas 11 arroceras, en un solo caso se hizo evidente que el tratamiento con algas proporcionó resultados casi similares a los obtenidos con un agregado de 64 kg. de sulfato de amonio/ha.

Venkataraman en la India, con un criterio quizá más práctico dado el bajo nivel económico de los agricultores de ese país, preconizó recientemente (1977a) una técnica muy sencilla, factible de ser llevada a cabo por el mismo agricultor teniendo en cuenta las parcelas más bien pequeñas que se cultivan. El Instituto de Investigaciones Agrícolas de la India (IARI) utiliza una mezcla de algas fijadoras (*Aulosira*, *Tolypothrix*, *Scytonema*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Plectonema*, etc.), que entrega a pedido a los agricultores, a quienes imparte normas para obtener biofertilizantes en su propio campo.

La unidad operativa es una pileta construida en un extremo de la parcela y bien iluminada, de aproximadamente 2x1x0,22m de profundidad, hecha de mampostería o de chapa o en última instancia revestida de polietileno para retener el agua. Luego se agregan 8-10 kg de tierra, se llena con agua y se deja decantar. Se adiciona 200 g de fosfato de sodio o de potasio y 2 g de molibdato de sodio. Se esparce el inóculo que es suministrado por el IARI en bolsitas de 400 g con una mezcla de las especies antes mencionadas, cuyo costo es de 40 céntimos de dólar aproximadamente. El pH adecuado es de 7 - 7,5; si llegara a ser ácido, antes de comenzar se hace un encalado a fin de elevarlo. Se riega diariamente en la cantidad necesaria como para mantener el nivel adecuado.

Cuando el crecimiento algal es abundante en la superficie de la pileta (al cabo de unos 7 días), se suspende el riego y se deja secar al aire y sol. Luego se recoge el material seco y se guarda en bolsas. Con un puñado se hace una nueva siembra en la pileta y se repite la operación. En estas piletas, cada cosecha rinde 1,5 - 2 kg de algas. La siembra de la parcela se hace en la relación de 8-10 kg de algas secas/ha, una semana después de haber inundado la parcela con las plantitas ya transplantadas.

Las resiembras en las piletas de cultivo pueden repetirse 3 a 4 veces. Cuando el suelo se agota se cambia la tierra y se procede como anteriormente, inoculando con las propias algas (el inóculo sólo se compra una vez).

El material algal en estado seco puede ser almacenado por largo tiempo (unos 2 años) sin perder su viabilidad (Venkataraman, 1961 b; 1966).

De acuerdo a Venkataraman, cuando no se utilizan fertili-

zantes químicos nitrogenados, el agregado de algas equivale a usar 20-30 kg de N/ha/cosecha. En el caso de agregar dichos fertilizantes comerciales, se puede reemplazar un 30 % de los mismos por inoculación algal, lo que representa una economía. La aplicación de algas por 3-4 estaciones sucesivas por lo menos, asegura un alto rendimiento de la cosecha y reduce la cantidad de fertilizantes a incorporar en la estación siguiente, no requiriéndose inoculaciones algales ulteriores (Agarwal, 1979).

Las medidas de control fitosanitarias adecuadas, así como otras prácticas de manipuleo de rutina, no interfieren con la actividad de las algas (Venkataraman, 1977 a).

Trabajos similares se están realizando actualmente en Egipto, Marruecos, Senegal, etc., con resultados en general concordantes con los obtenidos por el Indian Agricultural Research Institute (IARI) de Nueva Delhi (Agarwal, 1979). En Filipinas, el Instituto de Investigaciones del Arroz informó que la fijación de nitrógeno determinada "in situ" con N^{15} en arrozales algalizados, varió de 40 - 80 kg de N/ha/año. Con la misma técnica se demostró que el nitrógeno fijado y liberado por las algas azules es efectivamente tomado por las plantas de arroz (Venkataraman, 1977 a). En experiencias a campo se ha comprobado que la fijación por algas azules es 2 - 6 veces mayor (estación húmeda y seca respectivamente) que la correspondiente a las simbiosis asociativas con las plantas de arroz (I. Watanabe, 1978).

Con respecto al agregado de algas a otros cultivos, la información es escasa y se refiere tan solo a ensayos en maceta. Hay trabajos sobre lechuga (aumento de peso); ají (mayor producción de frutos); tomate (aumento en el contenido de vitamina Q; plántulas de cebada (mayor cantidad de N en la plántula) y agregado de floraciones a cultivos de caña de azúcar (mayor crecimiento y rendimiento) (Singh, 1961; Dadhich et al, 1969 y ver Venkataraman, 1966).

El estudio, selección y manejo agrícola de diversas especies de cianofíceas ha permitido ya en varios países utilizarlas para aumentar la productividad de cultivos como el del arroz. Es de esperar que en un futuro próximo, a medida que avance la experimentación, se extienda su uso a otros cultivos de importancia agrícola (Halperin et al., 1981).

MATERIAL Y METODOS

1- Material

1.1 Muestras: Proviene de arrozales de Argentina (Entre Ríos, Concepción del Uruguay) y fueron recolectadas en diciembre de 1966 por Delia R. de Halperin y Rosa Dieguez (137 muestras recogidas en 12 arroceras). A partir de 9 de estas muestras, se obtuvieron las cepas utilizadas en el presente trabajo, cuyos datos de recolección son los siguientes:

Muestra N° 13: San Justo, 19-XII-66. Variedad de arroz sembrada: H 14. Forma de riego: agua de arroyo. Muestra tomada en el fondo de un surco con agua; pH del barro: 6,4. Productor: Bell y Pérez.

Muestras N° 20 y 23: Villa Madero, 19-XII-66. Variedades de arroz sembradas: H 7 y H 14. Forma de riego: agua de pozo. pH: 6,7-7,0. Productor: Cohan (Arrocera "La Esperanza").

Muestras N° 58 y 60: Pasando Villa Elisa, camino a Villaguay, 20-XII-66. Forma de riego: agua de pozo. Ambas se tomaron de barro entre plantas. N° 58, pH 6,4-6,7 y N° 60, pH 6,7. Productor: Putallaz.

Muestra N° 79: Pasando Villa Elisa, camino a Villaguay, 20-XII-66. Variedad de arroz sembrada: Gualeyán. Forma de riego: agua de pozo. Barro entre plantas, pH 6,7.

Muestra N° 90: Sobre arroyo San Miguel, 20-XII-66. Variedad de arroz sembrada: Gualeyán. Riego con agua de arroyo. Barro del fondo de una canaleta, pH 6,7. Productor: Luis Fabre.

Muestra N° 114: Camino a San Antonio, 20-XII-66. Variedades de arroz sembradas: Itapé y Gualeyán (2° año de arroz). Riego con agua de pozo. Barro entre plantas, pH 6,7. Productor: Araldo Bran de Villa Elisa.

Muestra N° 115: Estación Experimental Agropecuaria, Concepción del Uruguay (INTA), 21-XII-66. Riego con agua de pozo. Barro entre plantas, pH 6,4 - 6,7.

1.2 Cepas: Se utilizaron las siguientes cepas en condición de cultivo unialgal, aisladas en un medio carente de N combinado (Watanabe, 1959a algo modificado; Halperin et al., 1973) e identificadas por Delia R. de Halperin, correspondientes a las familias *Nostocaceae* y *Scytonemataceae*;

Nostocaceae

- Nostoc muscorum* Ag. (N° 23⁽⁷⁾)
- Nostoc muscorum* Ag. (N° 60 a)
- Nostoc muscorum* Ag. (N° 115)
- Nostoc punctiforme* (Kütz.) Hariot (N° 90)

Scytonemataceae

- Scytonema hofmanni* Ag. (N° 13 a)
- Scytonema hofmanni* Ag. (N° 58)
- Tolypothrix tenuis* (Kütz.) J. Schimdt em. (N° 20)
- Tolypothrix tenuis* (Kütz.) J. Schimdt em. (N° 79 b)
- Tolypothrix tenuis* (Kütz.) J. Schimdt em. (N° 114 b)

Se mantienen en el medio de Watanabe (1959 a) algo modificado (Halperin et al., 1973), en frascos de 250 ml, a la temperatura del laboratorio y expuestos a la luz de tubos fluorescentes de 40W

(7) Las cepas se identificaron con el N° de muestra de la cual provienen. Cuando a partir de una misma muestra se obtuvieron más de una cepa cada una de ellas se designó con una letra (a, b, c, etc.) a continuación del N° de muestra correspondiente.

1.3 Medios de cultivo:

1- Medio de Allen y Stanier (1968) algo modificado, con la siguiente composición: PO_4HK_2 : 0,039 g; $\text{SO}_4\text{Mg}.7\text{H}_2\text{O}$: 0,075 g; $\text{CO}_3\text{Na}_2.10\text{H}_2\text{O}$: 0,020 g; $\text{Cl}_2\text{Ca}.2\text{H}_2\text{O}$: 0,027 g; SiO_3Na_2 : 0,058 g; EDTA Na 10 mM: 0,03 ml; ácido cítrico: 0,06 g; tartrato férrico (Cl_3Fe : 5g + ácido tartárico: 5 g en 1000 ml de H_2O destilada): 2 ó 3 gotas; solución A_6 (BO_3H_3 : 2,86 g; $\text{Cl}_2\text{Mn}.4\text{H}_2\text{O}$: 1,81 g; $\text{SO}_4\text{Zn}.7\text{H}_2\text{O}$: 0,222 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$: 0,391 g; $\text{SO}_4\text{Cu}.5\text{H}_2\text{O}$: 0,079 g; $\text{Cl}_2\text{Co}.6\text{H}_2\text{O}$: 0,0415 g; en 1000 ml. de H_2O destilada): 1 ml; se lleva a 1000 ml con H_2O destilada. pH final: 6,60. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 120 °C.

2- Triptona-soja agarizado: Se utilizó el producto comercial "Oxoid", cuya composición por litro es: Triptona (Oxoid L42) 15 g; peptona de soja (Oxoid L 44) 5g; ClNa 5 g; Agar N° 3 (Oxoid L 13) 15 g; pH 7,3 (aproximadamente). Suspender 40 g en 1 litro de H_2O destilada, llevar a ebullición hasta disolución completa y esterilizar en autoclave 15 minutos a 120° C.

3- Triptona-soja agarizado con tapón de vaselina-parafina: Medio para el crecimiento de organismos anaerobios. En cada tubo de ensayo con el medio indicado estéril y después de la inoculación se colocó un tapón de 1 cm de espesor aproximadamente de vaselina-parafina en partes iguales, también estéril. La mezcla de vaselina-parafina se esterilizó en autoclave durante 1 hora a 120 °C.

4- Extracto de malta agarizado: Se utilizó el producto comercial "Bacto-Difco" con la siguiente composición por litro: maltosa técnica: 12,75 g; dextrina Difco: 2,75 g; glicerol: 2,35 g; Bacto-peptona: 0,78 g y Bacto-agar: 15 g. Suspender 33,6g en 1000 ml de agua destilada fría, llevar a ebullición hasta disolución total y esterilizar en autoclave 15 minutos a 120 °C. pH final: 4,6 a 25 °C.

1.4- Luz ultravioleta: Se utilizó una lámpara germicida modelo F₆ 8132-A, de 2537 Å General Electric (USA), colocada dentro de una cámara de madera de 1x0,25x0,40 m, con una estan-

te graduable y una puerta anterior. En este caso el estante se fijó a 20 cm de la fuente luminosa.

2- Métodos

2.1- Obtención de cultivos axénicos

a) Irradiación con luz ultravioleta (U.V.): Se irradiaron las cepas unialgales con U.V. durante distintos intervalos (20, 40, 60, 75 y 90 minutos) siguiendo la técnica utilizada por Halperin et al. (1973), técnica mucho más sencilla que la utilizada por otros autores, ya que no requiere el empleo de vidriería de cuarzo ni rotación de los cultivos durante la irradiación.

Antes de iniciar cada ensayo, se esterilizó la cámara de irradiación encendiendo la lámpara germicida durante unos 30 minutos aproximadamente.

Para la obtención del material a irradiar, una pequeña cantidad de cada uno de los cultivos a purificar se transfirió a una caja de Petri estéril, y mediante ansas se lo fraccionó en porciones de 1mm^2 de superficie aproximadamente. Por cada cepa y cada uno de los tiempos de irradiación a ensayar, varias de dichas fracciones se pasaron a un porta objeto excavado, previamente esterilizado por inmersión en alcohol y flameado, colocado dentro de una caja de Petri estéril, y en el cual se habían vertido 2 a 3 gotas del medio nutritivo N° 1.

Las cajas se expusieron destapadas a la luz ultravioleta, a una distancia de 20 cm aproximadamente de la fuente luminosa. De acuerdo con el plan trazado respecto a los tiempos de exposición, se fueron retirando de la cámara tapándolas previamente y sin apagar la luz.

Dado el tamaño de la gota en la que quedan suspendidos los filamentos o los agregados celulares, puede considerarse que la acción de la luz ultravioleta alcanza a la mayor parte del material, con el cual se hicieron 8 subcultivos⁽⁸⁾ en tu-

(8)-Escogimos este número (8), - que es completamente arbitrario-, por ser practicable en nuestras condiciones de trabajo. Debe tenerse en cuenta que cuanto mayor sea el número de subcultivos, tanto mayor será la posibilidad de separar un copo de material libre de contaminantes. Gerloff et al. (1950) aconsejan preparar numerosos subcultivos, sin indicación de número.

bos de ensayo con el medio de Allen y Stanier (Nº 1) exponiéndolos a la luz indirecta de tubos fluorescentes de 40 W a la temperatura del laboratorio. Las irradiaciones se realizaron por duplicado.

La técnica seguida resultó también muy conveniente para la obtención de los subcultivos, ya que al tener todo el material irradiado concentrado en un pequeño volumen, se simplifica su manejo.

b) Controles de pureza: A fin de verificar la pureza de los cultivos viables después de la irradiación se utilizaron los siguientes medios: triptona soja agarizado, el mismo con tapón de vaselina-parafina y extracto de malta agarizado.

Los controles de pureza se realizaron en tubos de ensayo, con los testigos correspondientes. Las lecturas se realizaron a las 24-48 horas, prolongándolas hasta los 30-45 días, a fin de detectar aquellos contaminantes de crecimiento más lento.

2.2- Determinación del % de N, contenido proteico y N fijado.

Cada una de las cepas, tanto las originales no irradiadas como las irradiadas axénicas, se sembraron en 3 frascos Pyrex de 250 ml cada uno, con 70 ml de medio Nº 1. Se expusieron durante 60 ± 1 días a la luz de tubos fluorescentes de 40 W, a la temperatura del laboratorio. Una alícuota de los inóculos sembrados en cada frasco se llevó a estufa (110°C) hasta peso constante (24-26 hs) a fin de determinar su peso seco. Al cabo del lapso indicado (2 meses aproximadamente) y para cada cepa, se separó por centrifugación la masa algal del medio de cultivo: se determinó el peso seco de dicha masa y el volumen y pH del medio de cultivo.

El amino nitrógeno se determinó por el método del micro-

Kjeldahl y colorimetría. Se obtuvo así el porcentaje de nitrógeno de la masa algal, su contenido proteico ($\% N \times 6,25$) y se calculó además el nitrógeno fijado en 60 días por cada cepa, expresándolo en mg N/100 ml de medio de cultivo. Estas determinaciones se hicieron por cuadruplicado.

Se indica a continuación los detalles del método seguido: la técnica de determinación de nitrógeno por micro-Kjeldahl y colorimetría corresponde a la descrita por Lang (1958) y Jones (1960), con algunas modificaciones comunicadas verbalmente por el Lic. Jorge Duville (CIBIMA; INTI), y otras elaboradas en nuestro laboratorio.

El método consiste en: digestión ácida de la muestra (descomposición de la materia orgánica nitrogenada en agua, anhídrido carbónico y amoníaco), nesslerización y medición del color resultante. Con este método se puede detectar de 1 a más de 1,000 $\%$ de nitrógeno.

Reactivos: las drogas usadas son analíticas, y el agua desionizada y destilada por destilador de vidrio con agregado de permanganato de potasio.

1- Mezcla para digestión: las siguientes drogas se combinan en el orden dado:

sulfato de potasio-----	40 g
selenio metálico-----	0,3 g
H ₂ O destilada-----	hasta 250 ml
ácido sulfúrico concentrado-----	250 ml
sulfato de cobre 1 M-----	20 ml

El selenio metálico se disuelve previamente en un balón Kjeldahl a temperatura media (100-150°C) durante 30 minutos en 20 a 30 ml de ácido sulfúrico concentrado.

2- Reactivo de Nessler: 7 g de ioduro mercuríco y 5 g de ioduro de potasio se disuelven en agua; luego se completa con

agua hasta 500 ml, dejando esta solución en heladera y oscuridad durante 12 horas. Se separa con papel de filtro común el exceso de ioduro mercúrico. Al filtrado se le agrega 160ml de una solución acuoso al 1% (peso en volumen) de goma arábiga ⁽⁹⁾. Se completa con agua hasta 1.500 ml. La solución debe protegerse de la luz. Inmediatamente antes de usar, una alícuota de esta solución se diluye con igual volumen de hidróxido de sodio 2N.

3- Soluciones standard de:

a) Sulfato de amonio: 19,65 g de sulfato de amonio anhidro, previamente secado en desecador, se disuelven y llevan a 250 ml en una solución de ácido sulfúrico 0,2 N. Para preparar los standard se hacen diluciones que contendrán cantidades conocidas de sulfato de amonio.

b) Lisina: 652 mg se disuelven en 100 ml de agua.

Equipo

A. Aparato para digestión: como elemento calefactor se usa un sistema de resistencias en serie que mantienen un baño de arena a 320°C. Las muestras colocadas en tubos de ensayo comunes (15 x 150 mm) se introducen hasta una profundidad de 2,5 cm en la arena. Esto permite que cada tubo actúe simultáneamente como condensador, dando una adecuada área de reflujo. El aparato usado permite el procesamiento simultáneo de numerosas muestras.

B. Fotocolorímetro: se usó el modelo "Spectronic 20" de Bausch y Lomb.

Procedimiento: en cada tubo de ensayo se colocan 15 mg de

(9)- Cumple la función de estabilizar el complejo coloreado que se forma en la reacción de Nessler (Jones, 1960).

muestra y 1 ml de mezcla para digestión. Estos tubos, junto con otros que contienen soluciones standard, se colocan en el baño de arena hasta que la temperatura alcanza 320 °C, y se los mantiene a esta temperatura por 1 h 30 min a 2 h. Para los standard son suficientes 30 min. Luego se retiran los tubos y se los deja enfriar a temperatura ambiente. Cada tubo se diluye en la forma necesaria para hacer las lecturas en el fotocolorímetro. Se toma una alícuota de 3 ml de esta solución y se mezcla con 4 ml de solución de Nessler, se deja en reposo por 10 minutos en oscuridad y luego se lee la densidad óptica a 420 m μ en el fotocolorímetro.

A partir de la curva de calibración hecha con los standard de sulfato de amonio se calcula el contenido de nitrógeno de las muestras.

Todas las determinaciones se hacen por cuadruplicado.

2.3 Tratamiento estadístico de los datos obtenidos

A- Selección de cepas

Para seleccionar cepas con mayor contenido proteico y mejores fijadoras de N₂, tanto irradiadas con U.V. (axénicas) como no irradiadas, se aplicó el método de comparaciones simultáneas de Tuckey que permite comparar las cepas de a pares.

B- Influencia del tratamiento de luz U.V.

Para estudiar si el tratamiento con U.V. así como el tiempo de irradiación afectan el contenido proteico y la capacidad de fijar N₂ de las cepas consideradas se analizó primero si había interacción entre cepa y tiempo de irradiación. Como ésta no resultó significativa tanto para contenido proteico como para N fijado ($F_{6,22} = 0,55$ y $F_{6,22} = 0,56$ respectivamente) se propuso un modelo aditivo de dos factores (cepa y tiempo) considerando que las curvas de contenido proteico y N fijado en función del tiempo de irradiación, para las distintas cepas, son paralelas.

Solo se analizaron las cepas con mayor número de datos: *Nostoc punctiforme* (Nº 90); *Nostoc muscorum* (Nº 115) y *Tolypothrix tenuis* (Nº 114 b), en su condición original y las irradiadas axénicas correspondientes.

C- Correlación entre: a) aumento de peso seco de la masa algal y N fijado a los 60 días de cultivo y B) viabilidad y axenidad después del tratamiento con luz U. V.

a) Se determinaron los coeficientes de correlación para las cepas axénicas de: i) *Nostocaceae*, ii) *Scytonemataceae* y iii) *Nostocaceae* y *Scytonemaceae*. Se obtuvo la recta $y = ax+b$ por el método de cuadrados mínimos y se calcularon los intervalos con un 95 % de confianza.

b) Se calcularon los coeficientes de correlación entre el número de subcultivos viables y el número de subcultivos axénicos en los distintos tiempos de irradiación. Se obtuvo la recta $y = ax+b$ por el método de cuadrados mínimos y se determinaron los intervalos con un 95 % de confianza.

Los puntos A y B fueron realizados por personal del Laboratorio de Estadística de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (U.B.A.).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En los cuadros N° 1-4 se consignan los resultados obtenidos para *Nostoc muscorum* (N° 23, 60a y 115); *Nostoc punctiforme* (N° 90); *Scytonema hofmanni* (N° 13a y 58) y *Tolypothrix tenuis* (N° 20, 79b y 114b), con respecto a los siguientes parámetros: tiempos de irradiación y subcultivos axénicos; peso seco de la masa algal inicial, final e incremento (Δ) del mismo a los 60 días; volumen y pH final del medio de cultivo; porcentaje de nitrógeno promedio de la masa algal; contenido proteico promedio y nitrógeno fijado a los 60 días de cultivo.

En los puntos 1-8 que se dan a continuación, se analizan los resultados obtenidos.

CUADRO Nº 1: *Noctoc muscorum*

Cepa Nº	23							60a							115						
	0	90	0	75	0	40	2	4	4	2	4	4	7	7	75	3	3	4	3	4	7
Tiempos de irradiación (min)																					
Subc. axénico Nº	3	7	3	3	6	8	2	4	4	2	8	2	4	4	7	2	4	3	4	4	7
Peso [Inicial	4,2	6,6	3,6	21,3	15	6,3	3,9	2,7	0,9	5,4	3,9	3,7	8,7	3,3	5,7						
seco [Final	149,6	84,5	85,3	198,8	200,2	125,7	120,4	97,5	93,6	83,3	97,3	156,4	121,9	83,4	110						
(mg) [Δ en 60 d	145,4	77,9	81,7	177,5	185,2	119,4	116,5	94,8	92,7	77,9	93,4	152,7	113,2	80,1	104,3						
Vol. final del medio de cultivo (ml)	160	156	168	128	148	150	142	166	166	170	164	160	147	168	164						
pH final del medio de cultivo	8,10	8,60	7,50	8,00	8,55	7,70	6,90	8,95	7,10	7,00	7,30	7,60	8,20	8,35	7,05	7,30					
N de la masa algal	5,67	4,76	4,31	5,4	4,78	4,66	4,13	2,46	4,71	3,68	4,80	3,52	3,75	2,82	3,16	3,92					
Contenido proteico (t)	35,44	29,75	26,94	33,75	29,87	29,12	25,81	15,37	29,44	23	30	22	23,44	18	19,75	24,5					
N fijado (mg N/100 ml de medio en 60 d)	3,92	1,76	1,67	4,56	2,87	4,10	2,34	1,36	2,12	1,62	1,77	1,56	2,72	1,51	1,20	1,94					

CUADRO N.º 2: *Noctoc punctiforme* (N.º 90)

Tiempos de irradiación (min)	0								20								40								75								90							
	3	5	6	7	8	1	3	4	5	8	1	3	4	5	8	1	3	4	5	8	1	3	4	5	8	1	3	4	5	8	1	3	4	5						
Subc. axénico N.º	19,5	21	14,7	15,3	4,2	6,9	15,6	24,3	14,4	1,5	14,1	3,3	16,5	8,7	3,9	5,4																								
Peso [Inicial	181,1	132,3	120,4	118,4	120,3	129,8	97,1	135,7	113,2	98,1	91,1	91,8	120,8	88,2	86,9	94																								
seco	161,6	111,3	105,1	103,1	116,1	122,9	81,5	111,4	98,8	96,6	77	88,5	104,3	79,5	85	88,6																								
(mg) [Δ en 60 d	166	166	162	164	152	132	166	156	150	158	144	144	164	158	154	160																								
Vol. final del medio de cultivo (ml)	7,50	8,50	8,50	8,30	6,65	9,05	7,65	8,20	8,30	7,05	8,40	6,55	7,90	8,10	7,10	7,10																								
pH final del medio de cultivo	5,59	4,83	4,55	4,63	5,39	3,14	3,14	3,75	2,77	3,02	3,40	2,91	4,02	2,81	1,82	4,32																								
% N de la masa algal	34,94	30,19	28,44	28,94	33,69	19,62	19,62	23,44	17,31	18,91	21,25	18,19	25,12	17,56	11,37	27																								
Contenido proteico (%)	4,30	2,55	2,28	2,27	2,97	1,83	1,21	1,99	1,29	1,38	1,25	1,22	1,99	1,06	0,71	1,81																								
N fijado (mg N/100 ml de medio en 60 d)																																								

CUADRO N° 3: *Scytonema hořmanni*

Cepa N°	13a		58		
Tiempos de irradiación (min)	0	75	0	90	
Subc. axénico N°	2		1		
Peso (mg)	Inicial	33	8,7	31,5	21
	Final	189,5	140,1	246,3	158,7
	Δ en 60 d	156,5	131,4	214,8	137,7
Vol. final del medio de cultivo (ml)	182	166	165	159	
pH final del medio de cultivo	7,70	7,30	8,70	9,26	
% N de la masa algal	5,18	3,67	7,76	4,18	
Contenido proteico (%)	32,37	22,94	48,5	26,12	
N fijado (mgN/100 ml de medio en 60 d)	3,85	2,29	7,93	2,73	

CUADRO N° 4: *Tolypothrix tenuis*

Cepa N°	20		79b			114b		75		90		
Tiempos de irradiación (min)	0	75	90	0	60	0	60	75	90	0	60	90
Subc. axénico N°	2	1	6	1	6	7	2	5	6	7	2	7
Peso Inicial	31,2	32,7	3,6	14,7	27,6	5,4	11,7	11,4	15	6,9	10,8	5,1
Peso seco	196,1	220,9	144,5	200,5	184,8	133,8	161,3	121,3	141	127,8	120,4	142,1
(mg) Δ en 60 d	164,9	188,2	140,9	185,8	157,2	128,4	149,6	109,9	126	120,9	109,6	137
Vol. final del medio de cultivo (ml)	173	163	176	178	176	168	156	156	170	145	166	156
pH final del medio de cultivo	9,05	8,60	9,40	9,05	8,85	9,30	9,30	7,50	9,00	8,94	9,05	8,50
N de la masa algal	4,68	5,12	5,23	6,89	5,51	4,35	4,79	2,89	4,65	4,65	4,64	3,83
Contenido proteico (%)	29,25	32	32,69	43,06	34,44	27,19	29,94	18,06	29,06	29,06	29	23,94
N fijado (mg N/100 ml de medio en 60 d)	3,66	4,58	3,50	6,09	4,12	2,65	3,41	1,51	2,78	2,67	2,41	2,49
												3,22

1- OBTENCION DE CEPAS AXENICAS POR IRRADIACION CON LUZ ULTRAVIOLETA (U.V.) DE 2537 A

Una etapa fundamental en la selección de cianofíceas fijadoras de nitrógeno molecular es la obtención de cultivos axénicos, ya que sólo con cultivos bacteriológicamente puros se puede asegurar fehacientemente la capacidad de fijación de las cepas en estudio.

Las algas azules son particularmente difíciles de purificar debido al mucílago segregado por las células, el cual no sólo representa un sustrato adecuado para el crecimiento de muchas bacterias y otros contaminantes (Taha y El Refai, 1963), sino que además los protege de la acción de los diversos agentes físicos o químicos utilizados en los distintos métodos de purificación (Tchan y Gould), 1961). Estos han sido revisados por Halperin et al. en 1973 y por Roger y Renauld en 1977. Los primeros autores indican los resultados obtenidos con agua de cloro, antibióticos y luz ultravioleta en cepas pertenecientes a las familias *Nostocaceae* y *Scytonemataceae*, obteniendo cepas axénicas sólo por irradiación con U.V.

En trabajos posteriores realizados en nuestro laboratorio, corroboramos que la irradiación con U.V. es el método más rápido y con mayores probabilidades de éxito para lograr cultivos axénicos de algas azules.

En base a estos antecedentes se usó la misma metodología en el presente trabajo. El estudio estadístico de los datos obtenidos permitió evaluar este tratamiento con respecto a la capacidad de fijación y al contenido proteico (puntos 8 y 6 respectivamente de Resultados y Conclusiones).

El efecto perjudicial de la radiación ultravioleta parecería deberse principalmente a su acción sobre el ácido desoxirribonucleico (DNA). El daño más dramático, por supuesto, es la

muerte de la célula. Otros efectos incluyen mutagénesis, carcinogénesis, interferencia en la síntesis de DNA, ácido ribonucleico (RNA) y proteínas, retraso de la división celular y cambios en la permeabilidad y movilidad (Smith, 1977).

En las bacterias, las diferentes cepas muestran grandes variaciones en su sensibilidad a la radiación U.V., la cual depende de su capacidad de reparar el daño fotoquímico a su DNA (Smith, l.c.).

Con respecto a las algas azules, Singh en 1978 estudió en *Anabaena variabilis* la inactivación por luz U.V. (254 nm) y la reparación del daño causado. Observó que la irradiación produjo una disminución en el porcentaje de supervivencia, indicando que las razones de letalidad son las mismas que se han informado para bacterias: formación de dímeros de pirimidina, principalmente de la timina. Dado que el porcentaje de muerte aumenta con la dosis de U.V. aplicada, dicho autor concluyó que la dimerización en esta especie es dosis dependiente. Sus observaciones revelan que el daño producido por U.V. puede ser revertido considerablemente si el alga irradiada se expone a un tratamiento posterior con luz visible, lo que indica que el mecanismo de reparación es similar al de otros microorganismos. Además de la fotorreactivación, consideró que otro mecanismo para eliminar dímeros de pirimidina en esta misma especie, sería la reparación en oscuridad (escisión), ya observada en bacterias.

Singh (l.c.), considera que la variación en la sensibilidad (en diferentes fases del crecimiento de una misma cepa o en cepas de una misma especie o en distintas especies del mismo género, etc) depende de la capacidad para reparar dímeros de pirimidina y/o tolerar dímeros no reparados.

Haynes (1964 , según Singh, l.c.) considera que la sensibilidad de los organismos depende fundamentalmente de la composición química de su DNA, en particular de la relación de sus bases. Así, un organismo con un DNA rico en adenina y timina (A-T) es más sensible al U.V.

En el cuadro N° 5 se consigna el número de subcultivos viables, sobre 16 realizados para cada cepa y tiempo de irradiación. Este cuadro muestra que la viabilidad fue muy poco afectada por la irradiación con U.V., ya que de 720 subcultivos irradiados 540 crecieron (75%), siendo mayor en las *Scytonemataceae* que en las *Nostocaceae* (367 y 173 subcultivos viables respectivamente).

De acuerdo a estos resultados podemos concluir que las cepas de algas azules estudiadas son muy resistentes a la luz U.V., característica ya observada por diferentes autores (Newton et al., 1979). Esta resistencia podría deberse en parte a la fotorreactivación dado que los cultivos fueron expuestos a la luz visible continua inmediatamente después del tratamiento. Singh (1978) observó una buena reactivación en *Anabaena variabilis* luego de 24 h de exposición a la luz visible. También se sabe que las cianofíceas son resistentes a condiciones extremas (temperatura, alta salinidad y largos períodos de sequía) debido a sus características morfológicas como ser vainas gruesas, gran producción de mucílago, estructuras de resistencia (acinetas, que ocasionalmente pueden ser viables hasta más de 100 años), alta viscosidad del gel protoplasmático, propagación asexual, etc.

En cuanto al crecimiento algal (número de subcultivos viables) puede verse que varía en las diferentes cepas. Esto podría resultar no sólo de una mayor o menor resistencia al U.V. de las cepas estudiadas, sino también al hecho de que al irradiar una población, es factible que algunas células circunstancialmente más protegidas por el mucílago o por otras capas celulares, no resulten afectadas y crezcan posteriormente. Dentro de una misma cepa, el número de subcultivos viables varía no sólo por los distintos tiempos de irradiación empleados sino también por la razón antedicha.

En el cuadro N° 6 se observa que de los 720 cultivos irradiados sólo 40 resultaron axénicos (5,55 %) con respecto a los contro-

CUADRO N° 5: Número de subcultivos viables en los distintos tiempos de irradiación

Cepas	Tiempo de irradiación (min)					N° de subc./ cepa	N° de subc./ familia
	20	40	60	75	90		
<i>NOSTOCACEAE</i>							
<i>Nostoc muscorum</i> (N° 23)	16	9	8	8	6	47	
<i>Nostoc muscorum</i> (N° 60a)	16	14	14	13	10	67	
<i>Nostoc muscorum</i> (N° 115)	14	8	5	2	7	36	173
<i>Nostoc punctiforme</i> (N°90)	10	6	2	1	4	23	
<i>SCYTONEMATACEAE</i>							
<i>Scytonema hofmanni</i> (N° 13a)	16	15	16	15	14	76	
<i>Scytonema hofmanni</i> (N° 58)	16	16	16	15	14	77	
<i>Tolypothrix tenuis</i> (N° 20)	16	16	14	13	14	73	367
<i>Tolypothrix tenuis</i> (N° 79b)	16	15	13	15	13	72	
<i>Tolypothrix tenuis</i> (N° 114b)	14	16	11	14	14	69	
N°total/tiempo	134	115	99	96	96		

CUADRO N° 6: Número de subcultivos axénicos en los distintos tiempos de irradiación.

Cepas	Tiempo de irradiación (min)					N° de subc./ cepa	N° de subc./ familia
	20	40	60	75	90		
NOSTOCACEAE							
<i>Nostoc muscorum</i> (N° 23)	-	-	-	-	2	2	
<i>Nostoc muscorum</i> (N° 60a)	-	-	-	1	-	1	
<i>Nostoc muscorum</i> (N° 115)	-	2	2	2	4	10	
<i>Nostoc punctiforme</i> (N° 90)	5	5	-	1	4	15	28
SCYTONEMATACEAE							
<i>Scytonema hofmanni</i> (N° 13a)	-	-	-	1	-	1	
<i>Scytonema hofmanni</i> (N° 58)	-	-	-	-	1	1	
<i>Tolypothrix tenuis</i> (N° 20)	-	-	-	1	1	2	12
<i>Tolypothrix tenuis</i> (N° 79b)	-	-	-	-	-	-	
<i>Tolypothrix tenuis</i> (N° 114b)	-	-	1	3	4	8	
N° total/tiempo	5	7	3	9	16		

les de pureza usados. De estos 40 subcultivos axénicos, 28 pertenecen a las *Nostocaceae* y 12 a las *Scytonemataceae*. Es decir, que corresponde el menor número de subcultivos axénicos a la familia *Scytonemataceae*, la cual presentaba el mayor número de subcultivos viables. Esto podría deberse a que esta familia posee representantes más resistentes a la luz. U.V. no sólo por poseer mayor capacidad para reparar el daño fotoquímico a su DNA sino también debido a características estructurales, como ser vainas más gruesas que disminuirían la dosis recibida. Al mismo tiempo dichas vainas protegerían a las bacterias del efecto letal de la irradiación, explicándose así el menor número de subcultivos axénicos obtenidos. Otra posible explicación sería la presencia en las *Scytonemataceae* de bacterias más resistentes al U.V. que en las *Nostocaceae*, pero es poco probable que se dé esta circunstancia dado que todas las cepas provienen de hábitats similares. Con todo no se puede descartar las posibles asociaciones particulares entre una bacteria y un alga. En este caso la menor probabilidad de obtener una cepa axénica podría deberse a una mayor resistencia de la bacteria a la irradiación.

El número de subcultivos axénicos (x) con respecto al de viables (y) obtenidos en cada tiempo de irradiación (Cuadros N° 6 y 5 respectivamente), dan como resultado una correlación lineal significativa con $2 p < 0,05$ y un coeficiente de correlación $r = 0,47$. Por el método de cuadrados mínimos se calculó la recta $y = ax + b$ con $a = -1,43 \pm 0,82$ y $b = 13,27 \pm 9,35$. Estos intervalos se calcularon con un 95 % de confianza. De donde podemos concluir que en las condiciones de nuestra experiencia, a mayor número de subcultivos viables obtenidos menor es la probabilidad de lograr subcultivos axénicos. Con tiempos de irradiación breves (20 y 40 min) se obtienen numerosos subcultivos viables (93,05 y 79,86% respectivamente) pero el número de subcultivos axénicos es bajo (3,5 y 4,86 % respectivamente, Cuadro N° 7).

CUADRO N° 7: Porcentajes de subcultivos axénicos y viables

TIEMPOS DE IRRA- DIACION CON U.V. (min)		20	40	60	75	90
% de subcultivos viables		93,05	79,86	68,75	66,66	66,66
% de subcultivos axénicos con respecto al:	N° de subc. i- rradiados en cada tiempo	3,5	4,86	2,08	6,25	11,11
	N° de viables en cada tiempo	3,7	6,08	3,03	9,37	16,66
	total de axénicos	12,5	17,5	7,5	22,5	40

En cambio la irradiación de las cepas durante 90 minutos fue la que dió mejores resultados: 11,11 % de cepas axénicas sobre el total de irradiadas en este tiempo, con un porcentaje de viabilidad de 66,66 % y un 40 % con respecto al total de subcultivos axénicos obtenidos (Cuadro Nº 7). Por lo tanto en las condiciones de nuestra experiencia el tiempo más aconsejable para asegurarnos la obtención de cepas axénicas es 90 minutos.

En general, la mayoría de los autores que emplearon este agente físico no prolongaron su acción más de 20-30 minutos. Taha y El Refai (1963) indicaron 60 minutos de irradiación como tiempo máximo. Halperin et al. (1973), utilizando también cepas de *Nostocaceae* y *Scytonamataceae*, obtuvieron un buen crecimiento hasta 60 minutos y una cepa resistió 75, 90, 105 y 120 minutos. Mehta y Hawxby (1977) utilizaron hasta 120 minutos con buenos resultados, no observando cambios morfológicos al microscopio electrónico.

Estas diferencias indicarían que no pueden darse pautas generales debido a que cada cepa es un caso particular y a que los resultados de la irradiación dependen de la composición del medio (Reddy, 1976), del estado del cultivo (edad, espesor de la vaina, cantidad de mucílago, etc.), naturaleza y número de contaminantes, así como de la duración de la irradiación.

Consideramos entonces que la luz ultravioleta es un método de purificación rápido y con probabilidades de éxito, dado que de 9 cepas irradiadas de 8 se obtuvieron subcultivos en condición axénica.

2- MODIFICACIONES EN EL pH DEL MEDIO DE CULTIVO

El cuadro N° 8 consigna los valores de pH final del medio de cultivo a los 60 días. Salvo en el caso de tres cepas pertenecientes a las *Nostocaceae*: *Nostoc muscorum* (115 40 min 6); *Nostoc punctiforme* (90 20 min 7) y *Nostoc punctiforme* (90 75 min 5) en las cuales el pH del medio de cultivo a los 60 días se mantuvo cerca del valor inicial (6,60, todas las cepas restantes (irradiadas y no irradiadas) experimentaron un aumento en este parámetro. En algunos casos el pH llegó a valores superiores a 9, principalmente en *Scytonemataceae*: *Scytonema hofmanni* (58 90 min 1): 9,26; *Tolypothrix tenuis* (20): 9,05; *Tolypothrix tenuis* (20 90 min 1): 9,40; *Tolypothrix tenuis* (79b): 9,05; *Tolypothrix tenuis* (114b 75min 1): 9,30 y *Tolypothrix tenuis* (114b 90min 5): 9,05.

En general en nuestras experiencias de laboratorio hemos observado alcalinización del medio de cultivo en períodos y condiciones semejantes. Dado que la información sobre los productos extracelulares de cianofíceas es fragmentaria y escasa (Hellebust, 1974), más reducida aún es la referente a las variaciones del pH del medio de cultivo, de donde no hemos encontrado en la literatura una explicación del aumento de pH producido por estas algas.

Por otra parte, Singh (1974) estudiando el efecto del pH sobre el crecimiento y la fijación de nitrógeno atmosférico de una especie de *Aphanothece*, no observó cambios en el pH del medio de cultivo durante los 30 días que duró la experiencia.

CUADRO N° 8: pH final del medio de cultivo

Cepas	Tiempos de irradiación (min)	Subcultivo axénico N°	pH final
NOSTOCACEAE			
	0	-	8,10
<i>Nostoc muscorum</i> (N° 23)	90	3	8,60
	90	7	7,50
<i>N. muscorum</i> (N° 60a)	0	-	8,00
	75	3	8,55
	0	-	7,70
	40	6	6,90
	40	8	8,95
	60	2	7,10
<i>N. muscorum</i> (N° 115)	60	4	7,00
	75	4	7,30
	75	7	7,60
	90	2	8,20
	90	3	8,35
	90	4	7,05
	90	7	7,30
	0	-	7,50
	20	3	8,50
	20	5	8,50
	20	6	8,30
	20	7	6,65
	20	8	9,05
<i>N. punctiforme</i> (N° 90)	40	1	7,65
	40	3	8,20
	40	4	8,30
	40	5	7,05
	40	8	8,40
	75	5	6,55
	90	2	7,90
	90	3	8,10
	90	4	7,10
	90	5	7,10

CUADRO N° 8: pH final del medio de cultivo (continuación)

Cepas	Tiempos de irradiación (min)	Subcultivo axénico N°	pH final
<i>SCYTONEMATACEAE</i>			
<i>Scytonema</i>	[0	-	7,70
<i>hofmanni</i> (N°13a)	[75	2	7,30
<i>S. hofmanni</i>	[0	-	8,70
(N° 58)	[90	1	9,26
<i>Tolypothrix</i>	[0	-	9,05
<i>tenuis</i> (N°20)	[75	2	8,60
	[90	1	9,40
<i>T. tenuis</i> (N°79b)	[0	-	9,05
	[0	-	8,85
	[60	6	9,30
	[75	1	9,30
<i>T. tenuis</i>	[75	6	7,50
(N° 114b)	[75	7	9,00
	[90	2	8,94
	[90	5	9,05
	[90	6	8,60
	[90	7	8,50

3- COMPROBACION DE LA CAPACIDAD DE FIJAR N₂ DE LAS CEPAS ESTUDIADAS.

Se comprobó la capacidad de fijar N₂ de 8 cepas originales pertenecientes a las familias *Nostocaceae* y *Scytonemataceae*: *Nostoc muscorum* (Nº 23, 60a y 115), *Nostoc punctiforme*(Nº90), *Scytonema hofmanni* (Nº 13a y 58) y *Tolypothrix tenuis*(Nº20 y 114b) debido a que cepas axénicas de las citadas especies fijan nitrógeno molecular. La cepa *Tolypothrix tenuis* (Nº 79b), presuntamente fijadora de N₂, no pudo obtenerse en condición bacteriológicamente pura.

El cuadro Nº 9 muestra el rango de fijación de las cepas axénicas estudiadas.

Las *Scytonemataceae* resultaron mejores fijadoras que las *Nostocaceae* dado que el máximo valor de nitrógeno fijado en las cepas axénicas corresponde al subcultivo *Tolypothrix tenuis* (20 75 min 2): 4,58 mg de N/100 ml de medio de cultivo en 60 días y en segundo lugar cualquiera de las cepas siguientes: *Tolypothrix tenuis* (20 90 min 1) con un valor de 3,5; *Tolypothrix tenuis* (114b 75min 1) con 3,41 y *Tolypothrix tenuis* (114b 90 min 7) con 3,22 mg de N/100 ml de medio de cultivo en 60 días (Cuadro Nº4). También en las cepas originales no irradiadas, los mayores valores de fijación se dieron en las *Scytonemataceae*. El máximo obtenido corresponde a la cepa *Scytonema hofmanni* (Nº 58) con 7,93 mg. N/100ml de medio de cultivo en 60 días, (cuadro Nº3) y el segundo valor a *Tolypothrix tenuis* (Nº 79b) con 6,09(Cuadro Nº 4). Los resultados del tratamiento estadístico se detallan en el punto 7 de Resultados y Conclusiones.

Si bien las especies estudiadas ya han sido citadas como fijadoras por diversos autores, no todas las experiencias fueron realizadas en las mismas condiciones (duración, volumen de medio, intensidad de luz, temperatura, etc.), de donde resulta muy difícil comparar nuestros valores con los de otros autores aún para las mismas especies.

CUADRO N° 9: Capacidad de fijación de las cepas axénicas estudiadas

Cepas axénicas de: N fijado en mg de N/100 ml de medio de cultivo en 60 días.

NOSTOCACEAE:

Nostoc muscorum (N° 23).....1,67-1,76

Nostoc muscorum (N° 60a).....2,87

Nostoc muscorum (N° 115)1,2-2,72

Nostoc punctiforme (N° 90).....0,71-2,97

SCYTONEMATACEAE

Scytonema hofmanni (N° 13a).....2,29

Scytonema hofmanni (N° 58).....2,73

Tolypothrix tenuis (N° 20).....3,5-4,58

Tolypothrix tenuis (N° 114b).....1,51-3,41

Watanabe (1959a), con una cepa de *Tolypothrix tenuis* aislada de arrozales de Japón, obtuvo un valor de fijación de 5,2 mg de N/100 ml de medio de cultivo, semejante al obtenido en el presente trabajo con *Tolypothrix tenuis* (20 75 min 2): 4,58 mg de N/100 ml de medio. Ambas cepas pertenecen a la misma especie, han sido aisladas del mismo tipo de hábitat (arrozales) se utilizó el mismo método de purificación (U.V.), el mismo método para la determinación del N fijado (micro-Kjeldahl) e igual período de fijación (2 meses) en un medio mineral sin N combinado.

Con *Nostoc muscorum* (Nº 23, 60a y 115) obtuvimos valores de 1,2 a 2,87 mg de N fijado/100ml de medio en 60 días, mientras que Allison et al. (1937) y Taha y El Refai (1963) obtuvieron valores de 10 mg de N/100 ml de medio en 45 días y 1,30 mg de N/50ml de medio en 50 días respectivamente. Estos autores usaron el mismo método de purificación (irradiación con U.V.) y la misma técnica de determinación del N fijado (macro y micro Kjeldahl respectivamente). La cepa utilizada por Allison et al. (l.c.) fue aislada del suelo.

Burris y colaboradores (1943) y Williams y Burris (1952) detectaron fijación de nitrógeno por el método de marcación con ^{15}N en otras cepas de *Nostoc muscorum*.

Nostoc punctiforme fue citada como especie fijadora de nitrógeno atmosférico por Drewes en 1928, quien consignó valores de 2 y 2,98 mg de N/250ml de medio en 60 días, según el medio de cultivo utilizado. Estos datos son semejantes a los obtenidos con los subcultivos axénicos de nuestra cepa: 0,71-2,97 mg de N/100 ml de medio en 60 días. Drewes purificó su cepa aislada de suelo con el método de pasajes sucesivos por agar-medio mineral (Harder, 1917 según Drewes, 1928).

Watanabe y Kiyohara (1963) encontraron que cepas de *Nostoc punctiforme* aisladas de distintos líquenes pueden fijar N_2 tanto

en estado libre como en simbiosis, utilizando ^{15}N y purificando los cultivos mediante el uso combinado de bactericidas y antibióticos.

Laloraya y Mitra (según Watanabe, 1975a) obtuvieron para otra cepa de *Nostoc punctiforme* valores de fijación de 0,9 mg N/100 ml de medio en 35 días.

Cameron y Fuller (1960) aislaron de biodermas provenientes de suelos áridos y semiáridos de Arizona una cepa de *Scytonema hofmanni*, que fue posteriormente purificada por repetidos pasajes sobre placas de agar sin nitrógeno. Dichos autores fueron los primeros en citarla como especie fijadora de nitrógeno molecular. La capacidad de fijación de nuestras cepas axénicas de *Scytonema hofmanni* (Nº 13a y 58) fue de 2,29 y 2,73 mg de N/100 ml de medio de cultivo en 60 días respectivamente. En un tiempo de cultivo menor (35 días) Laloraya y Mitra (según Watanabe, 1975a) obtuvieron valores de fijación de 0,7 mg de N/100ml de medio de cultivo para la citada especie.

4- CORRELACION ENTRE AUMENTO DE PESO SECO Y CAPACIDAD DE FIJACION

En los gráficos N° 1-3 se consignan el incremento en el peso seco de la masa algal y el monto de N₂ fijado a los 60 días de cultivo por las cepas axénicas de *Nostoc muscorum* (N° 23, 60a y 115); *Nostoc punctiforme* (N° 90) y para las *Scytonemataceae* obtenidas respectivamente.

Se encontró correlación lineal significativa entre las variables x= incremento de peso seco de la masa algal e y= monto de N₂ fijado, para las cepas axénicas de: i) *Nostocaceae*, ii) *Scytonemataceae* y iii) *Nostocaceae* y *Scytonemataceae*, $2p < 0,05$ y coeficientes de correlación $r = 0,69$; $r = 0,89$ y $r = 0,86$ respectivamente.

Por el método de cuadrados mínimos se calculó la recta $y = ax + b$ con $a = 0,02 \pm 0,008$ y $b = -0,20 \pm 4,30$ para las *Nostocaceae*; $a = 0,03 \pm 0,01$ y $b = -1,24 \pm 5,25$ para las *Scytonemataceae* y $a = 0,03 \pm 0,005$ y $b = -1,22 \pm 3,59$ para *Nostocaceae + Scytonemataceae*. Estos intervalos se determinaron con un 95 % de confianza.

Dado que hemos establecido una correlación lineal significativa entre las variables mencionadas, podemos concluir que cuanto mayor sea la capacidad de fijación, mayor será la productividad. Por lo tanto el monto de N fijado podría tomarse como una medida de la productividad en las cepas axénicas de las dos familias estudiadas.

No hemos encontrado en la literatura antecedentes de este tipo de estudio.

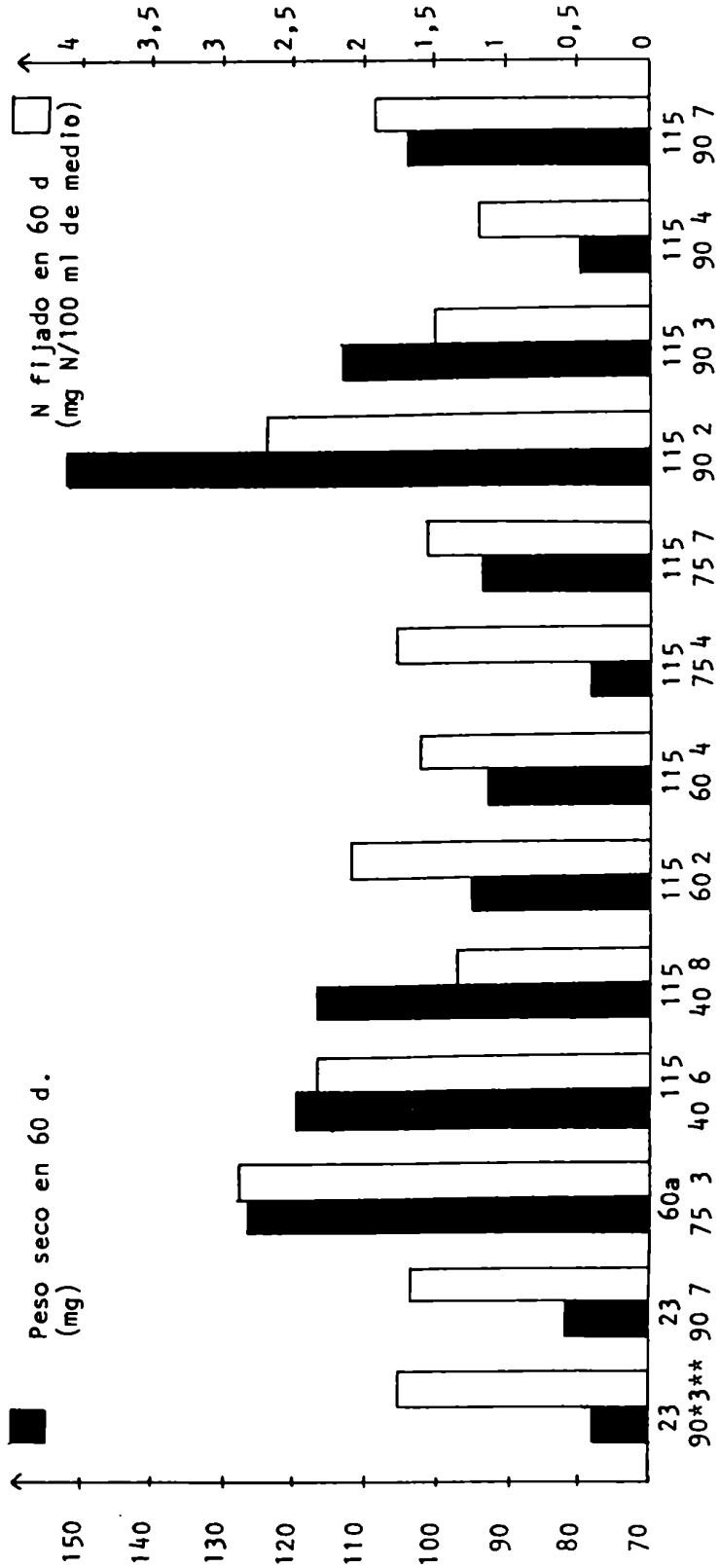


GRAFICO N° 1: Aumento de peso seco de la masa algal y N₂ fijado, en 60 días por las cepas axénicas de *Nostoc muscorum*² (23, . 60a y 115), *Nostocaceae*.
*minutos de irradiación con U.V.
**N° de subcultivo

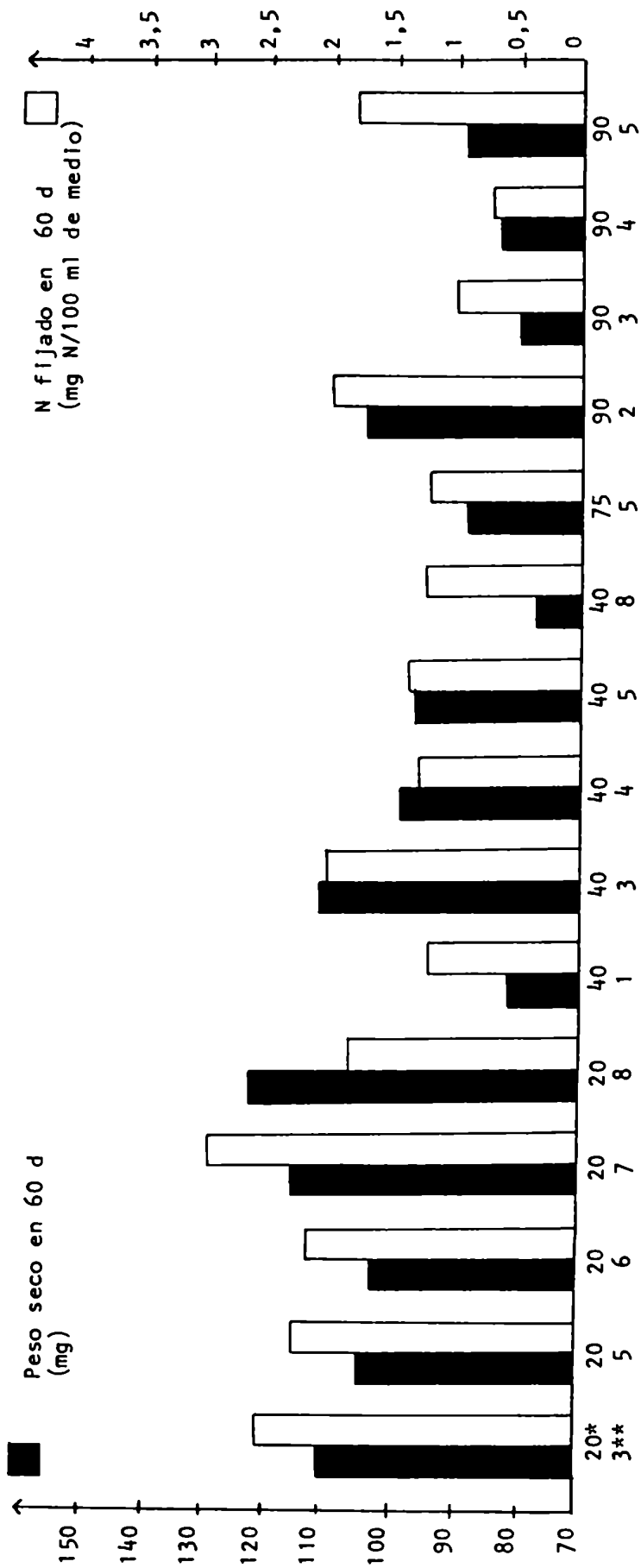


GRAFICO N° 2: Aumento de peso seco de la masa algal y N₂ fijado, en 60 días por cepas axénicas de *Nostoc punctiforme* (90)², *Nostocaceae*.
*minutos de irradiación con U.V.
**N° de subcultivo

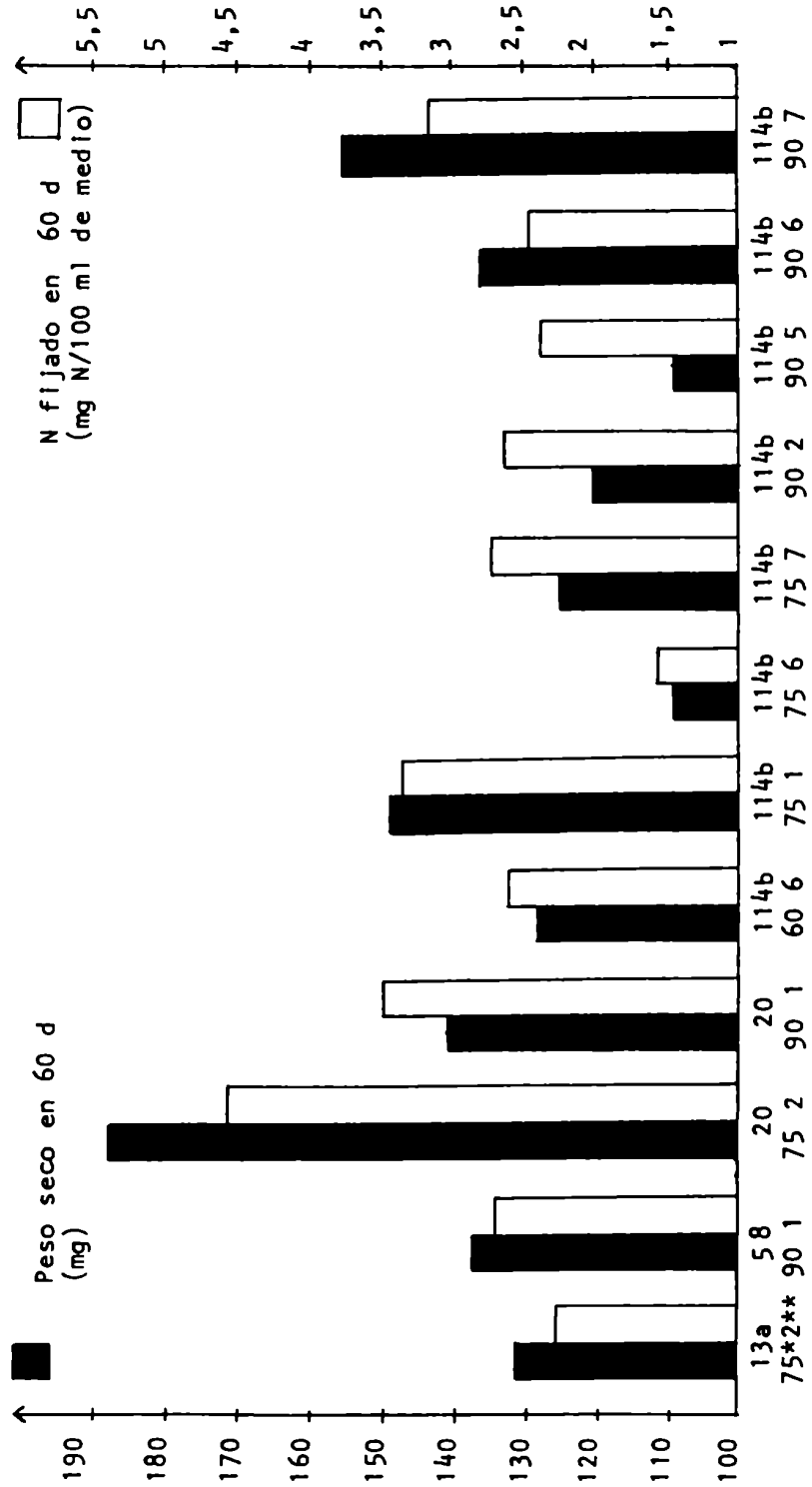


GRAFICO N° 3: Aumento de peso seco de la masa algal y N₂ fijado, en 60 días por las cepas axénicas de *Scytonema hoemannii* (13a y 58) y *Tolypothrix tenuis* (20 y 114 b), *Scytonemataceae*.
 * minutos de irradiación con U.V.
 ** N° de subcultivo.

5- SELECCION DE CEPAS CON MAYOR CONTENIDO PROTEICO

El incremento constante de la población mundial y la insuficiente disponibilidad de una adecuada provisión de alimentos, principalmente proteicos, ha planteado la urgente necesidad de buscar otras fuentes de proteínas, que junto a un elevado valor biológico y fácil manejo de obtención, puedan ser producidas a bajo costo como para ser accesibles a la gran masa de la población.

En la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas, les corresponde a las algas un lugar destacado. Desde la antigüedad y principalmente en los países orientales, diversas especies marinas se han utilizado en la alimentación humana. Japón marcha a la cabeza de los países consumidores de algas, las cuales llegan a representar hasta un 25 % de la dieta diaria.

Dentro de las cianofíceas utilizadas en la alimentación se conoce una única especie marina: *Brachytrichia quoyi* que abunda en Taiwan (Formosa). Con respecto a las de aguas continentales podemos citar varias especies del género *Nostoc* (*Nostoc commune*, *Nostoc verrucosum*, *Nostoc edule*, *Nostoc ellipso sporum*, *Nostoc sphaericum* y *Nostoc pruni forme*), *Spirulina maxima*, *Aphanothece stagnina*, *Phormidium tenue* y *Chroococcus turgidus* (Halperin, 1971). Sólo de algunas de ellas, se dispone del valor del contenido proteico.

El "cushuro" nombre indígena que agrupa varias especies de algas azules (*Nostoc commune*, *Nostoc sphaericum* y *Nostoc pruni forme*) y utilizado como alimento en la región alto-andina, fue estudiado por Aldave Pajares en 1969. El análisis químico de *Nostoc sphaericum* y *Nostoc pruni forme* indica un 48,8% de proteínas.

Para *Nostoc commune* var. *flagelliforme*, con el que se prepara un plato budista famoso, Chapman (1950) determinó un 20,9 % de proteínas.

Spirulina maxima, una especie utilizada desde tiempos remotos por algunas tribus de Chad (Africa) tiene un 63-68 % de proteínas (Clément et al., 1968).

En Japón, desde hace muchos años, se consume una especie continental: *Aphanothece stagnina*. Respecto de la composición proteica de esta especie, Namikawa (1906-08), le asigna 24,75 % de proteína del peso seco. Por nuestra parte, determinamos el contenido proteico de una cepa de *Aphanothece stagnina* (40e) en condición unialgal, aislada de los mismos arrozales de Argentina que las cepas utilizadas en el presente trabajo. Se halló un valor de 36 % a los 38 días (Halperin et al., 1974).

En el presente trabajo se ha realizado la selección de cepas con mayor contenido proteico, inquietud surgida durante el análisis de los datos obtenidos, con los siguientes resultados:

a- No tratadas con luz U.V.: el máximo valor de contenido proteico, 48,5% se obtuvo en *Scytonema hofmanni* (Nº 58). La diferencia entre esta cepa y las otras ocho estudiadas, resultó muy significativa ($p < 0,01$).

b- Tratadas con luz U.V. (axénicas): los estudios estadísticos (test de Tuckey) indican que el máximo contenido proteico se da en las siguientes cepas:

<i>Nostoc punctiforme</i> (90 20 min 7).....	33,69%;
<i>Nostoc punctiforme</i> (90 20 min 3).....	30,19%;
<i>Nostoc muscorum</i> (23 90 min 3).....	29,75%;
<i>Nostoc muscorum</i> (60a 75 min 3).....	29,87%;
<i>Nostoc muscorum</i> (115 60 min 2).....	29,44%;
<i>Nostoc muscorum</i> (115 75 min 4).....	30 %;
<i>Tolypothrix tenuis</i> (114b 75 min 1).....	29,94%;
<i>Tolypothrix tenuis</i> (20 75 min 2).....	32 %;
<i>Tolypothrix tenuis</i> (20 90 min 1).....	32,69%.

Esto es debido a que no hay diferencia significativa entre los valores de contenido proteico de *Nostoc punctiforme* (90 20 min 7) y las ocho cepas antes citadas y sí entre *Nostoc punctiforme* (90 20 min 7) y las restantes cepas axénicas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, *Scytonema hofmanni* (Nº 58) es una especie promisoría en la alimentación ya que su contenido proteico: 48,5 %, es semejante al de especies ya utilizadas como alimento, si bien aún no ha sido probada con tal fin, ni se ha determinado su valor biológico.

Con respecto a cianofíceas en condición axénica, no tenemos datos bibliográficos que indiquen valores de contenido proteico determinados en dicha condición; por lo tanto los valores hallados para nuestras cepas serían los primeros disponibles.

6- INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON LUZ U.V. SOBRE EL CONTENIDO PROTEICO (% N x 6,25).

Para estudiar estadísticamente si hay diferencia en el contenido proteico entre las cepas tratadas y no tratadas con luz U.V., y si el tiempo de irradiación afecta dicho parámetro, se consideraron las cepas de *Nostoc punctiforme* (Nº 90), *Nostoc muscorum* (Nº 115) y *Tolypothrix tenuis* (Nº 114b) las cuales cuentan con mayor número de datos. El cuadro Nº 10 indica los resultados estadísticos obtenidos con respecto al porcentaje de nitrógeno de la masa algal.

CUADRO Nº 10: Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	P
Diferencia entre cepas	2,69826	2	1,34913	2,42870	no sign.
Diferencia entre 6 tiempos (0-20-40-60-75 y 90 min)	11,29980	5	2,25996	4,06837	<0,01
Diferencia entre tratadas y no tratadas con U.V.	4,20006	1	4,20006	7,56094	<0,05
Diferencia entre 5 tiempos (20-40-60-75 y 90 min)	5,97621	4	1,49405	2,68959	no sign.
Error	15,55384	28	0,55549		

La diferencia entre el porcentaje de N de las cepas de las tres especies (las Nº 90, las Nº 115 y las Nº 114b) no es signi-

ficativa, mientras que la diferencia entre la media del porcentaje de nitrógeno de las algas tratadas y no tratadas con U.V., es significativa ($F_{1,28} = 7,56; p < 0,05$).

Es decir que la irradiación con luz U.V. reduce significativamente el porcentaje de nitrógeno y por ende el contenido proteico. Esto podría deberse al hecho de que la luz U.V. interfiere la síntesis de proteínas y produce inactivación de enzimas (Smith, 1977). Sin dejar de considerar que al eliminar las bacterias faltan las interacciones de éstas con el alga que podrían aumentar el contenido proteico, por ejemplo por represión y desrepresión.

En las condiciones de nuestra experiencia, no hay diferencias entre las medias del porcentaje de nitrógeno en los distintos tiempos de irradiación empleados (20, 40, 60, 75 y 90 minutos). Por lo tanto los 90 min de irradiación serían los que permiten obtener el mayor número de subcultivos axénicos con el mismo efecto sobre esta característica que tiempos de irradiación menores.

El cuadro N° 11 consigna los valores promedio del contenido proteico para cada tiempo de irradiación en las cepas antes mencionadas.

Dado que no hay datos bibliográficos sobre el contenido proteico de cianofíceas en condición axénica, consideramos que éste sería el primer estudio estadístico comparativo de dicho valor en cepas axénicas y no axénicas.

CUADRO N° 11: Contenido proteico (%). Valores promedio para cada cepa y tiempo.

Cepas	Tiempos de irradiación(min)					
	0	20	40	60	75	90
<i>Nostoc punctiforme</i> (90)	34,94	28,18	20,11	-	18,19	20,26
<i>Nostoc muscorum</i> (115)	29,12	-	20,59	26,22	26,00	21,42
<i>Tolypothrix tenuis</i> (114b)	34,44	-	-	27,19	25,69	27,28

-: no se obtuvieron cepas axénicas.

7- SELECCION DE CEPAS BUENAS FIJADORAS DE N₂

a- Cepas no irradiadas: la máxima capacidad de fijación se da en la cepa *Scytonema hofmanni* (Nº 58) con un valor de 7,93 mg de N/100 ml de medio de cultivo en 60 días, dado que la diferencia entre el valor de esta cepa y el de cada una de las otras 8 es significativa al 1 % (test de Tuckey). El segundo valor corresponde a *Tolypothrix tenuis* (Nº 79b): 6,09 mg de N/100 ml de medio en 60 días; la diferencia entre esta última y cualquiera de las 7 restantes es significativa (test de Tuckey, $p < 0,01$).

b- Cepas irradiadas (axénicas): el máximo corresponde a *Tolypothrix tenuis* (20 75 min 2) dado que la diferencia entre el valor de fijación de esta cepa (4,58 mg de N/100 ml de medio en 60 días) y el de cada una de las otras 39 es significativa (test de Tuckey , $p < 0,01$).

El segundo valor corresponde a las siguientes cepas de *Tolypothrix tenuis*: 20 90 min 1 con 3,50 mg de N/100 ml de medio en 60 días; 114 b 75 min 1 con 3,41 y 114 b 90 min 7 con 3,22. Las diferencias entre ellas no son significativas pero sí son significativas las diferencias entre este grupo y las restantes (test de Tuckey, $p < 0,01$) cuyos valores de fijación van de 0,71 a 2,97 mg de N/100 ml de medio en 60 días.

Los valores de fijación obtenidos han sido comparados con los citados en la literatura por otros autores en el punto 3 de Resultados y Conclusiones.

8- INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON LUZ U.V. SOBRE LA CAPACIDAD DE FIJACION

Se analizaron estadísticamente las cepas con mayor número de datos: *Nostoc punctiforme* (Nº 90), *Nostoc muscorum* (Nº 115) y *Tolypothrix tenuis* (Nº 114b). El cuadro Nº 12 indica los resultados estadísticos con respecto al N fijado y el Nº 13 los datos promedio de fijación de N para cada tiempo de irradiación con U.V., en las cepas mencionadas.

CUADRO Nº 12: Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	P
Diferencia entre cepas	5,01703	2	2,50851	9, 48948	< 0,001
Diferencia entre 6 tiempos (0-20-40-60-75 y 90 min)	15,33609	5	3,06722	11,60300	< 0,001
Diferencia entre tratadas y no tratadas con U.V.	11,19008	1	11,19008	42,33101	< 0,001
Diferencia entre 5 tiempos (20-40-60-75 y 90 min)	2,99752	4	0,74938	2,83483	< 0,05
Error	7,40172	28	0,26435		

CUADRO N° 13: Nitrógeno fijado en mg de N/100 ml de medio de cultivo. Valores promedio para c/cepa y tiempo de irradiación.

Cepas	Tiempos de irradiación (min)					
	0	20	40	60	75	90
<i>Nostoc punctiforme</i> (N° 90)	4,30	2,38	1,42	-	1,22	1,39
<i>Nostoc muscorum</i> (N° 115)	4,10	-	1,85	1,87	1,66	1,84
<i>Tolypothrix tenuis</i> (N° 114b)	4,12	-	-	2,65	2,57	2,70

-: no se obtuvieron cepas axénicas.

Las diferencias entre los valores de fijación de las cepas analizadas son muy significativas (F 2,28=9,49; $p < 0,001$). Lo mismo ocurre entre las no irradiadas y las irradiadas axénicas (F 1,28= 42,33; $p < 0,001$).

La menor capacidad de fijación de las cepas irradiadas axénicas con respecto a las originales puede deberse: 1- al efecto mutagénico del U.V.sobre el DNA alga; 2- a la eliminación de contaminantes bacterianos no fijadores, lo que podría implicar la pérdida de interacciones alga-bacteria que favorecieran la fijación de N_2 por parte del alga y 3- a la eliminación de conta-

minantes fijadoras y en este caso el monto total sería lógicamente menor.

También son significativas las diferencias entre los valores de fijación obtenidos a los diferentes tiempos de irradiación empleados ($F_{4,28} = 2,83$; $p < 0,05$). Pero dado que no se observa una disminución marcada a medida que aumenta el tiempo de irradiación, no podemos asegurar que a mayor irradiación con U.V., mayor sea el daño producido con respecto a la característica estudiada. Dado que se obtuvieron subcultivos axénicos con 20 min de irradiación sólo en la cepa *Nostoc punctiforme* (Nº 90) y no tenemos representantes de las otras dos cepas estudiadas estadísticamente (Cuadro Nº 6), consideramos que este valor no sería muy representativo, aunque muy probablemente sea el responsable de la diferencia obtenida en el análisis de varianza de los distintos tiempos de irradiación. Consideramos además que no hay diferencia entre los distintos tiempos de irradiación desde 40 min hasta 90 min y por lo tanto el mejor tiempo sería, como en el caso del contenido proteico, 90 min, lapso de irradiación que asegura un buen porcentaje de cepas axénicas. Estos resultados podrían deberse a que estamos en la dosis máxima a partir de 40 minutos.

Por otra parte podemos suponer que la dosis aplicada no es proporcional a la dosis efectiva. Esto puede deberse a que es factible que algunas células circunstancialmente más protegidas por el mucílago o por otras capas celulares o por otros factores, no resulten afectadas y crezcan posteriormente.

Cabe señalar que en todos los casos se irradió una población. En estas condiciones es muy probable que se hayan dado mutaciones en distintas direcciones para los diferentes integrantes de la población independientemente de la edad o del estado fisiológico. El resultado final sería la suma de los efectos, no siguiendo necesariamente una tendencia lineal.

Dado que la diferencia en el N_2 fijado entre las cepas no irradiadas y las irradiadas axénicas es muy significativa (Cuadro

Nº 12), podemos concluir que si bien la luz U.V. no anula la capacidad de fijar N_2 , la reduce considerablemente (Cuadro Nº 13). Puesto que la condición axénica es indispensable para comprobar dicha propiedad fisiológica, la purificación de los cultivos con luz U.V. es adecuada para este propósito, no así para determinar exactamente el valor de fijación.

Para obtener un valor más aproximado podría recurrirse posiblemente a otros métodos de purificación que en general, en el caso de las cianofíceas, son largos y tediosos y con pocas probabilidades de éxito. Estos métodos al no dañar el DNA, darían un valor más aproximado, siempre y cuando la disminución de la capacidad de fijación no se debiera principalmente a la eliminación de las bacterias contaminantes.

Estas consideraciones destacan que la eliminación de contaminantes aunque éstos no sean fijadores, sea por U.V. o por cualquier otro método, no nos asegura que el valor de fijación obtenido corresponde al de las condiciones naturales, dado que en toda asociación hay interacciones que pueden modificar la capacidad de fijación.

Otra posibilidad para conocer el valor de fijación de una cepa dada sería aislar sus contaminantes y establecer la posible capacidad de fijación de los mismos. En el caso de no haber contaminantes fijadores el valor de fijación obtenido a nivel unialgal sería el más próximo al real en esas condiciones.

Al determinar la capacidad de fijación de una cepa axénica no se trata de medir el valor real de fijación lo cual es prácticamente imposible, sino de establecer si es o no fijadora.

De acuerdo a lo expuesto hemos logrado 40 cultivos axénicos con luz U.V. para 8 cepas de las 9 tratadas. Se corroboró la eficacia de este método de purificación, su rapidez, manipuleo sencillo y alta probabilidad de éxito. De los diversos tiempos de irradiación ensayados (20, 40, 60, 75 y 90 minutos), con 90 min se obtuvo el 40 % de los subcultivos axénicos con un buen porcentaje de viabilidad (66,66 %).

La viabilidad fue muy poco afectada por la irradiación ya que de 720 subcultivos irradiados creció el 75 %, siendo mayor en las *Scytonemataceae* que en las *Nostocaceae*, de donde se infiere que las cepas estudiadas son muy resistentes al U.V., característica ya señalada en algas azules por otros autores, y debida en gran parte a que poseen mecanismos para reparar el daño fotoquímico a su DNA, similares a los observados en bacterias (fotorreactivación a la luz visible y reparación en oscuridad), además de poseer características morfológicas peculiares.

Con la técnica de irradiación utilizada se observó una reducción estadísticamente significativa en el contenido proteico y en el monto de fijación de N₂ de las cepas estudiadas, reducción que puede deberse a la acción deletérea de la irradiación y/o a la eliminación de las interacciones alga-bacteria.

Se seleccionaron cepas con alto contenido proteico, comparable al de otras especies de algas azules ya utilizadas en la alimentación. Tal es el caso de *Scytonema hořmanni* (58) con 48,5 % de contenido proteico. Sería de interés estudiar en el futuro el balance de sus aminoácidos esenciales a fin de establecer el valor nutritivo de esta posible fuente no convencional de proteína.

Se determinó la capacidad de fijación de 8 cepas aisladas de arrozales de la Argentina: *Nostoc muscorum* (Nº 23, 60a y 115) *Nostoc punctiforme* (Nº 90), *Scytonema hořmanni* (Nº 13 a y 58) y *Tolypothrix tenuis* (Nº 20 y 114b), pertenecientes a las familias

Nostocaceae y *Scytonemataceae*, siendo esta últimas mejores fijadoras de N_2 .

Se han seleccionado, a nivel axénico y no axénico, cepas buenas fijadoras con miras a su aplicación en la agricultura como biofertilizantes tales como *Scytonema hofmanni* (Nº 58) con 7,93 mg N/100ml de medio de medio de cultivo mineral en 60 días en condición unialgal sin irradiar y *Tolypothrix tenuis* (20 75 min 2) con 4,58 mg N/100 ml de medio en el mismo tiempo y en condición axénica. El valor de fijación de esta última es similar al de otra cepa de *Tolypothrix tenuis* (5,2 mg N/100 ml de medio mineral en 60 días) utilizada por Watanabe en arrozales de Japón con excelentes resultados como abono verde.

Si bien la obtención del cultivo axénico es indispensable para asegurar fehacientemente la capacidad de fijación de una cepa, dado que los resultados obtenidos indican un mayor valor para las originales sin irradiar, son estos cultivos los que conviene utilizar para obtención de biofertilizantes. Además el empleo de cepas no axénicas implica por supuestos una mayor simplicidad en el manejo de las mismas y un menor costo de producción. Cabe señalar por otra parte que una vez incorporadas al suelo no se puede asegurar que se mantenga el valor de fijación determinado en el laboratorio, puesto que las algas estarán sujetas a las interacciones con los otros organismos que comparten el hábitat.

BIBLIOGRAFIA

- Agarwal, A. 1979. Blue-green algae to fertilise Indian rice paddies. Nature 279: 181.
- Alberte, R.S.; Tel-Or, E.; Packer, L.; Thornber, J. P. 1980. Functional organisation of the photosynthetic apparatus in heterocysts of nitrogen-fixing cyanobacteria. Nature 284: 481-483.
- Aldave-Pajares, A. 1969. Cushuro, algas azul-verdes utilizadas como alimento en la región alto andina peruana. Bol. Soc. Bot. La Libertad, Perú 1 (2): 3-41.
- Allen, M.B. 1952. The cultivation of Myxophyceae. Arch. Mikrobiol. 17: 34-53.
- Allen, M.B. 1956. Photosynthetic nitrogen fixation by blue-green algae. Sci. Month. 83(2): 100-106.
- Allen, M.M.; Stanier, R. Y. 1968. Selective isolation of blue-green algae from water and soil. J. Gen. Microbiol. 51: 203-209.
- Allison, F.E.; Morris, H. J. 1930. Nitrogen fixation by blue-green algae. Science 71(1834): 221-223.
- Allison, F. E.; Morris, H.J. 1932. Nitrogen fixation by soil algae. Proc. Sec. Intern. Congr. Soil Sci. 3: 24-28.
- Allison, F.E.; Hoover, S. R. 1935. Conditions which favour nitrogen fixation by a blue-green alga. Proc. Trans. Intern. Congr. Soil Sci. 1: 145-147.

- Allison, F. E.; Hoover, S. R.; Morris, H. J. 1937. Physiological studies with the nitrogen-fixing alga, *Nostoc muscorum*. Bot. Gaz. 98(3): 433-463.
- Apte, S. K.; Rowell, P.; Stewart, W. D. P. 1978. Electron donation to ferredoxin in heterocysts of the N-fixing alga *Anabaena cylindrica*. Proc. R. Soc. Lond. B 200:1-25.
- Bharati, S. G.; Bongale, U. D. 1976. Nitrogen fixation by *Hapalosiphon welwitschii* W. and G. S. West. Phykos 15 (1-2): 31-33.
- Bottomley, P.J.; Stewart, W. D. P. 1977. ATP and nitrogenase activity in nitrogen-fixing heterocystous blue-green algae. New Phytol. 79: 625-638.
- Bortels, H. 1940. Über die Bedeutung des Molybdäns für stickstoffbindende Nostocaceen. Arch. Mikrobiol. 11: 155-186.
- Brock, T. D. 1973. Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. Science 179: 480-483.
- Bryceson, I.; Fay, P. 1981. Nitrogen fixation in *Oscillatoria* (*Trichodesmium*) *erythraea* in relation to bundle formation and trichome differentiation. Mar. Biol. 61 (2-3): 159-166.
- Burris, R. H.; Eppling, F. J.; Wahlin, H. B.; Wilson, P. W. 1943. Detection of nitrogen fixation with isotopic nitrogen. J. Biol. Chem. 148: 349-357.

- Cameron, E.; Fuller, W. H. 1960. Nitrogen fixation by some algae in Arizona soils. Proc. Am. Soil Soc. 24(5):353-356.
- Carpenter, E. J.; Price, C. C. 1976. Marine *Oscillatoria* (*Trichodesmium*): Explanation for aerobic nitrogen fixation without heterocysts. Science 191: 1278-1280.
- Clément, G.; Rebeller, M.; Trabouze, P. 1968. Utilization massive du gaz carbonique dans la culture d'une nouvelle algae alimentaire. Rev. Inst. Fr. Pétrole 23(5): 702-711.
- Copeland, J. J. 1932. Nitrogen fixation by Myxophyceae. Am. J. Bot. 19: 844.
- Chapman, V. J. 1950. Seaweeds and their uses. London, Methuen and Co. 287 p.
- Chapman, D. J. 1973. Biliproteins and bilipigments: 162-185. In Carr, N. G.; Whitton, B. A. (ed.). "The biology of blue-green algae". Blackwell Sci. Publ. Oxford. 676 p.
- Dadhich, K. S.; Varma, A.K.; Venkarataman, G. S. 1969. The effect of *Calothrix* inoculation on vegetable crops. Plant and Soil 31(2): 377-379.
- Davis, E. B.; Tischer, R. G.; Brown, L. R. 1966. Nitrogen fixation by the blue-green alga *Anabaena flos-aquae* A-37. Physiol. Plant. 19: 823-826.
- De, P. K. 1939. The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice fields. Proc. R. Soc. Lond., Ser. B 127 (846): 121-139.

- De, P. K.; Mandal, L. N. 1956. Fixation of nitrogen by algae in rice fields. Soil Sci. 81(6): 453-458.
- De, P. K.; Sulaiman, M. 1950. Fixation of nitrogen in rice soils by algae as influenced by crops, CO₂ and inorganic substances. Soil Sci. 70: 137-151.
- Donze, M.; Haveman, J.; Schiereck, P. 1972. Absence of photosystem 2 in heterocysts of the blue-green alga *Anabaena*. Biochem. Biophys. Acta 256: 157-161.
- Drewes, K. 1928. Über die Assimilation des Luftstickstoffs durch Blau-algen. Zentralbl. Bakt. Parasit. Abt. 2 76: 88-101.
- Fay, P. 1973. The heterocyst: 238-259. In Carr, N. G.; Whitton, B. A. (ed). "The biology of blue green algae". Blackwell Scientific Publ. Oxford. 676 p.
- Fay, P.; Fogg G. E. 1962. Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. III. Growth and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii* Mitra. Arch. Mikrobiol. 42: 310-321.
- Fay, P.; Stewart, W. D. P.; Walsby, A. E.; Fogg, G. E. 1968. Is the heterocyst the site of nitrogen fixation in blue-green algae?. Nature 220(5169): 810-812.
- Fogg, G. E. 1942. Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. I. Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. J. Exptl. Biol. 19(1): 78-87.

- Fogg, G. E. 1947. La fijación nitrogenica por algas verde-azules. Endeavour 6(24): 172-175.
- Fogg, G. E. 1951. Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. II. Nitrogen fixation by *Mastigocladus laminosus* Cohn. J. Exptl. Bot. 2(1): 117-120.
- Fogg, G. E. 1956. Nitrogen fixation by photosynthetic organisms. Ann. Rev. Plant Physiol. 7: 51-70.
- Fogg, G. E. 1961. Recent advances in our knowledge of nitrogen fixation by blue-green algae. Proc. Symposium Algology, New Delhi. 1959. Ind. Counc. Agric. Res: 115-117.
- Fogg, G. E. 1962. Nitrogen fixation: 161-170. In Lewin, R.A. (ed.). "Physiology and Biochemistry of Algae". Academic Press. New York and London. 929 p.
- Fogg, G. E.; Stewart, W. D. P. 1965. Nitrogen fixation in blue-green algae. Sci. Progr London 53(210): 191-201.
- Fogg, G. E.; Wolfe, M. 1954. The nitrogen metabolism of the blue-green algae (Myxophyceae): 99-125. In Fry, B. A.; Peel, J. L. (ed.) "Autotrophic microorganisms". Symp. Soc. Gen. Microbiol. 4
- Frank, B. 1889. Ueber den experimentellen Nachweis der Assimilation freien Stickstoffs durch erdbodenleohnende Algen. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 7: 34-42.
- Fritsch, F. E.; De, P.K. 1938. Nitrogen fixation by blue-green algae. Nature 142 (3602): 878.

- Gerloff, G. C.; Fitzgerald, G. P.; Skoog, F. S. 1950. The isolation, purification and culture of blue-green algae. Am. J. Bot. 37: 216-218.
- Goyal, S. K.; Venkataraman, G. S. 1964. Cultural variations in the morphology of *Anabaena cycadeae* Reinke Phykos 3 (1-2): 35-36.
- Halperin, D. R. de 1971. Las algas en la alimentación humana. Contr. Tecn. CIBIMA (10): 39 p.
- Halperin, D. R. de; Caire, G. Z. de; Mulé, M. C. Z. de 1974. Contenido proteico de *Aphanothece stagnina* (Sprengel) A. Braun (Cyanophyta, Chroococcaceae) . Physis Sec. B. 33 (87): 159-164.
- Halperin, D. R. de; Caire, G. Z. de; Mulé, M. C. Z. de; Cano, M. S. de 1977. Fijación de nitrógeno por una Cyanophyta unicelular: *Aphanothece stagnina* (Sprengel) A. Braun. Physis B. 36 (92): 85-88/ Contr. Cient. CIBIMA (145).
- Halperin, D.R. de; Cano, M.S. de; Mulé, M.C.Z. de; Caire, G. Z. de 1981. Algas azules fijadoras de nitrógeno atmosférico: su importancia como biofertilizante. Contr. Tecn. CIBIMA (36).
- Halperin, D. R. de; Mendoza, M. L.; Caire, G. Z. de. 1973. Obtención de cultivos axénicos de algas azules (Cyanophyta). Physis Sec. B 32(84): 67-84/Contr. Cient. CIBIMA (65).
- Haselkorn, R. 1978. Heterocysts. Ann. Rev. Plant Physiol. 29: 319-344.

- Haselkorn, R.; Mazur, B.; Orr, J.; Rice, D.; Wood, N.; Rippka, R. 1980. Heterocyst differentiation and nitrogen fixation in Cyanobacteria (Blue-green algae): 259-278. In Newton, W.E. and W. H. Orme-Johnson (Ed) "Nitrogen fixation". Vol II. University Park Press. Baltimore.
- Hellebust, J. A. 1974. Extracellular products: 838-863. In Stewart, W. D. P. (ed) "Algal physiology and chemistry". Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Henriksson, E. 1951. Nitrogen fixation by a bacteria free symbiotic *Nostoc* strain isolated from *Collema*. Physiol. Plant. 4:542-545.
- Hérisset, A. 1946. Fixation de l'azote par le *Nostoc commune* Vaucher. C. R. Acad. Sci. Paris 222: 1127-1129.
- Jacq, V.; Roger, P. 1977. Diminution des fontes de semis dues à la sulfato-réduction, par un prétraitement des graines de riz avec des Cyanophycées. Cah. Orstom Ser. Biol. 12(2): 101-107.
- Jones, A.S. 1960. Determination of nitrogen by Kjeldahl's method: 495-509. In Wilson, C. L. and D.W. Wilson (ed) "Comprehensive Analytical Chemistry". Vol I B Elsevier Pub. Co., Amsterdam. 878 p.
- Kratz, W. A.; Myers, J. 1955. Nutrition and growth of several blue-green algae. Am. J. Bot. 42(3): 282-287.
- Krogmann, D. 1973. Photosynthetic reactions and components of thylakoids: 80-98. In Carr, N.G. and B. A. Whitton (ed) "The biology of blue-green algae". Blackwell Scient. Publ. Oxford. 676 p.

- Lambein, F.; Wolk, C. P. 1973. Structural studies on the glycolipids from the envelope of the heterocyst of *Anabaena cylindrica*. Biochemistry 12(5): 791-798.
- Lang, C. A. 1958. Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological materials. An. Chem. 30(10): 1692-1694.
- Lang, N.J.; Fay, P. 1971. The heterocyst of blue-green algae II. Details of ultrastructure. Proc. R. Soc. Lond. B 178, 193-203.
- Laporte, G. S.; Pourriot, R. 1967. Fixation de l'azote atmosphérique par les algues Cyanophycées. Rev. Ecol. Biol. Sol 4(1): 81-112.
- Magee, W. E.; Burris, R. H. 1954. Fixation of N₂ and utilization of combined nitrogen by *Nostoc muscorum*. Am. J. Bot. 41: 777-782.
- Mehta, R.; Hawxby, K. 1977. Use of ultraviolet radiation to achieve bacteria-free algal culture. Proc. Okla. Acad. Sci. 57: 54-60.
- Mitra, A.K. 1950. Two new algae from Indian soils. Ann. Bot. n. s. 14 (56): 457-464.
- Mitra, A. K. 1961. Some aspects of fixation of elementary nitrogen by blue-green algae in the soil Proc. Nat. Acad. Sci. India 30 Sec. A: 98-99.
- Namikawa, S. 1906-1908. Fresh water algae as an article of human food. Bull. Coll. Agric. Tokyo Univ. 7: 123-124.

- Newton, J. W.; Tyler, D. D.; Slodki, M. E. 1979. Effect of ultraviolet B (280 to 320 nm) radiation on blue-green algae (Cyanobacteria), possible biological indicators of Stratospheric ozone depletion. App. Environ. Microbiol. 37(6): 1137-1141.
- Odintzova, S. V. 1941. Nitre formation in deserts. Compt. Rendus (Doklady) de l'Acad. des Sci. URSS 32(8): 578-580/ Nature 151 (3842): 701, 1943.
- Ohmori, M.; Hattori, A. 1971. Heterocyst and nitrogen fixation in *Anabaena cylindrica*. Proc. 7th Internat. Seaweed Symp: 598-601. Sapporo, Japan.
- Pankaw, H. 1964. Die bindung von Lufstickstoff durch Zwei weitere Blaualgen-Arten: *Fischerella muscicola* und *F. major*. Naturwis. 51: 274-275.
- Pattnaik, H. 1966. Growth and nitrogen fixation by *Westiellopsis prolifica* Janet. Ann. Bot. 30(118): 231-238.
- Pattnaik, U.; Singh, P. K. 1978. Effect of nitrate nitrogen on the growth, heterocyst differentiation and nitrogen fixation in rice field blue-green alga *Gloeotrichia* sp. Arch. Hydrobiol. 51: 318-327.
- Pringsheim, E. G. 1914. Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen. III. Mitteilung. Zur Physiologie der Schizophyceen. Beitr. Biol. Pfl. 12(1): 49-108
- Reddy, T. R. 1976. Nutrient induced modifications in sensitivity of two algae to ultraviolet light. Phykos 15(1-2): 103-115.

- Rippka, R. A.; Neilson, A.; Kunisawa, R.; Cohen-Bazire, G.
1971. Nitrogen fixation by unicellular blue-green algae. Arch. Mikrobiol. 76(4): 341-348.
- Roger, P. A.; Reynaud, P.A. 1977. Les méthodes d'isolement et de purification des cyanophycées. Cah. ORSTOM sér. Biol. 12(2): 121-128.
- Schneider, K.C.; Bradbeer, C.; Singh, R. N.; Waag, L.C.; Wilson, P. W.; Burris, R. H. 1960. Nitrogen fixation by cell-free preparations from microorganisms. Proc. N.A.S. 46: 726-733.
- Schwabe, G. H.; Ayouty, E.E. 1966. Über die hormogonale Blaualgen aus indischem Boden. Nova Hedwigia 10: 527-536.
- Simon, R. D. 1971. Cyanophycin granules from the blue-green alga *Anabaena cylindrica*: A reserve material consisting of copolymers of aspartic acid and arginine. Proc. Natl. Acad. Sci. 68(2): 265-267.
- Singh, R.N. 1961. The role of blue-green algae in nitrogen economy of Indian agriculture. Indian Counc. Agr. Res. 175 p.
- Singh, P.K. 1973. Nitrogen fixation by the unicellular blue-green alga *Aphanothece*. Arch. Mikrobiol. 92: 59-62.
- Singh, P.K. 1974. Effect of p H on growth and nitrogen fixation in *Aphanothece* (Cyanophyta). Oikos 25: 114-116.
- Singh, P.K. 1976. Growth and nitrogen fixation of a mutant of blue-green alga *Wollea bhavadwajae* defective in heterocyst development. Biochem. Physiol. Pflanzen 170: 237-242.

- Singh, P.K. 1977. Growth and nitrogen fixation of unicellular blue-green alga *Aphanothece castagnei*. Biol. Plant. (Praha) 19(2): 156-157.
- Singh, V P. 1978. Ultraviolet inactivation and repair of the blue-green alga *Anabaena variabilis* Kütz. J. Cytol. Genet. 13: 38-45.
- Singh, V. P. 1979. Studies on growth, heterocyst production and nitrogen fixation in *Anabaena variabilis*. Indian J. Plant Physiol. 22(1):61-65.
- Smith, K.C. 1977. Ultraviolet radiation effects on molecules and cells: 113-142. In Smith, K. C. (ed.) "The Science of Photobiology". A Plenum/Rosetta Edition. 430 p.
- Smith, R. V.; Evans, M. C. W. 1970. Soluble nitrogenase from vegetative cells of blue-green alga *Anabaena cylindrica*. Nature (Lond.) 225: 1253-1254.
- Stanier, R. Y.; Cohen Bazire, G. 1977. Phototrophic prokaryotes: The Cyanobacteria. Ann. Rev. Microbiol. 31: 225-274
- Stewart, W. D. P. 1967. Nitrogen-fixing plants. Science 158(3807): 1426-1432.
- Stewart, W. D. P. 1970. Algal fixation of atmospheric nitrogen. Plant and Soil 32(3): 555-588.
- Stewart, W. D. P. 1972. Heterocysts of blue-green algae: 227-235. In Desikachary, T. V. (ed.) "Taxonomy and Biology of blue-green algae". Madras Univ., Madras, India. 591 p.
- Stewart, W. D. P. 1973. Nitrogen fixation: 260-278. In Carr, N. G.; Witton, B. A. (ed.) "The biology of blue-green algae". Blackwell Sci. Publ. Oxford. 676 p.

- Stewart, W. D. P. 1974. Blue-green algae: 202-264. In Quispel, A. (ed.). "The biology of nitrogen fixation". North-Holland Publ. Co., Amsterdam. Oxford. Am. Elsevier Publ. Co., Inc., New York.
- Stewart, W. D. P. 1976. *Anabaena cylindrica*, a model nitrogen-fixing alga: 235-246. In Suderland, N(ed.) "Perspectives in experimental biology". Vol 2. Bot. Pergamon Press. Oxford.
- Stewart, W. D. P. 1977. A botanical ramble among the blue-green algae. Br. Phycol. J. 12: 89-115.
- Stewart, W. D. P.; Fitzgerald, G. P.; Burris, R. H. 1968. Acetylene reduction by nitrogen-fixing blue-green algae. Arch. Mikrobiol. 62: 336-348.
- Stewart, W. D. P.; Haystead, A.; Pearson, H. W. 1969. Nitrogenase activity in heterocysts of filamentous blue-green algae. Nature 224(5216): 226-228.
- Stewart, W. D. P.; Lex, M. 1970. Nitrogenase activity in the blue-green alga *Nectonema boryanum* Strain 594. Arch. Mikrobiol. 73: 250-260.
- Stewart, W. D. P.; Pearson, H. W. 1970. Effects of aerobic and anaerobic conditions on growth and metabolism of blue-green algae. Proc. R. Soc. London B 175: 293- 311.
- Stewart, W. D. P.; Codd, G. A. 1975. Polyhedral bodies (carboxysomes) of nitrogen-fixing blue-green algae. Br. Phycol. J. 10: 273-278.

- Stokes, J. L. 1940. The role of algae in the nitrogen cycle of the soil. Soil Sci. 49(4): 265-275.
- Stokes, J. L. 1941. The relation of algae to the nitrogen economy of the soil. Chron. Bot. 6(9): 202-203.
- Sundara, Rao, W. V. B.; Goyal, S. K.; Venkataraman, G. S. 1963. Effect of inoculation of *Aulosira fertilissima* on rice plants. Curr. Sci. 32: 366-367.
- Taha, E.E.M.; El Refai, A. H. 1962. Physiological and biochemical studies on nitrogen fixing blue-green algae. II. The role of calcium, strontium, cobalt and molybdenum in nitrogen fixation of *Nostoc commune*. Arch. Mikrobiol 43: 67-65.
- Taha, E. E. M.; El Refai, A. H. 1963. On the nitrogen fixation by Egyptian blue-green algae. Zeitschr. allg. Mikrobiol. 3(4): 282-288.
- Taha, M. S. 1963. Isolation of some nitrogen fixing blue-green algae from the rice fields of Egypt, in pure cultures. Microbiology 32(3): 492-497.
- Tchan, Y. T. ; Gould, J. 1961. Use of antibiotics to purify blue-green algae. Nature 192(4809): 1276.
- Tel-Or, E.; Stewart, W. D. P. 1975. Manganese and photosynthetic oxygen evolution by algae. Nature 258(5537) 715-716.
- Tel-Or, E.; Stewart, W. D. P. 1977. Photosynthetic components and activities of nitrogen-fixing isolated heterocysts of *Anabaena cylindrica*. Proc. R. Soc. Lond. B. 198: 61-86.

- Tiwari, G. L.; Pandey, D. C. 1976. On the morphology and nitrogen fixation in *Nodularia harveyana* (Thwaites) Thuret, a new record from India. Phykos 15(182): 59-63.
- Ukai, Y.; Fuyita, Y.; Morimura, Y.; Watanabe, A. 1958. Studies on growth of blue-green alga *Tolypothrix tenuis*. J. Gen. Appl. Microbiol. 4(3): 163-169.
- Varma, A. K.; Mitra, A.K.; Venkataraman, G. S. 1964. Role of *Aulosira fertilissima* in the nitrogen economy of soils Phykos 3(1-2): 29-32.
- Venkataraman, G. S. 1961 a. Nitrogen fixation by *Stigonema dendroideum*. Ind. J. Agr. Sci. 31(3): 213-215.
- Venkataraman, G. S. 1961 b. A method of preserving blue-green alga for seedling purposes. J. Gen. Appl. Microbiol. 7 (2): 96-99.
- Venkataraman, G. S. 1962. Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. III. Nitrogen fixation by *Anabaena azollae*. Ind. J. Agric. Sci. 32(1): 22-24.
- Venkataraman, G. S. 1966. Algalization. Phykos 5(1-2): 164-174.
- Venkataraman, G. S. 1967. Blue-green algae and soil fertility. Proc. Natl Acad. Sci.(India) 37 A(3-4):380.
- Venkataraman, G. S. 1969. The cultivation of algae. Ind. Counc. Agric. Res. New Delhi. 319 p.
- Venkataraman, G. S. 1977 a. Blue-green algae as a biological nitrogen input in rice cultivation. Proc. Natl. Symp. "Nitrogen assimilation and crop productivity". 132-141.

- Venkataraman, G. S. 1977 b. Blue-green algae. A biofertilizer for rice. Ind. Agric. Res. Inst. New Delhi 110012 India. 8p.
- Venkataraman, G. S.; Dutta, N.; Natarajan, K.V. 1959. Studies on nitrogen fixation by blue-green algae. I: nitrogen fixation by *Cylindrospermum sphaerica* Prasad. J. Ind. Bot. Soc. 38: 114-119.
- Venkataraman, G. S. ; Jacob, K. M.; Goyal, S. K. 1964. Nitrogen fixation by the endophytic alga from the coralloid roots of *Cycas revoluta*. Proc. Natl. Acad. Sci. (India) 34(B(2)): 153-159.
- Venkataraman, G. S.; Neelakantan, S. 1967. Effect of the cellular constituents of the nitrogen-fixing blue-green alga *Cylindrospermum muscicola* on the root growth of rice plants. J. Gen. Appl. Microbiol. 13:53-61.
- Virtanen, A. I. 1948. Biological nitrogen fixation. Ann. Rev. Microbiol. 2: 485-506.
- Watanabe, A. 1951. Production in cultural solution of some aminoacids by the atmospheric nitrogen-fixing blue-green algae. Arch. Bioch. Biophysics 34(1): 10-55.
- Watanabe, A. 1956. On the effect of the atmospheric nitrogen-fixing blue-green algae on the yield of rice. Bot. Magazine (Tokyo). 69(820-821): 530-536.
- Watanabe, A. 1959 a. Distribution of nitrogen-fixing blue-green algae in various areas of south and east Asia. J. Gen. Appl. Microbiol. 5(1-2): 21-29.
- Watanabe, A. 1959 b. On the mass-culturing of a nitrogen-fixing blue-green alga, *Tolypothrix tenuis*. J. Gen. Appl. Microbiol. 5(1-2): 85-91.

- Watanabe, A. 1959 c. Some devices for preserving blue-green algae in viable state. J. Gen. Appl. Microbiol. 5(3): 153-157.
- Watanabe, A. 1960. Collection and cultivation of nitrogen-fixing blue-green algae and their effect on the growth and crop yield of rice plants: 162-166. In Proc. Symp. Algology Ind. Counc. Agric. Res. and Unesco, New Delhi, 1959.
- Watanabe, A. 1962. Effect of the nitrogen-fixing blue-green alga *Tolypothrix tenuis* on the nitrogenous fertility of paddy soil and the crop yield of rice plants. J. Gen. Appl. Microbiol. 8(2): 85-91.
- Watanabe, A. 1966. Some devices for preservation of algae: 9-13. In Watanabe, A.; Hattori, A. (ed.) "Cultures and collections of algae". The Japanese Soc. Plant Physiol.
- Watanabe, A. 1973. On the inoculations of paddy fields in the Pacific area with nitrogen fixing blue-green algae. Soil Biol. Biochem. 5: 161-162.
- Watanabe, A. 1975 a. Nitrogen fixation by algae: 255-272. In Tokida, J.; Hirose, H. (ed.) "Advances of Phycology in Japan". W. Junk Publ. The Hague. 355 p.
- Watanabe, A. 1975 b. Nitrogen fixing blue-green algae used as green manure: 3-7. In Takahashi, H. (ed.) "Nitrogen fixation and nitrogen cycle". Japanese Comm. Int. Biol. Program. JIBP Synthesis 12. Univ. Tokyo Press.

- Watanabe, A.; Kiyohara, T. 1960. Decomposition of blue-green algae as effected by the action of soil bacteria J. Gen. Appl. Microbiol. 5(4): 175-179.
- Watanabe, A.; Kiyohara, T. 1963. Symbiotic blue-green algae of Lichens, Liverworts and Cycads. In "Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria". Special Issue of Plant and Cell Physiol.: 189-196. Univ. Tokyo Press, Japan.
- Watanabe, A.; Nishigaki, S; Konishi, C. 1951. Effect of nitrogen-fixing blue-green algae on the growth of rice plants. Nature 168(4278): 748-749.
- Watanabe, A.; Yamamoto, Y. 1967. Heterotrophic nitrogen fixation by the blue-green alga *Anabaenopsis circularis*. Nature 214(5089): 738.
- Watanabe, Iwao; Kuk-ki, L.; Guzmán, M. 1978. Seasonal change of N₂ fixing rate in rice field assayed by in situ acetylene reduction technique. II: estimate of nitrogen fixation associated with rice plants. Soil Sci. Plant Nutr. 24(4): 465- 471.
- Wildon, D. C.; Mercer, F. V. 1963. The ultrastructure of the heterocyst and akinete of the blue-green algae. Arch. Mikrobiol. 47: 19-31.
- Williams, A. E.; Burris, R. H. 1952. Nitrogen fixation by blue-green algae and their nitrogen composition. Am. J. Bot. 39: 340-342.
- Winkenbach, F.; Wolk, C. P. 1973. Activities of enzymes of the oxidative and reductive pentose phosphate pathways in heterocysts of a blue-green alga. Plant Physiol. 52: 480-483.

- Wolk, C. P. 1966. Evidence of a role of heterocyst in the sporulation of a blue-green alga. Am. J. Bot. 53(3): 260-262.
- Wolk, C. P. 1968. Movement of carbon from vegetative cells to heterocysts in *Anabaena cylindrica*. J. Bacteriol. 96 (6): 2138-2143.
- Wolk, C. P. 1980. Heterocysts, ^{13}N , and N_2 -fixing plants: 279-291. In Newton, W. E. and W. H. Orme-Johnson (ed.) "Nitrogen fixation". Vol II. University Park Press. Baltimore.
- Wyatt, J. T.; Silvey, J.K.G. 1969. Nitrogen fixation by *Gloeocapsa*. Science 165(3896): 908-909.

Helwig P. de Toledo

