

REGISTRO DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN EL SISTEMA LAGUNAR HUIZACHE Y CAIMANERO, SINALOA, MÉXICO

GUADALUPE DE LA LANZA, VIRGILIO ARENAS,
JAVIER TABOADA* y MIGUEL A. RODRÍGUEZ

Laboratorio de Química y Productividad Acuática,
Depto. de Zoología, Instituto de Biología, UNAM.

RESUMEN

Muestras de sedimento y de agua procedentes de distintas localidades del Sistema Lagunar Huizache y Caimanero de Sinaloa y con diferentes características en composición, fueron sometidas directamente a la prueba de la reducción del acetileno. De las trece estaciones estudiadas sólo tres muestras resultaron fuertemente positivas. De estas muestras se obtuvieron siete cepas en medios de cultivo carentes de nitrógeno, dichas cepas fueron sometidas a reducir nuevamente al acetileno, obteniéndose resultados negativos. Después de una serie de cambios en la composición de los medios de cultivo, periodos largos de incubación y estado de anacrobiosis se logró reducir levemente el acetileno.

Al parecer, el aporte de compuestos nitrogenados por fijación bacteriana en los sedimentos lagunares, es significativo. Sin embargo, a nivel de cultivo en medios sintéticos disminuye la capacidad de fijación debido posiblemente al tipo de sustrato.

ABSTRACT

Sediment and water samples from the Huizache-Caimanero Lagoon obtained at different localities and having different characteristics of composition were directly submitted to the acetylene reduction test. Of the thirteen samples studied only three were positive. From inoculations made into adequate culture media, seven pure bacterial strains were obtained. The isolates were again submitted to the acetylene-reduction test and gave negative results. After a series of changes in the composition of the media, long incubation periods, and anaerobiosis conditions the acetylene was slightly reduced.

It seems that the flow of nitrogen compounds by bacterial fixation in lagoon sediment is significant. However, the strains grown in synthetic media showed a low capacity to reduce acetylene, possibly due to the type of substratum.

INTRODUCCIÓN

A pesar de que el contenido de nitrógeno molecular en el aire es de 78% y en el mar 67%, no todos los productores pri-

marios acuáticos son capaces de asimilarlo para producir compuestos aprovechables, puesto que las formas más utilizables por

* Instituto de Química, UNAM.

ellos son sales inorgánicas como nitratos, nitritos y sales de amonio (nutrimentos).

En el ciclo del nitrógeno del ambiente acuático, el mayor aporte varía según las condiciones ambientales y locales, pero en rasgos generales las fuentes más importantes de nitratos y amonio son las fluviales, las atmosféricas y la actividad bacteriana. Sin embargo, en aquellos ambientes donde estas fuentes de nutrimentos son inferiores o han disminuido, puede presentarse en forma significativa el aporte de compuestos inorgánicos nitrogenados por algas azul-verdes y bacterias fijadoras de nitrógeno molecular.

Se ha estimado la cantidad de nitrógeno fijado por bacterias en el medio acuático, tanto en la columna de agua como en el sedimento y en cierta flora.

MacRoy *et al.* (1973), registraron un valor máximo de fijación de nitrógeno por bacterias de $29 \mu\text{g N}(\text{m}^2\text{-día})^{-1}$ en sedimentos que contenían raíces y rizomas de *Thalassia*. Bunt y colaboradores (1971), calcularon un valor de $0.37 \mu\text{g N}(\text{m}^2\text{-día})^{-1}$, en ensayos *in situ* en sedimentos de *Thalassia*.

Patriquin y Knowles (1972), cuantificaron el nitrógeno fijado en muestras que contenían raíces, rizomas y sedimentos por un lado, y hojas de pastos marinos por otro, registrando el máximo valor para estas últimas con $33 \mu\text{g N}$ por gramo de hoja formada.

Whitney *et al.* (1975), obtuvieron valores de nitrógeno fijado de $136 \mu\text{g}$

$\text{N}(\text{m}^2\text{-h})^{-1}$ en lodos intermareales; en sedimentos de *Spartina alterniflora* 116 y $65.4 \mu\text{g N}(\text{m}^2\text{-h})^{-1}$ y en charcos de marea $1,400$ a $5,000 \mu\text{g N}(\text{l-h})^{-1}$.

Según Head y Carpenter (1975), *Azotobacter* en simbiosis con *Codium* señalan valores de fijación de nitrógeno de 4.2 a $7.3 \mu\text{g N}(\text{g-h})^{-1}$ /peso seco. Los valores anteriormente presentados reflejan variación, tanto desde el punto de vista estacional como de localidad, y permiten reconocer la importancia en el aporte de nitrógeno a través de bacterias, tanto libres como simbióticas.

Debido al valor que tiene este tipo de aporte en el ciclo del nitrógeno en ciertos ambientes acuáticos, el trabajo aquí presentado consiste en un estudio preliminar de bacterias fijadoras de nitrógeno en un ambiente lagunar temporal de importancia pesquera. El Sistema Lagunar Huizache y Caimanero, Sin., tiene una gran trascendencia camaronera y muestra 2 estaciones anuales: la estación seca en que pierde el 70% de su volumen total y la estación de lluvias. Durante la estación de secas, el área es cubierta en su mayoría por vegetación halófila (*Suaeda mexicana*, Stand.) que posiblemente le sirve como material fertilizante al descomponerse en la época de lluvias, teniendo así una alta tasa de disponibilidad de nutrimentos y una producción primaria elevada que soporta una significativa producción camaronera.

MATERIAL Y MÉTODOS

En las estaciones de muestreo que se señalan en el mapa de la Laguna Huizachey Caimanero (Fig. 1), se colectaron muestras de agua, sedimento y halófitas vivas y en descomposición, durante la época de lluvias (septiembre 1977).

Cada estación fue seleccionada de acuerdo a distintas características del sustrato, y se ubicaron a una profundidad entre 10 y 50 cm; las muestras de agua se colectaron por arriba de la interfase y las de sedimento fueron superficiales. El con-

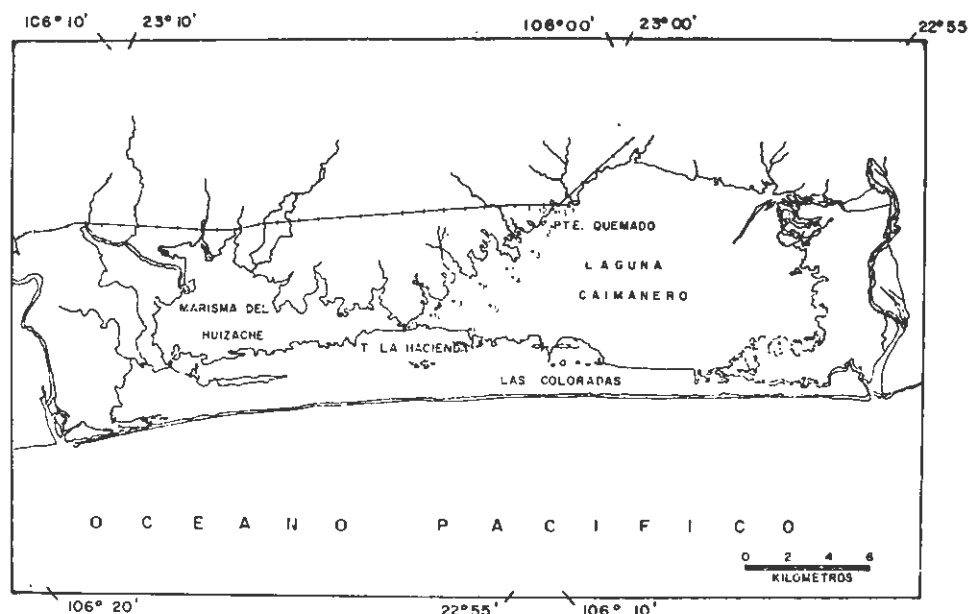


Fig. 1. Localización de las Estaciones de muestreo en el Sistema Lagunar Huizache y Caimanero.

tenido de materia orgánica, así como las características granulométricas en las estaciones fueron estudiadas por De la Lanza (1978). Las temperaturas registradas oscilaron entre 29 y 31°C. La salinidad presentó durante la época de lluvias un gradiente en el área de muestreo de 2 al 15‰. De los compuestos inorgánicos de nitrógeno, el NH_4 fue el más abundante, variando entre 0.78 y 2.28 $\mu\text{g-átomo N-ml}^{-1}$ de agua intersticial en el sedimento superficial (Arenas, comunicación personal). En cada estación se tomó una sola muestra, en frasco ampula estéril sellado *in situ* y transportado y mantenido en refrigeración, durante 72 hrs como máximo, antes de ser sometido a la prueba de la reducción del acetileno a etileno (Stewart, *et al.* 1967); desarrollándose en la siguiente forma: a una muestra de 10 a 15 g contenida en frascos ampula (60

ml) con tapón de hule y cerrada herméticamente con capucha de aluminio, se le inyectaron 0.15 atms de acetileno en ambiente de He ; la muestra se dejó incubar durante 24 hrs, y transcurrido este tiempo, se determinó la presencia de etileno por cromatografía de gases (Taboada *et al.*, 1971).

Las muestras que resultaron positivas fueron sembradas por triplicado en el medio de cultivo sólido 77 S (Allen, 1951) con el objeto de hacer el análisis bacteriológico y mantener las cepas para estudios posteriores. Así mismo se realizaron una serie de resiembras para aislar las colonias que fueron confirmadas por morfología y tinción de Gram.

Posteriormente, las colonias obtenidas fueron inoculadas por triplicado en el medio sólido de Lipman (Allen, 1951), que tiene como única diferencia con el me-

dio 77 S, la presencia de molibdato de sodio, obteniéndose una segunda separación de colonias (diferenciadas por tinción de Gram).

Estas últimas, fueron sometidas de nue-

vo a la prueba de la reducción del acetileno bajo distintos periodos de incubación, edades del cultivo y algunos cambios en la composición química del medio de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las trece estaciones de muestreo (más una prueba hecha en el laboratorio con la halófito viva), sólo se obtuvieron resultados positivos iniciales para las estaciones 1 en sedimento, y 2 en sedimento y halófitas en descomposición; sin considerar a las estaciones 1 en agua y la 3 en agua y sedimento (trazas). El resto no redujo el acetileno.

Entre las características de los sustratos que soportan organismos fijadores de nitrógeno está el contenido y el tipo de materia orgánica; a este respecto, la estación 1 (en sedimento) es una región donde se encuentran almacenes de pesca y se desecha todo material de desperdicio de camarón. Las otras muestras francamente positivas (la estación 12 en sedimento de halófitas en descomposición, y la halófito en descomposición), representan también un sustrato rico en materia orgánica como fuente de carbono. En el resto de las estaciones, posiblemente la cantidad de carbono proveniente de materia orgánica, no fue la suficiente para mantener el desarrollo de microorganismos o la capacidad para fijar nitrógeno molecular.

En las muestras que fueron positivas, se llevó a cabo un análisis bacteriológico para la separación posterior. Como resultado de los primeros inóculos en el medio 77 S, se obtuvieron colonias de bacilos Gram negativos para las estaciones 1 en sedimento y la 12 halófito en descomposición; en la estación 12 en sedimento,

también fueron Gram negativos pero con la presencia de esporas diferenciadas por la técnica de Wirtz-Conklin (Gradwohl, 1949); con relación a este resultado, se considera por lo general que las bacterias esporuladas son Gram positivas aunque algunas de ellas varían a Gram negativas y son fijadoras de nitrógeno, como *Bacillus macerans* y *B. polymyxa* (Buchanan y Gibbons, 1974).

En la resiembra de las colonias del medio 77 S al medio de Lipman, en la estación 1 en sedimento, se obtuvieron cuatro tipos diferentes de colonias; y en la estación 12 en sedimento se conservó el mismo tipo, con la excepción de que no se observaron esporas. Este cambio pudiera deberse a que el medio de cultivo de Lipman contiene Mo (Alexander, 1977).

En total se obtuvieron 3 tipos de colonias en el medio 77 S y 6 en el Lipman, que en medio líquido y con un desarrollo de 21 días, fueron sometidas cada una y por separado a la prueba del acetileno durante 24 hrs., obteniéndose resultados negativos. Se confirmó la prueba con nuevos inóculos, más uno que contenía las 9 colonias juntas, con resultados negativos nuevamente.

Entre los factores más importantes que inhiben la fijación de N_2 por bacterias, se encuentra; la presencia de sales de nitrógeno, la fuente de carbono y el grado de aerobiosis, por lo que se procedió al análisis del agua de los medios de cultivo con los siguientes resultados:

Agua destilada 1.6 μg átomo $\text{N-NH}_4\text{I}^{-1}$
Agua bidestilada 0.8 μg átomo $\text{N-NH}_4\text{I}^{-1}$

El agua destilada fue usada en todos los medios de cultivo anteriores y considerando su alto contenido en NH_4 , se estimó conveniente preparar nuevos medios con agua bidestilada. Sin embargo, aun cuando las concentraciones de este ión fueran altas, en el medio natural es posible la fijación de nitrógeno por bacterias, pero bajo condiciones distintas ya que el amonio inhibe sólo temporalmente la actividad de la nitrogenasa (Goering y Neess, 1964; Schick, 1971; Head y Carpenter, 1975).

Por lo que se refiere a la fuente de carbono utilizada por estas bacterias, los medios de cultivo 77 S y Lipman contienen sacarosa; en los últimos cultivos experimentales ésta fue sustituida por glucosa. Este cambio obedeció a que en el ambiente natural, las bacterias simbiotes de algas, utilizan el producto de secreción de estas últimas que es glucosa (Head y Carpenter, 1975).

En relación a la concentración de O_2 en el medio de cultivo, Dalton y Postgate (1969), han observado que en altas condiciones de aereación o elevadas presiones de O_2 , la fijación es ineficiente y sobre todo en relación al consumo de carbono como fuente de energía, y sugieren que la óptima fijación se realiza en anaerobiosis.

Tomando en consideración este último hecho, se llevó a cabo un siguiente inóculo en un medio de cultivo con mínimas concentraciones de sales de N_2 , fuente de carbono glucosa y baja tensión de O_2 en los medios de 77 S y Lipman.

Debido a que el desarrollo de las colonias en todos los casos fue sumamente lento y difuso, el último análisis de reducción de acetileno se realizó en un cultivo de 11 días, transcurridos los cuales se le inyectó el acetileno y se registró el etileno formado a los 14 y 21 días después de la inyección, obteniéndose los siguientes resultados: después de 14 días de la adición se obtuvo una respuesta ligeramente positiva en la estación 12 en sedimento, que prolongados a los 21 días, se presentó el mismo nivel de reducción de acetileno, asimismo aparecieron también ligeramente positivas la estación 12 en halófitas en descomposición y un aumento significativo para la estación 1 en sedimento.

Finalmente, las muestras iniciales que redujeron el acetileno, después de una separación bacteriológica y un cultivo posterior prolongado, lograron fijar nuevamente. Lo que significa, en términos generales, que sólo bajo condiciones naturales de sustrato (fuente de carbono, y anaerobiosis, las bacterias fijadoras pueden aportar valores considerables de nitrógeno dentro de los sistemas en que habitan, o bien que requieren mayor tiempo en condiciones de laboratorio.

Tanto la nitrificación como la desnitrificación, en ambientes lagunares, puede tener un papel importante en el ciclo del nitrógeno de estos cuerpos de agua, en los que la disponibilidad del mismo es con frecuencia un factor limitante. La cuantificación de la fijación de nitrógeno, debe llevarse a cabo con el fin de conocer el funcionamiento de estos ecosistemas, susceptibles al deterioro por contaminación.

LITERATURA

ALEXANDER, M. (1977). Introduction to soil microbiology. Wiley, 2a. Ed. 287-304.

ALLEN, O. N. (1951). Experiments in soil bacteriology. Burges Publ. Minneapolis, Minn., pp. 58-64.

- BUCHANAN, R. E. y GIBBONS, N. E. (1974). (Co. Ed.) Bergey's manual of determinative bacteriology. The Williams Et Wilkings, Baltimore 8a. Ed. 529-577.
- BUNT, J. S., LEE, C. C., TAYLOR, B., ROST, P. y LEE, E. (1971). Quantitative studies on certain features of card sound as a biological system. Rosenstiel School Mar. Sci. Univ. Miami Tech. Rep. 25 pp.
- DE LA LANZA, G. (1978). Materia Orgánica en una laguna de la costa de Sinaloa, México (1) Cuantificación Total. Mem. V. Simp. Lat. Amer. Oceanogr. Biol. Nov. 20-25, Sao Paulo, Brasil.
- DALTON, H. y POSTGATE, J. R. (1969). Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous cultures, J. Gen. Microbiol. 54, 463-473.
- GOERING, J. J. y NEESS, T. C. (1964). Nitrogen fixation in two Wisconsin Lakes. Limnol. Oceanogr. 9, 507-510.
- GRADWOHL, R. B. H. (1949). Clinical laboratory methods and diagnosis. Vol. II. St. Louis Mosby, 4a. Ed. 1327-1328.
- HEAD, W. D. y CARPENTER, E. J. (1975). Nitrogen fixation associated with the marine macroalga *Codium fragile*. Limnol. Oceanogr. 20, 815-823.
- MCCROY, C. P., GOERING, J. J. y CHANEY, B. (1973). Nitrogen fixation associated with seagrasses. Limnol. Oceanogr. 18, 998-1002.
- PATRIQUIN, D. C. y KNOWLES, R. (1972). Nitrogen fixation in the rhizosphere of marine angiosperm. Mar. Biol. 16, 46-58.
- SCHICK, H. J. (1971). Sustrate and light dependent fixation of molecular nitrogen in *Rhodospirillum rubrum*. Arch. Mikrobiol. 75, 89-101.
- STEWART, W. P. D., FITZGERALD, G. P. y BURRIS, R. H. (1967). *In situ* studies on N_2 fixation using the acetylene reduction technique. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 58, 2071-2078.
- TABOADA, J., HERRERA, T. y ULLOA, M. (1971). Prueba de la reducción del acetileno para la determinación de microorganismos fijadores de nitrógeno aislados del Pozol. Rev. Lat Amer. Quím. 2, 188-191.
- WHITNEY, D. E., WOODWELL, G. M. y HOWARTH, R. W. (1975). Nitrogen fixation in flax pound: a long island salt marsh. Limnol. Oceanogr. 20, 640-646.