



TOGETHER
for a sustainable future

OCCASION

This publication has been made available to the public on the occasion of the 50th anniversary of the United Nations Industrial Development Organisation.



TOGETHER
for a sustainable future

DISCLAIMER

This document has been produced without formal United Nations editing. The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariat of the United Nations Industrial Development Organization (UNIDO) concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries, or its economic system or degree of development. Designations such as “developed”, “industrialized” and “developing” are intended for statistical convenience and do not necessarily express a judgment about the stage reached by a particular country or area in the development process. Mention of firm names or commercial products does not constitute an endorsement by UNIDO.

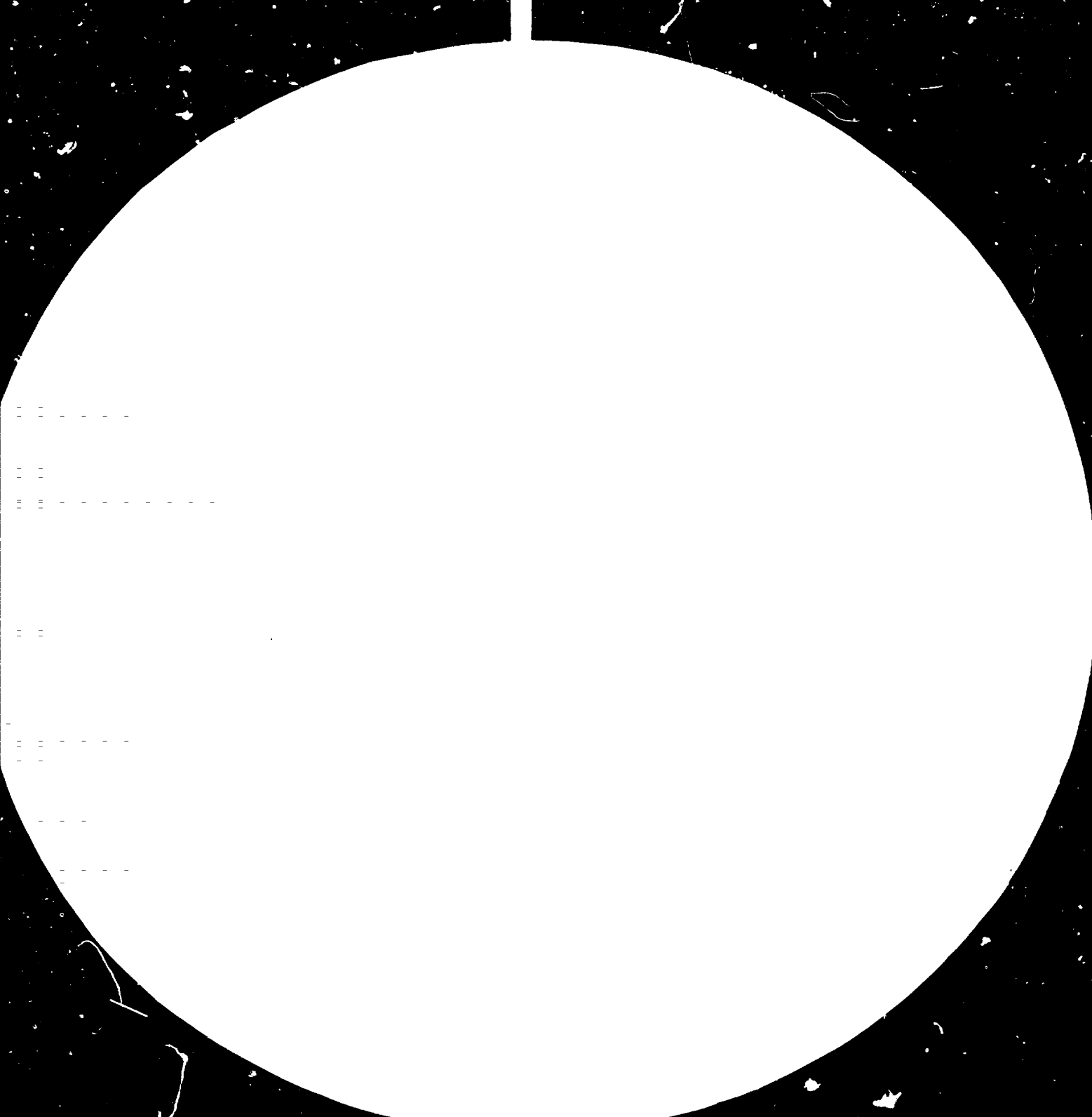
FAIR USE POLICY

Any part of this publication may be quoted and referenced for educational and research purposes without additional permission from UNIDO. However, those who make use of quoting and referencing this publication are requested to follow the Fair Use Policy of giving due credit to UNIDO.

CONTACT

Please contact publications@unido.org for further information concerning UNIDO publications.

For more information about UNIDO, please visit us at www.unido.org





Microcopy Resolution Test Chart

SAFETY COPY NO. 1000



11730-S

Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial

Distr. LIMITADA
ID/WG.382/2/Add.2
20 septiembre 1982
ESPAÑOL
Original: INGLES

Reunión de alto nivel sobre la creación
del Centro Internacional de Ingeniería
Genética y Biotecnología
Belgrado, Yugoslavia, 13-17 diciembre 1982

APLICACION DE LA INGENIERIA GENETICA A LA PRODUCCION DE
DE ENERGIA Y DE FERTILIZANTES A PARTIR DE LA BIOMASA*

preparado por
Ray Wu**

* Las opiniones que el autor expresa en este documento no reflejan necesariamente las de la secretaría de la ONUDI. El presente documento es traducción de un texto que no ha pasado por los servicios de edición de la ONUDI.

** Profesor, Department of Biochemistry, Cornell University, W1ag Hall, Ithaca, N.Y. 14853, Estados Unidos de América.

V.82-30523

INDICE

	<u>Página</u>
A (1). <u>Antecedentes y justificación</u>	1
1. Materiales celulósicos	1
2. Celulasas	1
3. Microorganismos celulolíticos	2
B (1). <u>Actividades</u>	3
1. Análisis de las celulasas obtenidas a partir de organismos celulolíticos	3
2. Clonación de los genes de celulasa y producción de mutantes favorables mediante la mutagénesis in vitro	3
3. Clonación de genes fungales de celulasa e introducción de los genes en la levadura	4
4. Clonación de genes bacterianos de celulasa e introducción de esos genes en la <i>Zymomonas mobilis</i>	5
5. Clonación del gen de la xilosa isomerasa e introducción de ese gen en el <i>S. pombe</i>	6
PRODUCCION DE FERTILIZANTES UTILIZANDO SISTEMAS BIOLÓGICOS	8
A (2). <u>Antecedentes y justificación</u>	8
B (2). <u>Actividades</u>	9
1. Utilización de la ingeniería genética para alterar el <i>Thiobacillus</i> y otros microorganismos, a fin de fijar más nitrógeno con objeto de aumentar la producción agrícola	11
2. Utilización de microorganismos libres para aumentar la productividad de los cultivos	12
C (2). <u>Plan de trabajo</u>	14
D (2). <u>Colaboración con otras instituciones</u>	15
E (2). <u>Requisitos previos</u>	15
F (2). <u>Necesidades financieras</u>	15
ANEXO I	
<u>Necesidades de equipo</u>	17
<u>Referencias para la producción de combustible líquido a partir de la biomasa</u>	19
<u>Bibliografía - Proyecto de nitrificación</u>	21

A. 1) Antecedentes y justificación

En vista de los crecientes problemas de escasez de combustible y reutilización de desechos, resulta necesario lograr la utilización y transformación eficientes de recursos renovables (como los materiales y residuos celulósicos) en combustibles líquidos. De esta forma se reducirá, al menos parcialmente, la necesidad de recurrir a materiales no renovables como el petróleo, cuya oferta disminuye.

A fin de resolver este importante problema mundial, el insumo de la ingeniería genética y de la biotecnología es absolutamente esencial. La ingeniería genética constituye un conjunto de múltiples disciplinas, entre las que se encuentran la bioquímica, la microbiología, la genética y la tecnología del ADN recombinado.

1. Materiales celulósicos. La celulosa y la hemicelulosa son los recursos renovables más abundantes de la naturaleza. Con la lignina, constituyen alrededor del 95% del peso seco de los residuos vegetales. La producción mundial de celulosa de residuos es superior a los 4.000 millones de toneladas anuales (1). Si los materiales celulósicos pudieran transformarse eficientemente en etanol, se dispondría de una enorme fuente de combustible líquido. Técnicamente, el proceso es relativamente sencillo: la hidrólisis de la celulosa para obtener glucosa y la transformación ulterior de ésta en etanol. El proceso se utilizó para la producción de etanol en gran escala durante la primera y la segunda guerras mundiales, y se perfeccionó en el decenio de 1940. Como consecuencia del bajo rendimiento y de la corrosión causada por el ácido catalítico necesario para descomponer los materiales celulósicos, el proceso no podía competir económicamente con los procesos basados en el petróleo. Sin embargo, la reciente crisis energética y el rápido agotamiento de las reservas de petróleo, juntamente con el desarrollo de la hidrólisis enzimática microbiana de la celulosa, ha invertido paulatinamente la situación. Mediante la aplicación de la ingeniería genética y de la biología, se confía en que la conversión de los materiales celulósicos en etanol resultará económicamente competitiva.

2. Celulasas. Los principales componentes celulásicos se aislaron a partir de filtrados de cultivos de muchos microorganismos como la Trichoderma reesei, cuyo sistema es el que más detenidamente se ha estudiado. Utilizando procedimientos cromatográficos, se han purificado las celulasas para lograr su homogeneidad (2). Entre esas celulasas se encuentran las siguientes:

- a) 1,4- β -glucan glucanohidrolasa (conocida también como endoglucanasa y CMCasa): convierte la celulosa amorfa en fibras libres.
- b) 1,4- β -glucan celobiohidrolasa (conocida también como exoglucanasa, exocelulosa y avicelasa): convierte el papel filtro o avicel en celobiosa, con un modo de ataque terminal. Es una enzima descristalizadora. La celobiosa es un inhibidor competitivo.
- c) β -glucosidasa (conocida también como celobiasa): convierte la celobiosa (posiblemente también la celotriosa y la celotetrosa) en glucosa. La glucosa actúa como inhibidor no competitivo. Al parecer, produce una alta inhibición del sustrato en concentraciones de éste muy elevadas. Es la menos estable de las tres celulasas y la que se encuentra en menor cantidad en la T. reesei.

3. Microorganismos celulolíticos. Muchos microorganismos contienen celulasas. Algunos de los que han merecido atención recientemente son los siguientes (3):

- a) Bacterias
Cellvibro fulvus, cellvibro vulgaris: aerobios, mesófilos;
Cellulomonas: aerobio, mesófilo;
Pseudomonas fluorescens: aerobio, mesófilo;
Clostridium thermocellulaseum: anaerobio, termófilo
- b) Actinomiceto (aerobio)
Streptomyces QM814
Thermoactinomiceto; thermomonospora curvata;
Thermomonospora fusca
- c) Hongos (aerobios)
Aspergillus niger
Trametes sanguinea; Poria; Pestalotiopsis westerdijkii
Penicillium iriense QM9624; Penicillium funiculosum
Polyporus versicola; Polyporus tulipiferae
Fusarium solani; sporotrichum pulverulentum QM9145
Trichoderma reesei (viride)
Trichoderma lignorum; Trichoderma konigii
Thermoascus aurantiacus QM9383

Como la biomasa está compuesta por alrededor de un 45% de celulosa, un 30% de hemicelulosa y un 20% de lignina, el tema central y el principal objetivo de este programa de trabajo es la transformación eficiente de la celulosa

y la hemicelulosa en etanol. Para alcanzar los objetivos mencionados hay varios métodos experimentales. Aquí sólo se examinarán dos de los más importantes:

- a) Utilización de microorganismos manipulados genéticamente;
- b) Utilización de la tecnología del ADN recombinado, especialmente para la clonación molecular y la amplificación de los genes de celulasa.

B. 1) Actividades

Para la transformación eficaz de celulosa y hemicelulosa en etanol, deben resolverse cierto número de problemas fundamentales y también técnicos. Es evidente que habrá que abordar paralelamente varios problemas diferentes. Una gran parte del presente programa de trabajo entrañará investigación básica, ya que quedan por determinar algunos puntos fundamentales de este sistema complejo.

1. Análisis de las celulasas obtenidas a partir de organismos celulolíticos. Se analizarán las tres celulasas - endoglucanasa, exoglucanasa y celobiasa - obtenidas de una diversidad de organismos celulolíticos conocidos (véase la sección A. 1)), a fin de determinar la cantidad de β -glucosidasa (por ejemplo, unidades/ml) excretada al medio extracelular y a las células, la actividad específica de las enzimas brutas y purificadas (unidades/mg de proteínas), la estabilidad, el grado de inhibición de productos o de sustratos, etc. Deberían analizarse otros microorganismos en busca de nuevas fuentes de celulasas.

Una vez encontradas diversas fuentes apropiadas de celulasas, el volumen o las propiedades de las enzimas podrán mejorarse, muy probablemente, aplicando métodos genéticos de mutación como los utilizados para seleccionar los mutantes favorables AM9414, MCG77 y MCG80 de la Trichoderma reesei (4).

2. Clonación de los genes de celulasa y producción de mutantes favorables mediante la mutagénesis in vitro. Un método apropiado de investigación que puede adoptar el CIIGB consiste en clonar los genes de celulasa obtenidos de los organismos celulolíticos analizados en la sección 1 supra. Esto puede lograrse formando bibliotecas genómicas u obteniendo DNA-c a partir del ARN-m mediante la aplicación de las técnicas del ADN recombinado (5,6). Una vez que los genes se hayan clonado en un plásmido, situado cerca de un fuerte activador y de emplazamientos apropiados de enlaces de ribosomas, y que se hayan introducido en el E. coli o el B. subtilis por procedimientos de transformación (5,6), cabe esperar la producción de grandes cantidades de esas celulasas.

El paso siguiente consiste en realizar mutagénesis in vitro en los genes de celulasa clonados, mediante cambios de pares básicos o pequeñas supresiones (7), con la esperanza de producir genes mutantes que codifiquen celulasas con mayor resistencia a la inhibición de productos.

3. Clonación de genes fungales de celulasa e introducción de los genes en la levadura. El hongo Trichoderma reesei produce y excreta grandes cantidades de celulasas que pueden degradar la celulosa convirtiéndola en glucosa. Las células de levadura (como las del Saccharomyces cerevisiae), que pueden convertir eficientemente la glucosa en etanol, no pueden degradar la celulosa. Un método apropiado de investigación que puede estudiar el CIIGB consiste en construir una cepa mejorada de levadura que lleve genes de celulasa y pueda excretar las celulasas de las células para convertir la celulosa en glucosa. Esta nueva cepa debería poder transformar eficientemente la celulosa en etanol. La creación de la cepa entraña dos etapas. La primera es clonar los genes de celulasa de la Trichoderma reesei (mutantes MCG77 o MCG80) o de otros hongos celulolíticos, como se describe en la sección anterior. Sin embargo, en este caso los genes se unen a un plásmido de levadura (como el de tipo YEp13, que tiene una secuencia de Ars y un marcador fácilmente seleccionable como el His3 o el LEU2). La segunda es transferir a la levadura los genes de celulasa juntamente con los plásmidos de levadura, por transformación (8). El plásmido puede mantenerse en la levadura cultivando ésta en ausencia de leucina. Otra posibilidad es permitir que los genes de celulasa se integren establemente en el cromosoma de la levadura. Suponiendo que los péptidos señaladores de la Trichoderma reesei sean reconocidos por la levadura (lo que es muy probable, ya que tanto la T. reesei como la levadura son hongos), los genes de celulasa clonados deberían incluir péptidos señaladores para la excreción de las celulasas en el medio. Si no son reconocidos por la levadura, se podría seguir otro método. Se eliminarían, mediante técnicas normales del ADN recombinado, los genes clonados que codificaran los péptidos señaladores de la T. reesei, y se incluirían sólo los genes estructurales de las celulasas. Estos genes de celulasa se unirían a un derivado del YEp13 que contiene también la secuencia de activadores y la secuencia de péptidos señaladores del gen de la invertasa de la levadura. Como la invertasa de la levadura se excreta, los genes de celulasa, unidos a su gen de secuencia señaladora, se excretarían también. Se han aislado mutantes de la levadura que producen un exceso de invertasa (9). En caso necesario, se clonará el gen de invertasa de esta cepa de levadura.

La ventaja de este método es que las células de la levadura corriente, como las del S. cerevisiae (cuyo sistema de transformación se ha determinado y que puede cultivarse fácilmente en fermentadores en gran escala), pueden convertir entonces directamente los materiales celulósicos en alcohol.

4. Clonación de genes bacterianos de celulasa e introducción de esos genes en la Zymomonas mobilis. La bacteria Zymomonas mobilis puede transformar la glucosa en etanol (10), con las siguientes ventajas:

- a) altos rendimientos específicos de etanol;
- b) tolerancia a las concentraciones elevadas de glucosa; y
- c) la capacidad para crecer de forma totalmente anaerobia, de modo que la edición de oxígeno en las fermentaciones continuas resulta innecesaria.

Recientemente, Bland y otros (12) han utilizado un reactor de inmovilización de células de "lecho ampliado con película agregada" (13) y han mostrado que la transformación de azúcar en etanol por la bacteria Z. mobilis puede aumentarse hasta 105 gm/l-hora, sobre la base del volumen total del fermentador (12). Aunque el fermentador de ese tipo es un medio eficiente de transformar el azúcar en etanol mediante la Z. mobilis, esta bacteria no tiene los genes de celulasa necesarios para transformar la celulosa en glucosa.

Bacterias como la Cellulomonas fimi contienen genes de celulasa y excretan celulasas que penetran en la matriz leñosa y atacan extracelularmente a la celulosa para producir azúcares. Por lo menos una celulasa obtenida de la C. fimi ha sido clonada recientemente (11). El paso siguiente consiste en clonar el gen que codifica las tres celulasas (endo- β 1,4-glucanasa, exo- β 1,4-glucanasa y β -glucosidasa), juntamente con la secuencia de codificación de los péptidos señaladores, y unirlos a un plásmido bacteriano como el pKC30 (14), cerca de la fuerte secuencia de activadores descrita en la sección 2 supra.

Un proyecto de que el CIIGB puede ocuparse consiste en transferir los genes bacterianos de celulasa clonados de un plásmido como el pKC30 a la Zymomonas mobilis, por transformación. Puede ser necesario encontrar primero los procedimientos de transformación para introducir plásmidos en la Z. mobilis, empleando los principios y técnicas utilizados para introducir plásmidos y genes extraños en la E. coli y la B. subtilis. Si el plásmido y los genes de celulasa no son estables en la bacteria, se les puede obligar a integrarse en el cromosoma bacteriano mediante su recombinación integradora. Esta se logra clonando

primero un gen Y de la Z. mobilis en el mismo plásmido pKC30. Una vez que los genes de celulasa se unen también a este plásmido y transforman las células, se puede integrar todo el derivado pKC30 en el cromosoma de la Z. mobilis, en el emplazamiento del gen Y, mediante su recombinación integradora.

5. Clonación del gen de la xilosa isomerasa e introducción de ese gen en el S. pombe. Mediante la utilización de ácidos diluidos se pueden obtener fácilmente altas concentraciones de hidratos de carbono derivados de la hemicelulosa. Los organismos ideales para transformar los hidratos de carbono derivados de la biomasa en productos como el etanol son las levaduras. Sin embargo, la mayoría de las levaduras no pueden degradar las pentosas. La reciente demostración, con éxito, de la posibilidad de producir cuantitativamente etanol (80% del rendimiento teórico) a partir de la D-xilosa, utilizando levadura y xilosa isomerasa, simplificaría el problema relacionado con el proceso de la pentosa (16).

Un campo posible de investigación consiste en clonar el gen de la xilosa isomerasa e introducirlo en un Schizosaccharomyces pombe, que es una levadura más conveniente que la de panadero (S. cerevisiae) para convertir la xilulosa en etanol. Esta levadura genéticamente manipulada puede transformar entonces la xilosa en etanol, con un alto rendimiento. Esta cepa de levadura debería ser mucho más eficiente para producir etanol que la cepa recientemente descubierta de Pachysolen tannophilus NRRL 2460 (17).

Además de producir etanol, entre los subproductos de la degradación de la hemicelulosa por medio de microorganismos se encuentran el metano, los ácidos orgánicos, los alcoholes del azúcar, los disolventes y los piensos animales. Así pues, pueden producirse otros materiales útiles.

De hecho, en esta parte del programa de trabajo se subraya la utilización de levaduras o de bacterias genéticamente manipuladas, para la transformación eficiente de materiales celulósicos en etanol. Es evidente que las mismas levaduras o bacterias serían útiles también para convertir la biomasa en piensos (como proteínas monocelulares) y en los productos químicos industriales mencionados en el párrafo anterior.

El principal componente del programa sería el de investigación y desarrollo, en que la labor de investigación se realizaría por cuatro grupos, por lo menos, relacionados entre sí. El primero lo dirigirá un microbiólogo, y su función principal será analizar las celulasas obtenidas de los microorganismos celulóticos conocidos y buscar nuevos microorganismos celulolíticos. El segundo grupo, que dirigirá un bioquímico, se ocupará de

purificar las celulasas (seleccionadas por el grupo de microbiología) y estudiar sus propiedades. Este grupo iniciará también los trabajos sobre la clonación de los genes de celulasas. El tercer grupo, que estará dirigido por un experto en el ADN recombinado, se ocupará de modificar los genes de celulasas clonados (por el grupo de bioquímica) y también de transferir los genes bacterianos de celulasas clonados a células de Zymomonas mobilis. El cuarto grupo, que será dirigido por un experto en levaduras, se ocupará de transferir los genes de celulasas clonados de la Tricoderma reesei (u otros genes fungales de celulasas como los del Penicillium funiculosum) a células de levadura, y de determinar las condiciones para la transformación óptima de celulosa en glucosa y etanol. Cada uno de esos cuatro grupos incluirá un becario posdoctoral o un técnico, o ambos, y el jefe de cada grupo contará con la asistencia de un científico de categoría subalterna (con título de doctor). Cada grupo podrá formar unos dos alumnos de países en desarrollo, cada dos años.

Esos cuatro grupos organizarán dos reuniones o cursos prácticos. Se invitará a expertos internacionales de cada esfera de investigación y desarrollo. Los temas de debate comprenderán estudios sobre los microorganismos celulolíticos y las celulasas, la clonación y amplificación de los genes de celulasas, la transferencia de genes de celulasas clonados a levaduras o bacterias fermentadoras, y el mejoramiento de la eficiencia de la transformación de la celulosa (y de la hemicelulosa) en azúcar y luego en alcohol.

Los resultados de este programa se obtendrán en varias etapas. La primera consistirá en identificar las mejores celulasas (obtenidas de uno o más microorganismos celulolíticos), que den celulasas estables y de gran actividad específica (la endoglucanasa y la exoglucanasa deberán excretarse al medio de crecimiento). La etapa siguiente consiste en clonar varias de esas celulasas y unir las a plásmidos bacterianos o plásmidos de levadura. La tercera etapa es transferir las celulasas fungales clonadas (como las de la T. reesei) a células de levadura y maximizar la transformación directa de celulosa en etanol en esta levadura recombinada. Se realizarán experimentos paralelos para transferir celulasas bacterianas clonadas (como las de la Cellulomonas fimi) a la Zymomonas mobilis, de forma que esta bacteria recombinada pueda convertir directamente la celulosa en etanol. Se esperan progresos considerables; no obstante, confiar en que la investigación y el desarrollo se terminen en el próximo quinquenio sería poco ajustado a la realidad. Con todo, incluso un éxito parcial será importante para resolver en definitiva el problema de

transformar eficiente y económicamente los materiales celulósicos en etanol. Una vez terminados la investigación y el desarrollo básicos, el programa se confiará al grupo de biotecnología para su adaptación a la producción en gran escala de etanol. Hacen falta también perfeccionamientos tecnológicos considerables para la extracción y secado en gran escala del etanol.

Se prestarán servicios de asesoramiento en esas esferas a los laboratorios de los países en desarrollo.

PRODUCCION DE FERTILIZANTES UTILIZANDO SISTEMAS BIOLÓGICOS

A. 2) Antecedentes y justificación

La nitrificación biológica es un proceso esencial para todos los organismos vivos de la tierra. La capacidad para reducir el nitrógeno atmosférico y convertirlo en amoníaco se limita a un pequeño número de bacterias, algas cianofíceas y actinomicetos. Algunos de esos organismos pueden reducir el nitrógeno atmosférico cuando se encuentran en libertad, como la Klebsiella, el Azobacter y las algas cianofíceas. Sin embargo, los microorganismos económicamente importantes realizan el proceso de nitrificación en asociación estrecha con plantas superiores, en forma de auténticas simbiosis. Durante la simbiosis, la planta superior aporta los hidratos de carbono esenciales para los microorganismos y, a su vez, los microorganismos suministran el nitrógeno reducido para la síntesis de las proteínas por las bacterias y la planta superior. La nitrificación, que es un proceso anaerobio, se realiza por el complejo de enzimas de nitrogenasa que se conserva muy bien en todos los microorganismos nitrificadores. Todo el proceso de la Klebsiella pneumoniae está codificado por un racimo genético que contiene unos 17 genes contiguos (tres genes estructurales), los cuales se transcriben unidireccionalmente en siete unidades de transcripción. El operón Nif de fijación del N_2 requiere la presencia constante de la proteína del gen A, que actúa como inductor. La proteína del gen L actúa como inhibidor del operón Nif, regulando la producción de la proteína del gen A. Datos recientes de varios laboratorios muestran, no sólo en la Klebsiella sino también en los Rhizobia y las algas cianofíceas, que los genes Nif se organizan en racimos contiguos. Actualmente no se comprende la regulación del proceso de nitrificación en los Rhizobia.

La fijación simbiótica del nitrógeno requiere la interacción de microorganismos y de células de plantas superiores. La proliferación de la raíz de la

planta, provocada por los Rhizobia, se traduce en formaciones nodulosas en las plantas leguminosas. A diferencia de lo que ocurre en las formaciones de la hernia de la raíz, los Rhizobia se encuentran dentro de las células de la planta y, en un proceso regulado de desarrollo, se convierten en bacteroides que realizan el proceso de nitrificación.

El reconocimiento de las plantas, el proceso de infección y la especificidad del hospedante parecen transmitirse, como racimos genéticos, en el genoma bacteriano. Recientes descubrimientos hechos en el Rhizobium leguminosarum documentan la presencia de genes de nodulación y de genes de nitrificación en un gran plásmido. Al transferir este plásmido al Agrobacterium tumefaciens, se formaron nódulos ineficaces no nitrificadores después de infectar raíces de guisantes. De igual modo, las células del Rhizobium meliloti contienen plásmidos aún mayores llamados megaplásmidos (de tamaño superior a 500 KD). Estos megaplásmidos contienen también los genes necesarios para el proceso de nodulación estrechamente vinculado al racimo de genes de nitrificación. Los experimentos realizados para transferir la capacidad de nitrificación de las células bacterianas a un sistema celular eucariótico mediante la ingeniería genética se tradujeron en el mantenimiento estable del gen Nif en el cromosoma número 3 de la levadura. Sin embargo, no se observaron productos de translación en las células de levadura transformadas, lo que indica que hace falta sustituir las señales de los genes bacterianos Nif por las señales de la levadura o de la planta para obtener la expresión de los genes. Además, harán falta estudios más detenidos para comprender la estructuración de la nitrogenasa en una célula eucariótica.

B. 2) Actividades

Para producir fertilizantes utilizando sistemas biológicos, hay que resolver cierto número de problemas fundamentales y técnicos. Aquí se presentan sólo dos proyectos importantes. La labor de investigación estaría a cargo de un equipo compuesto de, por lo menos, tres grupos estrechamente relacionados, y en consulta con los expertos en ingeniería genética de plantas descritos en el programa de productos agrícolas y alimentarios mejorados. 1/ El primer

1/ "Productos agrícolas y alimentarios mejorados mediante la ingeniería genética y la biotecnología", ID/WG.382/2/Add.5.

grupo, que dirigirá un microbiólogo, trabajará con bacterias de nitrificación como el Rhizobium, la Klebsella y el Azotobacter, y estudiará la eficiencia y la gama hospedante de la nitrificación. El segundo grupo, que dirigirá un bioquímico, utilizará métodos bioquímicos para analizar el sistema de fijación del nitrógeno, y usará la tecnología del ADN recombinado para clonar y transferir genes entre las cepas de bacterias nitrificadoras o entre las bacterias y las plantas. El tercer grupo, que dirigirá un experto en plantas y células vegetales, estudiará el mecanismo y la eficiencia de los sistemas nitrificantes y fotosintéticos de las plantas. A medida que se comprendan mejor esos sistemas, cooperará con los grupos de microbiología y bioquímica para utilizar las bacterias nitrificadoras seleccionadas genéticamente o para transferir bacterias modificadas de ADN recombinado a las plantas. Comprobará el ritmo de crecimiento de las plantas, el contenido proteínico de las semillas, etc., y tratará de maximizar el rendimiento.

Cada uno de esos tres grupos incluirá un becario posdoctoral y un técnico, y quizá un científico de categoría subalterna que ayude al jefe del grupo en ese programa. Cada grupo podrá formar unos dos alumnos procedentes de países en desarrollo cada dos años. En otras palabras, los tres grupos podrán formar seis alumnos en dos años, o sea, 15 alumnos en el primer quinquenio.

Esos tres grupos organizarán una reunión o curso práctico anual conjunto. Se invitará a participar a expertos en esta esfera de investigación procedentes de diferentes países.

Se necesitarán los servicios de asesoramiento de diversos grupos de investigación importantes del mundo en esta esfera de investigación. Los servicios de asesoramiento incluirán la invitación de investigadores en activo para que pasen en el CIIGB varios días o varias semanas. Todos los años se invitará quizá entre tres y seis investigadores. Los servicios podrán incluir también el envío de uno o varios investigadores a algunos centros principales de investigación de todo el mundo, para que trabajen en problemas muy específicos, relacionados con las condiciones del suelo y las cepas competitivas de bacterias nitrificadoras de la región. Esas cepas podrán llevarse al CIIGB para su modificación genética.

El resultado principal de este programa será mejorar las cepas existentes de Rhizobium, para hacerlo más competitivo en su ambiente natural en las diferentes zonas del mundo. Como las condiciones del suelo y las bacterias competidoras en los suelos de las diferentes partes del mundo serán diferentes, se

crearán en cada caso cepas mejoradas de Rhizobium hechas a medida. Aunque el principio de la modificación genética es muy simple, esta esfera de investigación requiere mucho tiempo y quizá no sea posible hacer grandes progresos en el primer quinquenio. En cambio, incluso los pequeños perfeccionamientos logrados en la eficiencia de la nitrificación, que produzcan un aumento del 10% en el rendimiento de los cultivos, serán económicamente importantes.

Además, toda investigación básica realizada en el CIIGB que conduzca a una mejor comprensión de las bacterias nitrificadoras y de la interacción entre las bacterias y las plantas será beneficiosa para mejorar la productividad de los cultivos. La soja y el frijol de vaca se utilizan como ejemplos en este programa de trabajo. Los principios que inspiran este tipo de investigación y la tecnología obtenida podrán aplicarse a otros sistemas.

Es probable que la utilización de microorganismos libres para mejorar la productividad de los cultivos, mediante el estudio de la Pseudomonas nitrificante y las algas cianofíceas nitrificantes produzca resultados positivos en el primer quinquenio.

1. Utilización de la ingeniería genética para alterar el Thixobium y otros microorganismos, a fin de fijar más nitrógeno con objeto de aumentar la producción agrícola

Alteración de los Rhizobia para aumentar la productividad de los cultivos.

Los principales factores limitativos en la fijación simbiótica del nitrógeno son la falta de cepas competitivas del Rhizobium. Sabido es que menos del 5% de los Rhizobia inoculados resultan eficaces para cultivar plantas útiles. En segundo lugar, se necesitan Rhizobia capaces de nodular y fijar el nitrógeno en presencia de bacterias fijas del suelo. Por último, el proceso de nodulación y el proceso de nitrificación son sensibles a factores de esfuerzo, por ejemplo, la sequía, la sal y el calor.

Las principales plantas leguminosas cultivadas son la soja y el frijol de vaca. Por consiguiente, debe darse mayor importancia al aislamiento de cepas nuevas obtenidas del suelo y a la selección de cepas competitivas de las especies de frijol Rhizobium japonicum y Rhizobium. Al mismo tiempo, esas cepas deben adaptarse a cultivares de plantas regionales y a las condiciones locales del suelo. Al disponer de sistemas de transferencia de genes de Rhizobium, podría utilizarse la tecnología del ADN recombinado para combinar las características beneficiosas de los Rhizobia naturales. Además de producir cepas

competitivas, la aplicación de la biología molecular a los Rhizobia podría producir noduladores constitutivos y cepas fijadoras constitutivas independientes o no inhibidas por el nitrógeno del suelo. Al disponer de sistemas de transferencia de genes y de genes clonados en genes de nodulación de Rhizobia de lento crecimiento, se podría movilizar genes nitrificadores o con capacidad para superar el esfuerzo, a fin de crear cepas superiores de Rhizobium.

La biología molecular debería tratar de comprender también la respuesta de las plantas a la infección por microbios. La capacidad de los microorganismos para vencer los mecanismos naturales de defensa de las plantas puede conducir a una infección y nodulación con Rhizobia más efectivas. Debería tratarse asimismo de crear nódulos en otras partes de la planta distintas de la raíz, por ejemplo en el tallo o las hojas.

El suministrar nitrógeno en forma de nódulos en los tallos u hojas en el momento en que es más necesario, antes de que las vainas se llenen, podría ser de enorme importancia económica para la agricultura. Además, debería estudiarse a nivel de biología molecular la interacción entre la fotosíntesis y la fijación del nitrógeno. En suma, el desarrollo de cepas superiores y la comprensión más completa del proceso de infección y de la respuesta de las plantas superiores podría conducir a una asociación óptima entre plantas y microbios y, por consiguiente, a un aumento de la productividad de las legumbres. La tecnología del ADN recombinado puede permitir la transferencia de la capacidad nitrificadora a plantas importantes distintas de las legumbres. Estas investigaciones son de naturaleza estrictamente básica y su realización exigirá mucho tiempo.

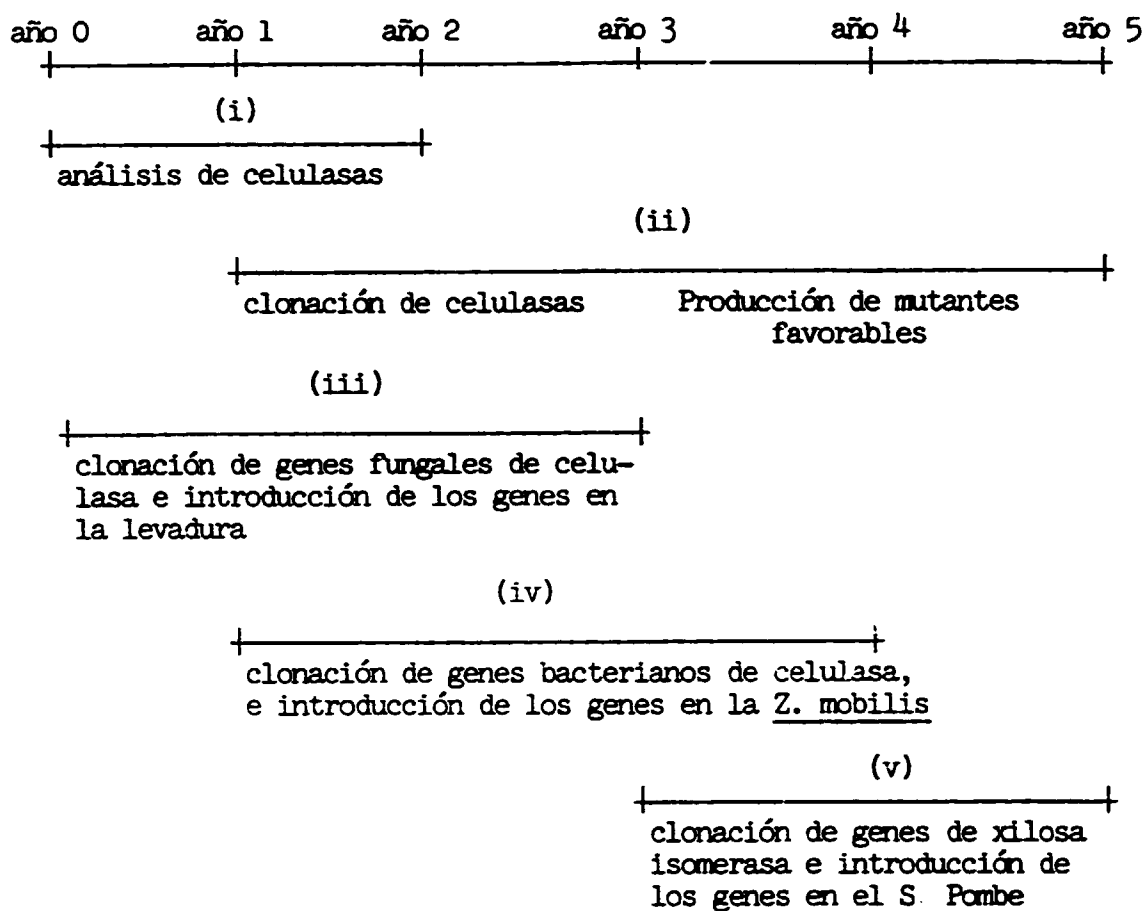
2. Utilización de microorganismos libres para aumentar la productividad de los cultivos

Las principales plantas cultivadas no leguminosas son el maíz, el arroz, el trigo, etc. La sustitución del nitrógeno químicamente reducido por nitrógeno fijado biológicamente en esos cultivos es de inmensa importancia económica; por consiguiente, los microorganismos del suelo, como el Azotobacter, la Pseudomonas nitrificante y las algas cianofíceas deberían recibir mayor atención. La posible aplicación de la Pseudomonas nitrificante en las raíces o los tallos podría llegar a ser tan importante para la fijación en los cereales como es la de los Rhizobia para aumentar la producción de legumbres. Además, la ingeniería genética de los microorganismos del suelo en general podría conducir a una mayor producción agrícola por medio de la creación de

microorganismos incapaces de causar enfermedades o alterando microorganismos para que se conviertan en antagonistas naturales de los agentes patógenos y competidores. Además, debería prestarse atención a los microorganismos fotosintéticos que pudieran adaptarse, como simbioses, a las hojas de plantas superiores; un ejemplo es la interacción entre el helecho acuático (Azolla) y las algas cianofíceas.

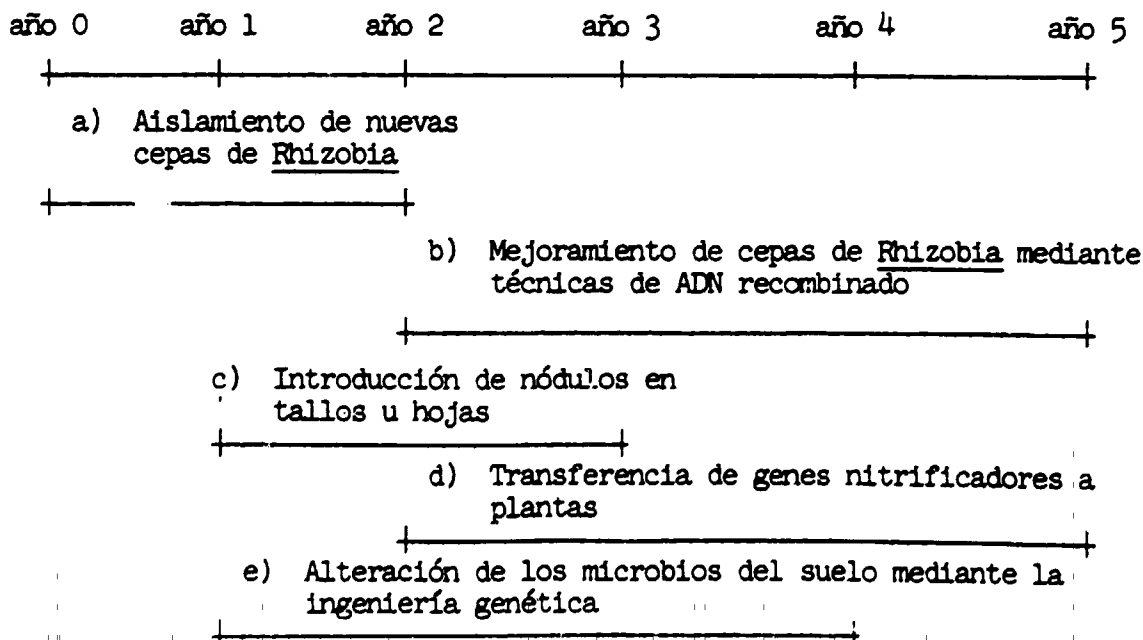
C. 2) Plan de trabajo

Calendario del programa de trabajo sobre producción de combustible a partir de la biomasa:



Calendario del programa de trabajo sobre producción de fertilizantes por sistemas biológicos:

Se espera que algunos proyectos den resultados positivos en el tiempo temporal indicado; otros (como el b) y el d)) pueden necesitar un período mucho mayor para su terminación.



D. 2) Colaboración con otras instituciones

Será necesario establecer contactos con varias instituciones de investigación importantes. Estas instituciones incluirán:

- Laboratorios de investigación avanzada;
- Organizaciones internacionales competentes como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO);
- Proyectos en curso en esta esfera, como el programa de la ONUDI para la transformación de desechos agrícolas en Filipinas.

E. 2) Requisitos previos

El requisito previo necesario para garantizar la ejecución con éxito del programa es que los alumnos tengan las calificaciones académicas apropiadas. Los alumnos habrán de tener un título de doctor o equivalente en bioquímica o microbiología. Habrán de conocer bien las técnicas generales de laboratorio en materia de bioquímica y de microbiología. Habrán de tener firmes motivaciones y estar ansiosos de aprender bajo la supervisión estrecha de los científicos del personal o los becarios posdoctorales, en el CIIGB.

En un principio, los candidatos a alumnos podrán ser recomendados por los consejos científicos de los países en desarrollo. Es imperativo que la selección final sea hecha por el personal científico del CIIGB, porque las calificaciones deben basarse en méritos científicos.

F. 2) Necesidades financieras

Quando el programa esté en pleno funcionamiento se requerirá el siguiente personal:

- dos científicos de categoría superior
- ocho científicos de categoría subalterna
- siete becarios posdoctorales
- ocho técnicos

Se espera que en este programa de trabajo participen 25 alumnos.

Presupuesto quinquenal

PERSONAL

(miles de dólares de
de los EE.UU.)

(primer año, al 40%; segundo año, al 60%)

Científico de categoría superior	8 años-hombre	600
Científico de categoría subalterna	32 años-hombre	1.440
Científico postdoctoral	28 años-hombre	672
Técnicos	32 años-hombre	544
		<hr/>
Total parcial		3.256
Dirección del Centro y personal de apoyo		937
		<hr/>
Total del personal		4.193

ACTIVIDADES OPERACIONALES

Científicos visitantes	40 meses-hombre	320
Reuniones de grupos de expertos	4 meses-hombre	100
Servicios de asesoramiento	30 meses-hombre	300
Capacitación	50 años-hombre	1.125
Material de información		30
Adquisición de productos químicos, etc.	104 años-unidad- hombre	1.040
Asociaciones		150
Gastos diversos (viajes, teléfono, etc.)		138
		<hr/>
Total de las actividades operacionales		3.203
Total del programa de trabajo		7.396

ANEXO I

Necesidades de equipo

Las necesidades de equipo para este programa son las siguientes:

- 30 baños e incubadoras
- 20 batidoras giratorias pequeñas
- 20 balanzas (una micro, una macro)
- 10 medidores del pH
- 20 microcentrifugadoras de mesa
- 20 microcentrifugadoras refrigeradas
- 10 centrifugadoras de pie, de velocidad media (como la Sorvall RC-5)
- 10 espectrofotómetros
- 30 refrigeradoras

Las instalaciones de apoyo compartidas incluirán:

a) Salas de instrumentos con:

- 1 escintilómetro
- 1 heladora
- 2 batidoras giratorias grandes
- 1 espectrofotómetro registrador
- 10 juegos de electroforesis
- centrifugadoras de pie, de velocidad media
- 2 centrifugadoras de gran velocidad (como la Beckman L8-70)

b) Una sala de recipientes biológicos (de nivel p2) con:

- 2 campanas de flujo laminar
- 2 batidoras giratorias grandes
- 2 centrifugadoras de velocidad media
- 1 centrifugadora de gran velocidad
- 1 autoclave
- 2 microscopios
- 2 baños
- 2 incubadoras

c) Una sala de preparación y esterilización de medios con:

- 1 autoclave
 - 1 campana estéril
 - 1 alambique de cristal para destilar agua
 - 2 balanzas
- d) Una cámara frigorífica a 4°C con:
- 1 centrifugadora pequeña
 - 2 baños
 - varias columnas de cromatografía
- e) Una cámara frigorífica a -20°C
- f) Una cámara oscura con:
- 1 reveladora automática de películas de rayos X
 - 1 ampliadora
 - 1 positivadora
- g) Una sala de lavado con:
- 2 máquinas de lavar
 - 1 autoclave
 - 2 hornos, etc.

Se necesitarán cámaras o invernaderos agrupados, de temperatura y de humedad controladas, para cultivar células y plantas.

Referencias para la producción de combustible líquido a partir de la biomasa

1. A.E. Humphrey (1979) en Hydrolysis of Cellulose. Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis (Recop. R.D. Brown, Jr. y L. Jurasek) pág. 25, Amerc. Chem. Society, Washington, D.C.
2. Gong, C.S., Ladisch, M.R. y Tsao, G.T. (1979) en Hydrolysis of Cellulose: Mechanism and enzymatic and acid catalysis (Recop. R.D. Brown y L. Jurasek), 261.
3. Mandels, M. y Andreotti, R.E. (mayo de 1978) Process Biochem., págs. 6 a 13.
4. Andreotti, R.E., Medeiros, J.E., Roche, C.R. y Mandels, M. (1981) Proc. Second Int'l. Sympo. on Bioconversion, Nueva Delhi, India (Recop. T.K. Ghose), Vol. 1, 353 a 372.
5. "Methods in Enzymology" (1979) Recombinant DNA (Recop. R. Wu) Vol. 66.
6. "A Manual for Genetic Engineering: Advanced Bacterial Genetics" (1980) (Recop. F.W. Davis, D. Bostein, J.R. Roth), Cold Spring Harbor Lab.
7. Smith, M. y Gillam, S. (1981) Genetic Engineering (Recop. J.K. Setlow, A. Hollaender) 3, 1.
8. Kinnien, A., Hicks, J.B. y Fink, J. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929.
9. Entian, K.-D y Zimmermann, F.K. (1980) Molec. Gen. Genet. 177, 345
10. Rogers, P.L., Phil, D., Lee, K.J. y Tride, D.E. (1980) Process. Biochem. 15, 7.
11. Whittle, D.J., Kilburn, D.G., Warren, R.A.J. y Miller, Jr. R.C. (1982) Gene 17, 139.
12. Bland, R.R., Chen, H.C., Jewell, W.J., Bellamy, W.D. y Zall, R.R. (1982) Biotech. Letters 4, 323.
13. Switzenbaum, M.S. y Jewell, W.J. (1978) Annual Water Pollution Control Control Federation Conference, Anaheim, Cal. 42 págs.
14. Shimatake, H. y Rosenberg, M. (1981) Nature 292, 128.
15. Gong. C.S., Chen, L.F., Flickinger, M.C. y Tsao, G.T. (1981) Recop. A. Fiechter) Adv. Biochem. Engineering 20, 93.

16. Chiang, L.C., Hsiao, H.Y., Ueng, P.P. Chen, L.F. y Tsao G.T. (1981)
Biotech. Bioengineering Symp. 11, 263.
17. Detroy, R.W., Cunningham, R.L., Bothast, R.J., Bagby, M.O., y Herman,
A. (1982) Biothech. Bioengineering 24, 1105.

BIBLIOGRAFIA

Proyecto de nitrificación

- Brisson, N. y Verma, D.P.S. (en prensa) "Soybean Leghemoglobin Gene Family: Normal, Pseudo and Truncated Genes". PNAS.
- Hyldig-Nielsen y otros (1982) "The Primary Structure of Two Leghemoglobin Genes from Soybean", Nucleic Acid Res. 10:688.
- Roberts, G.P. y Brill, W.J. (1981) "Genetics and Regulation of Nitrogen Fixation", Ann. Rev. Microbiol. 35:207 y 235.
- Bánfalvi, Z., Sakanyan, V., Koncz, C., Kiss, A., Dusha, I., y Kondorosi, A. (1981) "Location of Nodulation and Nitrogen Fixation Gene on a High Molecular Weight Plasmid of R. meliloti."
- Friedman, A.M., Long, S.R., Brown, S.E. Buikema, W.J., y Ausubel, F.M. (en prensa) "Construction of a Broad Host Range Cosmid Cloning Vector and Its Use in the Genetic Analysis of Rhizobium Mutants."
- Ruvkun, G.B. y Ausubel, F.M. (enero de 1981) "A General Method for Site-directed Mutagenesis in Prokaryotes.", Nature 289:85 a 88.
- Beringer, J.E., Beynon, J.L., Buchanan-Wollaston, A.V., Johnston, A.W.B. (diciembre de 1978) "Transfer of the Drug-resistance transposon Tn5 to Rhizobium", Nature 276:633 a 634.
- Zurkowski, W. y Lorkewicz, Z. (1979) "Plasmid-mediated control of nodulation in Rhizobium trifolii", Arch. Microbiol. 123:195 a 201.
- Nuti, M.P., Lepidi, A.A., Prakash, R.K., Schilperoort, R.A., y Cannon, F.C. (1979) "Evidence for nitrogen fixation (nif) genes on indigenous Rhizobium plasmids." Nature 282:533 a 535.
- Krol, A.J.M., Hontelez, J.G.J., van den Bos, R.C. y van Kammen, A. (1980) "Expression of large plasmids in the endosymbiotic form of Rhizobium leguminosarum." Nucleic Acids Res. 8:4337 a 4347.
- Johnston, A.W.B. y Beringer, J.E. (1975) "Identification of the Rhizobium strains in pen root nodules using genetic markers." Microbiol. 87:343 a 350.

