

# FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO

Indice:

## 1. Introducción:

1.1 Importancia del nitrógeno en el ecosistema terrestre

1.2 Ciclo biogénico del nitrógeno

## 2. Fijación biológica del nitrógeno:

2.1 Microbios fijadores

2.2 Asociaciones fijadoras de nitrógeno

2.3 Fijación bioquímica del nitrógeno

2.4 Protección frente al oxígeno

2.5 Evolución de los fijadores de nitrógeno

3. La simbiosis Rhizobium \_ leguminosa

4. La simbiosis Frankia \_ planta no leguminosa

## 5. Otras simbiosis:

Algas cianofíceas y sus simbiosis con plantas

Empleo de la simbiosis Azolla \_ Anabaena

Asociación de Azospirillum con raíces de plantas

Fijación del nitrógeno en termitas

6. Limitaciones en la fijación de Nitrógeno en ambientes de tipo Mediterráneo

7. El quemado de rastrojos y la fijación de nitrógeno

8. Futuro y restos en biotecnología

BIBLIOGRAFIA

## **INTRODUCCION**

### **1. IMPORTANCIA DEL NITROGENO EN EL ECOSISTEMA TERRESTRE**

El nitrógeno es un elemento que cuantitativamente y tras el carbono, oxígeno e hidrógeno es el más abundante en la materia viva que constituye un 8-16%. Cualitativamente forma parte de moléculas muy importantes para la actividad biológica como los ácidos nucleicos, donde se asienta la información genética o las proteínas y enzimas, compuestos estructurales fundamentales en la organización de la materia viva y catalizadores de los procesos biológicos respectivamente. Como constituyente de las proteínas está en una proporción del 10-15%.

La tierra es muy rica en nitrógeno, con más de 60000 billones de toneladas de las que el 94% se encuentra en la corteza terrestre. Del 6% restante, el 99,86% se haya en la atmósfera como nitrógeno molecular y el 0,04% aparece en los organismos vivos, suelos y aguas en forma de compuestos orgánicos e inorgánicos.

El nitrógeno se encuentra en estado molecular y el que respiramos tiene un carácter inerte y no es utilizable por los organismos vivos, excepto por los que pueden convertirlo en compuestos aprovechables. De hecho las plantas, los animales y casi todos los microbios, sólo pueden utilizar nitrógeno combinado, es decir, el nitrógeno en un compuesto químico.

Las plantas y la mayoría de los organismos son dependientes de formas inorgánicas de este elemento (nitratos, amonio...) mientras que los animales requieren nitrógeno orgánico obtenido directa o indirectamente de las plantas.

Las plantas pueden acumular nitrógeno en la vegetación por periodos de cientos de años (árboles), o en ciclos estacionales (cosechas anuales). La cantidad de nitrógeno estimada absorbida anualmente por las plantas puede obtenerse de los valores de carbono asimilado por fotosíntesis. La cantidad global de carbono fijado es alrededor de 70000 Tg (terragrama = 1 millón de toneladas métricas) aunque no existe relación única C-N para las plantas (50:1 es la relación más frecuente).

Las plantas utilizan solamente entre un 30-60% del nitrógeno mineral asequible en el suelo. Por tanto, para una eficacia del 40%, es aproximadamente el 3% del nitrógeno total contenido en el suelo.

La fijación simbiótica del nitrógeno representa el 8,5% del consumo total de nitrógeno de la planta, debido a la eficacia de la transferencia de este nitrógeno fijado a la misma. Los fertilizantes aportan una cantidad de nitrógeno equivalente al 50% del nitrógeno asimilado por la fijación biológica.

En la siguiente tabla se muestran las pérdidas de nitrógeno.

(TABLA 1. Contenido global de nitrógeno y flujo en el suelo.)

	<b>NITRÓGENO</b>
	<i>Contenido (Tg) Flujo anual (Tg)</i>
<i>Nitrógeno atmosférico.</i>	$3.9 \times 10^9$
<i>Nitrógeno en el suelo.</i>	105.000
<i>Nitrógeno mineralizado en el suelo.</i>	3500
<i>Consumo por plantas.</i>	1400
<i>Fijación simbiótica del nitrógeno.</i>	120
<i>Fijación asociativa y libre de nitrógeno.</i>	50
<i>Fertilizantes nitrogenados.</i>	65
<i>Fertilizantes nitrogenados utilizados.</i>	26
<i>Aportaciones de la atmósfera.</i>	25
<i>Desnitrificación, volatilización.</i>	135
<i>Erosión.</i>	25
<i>Lixiviación.</i>	93

Las alteraciones del ecosistema natural son las principales causas de la pérdida de nitrógeno, tanto en ambientes gaseosos como acuosos. Las áreas perturbadas ecológicamente y las áreas cultivadas son las que requieren un mayor aporte de nitrógeno.

## **1.2 CICLO BIOGEOQUIMICO DEL NITROGENO**

El ciclo biogeoquímico de nitrógeno es un conjunto de transformaciones donde se dan varias etapas:

- A. MINERALIZACION: formación de nitrógeno inorgánico, como amoníaco, nitrito y nitrato, a partir de nitrógeno orgánico procedente de la desintegración de los organismos y sus excreciones.
- B. ABSORCION: El nitrógeno inorgánico puede ser absorbido por plantas y microorganismos, pasar de nuevo a formar parte de la materia viva y circular a lo largo de las cadenas alimenticias.
- C. DESNITRIFICACION: El nitrógeno puede ser transformado en nitrógeno molecular y sus óxidos, que mediante este proceso pueden escapar a la atmósfera.
- D. FIJACION: El nitrógeno molecular atmosférico pasa a forma combinada.

La mineralización incluye dos procesos:

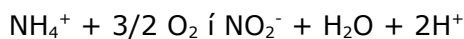
-Amonificación

-Nitrificación

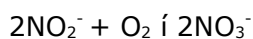
La amonificación consiste en la formación de compuestos amoniacales realizada por microorganismos heterótrofos, entre los que se encuentran bacterias y hongos.

La nitrificación es la oxidación de amonio a nitrato en dos etapas realizadas por dos tipos de microbios que obtienen de ellas toda la energía que necesitan para su crecimiento.

En la primera etapa de la nitrificación las bacterias del género NITROSOMONAS oxidan el amonio a nitrito:



En la segunda etapa bacterias del género NITROBACTER convierten el nitrito en nitrato:



La velocidad de mineralización es un factor importante en la determinación de la fertilidad del suelo.

Gran parte del amoníaco formado es retenido por minerales de la arcilla en el complejo de cambio del suelo, donde podrá ser cambiado por otros cationes y entonces ser nitrificado o absorbido por las plantas. Otra parte del amonio puede volatilizarse y escapar a la atmósfera, esto puede ocurrir en suelos alcalinos.

La nitrificación tiene lugar con rapidez en la mayoría de los suelos constituyendo el nitrato la fuente de nitrógeno más importante para la mayoría de las plantas, donde unas enzimas conocidas como nitrato-reductasas lo convierten en amonio que es utilizado en la síntesis de aminoácidos y proteínas. A diferencia del amonio, el nitrato es retenido fácilmente por el suelo y es transportado por lixiviación. Este lavado de los nitratos es un importante factor de pérdida del nitrógeno que puede ser del 50%.

El proceso opuesto a la mineralización es la inmovilización, en ella los microbios heterótrofos convierten por amonificación el nitrógeno orgánico en nitrógeno amoniacal, parte del cual se utiliza para su crecimiento, inmovilizándolo o haciéndolo no disponible para las plantas.

La cantidad de nitrógeno en el suelo en forma asimilable para las plantas y en ausencia de aportes nitrogenados externos es función de la cantidad de nitrógeno orgánico de reserva en el mismo.

La fijación de nitrógeno es la etapa reguladora del ciclo, el nitrógeno atmosférico pasa a forma combinada compensando las pérdidas de ésta por desnitrificación y volatilización del amoníaco. Hay tres rutas:

-Fijación espontánea: proceso a partir del cual se obtiene energía por descargas naturales para originar óxidos de nitrógeno o amoníaco a partir de nitrógeno molecular atmosférico.

-Fijación industrial química: producción de amoníaco y fertilizantes nitrogenados por la industria a partir del nitrógeno del aire.

-Fijación biológica: conversión de nitrógeno atmosférico en amoníaco, realizada por microbios libres o en asociación con plantas superiores, microbios que reciben por ello el nombre de diazótrofos (azoe = nitrógeno, trofos = alimentación).

## BALANCE DE NITROGENO

Ganancias:

- Fijación biológica.
- Fijación espontánea.
- Abonado nitrogenado.

Pérdidas:

- Desnitrificación.
- Lavado de nitratos.
- Volatilización de amonio.
- Explotación de cosechas.

La fijación de nitrógeno en la biosfera se estima en unos 275 millones de toneladas anuales, de las cuales 175 corresponden a la fijación biológica, 70 a la industrial y 30 a la espontánea.

Por lo tanto la fijación biológica supone más del 60% del nitrógeno fijado y es con mucho el proceso más importante y que a continuación se desarrolla. (Punto 2).

## **2. FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO**

Los efectos beneficiosos del nitrógeno para las plantas ya se conocían por los romanos desde hace unos 2000 años. Autores Chinos en la misma época descubrieron el efecto beneficioso del uso de *Azolla* en el cultivo del arroz.

### **2.1- MICROBIOS FIJADORES.**

La fijación biológica aparece únicamente en bacterias, algas cianofíceas y actinomicetos, microorganismos procariotas que tienen la capacidad de utilizar el nitrógeno atmosférico. Entre los más de 60 géneros conocidos se encuentran formas aerobias facultativas, anaerobias, autótrofas y heterótrofas, con hábitats muy dispares y con requerimientos ambientales de temperatura, humedad, pH, etc muy heterogéneos.

Los organismos responsables de la fijación de nitrógeno contienen la enzima NITROGENASA y se llaman DIAZOTROFOS y en ellos se incluyen bacterias organotróficas, bacterias sulfurosas fototróficas y cianobacterias.

(Ver tabla 2, página siguiente.)

(TABLA 2. Clasificación de microbios fijadores de nitrógeno de interés agrícola y forestal.)

Forma de vida	Tipo de microbio	Género microbio	Tipo de planta	Localización de microbio
Libre	Bacteria	Numerosos		
	Alga	Numerosas		
Asociación (Rizocenosis)	Bacteria	Azospirillum Azotobacter.	Gramíneas: sorgo, Maíz.	Zona de la raíz
Simbiótica	Bacteria	Rhizobium.	Leguminosas: lenteja, veza, garbanzo, haba, etc.	Nódulo radical.
	Actinomiceto	Frankia	Árboles y arbustos:  Aliso, casuarina, etc.	Nódulo radical
	Alga Cianoficea	Numerosos Nostoc	Hongo ascomiceto  Hongos, hepáticas,  Musgos, gimnospermas, angiospermas.	Talo de liquen  Variable
		Anabaena	Helecho azolla	Cavidad foliar

La capacidad para fijar el nitrógeno por los organismos procariontes ha sido muy estudiada por grupos de investigadores, si bien parece estar relacionada con las características y composición de la atmósfera de nuestro planeta en tiempos pasados.

#### CANTIDAD DE NITROGENO FIJADO ANUALMENTE POR VIA BIOLÓGICA

De los 175 millones de toneladas de nitrógeno fijado anualmente por vía biológica, 140 millones de toneladas corresponden a ecosistemas terrestres y 35 millones de toneladas a ecosistemas marinos.

Dentro de los ecosistemas terrestres, 45 millones de toneladas son fijadas por tierras de cultivo, 45 millones de toneladas por prados y pastos y 50 millones de toneladas por áreas forestales y otras.

Los microorganismos fijadores de vida libre tienen escaso rendimiento fijador debido a que consumen mucha energía en el proceso y los substratos necesarios para obtenerla son poco

abundantes en la biosfera. Los microorganismos libres de mayor importancia ecológica en este sentido son las algas azul verdosas fijadoras, ya que son capaces de utilizar la energía solar para conducir la fijación biológica del nitrógeno.

Entre las bacterias fijadoras de vida libre las más numerosas y eficaces son formas aeróbicas pertenecientes al género *Azotobacter*: *A. Chroococcum* es la especie más abundante en los suelos neutros y alcalinos, mientras que otros como *A. Beijerinckia* domina en suelos ácidos. Entre las bacterias anaeróbicas destacan los géneros *Clostridium* y *Desulfovibrio* y entre las facultativas *Bacillus* y *Klebsiella*.

## **2.2- ASOCIACIONES FIJADORAS DE NITRÓGENO.**

Las asociaciones entre microbio fijador y planta admiten varios grados de interdependencia de ambos simbioses. En el nivel inferior, con un menor grado de relación, están las rizocenosis que se establecen en la rizosfera de algunas plantas, como las formadas por la bacteria *Azospirillum* y con cereales como sorgo y maíz o también por *Azotobacter paspali* y la gramínea *Paspalum notatum*. En el nivel superior, con una interdependencia muy elevada entre los microorganismos asociados, están las simbiosis mutualísticas, que conducen a la formación de estructuras especializadas, generalmente nódulos o tumoraciones en raíces y más raramente en los tallos, como en *Sesbania Spp*. Las plantas superiores forman este tipo de simbiosis fijadora de nitrógeno, con bacterias (*Rhizobium*), actinomicetos (*Frankia*), y algunas algas azul verdosas, teniendo todas ellas especial impacto en la producción vegetal de sus respectivos hábitats y/o cultivos.

Destaca la relevancia de las leguminosas en la actividad agrícola y forestal, de las plantas leñosas actinorrhizas (aliso, casuarina etc) en colonización y forestación, y del helecho acuático *Azolla* en arrozales sumergidos.

Es importante mencionar que todos los microorganismos implicados en esta simbiosis pueden tener cierta actividad fijadora en el suelo en ausencia de la planta, salvo que se sepa, en rizobios de crecimiento rápido. Sin embargo, es en simbiosis con la planta donde dicha actividad se manifiesta plenamente.

Algunas algas azul-verdosas (*Nostoc* y *Anabaena*) pueden vivir simbióticamente, bien con hongos formando líquenes, bien en nódulos radicales de gimnospermas del grupo de las cicadineas, o en glándulas de la base foliar de la angiosperma *Gunnera*.

Las simbiosis con *Rhizobium* y *Frankia* respectivamente, se establecen como resultado de la expresión de unas características propias del microbio de la planta hospedadora y de la asociación de ambos. Entre las propiedades de la simbiosis cabe destacar:

A. La especificidad: propiedad por la que el microbio infecta selectivamente a la planta hospedadora. La magnitud de la misma varía de unas simbiosis a otras.

Esta especificidad, que también se da en plantas actinorrhizas, aquellas que forman simbiosis con actinomicetos, ha llevado a definir varios grupos de *rhizobium* y *frankia*.

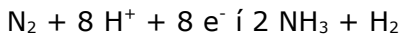
B. Infectividad: la capacidad de un microbio para invadir la planta.

C. Efectividad: capacidad para que en un nódulo se realice la secuencia de un proceso que lleve a la reducción de nitrógeno atmosférico en amoníaco.

El microbio entra en la planta bien por los pelos absorbentes de la raíz bien a través de su epidermis, posteriormente se ubican en los nódulos aislado del ambiente exterior. Esta localización plantea la necesidad de la existencia de un intercambio metabólico entre los dos simbioses que implica el suministro por la planta de los nutrientes y componentes carbonados necesarios para el microbio, así como el transporte hacia la planta de los productos nitrogenados resultantes de la actividad fijadora del microbio.

## **2.3 BIOQUÍMICA DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO.**

La dinitrogenasa constituye el equipo enzimático que cataliza la reducción del nitrógeno a amoníaco.



La dinitrogenasa, es un complejo enzimático formado por un componente 1, molibdo-ferroproteína, y un componente 2 ó ferro-proteína. El componente 1 tiene por misión la reducción de nitrógeno a amoníaco, y el componente 2 la transferencia al 1 de la energía necesaria para que éste pueda realizar la reducción. Para que tenga lugar la reducción del nitrógeno se necesita:

- La presencia de ambos componentes.
- Energía biológica en forma de ATP.
- Iones magnesio.
- Poder reductor.
- Protones.
- Un ambiente anaerobio, ya que la dinitrogenasa es rápidamente desactivada por el oxígeno.

### **2.3.1. Limitaciones en la fijación biológica del nitrógeno**

La fijación del nitrógeno consume aproximadamente 28 moléculas de ATP, este alto consumo energético limita la importancia ecológica de los fijadores de nitrógeno. Además de proporcionar esta energía, los productos de la fotosíntesis, o fotosintatos, van a ser utilizados como fuente de compuestos carbonados para la incorporación del amoníaco en su estructura química, y también en el crecimiento y desarrollo de los nódulos y otros órganos.

Si tenemos en cuenta que el rendimiento fotosintético no es muy alto, se comprende fácilmente que la fotosíntesis sea un factor limitante en la fijación de nitrógeno.

Por otro lado, la fotorrespiración puede consumir gran parte de la energía fijada fotosintéticamente, lo que supone una seria reducción de la fotosíntesis neta.

Otra limitación que incide en gran medida en el proceso fijador la constituye la liberación de hidrógeno gaseoso, paralela a la formación de amoníaco, lo que hace que se malgaste un alto porcentaje de la energía en una función sin interés aparente.

## **2.4. PROTECCIÓN FRENTE AL OXIGENO.**

Los dos componentes de la dinitrogenasa son inactivados por el oxígeno.

Para protegerse del oxígeno, los sistemas fijadores de nitrógeno han desarrollado una serie de estrategias fisiológicas, entre las cuales cabe citar:

- A. Una mayor actividad respiratoria en el caso de fijadores libres cuando la oxigenación del entorno aumenta, se consigue un nivel de oxígeno lo suficientemente bajo para que no sea nocivo.
- B. En cianofíceas, se desarrollan unas células especializadas: los heterocistos, en las cuáles se localiza exclusivamente la nitrogenasa, y donde no hay liberación de oxígeno.
- C. En los nódulos radicales, donde el microbio encuentra las condiciones idóneas para expresar su actividad fijadora y donde existe un pigmento que regula el suministro de oxígeno al microbio para su respiración, y a niveles que no afecten a la actividad fijadora.

El amoníaco formado en la fijación de nitrógeno, es asimilado rápidamente a través de una ruta metabólica en la que intervienen dos enzimas, la glutaminosintetasa y la glutamatosintetasa, con el resultado final de la incorporación del nitrógeno a la molécula de glutamato. La asimilación del amoníaco en la simbiosis es realizada por la planta. Una vez en la célula vegetal del nódulo el



amoniaco pasa a formar parte de la glutamina y del glutamato, que son los primeros productos orgánicos llamados asociaciones simbióticas.

La glutamina puede salir como tal del nódulo, o bien sufrir transformaciones a asparraguina, alantoína, o ácido alantoico. Las leguminosas, en general, poseen el mecanismo necesario para producir ureidos (alantoína o ácido alantoico).

Se estudian hipótesis sobre cómo aumentar la eficiencia fijadora de una asociación planta-microbio, mediante manipulación genética.

## **2.5. EVOLUCION DE LOS FIJADORES DE NITROGENO**

Hace unos 3100 millones de años, parecen haber existido microbios procariotas, según se deduce de los microfósiles encontrados en Canadá. Estas primeras formas vivas tuvieron que ser anaerobias porque en la atmósfera primitiva no existía oxígeno libre, posteriormente fueron apareciendo microbios fotosintéticos liberadores o no de oxígeno, formas autótrofas no fotosintéticas, y heterótrofos aerobios. Se calcula que el oxígeno libre aparece en la atmósfera hace 2000 millones de años.

La proliferación de estos grupos sobre la tierra fue uno de los factores que hizo posible la colonización de los ambientes terrestres muy pobres en nutrientes hasta entonces.

Algunas características de la dinitrogenasa, relacionan su presumible antigüedad con las condiciones del medio primitivo:

- A. sólo funciona en ausencia de oxígeno libre.
- B. Su composición es una metaloproteína que tiene hidrógeno y azufre, elementos presentes en el medio donde se desarrollan las primeras formas vivas.
- C. Los aminoácidos que la componen se encuentran entre los termodinámicamente más estables, lo cual sólo ocurre en moléculas primitivas.

El origen de la fijación simbiótica es mucho más reciente, aproximadamente 150 millones de años. Una de las hipótesis que trata de explicar la evolución de la simbiosis supone una adaptación ecológica que debió ocurrir de acuerdo con las siguientes fases;

- 1) Asociación entre un fijador de vida libre y la planta sobre la superficie radical.
- 2) Establecimiento de la simbiosis dentro del tejido cortical de la raíz.
- 3) Formación de un tejido especializado en la fijación de nitrógeno, el nódulo.

Quizás la fijación simbiótica es todavía demasiado joven, y en una previsible evolución de las plantas surjan especies vegetales fijadoras de nitrógeno, con orgánulos semejantes a los cloroplastos en sus hojas y/o raíces, como sugiere J-R. Postgate. o quizás existen ya estas especies y aún no las hemos encontrado.

## **3. LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM- LEGUMINOSA.**

Las leguminosas constituyen la familia de plantas con flores más numerosa después de las gramíneas, con unos 700 géneros y 14000 especies.

La nodulación es una característica de las leguminosas en general, pero existen géneros que no forman tales estructuras (en la subfamilia Papilionoideae, donde se incluyen alfalfa, soja, judía garbanzo, se dan nódulos en un 95% de los individuos examinados, en la Caesalpinioideae no se ha encontrado nodulación en un 67% de los miembros estudiados).

Si se tiene en cuenta que más del 50% de las leguminosas no han sido examinadas respecto a si nodulan o no, se llega a la conclusión de que este tema necesita mayor atención.

Muchas de las plantas que no nodulan en su ambiente natural quizás pudieran hacerlo si las condiciones fueran otras. La cantidad de nitrógeno fijado depende de la cepa o estirpe de bacteria, de la planta hospedadora y de las condiciones ambientales.

El empleo de las leguminosas en la agricultura aparece junto con el de los cereales, ya en registros arqueológicos, y el reconocimiento de que fertilizan el suelo y que tienen, por tanto, gran interés para la cosecha siguiente, se manifiesta en algunos de los escritos más antiguos de griegos, romanos, chinos y civilizaciones precolombinas.

Las estimaciones recientes indican que contribuyen en la actualidad con más de la mitad del nitrógeno fijado por sistemas biológicos, con un aporte anual superior al de fertilizantes químicos.

Las leguminosas se utilizan para forraje, fertilización de pastizales, obtención de aceites y grano para el consumo y como abono verde (práctica muy extendida en regiones tropicales y subtropicales).

Aproximadamente los dos tercios del nitrógeno total se encuentran en la parte aérea de la planta, de forma que si ésta se retira como heno, por pastoreo, o por cosecha de la semilla, irá en perjuicio del suelo disminuyendo la cantidad de nitrógeno que va a parar a él.

El tiempo que media desde el enterrado de la leguminosa hasta la siembra del cultivo principal es un factor crítico, pues ha de transcurrir un período de tiempo suficiente para la descomposición del abono verde, pero no excesivo, para evitar que haya pérdidas por drenaje. El estado de madurez en el que se encuentra la leguminosa en el momento de enterrarla constituye otro factor importante en el aumento de la fertilidad del suelo.

En el caso de su empleo como forrajes para la alimentación animal se ha de elegir una que tenga calidad nutritiva aceptable, y que sea capaz de persistir y regenerarse aun cuando el pastoreo sea intensivo.

El animal en régimen de pastoreo favorece la transferencia de nitrógeno de la leguminosa a la gramínea, ya que retiene solamente una pequeña parte del que toma del pasto, desechando el resto en forma de orina y estiércol. Este nitrógeno devuelto al suelo es reutilizado por las plantas del pasto, por eso es recomendable el sistema del pastoreo. Se ha estimado que la mitad o los dos tercios del nitrógeno fijado por la leguminosa se incorpora al suelo por acción del ganado.

*Transferencia de nitrógeno fijado por la leguminosa a la gramínea no fijadora en un pasto mezcla de ambas. El hombre puede intervenir en el sistema suelo-planta-animal regulando la proporción de mezcla, así como la adicción de nitratos, materia orgánica y carga mineral.*

El efecto beneficioso de las leguminosas puede manifestarse también en el área de la selvicultura, donde especies de tipo leñoso, como Robinia (falsa acacia) o bien herbáceas forrajeras o de grano, como tréboles, pueden ser utilizadas en algunas explotaciones forestales de plantas no fijadoras.

### LIMITACIONES DE SU EMPLEO

En general se hace la recomendación de aumentar el cultivo de leguminosas con el fin de disponer de un adecuado suministro de alimentos, pero existen algunos obstáculos para seguir tales recomendaciones ya que muchas sociedades no tienen el hábito de cultivar y consumir leguminosas y además existen algunas limitaciones más como son la presencia de algunas sustancias tóxicas en algunas leguminosas (como hemaglutininas, bociógenos, cianógenos o antagonistas de vitaminas), lenta digestibilidad y que la mayoría tienden a contener poca cantidad de algunos aminoácidos importantes (como los azufrados metionina y cistina).

No obstante existe alguna leguminosa, como la soja, que no solamente posee un contenido de proteínas superior a la mayoría, sino que también aporta una mejor composición de aminoácidos y una mayor digestibilidad.

Para el agricultor, las leguminosas pueden originar un problema más inmediato: el aumento de las producciones conduce a un incremento en el consumo de otros elementos esenciales, principalmente

de potasio, fósforo, calcio y azufre, que hay que proporcionar al suelo si éste no los contiene en cantidades suficientes para obtener un beneficio máximo del cultivo.

Otros elementos que inciden en una mayor actividad fijadora son el molibdeno, como parte constitutiva de la dinitrogenasa, y el cobalto, como constituyente de la leghemoglobina de los nódulos, por lo que en ciertos suelos deberá contemplarse la necesidad de su adicción.

La incorporación de fertilizante nitrogenado al suelo deberá hacerse en cantidades moderadas, dado su efecto inhibitorio sobre la nodulación y fijación de nitrógeno.

### SIMBIOSIS MULTIPLE EN LEGUMINOSAS

En la relación simbiótica de las leguminosas con rizobios puede existir simultáneamente la intervención de otros microbios que contribuyen a un aumento de la producción y este es el caso de los hongos micorrícicos y bacterias *Azospirillum*.

Se sabe que un centímetro de raíz micorrizada se halla recubierta de un metro, aproximadamente, de hifas o filamentos del hongo. Estas hifas se propagan por el suelo invadiendo zonas donde el sistema radical de la planta no llega directamente, aumentando así el volumen de suelo explorado y la cantidad de nutrientes minerales y agua que la planta recibe a través del hongo.

Las micorrizas también facilitan la llegada de fosfatos a la raíz, hecho que es muy beneficioso ya que el fósforo es un factor limitante crítico que participa en la nodulación, fijación de nitrógeno y crecimiento de la planta.

Un segundo tipo de simbiosis múltiple es la formada por *leguminosa-rizobio-azospirilo*. La interacción de los dos microbios, cuando se aplican a la planta en forma de un inóculo a partes iguales de ambos, conduce a una mayor producción vegetal. Si en el inóculo predominan los *azospirilos* sobre los *rizobios*, no se forman nódulos radicales, pero si produce una interacción de ambos microbios que conduce también a un aumento de productividad respecto de los controles inoculados con *azospirilos* solamente.

### INOCULACION CON RHIZOBIUM

La inoculación de leguminosas con microbios adecuados es de gran importancia para el desarrollo de éstas.

Un criterio de selección es que el rizobio forme nódulos en las raíces de la planta hospedadora bajo un amplio espectro de condiciones ambientales, muestre capacidad de competir con ventaja sobre otros rizobios no deseados, sobreviva y se multiplique en el suelo, tenga resistencia a pesticidas, desecación, etc.

Se han obtenido resultados muy satisfactorios cuando se inocula el suelo directamente y a continuación se siembra la semilla.

Otra posibilidad para obtener simbiosis efectivas *Rhizobium-leguminosa* consiste en seleccionar las plantas a fin de reducir su especificidad simbiótica, lo que les permitirá asociarse con cepas nativas del suelo.

### GENES DE LA NODULACION Y FIJACION DE NITROGENO

Mediante la manipulación genética del sistema regulatorio de la fijación, se puede llegar a líneas más eficientes y tolerantes de altos contenidos en nitrógeno en el suelo.

Hasta el momento se han identificado unos 45 genes en 8 especies leguminosas (alfalfa, guisante, soja, trébol, garbanzo, cacahuete...) que de algún modo regulan la nodulación y fijación de nitrógeno. Estos genotipos se han obtenido de mutantes espontáneos, o por mutagénesis bien química o radiactiva.

Las líneas mutantes son fuentes valiosas para conseguir un mejor conocimiento de los genes que en la planta se hallan relacionados con el inicio, desarrollo y funcionamiento del nódulo, así como son en potencia poseedoras de una información muy útil con respecto a la autorregulación del número de nódulos y su inhibición por nitratos.

Por otra parte, dado que la membrana peribacterioidal parece ser el mediador primario en el desarrollo del bacteroide, y el lugar donde se controla el intercambio nutritivo entre la planta y el microorganismo, los análisis comparativos de tales membranas, en los genotipos eficientes y en los ineficientes, podría revelar la contribución de estas estructuras a la simbiosis.

#### PROTEINAS ESPECIFICAS DE LA NODULACION

Las proteínas sintetizadas por la planta en respuesta directa a la infección radicular y formación del nódulo se conocen como "proteínas nódulo-específicas" y tras la propuesta de un investigador se las ha llamado nodulinas.

La leghemoglobina es la proteína que da a los nódulos su color rosado, y es la nodulina mejor caracterizada hasta el momento.

Los estudios que emplean mutantes de *Rhizobium* sugieren que hay muchos tipos de señales envueltas en la expresión de los genes de las nodulinas.

Las tecnologías emergentes del ADN recombinante y la manipulación in vitro ofrecen una gran promesa en relación a la mejora de plantas, éstas podrían aportar unos métodos nuevos de selección, propagación e hibridación, y también la capacidad de insertar genes foráneos directamente en el genoma vegetal. El empleo del cultivo celular como herramienta de selección ofrece la promesa más inmediata para la incorporación en programas de cruzamientos ya existentes. Los genes extraños podrían ser fuentes de variación importantes para caracteres heredables de forma simple, tales como resistencia a herbicidas o a enfermedades, si se pudieran transferir con todos los sistemas de control intactos, por el contrario, los caracteres cuantitativos tales como rendimientos y fijación de nitrógeno, serán más difíciles de cambiar utilizando cualquier procedimiento que afecte a un reducido número de genes. La mejora vegetal será necesaria para traspasar los productos de las manipulaciones genéticas no convencionales del laboratorio a la producción agronómica.

## **4. LA SIMBIOSIS FRANKIA-PLANTA NO LEGUMINOSA**

Esta simbiosis fijadora de nitrógeno entre el actinomiceto, o bacteria filamentosa FRANKIA y plantas no leguminosas, todas ellas leñosas, tiene gran importancia en áreas forestales. El beneficio que se puede derivar de su empleo nos viene dado a más largo plazo que en el caso de las leguminosas, este es el motivo fundamental de que las investigaciones sobre esta simbiosis hayan ido siempre por detrás de la simbiosis de leguminosas, que proporcionan un beneficio inmediato a la economía del agricultor medio.

Los actinomicetos del género *frankia* forman nódulos en asociación con 170 especies de plantas no leguminosas, pertenecientes a 17 géneros y 7 órdenes.

Estas asociaciones ocurren en hábitat muy dispares, tales como desde el ártico al trópico, o como de ambientes semidesérticos a bosques muy húmedos.

(TABLA 3: Clasificación de Angiospermas no leguminosas fijadoras de nitrógeno en simbiosis con Frankia)

<i>orden</i>	<i>Familia</i>	<i>Género</i>	<i>Número de especies noduladas</i> (en paréntesis número total de especies)	<i>Rendimiento estimado de fijación de nitrógeno (Kg/ha año)</i>
Casuarinales	Casuarinaceae	Casuarina	24 (45)	230
Myricales	Myricaceae	Myrica	26 (35)	32-25
		Comptonia	1 (1)	26-30
Fagales	Betulaceae	Alnus	33 (35)	26-300
	Eleagnaceae	Eleagnus	16 (45)	15
		Hippophae	1 (3)	2-180
		Shepherdia	3 (3)	60
Rhamnales	Rhamnaceae	Ceanothus	31 (55)	
		Discaria	6 (10)	
		Colletia	3 (17)	
		Trevoa	1 (6)	
Coriariales	Coriariaceae	Coriaria	13 (15)	
Rosales	Rosaceae	Rubus	1 (250)	18-60
		Dryas	3 (4)	
		Purshia	2 (2)	
Cucurbitales	Datisceae	Datisca	2 (2)	

(Adaptada de Becking, 1982. In "advances in agricultural Microbiology")

#### 4.1 UTILIZACIÓN E IMPORTANCIA ECOLÓGICA.

El nitrógeno también es un factor limitante en los cultivos forestales. Las plantas actinorrhizas pueden representar una solución a este problema, puesto que asociadas a otras de interés forestal contribuyen a la nutrición nitrogenada de éstas, así como ellas mismas pueden ser empleadas en la obtención de pulpa para la fabricación de papel y en la industria maderera.

(TABLA 4: Resultados de una plantación pinus-myrica a los 12 años de la introducción de esta.)

<i>Parcela</i>	<i>Planta</i>	<i>Nº de árboles/ha</i>	<i>Altura (m)</i>	<i>Diámetro (cm)</i>	<i>Volumen de tallo (cm<sup>3</sup>x10<sup>3</sup>)</i>	<i>Nitrógeno (kg.N/Ha)</i>
<i>A</i>	<i>Pinus</i>	1540	6.2	7.6	17238	85
	<i>Myrica</i>	4300	4.1	4.9		259
<i>B</i>	<i>Pinus</i>	2850	5.0	5.9	10287	94
	<i>Myrica</i>	2380	3.5	4.5		125
<i>C</i>	<i>Pinus</i>	6490	4.4	4.5	3403	53

Resultados de una plantación pinus-myrica a los 12 años de la introducción de ésta.

Las hojas de algunas plantas actinorrícas, por ejemplo las del aliso, conservan a su caída una gran parte del nitrógeno que contenían en vida.

Ello hace que la adicción del elemento al suelo sea un proceso continuo y más ventajoso para la vegetación vecina, que si el nitrógeno quedase almacenado en los demás órganos de la planta hasta su muerte.

El efecto fertilizante de estas plantas se manifiesta también en pastizales, habiéndose demostrado que el aliso incrementa la producción de un pasto de gramíneas subyacente, proporcionando al ganado un alimento de mayor calidad.

También es importante destacar que las especies que crecen en los márgenes de las corrientes de agua actúan como fuente de proteínas para la alimentación de la fauna acuática, debido a esto las zonas de pesca más ricas en aguas dulces se sitúan donde existen alisos.

Las plantas actinorrícas son típicamente pioneras, con lo cual su uso puede extenderse a la colonización de hábitat desérticos, fijación de dunas o regeneración de suelos pobres o de aquellos que han sido alterados por la acción del hombre o que están sometidos a una fuerte erosión. Ejemplos en este sentido:

1. En el oeste de EEUU se colonizaron miles de kilómetros cuadrados por los géneros *Alnus*, *Ceanothus* y *Purshia*.
2. En países tropicales se usa *causarina* para fijar dunas móviles.
3. *Myrica gale* se utiliza para recuperar suelos erosionados y reforestación, es una especie común en zonas pantanosas de Europa y Norteamérica.
4. Uso a gran escala del Aliso en muchos países europeos, asiáticos y americanos, en la lucha contra la erosión, en la colonización de tierras recuperadas al mar en Holanda, en la regeneración de terrenos de cultivo agotados, zonas forestales degradadas, zonas glaciares desnudas, suelos pedregosos de altitudes e incluso como indicadores de agua.

Por último, las especies arbóreas de gran porte se emplean como cortavientos y como protección de diferentes cultivos frente a la invasión de arena. En México se ha utilizado "Casuarina" para proteger a la ciudad de los vientos cargados de polvo procedentes del lago Texoco.

Respecto al problema de la erosión hay que tener en cuenta que en nuestro país un 25% sufre fenómenos de erosión grave, y más del 27% sufre de erosión moderada (es muy posible que estos datos hayan aumentado ya que la fuente consultada se publicó en 1985). Cada año las aguas arrancan y transportan 1000 millones de toneladas de nuestro suelo. Todo ello presenta a nuestro país como el único europeo en claro proceso de desertización. Por lo tanto es urgente la realización de estudios sobre la viabilidad de la utilización de plantas actinorrísticas, tanto para regenerar las zonas degradadas como para fertilizar otras especies usadas en repoblación forestal.

## **5. OTRAS SIMBIOSIS.**

A continuación se muestran algunas otras simbiosis destacables por su importancia en la captación del nitrógeno:

### **1-LAS ALGAS CIANOFÍCEAS Y SU SIMBIOSIS CON PLANTAS.**

Las especies de algas conocidas que fijan nitrógeno superan el centenar, tienen una distribución universal, siendo más abundantes en las zonas tropicales y templadas; comprenden aguas dulces y saladas, ambientes terrestres y fijan nitrógeno en vida libre o en simbiosis con un gran número de organismos. Las algas implicadas en la fijación de nitrógeno son fotosintéticas por lo que no requieren aporte del exterior de compuestos carbonatados.

Existen tres grupos principales de algas cianofíceas fijadoras de nitrógeno:

1. Formas filamentosas con heterocistos (células filamentosas de pared gruesa; no fotosintéticas intercaladas en los filamentos del alga).
2. Formas filamentosas sin heterocistos.
3. Formas unicelulares.

El grupo de las algas filamentosas con heterocistos es el más importante, fijan nitrógeno en condiciones aerobias y anaerobias.

Algunos géneros como NOSTOC y ANABAENA, fijan nitrógeno en vida libre pero también pueden establecer simbiosis con un gran número de plantas.

Desde un punto de vista de aplicación a la agricultura, hay que destacar, las asociaciones simbióticas de estos organismos con plantas.

(Tabla5) Fijación de nitrógeno de asociaciones simbióticas entre algas cianofíceas y plantas.

Planta asociada
Género de Cianofíceas (alga azul-verdosa)
Cantidad de nitrógeno fijado. Kg. N/Ha. Año.
Hongos
<i>Calothrix, Nostoc.</i>
1-10
Hepáticas
<i>Anthoceros</i>
<i>Nostoc</i>
1-10
Musgos
<i>Sphagnum</i>
<i>Nostoc</i>
1-10
Helechos
<i>Azolla</i>
<i>Anabaena</i>
10-200
Gimnospermas
<i>Macrozamia</i>
<i>Nostoc</i>
20
Angiospermas
<i>Gunnera</i>
<i>Nostoc</i>
10-70



# 1. EMPLEO DE LA SIMBIOSIS AZOLLA-ANABAENA.

Su aplicación más extendida es como biofertilizante en los cultivos de arroz.

El género *Azolla* agrupa a seis especies de pequeños helechos acuáticos que viven flotando en aguas tropicales y templadas de todo el mundo, en la región Castellano-leonesa podemos encontrar en ríos y charcas la especie *Azolla Caroliniana*, las principales características que la hacen útil como biofertilizante son:

- capacidad fijadora del sistema, del orden de 3Kg. de nitrógeno por Ha y día.
- rápida propagación, duplican su biomasa entre tres y seis días.
- rápida descomposición en el suelo.
- no transmiten enfermedades a los cultivos.

Es preciso controlar su desarrollo, ya que pueden causar algunos problemas ecológicos provocando la desaparición de otras plantas ya existentes. Esto ha hecho que muchas veces se la considere una mala hierba.

La fertilización de *Azolla* con fosfatos es necesaria, y representa la inversión más importante en su cultivo.

Su utilización como fertilizante en más de 1,7 millones de hectáreas en el lejano Oriente data originalmente de tiempos remotos.

En los cultivos de arroz, se usa adoptando las siguientes técnicas:

- a. Antes de plantar el arroz, se incorpora como abono verde al suelo.
- b. Crecer *Azolla* junto al arroz en forma de sistema de doble cultivo.

Los aumentos en la producción de arroz por el efecto de la incorporación de *Azolla* son importantes, quedan reflejadas en la siguiente tabla.

(Tabla6) Efecto de *Azolla* sobre el rendimiento de grano y paja de arroz. (Singh, 1977).

<i>Tratamiento</i>	<i>Rendimiento en Kg/Ha</i>	
	<i>Grano</i>	<i>Paja</i>
Control	3.489	2.581
<i>Azolla</i> (10 Tm. Peso fresco/Ha)	5.125	3.786
% de aumento	47	47

La asociación puede tener también un papel fertilizante en campos no sembrados o como abono verde, cuya práctica es útil en otros cultivos distintos al del arroz como trigo, cebada, avena y otros.

El empleo de *Azolla* con este fin en cultivos de trigo, ha sido estudiado por diversos autores, obteniendo aumento de peso fresco de plantas de trigo, cultivadas en maceta, del orden de 25-30 por ciento respecto de controles no fertilizados.

Otro empleo de esta asociación es como forraje, así en Indochina se recolecta *Azolla* para la alimentación animal, y en Vietnam es utilizado como alimento para reses, aves de corral y peces.

## **2. ASOCIACIÓN DE AZOSPIRILLUM CON RAÍCES DE PLANTAS.**

Se trata de una asociación que no se puede considerar exactamente como simbiosis.

*Azospirillum* es una bacteria fijadora de nitrógeno que prolifera en y sobre raíces de maíz, trigo, cebada, avena y otros cereales y plantas forrajeras constituyendo una rizocenosis no nodulante que lleva a un aumento del número de espigas y de biomasa vegetal.

La cantidad de nitrógeno aportado directamente del microbio a la planta es pequeña debido a que el microbio exporta a la planta una parte mínima del nitrógeno fijado, por lo que el cultivo se beneficia indirectamente a través del suelo adonde va a parar el resto del nitrógeno.

La inoculación de los suelos se hace utilizando turba molida como portador, conteniendo 10<sup>9</sup> bacterias de *Azospirillum* por gramo de turba que se aplica antes o poco después de la siembra. El aumento de cosecha alcanza un máximo en suelos que reciben un 30-50 por ciento menos de fertilizante nitrogenado del normalmente recomendado para estos cultivos. Junto a la capacidad fijadora existe una mayor producción de hormonas de crecimiento que suponen un beneficio para el desarrollo de la planta y que llevan a la formación de más raíces y consiguiente aumento de absorción de nutrientes.

## **3. FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN TERMITAS.**

Las termitas representan el máximo exponente en simbiosis fijadoras de nitrógeno en las que participan animales.

La actividad microbiana presente en el aparato digestivo de las termitas, es realizada por dos importantes grupos microbianos: uno que descompone la celulosa en azúcar, glucosa, y otro que a su vez utiliza esa glucosa como fuente de energía para fijar nitrógeno del aire. Esta complementación es suficiente para que las termitas puedan nutrirse exclusivamente de compuestos celulósicos de la madera, causa de graves problemas en construcciones donde predomina dicho material.

Se trata de un ejemplo de cómo tres organismos diferentes pueden beneficiarse mutuamente: el microbio fijador de nitrógeno utiliza la glucosa que le proporciona el celulolítico; éste recibe la celulosa triturada y aminoácidos que la termita y el fijador de nitrógeno respectivamente le dan; por último, la termita tiene a su disposición una abundante fuente de alimentos celulósicos que ningún otro animal puede consumir de forma exclusiva.

## **6. LIMITACIONES EN LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN AMBIENTES DE TIPO MEDITERRÁNEO.**

La característica principal del clima Mediterráneo, presente no sólo en la Cuenca Mediterránea sino también en otras regiones del mundo (centro y sur de California, parte central de Chile, Suroeste de la provincia del Cabo en Sudáfrica y bordes sur y suroccidental de Australia) es la existencia de inviernos lluviosos y fríos, seguidos de veranos secos y calurosos.

Debido a la importancia económica de la agricultura y ganadería en estos ambientes, especialmente en la Cuenca Mediterránea, muchos de los estudios realizados están dedicados a la optimización de los niveles de nitrógeno. El interés por un mejor uso desde el punto de vista agrícola, forestal y de

conservación, hace que exista una mayor dedicación de los investigadores al estudio de la influencia del estrés y disponibilidad de nutrientes en dichos ecosistemas.

La alternancia de una estación generalmente calurosa y seca con otra fría y lluviosa origina un comportamiento peculiar de la actividad microbiana en las regiones mediterráneas. Existen dos momentos transitorios con mayor intensidad biológica, uno al comienzo de la estación seca y otro con las primeras precipitaciones otoñales.

## **6.1 FACTORES AMBIENTALES QUE LIMITAN LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN LOS AMBIENTES MEDITERRÁNEOS.**

◦ La sequía: en el Suroeste de Australia, Lange observó que el 94% de las leguminosas poseían nódulos activos en invierno, pero que sólo un 3% los conservaban en verano. Se presenta por lo tanto un marcado descenso de la fijación durante el verano.

◦ Inundación periódica.

◦ Presencia de compuestos fenólicos procedentes de materia orgánica en descomposición.

◦ Bajas temperaturas en invierno.

◦ Salinidad.

◦ pH bajo.

◦ Reducida disponibilidad de nutrientes.

◦ Defoliación debida al fuego, sequía y presencia de animales herbívoros.

◦ La formación de rocío, factor que puede provocar una fluctuación diaria en la actividad fijadora especialmente de las cianobacterias.

Tanto la proliferación de *Rhizobium* como la formación de nódulos, requieren presencia de potasio, calcio, zinc, cobre y boro. El proceso de fijación en si demanda hierro, molibdeno, cobalto, zinc, fósforo y en menor grado cobre, azufre y calcio.

El problema es que algunos de estos nutrientes asociados con la actividad nodular tales como fósforo, hierro, calcio, molibdeno, cobre, cobalto y zinc son escasos; muy poco móviles y/o lixiviados en algunos de los suelos mediterráneos.

En estos climas, con una estacionalidad marcada, y especialmente caracterizada por episodios repentinos de precipitaciones, la pérdida de nutrientes esenciales para la fijación mediante los procesos de lixiviación es relativamente frecuente. En estos caso, las micorrizas constituyen un fenómeno bastante frecuente. Al ser estructuras que comunican la raíz con los micrositios en los cuales tiene lugar la mineralización, reducen el riesgo de pérdida de nutrientes. Por lo tanto, es muy posible que uno de los mecanismos adaptativos más interesantes en muchos ambientes mediterráneos, y en general para las plantas colonizadoras de suelos nutricionalmente marginales, sea el poseer tanto infección nodular como micorrízica.

Otra característica más de los ecosistemas mediterráneos es la elevada frecuencia de fuegos. La disminución en la productividad al aumentar su incidencia se puede relacionar con pérdidas de nitrógeno.

Por tanto, en relación al proceso de fijación en si, hay que considerar:

1. La actividad y supervivencia en el suelo de microorganismos fijadores efectivos.

2. La disponibilidad de elementos nutritivos tales como hierro, azufre, molibdeno, cobre, zinc y especialmente fósforo, que desempeñan funciones esenciales en el proceso de fijación.

El papel de las bacterias libres fijadoras de nitrógeno se considera de menor importancia en estas zonas al hallarse el proceso limitado bien por la falta de agua, bien por la escasez de materia orgánica, o incluso, por efecto de las temperaturas elevadas.

## **7. EL QUEMADO DE RASTROJOS Y LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO.**

Una práctica común entre los agricultores es la quema de paja y restos de cereales tras la siega en lugar de reincorporarlos al suelo. Se ha observado que la incorporación de paja al suelo aumenta la actividad fijadora de nitrógeno, contribuye a disminuir la erosión por el viento y agua de lluvia mejora la estructura del suelo y favorece el desarrollo de bacterias importantes del ciclo del nitrógeno, entre ellas las fijadoras y nitrificantes.

El quemado de rastrojos produce además una reducción de la población microbiana en general, tanto más drástica cuanto mayor sea la humedad.

Por lo tanto, un modo de favorecer la fijación de nitrógeno y, consecuentemente aumentar la producción, consiste en incorporar la paja y restos de cereales al suelo, procurando que tenga lugar su degradación antes de proceder a una nueva siembra.

## **8. FUTURO Y RETOS EN BIOTECNOLOGIA**

Actualmente son muchos los estudios de organismos fijadores de nitrógeno que aplican la Biología molecular para conseguir mejorar la fijación del nitrógeno atmosférico.

Aunque los genes responsables de la fijación de nitrógeno están identificados y tienen la facultad de transferirse en bloques entre organismos, otros muchos genes y factores, además de la nitrogenasa, están implicados en el establecimiento de la simbiosis.

Las perspectivas a corto plazo incluyen la expansión del uso de las simbiosis existentes, el estudio de las mal conocidas y la búsqueda de nuevas; a medio plazo, la mejora de la eficacia de los sistemas simbióticos conocidos y a largo plazo, el desarrollo de nuevos sistemas fijadores.

El aumento de la eficiencia de los sistemas fijadores depende en muchos casos de las condiciones de cultivo y de las plantas utilizadas, por lo que la selección de variedades adecuadas y una práctica agrícola conveniente pueden aumentar sensiblemente los rendimientos. Así, en la simbiosis *Rhizobium-leguminosas*, aparte de la selección de razas de *Rhizobium* mediante obtención de mutantes por tratamientos físicos, químicos o bioquímicos, también puede seleccionarse la planta con vistas a obtener cultivares que den lugar a simbiosis más efectivas, práctica que promete ser muy fructífera y que muchas veces se ha olvidado con las leguminosas.

Actualmente se realizan numerosos estudios sobre la fisiología de la fijación simbiótica y la influencia ambiental, tratando de encontrar la combinación bacteria-leguminosa más adaptada a una situación ambiental concreta, así como el manejo óptimo del cultivo, poniendo énfasis en la resistencia a temperaturas extremas, sequía, salinidad y en la influencia de la fertilización nitrogenada y aplicación de productos fitosanitarios. Pero sin duda, lo que ha despertado mayores expectativas es la utilización de la más moderna y sofisticada técnica: la ingeniería genética, que es la que ofrece mayores expectativas debido a su novedad y a sus posibilidades casi ilimitadas.

Los métodos genéticos han sido utilizados desde los primeros tiempos en agricultura, representados por la selección empírica de plantas con el fin de obtener variedades más productivas, pero es en los años 70 con la aparición de las técnicas de ingeniería genética, como la del ADN recombinante, cuando se abren posibilidades espectaculares.

La propia naturaleza del material genético, permite, mediante su manipulación, el desarrollo de proyectos con unos objetivos de gran interés aplicado, como son la alteración de los genes de una

forma específica y predeterminada o la transferencia de genes de interés de unos organismos a otros, adicionándolos o sustituyendo parte de su dotación genética. De este modo puede lograrse un incremento de la eficacia de fijación de nitrógeno.

La manipulación y transferencia de genes ligados a la fijación del nitrógeno y de otros estrechamente relacionados con ella, permitirá conseguir nuevas o mejores cepas de microbios fijadores, crear nuevos sistemas, e incluso obtener plantas capaces de utilizar nitrógeno atmosférico en ausencia de un microbio diazótrofo asociado. Respecto a esto es importante destacar la presencia de un vector natural microbiano: *Agrobacterium tumefaciens*, causante de la formación de tumores en forma de cresta de gallo en plantas, que tiene la propiedad de transmitir al genoma de la planta dicho carácter tumorigeno, con lo cual el tumor puede proliferar en ausencia de aquel tumor que lo inició. Así se pretende introducir en la planta el carácter deseado incorporándolo previamente en el genoma de *Agrobacterium*.

Por otro lado la alteración de los genes que regulan la fotosíntesis y de otros relacionados con el metabolismo y fisiología de las plantas, permitirá un incremento de la fotosíntesis neta y de la capacidad de utilización de los nutrientes, una mayor tolerancia a las condiciones naturales extremas y una cierta independencia de las características físicas y químicas de los suelos, la obtención de plantas resistentes a plagas y pesticidas y la mejora de su calidad nutritiva.

### GENES DE LA FIJACION DEL NITRÓGENO

La actividad fijadora de nitrógeno atmosférico está codificada por los llamados genes nif, que han podido transferirse por manipulación genética bajo forma de plásmidos (material genético extracromosómico) desde microorganismos fijadores a otros que no lo son.

Las investigaciones actuales sobre estos genes se centran en los siguientes aspectos:

- Caracterización y manipulación del grupo nif con objeto de producir plásmidos estables y de alta velocidad de replicación.
- Transformación de los microorganismos que habitualmente colonizan la rizosfera de las plantas.
- Transferencia del grupo nif directamente a las plantas.

La transferencia de genes nif a las bacterias y hongos rizosféricos no fijadores constituye un objetivo interesante, pero muy difícil. En el caso de microorganismos de vida libre, hay que tener en cuenta que la fijación biológica de nitrógeno consume tal cantidad de energía que hace difícil la obtención de niveles de fijación apreciables.

A esto hay que añadir que los fijadores libres reducen únicamente el nitrógeno que estrictamente necesitan, por lo que la planta no puede aprovecharse de él hasta que no haya sido reciclado, y por otra parte, no fijan en presencia de nitrógeno combinado salvo que existan mutantes apropiados. Por tanto, aunque se dispusiera de una fuente de energía suficiente para conseguir un nivel de fijación elevado, la misma existencia de ese nitrógeno fijado inhibiría la propia fijación.

Sería mucho más interesante la conversión en fijadores de microorganismos rizosféricos simbióticos con plantas, particularmente de hongos formadores de micorrizas, que contribuyen a la nutrición fosforada de la planta. Sin embargo, existen grandes obstáculos para lograr este objetivo, el mayor de los cuales es la práctica incapacidad del hongo de tipo endotrófico para desarrollarse en ausencia del hospedador, lo que dificulta la investigación genética.

Mientras se resuelven estos problemas, los estudios en levaduras han abierto nuevos caminos al haber hecho posible la introducción del ADN en *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura de cerveza, que, además, tiene la ventaja de tener ADN extracromosómico (comparable a los plásmidos bacterianos), con lo que puede usarse como un sistema de reproducción de genes, y entre ellos los genes nif, que han sido ya transferidos a *S. Cerevisiae*, aunque hasta el momento no se ha detectado fijación de nitrógeno en las células transformadas.

El problema principal radica en la regulación de la expresión de los genes *nif*, es decir, si se consigue transferir estos genes a una célula vegetal y se mantienen estables ¿podrían llegar a expresarse?. Por lo tanto, la introducción del grupo *nif* en los organismos superiores, como los cereales, no basta, sino que es necesaria también la introducción de genes auxiliares para hacer posible su expresión, lo que significa una modificación del metabolismo y estructuras vegetales, para lo cual, los avances técnicos actuales aún no están dispuestos.

## GENES DE LA FOTOSINTESIS Y OTROS

Cualquier acción que incremente el fotosintato o compuesto carbonado disponible, producirá un motor rendimiento en la fijación del nitrógeno, como se ha demostrado en numerosos experimentos en los que se ha incrementado la intensidad luminosa, o utilizando atmósferas enriquecidas en dióxido de carbono.

La ribulosadifosfato-carboxilasa es la enzima que cataliza la fijación de dióxido de carbono, pero también cataliza una reacción colateral (función oxigenasa) en la que se sintetiza el substrato inicial de la fotorrespiración, por lo que una alteración de este enzima, que conduzca a la desaparición o disminución de la actividad oxigenasa, mediante la manipulación de los genes que codifican su síntesis, constituye una alternativa prometedora.

Por otro lado, la producción de fotosintato requiere ATP y poder reductor, como el reductor deriva del agua una manipulación adecuada de los genes disruptores (que producen ruptura) de agua conducirá a un mayor poder reductor y a un incremento en la producción de fotosintatos.

Otra forma de incrementar la fijación de nitrógeno consiste en conseguir que las plantas que forman simbiosis fijadoras puedan cultivarse con buenos rendimientos en condiciones extremas.

Presentan gran interés los genes correguladores (*osm*) que proporcionan protección frente a gran variedad de tensiones ambientales, tales como la sequedad, calor o exceso de sales, y que funcionan en numerosas bacterias.

La resistencia de las plantas a las diferentes plagas y pesticidas posee también un evidente efecto indirecto sobre la fijación de nitrógeno.

Otra posibilidad de la ingeniería genética es la de mejorar la calidad nutritiva de las proteínas de las leguminosas, para ello la localización cromosómica de los genes que codifican estas proteínas permitirá diseñar experimentos de integración de caracteres seleccionados, presentes en otras especies vegetales, cuya expresión en plantas de mayor interés agrícola, determinará la síntesis de polipéptidos de mayor calidad.

Finalmente cabe incluir los genes de utilización de celulosa (*cut*) y los genes de desnitrificación (*den*). La celulosa representa una de las mayores fuentes de material orgánico del suelo, proporcionando energía a bacterias heterótrofas fijadoras de nitrógeno libre; además, el acoplamiento dentro de una misma bacteria de los genes *cut* y *nif* permitirá la conversión de los desechos celulósicos, en alimentos, energía y productos químicos. Por su parte los genes *den* son importantes en la fertilidad del suelo, donde anulan la actividad de los genes de la fijación del nitrógeno, con el resultado de que se necesitan mayores niveles de fertilizantes nitrogenados para compensar las pérdidas.

Al margen de todo o anterior hay que considerar que en este tipo de investigaciones existe siempre una serie de signos negativos, ya que cabe la posibilidad de que se llegue a desequilibrar el funcionamiento del ciclo biogeoquímico del nitrógeno. En realidad puede decirse que antes de la fabricación a gran escala de fertilizantes químicos y del extensivo cultivo de plantas que forman simbiosis con microorganismos fijadores, la cantidad de nitrógeno extraído de la atmósfera por procesos naturales de fijación estaba prácticamente compensada por la cantidad devuelta a la misma por desnitrificación y volatilización del amoníaco. En la actualidad, sin embargo, existe un desequilibrio a favor de la fijación, cuya cuantía puede ya superar en un 10 por ciento a la cantidad de nitrógeno devuelta a la atmósfera.

La acumulación de nitrógeno fijado, es decir, la eutrofización de ambientes acuáticos y terrestres, es un peligro que debe ser neutralizado mediante una investigación dirigida a proveer mecanismos de desnitrificación y prácticas de fertilización efectivas, de modo que el ciclo del nitrógeno se mantenga en un equilibrio razonable.

El nitrógeno atmosférico se encuentra a nuestra disposición, pero hemos de saber cómo y en qué medida debemos utilizarlo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Rodríguez Barrueco, C; Sevillano García, F; Subramaniam, P. *La fijación del nitrógeno atmosférico.*
- Mejías Guijo, M; Palomares Díaz, AJ; Ruíz Berraquero, F. *Aportaciones a la biología de la fijación del nitrógeno. Publicaciones de la universidad de Sevilla.*
- [www.utexas.edu/world/lecture/mic/](http://www.utexas.edu/world/lecture/mic/)
- [www.grain.org](http://www.grain.org)
- [www.amcchemical.com](http://www.amcchemical.com)
- [www.gaiker.es](http://www.gaiker.es)