

GERARDO LOPEZ JURADO \*

## INTRODUCCION

La fijación biológica del nitrógeno (N), el proceso por el cual ciertos organismos libres o bacterias simbióticas y algas verde-azuladas convierten el  $N_2$  atmosférico a una forma que las plantas pueden usar, es un proceso que es fundamental para la agricultura mundial (14,16). Una característica importante de la fijación simbiótica del N es que la energía para la conversión de  $N_2$  atmosférico a amonio viene de la luz del sol.

Las leguminosas utilizan los productos de la fotosíntesis para suplir a los nódulos de las plantas con energía para la fijación biológica del N. Una de las ventajas mayores de la fijación biológica del N sobre la fertilización nitrogenada es que la primera es máxima durante el desarrollo de las vainas y las semillas, período en el cual la aprovechabilidad de N del suelo y la absorción por las raíces de la planta está declinando (14).

Desde el punto de vista agrícola, los más importantes fijadores de N son las bacterias las cuales fijan el N simbióticamente en asociación con las plantas. Los principales fijadores de N más útiles en la agricultura mundial son las leguminosas por ejemplo la alfalfa, el trébol, la soya y el frijón todas las cuales crecen asociadas con bacterias del género Rhizobium.

La fijación simbiótica de N suministra este elemento directamente a la planta, e indirectamente a través de la descomposición de materiales nitrogenados formados co-

\* Profesor Asociado. Facultad de Agronomía, Universidad de Nariño. Pasto, Colombia.

mo resultado de la fijación simbiótica de N. Esta fijación es incrementada en las leguminosas cuando cepas efectivas y altamente competitivas de Rhizobium nodulan con éxito las plantas. La inoculación de semillas de leguminosas puede ser benéfica en suelos en los cuales las bacterias específicas están ausentes, o muy diseminadas, o donde las poblaciones nativas son inefectivas o submáximas en su capacidad de fijación de N (19).

## Experimentos iniciales

Boussingault en 1837 mostró la esenciabilidad de N, fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), y azufre (S), y concluyó que el nitrato ( $NO_3^-$ ) era la mayor fuente de N para las plantas. De los experimentos de campo él observó, en 1838, que las leguminosas fijaban N atmosférico ( $N_2$ ); cuando las leguminosas fueron sembradas en suelos esterilizados el crecimiento y la fijación del N disminuyó.

Lachman, en 1858, observó nódulos en las raíces de las leguminosas y pensó que los nódulos estaban asociados con la fijación de N. Sin embargo él no ofreció una prueba definitiva sobre este proceso. La capacidad de las plantas leguminosas para fijar  $N_2$  atmosférico no fue totalmente apreciada, sino hasta cuando se publicaron los resultados de sus experimentos clásicos en 1888.

Las principales conclusiones de los experimentos de Lachman fueron las siguientes: a) los nódulos en las arvejas eran formados como resultado de la infección de las raíces de las plantas por el Rhizobium; b) los nódulos eran necesarios para la fijación del  $N_2$  atmosférico; c) los suelos no esterilizados podían contener Rhizobium efectivo, pero la esterilización del suelo mata a los rizobios y por lo tanto provenía la nodulación (8,12).

Winogradsky, en 1890, estableció que ciertos organismos libres de vida anaeróbica como Clostridium pasteurianum fijaban  $N_2$ .

Beijerinck, 1888-1891, aisló Rhizobium y demostró además, que el organismo de vida aeróbica Azobacter Chocoma

ococum también tenía la capacidad de fijar  $N_2$ .

En 1892, Schlosing y Laurent demostraron que el  $N_2$  fijado por las leguminosas, medido por el contenido de N de los tejidos, era igual a la pérdida del  $N_2$  alrededor de las plantas (8,12).

#### Simbiosis entre Rhizobium y leguminosas

Las leguminosas son únicas entre las plantas de cultivo en su habilidad para satisfacer sus grandes demandas por N a través de la absorción y asimilación del N inorgánico de la solución del suelo (y obtener N del fertilizante nitrogenado aplicado al suelo), o de la atmósfera a través de la fijación simbiótica del  $N_2$  (14,20).

Es conocido, desde más de 85 años, que las bacterias del género Rhizobium infectan las raíces de las leguminosas y forman unas estructuras llamadas nódulos. Por definición, ambos, la bacteria y la raíz de la leguminosa se benefician de esta relación simbiótica. La bacteria obtiene energía y un ambiente protegido en la raíz de la leguminosa, mientras que la bacteria convierte el  $N_2$  gaseoso de la atmósfera a formas inorgánicas de N que son aprovechables para las plantas. Bajo la mayoría de las circunstancias, ni la planta, ni la bacteria fijan  $N_2$  individualmente. El amonio ( $NH_3$ ) producido por la bacteria es usado entonces para hacer amino ácidos, los cuales son la base para la síntesis de las proteínas (0,5,13,15).

Las bacterias del género Rhizobium están presentes generalmente en el suelo. Sin embargo, usualmente se recomienda la inoculación para asegurar la nodulación y para proveer grandes números de bacterias de una cepa específica con una alta efectividad para fijar  $N_2$  (5). La infección de la raíz de la planta y la producción de un nódulo no garantiza una vigorosa fijación de  $N_2$ . Para obtener una simbiosis efectiva es necesario un balance perfecto entre la planta y la bacteria y esto no se refleja en la variación de cepas y la especificidad de la planta hospedera (7).

En algunos casos las plantas pueden estar noduladas, pero la relación entre la planta y la bacteria pueden

mostrar una pobre fijación de  $N_2$  atmosférico; en otros casos pueden mostrar buena fijación de  $N_2$ . Estas diferencias en efectividad no son muy claramente entendidas (7) pero se sabe que son influenciadas por condiciones ambientales (17,19).

La simbiosis entre las bacterias y las raíces de las plantas es muy específica y ha sido objeto de gran investigación; la planta produce unas sustancias que atraen las bacterias las cuales responden con un movimiento hacia las raíces; las bacterias entonces producen unas sustancias similares a la auxina, las cuales inician el encurvamiento de los pelos radicales; el mucílago que se produce en la parte superior de crecimiento de la raíz provee un sitio favorable para la unión de las bacterias a la raíz; (1,2,5,9,16,17,19).

Las bacterias del género Rhizobium muestran un grado de especificidad con respecto a las raíces de la planta hospedera; Rhizobium japonicum de los nódulos de la soya (Glicine max (L) Merrill), por ejemplo, no colonizan las raíces de la alfalfa (Medicago sativa L.)

La especificidad del hospedero ha dado las bases de una clasificación conocida como los grupos de inoculación cruzada (14). Las bacterias del género Rhizobium han sido divididas en dos tipos, unas de crecimiento rápido (doblan la población cada 2 a 5 horas en un medio de cultivo convencional a 30°C), y los tipos de crecimiento lento (se doblan cada 12 a 24 horas). Rhizobium meliloti; la especie de Rhizobium que bajo condiciones apropiadas infecta las raíces de alfalfa y es responsable de la iniciación de los nódulos radicales, es un tipo de crecimiento rápido (16).

#### Infección y desarrollo del nódulo

Con prioridad a la infección de un pelo radical la bacteria debe estar presente en la rizosfera (1,17). La bacteria entra en la leguminosa, en muchos casos, a través de los pelos radicales o durante la emergencia de las raíces laterales, y crece dentro de partes modificadas de las raíces llamadas nódulos (19). La infección puede ocurrir tan temprano como de 4 a 12 días después de la germinación de las semillas. La infección original rápi

damente se desarrolla en nódulos visibles de 3 a 5 semanas después de la emergencia de las plantas, dependiendo de la especie de planta y de la intensidad de su crecimiento.

La bacteria que se está multiplicando forma células a normales de Rhizobium llamadas bacteroides; el material nuclear de la bacteria se degenera (durante algún tiempo se sostuvo que la degeneración era para eliminar la capacidad de los bacteroides para una multiplicación independiente). La célula del bacteroide contiene nitrógeno activo, que es el sistema enzimático responsable de la fijación biológica del nitrógeno (10). Los bacteroides dentro del nódulo llevan a cabo la fijación del  $N_2$  atmosférico (1).

Todos los organismos que fijan  $N_2$  contienen nitrógenoasa la cual no varía significativamente en estructura de una especie a otra (15). La nitrógenoasa consiste de dos componentes: uno que contiene molibdeno (Mo), hierro (Fe), y S y es designado como Mo-Fe proteína, componente I, ó proteína 1, y otra parte que contiene Fe y S, designado como Fe-Proteína, componente II, ó proteína 2 (3). Una característica especial de todos los sistemas de nitrógenoasa es que ambos componentes son desnaturalizados por contacto con oxígeno libre ( $O_2$ ).

El oxígeno es atrapado por una proteína que se une al oxígeno, llamada leghemoglobina, antes de que pueda alcanzar el bacteroide. La leghemoglobina es sintetizada por el tejido vegetal en los nódulos radicales. Como resultado el Rhizobium puede usar un metabolismo eficiente aeróbico, protegiendo la nitrógenoasa del efecto nocivo del oxígeno (5).

Vicent (19) ha resumido los pasos en el establecimiento de la simbiosis en la siguiente forma: 1) Colonización de la rizosfera por la bacteria; 2) entrada de la bacteria por los pelos radicales dando como resultado la formación de los hilos de infección; 3) comienzo de un sistema nodular persistente; 4) liberación de la bacteria del hilo de infección; 5) multiplicación de la bacteria dentro de la membrana que rodea el nódulo; 6) transformación de las bacterias en bacteroides;

7) deposición de la leghemoglobina sintetizada por el hospedero; 8) establecimiento y continuación de un metabolismo compartido entre la planta y la bacteria.

Esta asociación íntima entre el Rhizobium y la planta requiere que todos los aspectos de la relación sean mutuamente aceptables para una efectiva fijación de  $N_2$ . La diferenciación de la bacteria en bacteroide y la producción de la leghemoglobina está acompañada por la iniciación de la capacidad para fijar  $N_2$  (3).

Los nódulos formados en las raíces de las leguminosas por bacterias efectivas son más grandes, y los interiores tienen un color rojo o rosado, cuando se los compara con los nódulos no efectivos, los cuales son más pequeños y más pálidos. El color rojo o rosado es debido a la leghemoglobina, una proteína roja (4). Es necesario el desarrollo de nódulos altamente efectivos por cepas efectivas de Rhizobium; de otra manera, las raíces pueden ser noduladas por cepas infectivas de Rhizobium (11). La leghemoglobina está presente en muy altas concentraciones (150 a 300  $\mu M$ ) en los nódulos efectivos (16), y se ha demostrado que facilita la difusión del  $O_2$  en medio acuoso (6).

#### LITERATURA CITADA

1. ATLAS, R. M., and R. Barta. Microbial ecology; fundamentals and applications. Addison-Wesley Publishing Co., London, (England). 560 p. 1981.
2. BA, A., S.S. SHANTHARAN, and S. RATNAM. 1978. Ultrastructure of Rhizobium japonicum in relation to its attachment to the root hairs. J. Bacteriol. (United States), 133:1393-1400. 1978.
3. BEEVERS, L. Nitrogen metabolism in plants. p. 15-29. In H. Bothe y A. Trebst (eds.) Biology of inorganic nitrogen and sulfur. Springer-Verlag, New York. (98)
4. BERGERSEN, F. J., G. L. TURNER, and C. A. Appleby. Studies on the physiological role of leghemoglobin.



- bin in soybean root nodules. Biochemmistry Bio - physics. Acta 292:271-282. 1973. (United States).
5. BRILL, W. J. Biological nitrogen fixation. Scientific American (United States) 236:68-81. 1977.
  6. BURNS, R. C., and R. W. F. HARDY. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Spring Verlag, New York (United States) 189 p. Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics 21. 1975.
- BURRIS, R. H. Methodology. p. 9-33. In A. Quispel (ed.) The Biology of nitrogen fixation. North Holland Publish Co., Amsterdam Frontiers ob biology. Vol. 33. 1974.
8. BURRIS, R. H. Nitrogen fixation. p. 887-908. In J. Bonner and J. E. Varner (eds.) Plant biochemistry. Academic Press, New york (United States) 1976.
  9. DAZZO, F. B., W. E. VANKE. and W. J. Trifoliin: a Rhizobium recongnition protein from white clo - ver. Biochemistry. Biophysics. Acta 539:276-286. 1978. (United States).
  10. EADq. R. R., and J. R. POSTGATE. Nitrogenase. Nature (England). 249:805-810. 1974.
  11. EMERICH, D. W., and H. J. EVANS. Biological nitro - gen fixation with an emphasis on the legumes. p. 117-145. In Biochemical and photosynthetic as - pects of energy production. Academic Press. New york (United States). 1980.
  12. EVANS, H. J. (ed.) How legumes fix nitrogen. p. 110-127. In How crops grow - a century later. Bulletin 708. The Connecticut Agric. Exp. Snt., New Haven (United States). 1975.
  13. HARD , R. W. F., L. R. FREDERICK, J. E. JARPER, C. SLOGER, and D. F. WEBER. Increasing input of biologically fixed nitrogen into legumes. In H. J. Evans (ed.) Enhancing biological nitrogen

- fixation. (United States). 52 p. 1975.
14. POSTGATE, J. R. The fundamentals of nitrogen fixa - tion. Cambridge University Press, Cambridge. (England). 252 p. 1982.
  15. SPRENT, J. I. The biology of nitrogen-fixing orga - nisms. McGraw Hill, London. (England). 196 p. 1979.
  16. VICENT, J. M. Root-nodule symbiosis with Rizobium p. 265-341. In A. Quispel (ed.) The biology of nitrogen fixation. North Holland Publish Co., Amsterdam, (Holland). Frontiers of biology. Vol. 33. 1974.
  17. VICENT J. M. Nitrogen fixation in legumens. Acade - mic Press, Sidney. 288 p. 1982.
  18. W,CH, R. D., and W RAINS. Simultaneous measurement of nitrogen fixation estimated by acetylene-ethy - lene assay and nitrate absorption by soybeans. Planta Physiology. (United States) 62:443 - 448. 1978.