

Fijación biológica de nitrógeno: factores limitantes

Mercedes Fernández-Pascual,
Nuria de María y María Rosario de Felipe

Resumen

La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) representa una alternativa a la fertilización nitrogenada ya que puede paliar muchos de los efectos negativos que dicha fertilización produce tanto a nivel medioambiental, como a nivel sanitario. La FBN está relegada a organismos procariontes que son capaces de reducir el nitrógeno molecular a amoníaco tanto en vida libre como en simbiosis. La mayor parte del nitrógeno fijado en los ecosistemas terrestres se realiza mediante la asociación simbiótica de bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* y *Mesorhizobium* (*Rhizobium* para generalizar) con plantas leguminosas. Gran parte de estas asociaciones simbióticas tiene interés para la Agricultura. Sin embargo, aunque los rendimientos de la FBN se han incrementado considerablemente en los últimos años, al trasladar estos conocimientos a la Agricultura práctica, se detectan limitaciones a la fijación biológica en la simbiosis a nivel medioambiental, biológico, metodológico y a nivel de producción. En este trabajo se analiza el efecto de alguno de estos factores sobre la fijación de nitrógeno y la producción final de grano, desde el punto de vista fisiológico, bioquímico y estructural en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

Palabras clave: *Rhizobium*, Simbiosis, Fijación de nitrógeno, Factores limitantes, nitrato, salinidad, herbicidas.

Introducción

El nitrógeno, después del agua, es el principal factor limitante para el desarrollo de las plantas. Precisamente por esta razón en el periodo entre 1950 y 1990 se incrementó 10 veces el uso de fertilizantes nitrogenados lo cual llevó a un aumento sin precedentes de la productividad en los cereales. Sin embargo, la aplicación de estos fertilizantes y otras acciones industriales y antrópicas han alterado las condiciones básicas del ciclo natural del nitrógeno y han contribuido a la contaminación por nitratos de los ecosistemas

terrestres y acuáticos con grave riesgo para la salud humana. Los efectos sobre la salud han sido puestos de manifiesto en diversos estudios epidemiológicos y clínicos. Estos estudios han demostrado que la ingestión de nitratos con el agua de bebida o en alimentos conduce a la aparición de metahemoglobinemia e incluso se han relacionado con la aparición de cáncer. El nitrato se transforma en el organismo en nitrito que oxida el Fe^{2+} ferroso de la hemoglobina a Fe^{3+} férrico que es incapaz de fijar el oxígeno y transportarlo a los tejidos; es lo que se llama enfermedad azul de los lactantes. Otro producto secundario de los nitratos son las nitrosaminas, cuyo carácter cancerígeno fue demostrado por Mirvish en 1981.

La fijación Biológica de nitrógeno representa una alternativa a la fertilización nitrogenada ya que puede paliar muchos de los efectos negativos tanto a nivel medioambiental como sanitario (Newton 2000).

El nitrógeno es el elemento más abundante de la atmósfera terrestre y sin embargo es una fuente nutritiva muy escasa. Esta paradoja se debe a que el nitrógeno atmosférico es inerte y no puede ser aprovechado por la mayoría de los seres vivos. El nitrógeno únicamente se incorpora a los sistemas biológicos cuando ha sido fijado o combinado con ciertos elementos como el hidrógeno o el oxígeno, es decir, en forma de nitrato o de amonio.

Dentro de la fijación de nitrógeno global, la FBN aporta la mayor parte del nitrógeno fijado a los ecosistemas terrestres. La FN global se estima en unos 275 millones de toneladas de nitrógeno al año. De esta cantidad 30 millones de toneladas se fijan por causas naturales como descargas eléctricas, erupciones volcánicas, etc. 70 millones de toneladas se fijan mediante fijación industrial, es el proceso de Haber-Bosch en el cual se gasta gran cantidad de energía procedente del petróleo y 175 millones de toneladas se fijan mediante fijación biológica. De estos 175 millones, 35 millones se fijan mediante fijación en vida libre y 140 millones de toneladas se fijan mediante fijación simbiótica (Sevillano y Rodríguez-Barrueco 1987). De estos 140 millones de toneladas, 105 millones son fijados por especies de interés para la agricultura, como las que figuran en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores medios de fijación de nitrógeno de algunas leguminosas

Leguminosa	Nitrógeno fijado kg/ha/año	Especie de <i>Rhizobium</i>
Alfalfa	200-250	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
Altramuz	150	<i>Bradyrhizobium</i> sp (<i>Lupinus</i>)
Trébol rojo	100-150	<i>R. Leguminosarum</i> bv. trifoli
Meliloto	100-125	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
Veza	100-120	<i>R. Leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>
Guisante	100	<i>R. Leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>
Lenteja	100	<i>R. Leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>
Soja	80-90	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
Garbanzo	60-80	<i>R. Leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>
Judía	50	<i>R. Leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>

El proceso de fijación está relegado a organismos procariontes, que son capaces de reducir el nitrógeno molecular a amonio tanto en vida libre como en simbiosis con organismos superiores. A continuación se presenta un resumen de los principales grupos de microorganismos fijadores (Martínez-Molina y Velázquez 1991).

Bacterias fijadoras en vida libre

Bacterias anaerobias

- Quimiótrofas: *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Methanosarcina*
- Fotótrofas: *Chromatium*, *Thiopedia*, *Ectothiorhodospira*

Bacterias anaerobias facultativas.

- Quimiótrofas: *Klebsiella*, *Citrobacter enterobacter*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Propionibacterium*.
- Fotótrofas: *Rhodospirillum* y *Rhodopseudomonas*

Bacterias aerobias o microaerófilas

- Quimiótrofas: *Azospirillum*, *Aquaspirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Thiobacillus*, *Corynebacterium*.
- Fotótrofas: *Gloeocapsa*, *Anabaena*, *Calothrix*, *Nostoc*, *Spirulina*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*.

Bacterias que forman asociaciones fijadoras

Rizocenosis

- *Azospirillum* y *Azotobacter* con raíces de gramíneas. *Beijerinckia* con raíces de caña de azúcar
- *Bacillus* con raíces de gramíneas

Simbiosis asociativas

- *Anabaena* con hojas de *Azolla anabaenae*.
- *Nostoc* con raíces de musgos y hepáticas

- *Calotrix* con hongos (líquenes)

Rizoendosimbiosis

- *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Sinorhizobium* en raíces de leguminosas
- *Azorhizobium* en raíces y tallos de *Sesbania rostrata*
- *Frankia* con raíces de Angiospermas no leguminosas

Fisiología de la fijación de nitrógeno

Aunque existen grandes diferencias en la morfología y fisiología de todos los organismos fijadores de nitrógeno, el proceso de fijación y el sistema enzimático que lo lleva a cabo es similar en todos los organismos. Este sistema se denomina nitrogenasa y la reacción que se produce es la siguiente:



El proceso de fijación lleva asociada una reducción de H^+ a H_2 en todos los sistemas donde se ha probado, sin embargo, muchos de estos sistemas tienen acoplado un sistema de reciclar el hidrógeno mediante la presencia del enzima hidrogenasa.

La reacción de reducción del nitrógeno es un proceso endérgico que requiere un mínimo de energía de 960 kJ por mol de nitrógeno, por lo que debe acoplarse a un sistema que produzca ATP de una manera eficiente. El ATP necesario se produce mediante el proceso de fosforilación oxidativa acoplado a la cadena transportadora de electrones que utiliza el oxígeno como aceptor final de los mismos.

Estructura de la nitrogenasa

La nitrogenasa se separa en dos componentes, el componente I. Mo-Fe proteína y el

componente II. Fe-proteína. El componente I es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ de aproximadamente 220 kDa. Tiene 24 átomos de hierro y 2 átomos de molibdeno. El componente II es un dímero con dos subunidades idénticas de 32 kDa cada una. La secuencia de aminoácidos de esta proteína está altamente conservada entre las de diversas especies de procariontes fijadores.

Los electrones procedentes de los glúcidos son donados primero al componente II y luego al componente I en donde ocurre la verdadera reducción de nitrógeno. Para que la transferencia tenga lugar es necesario que la Fe-proteína se una a un MgATP en dos lugares de enlace. Esto produce una alteración de la conformación de la proteína, una disminución de su potencial redox y un aumento de la sensibilidad al oxígeno. La transferencia de electrones es concomitante con la hidrólisis de Mg-ATP. La Fe-Proteína es extremadamente sensible al oxígeno de manera que el exceso de este gas produce un cambio conformacional en el sistema que le incapacita para aceptar electrones.

Además de estos dos componentes fundamentales de la nitrogenasa existen los denominados centros P y el cofactor Fe molibdeno: FeMoco. Los centros P son centros redox involucrados en la acumulación intramolecular de electrones hacia el lugar de reducción del sustrato. El FeMoco es un pequeño centro metálico aniónico que no contiene aminoácidos, pero sí homocitrato.

Asimilación del nitrógeno fijado

La asimilación del nitrógeno fijado varía dependiendo del organismo fijador

En los apartados siguientes se distingue entre microorganismos fijadores en vida libre y en simbiosis. En cada apartado se hará mención a la asimilación de los productos de la fijación.

Fijación de nitrógeno en vida libre

Entre los microorganismos fijadores de nitrógeno en vida libre existen anaerobios estrictos, anaerobios facultativos y aerobios. Dentro de cada uno de estos grupos existen géneros capaces de tomar la energía de sustancias químicas (Quimiotrofos) o de tomarla de la luz (Fototrofos).

Estrategias de protección contra el oxígeno

Como se ha dicho anteriormente, uno de los principales factores limitantes de la fijación de nitrógeno es el oxígeno. La pérdida de actividad de la nitrogenasa en presencia de oxígeno y los altos requerimientos de ATP por parte de este enzima han llevado a los organismos fijadores a desarrollar una serie de estrategias para protegerse de este gas y tener los niveles mínimos requeridos para la fosforilación oxidativa. Entre estas estrategias cabe destacar: Microaerofilia, protección respiratoria, protección conformacional, inhibición reversible,

síntesis de la nitrogenasa, separación espacial de la nitrogenasa y barreras de difusión (Lluch y Ligeró, 1992).

Asimilación de amonio en vida libre

Aunque el primer producto de la nitrogenasa es el NH_3 este es rápidamente protonado para formar NH_4^+ . Este amonio se une al ácido glutámico para dar glutamato en presencia de ATP y la Glutamina sintetasa (GS). El ácido glutámico puede volver a glutamina en presencia de otra enzima denominada glutamina-2-oxoglutarato-amino-transferasa (GOGAT). El coste de la ruta GS/GOGAT es un ATP por Glutamato formado, produciéndose una rápida asimilación de amonio evitando la acumulación de este compuesto que en concentraciones altas inhibiría la síntesis de la nitrogenasa. La relación exacta entre GS/GOGAT puede variar con las especies libres o en simbiosis. Parte de la glutamina formada es un producto neto de la fijación, que puede pasar a distintos aminoácidos por transaminaciones y otra parte se utiliza para mantener el suplemento de sustrato para nuevas incorporaciones de amonio.

Fijación de nitrógeno en simbiosis

Como se ha dicho anteriormente, existen 3 formas de asociaciones fijadoras: Rizocenosis, Simbiosis asociativas y Rizoendosimbiosis.

La rizocenosis consisten en la interacción entre microorganismos del suelo con los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Beijerinckia*, los cuales colonizan el suelo rizosférico y las raíces de las plantas en respuesta a una indudable ventaja ecológica establecida por la alta relación C/N que en estos hábitats se establece. La mayoría de los trabajos de investigación en bacterias diazotrofas, asociadas a raíces de plantas de interés agrícola se han concentrado en dos géneros bacterianos: *Azotobacter* y *Azospirillum*, que, aunque similares en algunos aspectos morfológicos se encuentran claramente diferenciados desde el punto de vista filogenético. Estos diazotrofos son quizás los que se aíslan e identifican de una forma más constante con cereales.

Los tres géneros que forman las simbiosis asociativas, *Anabaena*, *Nostoc* y *Calothrix*, son organismos fototrofos, con una distribución de hábitats muy amplia y que pueden formar heterocistos donde se localiza la nitrogenasa.

Simbiosis *Rhizobium* Leguminosa

Como se indicaba al principio del tema este tipo de asociación es la que proporciona mayor cantidad de nitrógeno en los ecosistemas terrestres, teniendo además un gran impacto a nivel agronómico y ecológico. En esta asociación la reducción del nitrógeno se lleva a cabo en unas estructuras morfológicamente definidas denominadas nódulos que se forman por la asociación de microorganismos de los géneros *Rhizobium*,

Bradyrhizobium, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* y *Mesorhizobium* en raíces de leguminosas.

La asociación entre el microsimbionte, la especie de *Rhizobium*, y la leguminosa es específica y sólo se establece cuando en el suelo existe el rizobio o rizobios característicos de la planta.

En general el rizobio infecta a la leguminosa a través de un pelo radicular. El proceso se lleva a cabo en una serie de etapas que se inician con el reconocimiento, sigue con la infección, el desarrollo del nódulo y la fijación de nitrógeno propiamente dicha (Fernández-Pascual, 1984). A nivel molecular el reconocimiento se establece mediante un dialogo molecular entre la planta que exuda flavonoides e isoflavonoides que son capaces de inducir los genes de nodulación del rizobio. Los productos de los genes nod son los denominados factores nod los cuales son capaces de inducir la curvatura del pelo radicular (primer signo de infección de un rizobio a la raíz de la leguminosa) y la división de las células radiculares subepidérmicas que darán lugar al meristemo primario del nódulo, el cual induce la diferenciación del pelo radicular que se encuentra por encima y que llegará a ser el sitio de infección. Además el meristemo primario induce la formación del meristemo secundario. Mientras tanto el rizobio se une específicamente al pelo radicular, se forma el canal de infección desde el punto donde se ha iniciado la infección hacia la base del pelo radicular. En el foco de infección los rizobios son liberados endocíticamente a partir del canal de infección. Alcanzado este punto se producen una serie de modificaciones vasculares y la variedad de tipos celulares necesarios para el funcionamiento del nódulo. Las bacterias se transforman en bacteroides los cuales son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico.

Las etapas descritas anteriormente corresponden a fenotipos determinados por genes de las bacterias y de la planta que interactúan durante el proceso de infección.

La variedad de tipos celulares dan lugar a dos zonas bien diferenciadas en los nódulos: la corteza o parénquima nodular y la zona infectada donde se encuentran los bacteroides, que son los encargados de fijar el nitrógeno molecular. La corteza está formado por células de estructura semejante a las células radiculares. Se distinguen diferentes tipos de células y diferente ordenación dependiendo del nódulo de que se trate. Además, en esta zona del nódulo, se encuentran los haces conductores por donde se va a realizar el intercambio de productos entre los dos simbioses, es decir, los esqueletos carbonados y las fuentes de poder reductor por parte de la planta y el nitrógeno fijado por parte de los bacteroides. En la zona infectada se encuentran las células vegetales repletas de bacteroides los cuales están rodeados de una membrana de origen vegetal denominada membrana peribacteroidal. El conjunto de membrana peribacteroidal y bacteroides recibe el nombre de simbiosoma. El número de bacteroides

dentro de un simbiosoma varía dependiendo de la procedencia del nódulo. Entre los simbiosomas se encuentra la proteína mayoritaria del nódulo que es la leghemoglobina y que como veremos más adelante está encargada del transporte y regulación de la concentración de oxígeno en las cercanías de los bacteroides (Vivo y col. 1989).

El poder reductor y los electrones necesarios para la reducción de N_2 a NH_3 procede de los fotosintatos producidos por la fotosíntesis. Los fotosintatos son unos de los principales factores limitantes de la fijación de nitrógeno. Los esqueletos carbonados procedentes del ciclo de Krebs ceden electrones a la ferredoxina y flavodoxina que a su vez los ceden a la nitrogenasa.

Asimilación en simbiosis

La primera reacción dentro de los nódulos radiculares es igual que la utilizada por fijadores libres, pero después estos productos se tienen que exportar a través del xilema impulsados por la corriente transpiratoria de la planta, a la parte aérea (hojas) donde serán utilizados como donadores de nitrógeno reducido para la síntesis de aminoácidos, proteínas y otros compuestos necesarios para el crecimiento de la planta. Según el tipo de compuesto que se exporte por el xilema las plantas simbióticas se clasifican en dos grandes grupos: los que exportan amidas, asparragina, glutamina o 4-metilglutamina y los exportadores de ureidos, que transportan alantoina y ácido alantoico o citrulina. Las leguminosas pertenecientes a las tribus *Viciae*, *Genisteae* y *Trifoliae*, originarias de las zonas templadas, y que incluyen cultivos tan conocidos como el guisante, altramuza, habas y alfalfa son exportadores de amidas. Las leguminosa de origen tropical, como las pertenecientes a las tribus *Phaseoleae* y cuyos representantes más conocidos son *Phaseolus vulgaris* y *Glycine Max* son exportadores de ureidos.

Estrategias de protección contra el oxígeno en simbiosis.

Como ya se ha dicho anteriormente el oxígeno es imprescindible para aportar la energía necesaria para la fijación de nitrógeno y una elevada cantidad de oxígeno inhibe el componente II de la nitrogenasa. Para proteger a la nitrogenasa en los nódulos de leguminosas se han desarrollado 3 mecanismos: la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno (BRDO), la leghemoglobina y la respiración de los bacteroides de la cual ya hemos hablado para los fijadores en vida libre.

La BRDO es variable y es capaz de modificar su espesor dependiendo de las condiciones ambientales. Está situada en la corteza interna y formada por una o varias capas de células cuyos espacios intercelulares están rellenos de agua y glicoproteínas (De Lorenzo y col. 1993). Esta barrera responde a situaciones de estrés como sequía, encharcamiento, oscuridad, presencia de nitrato o sales (Fernández-Pascual y col. 1996),

bajas temperaturas, etc. Ante tales situaciones de estrés se pone en marcha el funcionamiento de la barrera, incrementando la cantidad de glicoproteínas en los espacios intercelulares lo que trae consigo un incremento de la Resistencia a la difusión de oxígeno hacia los bacteroides y consecuentemente el descenso de la actividad nitrogenasa. Puesto que la desaparición del estrés lleva aparejada la recuperación del normal funcionamiento de la barrera, se considera que la capacidad de ajuste de la misma representa un mecanismo biológico de protección de la nitrogenasa.

Superada la BRDO, el transporte de oxígeno hasta los bacteroides, dentro de las células infectadas, se lleva a cabo mediante difusión facilitada. Esta función es resuelta por las leghemoglobinas (Lbs), proteína monoméricas que contienen un grupo hemo y que pueden captar una molécula de oxígeno. La concentración de estas hemoproteína en nódulos se aproxima a 3mM y su afinidad por el oxígeno es extremadamente alta.

Para que la leghemoglobina pueda actuar como transportador de oxígeno necesita mantener su estado de oxidación como ferroleghemoglobina (Lb^{2+}), habiéndose calculado que el 80 % de las Lbs del nódulo se encuentran como Lb^{2+} y sólo el 20% como $Lb^{2+} \cdot O_2$ (oxiferroleghemoglobina).

Comparación de la fijación de nitrógeno en sistemas libres y simbióticos

Aunque las nitrogenasa de ambos sistemas funcionan de forma parecida, existen algunas diferencias que merecen la pena ser destacadas. Las diferencias conciernen a.

- La fase de crecimiento de los microorganismos durante la cual tiene lugar la fijación de nitrógeno.
- La cantidad de nitrógeno fijado por gramo de material celular
- La eficiencia de la fijación de nitrógeno.
- El destino del nitrógeno fijado.

Factores limitantes de la fijación de nitrógeno

Los rendimientos potenciales de la FBN en la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa, se han incrementado en un 34 % con los conocimientos que disponemos en la actualidad. Sin embargo, se debe tender a alcanzar el 100 % mediante la manipulación genética y el manejo del ambiente (Lluch, 1998).

Como se ha dicho anteriormente, a nivel de funcionamiento de la nitrogenasa los principales factores limitantes son los fotosintatos procedentes de la fotosíntesis y el oxígeno, ya que ambos factores son imprescindibles para la obtención de energía por parte de la nitrogenasa.

Aunque hoy se conocen los genes simbióticos fix y nif que codifican la nitrogenasa, así como la regulación de estos genes y los avances

en los últimos años han sido notables, al trasladar estos conocimientos a la agricultura práctica se detectan las limitaciones de la fijación biológica en la simbiosis en a) medioambientes con acidez de suelo, deficiencia o toxicidad de P, Ca, Mo y Al, salinidad, falta o exceso de agua, xenobioticos, presencia de nitrógeno combinado, el clima, herbicidas, temperatura y humedad del suelo (especialmente en suelos tropicales Andrade et al., 2001), b) a nivel biológico, es lógico que estos factores influyan en la supervivencia, competitividad y establecimiento de la simbiosis, c) a nivel metodológico con la preparación de inoculantes con cepas seleccionada y competitivas, con la formulación, preparación y uso de los inóculos y d) a nivel de producción.

Dentro de los factores limitantes anteriormente citados en nuestro departamento hemos trabajado con nitrógeno combinado, salinidad y herbicidas. El estudio de estos factores se ha llevado a cabo de forma integral, teniendo en cuenta aspectos fisiológicos, bioquímicos y estructurales.

Nitrógeno combinado

El nitrato inhibe la nodulación y la fijación de nitrógeno. Aunque no está totalmente demostrado, parece que la inhibición de la nodulación se debe a que el nitrato se une a algún receptor específico del *Rhizobium* sobre la raíz de la leguminosa impidiendo la nodulación.

Los mecanismos de inhibición de la actividad nitrogenasa por nitrato han sido estudiados en nuestro Departamento con plantas de *Lupinus*. La aplicación de nitrato 20 mM provoca una disminución de la actividad nitrogenasa y de la respiración del sistema radicular, así como un incremento de la resistencia a la difusión de oxígeno. Además, la aplicación de nitrato produce alteraciones en la morfología de la corteza nodular, la más evidente de las cuales es la oclusión de los espacios de la corteza media por una sustancia de naturaleza glicosídica, posteriormente identificada como una glicoproteína (de Lorenzo et al., 1993). Estos datos permitieron llevar a cabo la visualización de la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno (de Lorenzo et al., 1993 y Iannetta et al 1993), que hasta entonces había sido puesta de manifiesto por métodos fisiológicos y matemáticos.

El aumento de la concentración de glicoproteína está relacionado con el incremento de la resistencia a la difusión de oxígeno, por lo que el mecanismo de inhibición de la actividad nitrogenasa está relacionado con la falta de oxígeno de los bacteroides para mantener simultáneamente las actividades respiratoria y nitrogenasa.

El mecanismo de operación de la barrera lleva consigo la disminución del tamaño de los espacios intercelulares mediante la expansión de las células que forman la corteza media y la oclusión de los espacios intercelulares con la glicoproteína

umentando el tamaño de la barrera donde en el caso de los nódulos sometidos a situaciones de estrés la limitación de oxígeno es también para los haces vasculares.

Salinidad

En nuestro departamento y en colaboración con el Institute of Grassland and Environmental Research se ha estudiado el efecto de diferentes concentraciones de NaCl sobre el crecimiento y la actividad fijadora de nitrógeno en plantas de *Lupinus albus*. La actividad nitrogenasa decrece, mientras que la resistencia a la difusión de oxígeno aumenta, a medida que aumenta la concentración de cloruro sódico de 0 a 150mM. (Fernández-Pascual et al., 1996). Sin embargo, esta disminución es menor que en otras leguminosas. Los parámetros de crecimiento, fotosíntesis y la respiración de la parte aérea no se afectaron con concentraciones de 150 mM de NaCl aplicadas durante 6 días. Estos datos indicaban que las plantas de *Lupinus* eran más resistentes al estrés salino que otras leguminosas. El microanálisis de rayos X, junto con la microscopía electrónica de nos da la posible explicación de la resistencia al estrés salino: el bajo nivel de sodio que entra en la zona infectada y la sustitución de K por Na en la corteza.

Herbidas

En cuanto a los herbidas se han llevado a cabo experimentos de laboratorio y campo para determinar la influencia de herbidas comerciales sobre la fijación de nitrógeno, el aparato fotosintético, el metabolismo proteico y la producción en plantas de *Lupinus albus* (de Felipe et al., 1987). En los experimentos de campo se añadieron 3 kg por hectárea del producto comercial. Se midió la actividad nitrogenasa por el sistema de reducción de acetileno antes de la primera y segunda floración. La actividad nitrogenasa decrece con la aplicación de herbidas El descenso fue menor en los tratamientos con simazina y semillas inoculadas. El efecto de la simazina sobre el aparato fotosintético fue más tóxico que el del Lindex, reduciendo el tamaño del cloroplasto y afectando a la estructura del grana. No se observaron cambios ultraestructurales en las células nodulares tratadas con Lindex. Por el contrario la simazina altera las células nodulares causando formación de vesículas, degeneración de bacterias y descenso en el número de bacteroides fijadores. La producción final decrece con ambos herbidas, siendo menor el descenso con plantas inoculadas (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de malas hierbas y dos herbidas (Lindex y simacina) la producción final de grano (kg/ha) en plantas inoculadas y no inoculadas de *Lupinus albus*.

Tratamientos	No inoculadas	Inoculadas
Control sin malas hierbas	1252a	1180a
Control con malas hierbas	443b	433b
Lindex	807ab	687ab
Simacina	272b	481b

Los resultados sugieren que cada herbida tiene un efecto diferente sobre la producción final, el aparato fotosintético y la producción final de grano, no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos con Lindex y el control. El hecho de que los herbidas aplicados sobre cultivos de *Bradyrhizobium* no afectaran el crecimiento de este microorganismo, sugieren que los efectos adversos de estos herbidas se deben a interacciones de estos compuestos con el aparato fotosintético lo

cual, lleva a una pérdida del aporte de energía a la nitrogenasa, disminuyendo la actividad fijadora de nitrógeno y la producción.

A la vista de los resultados obtenidos en el campo con el herbida Lindex nos pareció conveniente investigar el efecto que los dos componentes del Lindex, la cianacina y el linuron, tenían sobre el desarrollo de las plantas, la ultraestructura del mesófilo y de los nódulos, el metabolismo proteico y la actividad nitrogenasa

(Fernández-Pascual et al., 1988). Tanto la cianacina como el linuron producen un descenso en el peso de raíces y parte aérea. Con respecto a la actividad nitrogenasa, y a la estructura del aparato fotosintético y del nódulo, la cianacina resulto más tóxica que el linuron. También con estos herbicidas se comprobó que los efectos adversos causados en la actividad nitrogenasa fueron debidos a la acción sobre el aparato fotosintético, ya que el herbicida no afectó al microsimbionte en cultivo *in vitro*. El metabolismo proteico también fue alterado. Cuando la concentración aplicada fue de 20 μM de cianacina y 80 μM de linuron apareció un nuevo polipeptido de 17 kDa, el cual no fue encontrado en las plantas control. Estos herbicidas también afectan al metabolismo del carbono, ya que la concentración de la subunidad grande de la Ribulosa1, 5-bifosfato carboxylasa disminuye a medida que aumenta la concentración de cianacina y linuron. (Fernández-Pascual et al., 1988).

En relación con la aparición de nuevas proteínas en plantas tratadas con herbicidas, recientemente en nuestro laboratorio, se ha detectado la aparición de dos nuevos polipeptidos de 45 y 21 kDa en el citoplasma de bacteroides procedentes de nódulos de plantas de *Lupinus* tratadas con glifosato (de María et al., 1999). Actualmente estamos procediendo a la caracterización de estos polipeptidos mediante secuenciación del N-terminal.

Los herbicidas además de producir modificaciones en la estructura del aparato fotosintético en las hojas y de la zona infectada en los nódulos, producen alteraciones en la estructura de la corteza, modificando las capas celulares relacionadas con la regulación de la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno (Fernández-Pascual et al., 1992).

También a nivel de campo se ha estudiado el efecto de ocho herbicidas pertenecientes a 5 grupos químicos diferentes, sobre la fijación de nitrógeno y la producción final de grano en plantas de *Lupinus albus* (Pozuelo et al., 1989). En este trabajo se observó un efecto beneficioso de tres herbicidas, cianazina, trifluralina y simazina (usando la mitad de dosis que en el trabajo de Felipe et al., 1987) sobre la actividad nitrogenasa y la producción final de grano, lo cual indica que la dosis de herbicida debe ser establecida para cada cultivo.

Con objeto de superar el efecto de los factores limitantes de la fijación se están llevando a cabo diferentes proyectos tanto a nivel del microsimbionte, como de la leguminosa y de las diferentes prácticas agrícolas en los cultivos.

Las líneas que mejoran la fijación de nitrógeno en cuanto al microsimbionte son a) conseguir disminuir la especificidad de *Rhizobium* (rizobios que infecten más de una especie vegetal, b) aumentar la nodulación (infectividad) y la efectividad. Aumentar la competitividad y d) aumentar la eficiencia de la nitrogenasa reciclando

el hidrógeno perdido mediante la adquisición del fenotipo *hup* y resistencia a los factores adversos. Esto implica la utilización de organismos manipulados genéticamente

En cuanto a las leguminosas se está tratando de potenciar la doble simbiosis que son capaces de formar estas plantas (micorrizas y *Rhizobium*) a través de la mejora genética clásica y el uso de plantas transgénicas que pueden incorporar genes de interés.

Las prácticas agrícolas que pueden conducir a la sostenibilidad del sistema cabe destacar, la rotación de cultivos, el control biológico de patógenos, la reducción de fitosanitarios sintéticos y la utilización de fertilizantes biológicos como los inóculos de *Rhizobium*.

Conclusiones

La fijación de nitrógeno representa una alternativa a la fertilización nitrogenada, sin embargo, existen una serie de factores limitantes entre los que se ha hecho especial hincapié en este trabajo en el nitrato, la salinidad en experimentos de laboratorio y la utilización de herbicidas en experimentos de campo, en plantas de *Lupinus albus*. Estos factores inhiben la actividad nitrogenasa y hemos estudiado los mecanismos por los que se produce la inhibición. En el caso del nitrato y la sal se produce un aumento de la resistencia a la difusión de oxígeno producido por la oclusión de los espacios intercelulares de la zona correspondiente a la barrera de resistencia a la difusión de oxígeno, lo cual hace que menos oxígeno quede disponible para los bacteroides. Merece la pena destacar que las plantas de *Lupinus* resultaron más resistentes que otras leguminosas a estos estreses. El efecto de los herbicidas sobre la actividad nitrogenasa depende del herbicida utilizado y de la dosis aplicada, habiendo encontrado herbicidas capaces de incrementar la fijación de nitrógeno y la producción final de grano. La inhibición de la actividad nitrogenasa por los herbicidas se debe a un efecto indirecto sobre el aparato fotosintético de la planta, que conlleva una pérdida del aporte de fotosintatos y energía para la nitrogenasa.

Referencias

- Andrade, D.S., A. Colozzi-Filho, E.L. Balota and M. Hungria. 2001 Long-term effects of agricultural practices on microbial community. Pp. 275-280. En: L. García-Torres, J. Benites y A. Martínez-Vilela. Conservation Agriculture, a worldwide challenge. Córdoba.
- De Felipe, M.R., M. Fernández-Pascual y J.M. Pozuelo. 1987 Effects of the herbicides Lindex and Simazine on chloroplast and nodule development, nodule activity and grain yield in *Lupinus albus* L. Plant and Soil. 101 99-105.
- De Lorenzo, C., P.P.M. Iannetta, M. Fernández-Pascual, E. K. James, M.M. Lucas, J.I. Sprent, J. F. Witty, F.R. Minchin and M.R. de Felipe. 1993. Oxygen diffusion in lupin nodules. II Mechanism of

- diffusion barrier operation. *Journal. Experimental Botany*. 44: 1468-1474.
- N. De María, C. Rubio, M.P. Golvano, M.R. de Felipe y M. Fernández-Pascual. 1999. Efecto del glifosato sobre la fijación de nitrógeno en plantas de *Lupinus albus*. Resúmenes XIII Reunión de la SEFV VI Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. p. 127
- Fernández-Pascual, M. 1984. Estudio de determinados factores responsables de la especificidad *Rhizobium-leguminosa*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Fernández-Pascual, M., M.R. de Felipe, M.T. Serra, and J.M. Pozuelo. 1988. Effects of canazine and Linuron on chloroplast development, nodule activity and protein metabolism in *Lupinus albus* L. *Journal of Plant Physiology*. 133: 288-294
- Fernández-Pascual, M., C. de Lorenzo, J.M. Pozuelo, and M.R. de Felipe. 1992. Alterations induced by four herbicides on lupin nodule cortex structure, protein metabolism and some senescence-related enzymes. *Journal of Plant Physiology*. 140:385-390.
- Fernández-Pascual M., C. de Lorenzo, M.R. de Felipe, S. Rajalakshmi, A.J. Gordon, B.J. Thomas B.J. and F.R. Minchin. 1996. Possible reasons for relative salt stress tolerance in nodules of white lupin cv. Multolupa. *Journal. Experimental Botany*. 47:1709-1716.
- Iannetta P.P.M., C. de Lorenzo, E.K. James, M. Fernández-Pascual, J.I. Sprent, M.M. Lucas, J.F. Witty, M.R. de Felipe and F.R. Minchin. 1993. Oxygen diffusion in lupin nodules. I. Visualization of diffusion barrier operation. *Journal. Experimental Botany*. 44: 1461-1467
- Lluch, C. 1998. Uso de bacterias fijadoras de nitrógeno en la Agricultura sostenible. Primeras Jornadas Científicas sobre el medio ambiente. Centro de Ciencias Medioambientales. Madrid.
- Lluch, C. y F. Ligeró. 1992. Bioquímica de la nitrogenasa. En: *Biología del Nitrógeno*. Eds. J.G. López y C. Lluch Pla. Pp 143-162. Editorial Rueda. Madrid.
- Martínez-Molina, E. y E. Velázquez. 1991 Organismos fijadores de nitrógeno atmosférico. En: *Biología del Nitrógeno*. Eds. J.G. López y C. Lluch Pla. Pp 55-70. Editorial Rueda. Madrid.
- Mirvish, S.S. 1981 Inhibition of the formation of carcinogenic N-nitroso compounds by ascorbic acid and other compounds. En: Burchenal, J.H., Oettgen, H.P (eds.) *Achievements, Challenges, Prospects for 1980d*. Grune and Stratton, New York., p. 557
- Newton WE. 2000. Nitrogen fixation in perspective. In: Pedrosa, FO, ed. *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 3-8.
- Pozuelo J.M., M. Fernández-Pascual, M.M. Lucas and M.R. de Felipe. 1989. Effect of eight herbicides from five different chemical groups on nitrogen fixation and grain yield in *Lupinus albus* L. grown in semi-arid zones. *Weed Research*. 29: 419-425.
- Vivo A., J.M. Andreu, S. de la Viña. and M.R. de Felipe. 1989. Leghemoglobin in lupin plants (*Lupinus albus* cv Multolupa). *Plant Physiol*. 90: 452-457
- Sevillano, F y C. Rodríguez-Barrueco. 1987. Sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno de interés aplicado en Agricultura. En: *Avances en la biología de la Fijación de nitrógeno atmosférico*. Eds. M. Megías y F. Ruíz. Pp 9-29. Publicaciones de la Universidad de Sevilla.