

93  
2 eje.



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**LA FIJACION DEL NITROGENO Y SU RELACION  
CON ALGUNOS MICROORGANISMOS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A :  
**ARNULFO PLAZA ALMANZA**

ASESOR:

M. EN C. BERTHA RODRIGUEZ SAMANO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1994

**TESIS CON  
FALLA DE GRIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA ACADÉMICA  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"La fijación del nitrógeno y su relación con algunos  
microorganismos "

que presenta el pasante: Arnulfo Plaza Almanza

con número de cuenta: 8454060-3 para obtener el TÍTULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 9 de Agosto de 1994

PRESIDENTE	<u>M.en C. Bertha Rodríguez Samano</u>	<i>Bertha Rodríguez Samano</i>
VOCAL	<u>Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	<i>Esther Revuelta Miranda</i>
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Virginia Oliva Arellano</u>	<i>Virginia Oliva Arellano</i>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. S. Patricia Miranda Castro</u>	<i>Patricia Miranda Castro</i>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.en C. Stella Maris Reginensi Rivera</u>	<i>Stella Maris Reginensi Rivera</i>

**LA FIJACION DEL NITROGENO  
Y SU RELACION CON  
ALGUNOS  
MICROORGANISMOS**

**"Los triunfos nacen cuando nos atrevemos a comenzar "**

*De un amigo.*

**" Es amigo mío aquel que me socorre , no el que me compadece"**

*Thomas Fuller*

**" Nunca pienses que lo sabes todo por muy alto que te valores ,  
ten siempre el coraje de decirte a ti mismo : Soy un ignorante".**

*Ivan Pavlov*

*A MIS PADRES*

**J. Luz Plaza Villafuerte  
Ma. Trinidad Almanza Araujo**

**Por brindarme su apoyo incondicional y depositar en mí la confianza sin lo cual no me hubiese logrado como profesionalista .**

*A MIS HERMANOS*

**Socorro , Salvador , Ma. de la Luz , Ma. Trinidad , Carmen , Antonio , Jesus ,  
Raúl , José .**

*A MIS AMIGOS DE LA FESC - UNAM*

Porfirio , Hermenegildo , Luis , Rocio , Olivia , Felipe , Delfino , Martín , Ana  
Luisa , Tere , Bertha , Lety , CHayo , Inocencio , Eugenio , Flavia , Audelia .

**GRACIAS :** Por brindarme su amistad incondicional y por  
disfrutar juntos momentos tan especiales que para mí es un grato recuerdo.

*A MIS AMIGOS DEL HOSPITAL ESPAÑOL*

En general a todo el personal que labora en el laboratorio de dicha institución

**GRACIAS :** Por brindarme la oportunidad de tener una opción más hacia  
el conocimiento y por su gran compañía.

## **AGRADECIMIENTOS AL JURADO**

**PRESIDENTE** M en C. BERTHA RODRIGUEZ SAMANO

**VOCAL** Q. F. B MA. ESTHER REVUELTA MIRANDA

**SECRETARIO** Q. F. B VIRGINIA OLIVA ARELLANO

**PRIMER SUPLENTE:** Q. F. B PATRICIA SUSANA MIRANDA C.

**SEGUNDO SUPLENTE:** M en C. STELLA MARIS REGINENSI R.

**A GRADECIMIENTO A :**

**UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTONOMA DE  
MEXICO**

**Por ser la semilla que germina, fuente del conocimiento que perdura a través del tiempo y por lograr de ella los frutos hacia la superación.**

## INDICE

LISTA DE FIGURAS .....	1
LISTA DE CUADROS .....	2
INTRODUCCION .....	3
1. NITROGENO .....	3
1.1. PROPIEDADES QUIMICAS .....	4
1.2. PROPIEDADES FISICAS .....	4
1.3. ABUNDANCIA, USOS .....	5
1.4. IMPORTANCIA .....	6
1.4.1. Nitrógeno de los alimentos .....	7
1.4.2. Nitrógeno del organismo .....	7
1.4.3. Balance nitrogenado .....	8
OBJETIVO .....	9
2. CICLO DEL NITROGENO .....	10
2.1. TRANSFORMACIONES DE COMPUESTOS NITROGENADOS ..	12
2.1.1. Protéolisis .....	13
2.1.2. Degradación de aminoácidos .....	14
2.1.3. Nitrificación .....	15
2.1.4. Reducción de nitratos a amonio .....	16
2.1.5. Desnitrificación .....	16
3. MICROORGANISMOS QUE PARTICIPAN EN EL CICLO DEL NITROGENO .....	17

3. 1. BACTERIAS .....	20
3. 1. 1. Ubicación taxónomica .....	20
3. 1. 2. Características generales del género <i>Rhizobium</i> .....	21
3. 1. 3. <i>Azotobacter chroococum</i> .....	22
3. 1. 4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	22
3. 1. 5. <i>Proteus vulgaris</i> .....	23
3. 1. 6. <i>Bacillus mycoides</i> .....	23
3. 1. 7. <i>Nitrosomona europea</i> .....	24
3. 1. 8. <i>Nitrosomona winogradskyi</i> .....	24
3. 2. LEVADURAS .....	24
3. 2. 1. Características generales de las levaduras .....	25
3. 2. 2. Clasificación .....	25
4. PROCESO DE FIJACION DE NITROGENO .....	27
4. 1. FIJACION DE NITROGENO .....	30
4. 2. TIPOS DE FIJACION DE NITROGENO Y CARACTERISTICA .....	32
4. 2. 1. Fijación de tipo no biológico .....	32
4. 2. 2. Fijación de tipo biológico .....	34
4. 3. BIOQUIMICA DE LOS PROCESOS .....	35
4. 3. 1. Fuente de poder reductor .....	35
4. 3. 2. Fuente de energía .....	36
4. 3. 3. Complejo enzimático .....	36
4. 4. ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN LA FIJACION .....	38

4.4.1. Nitrogenasa .....	38
4.4.2. Nitrato reductasa .....	39
4.4.3. Nitrito reductasa .....	39
4.4.4. Glutamina sintetasa .....	39
4.4.5. Glutamato sintetasa .....	41
4.5. LEGHEMOGLOBINA Y PROTEINAS DE RHIZOBIUM .....	43
4.6. REGULACION DE LA FIJACION DE NITROGENO .....	45
4.7. FISILOGIA DEL PROCESO .....	47
4.7.1. Proceso de nodulación .....	48
4.7.2. Control genético para la nodulación .....	53
5. DISCUSION .....	56
6. CONCLUSIONES .....	58
ABREVIATURAS .....	59
7. BIBLIOGRAFIA .....	60

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA No. 1 CICLO DEL NITROGENO .....	11
FIGURA No. 2 PASOS EN LA FIJACION DE NITROGENO .....	28
REDUCCION DEL $N_2$ AL $2NH_3$ .	
FIGURA No. 3 DIAGRAMA ESQUEMATICO DE LA ACTIVIDAD DE LA NITROGENASA EN UNA CELULA BACTERIANA .....	44
FIGURA No. 4 ESTADIOS EN LA FORMACION DE UN NODULO RADICAL .....	49

## LISTA DE CUADROS

CUADRO No. 1	MICROORGANISMOS FIADORES DE NITROGENO .....	18
CUADRO No. 2	MICROORGANISMOS SIMBIOTICOS FIADORES DE NITROGENO .....	19
CUADRO No. 3	INDICES GLOBALES DE FIACION DE NITROGENO EN LOS DIFERENTES SISTEMAS .....	31

## INTRODUCCION

### 1. NITROGENO.

Los elementos que componen los organismos vivos, particularmente aquellos considerados como mayores ( carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno ), están sujetos a procesos cíclicos en la naturaleza, siendo el nitrógeno uno de los que revisten mayor importancia desde el punto de vista económico y ecológico ya que es el nutriente limitante más común en la producción agrícola( 45 ).

Todos los seres vivos requieren una fuente nitrogenada para crecer, ya que los principales componentes celulares, como las proteínas y los ácidos nucleicos, contienen nitrógeno. Varían sin embargo, los compuestos nitrógenados que los distintos organismos son capaces de asimilar; las plantas utilizan compuestos inorgánicos, como amonio (  $\text{NH}_4$  ) o nitrato (  $\text{NO}_3$  ); los animales superiores, además de amonio, requieren compuestos orgánicos, como aminoácidos o bases nitrogenadas( 53 ) . En última instancia, todos los compuestos nitrogenados que los seres vivos utilizan provienen del nitrógeno molecular (  $\text{N}_2$  ), que representa el 80% de los gases que forman la atmósfera terrestre. Los únicos organismos capaces de utilizar directamente este elemento son las bacterias fijadoras de nitrógeno ( 47 ). Los demás dependen del metabolismo de estos microorganismos para tener una fuente nitrogenada.

La atmósfera es la fuente original de casi la totalidad del nitrógeno en el sistema suelo-planta-animal, ya que las rocas ígneas presentan contenidos de 10 a 50 ppm, por lo cual su aporte se torna insignificante. La transferencia del nitrógeno molecular (  $\text{N}_2$  ), aunque una pequeña cantidad proviene de procesos químicos ( generados por luz, combustión o descargas eléctricas ), aportado por la precipitación ( 44, 51 ).

A partir de nitrógeno atmosférico se sintetizan los fertilizantes nitrogenados que se utilizan en la agricultura( 25 ).

## 1.1. PROPIEDADES QUIMICAS.

El calor de disociación de las moléculas de nitrógeno es de -171.14 Kcal por mol de  $N_2$  ( calor absorbido ), siendo mayor que el de cualesquiera otras moléculas diatómicas . A 3500 °C únicamente un 5% de las moléculas de nitrógeno estan disociadas en átomos( 40 ).

En consecuencia , el nitrógeno es el elemento más inactivo, con excepción de los gases inertes . La estructura de su molécula , :  $N \equiv N$  : , con tres pares de electrones compartidos , explica la inercia química del nitrógeno . No obstante, cuando se calienta a elevadas temperatura con ciertos metales se combina con ellos formando nitruros ; de este modo se obtienen fácilmente,  $NLi$ ,  $N_2Ca_3$  ,  $N_2Mg_3$  y  $NB$  ; los nitruros de los metales activos son iónicos y contienen el ion nitruro, también reacciona con elementos no metálicos como oxígeno e hidrógeno, y con compuestos tales como carburo cálcico,  $C_2Ca$  (  $C_2Ca + N_2 = CN_2Ca + C$  )( 25 ).

## 1.2. PROPIEDADES FISICAS ( 35 ).

Número atómico.....7	Densidad absoluta ( en c.n )...1.2506 g / l
Peso atómico..... 14.008	Densidad relativa ( aire = 1 ). 0.9672
Radio atómico covalente. 0.70 *A	Densidad del $N_2$ líquido..... 8.808
Radio del ion nitruro.. 1.71 *A	Solubilidad en agua ( c.c en c.n por litro )
Abundancia de los isótopos :	a 0 °C ..... 23.54
$N_{14}$ 99.62 %	a 25 °C..... 14.34
$N_{15}$ 0.38 %	Punto de ebullición..... -195.8 °C
Notación espectral $IS_2; 2S_2; 2P_3$	Punto de congelación..... -209.86 °C
Estado físico..... Gas incoloro,	Temperatura crítica..... -147.1 °C
inodoro	Presión crítica..... 33.7 atm
e insípido	
Fórmula molecular ..... $N_2$	

### 1. 3. ABUNDANCIA , USOS

El nitrógeno constituye el 78.03 % en volumen de la atmósfera , es también abundante en estado de combinación. Los principales compuestos minerales nativos son el salitre  $\text{NO}_3\text{K}$  , y el nitrato sódico,  $\text{NO}_3\text{Na}$  . El nitrógeno es un elemento esencial de las proteínas ( compuestos orgánicos complejos ) de todos los animales y plantas. La mayoría del nitrógeno que entra al suelo es en forma de compuestos inorgánicos reciclado , tales como nitratos y amonio, que proviene de la lluvia, de excreciones y descomposición de organismos. La atmósfera es la fuente original de casi la totalidad del nitrógeno en el sistema suelo-planta-animal , ya que las rocas ígneas presentan contenidos de 10 a 50 ppm, por lo cual su aporte se torna insignificante. La transferencia del nitrógeno atmosférico al suelo es lograda casi totalmente por medio de procesos de fijación microbiológico o industrial de nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) aunque una pequeña cantidad proviene de procesos químicos ( generados por luz, combustión o descargas eléctricas ) aportado por la precipitación. Resulta difícil poder estimar con precisión la cantidad de nitrógeno mundialmente fijada por los microorganismos, pero se considera normalmente una cifra anual de 100 millones de toneladas provenientes de la fijación industrial. Estimaciones más recientes indican que el total fijado por los diferentes procesos asciende a 240 millones de toneladas, de los cuales el 66% corresponde a procesos biológicos, 25% a la fijación industrial y el 9% por procesos químicos espontaneos( 25, 42 ).

Dentro de los usos que se le da al nitrógeno se aprovecha su extraordinario carácter inerte, se utiliza en la fabricación de amoníaco, acrilonitrilo, cianamida, cianuros, nitruros; fabricación de explosivos; gas inerte para purgado, vaciado y ejercicio de presión ; industrias eléctricas y electrónicas; refrigeración de alimentos en transporte ; hielo seco; propulsores de líquido presurizado ; congelación rápida de alimentos; congelación criogénica ; antioxidante para alimentos ; fuente de presión en pozos de petróleo ; componentes de mezclas fertilizantes( 25 ).

#### 1.4. IMPORTANCIA

El nitrógeno es necesario para la biosíntesis de aminoácidos , purinas y pirimidinas , y pueden obtenerlo los microorganismos ya sea en forma inorgánica u orgánica. Las fuentes de nitrógeno inorgánico más frecuentes son el nitrato y el amonio, pero otras fuentes inorgánicas empleadas por algunos microbios incluyen también cianuro (  $CN$  ), cianato (  $OCN$  ), tiocianato (  $SCN$  ), cianamida (  $NCN$  ), nitrito (  $NO_2$  ) e hidroxilamina (  $NH_2OH$  ) . El nitrógeno libre como gas (  $N_2$  ) también es empleado por algunas bacterias .

Gran parte de los datos obtenidos acerca del metabolismo de las proteínas pueden expresarse ( y a menudo se miden ) en términos de nitrógeno, por razones que saltan a la vista. Los productos terminales del metabolismo de los átomos de carbono y de hidrógeno de las proteínas son  $CO_2$  y  $H_2O$  , idénticos a los productos terminales del metabolismo de los carbohidratos y o los ácidos grasos( 48 ).

Si bien algunas proteínas poseen ácido fosfórico, este componente es más característico de los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y algunos productos intermedios del metabolismo de los carbohidratos. El azufre es componente casi invariable de las proteínas, pero su metabolismo traduce sólo las reacciones de la cistina y la metionina. A diferencia de estos elementos, el nitrógeno es peculiar de las proteínas, en lo que se refiere a su concentración elevada en la molécula proteínica ( en promedio, 10% ) y a sus productos especializados de excreción ( amoníaco, urea y otros más ).

#### 1.4.1. Nitrógeno de los alimentos.

El nitrógeno proteínico excede de las demás formas de nitrógeno de los alimentos. Se ingieren cantidades pequeñísimas de nitrógeno inorgánico en forma de nitratos y nitritos. Así mismo, en los alimentos hay pequeña cantidad de nitrógeno orgánico no proteínico ( NNP ), que incluye ácidos nucleicos y sus derivados, y aminoácidos y péptidos( 22 )

#### 1.4.2. Nitrógeno del organismo.

En los tejidos y los líquidos corporales hay muchos compuestos nitrogenados. A la proteína corresponde, en promedio, 20% del peso húmedo de casi todos los tejidos. En la sangre, además de proteínas hay varios tipos de ( NNP ). La urea, el producto principal del catabolismo proteínico se forma en el hígado, y pasa por la sangre a los riñones para ser excretada. La creatina sanguínea puede estar en camino hacia el músculo para la síntesis de fosfocreatina, o puede haber salido de los músculos. La creatinina es un producto de desecho formado por fosfocreatina y creatina. El producto terminal del catabolismo de las purinas es el ácido úrico( 22 ).

En la sangre también se observan aminoácidos libres; se hallan en camino de un órgano ha otro para fines de síntesis o de degradación. Otros componentes del nitrógeno no proteínico de la sangre incluyen polipéptidos, glutatión, purinas y pirimidinas, ATP y ergotioneína.

#### 1. 4. 3. Balance nitrogenado

La mayor parte del nitrógeno de la dieta corresponde a proteínas, y la mayor parte de los productos nitrogenados de excreción provienen del catabolismo proteínico. El balance nitrogenado se define como la diferencia cuantitativa entre el ingreso de nitrógeno y la excreción del mismo, expresada en las mismas unidades ( v.g. : gramos N/ día ). Ingreso denota el nitrógeno de los alimentos . En la excreción se cuentan estas vías : orina, heces, leche, sudor, expectoración, vómito, descamación de la piel, líquido menstrual y pelo que cae; sin embargo, en la práctica sólo se consideran los dos primeros factores, excepto en circunstancias insólitas( 22 )

El balance de nitrógeno es positivo si el ingreso excede de la excreción. Esto rige invariablemente cuando se sintetizan nuevos tejidos; por ejemplo el crecimiento de los jóvenes, en la gestación y en la convalecencia del estados de balance nitrogenado negativo.

En el balance nitrogenado negativo, la excreción excede del ingreso. Este estado, que patentemente no puede continuar de manera indefinida, ocurre en las siguientes circunstancias: ingreso inadecuado de proteínas ( ayuno, enfermedades digestivas ); aumento del catabolismo de las proteínas tisulares ( fiebres, infecciones, enfermedades extenuantes ); aumento de la pérdida de proteínas del organismo, por cualquier mecanismo.

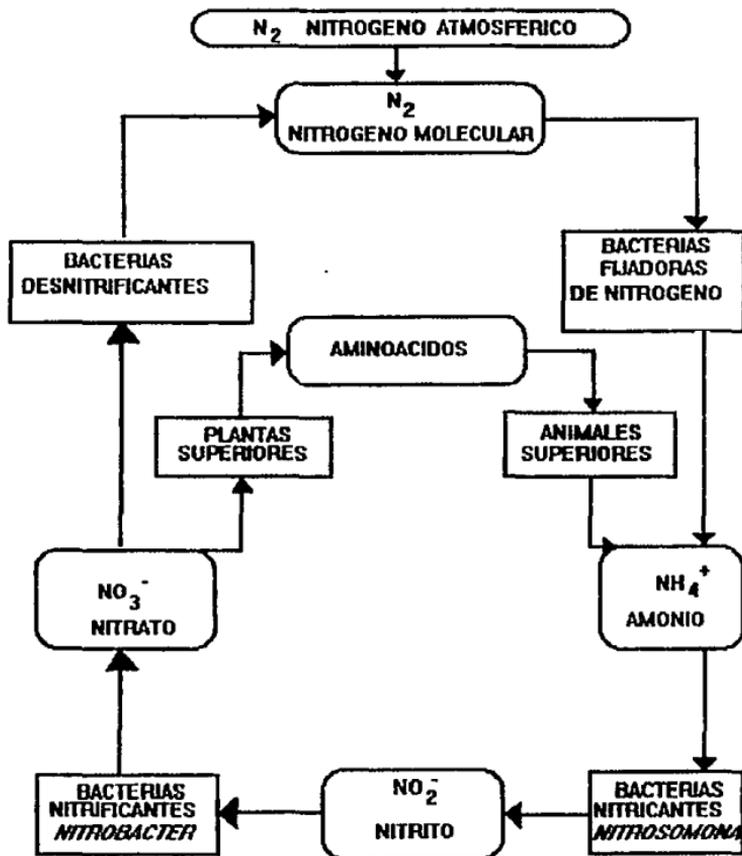
## OBJETIVO

**Hacer una relacion accesible de información básica enfocada a estudiantes y profesionales de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, que deseen en un futuro cercano desarrollar trabajos y estudios sobre el proceso de fijación de nitrógeno y la importancia que tiene este , como base en la fabricación de fertilizante utilizados en la agricultura capaz de mejorar la producción de semillas.**

## 2. CICLO DEL NITROGENO

Las rutas biosintéticas que conducen a los aminoácidos y los nucleótidos comparten la necesidad de nitrógeno, pero los compuestos nitrogenados útiles biológicamente y solubles son generalmente escasos en el medio natural. Por esta razón, el amoníaco, los aminoácidos y los nucleótidos son empleados con economía por la mayor parte de los organismos, particularmente porque tales compuestos son los precursores de sus vitales ácidos nucleicos y proteínas. Ya se ha visto que los aminoácidos libres, las purinas y las pirimidinas formadas durante el recambio metabólico se recupera frecuentemente y se emplean de nuevo( 43 ). La forma de nitrógeno más abundante se halla en el aire, cuyas cuatro quintas parte son nitrógeno molecular (  $N_2$  ). Sin embargo, solamente unas pocas especies, relativamente, pueden convertir el nitrógeno atmosférico en formas útiles para los organismos vivos, los cuales pueden recuperar utilizar de nuevo el nitrógeno disponible biológicamente constituyendo un amplio ciclo del nitrógeno ( Fig. No. 1 ). La primera etapa del ciclo del nitrógeno es la fijación del nitrógeno atmosférico por los organismos fijadores del nitrógeno y dar amoníaco. El amoníaco puede emplearse por la mayor parte de los organismos vivos. Sin embargo, existe algunas bacterias del suelo importantes que obtienen su energía oxidando el amoníaco para formar nitrito y , por último nitrato. Como todos estos organismos son muy abundantes y activos, casi todo el amoníaco que llega al suelo se oxida. Finalmente a nitrato, proceso que se conoce como nitrificación ( 22, 16 ). Las plantas y muchas bacterias pueden reducir con facilidad el nitrato a amoníaco nuevamente por la acción de las reductasas del nitrato ; este proceso se le conoce como desnitrificación ( 18 ).

Fig. No. 1 Ciclo del nitrógeno ( 53 )



El amoníaco así formado se incorpora a los aminoácidos por las plantas que luego se emplean por los animales como fuente de aminoácidos esenciales y no esenciales para construir las proteínas animales. A la muerte de los animales la degradación microbiana de sus proteínas devuelve el amoníaco al suelo en donde las bacterias nitrificantes lo convierten en nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y en nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) de nuevo( 53 ).

## 2.1. TRANSFORMACION DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS.

Las sustancias orgánicas nitrogenadas complejas del suelo están representadas por las proteínas , ácidos nucleicos, bases púricas y pirimidicas y azúcares aminados ( glucosamina y galactosamina ). La forma más simple del nitrógeno encontrada en las transformaciones biológicas es el nitrógeno gaseoso elemental. las transformaciones en las que participan los microorganismos oscilan desde el gas nitrógeno hasta proteínas( 48 ). Para que ocurran estos cambios se efectuan muchas reacciones enzimáticas complicadas y se producen muchas sustancias intermedias. Estos procesos bioquímicos son :

Proteólisis

Degradación de aminoácidos : Amonificación

Nitrificación

Reducción de nitratos a amoníaco

Desnitrificación

### 2.1.1. Proteólisis.

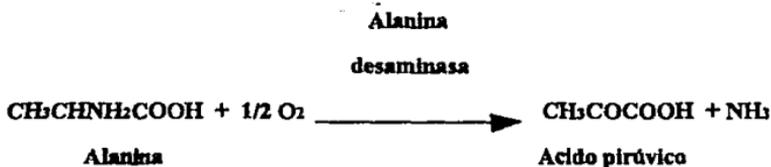
El nitrógeno de las proteínas ( y de los ácidos nucleicos ) se debe considerar como el final de la línea en la síntesis de los compuestos nitrogenados. El nitrógeno en las proteínas está "encerrado" y no se halla disponible como alimento para las plantas. para que este nitrógeno orgánico quede libre para ser reusado, el primer proceso que debe ocurrir es la hidrólisis enzimática de las proteínas ( proteólisis ). Esta la efectúan microorganismos capaces de elaborar proteinasas extracelulares que transforman las proteínas a unidades más pequeñas ( péptidos ). Estos péptidos son atacados posteriormente por peptidasas, dando como productos finales la liberación de aminoácidos individuales. El alcance de la reacción se resume así :



Algunas especies de bacterias elaboran grandes cantidades de enzimas proteolíticas y entre las más activas están algunas de la clostridia, como Clostridium histolyticum y Cl. sporogenes ; menor grado de actividad tienen las especies de los géneros *Proteus* , *Pseudomonas* y *Bacillus* . Muchos hongos y actinomicetos del suelo son muy proteolíticos . Las peptidasas, sin embargo, abundan en los microorganismo lo demuestra el que las peptonas ( proteínas parcialmente hidrolizadas ) sean componentes comunes de medios de cultivo bacteriológicos que proporcionan fuentes disponibles de nitrógeno( 39,48 ).

### 2.1.2. Degradación de aminoácidos : Amonificación

Los productos finales de la proteólisis son los aminoácidos. Su destino en el suelo es que sean utilizados como alimentos por los microorganismos. Los aminoácidos son objeto de gran variedad de patrones para la descomposición microbiana. Aquí trataremos de la liberación del nitrógeno de estos compuestos, que va acompañada de la desaminación, es decir la eliminación de los grupos amino. Aunque los microorganismos presentan muchas variaciones en la desaminación, uno de los productos finales siempre es amoníaco,  $\text{NH}_3$ . Un ejemplo de desaminación es :



Esta reacción se clasifica como desaminación oxidativa ( 48 ). Muchos microorganismos desaminan aminoácidos. La producción de amoníaco se conoce como amonificación. El destino del amoníaco es variable dependiendo de las condiciones del suelo ; sin embargo, si se solubiliza, se forma  $\text{NH}_4^+$ .

Algunas de las posibilidades subsiguientes son su acumulación y utilización por las plantas y microorganismos, los cuales bajo condiciones favorables se oxidan a nitratos ( 39,18 ).

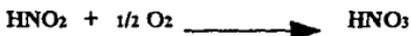
### 2.1.3. Nitrificación

La oxidación del amoníaco a nitratos se llama *nitrificación* es una de las actividades más importantes de algunas bacterias autótrofas. Las reacciones de oxidación proporcionan a estos microorganismos la energía que requieren para los procesos celulares( 43 ). Desde el punto de vista de la fertilidad del suelo, el producto de la reacción ( nitratos ) es la forma de nitrógeno más accesible a las plantas. La nitrificación la efectuan las bacterias específicas en dos pasos( 17 ):

1. Oxidación de amoníaco a nitritos por *Nitrosomonas* :



2. Oxidación de nitritos a nitratos por *Nitrobacter* :



Se han encontrado pocos géneros de bacterias capaces de realizar estas reacciones y sólo se han estudiado en detalle la *Nitrosomona* y *Nitrobacter* . Algunos hongos son capaces de nitrificación heterotrófica, como *Aspergillus* sp. Durante muchos años las bacterias *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* fueron consideradas como autótrofas obligadas y aerobias estrictas. La reducción del nitrato a amoníaco recibe el nombre de reducción asimilatoria del nitrato, en contraste con la reducción desasimilatoria del nitrato proceso que tiene lugar en las bacterias desnitrificantes en las que la función del nitrato es la de un aceptor de electrones alterno al  $\text{O}_2$  en la fosforilación por transporte de electrones. En la reducción asimilatoria del nitrato, no hay síntesis del ATP.

#### 2.1.4. Reducción de nitratos a amoníaco

Varias bacterias heterótrofas son capaces de convertir nitratos a nitratos o amoníaco. Esto ocurre normalmente en condiciones de anaerobiosis, tanto en suelos como en aguas estancadas. El oxígeno de los nitratos sirve como aceptor de electrones e hidrógeno. En el proceso participan varias reacciones y el resultado que abarca es :



Esta reacción no es la principal en los terrenos agrícolas no muy húmedos que están bien aireados y que contienen sólo cantidades moderadas de nitrógeno de nitratos orgánicos( 48 ).

#### 2.1.5. Desnitrificación.

Algunos microorganismos son capaces de transformar nitratos a nitrógeno gaseoso u óxidos nitrosos. Este proceso se le llama desnitrificación, y el cambio acarrea una red de pérdidas de nitrógeno del suelo. Algunos de los microorganismos relacionados en esta reacción son *Thibacillus desnitrificans* ( un autótrofo ), *Micrococcus desnitrificans* ( un heterótrofo ) y algunas especies de los heterótrofos más comunes de los géneros *Serratia*, *Pseudomonas*, y *Achromobacter*. La desnitrificación no se efectúa mucho en los suelos bien aireados que tienen cantidades moderadas de materia orgánica y nitratos. Al parecer sucede copiosamente en suelos saturados de agua ( anaerobios ) y ricos en sustancias orgánicas. Las reacciones que intervienen en la desnitrificación ( 43 ) se resume como sigue :



### 3. MICROORGANISMOS QUE PARTICIPAN EN EL CICLO DEL NITROGENO Y SU PAPEL ( MICROORGANISMOS DEL SUELO)

La fertilidad del suelo depende en gran parte de la actividad bacteriana. Centenares de especies de bacterias se encuentran en los distintos suelos y varían en las diferentes partes del mundo. La naturaleza y la magnitud de la población bacteriana del suelo depende de condiciones ambientales tales como el grado de humedad favorable, la concentración de hidrogeniones, la temperatura, el alimento disponible y la aireación. Las bacterias del suelo son absolutamente esenciales para todos los procesos vitales, ya que sin los procesos de putrefacción y desintegración no habría descomposición de la materia vegetal y animal muerta( 17 ). Los microbios del suelo, en la forma de bacterias de la putrefacción, descomponen el estiércol y la materia vegetal y animal con la consecuente liberación de sustancias químicas simples como nitrato sódico, fosfato de calcio, cloruro sódico, etc. Las plantas verdes en desarrollo pueden utilizar estos productos de la descomposición y sintetizarlos en el proceso de la fabricación de alimento fotosintético. En la flora del suelo hay microorganismos aerobios, anaerobios, proteolíticos y que desdoblan carbohidratos, capaces de causar descomposición y desintegración; hay además bacterias que reducen los nitratos a nitritos, otras que utilizan el nitrógeno del aire y del amoníaco y forman nitratos y otras más que utilizan el azufre, el hierro, el fósforo, compuestos de manganeso, etc( 17 ).

Cuadro No. 1 Microorganismos fijadores de nitrógeno (48).

De vida libre	
<b>Bacterias aerobias obligatorias :</b>	<b>Bacterias fototróficas</b>
Familia Azotobacteraceae ( género : Azotobacter , Azomonas , Azotococcus , Beijerinckia - Dersia )	<b>Rhodospirillum rubrum</b> <b>Rhodopseudomonas palustris</b> <b>Rhodomicrobium</b>
<b>Mycobacterium flavum , M. roseo-</b> <b>album , M. azotabsorptum , Myco-</b> <b>bacterium sp.</b>	<b>las bacterias sulfúreas :</b> <b>Chlorobium thiosulfatophilum</b> <b>Chromatium vinosum ,</b> <b>C. minutissimum .</b>
<b>Aerobias fotótrofas algas verdi - azuladas</b>	<b>Anaerobios obligatorios :</b>
Familia Nostocaceae Familia Stigonemataceae Familia Chroococcaceae Familia Oscillatoriaceae	<b>Clostridium pasteurianum ,</b> <b>C. butyricum.</b>
<b>Bacterias anaerobias facultativas</b>	<b>Bacterias reductoras de</b> <b>sulfatos :</b>
<b>Klebsiella pneumoniae , K. rubiacearum</b> <b>Bacillus polymyxa , B. macerans</b> <b>Enterobacter aerogenes , E. coli</b> <b>Enterobacter cloacae</b>	<b>Desulfovibrio desulfuricans,</b> <b>D. vulgaris , D. gigans</b> <b>Desulfotomaculum orientis ,</b> <b>D. ruminis.</b>

Cuadro No. 2 Microorganismos simbióticos fijadores de nitrógeno ( 15 ).

Simbióticos			
Plantas leguminosas	Asociadas con :	Plantas no leguminosas	Asociadas con :
Alfalfa	<i>Rhizobium meliloti</i>	Aliso	<i>Franquia alni</i>
Trebol	<i>Rhizobium trifolii</i>	Azolla	<i>Anabaena Azollae</i>
Soya	<i>Rhizobium japonicum</i>	<i>Gunnera macrophylla</i>	<i>Nostoc muscorum</i>
Pisum	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Casuarina</i>	<i>Actinomyces</i>
Frijol	<i>Rhizobium phaseoli</i>	<i>Comptonia</i>	<i>Frnquia</i>

### 3.1. BACTERIAS

Estos organismos derivan su energía de muchos de los carbohidratos simples y su nitrógeno de la atmósfera en la forma elemental o gaseosa . Las bacterias que fijan nitrógeno se encuentran usualmente en las raíces de diversas plantas. A continuación se describe a un grupo de bacterias fijadoras de nitrógeno, siendo estas las de mayor importancia en dicho proceso.

#### 3.1.1. Ubicación taxonomica

Las bacterias de los géneros Rhizobium y Agrobacterium son bacilos los que pertenecen a la familia Rhizobiaceae, según la clasificación propuesta por Bergey ( 19 ). El género Rhizobium se compone de seis especies, las cuales reciben sus nombres de acuerdo a la especie vegetales en que se alojan. A continuación se detallan los géneros y las leguminosas con las cuales se asocian:

A ). Rhizobium leguminosarum. Se localizan en leguminosas de los géneros Pisum, Vicia, Lathyrus, Lens y Cicer .

B ). Rhizobium phaseoli . Es la especie que encontramos en el frijol ( phaseolus vulgaris .

C ). Rhizobium trifolii. Se encuentra en especies de leguminosas forrajeras del género Trifolium .

D ). Rhizobium meliloti . Característica de los géneros Medicago, Melilotus y Trigonella .

E ). Rhizobium lupini. Se presenta en los géneros Lupinus, y Ornithopus .

F ). Rhizobium japonicum . Especie presente en la soja ( glycine máxima ) .

### 3. 1. 2. Características generales del género Rhizobium .

Las bacterias de este género son bastones cortos y medianos, Gram (-), de 1.2 a 3  $\mu$  de largo por 0.5 a 0.9  $\mu$  de ancho, son móviles cuando jóvenes y muchas veces presentan gránulos prominentes de B - hidroxibutirato ( 55 ). Son bacterias quimioorganotróficas y crecen mejor sobre medios complejos, especialmente sobre extracto de levadura, incubados entre 25 y 30 °C. Son organismos aeróbicos, que presentan su crecimiento máximo a presiones de oxígeno relativamente bajas. Las colonias pueden caracterizarse por la producción de mucilagi o goma, aunque se encuentran variantes no gomosas. Este mucilago esta formado por glucosa, ácido glucorónico, galactosa y piruvil ( 45 ).

Bajo condiciones de cultivo en agar - extracto de levadura - manitol se observa escaso o nulo crecimiento con un período de incubación de 24 horas. Cuando el desarrollo del cultivo es de moderado a abundante entre los 3 y 5 días, incoloro o blanco, con poca a abundante formación de goma, puede corresponder a las especies:

Rhizobium phaseoli, Rhizobium meliloti, Rhizobium trifolii y Rhizobium leguminosarum . En cambio, cuando el crecimiento fué escaso luego de 5 días, leve a moderado en 10 días , incoloro o blanco y rara vez rosado, con poca formación de goma, pueden pertenecer a las especies Rhizobium lupini y Rhizobium japonicum ( 55, 51 ).

Las pruebas de laboratorio para su identificación se basan en la motilidad, tinción de Gram, y las reacciones en leche tornasolada. Las pruebas específicas de identificación se realizan por medio de la producción de anticuerpos para la aglutinación, inmunodifusión o anticuerpos fluorescentes ( 40, 55 ), así como anticuerpos monoclonales ( 45 ).

### 3.1.3. *Azotobacter chroococcum*

1. Forma : bastones cortos, gruesos, con extremos redondeados; formas ovoides grandes como diplococos gigantes; bastones piriformes y otras formas. Tiende a sufrir cambios ciclógenicos desde grandes formas tipo levadura hasta tipo cocoide y bacilar y etapas sin forma definida, 2. Agrupamientos celulares: aislados o en pares de extremo a extremo; en los cultivos viejos aparecen en paquetes . 3. Tamaño: 2 a 3  $\mu$  por 3 a 6  $\mu$  . 4. No esporulados; los organismos están rodeados por una membrana gelatinosa de grosor variable, que por lo común se vuelven pardusca en los cultivos viejos. 5. Gramnegativo y no acidoresistente. Movilidad: móvil mediante un flagelo polar. 6. Temperatura óptima 25 °C .9. Aerobio estricto fija N<sub>2</sub> atmosférico.

### 3.1.4. *Klebsiella pneumoniae*

1. Forma: bastones gruesos, cortos con cápsula. 2. Agrupamiento celular: aislados o en pares extremo a extremo. 3. Tamaño: 0.5 a 0.8  $\mu$  por 1 a 5  $\mu$  . 4. Propiedades tintoriales: se tiñe bien con los colorantes ordinarios de anilina. 5. Gramnegativos. 6. Inmóvil. 7. No esporulado. 8. Temperatura óptima : 37 °C . 9. Aerobio y anaerobio facultativo. 10. Reduce los nitratos a nitritos ( 17 ).

### 3.1.5. Proteus vulgaris

1. Familia *Enterobacteriaceae* . 2. Hábitat : suelo, contenido intestinal del hombre, agua rica en materia orgánica, materiales putrefactos. 3. Forma: bacilos pequeños, delgados pleomórficos. 4. Agrupamiento celular : aislados, en parejas y frecuentemente en cadenas largas. 5. Tamaño: 0.5 a 1  $\mu$  por 1 a 3  $\mu$  . 6. Gramnegativos. 7. Movilidad: móvil con numerosos flagelos peritricos . 8. No esporulado. 9. Temperatura óptima 37 °C . 10. Aerobios y anaerobios facultativos. 11. Forma ácido sulfhídrico. 12. Forman amoníaco. 13. Reduce los nitratos a nitritos ( 48 ).

### 3.1.6. Bacillus mycoides

1. Familia: *Bacillaceae* . 2. Hábitat: leche, agua, suelo, polvo. 3. Forma: organismos bacilares gruesos con extremos truncados o ligeramente redondeados. 4. Agrupamiento celular : se presentan aislados, en pares, en pequeños grupos y en cadenas . 5. Tamaño: 0.8 a 1.3  $\mu$  por 2 a 6  $\mu$  . 6. Esporulados, con esporas grandes, centrales, ovales, que miden de 1 a 1.6  $\mu$  por 2 a 2.5  $\mu$  y que aparecen en un término de 24 a 48 horas . 7. Grampositivo y no acidoresistentes, que se tñen con los colorantes ordinarios de la anilina . 8. Temperatura óptima de 30 °C. 9. Aerobio y anaerobio facultativo. 10. Produce amoníaco. 11. Forma nitritos de los nitratos. 12. Forma ácido de la glucosa, la sacarosa, la xilosa y la dextrina ( 17 ).

### 3.1.7. Nitrosomonas europaea

1. Hábitat : suelo . 2. Forma : de bastón o esférica. 3. Agrupamientos celulares: aislados o agregados en una masa por alguna sustancia ligeramente viscosa; rara vez en cadenas de tres o cuatro. 4. Tamaño: 0.9 a 1  $\mu$  por 1.1 a 1.8  $\mu$ . 5. Movilidad : móviles por medio de un flagelo polar de longitud tres o cuatro veces mayor que la del bacilo. 6. Aerobio estricto. 7. El amoníaco y las sales amoniacaes son oxidadas a nitritos ( 17, 39 ).

### 3.1.8. Nitrobacter winogradskyi

1. Hábitat . 2. Forma: bastones con membrana gelatinosa . 3. Tamaño: de 0.6 a 0.8  $\mu$  por 1 a 1.2  $\mu$  . 4. Propiedades tintoreales : no se tifen facilmente. 5. Gramnegativos. 6. Inmóvil. 7. Temperatura óptima de 25 a 28 °C . 8. Aerobio estricto. 9. Oxida los nitratos a nitritos ( 17 ).

## 3.2. LEVADURAS

Muchas levaduras y mohos tienen gran importancia en la industria por su capacidad de formar productos de fermentación como el alcohol isopropílico y la acetona, por su utilidad en la industria del pan y en el queso, etc. Son también causa de efectos nocivos por su papel en la podredumbre y en el añublo. Producen cambios de importancia en el suelo. Algunos son causa de enfermedad en plantas y animales. *Penicillium* y *Aspergillus* producen antibióticos poderosos ( 39,48 ).

### 3.2.1. Características generales de las levaduras.

Las levaduras y los mohos son organismos vegetales sin clorofila, parásitos o saprófitos, que generalmente se reproducen por medio de esporas y con poca frecuencia por medio de un mecanismo sexual. Algunos son unicelulares (levaduras); en su mayor parte son multicelulares de tipo filamentosos. En general, los hongos se desarrollan mejor a la temperatura de la habitación (20° a 25 °C) u a 37 °C, por lo general en un medio de pH= 5.5 a 6.5. La mayoría de los hongos son aerobios. Para el aislamiento se usan con más frecuencia el medio de ensayo o el de conservación de Sabouraud y medio de Pensilvania.

### 3.2.2. Clasificación.

La clasificación de las levaduras y de los mohos es aún confusa. Las relaciones entre los grupos no es clara y el pleomorfismo es habitual. La amplia clasificación que sigue es bastante aceptada y da una indicación del lugar de las levaduras y los mohos en el reino vegetal (17, 39).

Phylum. *Tulofitas*. Organismos vegetales sin raíces, tallos, ni hojas.

Subphylum I. *Algas*. Poseen clorofila.

Subphylum II. *Hongos*. No poseen clorofila.

Clase 1. *Esquizomicetos*. Bacterias

Clase 2. *Ficomycetos*. Hongos semejantes a las algas, con micelio no tabicado.

Incluye los mohos del agua y el pan, el añublo, la roña, la pobredumbre.

**Clase 3. *Ascomycetos*.** Hongos succiformes con micelio tabicado cuando lo hay. Incluyen levaduras, *Penicillium*, *Aspergillus*.

**Case 4. *Basidiomicetos*.** Hongos con basidios, con micelio tabicado si lo hay. Incluyen los de tizón de trigo, añubios, plantas fungosas verdaderas como bejines y setas.

**Clase 5. *Hongos imperfectos* .** Hongos todavía inclasificables en otros grupos, con micelio tabicado.

Las clases 2, 3, 4 y 5 comprenden los *Eumycetos* u hongos verdaderos.

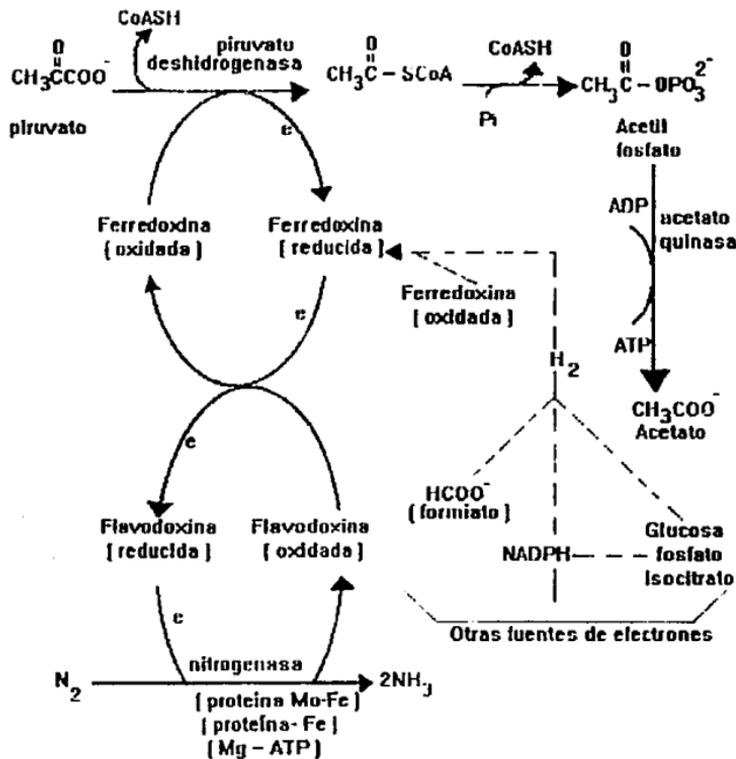
#### 4. PROCESO DE FIJACION DE NITROGENO

En el proceso de fijación de  $N_2$ , este es reducido a amoníaco que posteriormente es convertido a forma orgánica. El proceso de reducción es catalizado por la enzima *nitrogenasa*, que consta de dos componentes proteínicos separados llamados I y II. Ambos componentes contienen hierro y el componente I contiene también molibdeno. Los componentes de la *nitrogenasa* se inactivan por el oxígeno aun cuando llegen a ser obtenidos de un anaerobio. Debido a la estabilidad del triple enlace  $N \equiv N$ , el  $N_2$  es extremadamente inerte y su activación es un proceso que demanda mucha energía. Deben ser transferidos seis electrones para reducir  $N_2$  a  $2NH_3$  y varios pasos intermedios deben visualizarse; pero puesto que ningún intermediario ha sido aislado en la actualidad, se acepta que tiene lugar tres pasos sucesivos de reducción con los intermediarios firmemente unidos a la enzima. Fig. No. 2. La fijación del nitrógeno es de naturaleza muy reductora y el proceso se inhibe por el oxígeno puesto que el componente I es inactivado irreversiblemente por el  $O_2$ . En bacterias aeróbicas, la fijación del  $N_2$  se realiza en presencia de  $O_2$  en las células completas, pero no en las preparaciones enzimáticas purificadas; se piensa que la *nitrogenasa* dentro de la célula se encuentra en un microambiente protegido de  $O_2$ . Algunas bacterias y cianobacterias capaces de crecer aeróbica y anaeróbicamente fijan al  $N_2$  solo en condiciones de anaerobiosis. Los electrones para la reducción de nitrógeno son transferidos a la *nitrogenasa* provenientes de la ferredoxina, el acarreador de bajo potencial redox (43,48).

Fig. No. 2 Pasos en la fijación de nitrógeno  
Reducción del  $N_2$  al  $2NH_3$

Generación del poder reducción y ATP

[*Clostridium* : otras bacterias pueden emplear vías diferentes.



La ferredoxina fue descubierta inicialmente en las bacterias fijadoras de nitrógeno mediante estudios sobre la naturaleza del acarreador de electrones en la fijación de nitrógeno y posteriormente se encontró que estaba presente también en organismos que no fijan nitrógeno. En *Clostridium pasteurianum*, la ferredoxina es reducida por una ruptura fosforoplástica del piruvato, y el ATP es sintetizado al mismo tiempo. Además de la ferredoxina reducida se requiere de ATP para la fijación de  $N_2$  en todos los organismos estudiados. Los requerimientos del ATP para la fijación del nitrógeno son muy altos: cerca de 4 a 5 ATP son degradados en ADP + Pi por cada 2 electrones transferidos. El ATP es necesario para disminuir el potencial de reducción del sistema lo suficiente como para que el  $N_2$  pueda reducirse. El potencial de reducción del componente II es - 0.294 V y disminuye a - 0.402 V cuando la enzima se combina con el ATP. Los electrones son primeramente transferidos a ferredoxina al componente II, después de lo cual el ATP se une y disminuye el potencial de reducción. Este complejo se combina después con el componente I, el cual se reduce y puede ahora convertir el  $N_2$  a  $NH_3$ ; sin embargo, se desconocen los detalles de reducción de seis electrones. Los componentes I y II se han purificado es de interés desde un punto de vista de la evolución que el componente I de un organismo funciona con el componente II de otro diferente. Aun cuando los componentes sean obtenidos de organismos están emparentados muy lejanamente, el complejo híbrido mantiene algo de actividad esto puede interpretarse como que las estructuras de los componentes no se han modificado de manera importante durante la evolución( 43 ).

#### 4.1 FIJACION DE NITROGENO

La utilización del gas ( $N_2$ ) como fuente de nitrógeno se denomina fijación de nitrógeno y es una propiedad que poseen solo algunas bacterias y cianobacterias, son los únicos organismos capaces de llevar a cabo fotosíntesis oxigénica y fijación de nitrógeno; muchos aunque no todos, son potentes fijadores de nitrógeno. Tales organismos poseen requerimientos nutricionales más simples que se conocen, ya que pueden crecer en un medio mineral en presencia de luz, utilizando  $CO_2$  como fuente de carbono y  $N_2$  como fuente de nitrógeno. La coexistencia en un solo organismo de ambos procesos, fotosíntesis oxigénica y fijación de nitrógeno, no deja de ser una paradoja, ya que la fijación del nitrógeno es un proceso intrínsecamente anaeróbico (39).

También puede tener lugar químicamente en la atmósfera, aunque en un grado muy pequeño, mediante las descargas eléctricas, y cierta cantidad de fijación de nitrógeno tiene lugar en la producción industrial de los fertilizantes nitrogenados. Parte de la fijación del nitrógeno también tiene lugar durante los procesos de combustión artificial, puesto que el aire contiene 78% de  $N_2$  por unidad de peso y la combustión en el aire inevitablemente implica una combustión a altas temperaturas de algo del  $N_2$  (a óxidos de nitrógeno y en última instancia a nitrato). Cerca del 85% de la fijación del nitrógeno sobre la tierra es de origen biológico, aproximadamente el 60% de la fijación biológica del nitrógeno tiene lugar sobre la tierra y el otro 40% en los océanos. La velocidad de fijación del nitrógeno en la naturaleza y ecosistemas agrícolas han sido efectuadas mediante el uso de la técnica de reducción de acetileno.

La información obtenida es más completa para los sistemas terrestres que para los acuáticos. En el siguiente cuadro damos a conocer los índices globales de fijación de nitrógeno en los diferentes tipos de sistemas( 20 ).

Cuadro. No. 3

---

Sistemas	Unidades $10^{14}$ g/año
Agricultura: leguminosas	35
Arroz	4
Pastura	45
Otros cultivos	5
Otros habitats ( por ejemplo desiertos )	10

---

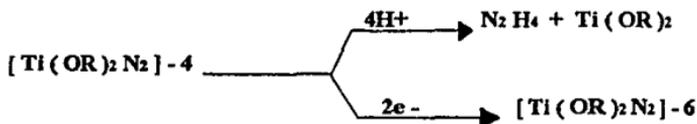
Con esto queda claro que cerca de la mitad de la fijación biológica del nitrógeno terrestre está en asociación con cultivos agrícolas. En el caso de las leguminosas, la fijación es gracias a la simbiosis con el *Rhizobium* en los nódulos de la raíz. Pero en otros cultivos la fijación puede tener lugar en bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre que habitan en la rizosfera. Los índices y velocidades de fijación de los fijadores de nitrógeno de vida parecen ser altamente variables de un habitat a otro, por lo que las estimaciones confiables de la fijación biológica del nitrógeno de las no leguminosas todavía no están disponibles( 20 ).

## 4.2 TIPOS DE FIJACION DE NITROGENO Y CARACTERISTICAS

Existen dos tipos de fijación de nitrógeno :

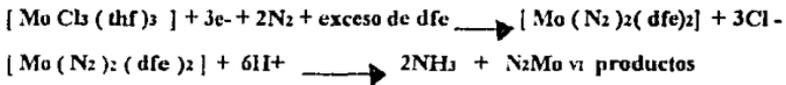
4.2.1 *La de tipo no biológico.* esta consiste en la transformación de nitrógeno molecular en una forma inorgánica de los enunciados, la característica de este proceso es la separación de los átomos unidos a un triple enlace (37).

El nitrógeno molecular puede formar complejos con metales de transición dío lugar a amplias investigaciones sobre la posibilidad de fijación de nitrógeno mediante dichos complejos. Entre los sistemas investigados el que emplea titanio ( II ) fue el primero en dar resultados, los alcóxidos de titanio ( II ) forman complejos de dinitrógeno que entonces pueden ser reducidos entonces con la subsecuente liberación de amoniaco o de hidrazina :



Se desconoce la naturaleza exacta de los complejos de dinitrógeno. En ciertas condiciones los materiales iniciales se pueden regenerar ( parcialmente ), haciendo que la reacción sea catalítica, aunque sólo se dispone de unos pocos ciclos antes que se agoten las "sustancias catalíticas " .

Hasta hace poco, todos los métodos para convertir los complejos de dinitrógeno en amoníaco requerían de poderosos agentes reductores : el dinitrógeno dentro del complejo es casi tan poco reactivo como el  $N_2$  atmosférico . Un avance importante fue el descubrimiento de que ciertos complejos de molibdeno y de tungsteno que contienen fosfina y dinitrógeno fácilmente liberan amoníaco en medios ácidos :



Donde thf = tetrahidrofurano y dfe = 1,2 - bis ( difenilfosfina ) etano,  $Q_2$   $CH_2CH_2 POQ_2$  . Ambas reacciones se llevan a cabo a temperatura ambiente y a presión atmosférica. El agente reductor es un reactivo de Grignard . Esta secuencia de reacciones es importante por dos razones :

- 1) Es un modelo de los sistemas de nitrogenasa *in vitro* que parecen emplear molibdeno.
- 2) Suministra información respecto al desarrollo de catalizadores útiles para la fijación industrial de nitrógeno.

#### 4. 2. 2 Fijación biológica

Como ya se ha mencionado anteriormente muchos microorganismos son capaces de aprovechar el nitrógeno molecular de la atmósfera. La conversión de este nitrógeno a compuestos nitrogenados se llama *fijación del nitrógeno*.

En este proceso están implicados dos grupos de microorganismos ( 20 ) :

a). Microorganismos *no simbióticos* , que viven libre e independientemente en el suelo.

La fijación del nitrógeno no simbiótico se ha estudiado extensamente con *Clostridium pasteurianum* y en especies de *Azotobacter* . Durante muchos años fueron las únicas conocidas como capaces de esta actividad . El primero es un bacilo anaerobio y el segundo son células ovales o esféricas aerobias; ambos se encuentran muy difundidos en los suelos. La capacidad para fijar nitrógeno de las especies de *Azotobacter* es mayor que la de *Clostridium pasteurianum* . Se estima que la cantidad de nitrógeno fijada por el proceso no simbiótico fluctúa entre 20 y 50 lb / acre anualmente. Esta estimación sin duda está sujeta a mucha variación, dependiendo de las condiciones peculiares de cada terreno( 48 ).

b) . Microorganismos *simbióticos* , que están en las raíces de plantas leguminosas. Una de las relaciones simbióticas más interesante e importante es la que se da entre las leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium* .

### 4.3 BIOQUIMICA DE LOS PROCESOS

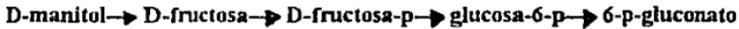
La fijación de nitrógeno requiere de la existencia de microorganismos, una fuente de poder reductor, una fuente de energía y un complejo enzimático ( que incluyen una hidrogenasa y una nitrogenasa ) en la secuencia que se señala a continuación :

4.3.1. Fuente de poder reductor. La fijación de nitrógeno es un proceso de reducción que necesita de la acción de sustancias reductoras como el ácido pirúvico, ácido  $\alpha$ -cetoglutarico o hidrógeno molecular. Existe un paralelismo estrecho entre las reacciones que llevan a cabo los organismos fotosintéticos y aquellos fijadores de nitrógeno, por lo cual se ha propuesto la hipótesis de fotoreducción del nitrógeno. El ácido pirúvico puede provenir de la fotosíntesis o de la degradación de los hidratos de carbono exógenos, suministrando el poder reductor ( 2H ) y por otra parte el acetyl fosfato que sirve para la síntesis de ATP :



La glucosa es metabolizada por vía Entner- Duodoroff y ciclo de Krebs en *R. japonicum* . Los polioles como manitol son buena fuente de carbono. Las deshidrogenasas inducibles NAD poliol se producen en cultivos de *R. meliloti* cuando crecen en medios con este compuesto . La acción de estas enzimas es oxidar a D-arabinosa a D-xilulosa y D- manitol , D-sorbitol a D-fructosa . Las enzimas inducidas manitol fructoquinasa, una isomerasa fosfoexosa y una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa fueron detectadas con ausencia de hexoquinasa ( 9 ).

La vía del manitol es la siguiente :



#### 4.3.2 Fuente de energía.

El adenosintrifosfato ( ATP ) proviene de la reacción del acetilfosfato para producir ácido acético :

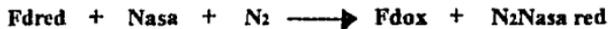


#### 4.3.3. Complejo enzimático.

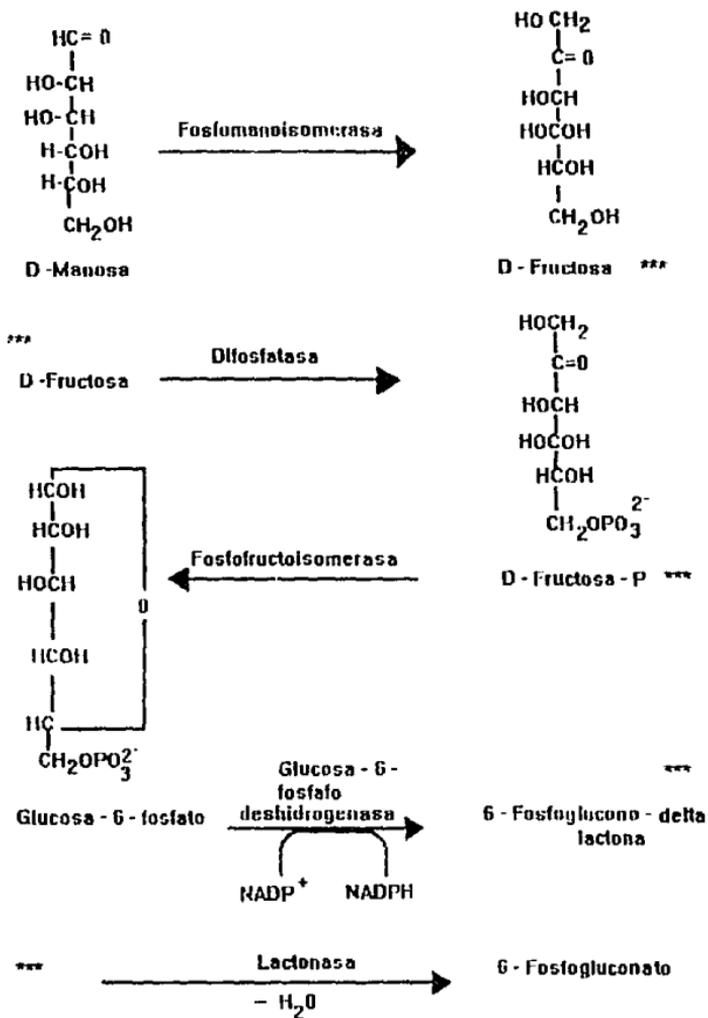
Existe un sistema que funciona como donador de hidrogeno, que incluyen una hidrogenasa y las enzimas catalizadoras de reacciones, y un segundo sistema activador de N es una nitrogenasa capaz de catalizar la reducción de nitrógeno. El hidrógeno activado por la hidrogenasa es orientado hacia la nitrogenasa por un transportador de hidrógeno ( principalmente ferredoxina ) que es una proteína que puede presentarse bajo formas moleculares reducidas u oxidadas.



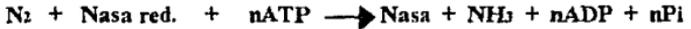
El dinitrógeno es activado por la nitrógenasa ( Nasa ) y el complejo nitrogenasa- N<sub>2</sub>, es reducido por la ferredoxina :



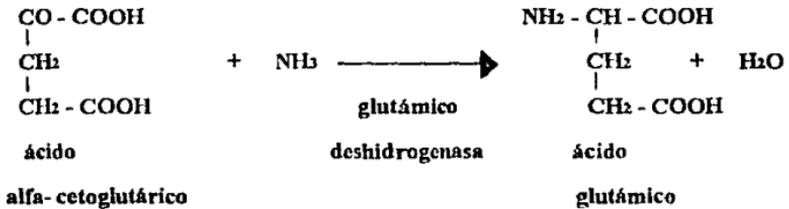
Vía del Manitol [ 43 ].



El complejo reducido acepta ATP de la reacción fijadora de energía y se libera amoníaco :



El amoníaco formado se combina con moléculas carbonadas para dar lugar a aminoácidos según las siguientes reacciones :



#### 4. 4. ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN LA FIJACION DE NITROGENO

##### 4.4.1. Nitrogenasa.

El componente I, también llamado dinitrogenasa, tiene un peso molecular de 200 - 250 kDa y contiene dos átomos de molibdeno Mo, 28 - 34 átomos de fierro Fe y de 26 a 28 puentes disulfuro ( ácidos lábiles ). Es un tetramero formado por dos monomeros alfa y dos beta, con 60 kDa cada uno. Dos genes codifican la estructura de este componente : Gene nif K y el gene nif D.

El componente II ( reductasa ) es un dímero de dos unidades iguales con masa molecular 60 kDa , con un centro de transferencia de electrones formado por 4 átomos de fierro Fe, 4 puentes disulfuro . Existe un flujo de electrones desde la reductasa a la dinitrogenasa. Esta transferencia de electrones del componente II al componente I está acoplado con el proceso de hidrólisis del Mg - ATP, que conduce a una reducción del nitrógeno molecular Fig. 3. ( 42 ).

#### 4. 4. 2. Nitrato reductasa

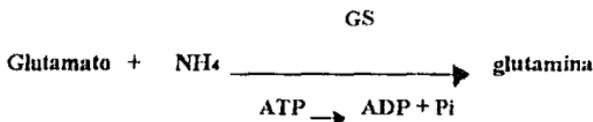
Esta enzima es una molibdeno - flavoproteína, formada por 2 subunidades idénticas de masa molecular de 200 KD . La enzima puede ser inactivada por amonio, el cianuro y altas temperaturas . En los nódulos esta enzima cataliza la reacción de nitratos a nitritos( 47 ).

#### 4. 4. 3. Nitrito reductasa

Esta enzima se induce en presencia de nitritos a nitratos. En condiciones in vitro requiere de ferredoxina como reductor. La acción enzimática conduce a la reducción de los nitritos a amonio( 47 ).

#### 4. 4. 4. Glutamina sintetasa ( Gs )

La actividad de esta enzima es influenciada por la presencia de Mg y Mn, y catalizada la reacción del glutamato a glutamina.

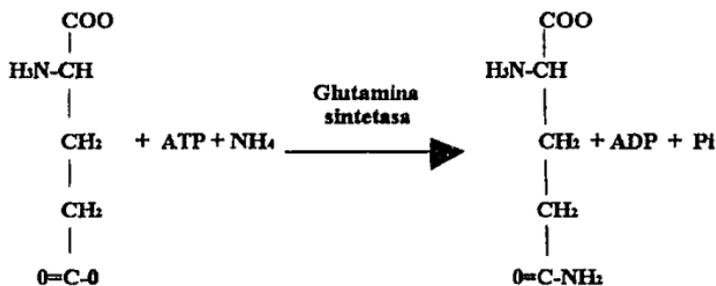


El amonio puede ser incorporado a dos diferentes tipos de grupos químicos. El primero lo constituyen las amidas que se forman por una condensación de amonio con un grupo carboxil - ATP y es catalizada por una glutamina sintetasa . El segundo tipo lo constituye el grupo  $\alpha$  - amino, que involucran una aminación reductiva de un oxoácido y requiere un agente reductor que usualmente es NADH o Fd reducida. Esto es muy importante para la biosíntesis del grupo  $\alpha$  - amino en las rutas metabólicas de proteína. La biosíntesis del grupo amino puede ser llevada a cabo por dos diferentes enzimas, la glutamato-deshidrogenasa y glutamato sintetasa( 13 ).

### Glutamina sintetasa ( 43 )

A esta enzima también se le conoce como : L - 2 - Acido aminoglutarámico.

Destoxificación cerebral. El cerebro destoxifica los iones amonio, convirtiéndolos en glutamina. El cerebro es muy rico en glutamina sintetasa, que cataliza la siguiente reacción :



glutamato

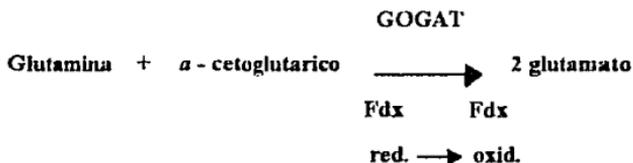
amonio

glutamina

Otros tejidos también contienen glutamina sintetasa, y los altos niveles de glutamina que se encuentran en la sangre tras la ingestión de alimentos ricos en proteínas se pueden deber a una forma de almacenaje y transporte del amoniaco. Granparte de la glutamina circulante es finalmente hidrolizada a glutamato e iones amonio por la acción de una glutaminasa renal.

#### 4. 4. 5. Glutamato sintetasa (GOGAT).

Esta enzima cataliza la formación de glutamato a partir de glutamina y ácido  $\alpha$ -cetoglutarico ( 47 ).



La enzima nitrogenasa y glutámico deshidrogenasa se encuentran en el citoplasma del bacteroide, la glutamato sintetasa en la solución del citoplasma los primeros productos orgánicos estables desde la fijación de nitrógeno en nódulos son glutamato, glutamina y asparagina que constituyen el punto final del nitrógeno en el nódulo. Este proceso tiene como resultado la presencia de altos niveles de asparagina en la sabia conducida por el xilema de varias especies de leguminosas. La asparagina es una opción lógica para el transporte de nitrógeno debido a que tiene una alta relación C : N y se sintetiza relativamente relativamente rápido. La síntesis de asparagina desde oxaloacetato usando glutamato y glutamina como donadores de nitrógeno, involucra la acción de dos enzimas :

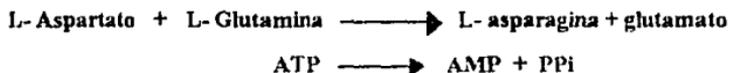
Aspartato aminotransferasa

AST





### Asparagina sintetasa

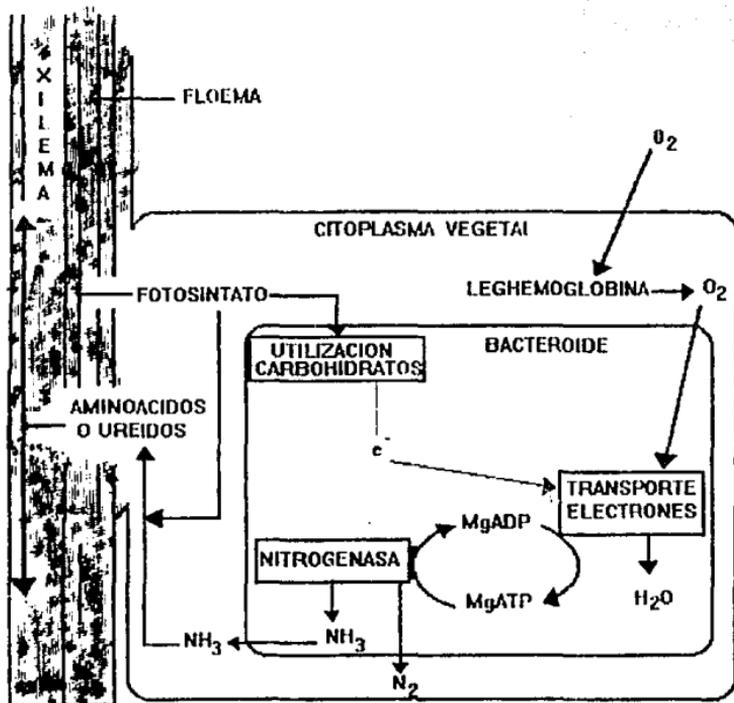


Las actividades de estas enzimas en el citoplasma del nódulo de la planta aumenta con la fijación de nitrógeno ( 13 ).

#### 4. 5. LEGHEMOGLOBINA Y PROTEINAS DE RHIZOBIUM.

En 1939 se conoce la presencia de un pigmento rojo en los nódulos de raíces parecido a la hemoglobina y , al igual que ésta, tiene la capacidad de transportar oxígeno. Esta sustancia es conocida como leghemoglobina ( lb ) y químicamente es una proteína monomérica con peso molecular de 15000 a 17000 daltons, que tiene como grupo prostético un grupo IX con un residuo de ácido propiónico . Cuatro de los heme- Fe son ocupados por átomos de nitrógeno de los núcleos tetrapirrol. La lb es la hemoproteína dominante de los nódulos efectivos de las raíces de las leguminosas y tiene un rol crítico con el aporte de oxígeno para la actividad respiratoria del bacteroide relacionado ala fijación de nitrógeno ( 29 ). Fig. No. 3, . Los bacteroides poseen un sistema respiratorio altamente eficiente en producir ATP para la acción de la nitrogenasa, que opera sólo cuando el oxígeno es suplementado en forma estabilizada y a baja concentración ( 57 ) . En su síntesis interviene el citoplasma de la planta huésped y el bacteroide. En relación con el sitio de síntesis del hem y la globina, se ha sugerido que el hem es producto de síntesis del bacteroide y la globina de la planta huésped ( 30 ).

Fig. No. 3 Diagrama esquemático de la actividad de la nitrogenasa en una célula bacteriana.



Las leghemoglobinas aisladas de diferentes especies de leguminosas presentan diferencias en composición y propiedades. Entre éstas se han encontrado variaciones en su punto isoeléctrico y en composición de aminoácidos ( 45 ). Independientemente de estas variaciones, la función de mayor importancia de la leghemoglobina es transportar oxígeno a muy bajas concentraciones hacia el bacteroide ( 9 ). La abundancia de leghemoglobina en el citoplasma asegura su mayor flujo de lb-oxigenada a través del citosol y esto se relaciona en forma directa con una mayor actividad de la nitrogenasa. Las disminuciones en el aporte de oxígeno puede disminuir la actividad nitrogenasa en 10 a 20 veces ( 57 ).

La leghemoglobina se encuentra dentro de las membranas peribacteroides y la transferencia de oxígeno al bacteroide se realiza directamente. Los gradientes de presión de oxígeno son los apropiados para que tenga lugar el ingreso por difusión facilitada, en forma similar a la postulada por los músculos ( 57, 29 ).

#### 4. 6. REGULACION DE LA FIJACION DE NITROGENO.

Los tipos de regulación que afectan la síntesis y la actividad de una enzima son determinados por el papel que juega en el metabolismo general. Los organismos han desarrollado vías metabólicas y mecanismos de control que optimizan su habilidad para lograr el máximo beneficio del ambiente en que se encuentran . Las bacterias fijadoras de nitrógeno presentan ventajas selectivas en aquellos ambientes que contienen muy poco material nitrogenado disponible.

A pesar de la utilidad potencialidad de la enzima nitrogenasa, pocas especies de bacterias la poseen debido a que su formación y mantenimiento pueden no ser viables en la mayoría de los procariotes y en todos los eucariotes. La fijación de nitrógeno requiere de : a) un bajo potencial reductor, b) varias moléculas de ATP para cada molécula de  $\text{NH}_4$  formado, c) un complejo metaloproteína, d) una sólo forma de los metales en las proteínas y e) un mecanismo para proteger la nitrogenasa al daño producido por el oxígeno. A causa de estos requerimientos, el mantenimiento y producción de esta enzima nitrogenasa es considerablemente costoso para una bacteria, lo cual contribuye a la baja incidencia de esta enzima entre los organismos vivos.

El exceso de amonio en el medio inhibe la actividad de la nitrogenasa, podría ser causado por una inactivación irreversible de la enzima. La presencia de amonio ejerce un alto grado de represión sobre la síntesis de nitrogenasa. Trabajos realizados con precursores de amonio, como urea y nitratos, en concentraciones de 1 mg/ml condujeron a una inhibición completa de la nitrogenasa . Otras fuentes nitrogenadas como aspartato, glutamato y aspargina también inhiben a la enzima nitrogenasa por el catabolismo de éstos con producción de  $\text{NH}_4$  ( 15 ).

#### 4. 7. FISILOGIA DEL PROCESO.

Las bacterias del genero Rhizobium son habitantes naturales del suelo que infectan las raíces de ciertas leguminosas. Al llevarse acabo esta infección, se desarrollan unas estructuras denominadas nódulos, donde las bacterias se dividen y fijan nitrógeno. La especie a la que pertenece un cierto Rhizobium se define por la especie de la planta que nodula y en la que es capaz de fijar nitrógeno; así pues, la bacteria que se asocia con el guisante se conoce como Rhizobium leguminosarum y , la que lo hace con trébol , Rhizobium trifolii , etcétera.

El nódulo está formado por tejidos de la planta. Algunas de las células que lo constituyen contienen bacterias englobadas en membranas dentro de su citoplasma ; estas bacterias atraviesan un proceso de diferenciación y es precisamente la forma diferenciada ( bacteroide ) la que fija el nitrógeno. El bacteroide es mayor que la bacteria, posee una forma irregular y se muestra más sensible a cambios de presión osmótica. El nódulo viene a ser, pues, un órgano producto de la simbiosis, encargado de la fijación de nitrógeno y la asimilación de este elemento. A los nódulos llegan carbohidratos producto de la fotosíntesis; de ellos se exporta a las estructuras superiores de la planta el nitrógeno fijado por el bacteroide y transformado en el citoplasma de la célula vegetal en compuestos orgánicos nitrogenados como aminoácidos o derivados de bases nitrogenadas. De este modo, el nitrógeno requerido para el crecimiento de la planta lo aporta la bacteria; la leguminosa proporciona la energía necesaria para la actividad de la nitrogenasa y para el mantenimiento del nódulo ( 51, 53 ).

#### 4.7 .1. Proceso de nodulación.

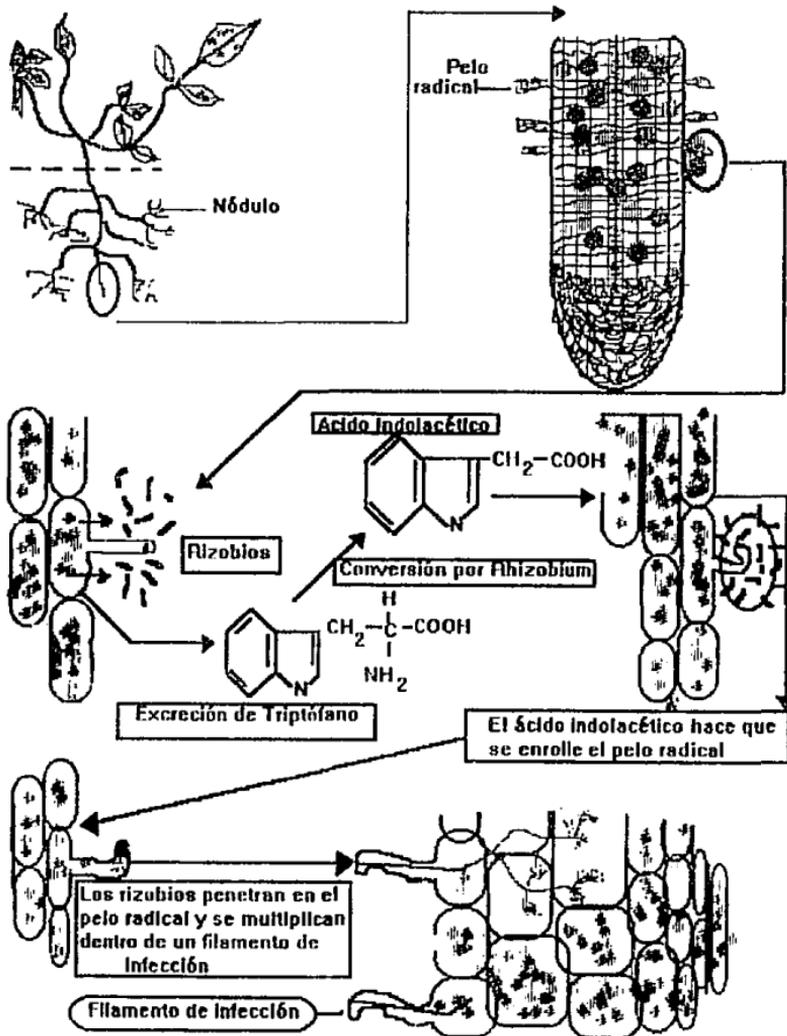
Los fenómenos observados durante el proceso de nodulación son los siguientes:

- 1) invasión de los pelos absorbentes de la raíz
- 2) avance del hilo de infección
- 3) diferenciación de la bacteria y de las células que integran el nódulo
- 4) fijación de nitrógeno, inducción de las enzimas de asimilación y distribución de amonio( 51 ). Fig. No. 4

El proceso de infección se inicia con la colonización y penetración de bacterias de Rhizobium en los pelos absorbentes de la raíz de la planta. En el momento inicial de la colonización bacteriana se establece la susceptibilidad de la planta y cuales de las cepas de Rhizobium presentes en el suelo serán competitivamente superiores para invadir y establecer la simbiosis( 53 ). La motilidad de la bacteria puede tener incidencia en el grado de colonización de las raíces por una cepa específica, aunque algunos trabajos no han encontrado diferencias entre cepas móviles y no móviles ( mutantes Tn 5- inducidas, no móviles) en efectividad de nodulación y fijación de nitrógeno ( 5, 24 ).

El inicio de la infección radical es facilitado por la producción de poligalacturonasas por la bacteria, que degradan los enlaces  $\alpha$  - 1,4 - glucosídicos de las pectinas y conducen a una pérdida en la estructura de las paredes celulares de los pelos radicales, permitiendo el ingreso del filamento de infección ( 45 ). En forma paralela, el pelo absorbente infectado presenta una deformación o enrollamiento en respuesta a la influencia de auxinas.

Fig. No. 4 Estadios en la formación de un nódulo radical



O de reguladores del crecimiento generados por la bacteria. Entre estos últimos, uno de los más estudiados es el ácido indolacético que tiene efectos hipertróficos en la raíz del vegetal e induce los cambios morfológicos característicos del proceso de nodulación ( 58 ). Las paredes del pelo se invaginan desarrollando una estructura de infección en forma de tubo interior. El filamento de infección inicial asemeja una hifa estrecha y posteriormente se ramifica desarrollando el aspecto característico del nódulo. La estructura de infección es rodeada por una pared de celulosa sintetizada por la planta huésped en respuesta a la infección. Las bacterias son liberadas en el citoplasma del simbionte, encerradas por la membrana sintetizada por el huésped, donde se multiplican entre 4 y 6 veces de la cantidad original ( 3 ). La estructura final consiste de un corazón central conteniendo las bacterias de Rhizobium y un área cortical asociado al sistema vascular de la planta ( 54 ). Posteriormente, la bacteria que ocupa el citoplasma vegetal asume una morfología particular llamada bacteroide. La mayoría de los nódulos contienen una sola cepa de bacterias, aunque pueden ser infectadas por una o más de los tres géneros ( colectivamente conocidos como rizobios ) Rhizobium, Bradyrhizobium, Azorhizobium ( 53 ). En los nódulos formados se produce ácido giberélico que tendrá efectos inhibitorios y controlará el desarrollo de los nuevos nódulos ( 45 ). El establecimiento de la simbiosis conduce a la producción de los componentes específicos del nódulo, tales como leghemoglobina producida en el citoplasma de la planta y la nitrogenasa sintetizada por el bacteroide ( 57 ).

Como se mencionó anteriormente, cada especie de *Rhizobium* puede establecer una relación simbiótica solo con ciertas especies de leguminosas. Bohloul y Schmidt ( 12 ) establecen la existencia de una correlación entre la unión de las lectinas de las plantas a receptores de superficie de *Rhizobium* y la existencia de esta especificidad. Las lectinas son proteínas que se unen a estructuras bacterianas superficiales de carbohidratos . En *Rhizobium spp* los receptores sacáridos interactúan en forma específica con las lectinas de las plantas y la naturaleza bioquímica de éstos es importante en el establecimiento de la relación. Existe una gran variedad de polisacáridos producidos por las bacterias: heteropolisacáridos acídicos, glucanos asociados a la pared,  $B - 1,2$ -glucanos y  $B - 1,4$  - glucanos, que actúan como receptores. Esta unión entre las lectinas de las plantas y carbohidratos de la superficie de las bacterias determina las leguminosas que pueden ser noduladas ( 3, 33 ). Por otra parte, la antigenicidad de las diferentes cepas de *Rhizobium* se expresa por la presencia de lipopolisacáridos ( LPS ), exopolisacáridos ( EPS) y polisacáridos capsulares ( CPS ), relacionándose en forma directa con el establecimiento de la simbiosis y la formación de nódulos efectivos ( 3, 23, 33 ). Sin embargo, algunas cepas de *Rhizobium fredii* con mutaciones deficientes en EPS y glucanos neutros fueron capaces de producir algunos nódulos eficientes en glicina máxima, indicando que ni el EPS ni los glucanos neutros son esenciales para la inducción de determinados nódulos por este caso particular ( 22,34 ).

La interacción entre las lectinas y los receptores del microorganismo puede variar entre una y otra fase de crecimiento de la bacteria. Por otra parte, existen evidencias que indican que la síntesis y/o modificaciones del receptor de la lectina en el Rhizobium puede ser afectado por el ambiente de la raíz del huésped ( 36 ). La relación simbiótica entre microorganismo y planta puede ser alterada por factores ambientales como la pérdida de nutrientes, competencia microbiana, saturación de oxígeno, pH, desecación, temperatura y salinidad del suelo ( 47, 8 ). El efecto del pH es importante en el establecimiento de la capacidad de competencia por los sitios de nodulación. Estudios realizados en phaseolu vulgaris variando el pH hacia la acidez (  $pH= 6.0$  a  $4.5$  ), usando cepas ácido tolerantes y ácido sensibles, demostraron la mayor susceptibilidad de algunas biovariedades ( 54 ). La restricción a la nodulación en tréboles a pH bajo fueron detectados al agregar sales alcalinizantes en los perfiles superiores del suelo, cuyos efectos condujeron a la proliferación en número y tamaño de nódulos efectivos( 49 ). El contenido de humedad del suelo tiene efectos sobre las bacterias de Rhizobium inoculadas, mejorando la sobrevivencia en suelos con baja humedad ( 43 ). La supervivencia de inóculos también es afectada por la acción de antibióticos o la predación por otros microorganismos ( 1 ). La utilización de fertilizantes nitrogenados en altas o bajas concentraciones pueden alterar tanto la infección como la simbiosis, lo cual se refleja en una menor producción de nódulos y materia verde por la planta.

#### 4. 7. 2. Control genético para la nodulación.

La información genética contenida en los diferentes cepas de Rhizobium controlan el proceso de nodulación. En las cepas de crecimiento rápido, la información genética es codificada en plásmidos; mientras que en las de crecimiento lento la mayoría de los genes asociados con la nodulación se localizan en los cromosomas del núcleo ( 51 ). Un plásmido simbiótico ( *Sym* ) ha sido definido como el que determina la especificidad con una leguminosa para la nodulación ( reconocimiento, infección, nodulación y fijación de nitrógeno) y contiene genes estructurales para la producción de la enzima nitrogenasa ( genes *nif* ). Estos plásmidos participan muy frecuentemente en eventos de recombinación, lo cual permite que la bacteria se adapte rápidamente a una serie de cambios que puedan ocurrir en el ambiente, por medio de una generación de nuevas funciones . En México se han logrado aislamientos de cepas de Rhizobium phaseoli simbióticamente inestables a causa de rearrreglos genéticos, que condujeron a un cambio en la estructura del plasmido *Sym* y concomitantemente una modificación en la información transportada ( 52 ).

En otras cepas de crecimiento rápido ( R. leguminosarum , R. trifolii y R. meliloti ) la regulación de los plásmidos *Sym* se localiza en los genes *nod*. En general , la bacteria requiere de la presencia de genes para la nodulación ( *nod* ) y para la especificidad de huésped ( *hcn* ). Originalmente la designación *nod* fue sugerida para los genes *hcn* . En aquellas especies de crecimiento rápido *nod* y *hcn* . ( 54 ).

En aquellas especies de crecimiento rápido *nod* y *hcn* son genes unidos, con relación cercana a los necesarios para la fijación de nitrógeno ( *fix* ) y la producción de la enzima nitrogenasa ( *nif* ) ( 53 ). Dentro de los genes de nodulación ( *nod* ) en el plásmido *Sym* se ha identificado una serie de genes denominados *nod A* , *nod B* , *nodC* , *nodD* , *nod I* , y *nod J* , mientras que para la especificidad de huésped se describen *nodE* , y *nodF*. El plásmido *Sym* en *Rhizobium meliloti* contiene 3 genes *nodD* , dos de los cuales *nodD1* y *nodD2* son requeridos para una eficiente nodulación de la planta huésped ( 51 ). Los plásmidos son megaplásmidos , y en la mayoría de los casos disponen de más de un plásmido , pudiendo presentar hasta siete. Algunos plásmidos contienen genes que codifican para la entrada de hidrógeno ( *hup* ) , otros determinan la producción de bacteriocina ( *mep* ) y su represión ( *rsp* ) , y para la producción melanina ( *mel* ) ( 53 ) .

El complejo nitrogenasa rizobial produce hidrógeno en una reacción ATP dependiente , la cual es mediada por una pérdida de energía. Las cepas de *Rhizobium* con un sistema de activación de hidrogenasa ( *hup* ) pueden reciclar parcialmente el ATP . Tales cepas son más eficientes en la fijación de nitrógeno ( 53 ) . Existen evidencias de que varios genes en las plantas controlan el desarrollo de nódulos efectivos en la raíz . El análisis del RNAm aislado de nódulos de raíces, ha demostrado la presencia de diferentes clases de RNAs específicos, que no han sido aislados en tejidos de raíces infectadas. Lo anterior indica la inducción y expresión de genes nodulares específicos, que codifican la producción de proteínas específicas denominadas nodulinas que intervienen en el proceso de nodulación.

**La expresión de los genes de leghemoglobina ( lb ) son esenciales para la fijación de nitrógeno en los nódulos, puesto que esta sustancia provee un balance en la distribución de oxígeno entre los bacteroides y el citoplasma de las plantas ( 11 ).**

## 5. DISCUSION

Existen en la atmósfera terrestre una serie de elementos como lo son: ( nitrógeno, carbono, oxígeno e hidrógeno ), tales elementos son de suma importancia desde el punto de vista biológico. El nitrógeno es el componente que existe en mayor abundancia en la atmósfera y el constituyente más importante en las proteínas y ácidos nucleicos.

Dentro de sus propiedades el nitrógeno es químicamente inerte, por dicha razón los únicos organismos capaces de utilizarlo directamente como compuesto nitrogenado son las bacterias fijadoras de nitrógeno. Los demás seres vivos dependen del metabolismo de estos microorganismos para obtener su fuente de nitrógeno. Dichas bacterias asimilan el nitrógeno molecular por medio de la enzima *nitrogenasa*, proteína que cataliza la conversión de nitrógeno en amonio hidrolizando adenosín trifosfato (ATP).

En el proceso de fijación de nitrógeno están implicados dos grupos de microorganismos:

- a). Microorganismos simbióticos, están en las raíces de plantas leguminosas
- b). Microorganismos no simbióticos, viven libre o independientemente en el suelo.

El microorganismo que tiene más importancia para el estudio de la fijación de nitrógeno es el *Rhizobium* y sus diferentes especies, ya que a partir de estos microorganismos se pueden fabricar fertilizantes biológicos utilizados en la agricultura.

Haciendo una comparación entre las moléculas que intervienen en el proceso de fijación del nitrógeno y la función que desempeña estas en las plantas y seres humanos. Nos damos cuenta de que existe una similitud en cuanto a funcionalidad y composición, tal es el caso de la leghemoglobina ( en plantas ) y hemoglobina ( en el humano ), su composición es similar y ambas transportan oxígeno.

## 6. CONCLUSIONES

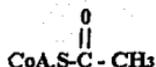
Desde el punto de vista biológico el nitrógeno atmosférico es de vital importancia por diversas razones :

- Es necesario para la biosíntesis de aminoácidos , purinas y pirimidinas
- Es un paso muy importante en el ciclo del nitrógeno.
- Dicho elemento es aprovechable en la nutrición de las plantas
- Los microorganismos pueden entrar en diversas relaciones beneficiosas con los organismos superiores. Algunas de estas relaciones son bastante casuales , mientras que otras son altamente específicas.

Por último terminaremos diciendo que en México se realizan y publican estudios sobre bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* . En instituciones de la UNAM , y el centro de investigaciones de fijación del nitrógeno, ubicado en Cuernavaca Morelos .

## ABREVIATURAS

Acil - CoA



ADP

ATP

FAD

FADH<sub>2</sub>

NAD

NADH

NADP

NADPH

PI

Derivado acilo de la coenzima A

Acetil - CoA , "acetato activado".  
forma en la que el acetato es activado por combinación con la CoA para participar en diversas reacciones.

Adenosínfosfato

Adenosíntrifosfato

Flavina adenínucleótido ( oxí ).

Flavina adenínucleótido ( red ).

Nicotinamida adenínucleótido ( oxí ).

Nicotinamida adenínucleótido ( red ).

Fosfato de nicotinamida adenínucleótido ( oxí ).

Fosfato de nicotinamida adenínucleótido ( red ).

fosfato inorgánico ( ortofosfato ).

## 7. BIBLIOGRAFIA

- (1). Acea, M.J. y M. Alexander. 1988. Survival and growth of bacterial introduced into soil. *Soil. Biol. Biochem.*, 20 : 509- 515.
- (2). Aiba, S. , A.E. Humphrey y N.F. Millis. 1973. Requirments for growth and formulation of medio. In : *Biochemical Engineering*. Academic press ( Ed. ). pp. 27- 30.
- (3). Albersheim, p. y A.J. Anderson prouty. 1975. Carbohidrates, proteins cell surfaces and the biochemistry of pathogenesis. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 26: 31- 52.
- (4). Ann C.C. Price IV. 1976. Marine Oscillatoria ( *Trichodesmium* ) : An explanation for aerobic nitrogen fixation without heterocysts. *Science* 191: 1278 - 1280.
- (5). Ames, p. y k. Bergman. 1981. competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* , 148: 728 - 729.
- (6). Auden, J. , J. Nuesch y F. Knusel. 1967. Some statiscal methods in nutrient medium optimalsation. *Path. Microbiol.* , 30: 858 - 866.
- (7). Bahl, N. y K.S. Jauhari. 1987. Spent compost as a carrier for bacterial inoculant production cultivating edible fungi. In : *Developments in crop. Science Publishers* ( Ed. ). pp. 63 - 68.

- ( 8 ). Batraa, L. y S.K. Ghai. 1988. Performance of different forage legume Rhizobium symbiotic systems under salina condition. Indian. J. Agri. Sci. , 58: 350 - 353.
- ( 9 ). Bergersen, F.J. 1973. Symbiotic nitrogen fixation by legumes. In : chemistry and biochemistry of herbage. Butler and Bailey ( Ed. ). pp. 189 - 226.
- ( 10 ). Bergersen, F.J. 1961. The growth of Rhizobiun synthetic media. August. J. Biol. Sci. , 14 : 349 - 360.
- ( 11 ). Bisseling, T., R.C. Van Den Bos y Van Kammen. 1986. Hostspecific gene expression in legume root nodules. In : Nitrogen Fixation. W.J. Broughtona Puhler ( Ed. ). pp. 280 - 312.
- ( 12 ). Bohlool, B.B. y E.L. Schmidt. 1974. Lectins : a posible basis for specificity in the Rhizobium - legume root nodule symbiosis. Science 185: 269-271.
- ( 13 ). Boland, M.J. , K.J.F. Farden y J.G. Robertson. 1980. Ammonia assimilation in nitrogen - fixing legume nodules. In : Nitrogen fixation. W.E. Newton and W.H. Orme - Johnson ( Ed. ). pp. 33- 52.
- ( 14 ). Box, G. y K.B. Wilson. 1951. On the experimental attainment of the optimum conditions . J. Roy. Stat. Soc. , B 13 : 1.
- ( 15 ). Brill, J.W. 1975. Regulation of nitrogen fixation. In : A treatise on Nitrogen. Wiley Interscience ( Ed. ). pp. 764 - 798.
- ( 16 ). Brill, J. Winston. Biological Nitrogen Fixation . Scientific American By , W.H. Freeman and company ., March 1977. 236 ( 3): pp. 68-81.
- ( 17 ). Bryan H.A. Bryan. A. Ch. Bacteriologia. Intercontinental ( Ed. ). 3a. impresión . México. D.F. 1976. pp. 142-289.

- (18). Brill, W.J. 1980. Biochemical Genetics of Nitrogen Fixation. *Microb. Rev.* (44): pp. 449-467.
- (19). Brock, T.D., D.W. Smith y M.T. Madigan. 1987. Clasificación de las bacterias según Bergey. *In*: *Microbiología*. Prentice hall (Ed.). pp. 863-867.
- (20). Brock, D. Tomas., *Microbiología*. Prentice halls (Ed.). Interamericana., cuarta edición. Barcelona España: 1987. pp. 441-451.
- (21). Burton, J.C. 1979. *Rhizobium* species. *in*: *Microbial Technology*. Peppier and Perlman (Ed.). pp. 29-55.
- (22). Cantarow. Abraham: *Bioquímica*. Interamericana. (Ed.). México 1969. pp. 532-533.
- (23). Carlson, R.W., R.E. Sanders, C. Napoli y P. Albersheim. 1978. Host-symbiont interactions. *Plant. Physiol.*, 62: 912-917.
- (24). Catlow, H.Y., A.R. Glenn y M.J. Dilworth. 1990. Does rhizobial motility affect its ability to colonize along the legume root. *Soil. Biol. Biochem.*, 22: 573-575
- (25). Clark L. George: *Enciclopedia de química*. Omega (Ed.). Barcelona. España. 1961. pp. 931-932.
- (26). Cordova, R., 1985. Evaluación de la turba nacional como soporte para inoculantes de leguminosas con cepas de *R. japonicum* tesis U.N.A.M. Facultad de Química. pp. 81.
- (27). Cotton F. Albert, Geoffrey Wilkinson, F.R.S., *Química Inorgánica avanzada*; Limusa (Ed.). México. D.F. 1981. pp. 712-732.

- (28). Cubero, J.I. y M.T. Moreno. 1983. Leguminosas de grano. In: Mundi Prensa Ed. Madrid, España. pp. 69-89.
- (29). Dilworth, M.J. and C.A. Appleby . 1977 . Legnemooglobin and Rhizobium hemoproteins . In: A Treatise on Fixation . Wiley Interscience ( Ed. ). pp. 691-763.
- (30). Dubois, M. , K.A. Giles , J.K. Hamilton , P.A. Rebers and F. Eady R. Robert. & R. Posgate John. Nitrogenase ; Nature. 249. 1974. pp. 805-812..
- (32). Graham, P.H. , V.M. Morales y R. Cavallo. 1974. Materiales excipientes y adhesibles de posibles usos en la inoculación de leguminosas. Turrialba, 24 : 125.
- (33). Halverson, L.J. y G. Stacey . 1986 . Signal exchange in plant-microbe interactions. Micobial. Rev. , 50 : pp. 193-225.
- (34). Hawley G. Gessner. Diccionario de Química y de productos químicos. Omega ( Ed. ). Barcelona . España 1993. pp. 720-723.
- (35). Hernandez, G.R. 1980. Estudio comparativo de soportes para la elaboración de inoculantes de leguminosas en México. Tesis UNAM. Facultad de química. pp. 61.
- (36). Hrabak, E.M. , M.R. Urbano y F.B. Dazzo. 1981. Growth-Phase dependement inmuno determinats of Rhizobium trifolii lipope-isaccharide Which bind trifolin A, a white clover lectin. J. Bacteriol. , 148 : 697 - 711.

- (37). Huheey, E. James. Química Inorgánica. ( Ed. ). Haria. 1980 pp. 812- 815.
- (38). Jauhri, K.S. , M. Gupta y K.V. Sadasivan. 1989. Agroindustrial Wastes. , 27: 81-86.
- (39). Jawetz. Ernest. Melnick. Joseph. Microbiología medica. ( Ed. ). Manual moderno, 13a. edición pp. 204 -206.
- (40). Joseph. A. Babor , José Ibartz. Aznarez. Química general moderna., Ed. Marín. Barcelona. España. 1974. 625-639.
- (41). J.R. Postgate. The Chemistry and Biochemistry of nitrogen fixation. Plenum Press, London. 1971. pp. 161.
- (42). Kirk E. Raymond. Othmer F. Donald. Enciclopedia de tecnología química. tomo XI., México. D.F. 1962. pp. 342-344.
- (43). Lenninger. Albert. Bioquímica. ( Ed. ). Omega. Barcelona Esp. pp. 730-735.
- (44). Mareckova, H. 1988. Bacteria for nitrogen fixation. In :Hems R. ( Ed. ). Biotechnology . pp. 219-232.
- (45). Martínez , V.R. 1986. Ciclo Biológico del Nitrógeno en el suelo In : Técnica Científica ( Ed. ). Cuba. 9-167 p.
- (46). Mora de González , N. , A. Ayunda, M. Gómez y R. González. 1986. Evaluation of some materials as carriers of Rhizobia inoculants. Turrialba, 36: 447-452.
- (47). Oaks, A y B. Hirel. 1985. Nitrogen metabolisme in roots. Ann Rev. Plant. Physiol., 36: 345-365.

- ( 48 ). Pelczar, J. Michael. Reid, D. Roger. Microbiología. ( Ed. ). Mc. Graw-Hill. 4a. Edición. México. D.F. 1984. PP. 638-642.
- ( 49 ). Rensvold, R.J. y P.E. Pope. 1987. Combined effect of Nitrogen and phosphorus on nodulation and growth Robinia pseudo-acacia . J. Can. Rech. For. , 14: 964-969.
- ( 50 ). Saint Macary, H. , P. Beunard, . D. Montange, J.P. Tranchant y S. Verniau. 1986. Setting and diffusion of a production system for legume Rhizobium inoculants. Sym., 2 : 363-366.
- ( 51 ). Sánchez, F. 1985. Fijación de nitrógeno : bioquímica, biología molecular y perspectivas de la ingeniería genética. In : Prospe- de la biotecnología en México. CONACYT México ( Ed. ). México. pp. 413-433.
- ( 52 ). Soberon-Chavez, G. , R. Najera , H. Olivera y L. Segovia. 1986. Genetic rearrangements of a Rhizobium phaseoli symbiotic plasmid. J. Bacteriol. , 167: 487-491.
- ( 53 ). Soberon-Chavez, G. Mecanismos de nodulación de las legumi- nosas. Científica Americana. 1986. 161 : pp. 6-12.
- ( 54 ). Vincent, J.M. 1980. Factors controlling the legumes- Rhizobium symbiosis. In : Nitrogen Fixation . W.E. Newton y H. Orme Johnson ( Ed. ). pp. 103-130.
- ( 55 ). Vincent, J.M. 1975. Manual práctico de Rhizobiología. In : Hemisferio Sur ( Ed. ). B. Aires. pp. 1-200.

- (56). Vincent, J.M. 1962. Influence of calcium and magnesium on the growth of Rhizobium . J. Gen. Microbiol. , 28 : 653-663.
- (57). Wittenberg , J.B. 1980. Utilization of leghemoglobin- bound oxygen by Rhizobium bacteroids. In : Nitrogen Fixation. W.E Newton. y H. Orme-Johnson ( Ed. ). pp. 53-58.
- (58). Yao, P.Y. y J.M. Vincent. 1969. Host. specificity in the root "curling factor" of Rhizobium spp . August. J. Biol. Sci. 22: pp. 413-423.