



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITROGENO: GENETICA Y REGULACION

TRABAJO ESCRITO VIA CURSOS DE EDUCACION CONTINUA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE : QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA :

CARLOS JOSE DEHMER MARIEL

83



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO:

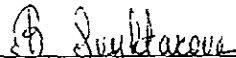
PRESIDENTE: PROF. GUADALUPE VÉLEZ PRATT
VOCAL: PROF. BISERKA SVESHTAROVA PEKARKOVA
SECRETARIO: PROF. MARÍA GUADALUPE TSUZUKI REYES
1er. SUPLENTE: PROF. MARCO ANTONIO ORTIZ JIMÉNEZ
2o. SUPLENTE: PROF. TERESA DE JESÚS OLVERA FLORES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

BIBLIOTECA FACULTAD DE QUÍMICA UNAM
HEMEROTECA FACULTAD DE QUÍMICA UNAM
BIBLIOTECA INTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS UNAM
HEMEROTECA FACULTAD DE MEDICINA UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DRA. BISERKA SVESHTAROVA PEKARKOVA



SUSTENTANTE: CARLOS JOSÉ DEHMER MARIEL



A G R A D E Z C O:

A DIOS

Por darme la vida, y por todos los dones que me has dado

A MIS PADRES

Carlos Arturo Dehmer Merkel y Raquel Mariel Herrera
Por ser mi guía, por su amor, comprensión y apoyo
incondicionales

A MI HERMANA:

Fabiola Eugenia Dehmer Mariel
Por todo su apoyo y comprensión

A MI ASESORA:

Dra. Biserka Sveshtarova Pekarkova
Por su ejemplo, sus conocimientos,
su comprensión y su paciencia

A TODOS Y CADA UNO DE MIS MAESTROS:

Por sus conocimientos y dedicación

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS:

Por su amistad y confianza

A LA UNAM:

Por darme la oportunidad de estudiar esta
Maravillosa carrera

Í N D I C E

Página

INTRODUCCIÓN	1
--------------------	---

C A P Í T U L O I

GENERALIDADES	2
1.1 Composición química de una célula	2
1.2 Nutrición microbiana	3
1.3 Nitrógeno	6
1.4 Ciclos biogeoquímicos	6
1.5 El ciclo del nitrógeno	7

C A P Í T U L O II

FIJACIÓN DE NITRÓGENO	12
2.1 El proceso de fijación de nitrógeno	12
2.2 Factores que afectan la fijación de nitrógeno.....	14
2.2.1 Molibdeno	14
2.2.2 Hierro	15
2.2.3 Calcio	15
2.2.4 Cobalto	15
2.2.5 Fuentes de energía	16
2.2.6 pH	16
2.2.7 Humedad	18
2.2.8 Temperatura	19
2.3 Fijación de N ₂ asociada con raíces	21
2.4 Nitrogenasa	22
2.4.1 Flujo de electrones en la fijación de nitrógeno	25
2.4.2 Nitrogenasas alternativas	25
2.4.3 Mecanismos de protección de la nitrogenasa	27
2.4.4 Valoración de la nitrogenasa	27
2.4.4.1 Método de la reducción del acetileno	28

2.4.4.2 Método con isótopo estable ^{15}N	29
--	----

C A P Í T U L O I I I

MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO	31
3.1 Fijación no simbiótica de nitrógeno. Microorganismos de vida libre	31
3.1.1 <i>Azotobacter</i>	31
3.1.2 <i>Azomonas</i>	36
3.1.3 <i>Beijerinckia</i>	36
3.1.4 <i>Derxia</i>	36
3.1.5 <i>Azospirillum lipoferum</i>	37
3.1.6 <i>Acetobacter diazotrophicus</i>	38
3.1.7 Bacterias fotosintéticas	38
3.1.8 Cianobacterias	38
3.1.9 Bacterias del hidrógeno	43
3.1.10 Metanótrofos	43
3.1.11 <i>Clostridium</i>	45
3.1.12 <i>Azoarcus</i>	46
3.1.13 Otras bacterias fijadoras de nitrógeno	47
3.2 FIJACIÓN SIMBIÓTICA DEL NITRÓGENO	47
3.2.1 El proceso de la fijación simbiótica del nitrógeno	47
3.2.2 Las leguminosas	48
3.2.3 El microsimbionte	48
3.2.3.1 Otras aplicaciones de los rizobia	51
3.2.4 Grupo de inoculación cruzada	51
3.2.5 Rhizobios formadores de nódulos en el tallo	55
3.3 NODULACIÓN	56
3.3.1 El proceso de nodulación	56
3.3.2 Etapas en la formación de los nódulos	57
3.3.3 Bioquímica de la fijación de nitrógeno en los nódulos	64
3.3.4 Leghemoglobina	66
3.4 SIMBIOSIS ENTRE FIJADORES DE NITRÓGENO Y PLANTAS NO LEGUMINOSAS	68
3.4.1 <i>Frankia</i>	70

C A P Í T U L O I V

GENÉTICA Y REGULACIÓN DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO	75
4.1 Genética de la fijación de nitrógeno: genes <i>nif</i>	75
4.2 Genética de la formación del nódulo: genes <i>nod</i>	79
4.3 Cooperación genética en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	83

C A P Í T U L O V

CONCLUSIONES	85
RECOMENDACIONES	86
BIBLIOGRAFÍA	87

RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS

CAPÍTULO I	Página
Figura 1.1 Visión simplificada del metabolismo celular	2
Tabla 1.1 Composición química de una célula procariótica ^a	3
Tabla 1.2 Macronutrientes en la naturaleza y en los medios de cultivo	4
Tabla 1.3 Micronutrientes (elementos traza) necesarios para organismos vivos ^a	5
Tabla 1.4 Estados de oxidación de compuestos nitrogenados clave	7
Figura 1.2 Ciclo de oxidación-reducción del nitrógeno	7
Figura 1.3 Ciclo global del nitrógeno	11
Figura 1.4 Ciclo global simplificado del nitrógeno	11
CAPÍTULO II	
Tabla 2.1 Organismos fijadores de nitrógeno	13
Tabla 2.2 Efecto de la concentración de glucosa y de la temperatura del suelo sobre la fijación de nitrógeno durante 14 días.	16
Figura 2.1 Efecto de la temperatura del suelo sobre la fijación de N ₂	19
Figura 2.2 Estructura de FeMo-co, el cofactor con hierro y molibdeno de la nitrogenasa	23
Figura 2.3 El sistema nitrogenasa. Etapas en la fijación de nitrógeno: reducción de N ₂ a 2NH ₃	24
Figura 2.4 Ensayo de la reducción del acetileno para determinación de la actividad nitrogenasa.	29
CAPÍTULO III	
Figura 3.1 <i>Azotobacter vinelandii</i> : (a) células vegetativas y (b) quistes	32
Tabla 3.1 Bacterias (fototróficas anoxigénicas) rojas y verdes ^a	33
Figura 3.2 Diversidad evolutiva de las bacterias rojas (Proteobacteria), que da lugar a organismos relacionados no fototróficos.	33
Figura 3.3 Ejemplo de producción de limo por bacterias de vida libre fijadoras de N ₂ . (a) Células de <i>Derxia gummosa</i> en el limo. (b) Colonias de especies de <i>Beijerinckia</i>	36
Tabla 3.3 Características de los géneros de las bacterias en forma de espiral ^a	37

Tabla 3.4	Géneros de bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno de vida libre ^a	37
Figura 3.4	<i>Anabaena</i> sp. mostrando los heteroquistes	39
Figura 3.5	Diversidad metabólica entre cianobacterias: los cinco principales tipos morfológicos. (a) Unicelular, <i>Gloeothoece</i> ; (b) colonial, <i>Dermocarpa</i> ; (c) filamentoso, <i>Oscillatoria</i> ; (d) heteroquiste filamentoso, <i>Anabaena</i> ; (e) ramificación filamentosa, <i>Fischerella</i>	41
Tabla 3.5	Géneros y grupos de cianobacterias	42
Tabla 3.6	Algunas características de las bacteria metanotróficas	44
Tabla 3.7	Características de algunos grupos del género <i>Clostridium</i>	45
Figura 3.6	Raíces de leguminosas bien noduladas. Izquierda, trébol rojo; derecha, soya	48
Figura 3.7	Nódulos radiculares de la soya, de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	50
Figura 3.8	Plantas de soya sin nódulos a la izquierda y con nódulos a la derecha, creciendo en un suelo pobre en nitrógeno.	50
Tabla 3.8	Principales grupos de inoculación cruzada de plantas leguminosas	52
Figura 3.9	Nódulos del tallo causados por <i>Azorhizobium</i>	56
Figura 3.10	Pasos en la formación de un nódulo radicular en una leguminosa infectada por <i>Rhizobium</i>	58
Figura 3.11	Tubo de infección y formación de nódulos radiculares. (a) Tubo de infección formado por células de <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>trifolii</i> sobre un pelo radicular de un trébol blanco (<i>Trifolium repens</i>). (b-d) Nódulos radiculares de alfalfa infectada con células de <i>Rhizobium meliloti</i> en diferentes estadios de desarrollo.	61
Figura 3.12	(a) Sección tansversal de un nódulo radicular de leguminosa. (b) Sección fina de una sola célula de un nódulo subterráneo de trébol. La célula está repleta de <i>Rhizobium trifolii</i>	62
Figura 3.13	Diagrama de las principales reacciones metabólicas y de intercambio de nutrientes que tienen lugar en el bacteroide.	65
Figura 3.14	Papel de la glutamina sintetasa en la asimilación de amoniaco	66
Figura 3.15	Sección transversal de nódulos radiculares de la leguminosa <i>Coronilla varia</i> , mostrando el pigmento rojizo de la leghemoglobina.	67
Figura 3.16	Nódulos y células de <i>Frankia</i> . (a) nódulos radiculares del aliso común <i>Alnus</i> <i>Glutinosa</i> . (b) Cultivo de <i>Frankia</i> purificado procedente de <i>Comptonia peregrina</i> .71	
Tabla 3.9	Géneros de actinomicetos y géneros relacionados (todos Gram positivos) ^a	72
Figura 3.17	Simbiosis <i>Azolla-Anabaena</i> . (asociación intacta que muestra una sola planta de <i>Azolla pinnata</i> . (b) La cianobacteria simbionte <i>Anabaena azollae</i>	74

CAPÍTULO IV

Tabla 4.1 Genes <i>nif</i> y su función	75
Figura 4.1 Estructura genética del regulón <i>nif</i> en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	76
Tabla 4.2 Genes <i>nod</i> , las proteínas que codifican y su función	79
Figura 4.2 Organización de los genes <i>nod</i> en el plásmido Sym de <i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i>	80
Figura 4.3 Factores Nod. (a) Estructura general del factor Nod producido por <i>Rhizobium</i> <i>Trifolii</i> y <i>Rhizobium meliloti</i> biovar <i>viciae</i> y (b) en la tabla las diferencias estructurales (R ₁ , R ₂) que definen el factor Nod concreto en cada especie.	81
Figura 4.4 Estructura de moléculas flavonoides que (a,b) inducen la expresión de los genes <i>nod</i> y (c) la inhiben, en <i>Rhizobium meliloti</i> biovar <i>viciae</i>	83

I N T R O D U C C I Ó N

Todo nuestro sistema de agricultura depende en muchos aspectos de las actividades microbianas. Muchas de las cosechas que obtenemos son de plantas pertenecientes a las leguminosas, que viven estrechamente asociadas con bacterias fijadoras de nitrógeno que forman en sus raíces estructuras llamadas nódulos. En estos nódulos radiculares, el nitrógeno atmosférico (N_2) es convertido en compuestos nitrogenados, los cuales son fácilmente aprovechados por las plantas y otros organismos del suelo. El nitrógeno atmosférico es utilizado por los microorganismos a través del proceso que se conoce como fijación de nitrógeno y que realizan todos los microorganismos que contienen el sistema enzimático apropiado. De este modo, la actividad bacteriana en los nódulos radiculares reduce la necesidad de costosos fertilizantes y se evita la contaminación de los suelos y el desequilibrio ecológico. Las actividades microbianas en el suelo y en las aguas transforman este elemento a formas que son fácilmente tomadas por otros organismos. Por todo lo antes mencionado, es de capital importancia el estudio de los microorganismos fijadores de nitrógeno, su genética y la regulación de la fijación de nitrógeno, para entender, mejorar y optimizar el proceso, al hacer uso de diferentes microorganismos fijadores de nitrógeno^{3,8,59}.

C A P Í T U L O I

G E N E R A L I D A D E S

1.1 Composición química de una célula

La célula contiene grandes cantidades de pequeñas moléculas así como de macromoléculas. La célula puede obtener la mayoría de las pequeñas moléculas que necesita del exterior o sintetizarlas a partir de moléculas más simples. Las macromoléculas, por el contrario, son siempre sintetizadas en la célula. Aunque hay muchos elementos en la naturaleza, prácticamente la totalidad de la masa celular está formada por sustancias con cuatro tipos de átomos: **carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno**. Estos cuatro elementos constituyen el esqueleto de las macromoléculas así como las moléculas orgánicas pequeñas. Otros elementos son menos abundantes que el **C, O, H y N**, pero son igualmente importantes para el conjunto del metabolismo. Éstos incluyen al fósforo, potasio, calcio, magnesio, azufre, hierro, zinc, manganeso, cobre, molibdeno, cobalto y otros pocos elementos, dependiendo del organismo. En la Figura 1.1 se muestra una visión simplificada del metabolismo celular^{8, 59}.

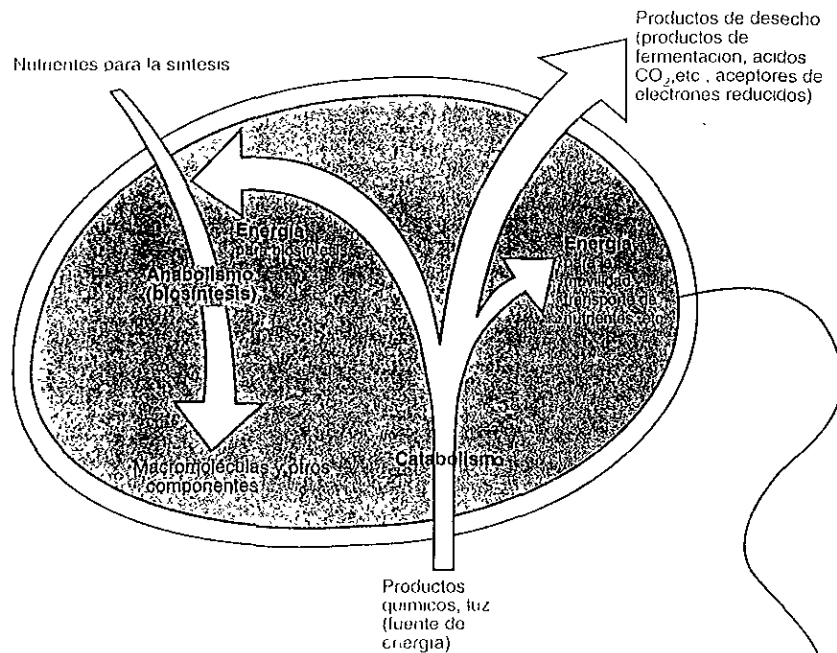


Figura 1.1 Visión simplificada del metabolismo celular

El agua representa el 90% del peso húmedo de una célula y las macromoléculas la masa global del peso seco. En la Tabla 1.1 se indica la composición química de una célula procariótica⁵⁹.

Tabla 1.1 Composición química de una célula procariótica^a

Molécula	Porcentaje de peso seco ^b	Moléculas por célula	Clases diferentes
Total de macromoléculas	96	24,610,000	~2500
Proteínas	55	2,350,000	~1850
Polisacáridos	5	4,300	2 ^c
Lípidos	9.1	22,000,000	4 ^d
DNA	3.1	2.1	1
RNA	20.5	255,500	~660
Total de monómeros	3.5		~350
Aminoácidos y precursores	0.5		~100
Azúcares y precursores	2		~50
Nucleótidos y precursores	0.5		~200
Iones inorgánicos	1		18
Total	100%		

^a Datos de Neidhardt, F. C. et al. (eds.). 1996. *Escherichia coli y Salmonella typhimurium—Cellular and Molecular Biology*, 2.^a edición, American Society for Microbiology, Washington, D. C.

^b Peso seco de una célula de *E. coli* creciendo activamente $\cong 2.8 \times 10^{-11}$ g.

^c Asumiendo que el peptidoglicano y el glucógeno son los polisacáridos mayoritarios presentes.

^d Existen diversas clases de fosfolípidos; de cada uno de ellos existen muchas formas debido a la variabilidad del ácido graso entre las especies y las condiciones de crecimiento.

1.2 Nutrición microbiana

Los nutrientes pueden ser divididos en dos clases: (1) **macronutrientes**, los que son requeridos en grandes cantidades (Tabla 1.2) y (2) **micronutrientes**, requeridos solamente en pequeñas cantidades (Tabla 1.3). Los nutrientes mayoritarios son el carbono y el nitrógeno.

La mayoría de los procariotes requieren un compuesto orgánico de algún tipo como fuente de carbono. Estudios nutricionales han demostrado que muchas bacterias pueden asimilar varios compuestos de carbono orgánico y utilizarlos para fabricar material celular. Un incontable número de compuestos tales como aminoácidos, ácidos grasos y compuestos aromáticos pueden ser usados por una bacteria u otra. En peso seco, una célula típica consta de aproximadamente 50% de carbono y a su vez este es el elemento mayoritario de las macromoléculas^{3,8,59}.

En la Tabla 1.2 se enlistan los macronutrientes en la naturaleza y en los medios de cultivo⁵⁹.

Tabla 1.2 Macronutrientes en la naturaleza y en los medios de cultivo

Elemento	Forma habitual del nutriente en el ambiente	Forma química utilizada en medios de cultivo
Carbono (C)	CO ₂ , compuestos orgánicos	Glucosa, malato, acetato, piruvato cientos de otros compuestos o mezclas complejas (extracto de levadura, peptona, etc.)
Hidrógeno (H)	H ₂ O, compuestos orgánicos	H ₂ O, compuestos orgánicos
Oxígeno(O)	H ₂ O, O ₂ , compuestos orgánicos	H ₂ O, O ₂ , compuestos orgánicos
Nitrogeno (N)	NH ₃ , NO ₃ ⁻ , N ₂ , compuestos orgánicos nitrogenados	<i>Inorgánicos:</i> NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KNO ₃ , N ₂ <i>Orgánicos:</i> aminoácidos, bases nitrogenadas de nucleótidos, otros muchos compuestos orgánicos que contienen N
Fósforo(P)	PO ₄ ³⁻	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄
Azufre (S)	H ₂ S, SO ₄ ²⁻ , compuestos orgánicos azufrados, sulfuros metálicos (FeS, CuS, ZnS, NiS, etc.)	Na ₂ SO ₄ , Na ₂ S ₂ O ₃ , Na ₂ S, compuestos orgánicos azufrados
Potasio (K)	K ⁺ en solución o como sales K	KCl, KH ₂ PO ₄
Magnesio (Mg)	Mg ²⁺ en solución o como sales de Mg	MgCl ₂ , MgSO ₄
Sodio (Na)	Na ⁺ en solución o como NaCl u otras sales de Na	NaCl
Calcio (Ca)	Ca ²⁺ en solución o como CaSO ₄ u otras sales de Ca	CaCl ₂
Hierro (Fe)	Fe ²⁺ or Fe ³⁺ en solución o como FeS, Fe(OH) ₃ , u otras sales de Fe	FeCl ₃ , FeSO ₄ , varias soluciones de Fe quelado con EDTA, citrato, etc.

Aunque los micronutrientes (elementos traza) son requeridos en muy pequeñas cantidades son, sin embargo, tan importantes como los macronutrientes para la función celular. Los micronutrientes son metales, muchos de los cuales forman parte de enzimas que son los catalizadores celulares. La tabla 1.3 resume los micronutrientes más importantes de sistemas vivos, ejemplificando aquellas enzimas en las que desempeñan un papel importante.

Debido a que el requerimiento de elementos traza es muy pequeño, para el cultivo de microorganismos en el laboratorio se hace innecesario su adición al medio. Sin embargo, si un medio contiene compuestos químicos altamente purificados y disueltos en agua destilada de alta

pureza, puede ocurrir una deficiencia de elementos traza. En tales casos se añade una pequeña cantidad de éstos. (Tabla 1.3) al medio para que estén disponibles los metales necesarios.

En la Tabla 1.3 se indican los micronutrientes (elementos traza) necesarios para organismos vivos⁵⁹.

Tabla 1.3 Micronutrientes (elementos traza) necesarios para organismos vivos^a

Elemento	Función celular
Cromo (Cr)	Requerido por los mamíferos para el metabolismo de la glucosa, no se conoce microorganismo que lo requiera
Cobalto (Co)	Vitamina B ₁₂ ; transcarboxilasa (bacterias del ácido propiónico)
Cobre (Cu)	Ciertas proteínas, como son las implicadas en la respiración, como citocromo c oxidasa; o en la fotosíntesis como, por ejemplo, la plastocianina, algunas superóxido dismutasas
Manganeso (Mn)	Activador de muchas enzimas; presente en algunas superóxido dismutasas o en la enzima que rompe el agua del fotosistema II, en los fototrofos oxigénicos
Molibdeno (Mo)	Presente en varias enzimas que contienen flavina; también en nitrogenasa, nitrato reductasa, sulfito oxidasa, DMSO-TMAO reductasas, algunas formato deshidrogenasas, oxotransferasas
Níquel (Ni)	La mayoría de las hidrogenasas, coenzima F ₄₃₀ de los metanógenos; la deshidrogenasa de monóxido de carbono; ureasa
Selenio (Se)	Formato deshidrogenasa; algunas hidrogenasas, el aminoácido selenocisteína
Tungsteno (W)	Algunas formato deshidrogenasas, oxotransferasas de los hipertermófilos (por ejemplo aldehído. ferredoxina oxidoreductasa de <i>Pyrococcus furiosus</i>)
Vanadio (V)	Vanadio nitrogenasa; bromoperoxidasa
Zinc (Zn)	Presente en las enzimas anhidrasa carbónica, alcohol deshidrogenasa, RNA y DNA polimerasas y muchas proteínas que unen DNA
Hierro (Fe) ^b	Citocromos, catalasas, peroxidasas, proteínas con hierro y azufre (por ejemplo la ferredoxina), oxigenasas, todas las nitrogenasas

^aNo todos los micronutrientes indicados son requeridos por todas las células; algunos se encuentran sólo en microorganismos muy específicos.

^bEs necesario en mayores cantidades que otros metales. Normalmente no se le considera elemento traza.

1.3 Nitrógeno

Después del carbono, el siguiente elemento más abundante en la célula es el nitrógeno. Una bacteria típica contiene aproximadamente el 12% de nitrógeno (peso seco) y a su vez el nitrógeno es un componente mayoritario de proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares. El nitrógeno se encuentra en la naturaleza tanto en forma orgánica como inorgánica (Tabla 1.2). Sin embargo, la globalidad del nitrógeno utilizable está en forma **inorgánica**, bien como amoníaco (NH_3), nitrato (NO_3^-) o N_2 . La mayoría de las bacterias pueden utilizar amoníaco y muchas además nitrato. El nitrógeno molecular (gas), sin embargo, puede ser fuente de nitrógeno para un reducido grupo de bacterias (**bacterias fijadoras de nitrógeno**)^{3,8,59}.

1-4 Ciclos biogeoquímicos

La energía entra en los ecosistemas en forma de luz solar, carbono orgánico o sustancias inorgánicas reducidas. La luz es utilizada por los organismos fototróficos para sintetizar materia orgánica nueva, que, además de carbono, también contiene nitrógeno, azufre, fósforo, hierro y muchos otros elementos. Esta materia orgánica sintetizada, junto con la que penetra en el ecosistema desde el exterior (materia orgánica **alóctona**), y con sustancias inorgánicas, determina las actividades metabólicas de los organismos quimioorganotrofos y quimiolitotrofos, cuya diversidad metabólica es muy grande. En relación a los elementos químicos clave de los sistemas vivos, podemos definir como **ciclo biogeoquímico** aquél en el cual el elemento químico experimenta cambios en su estado de oxidación al moverse dentro del ecosistema. Los microorganismos intervienen activamente en los ciclos biogeoquímicos y en muchos casos son los únicos agentes biológicos capaces de regenerar formas de un elemento utilizable por otros organismos, especialmente por plantas⁵⁹.

1.5 EL ciclo del nitrógeno

El elemento nitrógeno, N, constituyente básico del protoplasma, se encuentra en varios estados de oxidación. En la Tabla 1.4 se indican los estados de oxidación de compuestos nitrogenados clave⁵⁹.

Tabla 1.4 Estados de oxidación de compuestos nitrogenados clave

Compuesto	Estado de oxidación
Nitrógeno orgánico (R—NH ₂)	-3
Amoníaco(NH ₃)	-3
Gas nitrógeno (N ₂)	0
Óxido nitroso (N ₂ O)	-1 (media por N)
Óxido de nitrógeno (NO)	+2
Nitrito(NO ₂ ⁻)	+3
Dióxido de nitrógeno (NO ₂)	+4
Nitrato (NO ₃ ⁻)	+5

Los principales procesos de transformación microbiana del nitrógeno, están resumidos en el ciclo de oxidorreducción que muestra la Figura 1.2⁵⁹.

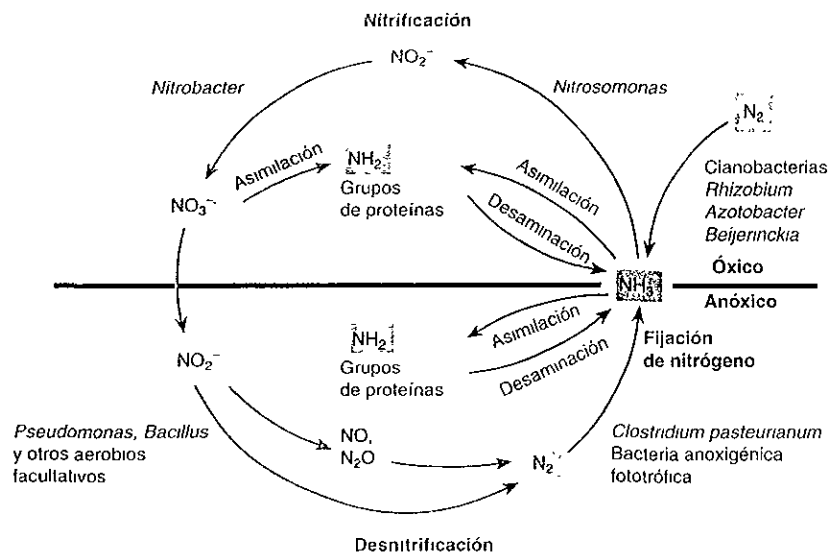


Figura 1.2 Ciclo de oxidación-reducción del nitrógeno

Varias de las reacciones clave de oxidorreducción del nitrógeno que tienen lugar en la naturaleza las llevan a cabo casi exclusivamente microorganismos, por lo que su participación en el ciclo del nitrógeno es de gran importancia. Desde el punto de vista de la termodinámica, el nitrógeno gaseoso, N_2 , es la forma más estable de este elemento, y a la que revierte el nitrógeno en condiciones de equilibrio. Esto explica que el reservorio más importante de nitrógeno de la Tierra sea la atmósfera. Contrasta con el caso del carbono, que tiene en la atmósfera un reservorio de poca importancia (CO_2 , CH_4). La gran cantidad de energía necesaria para romper el enlace $N\equiv N$ del nitrógeno molecular significa que la reducción de N_2 es un proceso que requiere gran cantidad de energía. Sólo un número de organismos relativamente reducido puede utilizar N_2 , en el proceso que se conoce como **fijación de nitrógeno**. Por tanto, el reciclado del nitrógeno de la Tierra requiere, en gran parte, las formas más fácilmente convertibles, amoníaco y nitrato. Sin embargo, dado que el N_2 constituye, con mucho el mayor reservorio de nitrógeno disponible para los seres vivos, la capacidad de utilizarlo reviste una gran importancia ecológica. En muchos ambientes, la productividad está limitada por el pequeño aporte de compuestos de nitrógeno combinado, lo que hace muy ventajosa la fijación biológica del nitrógeno^{3,8,59}.

La disponibilidad biológica de nitrógeno, fósforo y potasio es de considerable importancia económica porque son los principales nutrientes vegetales que se derivan del suelo. De los tres, el nitrógeno es el más susceptible a las transformaciones microbianas. Este elemento es la unidad estructural clave de la molécula de proteína sobre la cual se basa toda la vida y por consiguiente es un componente indispensable del protoplasma de plantas, animales y microorganismos. Debido a la posición crítica del suministro de nitrógeno en la producción de cultivos y en la fertilidad del suelo, una marcada deficiencia reduce la producción y la calidad de las cosechas; y también a causa de que es uno de los pocos nutrientes del suelo que se pierde por volatilización así como por lixiviación, requiere de una conservación y mantenimiento constantes.

El nitrógeno sufre un número de transformaciones que involucran a compuestos orgánicos, inorgánicos y volátiles. Estas transformaciones ocurren simultáneamente pero a menudo los pasos

individuales efectúan objetivos opuestos. Las reacciones pueden verse en términos de un ciclo en el cual el elemento es manejado a discreción por la microbiota. Una pequeña parte del gran reservorio de N_2 en la atmósfera es convertido en compuestos orgánicos por algunos microorganismos de vida libre o por una asociación planta-microorganismo que torna al elemento directamente aprovechable por la planta. El nitrógeno presente en las proteínas o ácidos nucleicos de los tejidos vegetales es usado por los animales. En el cuerpo animal el nitrógeno se convierte a otros compuestos simples y complejos. Cuando los animales y las plantas son sujetos a la degradación microbiológica, el nitrógeno orgánico es liberado como amonio que a su vez es utilizado por la vegetación o es oxidado a nitrato. Este último ion puede perderse por lixiviación, servir como nutriente vegetal o puede ser reducido alternativamente a amonio o a N_2 gaseoso, que escapa a la atmósfera, completando así el ciclo. La presente exposición está relacionada con el ciclo del nitrógeno en hábitats terrestres, pero la misma secuencia general se lleva a cabo en medios acuáticos.

Las partes del ciclo del nitrógeno dirigidas por el metabolismo microbiano están compuestas de varias transformaciones individuales. En la **mineralización** del nitrógeno parte de la gran reserva de compuestos orgánicos en el suelo es descompuesta y convertida a iones inorgánicos que son usados por las plantas como amonio y nitrato. La mineralización microbiana da como resultado la degradación de las proteínas, polipéptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos y otros compuestos orgánicos. Contrastando con la conversión de sustancias complejas a simples está la **inmovilización del nitrógeno** o **asimilación**. La inmovilización microbiológica lleva a la biosíntesis de moléculas complejas del protoplasma microbiano a partir del amonio y nitrato. La mineralización de nitrógeno orgánico y la asimilación por la microflora de los iones inorgánicos sucede simultáneamente. Como consecuencia, en la mineralización se producen amonio y nitrato y desaparece el nitrógeno orgánico. Estos productos delimitan dos procesos microbiológicos distintos: **amonificación**, en donde el amonio se forma a partir de compuestos orgánicos y **nitrificación**, término que usualmente se adopta para referirse a la oxidación del amonio a nitrato y nitrito.

El nitrógeno, una vez en forma de nitrato, puede perderse del suelo de varias formas. A causa de su solubilidad en la solución del suelo, el nitrato se mueve fácilmente colocándose por debajo de la zona de penetración radicular. El nitrato y el amonio serán excluidos para satisfacer la demanda de nutrientes de la cubierta vegetal. La fuga biológica más grande, en el otrora ciclo cerrado en el suelo, la constituye la **desnitrificación**, donde el nitrógeno es excluido completamente del reservorio de fácil accesibilidad pues el producto final de la desnitrificación, el N_2 no es utilizable por la mayoría de los macro y microorganismos.

Cualquier ruptura en el ciclo disminuye la reserva del nitrógeno del suelo y eventualmente puede tener efectos drásticos en la economía agrícola del hombre. Pero como la fuga hacia la atmósfera es omnipresente, debe existir un proceso inverso para mantener el balance; de otra manera la reserva mundial de nitrógeno estaría disminuyendo continuamente. Aunque inactivo en lo que concierne a vegetales, animales y muchos microorganismos, ciertos microorganismos actúan sobre N_2 , algunas veces en simbiosis con plantas superiores que pueden usarlo como fuente de nitrógeno para su crecimiento. Este proceso, **fijación de nitrógeno**, da como resultado la acumulación de nuevos compuestos orgánicos en las células de los organismos responsables. Una vez fijado de esta manera, el N_2 se introduce de nuevo a la circulación general cuando las nuevas células formadas son a su vez mineralizadas³.

Por medio de estas reacciones, la microbiota subterránea regula el abastecimiento y dirige la disponibilidad y naturaleza química del nitrógeno en el suelo. En la Figura 1.3 se muestra el Ciclo global del nitrógeno. No se dan los compartimentos ni los flujos de menor importancia. Todas las cifras tienen que multiplicarse por 10^{15} para obtener gramos de nitrógeno (escala global)⁵⁹.

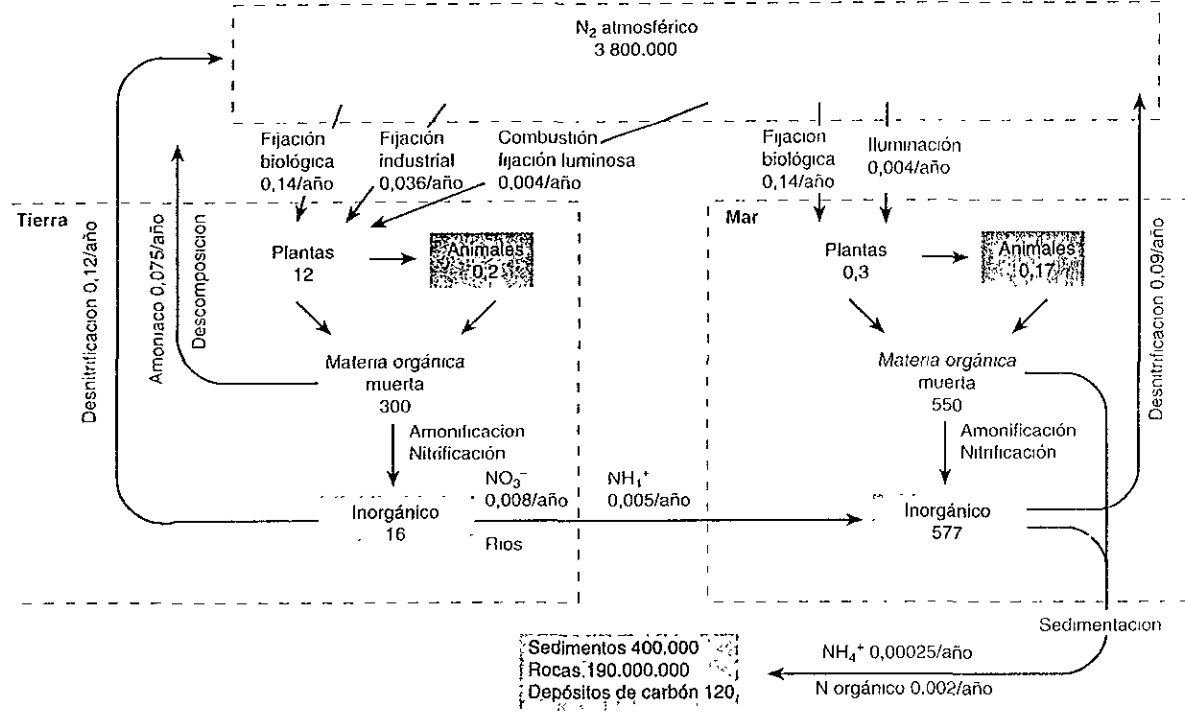


Figura 1.3 Ciclo global del nitrógeno

Todas las cifras tienen que multiplicarse por 10^{15} para obtener gramos de nitrógeno (escala global)⁵⁹.

La figura 1.4 muestra el ciclo global del nitrógeno de manera simplificada³.

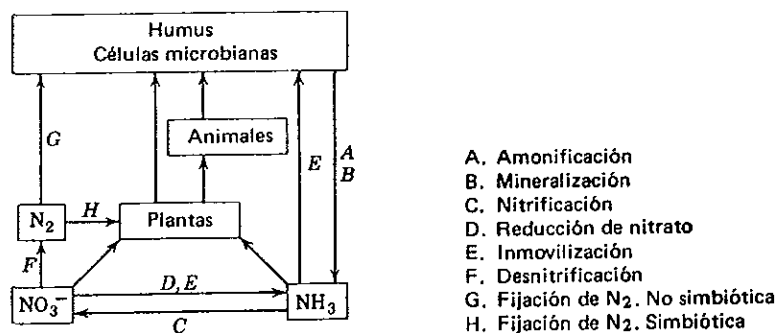


Figura 1.4 Ciclo global simplificado del nitrógeno

La transferencia de nitrógeno hacia y desde la atmósfera ocurre en gran parte en forma de N_2 , con una menor transferencia en forma de óxidos nitrosos, N_2O y NO , y amoníaco gaseoso, NH_3 . La transferencia entre el compartimento terrestre y el acuático es principalmente como nitrógeno orgánico, ion amonio e ion nitrato³.

C A P Í T U L O II

FIJACIÓN DE NITRÓGENO

2.1 El proceso de fijación de nitrógeno

La utilización de nitrógeno gaseoso (N_2) como una fuente de nitrógeno se denomina **fijación de nitrógeno** y es una propiedad exclusiva, realizada por grupos filogenéticamente diversos de organismos procariontes pertenecientes a *Bacteria* y *Archaea*^{22,98}. La tabla 2.1 presenta una lista abreviada de organismos fijadores de nitrógeno y puede apreciarse que una gran variedad de procariotas, aerobios y anaerobios, fijan nitrógeno. Además, existen bacterias, llamadas **simbióticas**, que sólo fijan nitrógeno en asociación con ciertas plantas. Hasta hoy en día, no se conoce ningún organismo **eucariota** que fije nitrógeno^{3,8,59}.

Aunque en grado muy pequeño, la fijación de nitrógeno puede ocurrir químicamente en la atmósfera, mediante, las descargas eléctricas de los rayos. Una cierta cantidad también se obtiene en la producción industrial de abonos nitrogenados (indicada como fijación industrial en la Figura 1.4), o durante procesos de combustión artificial, puesto que el aire contiene un 78% en peso en N_2 y cualquier combustión a alta temperatura de algo de N_2 producirá óxidos de nitrógeno y finalmente nitrato. Sin embargo, como puede calcularse a partir de los flujos que se indican en la figura 1.4, aproximadamente el 85% de la fijación de nitrógeno en la Tierra es de origen biológico. Como puede calcularse también a partir de la Figura 1.3, aproximadamente el 60% de la fijación biológica del nitrógeno tiene lugar en el medio terrestre y el otro 40% en el mar⁵⁹.

Los microorganismos que asimilan nitrógeno molecular son únicos biológicamente, ya que utilizan un gas que se considera relativamente inerte. La enzima específica que se combina y activa al gas comúnmente no reactivo se llama **nitrogenasa**. La presión parcial de N_2 a la cual se lleva a cabo la fijación a la mitad de la velocidad máxima es aproximadamente de 0.02 atmósferas para *Azotobacter*, *Rhodospirillum* y *Nostoc*, 0.03 atmósferas para *Clostridium* y 0.05 atmósferas para el

sistema simbiótico *Rhizobium*-trébol rojo. La incorporación de N₂ más rápida se lleva a cabo a concentraciones algo más elevadas del gas y la velocidad es apreciablemente más lenta por debajo de 0.02 y 0.05 atmósferas³.

Tabla 2.1 Organismos fijadores de nitrógeno

Aerobios libres		
Quimio-organotrofos	Fototrofos	Quimio-litotrofos
Bacterias: <i>Azobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> * <i>Beijerinckia</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Mycobacterium flavum</i> <i>Azospirillum lipoferum</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Acetobacter diazotrophicus</i> <i>Methylomonas</i> <i>Methylococcus</i>	Cianobacterias (varias, pero no todas)	<i>Alcaligenes</i> <i>Thiobacillus</i> (algunas especies)
Anaerobios libres		
Quimio-organotrofos	Fototrofos	Quimio-litotrofos
Bacterias: <i>Clostridium</i> spp. <i>Desulfovibrio</i> <i>Desulfotomaculum</i>	Bacterias: <i>Chromatium</i> <i>Thiocapsa</i> <i>Chlorobium</i> <i>Rhodospirillum</i> <i>Rhodospseudomonas</i> <i>Rhodomicrobium</i> <i>Rhodopila</i> <i>Rhodobacter</i> <i>Heliobacterium</i> <i>Heliobacillus</i> <i>Heliophilum</i>	Archaea: <i>Methanosarcina</i> <i>Methanococcus</i>
Simbióticos		
Plantas leguminosas	Plantas no leguminosas	
Soja, guisante, trébol, etc., en asociación con una bacteria del género <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , o <i>Azorhizobium</i>	<i>Alnus</i> , <i>Myrica</i> , <i>Ceanothus</i> , <i>Comptonia</i> , <i>Casuarina</i> ; en asociación con actinomicetos del género <i>Frankia</i>	
*La fijación de N ₂ ocurre sólo bajo condiciones anóxicas.		

2.2 Factores que afectan la fijación de nitrógeno

Un gran número de factores ambientales rigen la tasa y magnitud de la fijación de N_2 no simbiótica y la transformación está marcadamente afectada por las características físicas y químicas del hábitat. Se ha obtenido bastante información a partir de investigaciones en cultivos puros y algunas veces es posible la extrapolación al campo³.

Los microorganismos que asimilan N_2 tienen la capacidad de utilizar amonio y algunas veces nitrato y otras formas combinadas de nitrógeno. En realidad, las sales de amonio son usadas preferentemente y frecuentemente en una proporción más grande que el nitrógeno molecular, por lo que la presencia de amonio inhibe en efecto la fijación, es decir, las bacterias usan las sales de nitrógeno más que el N_2 atmosférico. El amonio o los compuestos transformados a éste, por ejemplo urea o nitrato, son más efectivos en la inhibición de la fijación en cultivo, pero determinado número de aminoácidos tienen una influencia perjudicial menos marcada. En concentraciones moderadas o altas, el nitrato y el amonio inhiben la fijación de N_2 tanto en el suelo como en cultivo; sin embargo, conforme el nivel de amonio libre o de nitrato desciende a una concentración baja, debido a la asimilación microbiana del elemento, la utilización del N_2 se reanuda. Es probable que muchos suelos puedan mantener la fijación cuando el nitrato o el amonio disponibles estén presentes en niveles bajos^{3,8,59}.

Para el desarrollo de los microorganismos se necesitan muchos nutrientes inorgánicos, sólo algunos cuantos están implicados en el metabolismo del N_2 , es decir, son indispensables para la proliferación dependiente de N_2 . Algunos se requieren en menores cantidades para el crecimiento. El molibdeno, hierro, calcio y cobalto son críticos para la reacción de fijación^{3,8,59}.

2.2.1 Molibdeno

El molibdeno se requiere para el metabolismo del N_2 , pero los microorganismos no usarán nitrato de la misma forma a menos que el molibdeno esté presente, aunque el requerimiento de molibdeno para la utilización del nitrato es menor que para la fijación de N_2 . Sin embargo, el crecimiento en

sales de amonio se lleva a cabo rápidamente en ausencia de molibdeno. En algunos organismos, el vanadio reemplazará al molibdeno, pero nunca es tan efectivo^{3,59}.

2.2.2 Hierro

De igual manera, las sales de hierro están implicadas en el metabolismo del N₂ en *Azotobacter*, *Clostridium*, cianobacterias y *Klebsiella*, aunque el requerimiento específico para el metabolismo del N₂ frecuentemente es difícil de establecer, debido a que se requiere hierro en un menor grado para el crecimiento en compuestos de nitrógeno combinado. Debido al uso de medios deficientes en hierro o molibdeno o ambos, se ha observado una estimulación de azotobacterias por humus o extracto de suelo³.

2.2.3 Calcio

También se ha demostrado un requerimiento de calcio por cianobacterias y algunas especies de *Azotobacter* durante la asimilación del N₂, aunque el calcio pueda ser reemplazado algunas veces por estroncio. También se requiere de calcio para el crecimiento en compuestos de nitrógeno combinado, pero la necesidad es menor que para cultivos que crecen con N₂³.

2.2.4 Cobalto

De la misma manera, los organismos que usan N₂ deben tener cobalto disponible, aunque una concentración menor de este elemento puede ser esencial para el crecimiento en nitrógeno combinado. En *Azotobacter*, *Beijerinchia*, *Clostridium* y algunos géneros de cianobacterias se ha establecido un papel para el cobalto dentro del proceso³.

2.2.5 Fuentes de energía

La disponibilidad de fuentes de energía es un factor importante que limita la tasa y extensión de la asimilación del N₂ por poblaciones heterótrofas. De esta manera, la adición de azúcares simples, celulosa, paja o residuos vegetales con proporciones C:N altas, frecuentemente aumentan de manera marcada la transformación, ya sea en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. La cantidad de nitrógeno ganado está relacionada con la cantidad de carbono agregado y con la temperatura predominante; las poblaciones del suelo pueden asimilar de 1.0 a 30 mg de N₂ por gramo de fuente de carbono. Debido a que las especies activas deben competir por las fuentes de energía con otras poblaciones, mientras más competitivo sea el organismo activo más grande será la ganancia de nitrógeno^{3,8,59}. En la Tabla 2.2 se muestra el efecto de la concentración de glucosa y de la temperatura del suelo sobre la fijación de nitrógeno durante 14 días³. Se observa que a mayor concentración de glucosa hay mayor fijación de nitrógeno y que, 15°C es la temperatura óptima, mientras que a 25°C y 35°C, la fijación de nitrógeno disminuye.

Tabla 2.2 Efecto de la concentración de glucosa y de la temperatura del suelo sobre la fijación de nitrógeno durante 14 días.

Glucosa agregada	mg de N ₂ fijado/kg de suelo		
	15°C	25°C	35°C
%			
0.00	2.0	0.9	1.3
0.04	3.7	0.7	1.3
0.20	4.4	1.7	1.6
1.00	34.3	33.5	12.4

2.2.6 pH

El pH predominante tiene una marcada influencia en la abundancia de estos organismos. Por ejemplo, *Azotobacter* es característicamente sensible a altas concentraciones del ion hidrógeno. Las investigaciones ecológicas muestran que a pesar de la amplia distribución de bacterias del género, muchos suelos no contienen ninguna o el número es insignificante. Su ausencia está asociada directamente con el pH. Como regla general los ambientes que presentan una acidez mayor a la de

un pH de 6 están libres de organismos o contienen muy pocas azotobacterias. De igual manera., las bacterias generalmente no crecerán ni fijarán N₂ en un medio de cultivo que tenga un pH menor que 6.0, aunque alguna variante ocasional tolerará concentraciones más altas del ion hidrógeno. Las especies de *Beijerinckia* no poseen la sensibilidad de las azotobacterias a la acidez y se desarrollan y fijan el N₂ en intervalos de pH de 3 a 9. Sin embargo, las cianobacterias se desarrollan pobremente en medios de cultivo y son escasas en suelos con acidez mayor a un pH de 6.0. En una investigación típica se encontró que las cianobacterias que utilizan N₂ son raras en suelos ácidos de bosques, escasez que sugiere que estos organismos no pueden adicionar nitrógeno a bosques establecidos en regiones con valores de pH bajos. La tolerancia a la acidez de *Clostridium* es intermedia entre la de *Azotobacter* y *Beijerinckia*.³

María F. del Papa, y colaboradores, aislaron y caracterizaron rhizobia de alfalfa nodulada de suelos ácidos de diferentes regiones del centro de Argentina y Uruguay. De un total de 465 aislamientos, los rhizobia fueron caracterizados por su tolerancia a pH ácido. 15 de las cepas aisladas fueron capaces de crecer a pH 5.0 y formaron nódulos en alfalfa (*Medicago sativa*) con una tasa baja de fijación de nitrógeno¹⁷. Los estudios con rRNA 16S y con PCR con los iniciadores MBOREP1 y BOXC1, demostraron que los aislamientos tenían una relación estrecha con la cepa de *Rhizobium sp. Or191* aislada en un suelo ácido de Oregon²⁶.

Grandes áreas de tierras cultivadas en la región central de Argentina se han acidificado progresivamente desde hace 10 a 20 años. Uno de los principales factores que favorecen la acidificación de los suelos es la sobreexplotación de las tierras sin que exista rotación de cultivos³⁴. Se ha identificado que la simbiosis limitada a pH bajo es consecuencia de varios factores que afectan: a la planta hospedera^{37, 38}, la población de rhizobia⁵⁷ y la interacción simbiótica misma^{10,63,73}. Los primeros estudios hechos por Munns^{63,64}, en los que comparó el progreso de la simbiosis en condiciones neutras y ácidas, concluyó que las primeras etapas de la preinfección son las más sensibles a la acidificación⁶³. Esta observación coincide con los resultados publicados por Caetano Anollés y colaboradores en 1989, donde se muestra una influencia negativa del pH bajo en

la invasión bacteriana a las raíces. La mayoría de las investigaciones han sido para caracterizar la fisiología de la interacción^{10,35,36,38,39} y los efectos de la acidez, en el laboratorio y en experimentos de campo¹, y más recientemente se han dirigido a la identificación de los determinantes bacterianos de la ácido tolerancia^{29,89,90}.

Dentro de los rhizobia, las cepas de *Sinorhizobium meliloti* están entre las más tolerantes a pH ácido^{9,30}. La mayoría de los aislamientos de *Sinorhizobium meliloti* toleran pH ácido en el intervalo entre pH 5.5 a 6.0²⁵.

La caracterización de los cultivos de alfalfa en suelos ácidos ha mostrado la nodulación específica de *Sinorhizobium meliloti* y la cepa *Or191* originaria de Oregon^{13,15}, genéticamente similar a cepas de *Rhizobium phaseoli* tipo I^{15,93}, reclasificadas como *Rhizobium etli*^{32,45}.

2.2.7 Humedad

Frecuentemente, la tasa de fijación está determinada por la humedad del suelo. Las ganancias son insignificantes cuando hay poco agua disponible, pero la tasa y la magnitud del proceso se incrementa conforme la humedad empieza a ser más abundante. Algunas veces, la actividad es grande a la capacidad de campo o cerca de ésta y, ocasionalmente, bajo condiciones de anegamiento; el nivel óptimo de agua varía con el tipo de suelo y la cantidad de materia orgánica degradable. Como con otras transformaciones microbiológicas, los cambios asociados con una humedad excesiva están íntimamente relacionados con el cambio de aerobiosis a anaerobiosis y esta secuencia de reacción se ve afectada de igual manera por el *status* de O₂ en el medio ambiente. En la mayoría de los suelos que tengan una humedad adecuada, la tasa es más alta cuando el suelo es anaeróbico que cuando hay presencia de O₂, aunque algunos suelos presentan una mayor actividad con O₂ en la atmósfera superficial o la transformación no es afectada por la disponibilidad de O₂. También se ha propuesto que el anegamiento promueve ganancias de N₂, debido a que los nutrientes orgánicos complejos son descompuestos a productos simples, ya sea en la porción

aeróbica superior del suelo inundado o en la zona anaeróbica interna, y los productos simples son luego difundidos a los micro-hábitats adyacentes donde son metabolizados por los fijadores de N_2^3 .

2.2.8 Temperatura

La temperatura también tiene una gran influencia en el metabolismo de N_2 . A bajas temperaturas, es evidente muy poca actividad; el aumento de temperatura estimula la captación microbiana del gas. El proceso se lleva a cabo a temperaturas moderadas, pero cesa a escasos grados por arriba de la temperatura óptima. En algunas regiones de la zona templada del norte, la fijación se efectúa aún durante el invierno. Por lo menos en algunos de estos suelos, la fijación no es heterótrofa sino que es realizada por cianobacterias nativas; estos organismos fotosintéticos pueden estar activos durante las épocas de invierno en que la temperatura se encuentra por debajo de los $0^\circ C$. En la figura 2.1 se muestra el efecto de la temperatura del suelo sobre la fijación de N_2^3 . La reacción se midió determinando la tasa de formación de etileno a partir de acetileno incubado con el suelo. Los resultados indican que en este caso la temperatura óptima es cercana a $35^\circ C$, mientras que temperaturas inferiores o superiores disminuyen la fijación de N_2 .

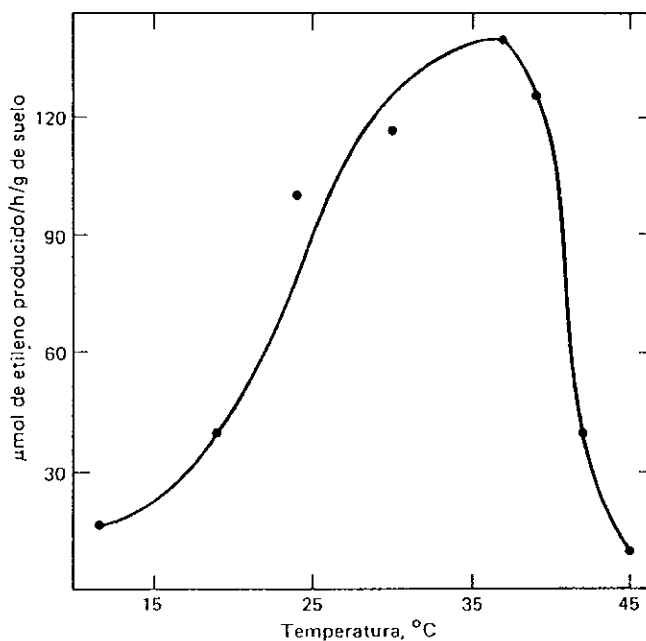


Figura 2.1 Efecto de la temperatura del suelo sobre la fijación de N_2

Para que la fijación heterótrofa sea apreciable se deben satisfacer tres condiciones: a) las poblaciones deben ser grandes; b) la tasa de formación de nuevas células necesita ser rápida debido a que la incorporación del N_2 es un proceso ligado al crecimiento, y c) la mayor parte del nitrógeno en las células de especies activas debe venir de la atmósfera. Se puede calcular que se necesitan aproximadamente 10^7 células bacterianas por gramo para la fijación de 2 kg de nitrógeno por hectárea. Para el metabolismo bacteriano se requiere de una producción o formación de 50,000 células por gramo al día para un incremento de 2 kg de nitrógeno, si la estación de crecimiento tiene aproximadamente 200 días favorables.

La marcada influencia de la región también es aparente; la estación del año también tiene un profundo impacto. En aquellas localidades donde las ganancias son de pocos kilogramos por hectárea al año, probablemente el proceso no sea importante en agricultura intensiva, pero tendrá un apreciable impacto en el ciclo del nitrógeno en campos sin fertilizar. Probablemente la causa de los bajos valores para la fijación heterótrofa sea la falta de fuentes de carbono disponibles, aunque también pueden estar implicadas temperatura y humedad bajas³.

En numerosas localidades donde florecen las cianobacterias, como en arrozales inundados, o donde la humedad es adecuada para tales fotoautótrofos, se puede asimilar mucho N_2 ; el funcionamiento de esta reacción de las cianobacterias que es promovida por la luz, puede explicar por qué el arroz ha crecido en regiones de Asia a pesar del poco o ningún uso de fertilizantes o abono^{3,8,59}.

Se ha confirmado en numerosos hábitats la asimilación del N_2 por las cianobacterias. En regiones desérticas o semiáridas, las cianobacterias empiezan a ser activas después de lluvias ocasionales, pudiéndose incorporar cantidades considerables de N_2 por el crecimiento en manchones originado cuando el abasto de humedad favorece a las poblaciones fotosintéticas. Parte del N_2 fijado de esta manera puede ser liberado como excreción de las cianobacterias y el resto será liberado conforme las células se van descomponiendo; el elemento entonces es mineralizado y puede ser utilizado por plantas superiores^{3,8,59}.

2.3 Fijación de N₂ asociada con raíces

Si la capacidad de los microorganismos heterótrofos de hacer uso del N₂ es limitada realmente debido a las pequeñas cantidades de carbono disponibles, es muy posible creer que las raíces de las plantas que excretan moléculas orgánicas simples puedan mantener grandes poblaciones de bacterias que utilizan el N₂. Particularmente, esta posibilidad parece probable en vista de que algunos pastos y especies de cultivo, especialmente entre las plantas tropicales crecen sorprendentemente bien sin adición de fertilizantes nitrogenados. No fue sino hasta la introducción de procedimientos sensitivos para la medición del proceso que este punto de vista fue confirmado.

Las raíces se encuentran en un ambiente donde la humedad varía menos y la concentración de nutrientes es mayor. Por dicho motivo, las raíces de las plantas son la principal zona de acción microbiana de los vegetales. La *rizósfera* es la región del suelo inmediato a la raíz; es una zona donde la actividad microbiana suele ser intensa. El recuento de bacterias casi siempre es superior en la rizósfera que en las regiones del suelo donde no hay raíces; a veces puede ser varias veces superior. Esto se debe a que las raíces excretan cantidades considerables de azúcares, aminoácidos, hormonas, vitaminas, estimulando un crecimiento tan intenso de bacterias y hongos que estos organismos a menudo forman microcolonias en la superficie de las raíces³.

Ahora existe gran evidencia mostrando que hay una asociación débil entre las raíces de algunas especies de plantas superiores y bacterias heterótrofas no simbióticas fijadoras de N₂. Estas bacterias difieren de *Rhizobium* en que no están localizadas en nódulos especializados o protuberancias de las raíces, sino que crecen en la superficie radicular y hacen uso de los exudados carbonados para satisfacer sus demandas energéticas. Las bacterias son miembros de tres géneros: *Azotobacter* (especialmente *A. paspali*), *Beijerinckia* y *Azospirillum*. *A.paspali* está asociado más notablemente con el pasto tropical *Paspalum notatum*, pero sólo es común en ciertas variedades de *P. notatum*, y es raro en las raíces de otras variedades y en otras especies de *Paspalum* así como en pastos diferentes. Por el contrario, *Beijerinckia* con frecuencia es especialmente abundante en las raíces de caña de azúcar que crecen en regiones de Brasil, pero también se ha encontrado en otras

plantas. Frecuentemente *Azospirillum* se encuentra en las raíces del maíz, trigo, sorgo, *Digitaria decumbens*, *Panicum maximum* y *Melinis multiflora*. Las bacterias están ligadas en cierta forma con las raíces, en vista de que no puede eliminarse la actividad nitrogenasa de éstas con lavados leves.

Por medio de la técnica de reducción del acetileno se ha mostrado que la fijación de N_2 se lleva a cabo en raíces de maíz, trigo, mijo, arroz y especies de los siguientes géneros de plantas superiores: *Andropogon*, *Anthriscus*, *Brachiaria*, *Convolvulus*, *Cyperus*, *Digitaria*, *Eleusine*, *Heracleum*, *Hyparrhenia*, *Melinis*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum*, *Rumex*, *Stachys* y *Viola* y la extrapolación a partir de la tasa de formación del etileno en el ensayo sugiere que dependiendo de la planta pueden ser fijados cada día de 0.002 a 1.1 kilogramos de N_2 por hectárea. Aunque no en todos los casos las bacterias están bien caracterizadas, parece ser que son cepas de *A. paspali*, *Beijerinckia* y *Azospirillum* las que tienen como hábitat a raíces. Existe también cierta evidencia de que el N_2 puede ser fijado por bacterias que viven en unión con las raíces de las coníferas^{3,8,59}.

Los cálculos de este tipo, derivados de las mediciones de acetileno más que del metabolismo de N_2 marcado con ^{15}N , sugiere que *A. paspali* en las raíces de *P. notatum* incorpora de 15 a 93 kg/ha/año, *Beijerinckia* puede asimilar en la caña de azúcar 50 kg/ha/año, *Pennisetum purpureum* puede fijar un máximo de 1 kg/ha/día y las bacterias en la mayoría de las variedades activas del maíz pueden fijar 2.4 kg/ha/día. Debido a que variedades de muchos de estos pastos de cultivo y forrajeros muestran síntomas de deficiencias de nitrógeno cuando crecen naturalmente, el cruzamiento para lograr los mejores genotipos y una comprensión de los factores que conducen a la mayor actividad deben ser de gran beneficio para la producción de alimento y forraje³.

2.4 Nitrogenasa

Durante el proceso de fijación de N_2 , éste es *reducido* a amoníaco, y posteriormente convertido a forma orgánica. El proceso de reducción está catalizado por el complejo enzimático **nitrogenasa**, que consta de dos proteínas distintas llamadas **dinitrogenasa** y **reductasa de la dinitrogenasa**. Ambos componentes contienen hierro y la **dinitrogenasa** también contiene molibdeno. En la

dinitrogenasa el hierro y el molibdeno forman parte de un cofactor conocido como **FeMo-co** (Figura 2.2), que es el centro donde ocurre la reducción real del N_2 . La composición del FeMo-co es homocitrato de $MoFe_7S_9$ (Figura 2.2), y se presentan dos copias de FeMo-co por molécula de nitrogenasa^{48,70,97}.

En la Figura 2.2 se muestra la estructura de FeMo-co, el cofactor con hierro y molibdeno de la nitrogenasa. A la izquierda está el cubo Fe_7S_8 que se une al molibdeno junto con los átomos de oxígeno del homocitrato y los átomos de N y S de la dinitrogenasa. Por cada molécula de nitrogenasa hay dos moléculas de FeMo-co⁵⁹.

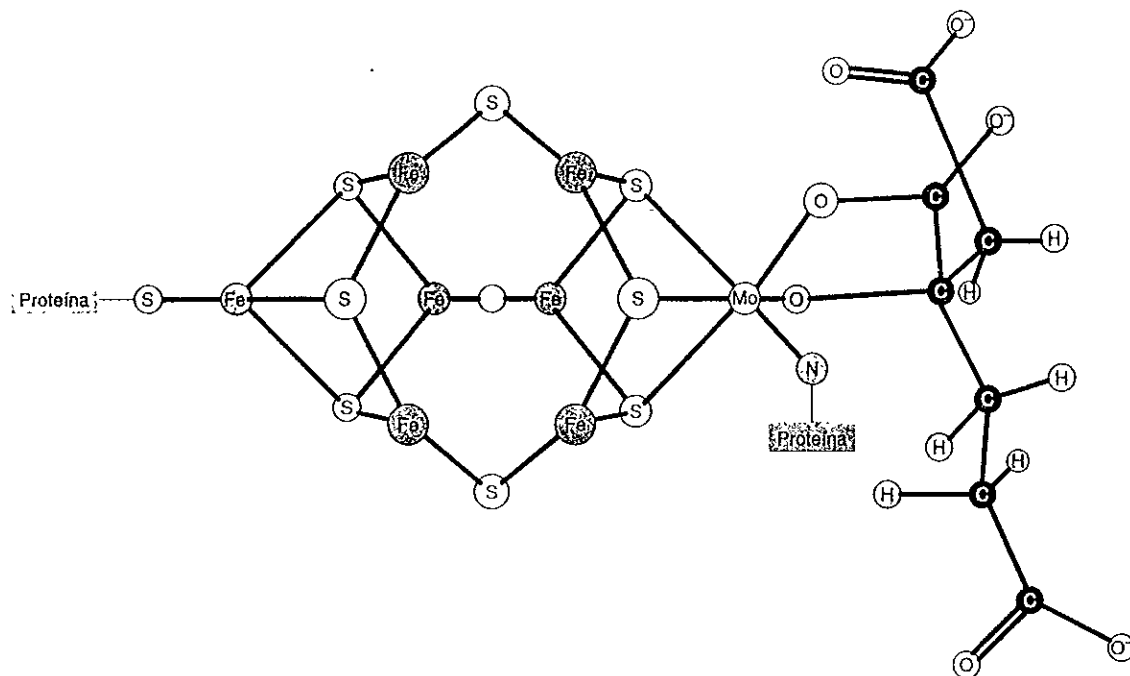


Figura 2.2 Estructura de FeMo-co, el cofactor con hierro y molibdeno de la nitrogenasa

Debido a la estabilidad del triple enlace $N=N$ (que tiene una energía de disociación de 940 kJ comparada con 493 kJ para O_2), el N_2 es muy inerte y su activación es un proceso que requiere

mucha energía. Se deben transferir seis electrones para reducir el N_2 a NH_3 a través de una posible serie de pasos intermedios, sin embargo, se piensa que en la nitrogenasa ocurren directamente tres etapas sucesivas de reducción sin acumulación de intermediarios libres. (Figura 2.3). La fijación de nitrógeno en la naturaleza es muy reductora y el proceso se inhibe por oxígeno, porque tanto la dinitrogenasa como la reductasa de la dinitrogenasa se inactivan rápida e irreversiblemente por O_2 (incluso cuando se aíslan de fijadores de nitrógeno aerobios). En la Figura 2.3 se observa el sistema nitrogenasa y las etapas de la fijación de nitrógeno, la reducción de N_2 a NH_3 ⁵⁹.

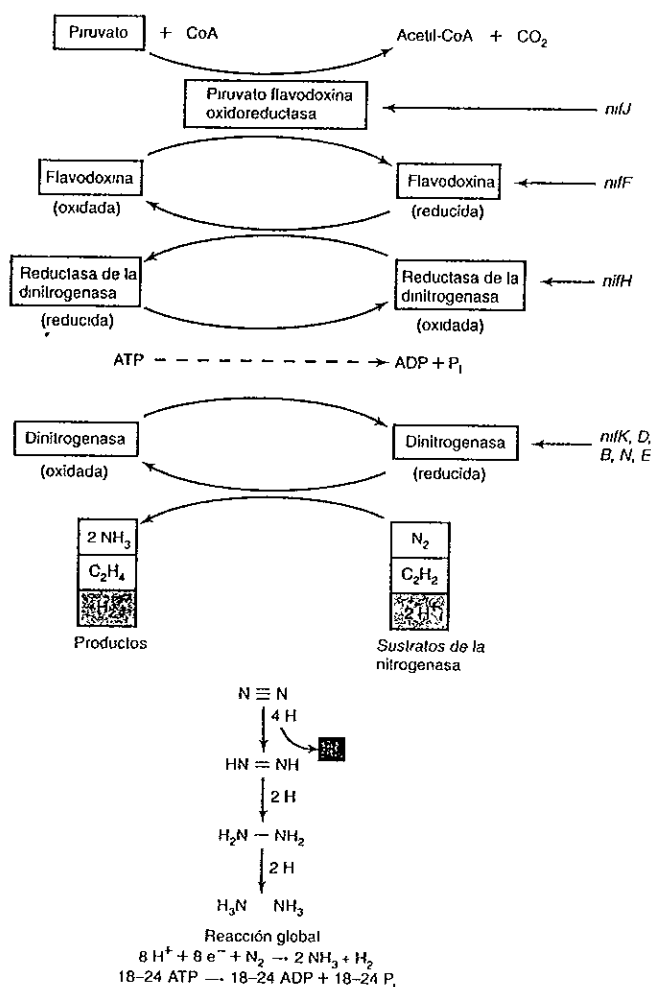


Figura 2.3 El sistema nitrogenasa. Etapas en la fijación de nitrógeno: reducción de N_2 a $2NH_3$

2.4.1 Flujo de electrones en la fijación de nitrógeno

La secuencia de transferencia de electrones en la nitrogenasa es como sigue: donador de electrones reductasa de la nitrogenasa – dinitrogenasa – N_2 – $2NH_3$. Los electrones para la reducción del nitrógeno se transfieren a la reductasa de la dinitrogenasa desde la ferredoxina o la flavodoxina, proteínas de bajo potencial que contienen hierro y azufre. En *Clostridium pasteurianum* el donador de electrones es la ferredoxina y se reduce por rotura del piruvato a acetil-CoA + CO_2 . Además de ferredoxina reducida se necesita ATP para la fijación de N_2 . El requerimiento de ATP en la fijación de N_2 es muy alto, con 4 – 5 ATPs hidrolizados por cada $2e^-$ transferidos. El ATP se necesita para bajar el potencial de reducción de la nitrogenasa lo suficiente de modo que el N_2 se pueda reducir. El potencial de reducción de la reductasa de la dinitrogenasa es $-0.30V$ y se baja a $-0.40V$ cuando se transfieren electrones a la enzima y la enzima hidroliza ATP (Figura 2.3). Este complejo se combina luego con la dinitrogenasa, que pasa a ser reducida. La dinitrogenasa reducida reduce a continuación el N_2 hasta NH_3 y la reducción total ocurre en el centro FeMo-co. Aunque sólo se necesitan seis electrones para reducir N_2 a $2NH_3$, en el proceso se consumen en realidad ocho electrones, de los cuales dos se pierden como hidrógeno (H_2) por cada mol de N_2 reducido (Figura 2.3). No se conoce la razón de este exceso aparente, pero muchas evidencias señalan que la producción de H_2 es una parte esencial del mecanismo de reacción de la nitrogenasa^{8,59}.

2.4.2 Nitrogenasas alternativas

Bajo ciertas condiciones de crecimiento, algunas bacterias fijadoras de nitrógeno pueden sintetizar nitrogenasas sin molibdeno; estas **nitrogenasas alternativas** sin molibdeno contienen vanadio (más hierro) o hierro solo. Las nitrogenasas alternativas también presentan cofactores similares a FeMo-co, FeVa-co en la nitrogenasa con vanadio^{23,24,31,32,77} y un núcleo con hierro y azufre, carente de Mo y Va, en la nitrogenasa con hierro¹⁴. Las nitrogenasas alternativas no se sintetizan en presencia de molibdeno y la nitrogenasa con molibdeno es generalmente la principal

en la célula^{48,70,97}. Las nitrogenasas alternativas parecen servir de mecanismo de apoyo para asegurar que ocurre fijación de N_2 incluso cuando el molibdeno es un factor limitante en el hábitat del microorganismo.

Azotobacter vinelandii fue el primer microorganismo en el que se demostró que tiene tres nitrogenasas distintas⁵.

Al colocar células de *Azotobacter chroococcum* en un medio mineral que carece de amoníaco y molibdeno, pero contiene vanadio, se produce una nitrogenasa alternativa que posee vanadio en vez de molibdeno, y que soporta el crecimiento del organismo a partir de N_2 . Como la enzima con molibdeno, la vanadio nitrogenasa está formada por dos proteínas, una de las cuales posee hierro, y la segunda hierro y vanadio, y reduce: N_2 a NH_3^+ , H^+ a H_2 y C_2H_2 a C_2H_4 . Sin embargo, las tasas de reducción del sustrato son considerablemente menores con vanadio nitrogenasa que con la enzima con molibdeno, lo cual indica que la enzima con vanadio tiene menor poder catalítico. Es interesante notar que la vanadio nitrogenasa también reduce C_2H_2 a etano, C_2H_6 . Aunque sólo un 3% del acetileno reducido se convierte en etano. La capacidad de la vanadio nitrogenasa de catalizar la reducción de C_2H_2 a C_2H_6 puede usarse como prueba para detectar las bacterias fijadoras de nitrógeno que pueden sintetizar esta nitrogenasa alternativa. *Azotobacter* también puede producir una nitrogenasa que contiene sólo hierro y se origina sólo en ausencia de molibdeno y vanadio, pero es un catalizador muy pobre de la reducción de N_2 . La nitrogenasa que lleva sólo hierro produce también algo de C_2H_6 .

La vanadio nitrogenasa no es la principal nitrogenasa de *Azotobacter chroococcum* por que la adición de molibdeno al medio de cultivo reprime la síntesis de la vanadio nitrogenasa y de la nitrogenasa que contiene sólo hierro, formando en cambio la nitrogenasa convencional. Las vanadio nitrogenasas no son universales entre las bacterias fijadoras de N_2 . No obstante, se sabe que el vanadio estimula la fijación de N_2 en diversos organismos, incluyendo varias especies de *Azotobacter*, algunas cianobacterias y bacterias fototróficas, y *Clostridium pasteurianum*. Es

probable que las nitrogenasas alternativas sean sistemas de “refuerzo” para la fijación del N₂ en hábitats deficientes en molibdeno⁵⁹.

Los microorganismos que tienen sistemas de nitrogenasa independientes de molibdeno incluyen microorganismos fisiológica y filogenéticamente distintos, entre los que se encuentran: *Clostridium pasteurianum*¹⁰², *Rhodobacter capsulatus*^{83,84,85}, *Anabaena variabilis*^{47,88}, *Rhodospirillum rubrum*^{15,55}, *Heliobacterium gestii*⁴⁹, y *Azospirillum brasilense*¹².

2.4.3 Mecanismos de protección de la nitrogenasa

En las bacterias aerobias, la fijación de N₂ ocurre en presencia de O₂ en células enteras pero no en preparaciones purificadas de la enzima, y la nitrogenasa se protege de la inactivación por O₂ en tales organismos mediante una rápida eliminación del O₂ por respiración, por la producción de capas mucosas que retienen O₂ o por compartimentalización de la nitrogenasa en un tipo especial de células (los heteroquistes). Además, aunque la fijación de N₂ no ocurre en extractos celulares oxigenados, en fijadores aerobios de nitrógeno como *Azotobacter*, la nitrogenasa se protege de la inactivación por oxígeno mediante formación de complejos con una proteína específica, esto se conoce como **protección conformacional**.

Frankia protege su nitrogenasa situándola en un extremo hinchado de las células, que se conoce como vesícula. Las vesículas tienen unas paredes gruesas que actúan como barreras a la difusión de O₂, y que mantienen la tensión de O₂ en su interior a niveles compatibles con la actividad de la nitrogenasa. En este aspecto, las vesículas de *Frankia* se parecen a los heteroquistes producidos por algunas cianobacterias filamentosas, porque son sitios localizados de fijación de N₂^{8,59}.

2.4.4 Valoración de la nitrogenasa

Anteriormente era difícil demostrar que un organismo tenía la capacidad de fijar nitrógeno; de hecho, muchos trabajos sobre fijación de nitrógeno en algunos microorganismos se ha visto luego que eran erróneos. El crecimiento de un organismo en un medio al que no se añaden compuestos

nitrogenados no significa, por sí solo, que el organismo esté fijando nitrógeno del aire, porque a menudo existen trazas de compuestos nitrogenados como contaminantes de los ingredientes del medio de cultivo o entran al medio en forma gaseosa o como partículas de polvo.

Actualmente existen dos métodos que se utilizan para detectar la nitrogenasa, el método de la reducción del acetileno y el método con isótopo estable ^{15}N , los cuales se describen a continuación.

2.4.4.1 Método de la reducción del acetileno

La nitrogenasa no es por completo específica para el N_2 , ya que también puede reducir cianuro (CN^-), acetileno ($\text{HC}\equiv\text{CH}$) y varios compuestos con triples enlaces. La reducción del acetileno por la nitrogenasa es un proceso en el que intervienen dos electrones y se produce etileno ($\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$).

El descubrimiento de Schöllhorn y Burris, y Dilworth en 1966⁸⁶, de que el complejo enzimático nitrogenasa, para la fijación de nitrógeno reduce acetileno a etileno, sugirió que la cuantificación de la reducción del acetileno podía ser usada como un índice de la cantidad de nitrógeno fijado. El método de la reducción del acetileno puede emplearse como un índice de la fijación de nitrógeno *in situ*, en suelos, en plantas noduladas y en ambientes acuáticos. El etileno producido a partir del acetileno puede medirse por cromatografía de gases después de 5 segundos a 30 minutos después de la exposición del acetileno a los agentes fijadores de nitrógeno.

Probablemente la producción de acetileno no tiene utilidad alguna para la célula, pero suministra al experimentador un medio sencillo y rápido de ensayar la actividad de sistemas fijadores de nitrógeno, por que es relativamente fácil medir la reducción del acetileno a etileno por cromatografía de gases (Figura 2.4). Esta técnica se usa ampliamente en la actualidad para detectar la fijación de nitrógeno en sistemas desconocidos.

En la Figura 2.4 se esquematiza el ensayo de la reducción del acetileno para determinación de la actividad nitrogenasa. Cuando el experimento comienza (tiempo 0), los resultados no muestran C_2H_4 , pero a medida que pasa el tiempo la producción de C_2H_4 se incrementa. Cuando se produce

C_2H_4 se consume C_2H_2 . Si el vial contuviera un extracto enzimático, las condiciones deberían ser anóxicas aunque la nitrogenasa fuera de una bacteria aeróbica⁵⁹.

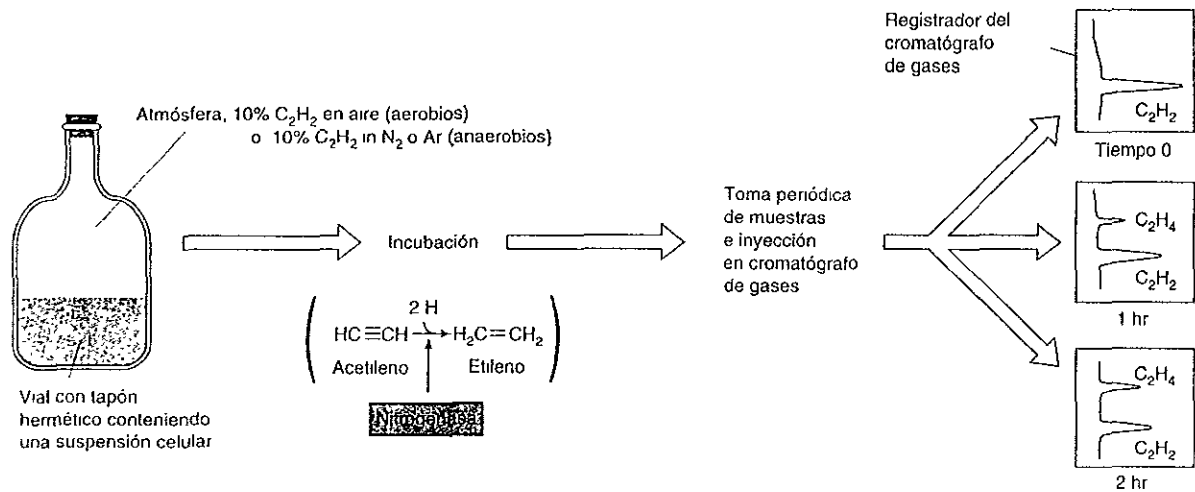


Figura 2.4 Ensayo de la reducción del acetileno para determinación de la actividad nitrogenasa.

2.4.4.2 Método con isótopo estable ^{15}N

La prueba definitiva de la fijación de N_2 se basa en usar un isótopo de nitrógeno, ^{15}N , como sonda (^{15}N no es un isótopo radiactivo, sino un isótopo estable, que se detecta con un espectrómetro de masas). La fase gaseosa de un cultivo se enriquece con ^{15}N y tras incubación, las células y el medio se digieren, el amoníaco producido se analizará en cuanto a su contenido de ^{15}N . Si ha habido una producción significativa de NH_3 marcado con ^{15}N , es una prueba de fijación de nitrógeno. No obstante, el método de la reducción del acetileno, aunque indirecto, es más rápido, y sensible para medir la fijación de nitrógeno. La muestra, que puede ser suelo, agua, un cultivo, o un extracto celular, se incuba con acetileno y se analiza más tarde la fase gaseosa de la mezcla de reacción para ver si hay producción de etileno por cromatografía de gases (Figura 4.2). Este método es mucho

más simple y rápido que otros y puede adaptarse fácilmente para uso de campo en estudios ecológicos de bacterias fijadoras de N_2 en sus propios hábitats.

Ventajas del método de la reducción del acetileno sobre el método con isótopo estable ^{15}N :

A. El método es relativamente económico, el único gasto mayor es el cromatógrafo de gases, cuyo valor es la décima parte de un espectrómetro de masas. El acetileno purificado es mucho más económico que el isótopo estable ^{15}N .

B. La sensibilidad es muy alta. Se requieren cinco segundos para nódulos radiculares y en estudios con cianobacterias 30 minutos de exposición. En la mayoría de las investigaciones con ^{15}N se requieren periodos de 6 a 24 horas. La baja sensibilidad de la técnica con ^{15}N requiere un tiempo de exposición mayor con la muestra que con el método de la reducción del acetileno.

C. El equipo es fácil de manejar, la cromatografía de gases es una técnica más rápida y requiere menor tiempo de aprendizaje que la espectrometría de masas^{86,59}.

C A P Í T U L O I I I

MICROORGANISMOS FIJADORES DE NITRÓGENO

3.1 Fijación no simbiótica de nitrógeno. Microorganismos de vida libre

La precipitación pluvial puede agregar varios kilogramos de amonio y nitrato por hectárea y las descargas eléctricas de la atmósfera regresan una pequeña cantidad de nitrógeno al suelo. Por otra parte, la fijación biológica tiende a ajustar el balance de nitrógeno, por lo que a pesar del crecimiento de la industria de los fertilizantes, aún es necesario estimular a los agentes microbianos responsables de regresar el nitrógeno gaseoso al suelo^{3,8,59}.

La fijación no simbiótica del N₂ es efectuada por las bacterias de vida libre que hacen uso del N₂ por medios no simbióticos³.

A continuación se describen los principales géneros de microorganismos de vida libre que realizan fijación no simbiótica de nitrógeno.

3.1.1 *Azotobacter*

El género *Azotobacter* comprende bacilos gram negativos de gran tamaño, que son aerobios estrictos y pueden fijar N₂. En la Figura 3.1 se muestra *Azotobacter vinelandii*: (a) células vegetativas y (b) quistes, por microscopía de contraste de fase. Diámetro aproximado de la célula 2 μm, y del quiste 3 μm⁵⁹.

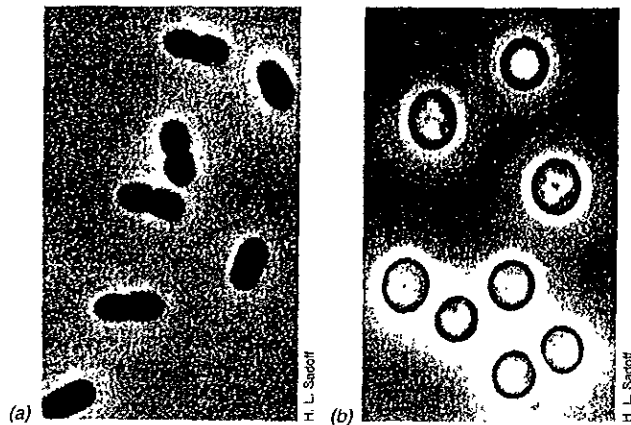


Figura 3.1 *Azotobacter vinelandii*: (a) células vegetativas y (b) quistes

El primer miembro de este género fue descubierto a principios del siglo XX por el microbiólogo holandés M. W. Beijerinck, usando un cultivo de enriquecimiento a partir de un medio desprovisto de cualquier fuente de nitrógeno combinado. Aunque *Azotobacter* puede crecer con N_2 como única fuente de nitrógeno, lo hace más rápidamente con NH_3 ; en realidad al añadir NH_3 se reprime la fijación de nitrógeno. Se ha trabajado mucho para evaluar la función de *Azotobacter* en la fijación de nitrógeno en la naturaleza, especialmente en comparación con el microorganismo anaerobio *Clostridium pasteurianum*, y con los simbioses del género *Rhizobium*. *Azotobacter* presenta interés también por ser el organismo vivo que tiene la tasa respiratoria más alta (medida como la tasa de entrada de O_2). Además de su importancia ecológica y fisiológica, *Azotobacter* es interesante por su capacidad de formar una estructura de reposo común, llamada **quiste** o **cisto** (Figura 3.1). Filogenéticamente, *Azotobacter* pertenece al grupo gamma de las Proteobacterias. En la Tabla 3.1 se enlistan las bacterias (fototróficas anoxigénicas) rojas y verdes⁵⁹:

Tabla 3.1 Bacterias (fototróficas anoxigénicas) rojas y verdes^a

Grupo	Género
Grupo Alpha	<i>Rhodospirillum</i> ^a , <i>Rhodopseudomonas</i> ^a , <i>Rhodobacter</i> ^a , <i>Rhodomicrobium</i> ^a , <i>Rhodovulum</i> ^a , <i>Rhodospila</i> ^a , <i>Rhizobium</i> , <i>Nitrobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Aquaspirillum</i> , <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Pseudomonas</i> (some species)
Grupo Beta	<i>Rhodocyclus</i> ^a , <i>Rhodoferax</i> ^a , <i>Rubrivivax</i> ^a , <i>Spirillum</i> , <i>Nitrosomonas</i> , <i>Sphaerotilus</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Bordetella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Zymomonas</i>
Grupo Gamma	<i>Chromatium</i> ^a , <i>Thiospirillum</i> ^a , y otras bacterias púrpuras del azufre ^a , <i>Beggiatoa</i> , <i>Leucothrix</i> , <i>Escherichia</i> y otras bacterias entéricas, <i>Legionella</i> , <i>Azotobacter</i> , especies fluorescentes de <i>Pseudomonas</i> <i>Vibrio</i>
Grupo Delta	<i>Myxococcus</i> , <i>Bdellovibrio</i> , <i>Desulfovibrio</i> y otras bacterias reductoras de sulfato <i>Desulfuromonas</i>
Grupo Epsilon	<i>Thiovulum</i> , <i>Wolinella</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Helicobacter</i>

^aGrupos representativos de organismos fototróficos.

En la Figura 3.2 se observa la diversidad evolutiva de las bacterias rojas (Proteobacteria), que da lugar a organismos relacionados no fototróficos⁵⁹:

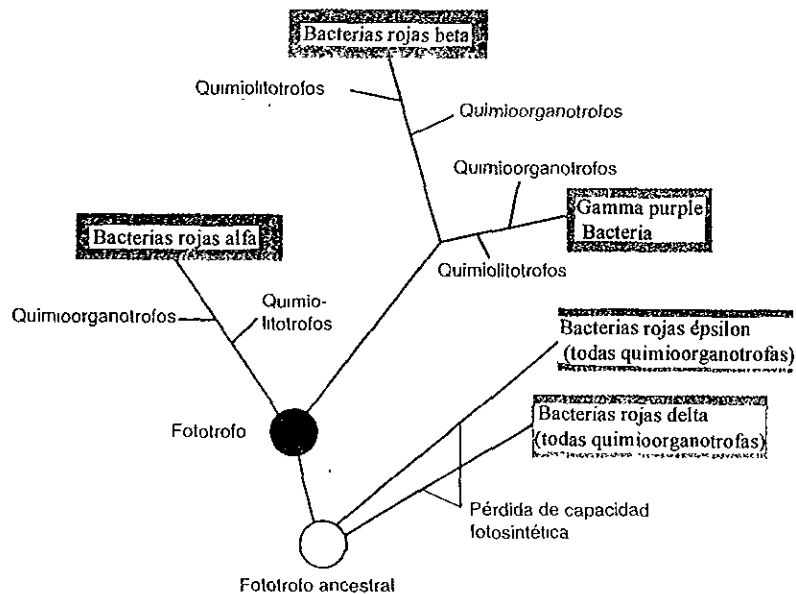


Figura 3.2 Diversidad evolutiva de las bacterias rojas (Proteobacteria), que da lugar a organismos relacionados no fototróficos.

Azotobacter es el representante del grupo más intensamente investigado, pero no debe tomarse la vasta bibliografía relacionada con el género como indicador de que sea el más importante en la naturaleza. Las células de *Azotobacter* son bastante grandes para un procarionta; muchos aislados son del tamaño de levaduras, con diámetros entre 2 y 4 μm o más. El pleomorfismo es frecuente en este género y se han descrito diferentes formas celulares y tamaños. Algunas cepas presentan motilidad por flagelos peritricos. En medios con carbohidratos las bacterias de vida libre fijadoras de N_2 forman cápsulas gruesas o capas de mucílago (Figura 3.3). *Azotobacter* puede crecer a partir de una gran variedad de carbohidratos, alcoholes y ácidos orgánicos. El metabolismo de los compuestos de carbono es estrictamente oxidativo y raramente se producen ácidos u otros productos de fermentación. Todos sus miembros son fijadores de nitrógeno, pero pueden crecer también en medios que contengan formas sencillas de nitrógeno combinado: amoníaco, urea, nitrato y nitrito. Los miembros de este género son mesófilos y su temperatura óptima es cercana a los 30°C . Cuando las cepas de *Azotobacter* utilizan la forma gaseosa del elemento, la ganancia de nitrógeno puede exceder 1.0 mg de nitrógeno por mililitro de medio de cultivo. La eficiencia, medida como N_2 fijado por unidad de azúcar degradada, frecuentemente es muy baja de 5 a 20 mg de N_2 por gramo de azúcar oxidada, aunque se han registrado algunas veces valores que exceden los 30 $\text{mg}^{3,59}$.

A pesar de que *Azotobacter* sea aerobio estricto, su nitrogenasa es sensible al O_2 como las demás nitrogenasas. Se cree que su elevada tasa respiratoria, tenga por objeto proteger a la nitrogenasa del O_2 . Su metabolismo mantiene la concentración intracelular de O_2 suficientemente baja para que la nitrogenasa no se inactive⁵⁹.

Como las endosporas bacterianas, los cistos o quistes de *Azotobacter* (Figura 3.1) muestran una respiración endógena mínima y resisten la desecación, la desintegración mecánica y las radiaciones ultravioleta e ionizantes. No obstante, a diferencia de las endosporas, los quistes *no* son especialmente resistentes al calor y no están completamente en estado latente, porque oxidan rápidamente las fuentes de energía exógena. La fuente de carbono del medio influye mucho en la

formación del quiste, el butanol es especialmente favorable. Algunos compuestos relacionados con el butanol, como el beta-hidroxibutirato, también favorecen la formación de quistes.

. La bacteria fijadora de N_2 que se encuentra con mayor frecuencia en suelos de regiones templadas es *Azotobacter chroococcum*. Las densidades de *Azotobacter* varían de cero a varios miles por gramo y no es común encontrar cifras que sobrepasen 10^3 , siendo aún más raro encontrar valores que excedan 10^4 por gramo en suelos de la zona templada y en muchas de las zonas tropicales. La escasez de estos organismos en tales sitios, indica que no son un constituyente importante para la fijación de N_2 , aunque puedan aislarse fácilmente y hayan sido ampliamente estudiados. Por otra parte, hay localidades donde la población es particularmente grande: algunas veces exceden los 10^6 por gramo de suelo en regiones del norte de África, y en las raíces de algunos pastos tropicales pueden abundar las azotobacterias; bajo estas circunstancias especiales el género puede contribuir sustancialmente a las ganancias de nitrógeno⁵⁹.

3.1.2 *Azomonas*

Azomonas es un género de bacterias con forma bacilar, de gran tamaño, fijadoras de N_2 , que se parecen a *Azotobacter*, excepto en que no producen quistes y son principalmente acuáticas⁵⁹.

3.1.3 *Beijerinckia*

Las especies de *Beijerinckia* son también fijadoras aerobias de N_2 , pero sólo crecen bien en condiciones ácidas y algunas veces se desarrollan a un pH tan bajo como 3. Las especies de *Beijerinckia* se encuentran en suelos tropicales y se han aislado cepas en Sudamérica, Asia, norte de Australia y áreas tropicales de Africa; su número varía de unos pocos a varios miles por gramo. *Beijerinckia* raramente se distribuye en suelos de zonas templadas^{3,8,59}.

3.1.4 *Derxia*

Derxia es un género aerobio, ácido tolerante y crecerá en medios con pH de 5 a 9. En suelos de Asia y Brasil se han detectado cepas de *Derxia*, pero el grupo ha recibido escasa atención. En la Figura 3.3 se observa un ejemplo de la producción de limo por bacterias de vida libre fijadoras de N_2 . (a) Células de *Derxia gummosa* en el limo. Anchura aproximada de 1 a 1.2 μm . (b) Colonias de especies de *Beijerinckia* creciendo en un medio con carbohidratos. Se aprecia la apariencia deslizante de las colonias debido a la abundancia de limo capsular⁵⁹.

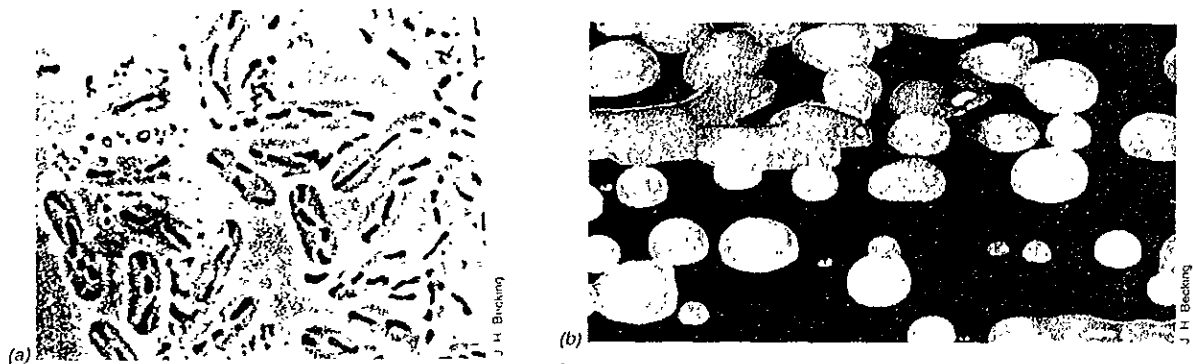


Figura 3.3 Ejemplo de producción de limo por bacterias de vida libre fijadoras de N_2 .
(a) Células de *Derxia gummosa* en el limo. (b) Colonias de especies de *Beijerinckia*

3.1.5 *Azospirillum lipoferum*

Azospirillum lipoferum es una bacteria fijadora de N₂, que originalmente fue descrito por M. W. Beijerinck en 1922, que le dio el nombre de *Spirillum lipoferum*. En los últimos años el interés por este microorganismo ha aumentado porque se ha descubierto que establece una asociación un tanto casual con raíces de plantas tropicales. Se encuentra en la rizósfera, donde se alimenta de productos excretados por las raíces. Puede crecer también alrededor de raíces de plantas cultivadas, como el maíz (*Zea mays*). La inoculación del maíz con *A. lipoferum* puede originar un ligero aumento (aproximadamente el 10%) del rendimiento de esta planta. En la Tabla 3.3 se presentan las características de los géneros de las bacterias en forma de espiral^{8,59}:

Tabla 3.3 Características de los géneros de las bacterias en forma de espiral^a

Género	Grupo de rRNA 16S ^b	Características	DNA (mol % GC)
<i>Spirillum</i>	Beta	Diámetro celular de 1,7 µm, microaerofílica, de agua dulce	36-38
<i>Aquaspirillum</i>	Alfa o beta	Diámetro celular de 0,2-1,5 µm; aerobia, de agua dulce	49-66
<i>Oceanospirillum</i>	Gamma	Diámetro celular de 0,3-1,2 µm; aerobia; marina (requiere 3% de NaCl)	42-51
<i>Azospirillum</i>	Alfa	Diámetro celular de 1 µm, microaerofílica, sus hábitats son el suelo y la rizósfera; fija N ₂	68-70
<i>Herbaspirillum</i>	—	Diámetro celular de 0,6-0,7 µm; microaerofílica; sus hábitats son el suelo y la rizósfera, fija N ₂	66-67
<i>Campylobacter</i>	Épsilon	Diámetro celular de 0,2-0,8 µm, desde microaerofílica hasta anaeróbica, patógena o comensalista en humanos y animales; flagelo polar único	30-38
<i>Helicobacter</i>	Épsilon	Diámetro celular de 0,5-1 µm, cresta (tuft) de flagelos polares, se asocia con las úlceras pilóricas en humanos	—
<i>Bdellovibrio</i>	Delta	Diámetro celular de 0,25-0,4 µm; aerobio; depredador de otras bacterias; un único flagelo polar recubierto	33-52
<i>Spirosoma</i>	Grupo de <i>Bacteroides</i> - <i>Flavobacterium</i>	Diámetro celular de 0,5 µm; bacilos curvados formando anillos; inmóvil, aerobio; a veces con vesículas de gas	66-69

^aTodos son Gram negativo y respiratorios pero nunca fermentativos.

^bTodos los géneros excepto *Spirosoma* pertenecen a las bacterias rojas (Proteobacterias)

En la Tabla 3.4 se presentan las principales características de los géneros de bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno de vida libre⁵⁹:

Tabla 3.4 Géneros de bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno de vida libre^a

Género	Número de especies	Características	DNA (mol % GC)
<i>Azotobacter</i>	6	Bacilo grande; produce cistos; se encuentra principalmente en suelos de neutros a alcalinos	63-67
<i>Azomonas</i>	3	Bacilo grande; sin cistos; principalmente acuático	52-59
<i>Azospirillum</i>	4	Bacilo microaerofílico; asociado a plantas	69-71
<i>Beijerinckia</i>	4	Bacilo en forma de pera con cuerpos grasos grandes en cada extremo; producción extensa de limo; habita en suelos ácidos	54-59
<i>Derrxia</i>	1	Bacilos; forma colonias toscas y arrugadas	69-73

^aTodas las especies examinadas pertenecen a las bacterias rojas, principalmente a las subdivisiones alfa y gamma

3.1.6 *Acetobacter diazotrophicus*

Este microorganismo crece en el tejido vascular de la caña de azúcar y fija cantidades sustanciales de N_2 . Esta planta necesita para su crecimiento una elevada concentración de sacarosa, lo que hace pensar que la asociación planta-bacteria en este caso está más desarrollada que la de *Azospirillum*⁵⁹.

3.1.7 Bacterias fotosintéticas

Las bacterias fotosintéticas fijadoras de N_2 se dividen en tres grupos: bacterias púrpura no sulfurosas, bacterias púrpura sulfurosas y bacterias verdes sulfurosas. Todas son afectadas favorablemente por la luz, pero son inhibidas por el O_2 . La tasa de asimilación del N_2 por las bacterias fotoautótrofas es muy lenta, requiriéndose de períodos de semanas para obtener ganancias de 100 microgramos de nitrógeno por mililitro de medio de cultivo. Las bacterias púrpura no sulfurosas se encuentran en suelos anegados y en zanjas, cieno de lagos o fondos marinos, pero están ausentes en tierras de cultivo o bosques. Sin embargo, cuando suelos de los trópicos se inundan, algunas veces pueden florecer estas bacterias. De esta manera, los campos de arroz de Asia pueden mostrar algunas veces la presencia de 10^4 a 10^5 células de bacterias púrpuras no sulfurosas o de casi ninguna a 10^3 células de bacterias púrpura sulfurosas por gramo; algunas veces se han registrado cifras superiores.

3.1.8 Cianobacterias

Las cianobacterias son comunes en campos bien drenados pero son más abundantes en suelos inundados. Muchas cianobacterias del suelo crecen en soluciones de cultivo carentes de compuestos nitrogenados y llevan a cabo un aumento en el contenido de nitrógeno del medio. De cualquier manera, no todas las cianobacterias y ningún representante de las algas pueden utilizar N_2 . La fijación del nitrógeno realizada por las cepas activas se estimula por el incremento de la intensidad luminosa, aunque la luz en exceso es inhibitoria. Invariablemente la transformación es lenta y una

ganancia de 30 a 115 microgramos de nitrógeno por mililitro de solución requiere de 1 ½ a 2 meses para la mayoría de los aislamientos de *Aulosira*, *Anabaenopsis*, *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Nostoc* y *Tolypothrix*. Por lo tanto, la fijación es mucho menos rápida que con azotobacterias o clostridios. Algunas cianobacterias crecen lentamente en cultivos puros en la oscuridad, con tal que haya azúcar que pueda utilizarse como fuente de carbono y energía para el metabolismo heterotrófico, aunque las ganancias de nitrógeno son pequeñas. Es probable que la fijación de N₂ en la oscuridad, realizada por las cianobacterias, no sea de importancia ecológica. Sin embargo, en la luz, las cianobacterias y la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* tienen una marcada ventaja sobre los organismos heterótrofos que emplean N₂ (su capacidad de desarrollarse sin depender del abastecimiento limitado de carbohidratos degradables en el suelo)^{3,8,59}.

Algunas cianobacterias filamentosas, tales como *Anabaena*, *Cylindrospermum* y *Mastigocladus*, poseen estructuras conocidas como **heteroquistes**. Los heteroquistes son células redondas y con aspecto de estar más o menos vacías, que se encuentran distribuidas regularmente a lo largo de un filamento o en un extremo del mismo (Figura 3.4). Los heteroquistes se forman por diferenciación de las células vegetativas y son los únicos lugares en que se produce la fijación de nitrógeno por parte de las cianobacterias. En la Figura 3.4 se observa la cianobacteria *Anabaena* sp. mostrando los heteroquistes^{8, 59}:

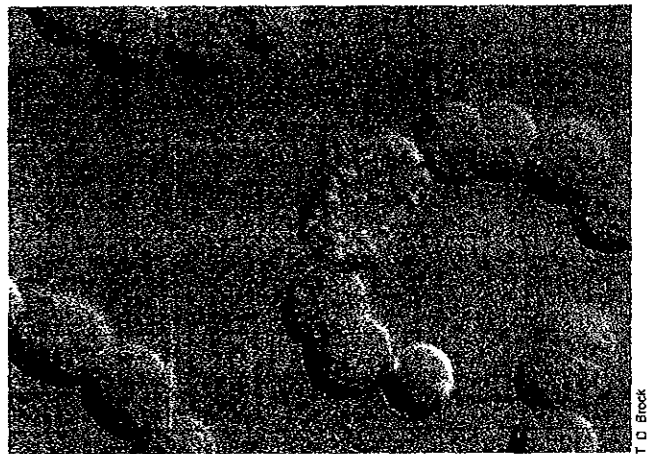


Figura 3.4 *Anabaena* sp. mostrando los heteroquistes

Los heteroquistes tienen conexiones intercelulares con las células vegetativas adyacentes con las que establecen un intercambio de materiales. Así, productos de la fotosíntesis se desplazan de las células vegetativas a los heteroquistes y productos de la fijación de nitrógeno se desplazan de los heteroquistes a las células vegetativas. Los heteroquistes tienen un contenido bajo de ficobilinas y carecen del fotosistema II, que es el fotosistema de la fotosíntesis oxigénica. Presentan una pared celular engrosada, con grandes cantidades de glucolípido, que sirve para disminuir la difusión de O_2 al interior de la célula. Debido a la labilidad de la enzima nitrogenasa en presencia de oxígeno, parece probable que el heteroquiste, al mantener un ambiente anóxico, estabiliza el sistema de fijación de nitrógeno en organismos que, no sólo son aeróbicos, sino que además liberan oxígeno. En realidad, algunas cianobacterias filamentosas que no producen heteroquistes producen nitrogenasa y fijan nitrógeno en células vegetativas normales cuando se cultivan en medios anaeróbicos. Sin embargo, unas pocas cianobacterias unicelulares del tipo de *Gloeotheca*, formadoras de vainas (Figura 3.5) no producen heteroquistes, pero tampoco fijan nitrógeno en condiciones anaeróbicas. Algunas especies marinas de *Oscillatoria* también fijan nitrógeno sin heteroquistes y producen una serie de células en el centro del filamento que carece de actividad del fotosistema II, la fijación de nitrógeno se lleva a cabo sólo en esta región que no produce O_2 .

En la Figura 3.5 se muestra la diversidad morfológica entre las cianobacterias: los cinco principales tipos morfológicos de cianobacterias: (a) Unicelular, *Gloeotheca*, por contraste de fase; diámetro 5-6 μm ; (b) colonial, *Dermocarpa*, por contraste de fase; (c) filamentosas, *Oscillatoria*, por campo brillante; anchura aproximada 15 μm ; (d) heteroquiste filamentosos, *Anabaena*, por contraste de fase; anchura aproximada 5 μm ; (e) ramificación filamentosas, *Fischerella*, por campo brillante⁵⁹:

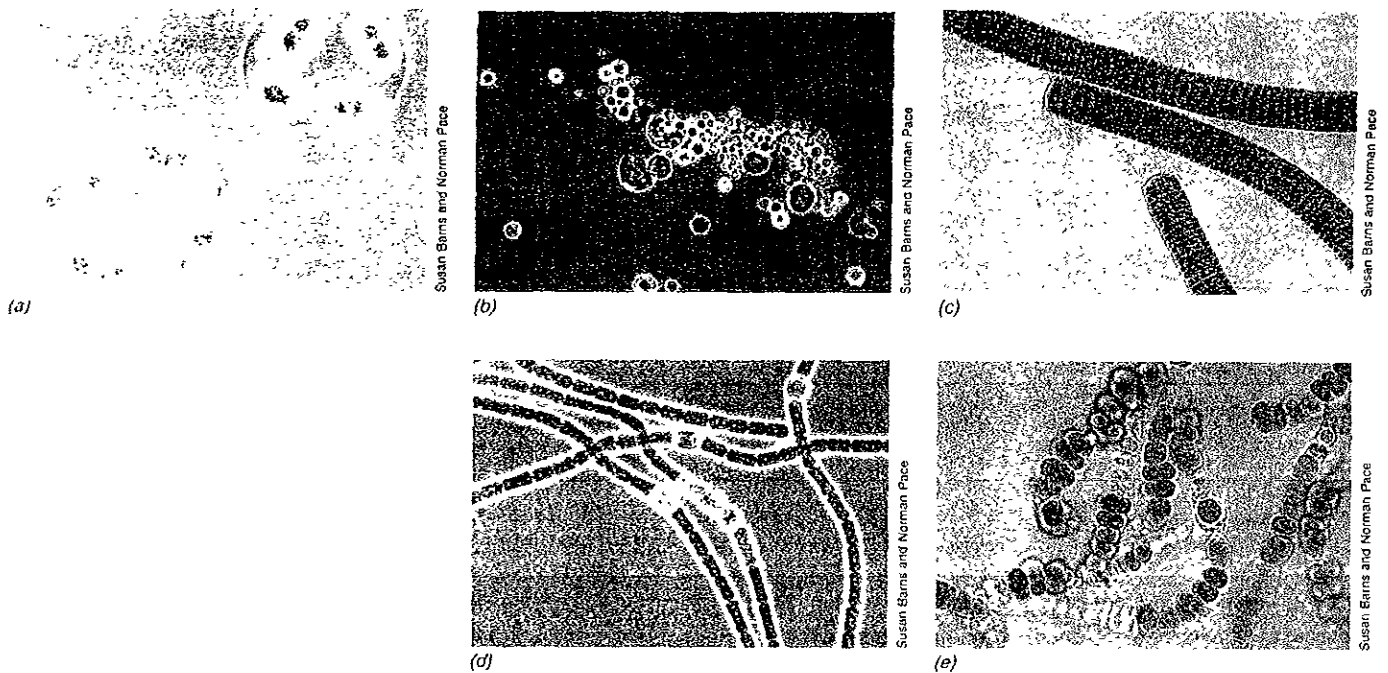


Figura 3.5 Diversidad metabólica entre cianobacterias: los cinco principales tipos morfológicos.
 (a) Unicelular, *Gloeothece*; (b) colonial, *Dermocarpa*; (c) filamentoso, *Oscillatoria*;
 (d) heteroquiste filamentoso, *Anabaena*; (e) ramificación filamentosa, *Fischerella*.

La nutrición de las cianobacterias es sencilla. No requieren vitaminas y utilizan nitrato o amonio como fuente de nitrógeno. También son comunes las especies fijadoras de nitrógeno. Las especies estudiadas son en su mayor parte fotótrofos estrictos, que no pueden crecer en la oscuridad, alimentándose de compuestos orgánicos. Sin embargo, algunas cianobacterias en presencia de luz pueden asimilar compuestos orgánicos sencillos, como glucosa y acetato. Aparentemente no pueden producir ATP por oxidación de compuestos orgánicos, pero sí obtienen ATP mediante fotofosforilación, pueden usar compuestos orgánicos como fuente de carbono. Algunas especies, principalmente formas filamentosas, crecen en la oscuridad a partir de glucosa u otros azúcares, utilizando el material orgánico como fuente de carbono y energía. Hay cianobacterias que realizan fotosíntesis anoxigénica usando sólo el fotosistema I cuando hay sulfuro en el ambiente.

Las cianobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza en hábitats terrestres y acuáticos, tanto en aguas continentales como en el mar. Por regla general toleran mejor los ambientes extremos que las algas y suelen ser los organismos predominantes, si no los únicos, en

los manantiales de aguas termales. (véase Tabla 3.5), lagos salados y otros ambientes extremos. Unas pocas cianobacterias viven en simbiosis con hepáticas, helechos y cicadales; algunas se encuentran como componentes fototróficos de los líquenes. En el caso del helecho de agua *Azolla*, se ha demostrado que el endófito cianobacteriano (una especie de *Anabaena*) fija nitrógeno, que pasa a disposición de la planta.

En la Tabla 3.5 se presentan los géneros y grupos de cianobacterias^{8,59}:

Tabla 3.5 Géneros y grupos de cianobacterias

Grupo	Géneros
Grupo I—Unicelulares: células únicas o agregados celulares	<i>Gloeothece</i> (Figura 16.20a), <i>Gloeobacter</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Cyanothece</i> , <i>Gloeocapsa</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Chamaesiphon</i>
Grupo II—Pleurocapsaleanos: se reproduce por la formación de pequeñas células esféricas llamadas baeocistos producidas a través de fisión múltiple	<i>Dermocarpa</i> (Figura 16.20b), <i>Xenococcus</i> , <i>Dermocarpella</i> , <i>Pleurocapsa</i> , <i>Myxosarcina</i> , <i>Chroococidiopsis</i>
Grupo III—Oscilatorias: Células filamentosas que se dividen por fisión binaria en un único plano	<i>Oscillatoria</i> (Figura 16.20c), <i>Spirulina</i> , <i>Arthrospira</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Microcoleus</i> , <i>Pseudanabaena</i>
Grupo IV—Nostocales: Células filamentosas que producen heterocistos	<i>Anabaena</i> (Figura 16.20d), <i>Nostoc</i> , <i>Calotrix</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Cylinodrosperum</i> , <i>Scytonema</i>
Grupo V—Ramificadas: Las células se dividen para formar ramificaciones	<i>Fischerella</i> (Figura 16.20e), <i>Stigonema</i> , <i>Chlorogloeopsis</i> , <i>Hapalosiphon</i>

Se ha demostrado la composición de las bases del DNA de varias cianobacterias. Algunas formas unicelulares varían del 35 al 71% de GC, un margen tan amplio, que parece indicar que el grupo contiene muchos miembros sin ninguna relación entre ellos. Por otra parte, los valores para las especies que forman heteroquistes varían mucho menos, del 39 al 47% de GC. Filogenéticamente, las cianobacterias agrupan muchas líneas en la mayoría de casos. Las especies filamentosas con heteroquistes y sin ellos forman grupos claros, y lo mismo ocurre con las formas ramificadas. Sin embargo, las cianobacterias unicelulares son muy diversas en cuanto a su filogenia, ya que sus representantes muestran un parentesco evolutivo con varios grupos distintos y parecen tener poca relación filogenética entre ellas.

3.1.9 Bacterias del hidrógeno

La mayoría de las bacterias del hidrógeno prefieren condiciones microóxicas cuando crecen quimiolitotróficamente con H_2 , debido a la sensibilidad al oxígeno que presentan las hidrogenasas. Típicamente, el mejor crecimiento se obtiene con una concentración de oxígeno aproximada del 10% (la mitad que en el aire). El níquel debe estar presente en el medio para que crezcan las bacterias del hidrógeno, ya que prácticamente todas las hidrogenasas contienen Ni^{2+} como cofactor metálico. Algunas bacterias del hidrógeno también fijan N_2 molecular y cuando crecen con N_2 , los organismos son muy sensibles al oxígeno, dado que la enzima nitrogenasa necesaria para la reducción del nitrógeno molecular es sensible al oxígeno. A diferencia de las bacterias nitrificantes o de los metanótrofos, las bacterias oxidadoras de hidrógeno generalmente carecen de membranas internas; aparentemente la membrana plasmática de estas bacterias puede integrar suficiente concentración de hidrogenasa para mantener una alta tasa de oxidación de H_2 .

3.1.10 Metanótrofos

El metano, CH_4 , es muy abundante en la naturaleza. Es producido en ambientes anóxicos por bacterias metanogénicas y es el principal gas de los lodos anóxicos, zonas pantanosas, zonas anóxicas de algunos lagos, y el rumen y el intestino de los mamíferos. Es el principal constituyente del gas natural y también está presente en muchas formaciones carboníferas. Su molécula es relativamente estable, pero un grupo variado de bacterias, los metanótrofos, lo oxidan rápidamente utilizando metano y algunos otros compuestos de carbono como donadores de electrones para generar energía y como fuente única de carbono. Estas bacterias son todas aeróbicas y en la naturaleza se encuentran distribuidas en el suelo y el agua. Son de tipos morfológicos diversos; siendo su única relación aparente la capacidad de oxidar metano.

Las bacterias oxidadoras del metano también son únicas entre los procariotes por poseer cantidades relativamente grandes de esteroides. Los esteroides se encuentran en los eucariotes como parte funcional del sistema de membranas, pero están ausentes en la mayoría de los procariotes. En

los metanótrofos, los esteroides pueden ser una parte esencial de su complejo sistema interno de membranas que interviene en la oxidación del metano.

Los metanótrofos están distribuidos ampliamente en ambientes acuáticos y terrestres; se encuentran donde haya una fuente estable de metano. Cuando este compuesto se produce en las regiones anóxicas de lagos, asciende a través de la columna de agua y los metanótrofos se concentran frecuentemente en la banda estrecha de la termoclina, donde el metano procedente de la zona anóxica se encuentra con el oxígeno de la zona óxica. Aunque los metanótrofos son aerobios estrictos, son sensibles al O_2 a concentraciones normales y prefieren hábitats microóxicos para su desarrollo. Una explicación de su sensibilidad al O_2 puede ser que muchos metanótrofos acuáticos fijan al mismo tiempo N_2 y la nitrogenasa es sensible al O_2 , por lo que el desarrollo óptimo se da cuando las concentraciones de O_2 son bajas. Las bacterias oxidadoras de metano desempeñan un papel sencillo, pero probablemente importante, en el ciclo del carbono, convirtiendo de nuevo el metano procedente de la descomposición anóxica en material celular (y en CO_2). Dentro de los géneros fijadores de nitrógeno se encuentran: *Methylococcus*, *Methylosinus* y *Methylocystis*.

En la Tabla 3.6 se indican algunas características de las bacterias metanotróficas⁵⁹:

Tabla 3.6 Algunas características de las bacterias metanotróficas

Organismo	Morfología	Grupo 16S rRNA ^a	Período de latencia	Membranas internas ^b	Ciclo del ácido cítrico ^c	Vía de asimilación del carbono ^d	Fijación del N_2	DNA (mol % GC)
<i>Methylomonas</i>	Bacilo	Bacterias purpúreas gamma	Cuerpos tipo cistes	I	Incompleto	Ribulosa monofosfato	No	50-54
<i>Methylochromium</i>	Bacilo	Bacterias purpúreas gamma	Ninguno	I	Incompleto	Ribulosa monofosfato	No	49-60
<i>Methylobacter</i>	De coco a elipsoide	Bacterias purpúreas gamma	Cuerpos tipo cistes	I	Incompleto	Ribulosa monofosfato	No	50-54
<i>Methylococcus</i>	Coco	Bacterias purpúreas gamma	Cuerpos tipo cistes	I	Incompleto	Ribulosa monofosfato	Sí	62-64
<i>Methylosinus</i>	Bacilo o vibrioide	Bacterias purpúreas alfa	Exoesporas	II	Completo	Serina	Sí	63
<i>Methylocystis</i>	Bacilo	Bacterias purpúreas alfa	Exoesporas	II	Completo	Serina	Sí	63

3.1.11 *Clostridium*

Los anaerobios dominantes que utilizan N_2 son miembros del género *Clostridium*. Las poblaciones de clostridios fijadores de N_2 en terrenos de cultivo pueden ser tan pequeñas como 10^2 o tan grandes como 10^5 por gramo. Bajo algunas condiciones se han detectado 10^6 clostridios por gramo.

Los clostridios carecen del sistema de citocromos y de un mecanismo para la fosforilación por transporte de electrones; por tanto, obtienen ATP *sólo* mediante la fosforilación a nivel de sustrato. En los clostridios se conocen diferentes mecanismos anaeróbicos de producción de energía. La separación del género en subgrupos se basa precisamente en estas características y en la naturaleza del donador de electrones usado. En la Tabla 3.7 se presentan las características de algunos grupos del género *Clostridium*, según los sustratos que fermentan y los productos obtenidos⁵⁹:

Tabla 3.7 Características de algunos grupos del género *Clostridium*

Características clave	Otras características	Especies	DNA (mol % GC)
I. Fermentan carbohidratos	Productos de fermentación: acetato, lactato, succinato, etanol, CO_2 , H_2	<i>C. cellobioparum</i>	28
Fermentan celulosa		<i>C. thermocellum</i>	38–39
Fermentan azúcares, almidón y pectina	Productos de fermentación: acetona, butanol, etanol, isopropanol, butirato, acetato, propionato, succinato, CO_2 , H_2 , algunos fijan N_2	<i>C. butyricum</i>	27–28
		<i>C. acetibutylicum</i>	28–29
		<i>C. pasteurianum</i>	26–28
		<i>C. perfringens</i>	24–27
Fermentan azúcares, principalmente a ácido acético	Síntesis total de acetato a partir de CO_2 , presencia de citocromos en algunas especies	<i>C. thomosulfatigenes</i>	33
		<i>C. acetivum</i>	33
	Células anulares que forman cadenas helicoidales que giran hacia la izquierda;	<i>C. thermoaceticum</i>	54
Fermentan únicamente pentosas o metilpentosas	productos de fermentación: acetato, propionato, <i>n</i> -propanol, CO_2 , H_2	<i>C. formicaceticum</i>	34
		<i>C. methylpentosum</i>	46
II. Fermentan proteínas o aminoácidos	Productos de fermentación: acetato, otros ácidos grasos, NH_3 , CO_2 , a veces H_2 ; algunos también fermentan azúcares hasta butirato y acetato, pueden producir exotoxinas	<i>C. sporogenes</i>	26
		<i>C. tetani</i>	25–26
		<i>C. botulinum</i>	26–28
	Fermenta compuestos de tres carbonos hasta propionato, acetato y CO_2	<i>C. tetanomorphum</i>	25–28
		<i>C. propionicum</i>	35
III. Fermentan carbohidratos o aminoácidos	Productos de fermentación de la glucosa: acetato, formato, pequeñas cantidades de isobutirato y isovalerato	<i>C. bifermutans</i>	27
IV. Fermentadores de purinas	Fermenta ácido úrico y otras purinas formando acetato, CO_2 y NH_3	<i>C. acidurici</i>	27–30
V. Fermentación del etanol a ácidos grasos	Produce butirato, coproato y H_2 ; requiere acetato como aceptor de electrones, no utiliza azúcares, aminoácidos o purinas	<i>C. kluyveri</i>	30

Algunos clostridios fermentan azúcares y tienen como producto final principal *ácido butírico*. Algunos producen también *acetona* y *butanol* y hubo un tiempo en que la fermentación de los clostridios que produce *acetona* tenía importancia industrial y era la principal fuente comercial de dichos productos. Algunos clostridios productores de *acetona* y *butanol* fijan N_2 ; el fijador más importante es *Clostridium pasteurianum*, que es posible que sea el principal responsable de la fijación anaeróbica de nitrógeno en el suelo. Otras especies dominantes que utilizan N_2 parecen ser *C. butyricum* y *C. acetobutyricum*, pero se han encontrado otras especies que llevan a cabo el mismo proceso bioquímico. Los clostridios proliferan cuando se agrega materia orgánica y frecuentemente son abundantes alrededor de las raíces de los vegetales. En contraste con las azotobacterias, que generalmente son más abundantes, los clostridios se encuentran en sitios con pH de 5.0 y son capaces de crecer a un pH de 9.0. La incorporación de N_2 , bajo condiciones adecuadas, es apreciable y se fijan más de 180 microgramos de nitrógeno por mililitro de medio de cultivo. La eficiencia es baja y sólo de 2 a 10 mg de nitrógeno se asimilan por gramo de carbohidrato consumido^{8,59}.

3.1.12 *Azoarcus*

Azoarcus es un género de bacterias respiratorias estrictas, fijadoras de nitrógeno, que pertenecen a la subclase beta de las Proteobacterias⁷². La mayoría de las especies han sido aisladas de las raíces y tallos del pasto Kallar (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth)^{71,72}, que crece como pionero en suelos afectados por sal y de baja fertilidad en Punjab, Pakistán⁸¹. Actualmente las especies del género *Azoarcus* se dividen en cinco grupos⁴¹: grupo A: *Azoarcus tolulyticus*, *Azoarcus evansii*, *Azoarcus indigens*. grupo B: *Azoarcus communis*, grupo C: *Azoarcus sp.*, grupo D: *Azoarcus sp.*, grupo E: *Azoarcus sp.* Las diferencias existentes entre los distintos grupos se basan en el análisis del rRNA 16S. Estudios hechos con los genes estructurales de la nitrogenasa de *Azoarcus* y DNA de las raíces del arroz cultivado en campos japoneses⁹², indican que *Azoarcus sp.* podría establecerse naturalmente en el arroz⁴⁰.

3.1.13 Otras bacterias fijadoras de nitrógeno

Poco se sabe acerca de la ecología o frecuencia de otras bacterias fijadoras de N_2 . Muchos aislamientos de *Klebsiella* catalizan la reacción, pero la abundancia de este género en la naturaleza no se ha estudiado ampliamente. Sin embargo, en estudios individuales de suelos se ha descubierto la presencia de 20 a 18,000 *Klebsiella* y menos de 10^3 células de *Enterobacter* y *Bacillus* por gramo potencialmente capaces de utilizar N_2 . Algunas veces, *Bacillus polymyxa* puede ser el principal fijador de N_2 en ciertas regiones de la tundra de Alaska³.

3.2 FIJACIÓN SIMBIÓTICA DEL NITRÓGENO

3.2.1 El proceso de la fijación simbiótica del nitrógeno

El continuo agotamiento de las fuentes de nitrógeno del suelo y la necesidad de producciones más altas en los cultivos ha dado lugar a un creciente interés por conservar la reserva limitada del elemento. A causa de que sólo una fracción de la necesidad total de nitrógeno para la agricultura proviene de fertilizantes naturales y sintéticos, la porción sobrante debe satisfacerse a partir de las reservas del suelo y a través de la fijación biológica del N_2 atmosférico. Cierta número de microorganismos de vida libre pueden asimilar el nitrógeno molecular, pero ningún animal o planta superior tiene la enzima necesaria para catalizar la reacción. Sin embargo, en ciertos casos se puede establecer una simbiosis, en donde uno de los efectos más importantes de la asociación es la adquisición de nitrógeno de la atmósfera. Se requieren dos miembros para la asociación: una planta y un microorganismo. El ejemplo clásico de tal simbiosis es aquél entre las plantas leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium*. El sitio de la simbiosis es dentro de los nódulos que aparecen en las raíces de las plantas^{3,8,59}. (Figura 3.7)

3.2.2 Las leguminosas

El grupo de plantas más importante relacionado con la fijación simbiótica de N_2 , son plantas dicotiledóneas de la familia *Leguminosae* y se caracterizan por tener las semillas dentro de una vaina. Las 13,000 o más especies, de las cuales cerca de 200 son cultivadas por el hombre, se dividen en tres subfamilias. La más grande de las tres es *Papilionoideae*. En esta subfamilia se encuentran *Trifolium*, *Melilotus*, *Medicago*, *Lotus*, *Phaseolus*, *Dalea*, *Crotalaria*, *Vigna*, *Pisum* y *Lathyrus*. Un pequeño número de géneros se clasifican en la subfamilia *Caesalpinioideae* mientras que *Mimosoideae* es la subfamilia más pequeña de las leguminosas.

En la Figura 3.6 se muestran raíces de leguminosas bien noduladas. Izquierda, trébol rojo; derecha, soya³:

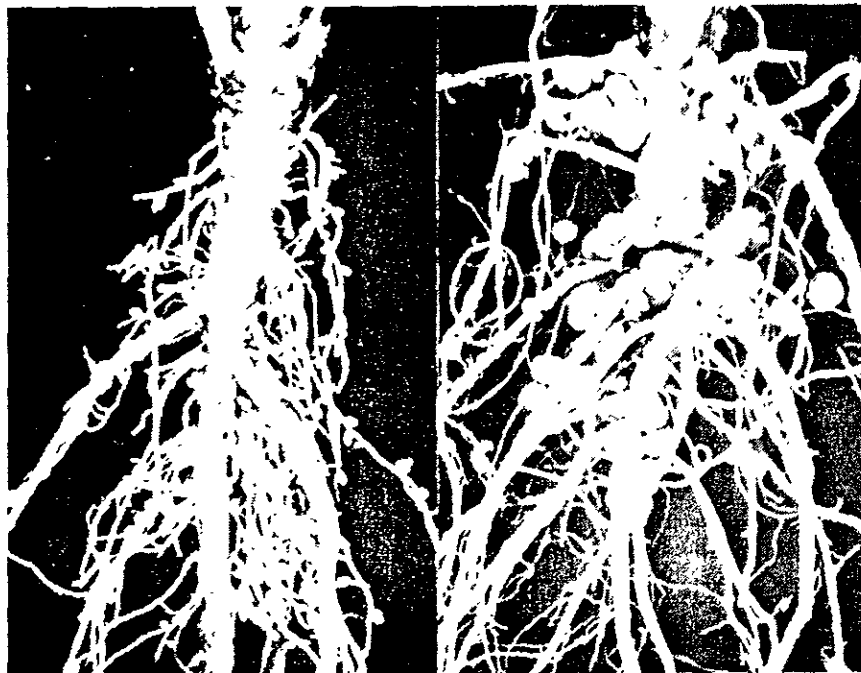


Figura 3.6 Raíces de leguminosas bien noduladas. Izquierda, trébol rojo; derecha, soya

3.2.3 El microsimbionte

Una de las interacciones más interesantes y destacadas entre bacterias y plantas son las que se dan entre las leguminosas y los *Rhizobia*. Todos los *Rhizobia* pertenecen al subgrupo alfa de las

Proteobacteria, basado en las secuencias génicas codificadas por la subunidad menor (16S) del rRNA^{99,44}. Hay tres ramas principales: el género *Bradyrhizobium*⁴⁴, de crecimiento lento, el género *Azorhizobium*¹⁹ y los *Rhizobia* de crecimiento rápido. Los últimos organismos son comúnmente divididos dentro de tres géneros: género *Rhizobium*⁹⁹, *Sinorhizobium*¹³ y *Mesorhizobium*⁴³, además de un cuarto género potencial que hasta ahora está representado sólo por *Rhizobium galegae*³³.

Los miembros de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* al infectar la leguminosa apropiada, pueden causar la formación de nódulos y participar en la adquisición simbiótica de N₂. Las bacterias son Gram negativas, no forman espora, son bacilos aerobios de 0.5 a 0.9 µm de largo. Los representantes de estos géneros son típicamente móviles y utilizan algunos carbohidratos, acumulando a veces ácido, pero nunca gas. Los rizobios son muy similares a *Agrobacterium radiobacter*, una bacteria que difiere de la bacteria de los nódulos de las raíces en ciertos rasgos menores de cultivo y en su incapacidad para infectar las raíces de las leguminosas. Los medios para diferenciar las especies de *Rhizobium* de las bacterias relacionadas son poco satisfactorios pues se basan en la capacidad de los organismos para nodular plantas experimentales. La infección de las raíces de una planta leguminosa con la especie apropiada de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* conduce a la formación de nódulos radiculares (Figura 3.6), que puede convertir el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado. *Azorhizobium*, en cambio, forma nódulos en los tallos. La fijación de nitrógeno por medio de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* es de considerable importancia en agricultura, porque causa un aumento significativo del nitrógeno combinado en el suelo. Dado que la carencia de nitrógeno suele darse en suelos desnudos y sin abonar, las leguminosas noduladas ofrecen una ventaja selectiva en tales condiciones y pueden crecer bien en zonas donde no lo harían otras plantas (Figura 3.7).

El descubrimiento de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* asociadas, en profundidad en el suelo, a las raíces de acacias adultas ha permitido una nueva expansión de la agricultura y de la silvicultura del Sahel, en Senegal²¹.

Emily Alexander, Dat Pham y colaboradores determinaron que el cobre puede inducir deficiencias nutricionales en células de *Rhizobium leguminosarum*, que las convierte en células viables, pero no cultivables (VBNC)^{2,96}.

En la Figura 3.7 se observan nódulos radiculares de la soya. Los nódulos se desarrollan por infección de *Bradyrhizobium japonicum*⁵⁹:

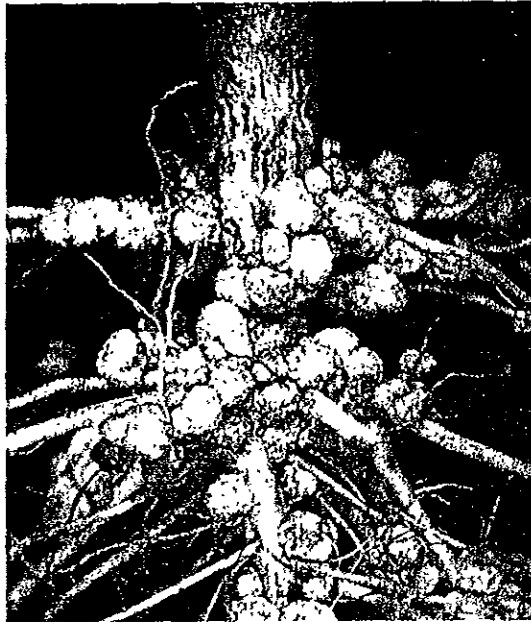


Figura 3.7 Nódulos radiculares de la soya, de *Bradyrhizobium japonicum*

En la Figura 3.8 se observan plantas de soya sin nódulos a la izquierda y con nódulos a la derecha, creciendo en un suelo pobre en nitrógeno^{8,59}:



Figura 3.8 Plantas de soya sin nódulos a la izquierda y con nódulos a la derecha, creciendo en un suelo pobre en nitrógeno.

3.2.3.1 Otras aplicaciones de los rhizobia

Miembros de la familia Rhizobiaceae han mostrado capacidad para la rápida degradación y utilización de herbicidas y pesticidas organofosforados como una fuente de fósforo; el metabolismo ocurre sólo bajo condiciones de estricta limitación de fosfato. John W. McGrath y colaboradores identificaron la biodegradación de más de 10 mM de fosfomicina, como fuente de carbono, energía y fósforo con la cepa PMY1 de *Rhizobium huakuii*. Esto se realizó con la concomitante liberación de fósforo inorgánico (Pi). Esta biodegradación representa un mecanismo más de resistencia a este antibiótico y una nueva ruta de desregulación de fosfato para el metabolismo de organofosforados de *Rhizobium spp*⁶¹.

G. I. Paton y colaboradores utilizaron una cepa de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* aislada del suelo y marcada con el gen *lux* CDABE, con la capacidad de expresar luminiscencia. La conveniencia de esta bacteria como un biosensor de contaminación de suelo fue evaluada usando ensayos precisos y repetidos. La bioluminiscencia bacteriana respondió sensiblemente a los metales estudiados. Se encontró que el orden de sensibilidad es: Cd mayor que Ni, igual a Zn, mayor que Cu, para la prueba de precisión; y, Cd mayor que Ni, igual Zn, igual Cu, para la prueba de repetibilidad.. La respuesta notable del biosensor es potencial para su uso como un indicador de contaminación de suelo en estudios de ecotoxicidad⁶⁹.

3.2.4 Grupo de inoculación cruzada

Un grupo de inoculación cruzada se refiere a un conjunto de especies de leguminosas que desarrollan nódulos cuando se exponen a bacterias obtenidas de los nódulos de cualquier miembro de ese grupo particular de plantas. Consecuentemente, un solo grupo de inoculación cruzada incluye idealmente todas las especies de hospederos que son infectadas por una sola cepa bacteriana. Se han establecido más de 20 grupos de inoculación cruzada de los cuales sólo 7 han resultado ser de importancia y no más de 6 se han delimitado lo suficiente para que la bacteria responsable logre la

posición de especie. El esquema de clasificación que se ha aceptado, basado en los grupos de inoculación cruzada, se presenta en la Tabla 3.8. Sin embargo, muchas leguminosas de importancia agrícola, así como plantas no cultivadas, no son noduladas por bacterias de los seis principales grupos. El trébol pata de pájaro (*Lotus corniculatus*), la acacia negra (*Robinia pseudoacacia*), el cáñamo sesbania (*Sesbania exaltata*) y otros que no se ajustan dentro de las categorías establecidas requieren de cepas bacterianas claramente diferentes. Sólo un pequeño porcentaje de las especies de leguminosas que se han reportado en la literatura botánica está incluido dentro de los seis grupos de inoculación cruzada definidos^{3,8,59}.

En la Tabla 3.8 se presentan los principales grupos de inoculación cruzada de plantas leguminosas⁵⁹:

Tabla 3.8 Principales grupos de inoculación cruzada de plantas leguminosas

Planta	Nódulos producidos por
Guisante	<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i> ^a
Judía	<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i>
Judía	<i>Rhizobium tropici</i>
Judía	<i>Rhizobium etli</i>
Trébol	<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>trifoli</i>
Alfalfa	<i>Rhizobium meliloti</i>
Soja	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
Soja	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
Soja	<i>Rhizobium fredii</i>
<i>Sesbania rostrata</i> (una leguminosa tropical)	<i>Azorhizobium caulinodans</i>

^aExisten diversas variedades (biovars) de *Rhizobium leguminosarum*; cada una capaz de inducir nodulación en una leguminosa diferente.

Las seis especies de *Rhizobium* no son completamente distintas. Por ejemplo, los grupos bacterianos de la soja y el caupí, comúnmente considerados por separado, contienen muchas cepas bacterianas similares y los organismos aislados de los nódulos de la soja frecuentemente infectan caupíes y viceversa. Estos resultados sugieren que al menos algunos de los rizobios de caupí pueden ser variedades de *B. japonicum*. Más aún, ciertas cepas de *R. lupini* poseen un grado de similitud con el tipo caupí-soja. Se puede hacer una distinción razonablemente clara entre los Rizobios que pueden tener tiempo de generación de dos a cuatro horas y producir ácido en medio de cultivo, y

aquellos con tiempo de generación comúnmente de seis a ocho horas y que crean condiciones alcalinas en cultivo. El primer grupo incluye *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. phaseoli* y *R. trifoli* y el último incluye *B. japonicum* y *R. lupini*.

La validez del sistema de inoculación cruzada se ha puesto a discusión, ya que muchas leguminosas son noduladas por rizobios de otros grupos hospedero-bacteria. Las cepas bacterianas que invaden leguminosas fuera de su clase particular y plantas que son infectadas de este modo son ejemplos de un fenómeno denominado *promiscuidad simbiótica*. Ocasionalmente, un hospedero es infectado por microorganismos normalmente clasificados en un número determinado de diferentes grupos planta-bacteria. Las clases de inoculación cruzada no son, por consiguiente, completamente adecuadas para la descripción de la capacidad de nodulación de muchos organismos. Los ejemplos de simbiosis fuera de las clases de inoculación cruzada establecidas son a menudo incapaces de fijar N_2 . Más aún, la importancia agrícola de estos grupos aún permanece como un rasgo clave del sistema taxonómico establecido y, aunque se proponga un nuevo esquema, uno está forzado a confiar en el criterio existente que constituye la base para la inoculación de leguminosas en la práctica agrícola.

Los rizobios crecen fácilmente en medios de cultivo que contienen fuentes de carbono tales como: manitol o glucosa, y amonio o nitrato para suministrar el nitrógeno requerido y algunas sales inorgánicas. Además de la fuente de carbono orgánico, los microorganismos a menudo necesitan una o varias vitaminas B. Las vitaminas que se requieren incluyen a la biotina, tiamina y ácido pantoténico, y algunas veces riboflavina. El hecho de que las bacterias requieren cobalto o su crecimiento sea estimulado por él, es de algún significado práctico, aunque sólo pequeñas cantidades satisfacen completamente sus necesidades. Hasta hace poco se creía que ninguna bacteria en medio de cultivo utilizaba N_2 , pero ahora es evidente que al menos algunas cepas fijan N_2 fuera de la planta. Es muy probable que se encuentren más cepas que tengan esta capacidad. Sin embargo, es posible que los rizobios aislados sean incapaces de llevar a cabo el proceso en la

naturaleza en un grado significativo, de manera que la asociación aún puede ser juzgada como simbiosis verdadera, al menos desde un punto de vista ecológico y práctico³.

La presencia de una gran población de rizobios es de particular importancia para el desarrollo de la relación simbiótica. Debido a que no hay medios selectivos para los organismos de los nódulos, un procedimiento común para su enumeración es la inoculación de diluciones decimales del suelo prueba en recipientes con suelo estéril o medio nutritivo sembrado con la leguminosa en cuestión. Después de un periodo de incubación adecuado se examinan las raíces y la dilución más alta que dio origen a nódulos se toma como indicador de la densidad de población. Cuando se usa este método de cuantificación se encuentra que las cifras de *B. japonicum*, *R. meliloti* y *R. trifolii* varían desde cantidades tan pequeñas como 10 hasta tantas como 10^6 por gramo, dependiendo de la estación del año, de la historia de cultivo del terreno y prácticas de laboreo del suelo. Los organismos son a veces más numerosos en cultivos rotatorios que tienen la leguminosa específica, que en los campos donde no existe dicha leguminosa. Los rizobios son frecuentemente más abundantes en la proximidad de las raíces que a cierta distancia de ellas, pero a menudo esta estimulación es tan pronunciada en la vecindad de las plantas no leguminosas como en la proximidad de las raíces que la bacteria potencialmente puede infectar. Los microorganismos son naturales en suelos sin ningún rastro reciente del macrosimbionte, pero su frecuencia se eleva generalmente si la planta hospedera está presente; no obstante, es común que no se encuentre una correlación entre su abundancia y el número de años desde el último cultivo del macrosimbionte apropiado³.

Se emplean varios métodos, además de las pruebas de plantas, para estudios de la ecología de los rizobios. El uso de hospederos apropiados para mostrar la presencia de las bacterias en diluciones de suelo es un excelente método de cuantificación pero requiere de mucho tiempo, además de que es laborioso. También se ha desarrollado la microscopía inmunofluorescente para investigaciones de la ecología del grupo, permitiendo la visualización directa de los rizobios en el suelo. Otro medio completamente diferente involucra el uso de mutantes resistentes a los antibióticos derivados de los

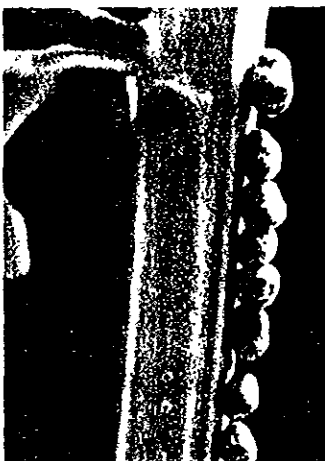
rizobios de interés particular. Estas mutantes toleran concentraciones tan altas de antibióticos que cuando los suelos que contienen las cepas experimentales son plaqueados en agar con el compuesto tóxico, pocas bacterias del suelo desarrollan colonias. Sin embargo, la mutante es enumerada con facilidad, aun cuando su población haya disminuido considerablemente³.

Las evaluaciones de sobrevivencia de los habitantes de los nódulos han sido facilitadas por estos diferentes procedimientos. Cuando se agregan a suelo húmedo en grandes cantidades, las poblaciones que han sido examinadas no disminuyen fácilmente, aunque la velocidad de pérdida de viabilidad se favorezca incrementando la temperatura. Similarmente, muchas cepas persisten bien en suelos secos, siempre y cuando la temperatura no sea muy alta o el pH muy bajo. Ciertos grupos de bacterias de los nódulos de las raíces no sobreviven veranos largos y calurosos cuando el suelo está seco. Bajo tales circunstancias, la pérdida de viabilidad puede ser tan marcada que las leguminosas, al tener muy pocos nódulos, no se desarrollan óptimamente, a pesar de la presencia de abundantes nódulos en las plantas el año anterior. La muerte asociada con ambientes secos expuestos a temperaturas elevadas está muy afectada por la clase de arcilla; algunos de esos coloides previenen una marcada disminución en la mortalidad de las células, resultado del calor seco³. En ocasiones existen cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* que inducen una respuesta sistémica en el hospedero que puede inhibir la nodulación de otra cepa invasiva de *Rhizobium* o *Bradyrhizobium*^{30,82}.

3.2.5 Rhizobios formadores de nódulos en el tallo

Aunque en la mayoría de las leguminosas los nódulos fijadores de nitrógeno se forman en las raíces, algunas especies los poseen en los tallos. Son plantas que abundan en regiones tropicales, con suelos a menudo pobres en nitrógeno debido a la lixiviación y a la intensa actividad biológica. El principal sistema formador de nódulos en el tallo con que se ha experimentado es el constituido por la leguminosa *Sesbania* y la bacteria *Azorhizobium caulinodulans* (Figura 3.9). Los nódulos del tallo normalmente se forman en la porción que queda sumergida o justo por encima del nivel del

agua. En la Figura 3.9 se observan nódulos del tallo causados por *Azorhizobium*. La fotografía muestra el tallo de la leguminosa tropical *Sesbania rostrata*. En la parte izquierda del tallo aparecen lugares sin inocular, mientras que idénticos lugares del lado derecho están inoculados por los rizobios formadores de nódulos⁵⁹:



B. Dreyfus

Figura 3.9 Nódulos del tallo causados por *Azorhizobium*.

Los estudios llevados a cabo indican que la secuencia general de acontecimientos en la formación de este tipo de nódulo es muy parecida a la de los nódulos radicales. Aparece un tubo de infección y la formación del bacteroide precede al estado de fijación de N_2 .

Un hallazgo curioso es que algunos rizobios formadores de nódulos en el tallo producen bacterioclorofila *a* y pueden, por tanto, llevar a cabo la fotosíntesis anoxigénica. Los rizobios que contienen clorofila son frecuentes en la naturaleza, especialmente asociados a leguminosas tropicales, en las cuales la luz aportaría al menos una parte de la energía necesaria para el proceso de fijación de N_2 por la bacteria.

3.3 NODULACIÓN

3.3.1 El proceso de nodulación

Las relaciones entre la formación de nódulos y la asimilación de N_2 se demostró por primera vez en 1888 por Hellriegel y Wilfarth, pero pasó más de medio siglo antes de que los estudios con

$^{15}\text{N-N}_2$ proporcionarían la prueba inequívoca de que en los nódulos es donde se suscita la reacción de fijación. La localización de las enzimas que metabolizan N_2 en su tejido de la raíz modificado, indica que la nodulación y el proceso bioquímico relacionado son de primordial importancia para el bienestar de los cultivos de leguminosas.

3.3.2 Etapas de la formación de los nódulos

Actualmente se conocen bien las etapas de la infección y desarrollo de los nódulos radiculares (Figura 3.10) Incluyen:

1. **Reconocimiento** de la “pareja” adecuada, tanto por parte de la planta como de la bacteria, y **adherencia** de la bacteria a los pelos radiculares.
2. **Invasión** del pelo radicular y formación, por parte de la bacteria, de un tubo de infección
3. **Desplazamiento** hacia la raíz principal a través del tubo de infección.
4. Aparición de células bacterianas deformes, llamadas **bacteroides**, dentro de las células de la planta, y desarrollo del estado de fijación de nitrógeno.
5. Proceso continuado de división de las células bacterianas y vegetales y formación del **nódulo radicular maduro**^{8,39}.

En la Figura 3.10 se muestran los pasos en la formación de un nódulo radicular en una leguminosa infectada por *Rhizobium*^{8,39}:

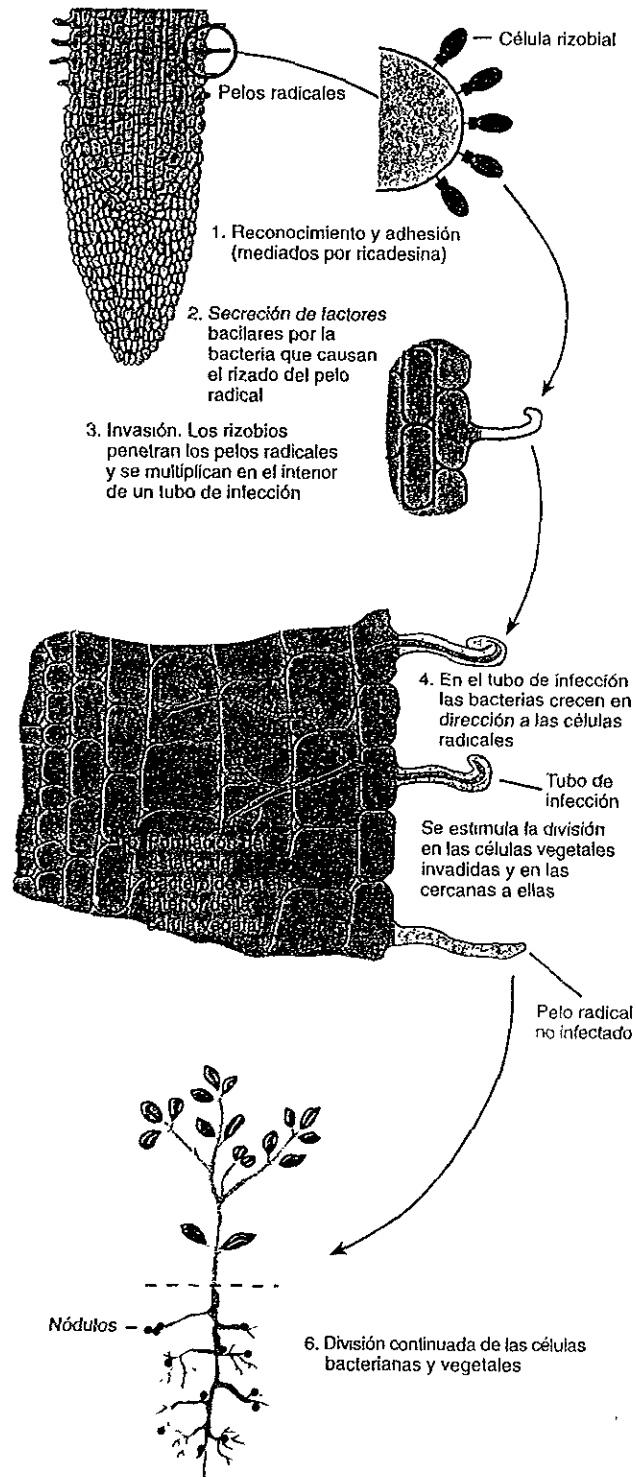


Figura 3.10 Pasos en la formación de un nódulo radicular en una leguminosa infectada por *Rhizobium*.

Exploraremos ahora con más detalle algunas de estas etapas de la formación de nódulos:

Las raíces de las leguminosas segregan diversos materiales orgánicos que estimulan el crecimiento de una microbiota en la rizósfera. Este estímulo no es exclusivo de los rizobios; se da también en otras bacterias de la rizósfera. Si en el suelo hay rizobios, se desarrollan en la rizósfera hasta constituir poblaciones muy densas. El primer paso en la formación de los nódulos, es la adherencia de la bacteria a la planta en la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*. En la superficie de todas las especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* se localiza una proteína específica de la adherencia, la **ricadesina**. Es una proteína que se une al calcio en la superficie de los pelos radiculares. Otras sustancias, como las **lectinas**, que son proteínas que contienen carbohidratos, también cumplen una función en la adherencia planta-bacteria. Las lectinas han sido identificadas en los extremos de los pelos radiculares y en la superficie de las células de *Rhizobium*. Después de la unión, los pelos radiculares se enroscan debido a la acción de unas sustancias secretadas por la bacteria, que se conocen como **factores Nod**. La bacteria penetra entonces en el pelo radicular a través de la punta de éste. En esta etapa, la pared del pelo radicular se invagina y la invaginación continúa convirtiéndose en una estructura tubular e induce la formación, por parte de la planta, de un tubo de celulosa conocido como **tubo de infección** ó **cordón de infección**, parecido a una hifa, que avanza por el pelo radicular y forma la llamada ruta de infección, que se extiende hacia la base del pelo radicular (Figura 3.11). A continuación, la infección alcanza a las células de la raíz adyacentes a los pelos radiculares.

Una célula de la raíz adyacente al pelo radicular queda entonces infectada, y si esta célula es del tipo *diploide normal*, generalmente es destruida por la infección, sufriendo necrosis y degeneración; pero si es una célula *tetraploide*, puede convertirse en la precursora de un nódulo. En la raíz siempre hay un pequeño número de células *tetraploides* que se han originado espontáneamente, y si una de ellas queda infectada se estimula su división, los factores Nod estimulan la división de estas células. Las divisiones progresivas de células infectadas de esta manera, dan lugar a la producción de un nódulo parecido a un tumor (Figura 3.12). Sólo una pequeña porción de los pelos radiculares

invadidos desarrolla nódulos; usualmente menos del 5% de las infecciones producen finalmente nódulos.

Las bacterias se multiplican rápidamente en el interior de las células tetraploides vegetales y se transforman en unas formaciones ramificadas, hinchadas y deformes, llamadas **bacteroides**. Los bacteroides varían en tamaño y forma, y aquellos formados por *R. leguminosarum*, por ejemplo, son apreciablemente diferentes de los de *R. trifolii*. Muchas autoridades no restringen el término bacteroide a los microorganismos de forma peculiar encontrados en los nódulos de muchas leguminosas y usan la palabra para designar a las bacterias presentes en todos los tipos de nódulos, aunque los rizobios presenten o no la singular morfología.

Los bacteroides quedan rodeados, individualmente o en pequeños grupos, por porciones de membrana de la célula vegetal, llamada **membrana peribacteroidal**. La fijación del nitrógeno no se inicia hasta que se han formado los bacteroides. (Los nódulos efectivos pueden detectarse mediante reducción por acetileno).

Cuando la planta muere, el nódulo se deteriora y las bacterias pasan al suelo. Las formas bacteroidales no tienen capacidad de división, pero contienen siempre algunos bacilos en estado de latencia. Estas formas bacilares proliferan en el suelo utilizando como nutrientes algunos de los productos del nódulo destruido y las bacterias pueden iniciar la infección en otras raíces o mantenerse en estado libre en el suelo^{3,8,59,91}.

Existen diferencias morfológicas importantes en la morfología de los nódulos entre leguminosas. Los tréboles rojo y blanco tienen estructuras en forma de basto y lobuladas; los nódulos de la alfalfa están más ramificados y largos, mientras que aquéllos del caupí, cacahuete y frijol lima presentan una forma esférica. En algunas plantas, por ejemplo el frijol terciopelo, los nódulos pueden alcanzar el tamaño de una pelota de béisbol mientras que los nódulos de otras leguminosas no tienen más que varios milímetros de diámetro. Las leguminosas con raíces fibrosas tienen frecuentemente una mayor abundancia de nódulos que las planas con raíces primarias bien formadas; las plantas que

tienen nódulos grandes a menudo tienen sólo unos pocos, mientras que las raíces con estructuras pequeñas los tienen en cantidades mayores³.

En la Figura 3.11 se observa un tubo de infección y la formación de nódulos radiculares. (a) Tubo de infección formado por células de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sobre un pelo radicular de un trébol blanco (*Trifolium repens*). El tubo de infección consiste en un tubo de celulosa a través del cual se desplaza la bacteria hasta las células de la raíz. (b-d) Nódulos radiculares de alfalfa infectada con células de *Rhizobium meliloti* en diferentes estadios de desarrollo. La longitud aproximada de las células de *R. leguminosarum* biovar *trifolii* y *Rhizobium meliloti* es de 2 µm. Las fotos b-d han sido reproducidas de la revista *Nature* 351:670-673 (1991)⁵⁹:

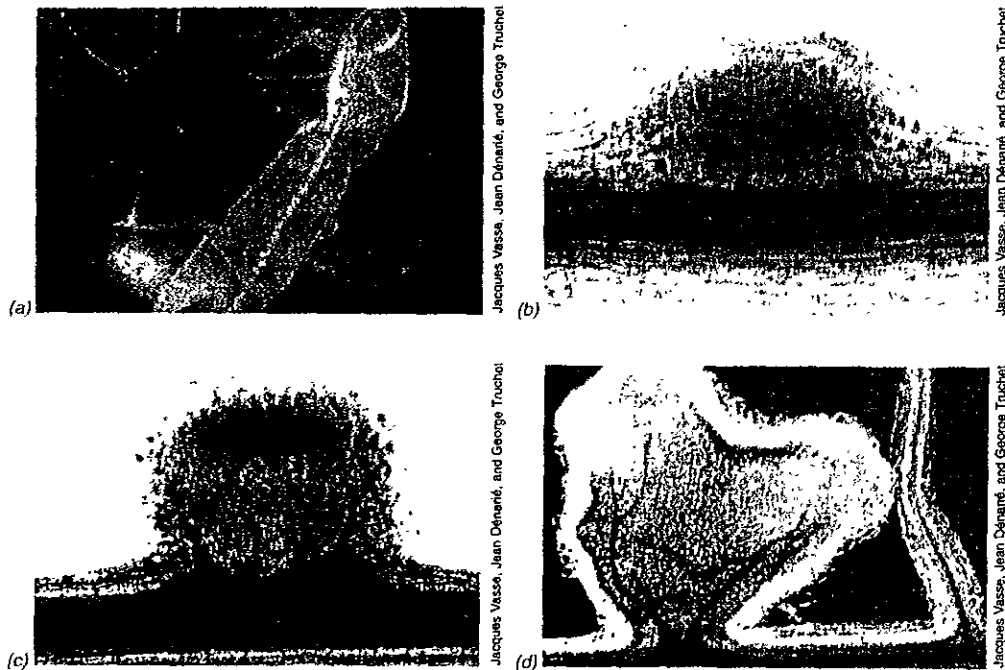


Figura 3.11 Tubo de infección y formación de nódulos radiculares. (a) Tubo de infección formado por células de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* sobre un pelo radicular de un trébol blanco (*Trifolium repens*). (b-d) Nódulos radiculares de alfalfa infectada con células de *Rhizobium meliloti* en diferentes estadios de desarrollo.

Los nódulos no se encuentran en todos los géneros y especies de Leguminosae. La incapacidad aparente de desarrollar simbiosis es más evidente en la subfamilia *Caesalpinioideae*, en la cual,

cerca de tres cuartos de las especies examinadas minuciosamente no contienen estructuras nodulares. Sólo unas 1,300 del total (que consta de aproximadamente 13,000 especies) de Leguminosae se han investigado para determinar la presencia de nódulos radiculares. El gran porcentaje de especies de *Caesalpinioideae* que no pueden desarrollar infecciones radiculares puede indicar un estado primitivo de desarrollo fisiológico en donde la capacidad de simbiosis no ha sido desarrollada. Sin embargo, además de los rasgos genéticos o bioquímicos innatos del hospedero que impiden la infección, está la posibilidad de que las investigaciones ecológicas no hayan sido suficientemente intensivas³.

En la Figura 13.12 se muestra: (a) La sección transversal de un nódulo radicular de leguminosa visto por microscopía de fluorescencia. La región teñida de oscuro contiene células de la planta llenas de bacterias. (b) Microfotografía electrónica de la sección fina de una sola célula de un nódulo subterráneo de trébol. La célula está repleta de bacterias, *Rhizobium trifolii*, que tiene alrededor de 2 μm de longitud⁵⁹:

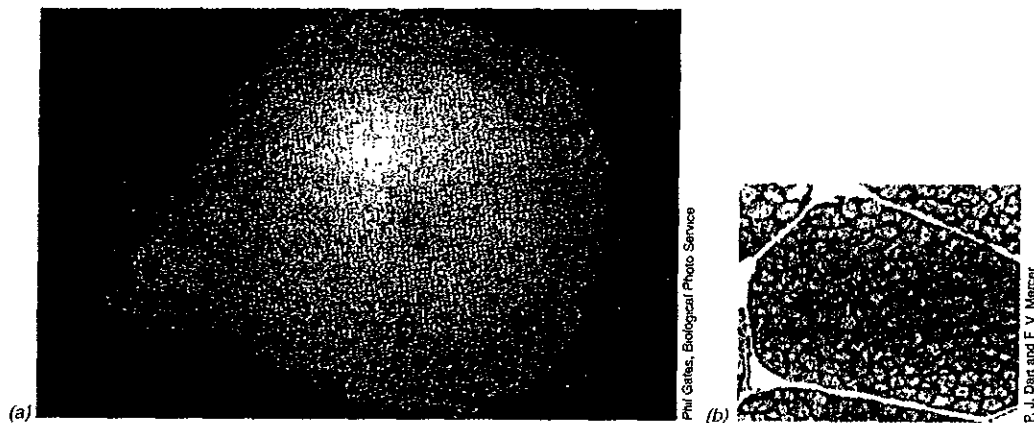


Figura 3.12 (a) Sección tansversal de un nódulo radicular de leguminosa. (b) Sección fina de una sola célula de un nódulo subterráneo de trébol. La célula está repleta de *Rhizobium trifolii*

No todos los rizobios son capaces de invadir plantas leguminosas, de manera que la *infectividad*, la capacidad de una cepa para nodular un hospedero dado es de considerable importancia económica. Más aún, entre las cepas *infectivas*, la capacidad de las bacterias de los nódulos para

llevar a cabo la fijación de N_2 en conjunto con la planta varía mucho. La capacidad relativa de la asociación planta-bacteria, una vez establecida, para asimilar nitrógeno molecular se conoce como **efectividad**. Muchas cepas de *Rhizobium* son muy efectivas mientras que otras son muy o completamente inefectivas. Una cepa que no permite fijación a una tasa suficiente que cubra las demandas del hospedero es parcialmente efectiva o totalmente inefectiva. Consecuentemente, la mera presencia de nódulos no es una *garantía* de que un cultivo de leguminosas pueda beneficiarse con nitrógeno gaseoso. No se han establecido las razones bioquímicas por las que las cepas inefectivas son incapaces de asimilar N_2 , cuando se localizan en la estructura nodular.

Las bacterias inefectivas de los nódulos de las raíces producen un mayor número de nódulos que los cultivos efectivos, pero los nódulos son más pequeños en tamaño y tienden a estar mas ampliamente distribuidos en el sistema radicular. Por otra parte, una sola cepa microbiana puede ser inefectiva o parcialmente efectiva en un hospedero que esté además asociado con la fijación activa de N_2 en otra variedad o especie de leguminosa. Más aún, las cepas bacterianas que parecen efectivas en ciertos hospederos pueden alcanzar el parasitismo en otros. Por consiguiente, no es posible concluir que una cepa dada es efectiva o inefectiva en términos absolutos.

El medio ambiente tiene una marcada influencia en el desarrollo de la asociación simbiótica. Los efectos del medio ambiente actúan ampliamente provocando alteraciones en la fisiología del hospedero. Los niveles inadecuados de muchos nutrientes inorgánicos alteran el desarrollo de los nódulos de una o varias formas, pero tales alteraciones son usualmente reflejo del crecimiento anormal de la planta. La nodulación tiene lugar generalmente a todas las temperaturas del suelo que tolera la planta, pero la abundancia de los nódulos se reduce en los extremos más fríos y más calientes. La duración del día e intensidad de luz también afectan el número de nódulos. La falta de luz también tiende a disminuir el peso de los nódulos mientras que la intensidad de luz elevada, pero no excesiva, y los altos niveles de CO_2 aumentan el número de nódulos. Se observa un efecto opuesto después de las adiciones de nitrógeno; es decir, el número de nódulos y su peso se reducen. La influencia de la duración del día, intensidad de luz, nitrógeno y suministro de CO_2 pueden ser

interpretados en términos de concentración interna de carbohidratos, luz abundante y CO₂, los cuales incrementan el almacenamiento de carbohidratos en la planta, favorecen la producción de nódulos, mientras que el nitrógeno disminuye el suministro interno de carbohidratos y al mismo tiempo tiene una influencia retardante en la nodulación. Sin embargo, los mismos hechos pueden usarse para dar bases a una teoría que involucre la proporción carbohidratos : nitrógeno para la nodulación. Aún no se ha resuelto cuál es el suministro más crítico, si el de carbohidratos o el de nitrógeno^{3,8,59,91}.

3.3.3 Bioquímica de la fijación de nitrógeno en los nódulos

La nitrogenasa de los nódulos radiculares posee características similares a la enzima de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, incluyendo la sensibilidad al O₂ y la capacidad de reducir el acetileno y N₂. La nitrogenasa está localizada en el interior de los bacteroides y no es liberada al citosol de la célula vegetal.

Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para la fijación del nitrógeno. Los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides a través de la membrana peribacteroidal son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en particular los ácidos de cuatro carbonos: *succinato*, *malato* y *fumarato* (Figura 3.13). Estos ácidos son utilizados como donadores de electrones para la producción de ATP y, después de su conversión en piruvato, como última fuente de electrones para la reducción de N₂.

El primer producto estable que se obtiene en la fijación del N₂ es el *amoniaco*, y varios tipos de pruebas indican que la asimilación del amoniaco para formar compuestos de nitrógeno orgánico en los nódulos radiculares la lleva a cabo principalmente la planta. Aunque los bacteroides pueden asimilar algo de amoniaco en forma de compuestos orgánicos, poseen unos niveles muy bajos de enzimas asimiladoras de amoniaco. En cambio, la enzima *glutamina sintetasa*, que asimila amoniaco (Figura 3.14), está presente en elevadas concentraciones en el citoplasma de la célula vegetal. Por tanto, el amoniaco transportado desde el bacteroide a la célula vegetal puede ser

asimilado por la planta en forma del aminoácido glutamina. Además de la glutamina, otros compuestos de nitrógeno, especialmente otros aminoácidos y amidas, como la asparragina y la 4-metil glutamina, y los ureidos alantofna y ácido alantoico, son sintetizados por la planta y transportados luego a los tejidos vegetales. (Figura 3.13)⁵⁹.

En la Figura 3.13 se muestra el diagrama de las principales reacciones metabólicas y de intercambio de nutrientes que tienen lugar en el bacteroide^{8,53}:

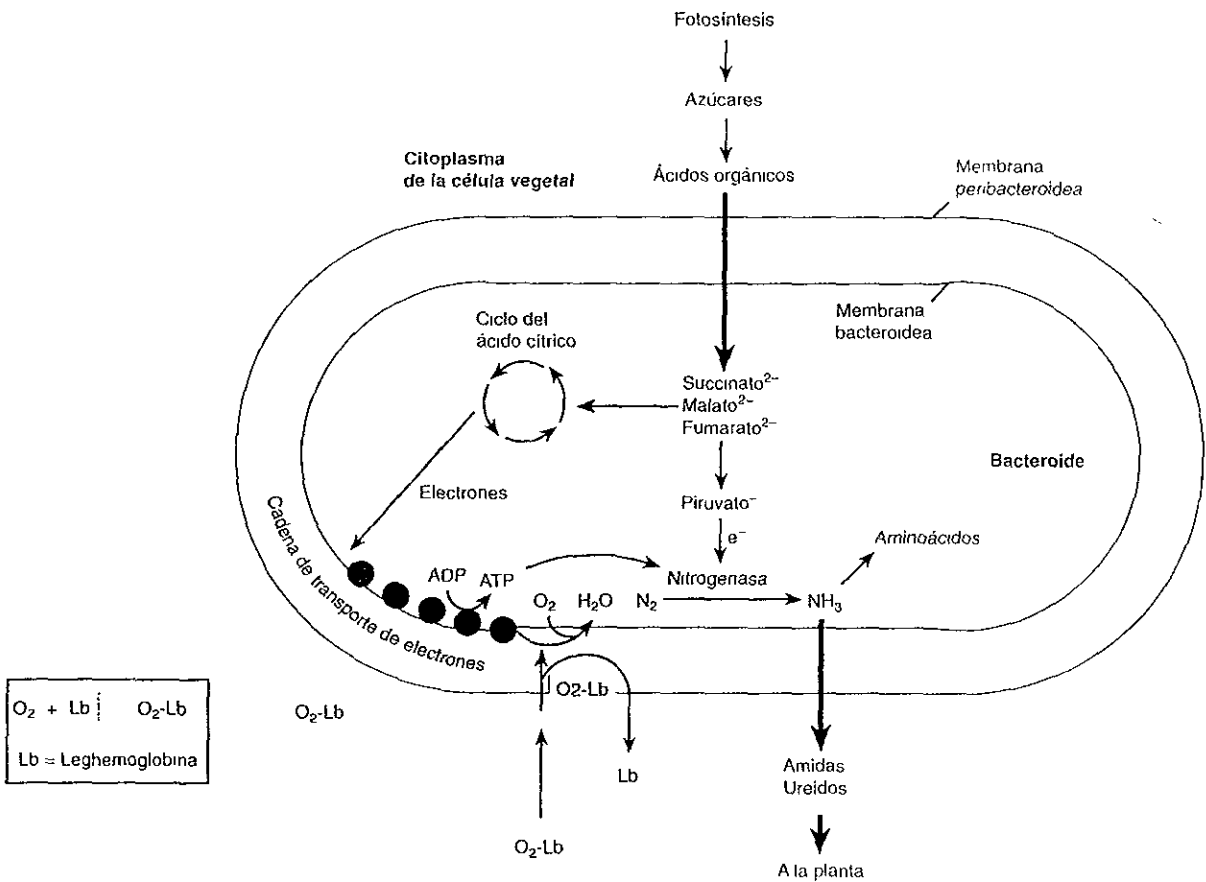


Figura 3.13 Diagrama de las principales reacciones metabólicas y de intercambio de nutrientes que tienen lugar en el bacteroide.

En la Figura 3.14 se indica el papel de la glutamina sintetasa en la asimilación de amoníaco. (a) Reacción de la glutamina sintetasa. (b) Reacción de la glutamato sintasa (GOGAT). (c) Suma de las dos reacciones. La reacción (c) también puede realizarse por la glutamato deshidrogenasa en ausencia de ATP, pero solo a altas concentraciones de amoníaco. La glutamina sintetasa y la glutamato sintasa son activas a bajas concentraciones de amoníaco⁵⁹:

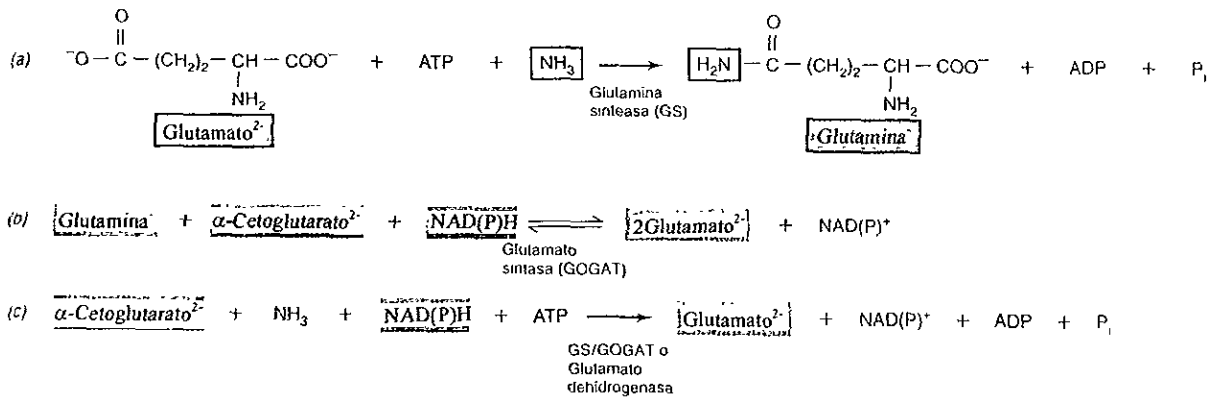


Figura 3.14 Papel de la glutamina sintetasa en la asimilación de amoníaco

3.3.4 Leghemoglobina

En los nódulos de las leguminosas que metabolizan activamente el N_2 , *Rhizobium* necesita algo de O_2 para generar energía para la fijación de N_2 ; sin embargo, su nitrogenasa es inactivada con O_2 . En el nódulo las concentraciones exactas de O_2 están controladas por la **leghemoglobina**, que es una proteína, que es roja y contiene hierro, está siempre presente en nódulos sanos fijadores de N_2 , que son característicamente de color rojo. La leghemoglobina funciona como un “tampón de oxígeno”, cuyo ciclo va de la forma oxidada del hierro (Fe^{3+}) a la reducida (Fe^{2+}) para mantener la concentración de O_2 en el interior del nódulo baja, pero constante. En el interior del nódulo, la relación entre el O_2 ligado a la leghemoglobina y el O_2 libre es del orden de 10,000 a 1.

Por el contrario, los nódulos producidos por rizobios inefectivos no tienen ni leghemoglobina ni pigmentación roja. Más aún, el grado de efectividad usualmente puede estar correlacionado con la cantidad de leghemoglobina en el tejido nodular (Figura 3.15). Consecuentemente, examinando

visualmente el contenido de los nódulos, es posible asegurar la capacidad relativa para la fijación activa de N_2 o, por determinación espectrofotométrica de la concentración de leghemoglobina, aproximar la efectividad bacteriana. La leghemoglobina está localizada fuera de la bacteria en el nódulo y parece estar situada entre la célula microbiana y la membrana derivada de la planta que rodea al rizobio. Las leghemoglobinas de los nódulos formadas en las mismas especies de plantas por diferentes cepas de *Rhizobium* son idénticas, mientras que en los nódulos de leguminosas diferentes producidos por la misma cepa bacteriana son diferentes. Ni las plantas ni *Rhizobium* pueden sintetizarla de manera independiente. Se supone que su formación es inducida por la interacción de ambos organismos. En consecuencia, el hospedero es el determinante genético de la síntesis de esta nueva sustancia. No obstante, el microorganismo es esencial, de alguna manera desconocida, para provocar que su hospedero inicie el proceso biosintético.

A causa de su relación con el metabolismo del N_2 de las leguminosas, la leghemoglobina ha estado sujeta a considerable investigación bioquímica. Los bacteroides son aerobios y consumen ávidamente O_2 que se hace disponible para ellos en su lugar peculiar; la leghemoglobina estimula la utilización de O_2 y, probablemente en forma indirecta, favorece la reacción de fijación. Esto puede ser tomado como una indicación de que la leghemoglobina sirve en la simbiosis para facilitar el movimiento de O_2 a través del tejido del hospedero, deficiente en O_2 , hacia la zona inmediata que rodea a la bacteria. En la Figura 3.15 se observa la sección transversal de nódulos radiculares de la leguminosa *Coronilla varia*, mostrando el pigmento rojizo de la leghemoglobina⁵⁹:

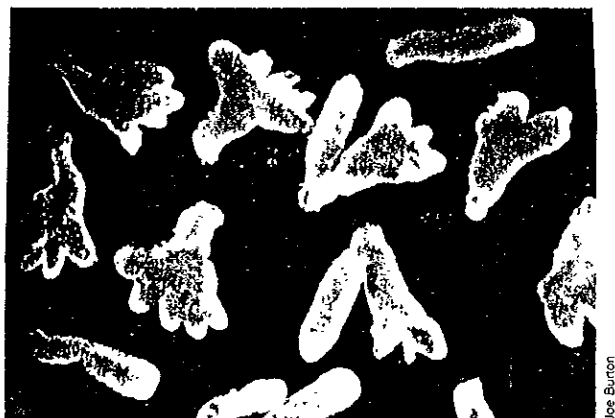


Figura 3.15 Sección transversal de nódulos radiculares de la leguminosa *Coronilla varia*, mostrando el pigmento rojizo de la leghemoglobina.

3.4 Simbiosis entre fijadores de nitrógeno y plantas no leguminosas

Algunos géneros de Angiospermas no leguminosas poseen, en algún estadio de sus ciclos de vida, nódulos en sus raíces. Las no leguminosas noduladas en las que se ha confirmado la capacidad para hacer uso de N_2 están representadas por los siguientes:

FAMILIA	GÉNERO
Betulaceae	<i>Alnus</i>
Myricaceae	<i>Myrica</i>
	<i>Comptonia</i>
Eleagnaceae	<i>Eleagnus</i>
	<i>Hippophaë</i>
Rhamnaceae	<i>Shepherdia</i>
	<i>Ceanothus</i>
	<i>Discaria</i>
Corariaceae	<i>Coriaria</i>
Rosaceae	<i>Dryas</i>
	<i>Purshia</i>
Casuarinaceae	<i>Casuarina</i>

No todos los géneros en estas familias y no todas las especies de estos 13 géneros fijan N_2 . En algunos ambientes, las especies de estos géneros pueden ser más abundantes que las leguminosas, de manera que la capacidad de los nódulos formados por tales géneros para asimilar N_2 tiene una considerable importancia ecológica.

No es difícil establecer el papel de los nódulos en tales plantas no leguminosas. El crecimiento de la planta en soluciones nutritivas que contienen bajas concentraciones de nitrógeno es marcadamente menor y son evidentes las deficiencias de nitrógeno. No obstante, la adición de una preparación de nódulos al medio radicular da como resultado la producción de nódulos en las plantas experimentales. Los hospederos nodulados se desarrollan entonces sin ningún síntoma de

deficiencia, alcanzan una altura mayor y parecen más vigorosos que los controles no inoculados. Un análisis químico del nitrógeno total, la exposición de hospederos infectados a N₂ marcado con ¹⁵N o pruebas con la técnica de reducción del acetileno proveen la prueba final de la existencia de enzimas que metabolizan N₂.

Uno de los organismos del grupo que se ha estudiado más intensamente es el aliso, una especie de *Alnus*, que asimila N₂ a una velocidad adecuada para permitir un rápido desarrollo en suelos deficientes en nitrógeno. El árbol no requiere nódulos para su crecimiento cuando se le suministra alguna sal de nitrógeno, aunque los alisos que crecen en el campo característicamente poseen nódulos que pueden alcanzar el tamaño de pelotas de tenis y el análisis químico del suelo en que se encuentran los alisos muestra un incremento en el contenido de nitrógeno. Cuando se trata con extractos acuosos o nódulos macerados del aliso de campo, las plantas que crecen en invernadero desarrollan nódulos en dos o tres semanas. El pH óptimo para la fijación es de alrededor de 5.5-6.0, aunque el crecimiento en soluciones libres de nitrógeno es vigoroso a un pH de 4.2 a 7.0.

Como sucede con las leguminosas, la cantidad de nitrógeno que ganan tales Angiospermas varía enormemente con el tipo de suelo, las condiciones climáticas y edad de la planta. Los reportes de ganancia de nitrógeno son de 12-200 kg/ha por año para especies de *Alnus* y de 27-179 kg/ha por año para especies de *Hippophaë*. Las pruebas en localidades aisladas sugieren una fijación de 58 kg/ha para *Casuarina*, 60 kg/ha para *Ceanothus* y sólo cerca de 10 kg/ha por año para *Myrica*³.

La capacidad de estos hospederos para satisfacer su demanda de nitrógeno a partir del aire tiene importantes consecuencias económicas. En algunos casos, como con especies de *Myrica*, es posible la colonización y buen crecimiento en dunas de arena que contengan poco nitrógeno combinado. Algunas veces el suelo se enriquece marcadamente con nitrógeno, por ejemplo, un suelo donde se encontraba *Alnus rugosa* tenía 0,46% de nitrógeno, mientras que el terreno que lo rodeaba contenía 0.14%. De modo similar, *Alnus glutinosa* puede ser beneficioso para el crecimiento de árboles adyacentes no nodulados.

A pesar de los reportes que dicen lo contrario, no se ha comprobado adecuadamente el aislamiento de los agentes microbiológicos responsables de los nódulos en algunos casos. Más aún, ninguna cepa conocida de *Rhizobium* invade y causa nodulación en ninguna de tales plantas no leguminosas. Debido a la incapacidad para obtener cultivos de los organismos responsables, se logran infecciones satisfactorias extrayendo los nódulos de las plantas que crecen en el campo, macerando el tejido y aplicando las preparaciones a las plántulas experimentales. Se ha registrado inoculación cruzada para *Hippophaë*, *Elaeagnus* y *Sheperdia*, los tres géneros de *Elaeagnaceae*, sugiriendo que los organismos infectivos son similares o idénticos. Inoculación cruzada se refiere aquí al hecho de que los nódulos macerados preparados a partir de un género, inducirán nodulación en un segundo. Sin embargo, entre los otros géneros no existe inoculación cruzada, indicando así que los agentes infecciosos difieren uno de otro^{3,59}.

3.4.1 *Frankia*

Frankia es un género de microorganismos que pertenece al grupo tres de actinomicetos, que fue identificado gracias a la microscopía electrónica y de luz en nódulos de plantas no leguminosas. Los microorganismos poseen hifas con diámetros usualmente de 0.3 – 0.5 ó 0.5 – 0.8 μm , una estructura filamentosa típica de actinomicetos³. El primer aislamiento exitoso de *Frankia* fue en 1978 por Callahan, Del Tridici y Torrey^{6,11}. La caracterización y clasificación de cepas de *Frankia* es difícil, porque implica mucho tiempo para la identificación morfológica, fisiológica y bioquímica⁵⁴, con un tiempo de generación de al menos tres días⁶. Aunque en extractos celulares la nitrogenasa de *Frankia* es sensible al oxígeno molecular, como las células intactas de *Azotobacter*, las células intactas de *Frankia* fijan N_2 en presencia de una tensión total de oxígeno. En la Figura 3.16 se muestran nódulos y células de *Frankia*. (a) Nódulos radiculares del aliso común *Alnus glutinosa*. (b) Cultivo de *Frankia* purificado procedente de nódulos de *Comptonia peregrina*. Se aprecian las vesículas (estructuras esféricas) en las puntas de los filamentos de las hifas⁵⁹:

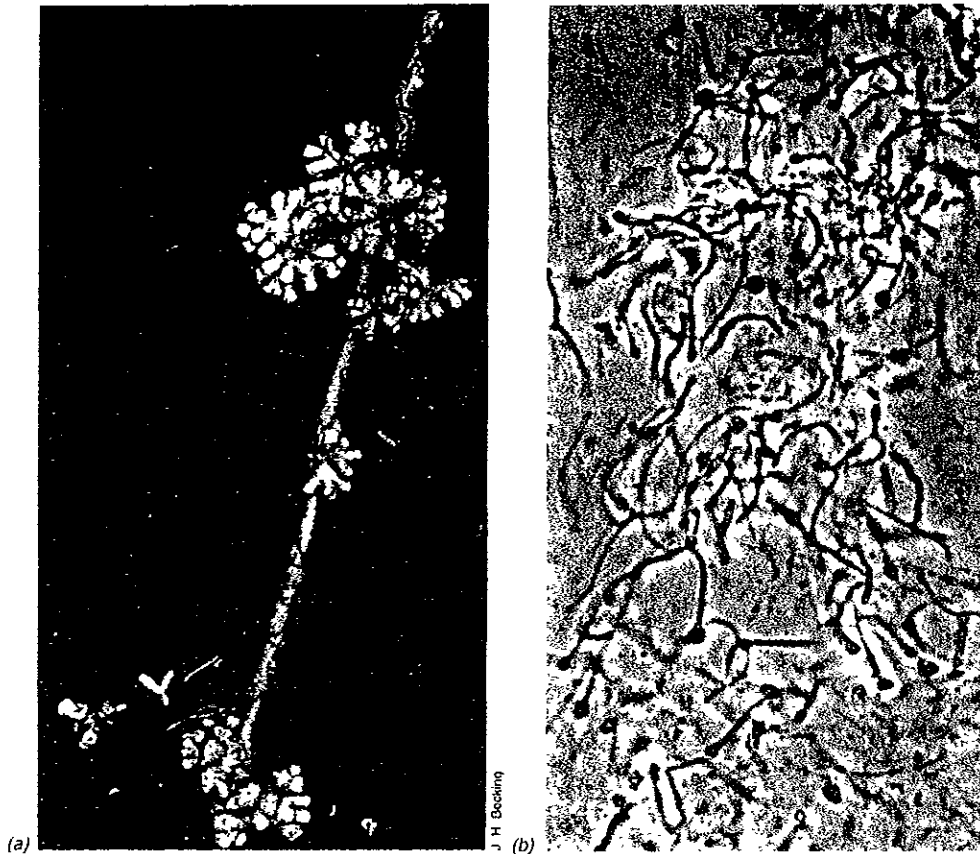


Figura 3.16 Nódulos y células de *Frankia*. (a) nódulos radiculares del aliso común *Alnus Glutinosa*. (b) Cultivo de *Frankia* purificado procedente de *Comptonia peregrina*.

El aliso es un característico árbol pionero en la colonización de suelos desnudos y pobres en nutrientes, lo que es probable que se deba a su capacidad de establecer relaciones simbióticas con *Frankia* para fijar nitrógeno. *Frankia* también forma nódulos en algunas plantas leñosas de menor tamaño. Se ha descrito este tipo de simbiosis formadora de nódulos radiculares en un mínimo de ocho familias de plantas, que en muchos casos no están relacionadas filogenéticamente. Esto indica que el proceso de nodulaciones en la simbiosis con *Frankia* es un fenómeno más generalizado que el proceso altamente específico observado en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

En la Tabla 3.9 se presentan los géneros de actinomicetos y géneros relacionados (todos Gram positivos)^{a 59}:

Tabla 3.9 Géneros de actinomicetos y géneros relacionados (todos Gram positivos)^a

Grupos principales	DNA (mol % GC)
Grupo corineforme de bacterias: bacilos, con frecuencia en forma de bastón, morfológicamente variables; sin resistencia ácido alcohol ni filamentos; división celular instantánea	
<i>Corynebacterium:</i> la tinción de los segmentos es irregular, algunas veces presentan gránulos, frecuentemente en forma de bastón hinchado; patógenos de animales y plantas, también saprofitos en el suelo	51-65
<i>Arthrobacter:</i> morfogénesis coco-bacilo; organismos del suelo	59-70
<i>Cellulomonas:</i> morfología corineforme; digiere celulosa; aerobio facultativo	71-73
<i>Kurtzia:</i> bacilos con los extremos redondeados que se suceden formando cadenas; más tarde cocoides	36-38
<i>Brevibacterium:</i> morfogénesis coco-bacilo; queso, piel	60-67
Bacterias del ácido propiónico: de anaeróbicas a aerotolerantes; bacilos o filamentos que se ramifican	
<i>Propionibacterium:</i> inmóviles; de anaeróbicos a aerotolerantes; producen ácido propiónico y ácido acético; productos lácticos (queso suizo); piel, pueden ser patógenos	53-68
<i>Eubacterium:</i> anaerobios obligados; producen una mezcla de ácidos orgánicos, que incluye butírico, acético, fórmico y láctico; intestino, infecciones de tejido blando, suelo; pueden ser patógenos; probablemente son el miembro predominante de la flora intestinal	26-48
Anaerobios obligados	
<i>Bifidobacterium:</i> microcolonias lisas sin filamentos; normalmente células corineformes, se encuentra en el tracto intestinal de infantes lactantes (breast-fed infants)	55-67
<i>Acetobacterium:</i> homoacetógeno; sedimentos y aguas residuales	39-43
<i>Butyrivibrio:</i> bacilos curvados; rumen	36-42
<i>Thermoanaerobacter:</i> bacilos termofílicos que se encuentran en fuentes termales	37-39
Actinomicetos: filamentosos con frecuencia ramificado; elevada diversidad	
Grupo I. Actinomicetos: sin resistencia ácido alcohol; aeróbicos facultativos; no forman micelio; pueden producir filamentos ramificados; bacilos, cocoides o células corineformes	
<i>Actinomycetes:</i> de anaeróbico a aeróbico facultativo; microcolonia filamentosos, pero los filamentos son transitorios y se fragmentan en células corineformes; pueden ser patógenos para humanos o animales; se encuentra en la cavidad oral	57-69
Otros géneros: <i>Arachna, Bacterionema, Rothia, Agronomyces</i>	
Grupo II. Micobacterias: acid-alcohol-fast, filamentos transitorios	
<i>Mycobacterium:</i> patógenos, saprofitos; aerobios obligados; células que contienen lípidos y paredes celulares fuertes; ceras, ácidos micólicos; nutrición simple; crecimiento lento; tuberculosis, lepra, granulomas, tuberculosis aviar; también son organismos del suelo; oxidadores de hidrocarburos	62-70
Grupo III. Actinomicetos fijadores de nitrógeno: fijadores de nitrógeno simbioses con plantas; producen micelios verdaderos	
<i>Frankia:</i> forma nódulos de dos tipos en las raíces de varias plantas; probablemente microaerofílico; crecimiento lento; fija N ₂	67-72
Grupo IV. Actinoplanes: producen micelios verdaderos; forman esporas, nacen en el interior del esporangio	
<i>Actinoplanes, Streptosporangium</i>	69-71
Grupo V. Grupo de dermatofilos: los filamentos del micelio se dividen transversalmente y, como mínimo, en dos planos longitudinales para formar masas de elementos cocoidales móviles; micelios aéreos ausentes; a veces son responsables de infecciones epidérmicas	
<i>Dermatophilus, Geodermatophilus</i>	56-75
Grupo VI. Nocardias: normalmente los filamentos del micelio se fragmentan para formar elementos cocoidales o alargados; a veces producen esporas aéreas; algunas veces con resistencia ácido alcohol	
<i>Nocardia:</i> normalmente organismos del suelo; aerobios obligados; utilizan muchos hidrocarburos diferentes	61-72
<i>Rhodococcus:</i> saprofitos del suelo, normalmente también en el intestino de varios insectos; utiliza hidrocarburos	59-69
Grupo VII. Estreptomycetos: el micelio permanece intacto, micelios aéreos abundantes y cadenas largas de esporas	
<i>Streptomyces:</i> Aproximadamente 500 especies conocidas, muchas producen antibióticos	69-75
Otros géneros (diferenciados morfológicamente): <i>Streptoverticillum, Sporichthya, Microcellobosporia, Kitasatoa, Chainia</i>	67-73
Grupo VIII. Grupo de micromonosporas: el micelio permanece intacto; forma esporas aisladas, en parejas o en cadenas cortas; algunos son termofílicos; saprofitos encontrados en el suelo y en restos de plantas en descomposición; una de las especies produce endoesporas	
<i>Micromonospora, Thermoactinomyces, Thermomonospora</i>	54-79

^aFilogenéticamente, todas las especies (excepto *Acetobacterium, Butyrivibrio, y Thermoanaerobacter*) están incluidas en la subdivisión de las bacterias Gram positivas de alta GC

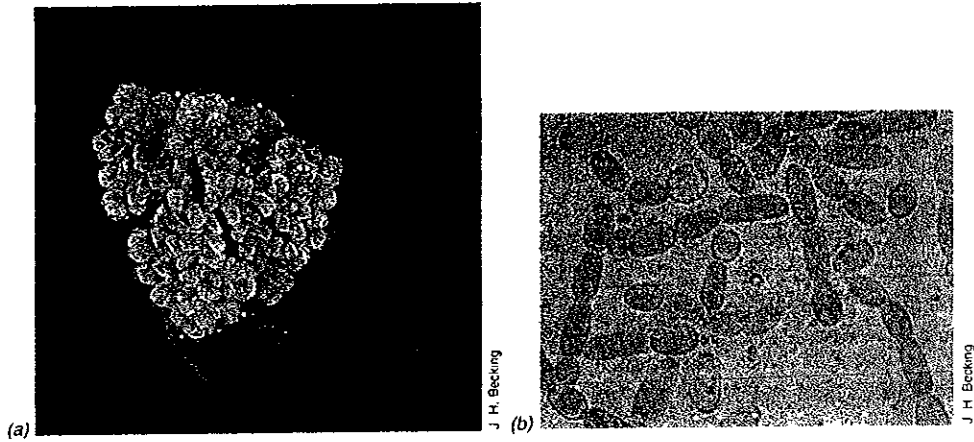


Figura 3.17 Simbiosis *Azolla-Anabaena*. (asociación intacta que muestra una sola planta de *Azolla pinnata*. (b) La cianobacteria simbiote *Anabaena azollae*

Cierto número de plantas, usualmente de los trópicos, tienen estructuras semejantes a nódulos en sus hojas. Tales hinchazones anatómicas han sido reportadas en especies de *Psychotria*, *Grumilca* y *Ardisia*. Se han obtenido de los nódulos de diferentes especies de *Psychotria*, cultivos de *Klebsiella* y *Chromobacterium* que poseen nitrogenasa, pero no existe evidencia directa que demuestre que las plantas tienen estos nódulos en las hojas y toman nitrógeno de la atmósfera³.

C A P Í T U L O I V

GENÉTICA Y REGULACIÓN DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO

4.1 Genética de la fijación de nitrógeno: genes *nif*

Para tener el conocimiento completo de la fijación de N₂, se requiere saber el número de genes involucrados, la organización y control de estos genes, y la identificación de la función de cada gen.

La genética de la fijación de N₂ se estudió inicialmente en *Klebsiella pneumoniae*, donde los genes *nif* se encuentran junto al gen *his* (histidina). Los primeros estudios se hicieron por transducción⁸⁷ y por conjugación¹⁸. Posteriormente se utilizó la inserción de elementos transponibles para construir físicamente el mapa detallado de los genes de la fijación de N₂ (*nif*) de *Klebsiella pneumoniae*^{75,76}. En la Tabla 4.1 se enlistan los genes *nif* y su función:

GENES <i>nif</i>	F U N C I Ó N
<i>nif J</i>	Transporte de electrones. Codifica la piruvato flavodoxina oxidoreductasa
<i>nif H</i>	Codifica la reductasa de la dinitrogenasa
<i>nif D</i>	Codifica la subunidad alfa de la dinitrogenasa
<i>nif K</i>	Codifica la subunidad beta de la dinitrogenasa
<i>nif T</i>	Desconocida
<i>nif Y</i>	Inserción de FeMo-co en la dinitrogenasa
<i>nif E</i>	Síntesis de FeMo-co
<i>nif N</i>	Síntesis de FeMo-co
<i>nif X</i>	Desconocida
<i>nif U</i>	Biosíntesis del centro de la metaloenzima
<i>nif S</i>	Biosíntesis del centro de la metaloenzima
<i>nif V</i>	Síntesis del homocitrato
<i>nif W</i>	Síntesis de FeMo-co
<i>nif Z</i>	Síntesis de FeMo-co
<i>nif M</i>	Procesamiento de la reductasa de la dinitrogenasa
<i>nif F</i>	Codifica una flavodoxina
<i>nif L</i>	Regulador Negativo
<i>nif A</i>	Regulador Positivo
<i>nif B</i>	Síntesis de FeMo-co
<i>nif Q</i>	Procesamiento del molibdeno

En *Klebsiella pneumoniae*, que es un fijador de N₂ muy estudiado, los genes de la dinitrogenasa y de la reductasa de la dinitrogenasa son parte de un complejo regulón (un gran sistema de operones) llamado *regulón nif* (Figura 4.1). En *K.pneumoniae* el regulón *nif* ocupa 24 kb (24,206 pares de bases)⁴ de DNA y contiene 20 genes dispuestos en varias unidades transcripcionales. En el regulón *nif* están presentes, además de los genes estructurales de la nitrogenasa, los genes para FeMo-co, los que controlan las proteínas del transporte de electrones y varios genes regulatorios. La dinitrogenasa es una proteína compleja formada por dos subunidades (producto del gen *nifD*) y (producto del gen *nifK*)^{7,46}, cada una de las cuales está presente en dos copias. La reductasa de la dinitrogenasa es una proteína dimérica que consta de dos subunidades idénticas, producto del gen *nifH*. FeMo-co se sintetiza con la participación de varios genes, incluyendo *nif N, V, Z, W, E, y B*, así como *Q*, que controla un producto responsable del procesamiento del molibdeno. El gen *nifA* codifica un regulador positivo que sirve para activar la transcripción de otros genes *nif*.

En la figura 4.1 se muestra la estructura genética del regulón *nif* en *Klebsiella pneumoniae*, el microorganismo fijador de nitrógeno mejor estudiado. La función de algunos genes es incierta. Se conocen otros genes que se sospecha que sean genes *nif* pero que no se muestran en esta figura. Los transcritos en mRNA (unidades transcripcionales) se muestran bajo los genes, las flechas indican la dirección de la transcripción⁵⁹.

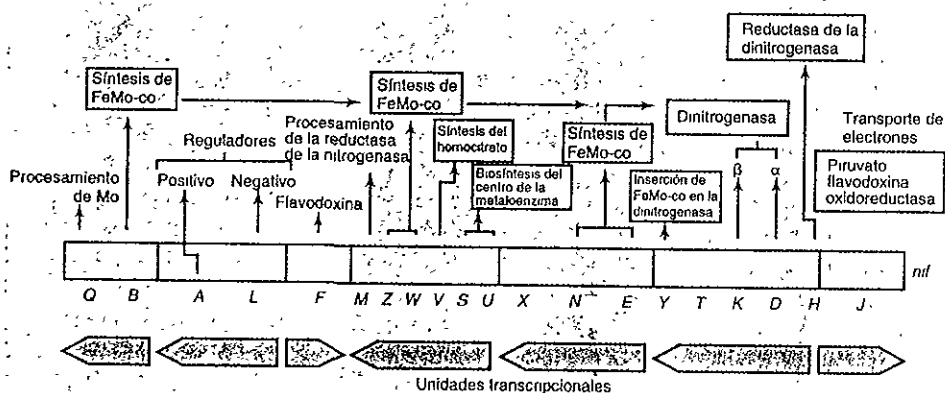


Figura 4.1 Estructura genética del regulón *nif* en *Klebsiella pneumoniae*.

La nitrogenasa está sometida a controles regulatorios muy estrictos. La fijación de nitrógeno se bloquea por O_2 y por nitrógeno fijado, incluyendo NH_3 , NO_3^- y algunos aminoácidos.

La mayor parte de esta regulación es a nivel transcripcional. Las distintas unidades transcripcionales del regulón *nif* se muestran en la Figura 4.1. Mientras que la transcripción de los genes estructurales *nif* se activa por la proteína NifA (regulación positiva), esta activación se elimina por la proteína NifL bajo ciertas condiciones.

El amoníaco producido por la nitrogenasa no reprime la síntesis de la enzima porque tan pronto como se forma se incorpora a forma orgánica y se usa en biosíntesis. Pero cuando el amoníaco está en exceso (como cuando hay altos niveles en el medio), la síntesis de nitrogenasa se reprime rápidamente. Esto evita desperdiciar ATP haciendo un producto que ya está presente en gran cantidad. En algunas bacterias fijadoras de nitrógeno, la *actividad* de la nitrogenasa también está regulada por amoníaco, lo que constituye un fenómeno llamado efecto “conmutador” del amoníaco. En este caso el exceso de amoníaco origina una modificación covalente de la reductasa de la nitrogenasa que produce una pérdida de la actividad enzimática. Cuando el amoníaco vuelve a ser factor limitante, esta proteína modificada se convierte a la forma activa y se reinicia la fijación de N_2 . La regulación por amoníaco es por tanto un método rápido y reversible de controlar el consumo de ATP por la nitrogenasa.

La nitrogenasa se ha purificado de un gran número de organismos fijadores de nitrógeno y en todos los casos se ha visto que es un complejo formado por dos proteínas. Entre las nitrogenasas con molibdeno, la dinitrogenasa de un organismo puede normalmente funcionar con la reductasa de la dinitrogenasa de otro organismo, lo que tiene un considerable interés evolutivo. Este resultado se puede interpretar en el sentido de que las estructuras de los componentes de la nitrogenasa no han cambiado mucho durante la evolución, lo que sugiere que los requerimientos moleculares para la reducción del N_2 son bastante específicos. De hecho, estudios sobre la agrupación génica “HDK” han confirmado esto, pues sondas moleculares conteniendo los genes *nifHDK* clonados de una

bacteria fijadora de nitrógeno hibridan con el DNA de prácticamente todos los fijadores de N₂ pero no con DNA de bacterias no fijadoras de N₂.

En *Rhizobium*, los genes *nif* están localizados en grandes plásmidos^{51,78} y son transcritos en una unidad transcripcional simple, en el orden *nifHDK*, en diversas especies de crecimiento rápido, incluyendo: *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium trifolii*⁸⁰ y *Rhizobium leguminosarum*⁵³. En contraste, estos genes se encuentran en el cromosoma, separados en dos operones *nifH* y *nifDK*, en las especies de crecimiento lento, *Bradyrhizobium japonicum*^{27,66} y *Bradyrhizobium sp.*^{42,100}.

En *Frankia* se ha encontrado que los genes *nifD* y *nifK* son contiguos, mientras que el gen *nifH* está separado^{56,65}.

En *Anabaena*, los genes *nifH* y *nifD* son adyacentes y se transcriben juntos, pero *nifK* está separado de *nifD* por 11 pares de kilobases de DNA. Además los genes *nifV* y *nifS* se encuentran a la derecha del gen *nifH*⁷⁴.

La probabilidad de que algunos microorganismos sean no cultivables⁷⁹, hace imprácticas las técnicas tradicionales para evaluar las poblaciones de fijadores de nitrógeno^{52,95}. La ecología molecular ha desarrollado métodos para analizar extractos de DNA ambiental de secuencias de genes específicos⁶⁸. Debido a que la fijación de nitrógeno es realizada por grupos filogenéticamente heterogéneos de procariontes, la detección de un marcador genético único requerido para la fijación de nitrógeno nos da una forma de analizar la fijación de nitrógeno potencial en los ecosistemas.

Para la evaluación de microorganismos fijadores de nitrógeno en el medio ambiente, el análisis de *nif H*, el gen que codifica la reductasa de la dinitrogenasa, ha sido usado con varios iniciadores de PCR que amplifican este gen de muestras de microorganismos y de muestras ambientales^{50,67,92,101}. Debido a las grandes diferencias filogenéticas entre los microorganismos fijadores de nitrógeno, las secuencias de los genes *nif H* tienen algunas diferencias considerables¹⁰¹, y aún las secuencias conservadas de DNA que codifican proteínas pueden variar. Sin embargo, el uso de protocolos de investigación más sofisticados podrán hacer relativamente simple el complejo estudio de los microorganismos fijadores de nitrógeno en un ecosistema dado. Widmer, Shaffer y

colaboradores utilizaron esta técnica en mantillo y suelos en Douglas Fir Forest Oregon. Identificaron en mantillo los géneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium*. En suelos, identificaron los géneros: *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Herbaspirillum* y *Thiobacillus*⁹⁴.

4.2 Genética de la formación del nódulo: genes nod

Los genes que dirigen las etapas específicas de la nodulación de una leguminosa por una cepa específica de *Rhizobium* se denominan *genes nod*.

En la Tabla 4.2 se enlistan los genes *nod*, las proteínas que codifican y su función⁵⁹:

Tabla 4.2 Genes *nod*, las proteínas que codifican y su función

GENES <i>nod</i>	PROTEÍNA	F U N C I Ó N
<i>nod A</i>	Nod A	Determina la formación del nódulo
<i>nod B</i>	Nod B	Determina la formación del nódulo
<i>nod C</i>	Nod C	Determina la formación del nódulo
<i>nod D</i>	Nod D	Control de la transcripción de otros genes <i>nod</i>
<i>nod F</i>	Nod F	Interviene en el transporte de sustancias para una nodulación efectiva
<i>nod E</i>	Nod E	Determinante del grupo de inoculación cruzada
<i>nod L</i>	Nod L	Determinante del grupo de inoculación cruzada
<i>nod M</i>	Nod M	Glucosamina sintasa que interviene en la síntesis de los factores Nod
<i>nod I</i>	Nod I	Proteína de membrana que transporta los factores Nod al exterior de las células bacterianas
<i>nod J</i>	Nod J	Proteína de membrana que transporta los factores Nod al exterior de las células bacterianas

Muchos genes *nod* de diferentes especies de *Rhizobium* están muy bien conservados y se transmiten por medio de plásmidos de gran tamaño, denominados *plásmidos Sym*. Además de los genes *nod*, que dirigen el proceso de nodulación, los plásmidos *Sym* contienen **genes de especificidad**, que restringen una cepa de *Rhizobium* a una determinada planta hospedadora. Es decir, la especificidad de grupo de inoculación cruzada puede transferirse entre especies de rizobio por la simple transferencia del **plásmido Sym**²⁸. Por ejemplo, cuando el plásmido *Sym* de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (cuya planta hospedadora es el guisante) se transfiera a

Rhizobium leguminosarum biovar *trifolii* (cuya planta hospedadora es el trébol), las células de esta última variedad forman nódulos en la planta del guisante o chícharo⁹¹.

En la Figura 4.2 se presenta la organización de los genes *nod* en el plásmido Sym de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. El producto de *nodD* controla la transcripción de otros genes *nod*. Las cajas *nod* aparecen destacadas en gris y las flechas indican la dirección de la transcripción de los genes *nod*⁵⁹.

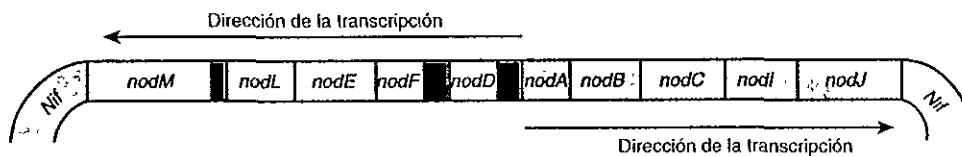


Figura 4.2 Organización de los genes *nod* en el plásmido Sym de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*.

En el plásmido Sym de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, los genes *nod* están situados entre dos grupos de genes que determinan la fijación de nitrógeno, denominados genes *nif* (en esta especie y algunas otras especies del género *Rhizobium*, los genes *nif* están en plásmidos). La figura 4.2 muestra la disposición de los genes *nod* en el plásmido Sym de *R. leguminosarum*, especie en la que han sido identificados. Se ha logrado secuenciar toda la región *nod* y se conoce la función de muchas de las proteínas que codifican estos genes. Los genes *nodABC* son comunes a todas las especies de *Rhizobium* y participan en la producción de moléculas parecidas a la quitina, llamadas **factores Nod**, que inducen el rizado de los pelos radicales y desencadenan la división de la célula cortical de la planta, lo que determina la formación del nódulo.

En la Figura 4.3 se muestra la estructura de los **factores Nod**. (a) Estructura general del *factor Nod* producido por *Rhizobium trifolii* y *Rhizobium meliloti* biovar *viciae* y (b) en la tabla se presentan las diferencias estructurales (R_1 , R_2) que definen el **factor Nod** concreto de cada especie. La unidad hexosa central se puede repetir hasta tres veces. C16:2, ácido palmítico con dos enlaces

dobles; C16:3, ácido palmítico con tres dobles enlaces; C18:1, ácido oleico con un doble enlace; C18:4, ácido oleico con cuatro dobles enlaces; ácido acético⁵⁹.

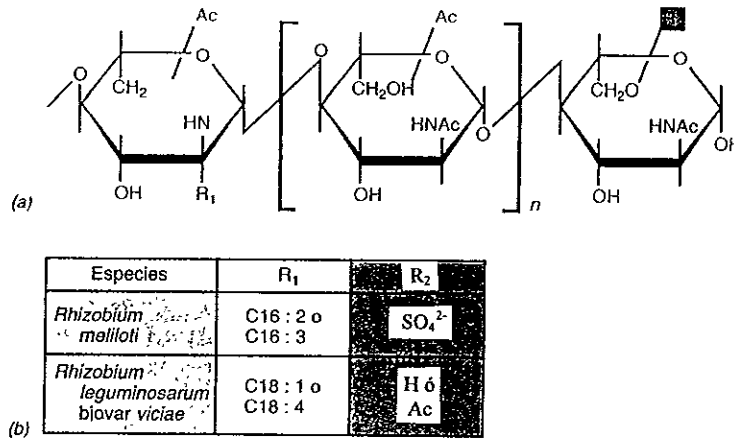


Figura 4.3 Factores Nod. (a) Estructura general del factor Nod producido por *Rhizobium trifolii* y *Rhizobium meliloti* biovar *viciae* y (b) en la tabla las diferencias estructurales (R₁, R₂) que definen el factor Nod concreto en cada especie.

Químicamente, los factores Nod consisten en un esqueleto de *N*-acetilglucosamina al cual se unen varias moléculas (Figura 4.4). La especificidad del hospedero está determinada por la estructura exacta del factor Nod producido por una determinada especie de *Rhizobium*. Por tanto, además de los genes *nodABC*, comunes a todas las especies y cuyos productos sintetizan el esqueleto nod, hay unos genes *nod* propios de cada especie que aportan variaciones químicas sobre el esqueleto básico del factor Nod. Estos factores Nod son los únicos responsables del rizado del pelo radicular y del inicio del nódulo, como se ha mostrado en experimentos donde se han añadido factores Nod purificados a los tejidos de la raíz, dicho tejido forma nódulos, incluso en ausencia de células de *Rhizobium*^{8,59,91}.

En *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, el gen *nodD* codifica una proteína reguladora, NodD, que controla la transcripción de otros genes *nod* (Figura 4.3). La proteína NodF interviene en el transporte de las sustancias necesarias para una nodulación efectiva; NodE y NodL participan en

la determinación del rango del hospedador (grupos de inoculación cruzada). NodM es una glucosamina sintasa que interviene en la síntesis del factor Nod. NodI y NodJ son proteínas de membrana que transportan los factores Nod al exterior de las células bacterianas^{8,59,91}.

NodD pertenece a una familia de proteínas reguladoras que activan la transcripción de otros genes plegando el DNA en el lugar del promotor; esto refuerza la unión de la RNA polimerasa. Por tanto, puede considerarse NodD como un elemento regulador de tipo positivo⁹¹. Se cree que NodD se une a regiones corriente arriba de los operones del gen *nod* estructural (regiones que se denominan **cajas *nod***) y, tras interactuar con moléculas inductoras, pliegan el DNA en esta región, lo que estimula la transcripción. Se han identificado varias moléculas inductoras. En la mayoría de los casos se trata de **flavonoides** vegetales, moléculas orgánicas complejas que son producidas por plantas y se encuentran ampliamente distribuidas (Figura 4.4). Los flavonoides tienen muchas funciones en las plantas, incluyendo la regulación del crecimiento y la atracción de los animales polinizadores. Sin embargo, las leguminosas se salen de lo usual porque, a diferencia de otras plantas, sus raíces segregan grandes cantidades de flavonoides, presumiblemente para desencadenar la expresión del gen *nod* en los rizobios que se encuentran en el suelo cerca de la planta. Es interesante notar que algunos flavonoides cuya estructura es muy parecida a la de los inductores *nodD* (Figura 4.3) **inhiben** fuertemente la inducción de los genes *nod* en determinadas especies de rizobios. Esto sugiere que una parte de la especificidad observada entre la planta y la bacteria en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa podría depender de la naturaleza química de los flavonoides excretados por una determinada planta⁵⁹.

En la Figura 4.4 se muestra la estructura de moléculas flavonoides que: (a, b) inducen la expresión del gen *nod* y (c) la inhiben, en *Rhizobium meliloti* biovar *viciae*. Puede observarse la similitud en la estructura de las tres moléculas. El nombre común de la estructura mostrada en (a) es **luteolina** y es un derivado flavónico. La estructura (b) se llama **eridictiol** y es químicamente una flavanona. La estructura en (c) se llama **genisteína** y es un derivado isoflavónico⁵⁹:

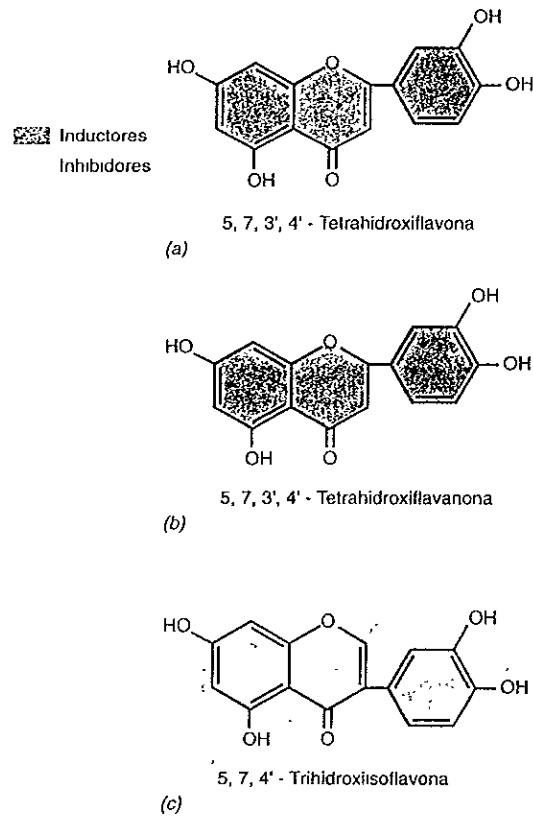


Figura 4.4 Estructura de moléculas flavonoides que (a,b) inducen la expresión de los genes *nod* y (c) la inhiben, en *Rhizobium meliloti* biovar *viciae*.

4.3 Cooperación genética en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

También se han identificado otras funciones dirigidas genéticamente que son cruciales para la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Como se ha observado previamente, la **leghemoglobina**, destacada proteína fijadora de O₂ en el nódulo radicular, está codificada genéticamente por la bacteria; los genes *nif* residen en los plásmidos Sym o, en algunas especies de *Rhizobium*, en el

propio cromosoma. En cambio, la síntesis de flavonoides y lectina es claramente una propiedad genética de la planta^{8,59}.

El gen de la hidrogenasa, el gen *hup*, es propio de las bacterias y frecuentemente se localiza en el plásmido Sym. La función de la hidrogenasa en los rizobios es incorporar el H₂ originado por la actividad de la nitrogenasa. El rastreo de cepas de tipo salvaje de varias especies de *Rhizobium* ha demostrado que sólo alrededor de un 20% de todas las cepas de *R. leguminosarum* y *Bradyrhizobium japonicum* contienen genes *hup* (hidrogen uptake) y producen hidrogenasa²⁰, y que esta importante enzima está totalmente ausente en cepas de muchas otras especies de *Rhizobium* recogidas en el campo. Se ha comprobado experimentalmente los niveles totales de nitrógeno en la planta, en relación a las cepas que carecen de la actividad de dicha enzima. Esto se debe al reciclado de H₂ procedente de la actividad de la nitrogenasa, que de otra manera se perdería. El hallazgo ha impulsado los esfuerzos para dotar de genes *hup* a todas las cepas de *Rhizobium* usadas para la inoculación en el campo, mediante ingeniería genética⁵⁹.

C O N C L U S I O N E S

La fijación de nitrógeno es una propiedad exclusiva de microorganismos procariontes

El sistema enzimático de la nitrogenasa consta de dos proteínas: la dinitrogenasa y la reductasa de la dinitrogenasa.

Existen nitrogenasas alternativas que utilizan vanadio o hierro y azufre

Los factores que afectan directamente el proceso de fijación de nitrógeno son: pH, humedad, temperatura, concentración y disponibilidad de diferentes elementos, y fuentes de energía.

Existen diferentes mecanismos de protección de la nitrogenasa: la eliminación de O₂ por respiración, la producción de capas mucosas que retienen O₂, la compartimentalización en los heteroquistes, la formación de vesículas y la síntesis de leghemoglobina en la simbiosis *Rhizobium-leguminosa*.

En la fijación de nitrógeno están involucrados los genes *nif*, los genes *nod*, y el gen *hup*

Los 20 genes *nif*, codifican y regulan la síntesis del sistema nitrogenasa y de FeMo-co

Los genes *nod*, codifican y regulan el proceso de nodulación de los microorganismos simbiotes

El gen *hup* codifica y regula la síntesis de la hidrogenasa que favorece la fijación de nitrógeno

Los genes *nif HDK* han sido utilizados para elaborar sondas como prueba definitiva para identificar microorganismos fijadores de nitrógeno.

En la regulación de la simbiosis que realizan los rizobia y las leguminasas intervienen: la ricadesina, las lectinas, los factores Nod, los flavonoides y la leghemoglobina.

R E C O M E N D A C I O N E S

Promover la investigación, difusión y utilización de inoculantes biológicos para evitar el uso de fertilizantes nitrogenados que alteran el medio ambiente.

Se recomienda el uso de inoculantes biológicos en sustitución al uso de semillas transgénicas.

Los genes *nif HDK* han sido utilizados para elaborar sondas como prueba definitiva para identificar microorganismos fijadores de nitrógeno.

En la regulación de la simbiosis que realizan los rizobia y las leguminasas intervienen: la ricadesina, las lectinas, los factores Nod, los flavonoides y la leghemoglobina.

R E C O M E N D A C I O N E S

Promover la investigación, difusión y utilización de inoculantes biológicos para evitar el uso de fertilizantes nitrogenados que alteran el medio ambiente.

Se recomienda el uso de inoculantes biológicos en sustitución al uso de semillas transgénicas.

B I B L I O G R A F Í A

1. Aguilar, O. M., D. H. Grasso, P. M. Riccillo, M. V. López, and E. Szafer. "Rapid identification of bean *Rhizobium* isolates by a *nif H* gene-PCR assay". Soil Biol. Chem. **30**, 1655-1661 (1998)
2. Alexander, E., D. Pham, and T. R. Steck. "The viable-but nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*." Appl. Environ. Microbiol. **65**, 3754-3756 (1999)
3. Alexander, M. "INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA DEL SUELO" Primera Edición AGT Editor. S. A. México (1987)
4. Arnold, W., Rump, A., Klipp, W., Priefer, U.B., and Pühler, A. "Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*". J. Mol. Biol. **203**, 715-738 (1988)
5. Bishop, P. E., and R. Premakumar. "Alternative nitrogen fixation systems," p. 736-762 In G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (ed.), Biological nitrogen fixation. Chapman and Hall, New York, N. Y. (1992)
6. Bloom, J. "Carbon and nitrogen source requirements of *Frankia* strains." FEMS Microbiol. Lett. **13**, 51-55 (1982)
7. Brill, W. J. "Biochemical genetics of nitrogen fixation" Microbiol. Rev. **44**, 449-467 (1980)
8. Brock, T. D., Madigan, M.T. "MICROBIOLOGÍA" Sexta Edición. Prentice Hall, México (1993)
9. Brockwell, J. A., A. Pilka, and R. A. Holliday. "Soil pH is a major determinant of the members of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in noncultivated soils of New South Wales." Aust. J. Exp. Agric. **31**, 211-219 (1991)
10. Caetano Anollés, G., A. Lagares, and G. Favelukes. "Adsorption of *Rhizobium meliloti* to

- alfalfa roots; dependence on divalents cations and pH." Plant Soil. 117, 67-74 (1989)
- 11 Callahan, D., P. Del Tridici, and J. G. Torrey. "Isolation and cultivation in vitro of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*." Science 199, 899-902 (1978)
 12. Chakraborty, B., AND k. R. Samadar. "Evidence for the occurrence of an alternative nitrogenase system in *Azospirillum brasilense*." FEMS Microbiol. Lett. 127, 127-131 (1995)
 13. Chen, W. X., G. H. Yan, and J. L. Li "Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov." Int J. Syst. Bacteriol. 38, 392-397 (1988)
 14. Chisnell, J. R., R. Premakumar, and P. E. Bishop. "Purification of a second alternative nitrogenase from a *nifHDK* deletion strain of *Azotobacter vinelandii*." J. Bacteriol. 170, 27-33 (1988)
 15. Davis, R., L. Lehman, R. Petrovich, V. K. Shah, G. P. Roberts, and P. W. Ludden. "Purification and characterization of the alternative nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*." J. Bacteriol. 178, 1445-1450 (1996)
 16. Dawson, J. O. "Nitrogen fixation in forests and agroforestry", p. 227-253. In F. B. Metting, Jr. (ed.), Soil microbial ecology. Marcel Dekker, Inc. New York, N. Y. (1992)
 17. Del Papa, M. F., L. J. Balague, S. C. Sowinski, C. Wegener, E. Segundo. F. Martínez, N. Toro, et. al. "Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay". Appl. and Env. Microbiol. 65, 1420-1427 (1999)
 18. Dixon, R. A., and J. R. Postgate. "Transfer of nitrogen fixation genes by conjugation in *Klebsiella pneumoniae*". Nature (London) 234, 47-48 (1971)
 19. Dreyfus, B., J. L. García, and M. Gillis. "Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*" Int. J. Syst. Bacteriol. 38, 89-98 (1988)

20. Drevon, J.J., Kalia, V. C., Heckmann, M. O., and Salsac, L. "Influence of the *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase on the growth of *Glycine* and *Vigna* species". Appl. Environ. Microbiol. **53**, 610-612 (1987)
21. Dupuy, N., C. Détrez, M. Neyra, P. Lajudie, and B. Dreyfus. "Las acacias fijadoras de nitrógeno del Sahel." Mundo Científico **116**, 896-898 (1992)
22. Eady, R. R. "The dinitrogen-fixing bacteria" p. 534-553. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer Verlag, New York, N. Y. (1991)
23. Eady, R. R., T. H. Richardson, R. W. Miller, M. Hawkins, and D. J. Lowe. "The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*: purification and properties of the Fe protein." Biochem. J. **256**, 189-196 (1988)
24. Eady, R. R., R. L. Robson, T. H. Richardson, R. W. Miller, and M. Hawkins. "The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*: purification and properties of the Vfe protein." Biochem. J. **244**, 197-207 (1987)
25. Eardly, B. D., D. B. Hannaway, and P. J. Bottomley. "Characterization of rhizobia from ineffective alfalfa nodules: ability to nodulate bean plants (*Phaseolus vulgaris* (L.) Savi.)" Appl. Environ. Microbiol. **50**, 1422-1427 (1985)
26. Eardly, B. D., J. P. W. Young, and R. K. Selander. "Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes." Appl. Environ. Microbiol. **58**, 1809-1815 (1992)
27. Fischer, H. M., and Hennecke, H. "Linkage map of the *Rhizobium japonicum* *nifH* and *nifK* operons encoding the polypeptides of the nitrogenase enzyme complex". Mol. Gen. Genet. **196**, 537-540 (1984)
28. Frelberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal, A., and Perret, X. "Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes" Nature **387**, 394-401

(1997)

29. Goss, T. G., G. W. O'Hara, M. J. Dilworth, and A. R. Glenn. "Cloning characterization, and complementation of lesions causing acid sensitivity in Tn5-induced mutants of *Rhizobium meliloti* WSM419." J. Bacteriol. **172**, 5113-5179 (1990)
30. Graham, P. H. "Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions:" Can. J. Microbiol. **38**, 475-484 (1992)
31. Hales, B. J., E. E. Case, J. E. Morningstar, M. F. Dzeda, and L. A. Mauterer. "Isolation of a new vanadium-containing nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*." Biochemistry **25**, 7251-7255 (1986)
32. Hales, B. J., D. J. Langosch, and E. E. Case. "Isolation and characterization of a second nitrogenase Fe-protein from *Azotobacter vinelandii*." J. Biol. Chem. **261**, 15301-15306 (1986)
33. Haukka, K., Lindström, K., and Young, P. W. "Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America" Appl. And Env. Microbiol. **64**, 419-426 (1998)
34. Hijano, E. H., and D. H. Basigalup. "El cultivo de la alfalfa en la República Argentina". p 15. In E. H. Hijano and A. Navarro (ed.) "La alfalfa en la Argentina". INTA C. R. Cuyo. Editar, San Juan, Argentina (1995)
35. Howison, J. G., and M. A. Ewing, "Acid tolerance in *Rhizobium meliloti*-*Medicago* symbiosis". Aust. J. Agric. Res. **37**, 55-64 (1986)
36. Howison, J. G., M. A. Ewing, and M. F. d'Antuono. "Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*" Plant Soil. **105**, 179-188 (1988)
37. Howison, J. G., and M. A. Ewing. "Annual species of *Medicago* differ greatly in their ability to nodulate on acid soils." Aust. J. Agric. Res. **40**, 843-850 (1989)

38. Howison, J. G., A. D. Robson, and L. K. Abbott. "Acid-tolerant species of *Medicago* produce root-exudates at low pH which induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium meliloti*". *Aust. J. Plant Physiol.* **19**, 287-296 (1992)
39. Howison, J. G., A. D. Robson, and M. A. Ewing. "External phosphate and calcium concentrations, and pH, but not the products of rhizobial nodulation genes, affect the attachment of *Rhizobium meliloti* to roots of annual medics." *Soil Biol. Biochem.* **25**, 567-573 (1993)
40. Hurek, T., T. Egener, and B. Reinhold-Hurek. "Divergence in nitrogenases of *Anabaena* spp., *Proteobacteria* of the beta subclass." *J. Bacteriol.* **179**, 4172-4178 (1997)
41. Hurek, T., B. Wagner, and B. Reinhold-Hurek. "Identification of N₂-fixing plant- and fungus associated *Azoarcus* species by PCR-based genomic fingerprints." *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4331-4339 (1997)
42. Jagdish, M.N., Yun, A. C., Noti, J. D., Folkers, O., and Szalay, A. "Structural and functional organization of the *nif* region in the slow-growing, broad host-range cowpea *Rhizobium* strain Irc 78", p. 27-31. In Szalay, A. and Legock, R. P. (ed.) *Advances in Molecular genetics of bacteria-plant interaction*. Cornell University Publishers, Ithaca, N.Y. (1985)
43. Jarvis, B. D. W., P. Van Berkum, W. X. Chen, S. M. Nour, M. P. Fernández, J. C. Cleyer-Marel, and M. Gillis. "Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 895-898 (1997)
44. Jordan, D. C. "Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**, 136-139 (1982)
45. Kaluza, K., Fuhrmann, M., Hahn, M., Regensburger, B., and Hennecke, H. "In *Rhizobium japonicum* the nitrogenase genes *nifH* and *nifDK* are separated". *J. Bacteriol.* **155**, 915-918 (1983)

46. Kennedy, C., F. Cannon, M. Cannon, R. Dixon, S. Hill, J. Jensen, S. Kumar, P. Mclean, M. Merrick, R. Robson, and J. R. Postgate. "Recent advances in the genetics and regulation of Nitrogen fixation". 146-156 In A. H. Gibson and W. E. Newton (ed.), "Current perspectives in Nitrogen fixation". Australian Academy of Sciences, Canberra (1981)
47. Kentemich, T., G. Danneberg, B. Hundeshagen, and H. Bothe. "Evidence for the occurrence of the alternative, vanadium-containing nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*." FEMS Microbiol. Lett. **51**, 19-24 (1988)
48. Kim, J., and D. C. Rees. "Nitrogenase and biological nitrogen fixation." Biochemistry **33**, 389-397 (1994)
49. Kimble, L. K., and M. T. Madigan. "Evidence for an alternative nitrogenase in *Heliobacterium gestii*." FEMS Microbiol. Lett. **100**, 255-260 (1992)
50. Kirshtein, J. D., H. W. Paerl, and J. P. Zehr. "Amplification, cloning, and sequencing of a *nifH* segment from aquatic microorganisms and natural communities." Appl. Environ. Microbiol. **57**, 2645-2650 (1991)
51. Kondrosi, E., Banfalvi, Z., and Kondrosi, A., "Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti* identification of nodulation genes". Mol. Gen. Genet. **193**, 445-452 (1984)
52. Knowles, R., and W. Laserna Barraquio. "Free-living dinitrogen-fixing bacteria", p 179-197 In R. W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicsek, S. Smith, A. Tabatabai, and A. Wollum (ed.), Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties. Soil Science Society of America. Inc., Madison. Wis. (1994)
53. Krol, A. J., Hotelez, J.G.J., Roozendaal, B., and vanKammen, A. "On the operon structure of the nitrogenase genes of *Rhizobium leguminosarum* and *Azotobacter vinelandi*". Nucleic Acids Res. **10**, 4147-4157 (1982)
54. Lechevalier, M. P. "The taxonomy of the genus *Frankia*" Plant Soil **78**, 1-6 (1984)

55. Lehman, L. J., and G. P. Roberts. "Identification of an alternative nitrogenase system in *Rhodospirillum rubrum*." J. Bacteriol. **173**, 5705-5711 (1991)
56. Ligon, J. M., and Nakas, J. P. "Isolation and characterization of *Frankia sp.* strain FaC1 gene involved in nitrogen fixation" Appl. and Env. Microbiol. **53**, 2321-2327 (1987)
57. Lowendorf, H. S., A. M. Baya, and M. Alexander. "Survival of *Rhizobium* in acid soils". Appl. Environ. Microbiol. **42**, 951-957 (1981)
58. MacNeil, T, MacNeil, D, Roberts, G. P., Supiano, M. A., and Brill, W. J. "Fine-structure mapping and complementation analysis of *nif* (nitrogen fixation) genes in *Klebsiella pneumoniae*". J. Bacteriol. **136**, 253-266 (1978)
59. Madigan, M.T., Martinko, J. M., y Parker, J. "BROCK BIOLOGÍA DE LOS MICROORGANISMOS" Octava Edición, Prentice Hall, España (1998)
60. Martínez-Romero, E. "Recent developments in *Rhizobium* taxonomy" Plant Soil. **161**, 11-20 (1994)
61. McGrath, J. W., Hammerschmidt, F., and Quinn, J. P. "Biodegradation of phosphonmycin by *Rhizobium huakuii* PMY1" Appl. Environ. Microbiol. **64**, 356-358 (1998)
62. Michelena, R., C. Irurtia, F. Vavruska, R. Mon, and A. Pittaluga. "Degradación de suelos en el norte de la región pampeana" Publicación Técnica INTA-Argentina no.6 INTA, Casterlar Argentina (1989)
63. Munns, D. N. "Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. I. Acid sensitive steps". Plant Soil. **28**, 129-146 (1968)
64. Munns, D. N. "Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. V. Calcium and pH requirements during infection" . Plant Soil. **32**, 90-102 (1970)
65. Normand, P., Simonet, P., Butour, J. L., Rosenberg, C., Moiroud, A., and Lalonde, M., "Plasmids in *Frankia sp*". J. Bacteriol. **155**, 32-35 (1983)

66. Noti, J. D., Folkerts, O., Turken, A. N., and Szalay, A. A. "Organization and characterization of genes essential for symbiotic nitrogen fixation from *Bradyrhizobium japonicum* 1110" J. Bacteriol. **167**, 774-783 (1986)
67. Ohkuma, M., S. Noda, R. Usami, K. Horikoshi, and T. Kudo. "Diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic intestinal microflora of the termite *Reticulitermes speratus*." Appl. Environ. Microbiol. **62**, 2747-2752 (1996)
68. Pace, N. R. "New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology." ASM News **62**, 463-470 (1996)
69. Paton, G. I., Palmer, G., Burton, M., Rattray, E.A.S., McGrath, S.P., Glover, L. A., and Killman, K. "Development of an acute and chronic ecotoxicity assay using *lux*-marked *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*" Lett. Appl. Microbiol. **24**, 296-300 (1997)
70. Peters, J. W., Fisher, and D. R. Dean. "Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective." Annu. Rev. Microbiol. **49**, 334-366 (1995)
71. Reinhold, B., T. Hurek, E. G. Niemann, and I. Fendrik. "Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass." Appl. Environ. Microbiol. **52**, 520-526 (1986)
72. Reinhold, B., T. Hurek, M. Gillis, B. Hoste, M. Vancanneyt, K. Kersters, and J. DeLey. "*Azoarcus* gen. nov. , nitrogen fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov." Int. J. Syst. Bacteriol. **43**, 574-584 (1993)
73. Rice, W. A., D. C. Penney, and M. Nyborg. "Effects of soil acidity on rhizobia members, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover". Can. J. Soil. Sci. **57**, 197-203 (1977)
74. Ricez, D., Mazurg, B., and Haselkorn, R. "Isolation and physical mapping of nitrogen fixation genes from the cyanobacterium *Anabaena* 7120". J. Biol. Chem. **257**, 13157-13163 (1982)

75. Riedel, G.E., Ausubel, F. M., and Cannon, F. C. "Physical map of chromosomal nitrogen fixation (*nif*) genes of *Klebsiella pneumoniae*" Proc, Natl. Acad. Sci. USA. **76**, 2866-2870 (1979)
76. Roberts, G. P., Brill, W. J. "Genetics and regulation of nitrogen fixation" Ann. Rev. Microbiol. **35**, 207-235 (1981)
77. Robson, R. L., R. R. Eady, T. H. Richardson, R. W. Miller, M. Hawkins, and J. R. Postgate. "The alternative nitrogenase of *Azotobacter chroococcum* is a vanadium enzyme." Nature (London) **322**, 388-390 (1986)
78. Rosenberg, C., Boistard, R., and Denarie, J. "Genes controlling early and later functions in symbiosis are located on a megaplasmid in *Rhizobium meliloti*". Mol. Gen. Genet. **154**, 326-333 (1981)
79. Roszak, D. B., and R. R. Colwell. "Survival strategies of bacteria in the natural environment." Microbiol. Rev. **51**, 365-379 (1987)
80. Ruvkun, G. B., Sundaresan, V., and Ausubel, F. M. "Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes". Cell **29**, 551-559 (1983)
81. Sandhu, G. R., K. A. Malik. "Plant succession—a key to the utilization of saline soils." Nucleus **12**, 35-38 (1975)
82. Sargent, L., Huang, S. Z., Rolfe, B. G., and Djordjevic, M.A. "Split-root assays using *Trifolium subterraneum* show that *Rhizobium* infection induces a systemic response that can inhibit nodulation of another invasive *Rhizobium* strain". Appl. And Env. Microbiol. **53**, 1611-1619 (1987)
83. Schneider, K., U. Gollan, M. Drottboom, S. Selsemeier-Voigt, and A. Müller. "Comparative biochemical characterization of the iron-only nitrogenase and the molybdenum nitrogenase from *Rhodobacter capsulatus*". Eur. J. Biochem. **15**, 789-800 (1997)

84. Schneider, K., A. Müller, U. Schramm, and W. Klipp. "Demonstration of a molybdenum and vanadium independent nitrogenase in a *nifHDK*-deletion mutants of *Rhodobacter capsulatus*." Eur. J. Biochem. **195**, 653-661 (1991)
85. Schüddekopf, K., s. Hennecke, U. Liese, M. Kutsche, and W. Klipp. "Characterization of *anf* genes specific for the alternative nitrogenase and identification of *nif* genes required for both nitrogenases in *Rhodobacter capsulatus*." Mol Microbiol. **8**, 673-684 (1993)
86. Stewart, W.D. P., Fitzgerald, G. P., and Burris, R.H. "In situ studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique". Proc. Natl. Acad. Sci. Wash. **58**, 2071-2078 (1967)
87. Streicher, S., E. Gurney, and R. C. Valentine. "The nitrogen fixation genes". Nature (London) **239**, 495-499 (1978)
88. Thiel, T. "Characterization of genes for an alternative nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*." J. Bacteriol. **175**, 6276-6286 (1993)
89. Tiwari, R. P., W. G. Reeve, and A. R. Glenn. "Mutation conferring acid sensitivity in the acid-tolerant strains of *Rhizobium meliloti* WSM419 and *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* WSM710." FEMS Microbiol. Lett. **100**, 107-112 (1992)
90. Tiwari, R. P., W. G. Reeve, M. J. Dilworth, and A. R. Glenn. "An essential role for *actA* in acid tolerance of *Rhizobium meliloti*." Microbiology **142**, 601-610 (1996)
91. Truchet, G., J. C. Prome, and J. Dénarie. "Simbiosis bacterias-leguminosas: un diálogo molecular". Mundo Científico **133**, 267-269 (1993)
92. Ueda, T., Y. Suga, N. Yairo, and T. Matsuguchi. "Remarkable N₂ fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences." J. Bacteriol. **177**, 1414-1417 (1995)
93. van Berkum, P., D. Beyene, and B. D. Eardly. "Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)" Int. J. Syst. Bacteriol. **46**, 240-244 (1996)

94. Widmer, F., B. T. Shaffer, L. A. Porteous, and R. J. Seidler. "Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas Fir Forest site in the Oregon Cascade Mountain Range." *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 374-380 (1999)
95. Weaver, R. W., and P. H. Graham. "Legume nodule symbionts," p 199-222 In R. W. Weaver, S. Angle, P. Bottomley, D. Bezdicsek, S. Smith, A. Tabatabai, and A. Wollum (ed.), *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties.* Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wis. (1994)
96. Xu, H. S., N. C. Roberts, F. L. Singleton, R. W. Arwell, D. J. Grimes, and R. R. Colwell. "Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment." *Microb. Ecol.* **8**, 313-323 (1982)
97. Yates, M. G. "The enzymology of molybdenum dependent nitrogen fixation" p 685-735. In G. Stacey, H. J. Evans, and R. H. Burris (ed.), *Biological nitrogen fixation.* Chapman & Hall, New York, N. Y. (1992)
98. Young, J. P. W. "Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms", p 43-86. In G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (ed.) *Biological nitrogen fixation.* Chapman and Hall, New York, N. Y. (1992)
99. Young, J. P. W., and K. E. Haukka. "Diversity and phylogeny of rhizobia". *New Phytol* **133**, 87-94 (1996)
100. Yun, A. C., and Szalay, A. A. "Structural genes of dinitrogenase and dinitrogenase reductase are transcribed from two separate promoters in the broad host range cowpea *Rhizobium* strain Irc 78." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7358-7362 (1984)
101. Zehr, J. P., and L. A. McReynolds. "Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*." *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2522-2526 (1989)
102. Zinoni, F., R. M. Robson, and R. L. Robson. (1993) "Organization of potential alternative nitrogenase genes from *Clostridium pasteurianum*." *Biochem. Biophys. Acta* **1174**, 83-86