

Fijación biológica $\frac{\text{O}}{\text{N}}$ nitrógeno

Beatriz Eugenia

Baca

Lucía

Soto Urzúa

Ma. Patricia A.

Pardo Ruiz

Dos fenómenos biológicos fundamentales aseguran la disponibilidad del carbono y del nitrógeno en los organismos vivos a partir del gas carbónico y del nitrógeno molecular del aire: la fotosíntesis y la fijación biológica del nitrógeno. La fotosíntesis es realizada por los vegetales y algunos procariotes, la fijación del nitrógeno únicamente por los procariotes. La fijación del nitrógeno (FN) funciona en bacterias adaptadas en ambientes ecológicos y estilos de vida muy diversos. Sin embargo, todas poseen el sistema enzimático responsable de la reducción del nitrógeno: La nitrogenasa.

El nitrógeno molecular (N_2) es la única reserva de nitrógeno (N) accesible en la biosfera. Prácticamente ilimitada, esta reserva no es directamente utilizada por los vegetales y animales. El N es un constituyente esencial de moléculas fundamentales de todos los seres vivos: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, etcétera. Para que el N_2 pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido. Los únicos seres vivos capaces de realizar esta reacción son las *Eubacteria* y *Archaea*, por el proceso denominado fijación biológica de nitrógeno (FBN). La atmósfera contiene alrededor de 10^{16} toneladas de gas N_2 , y el ciclo del nitrógeno involucra la transformación de unas 3×10^9 toneladas de N_2 por año. Las transformaciones no son exclusivamente biológicas: las radiaciones ultravioleta representan el 10% del aporte global; la industria de los fertilizantes aporta un 25%, por lo que la FBN corresponde al 60% aproximadamente. A nivel

mundial el consumo de fertilizantes nitrogenados aumentó de 8 a 17 Kg ha⁻¹ de suelo agrícola en un periodo de 15 años (1973-1988). Se predice que los requerimientos de fertilizantes nitrogenados aumentarán en el futuro; sin embargo, con la tecnología actual de producción de fertilizantes y los métodos de aplicación empleados que resultan poco eficientes, así como el costo y la contaminación ecológica que producen, su uso se hace más prohibitivo. Por más de cien años, la FBN ha atraído a los científicos interesados en la nutrición vegetal, y se ha explotado este conocimiento en la agricultura.⁴

La fijación química por el método de Haber-Bosch produce un rompimiento de la unión $N \equiv N$, por reducción del enlace de la molécula diatómica de N_2 a dos moléculas de NH_3 , con el empleo de alta temperatura y presión en presencia de un catalizador. La FBN se enfrenta a las mismas barreras energéticas, pero opera en una forma más sutil a temperatura ambiente y presión parcial de N_2 de 0.78 atm; esto gracias a la acción combinada del complejo enzimático de la nitrogenasa (Nasa).

El descubrimiento de la fijación biológica de nitrógeno en las leguminosas remonta al siglo XIX. Los trabajos del francés Jean Baptiste Boussingault y los de los alemanes Hermann Hellriegel y Hermann Wilfarth establecieron, en 1886, que la capacidad de las leguminosas de utilizar el N_2 del aire era debida a la presencia de "nudos" de la raíz inducidos por "fermentos" localizados en el suelo.⁵ Este descubrimiento fue seguido rápidamente por el aislamiento de *Rhizobium* por Beijerinck a partir del chicharo (*Pisum*), y posteriormente por otras bacterias fijadoras de nitrógeno (FN) que no se encuentran asociadas a plantas, como *Azotobacter* y *Clostridium pasteurianum*.⁷



FIGURA 1. Nódulos de la raíz de una planta de chicharo que contiene *Rhizobium*; reduce el N_2 en NH_3 que la planta utiliza, a cambio ésta le proporciona fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo. Los nódulos se desarrollan y son colonizados por la bacteria FN como un resultado del intercambio de señales químicas que se establecen entre los dos simbioses.



Las bacterias FN presentan una muy amplia diversidad taxonómica, con diferentes estilos de vida y de asociación con los vegetales. Sin embargo, sólo una pequeña proporción de especies son capaces de hacerlo; 87 especies en dos géneros de arqueobacterias, 38 de bacterias, y 20 géneros de cianobacterias se han identificado como diazotófos.⁴ Las más eficaces son aquellas que se asocian con las plantas y por medio de estructuras diferenciadas producidas por la planta hospedera, llamados "nódulos", localizados en la raíz de las leguminosas o de las plantas actinorizas. En el interior de estas estructuras se localizan los microorganismos, desarrollando una verdadera simbiosis con la planta; esta simbiosis representa un modelo biológico experimental biológico muy interesante para su estudio y, desde el punto de vista económico, ha abierto un campo de aplicación sumamente prometedor en la agricultura (Figura 1).

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosas es el resultado de una interacción muy específica entre la bacteria y la planta. La organogénesis del nódulo es un proceso inducido por un "intercambio de señales" entre los dos participantes de la interacción, el microsimbionte (bacteria) y el macrosimbionte (planta). Es esencial la unión del microorganismo a los pelos radicales de la planta. Sustancias con efecto mitógeno (factores de nodulación) son sintetizadas por productos de los llamados genes de nodulación del microsimbionte (genes *nod*), en respuesta a la excreción por la planta de sustancias de tipo flavonoide. En la lucerna, el trébol y el chicharo, la bacteria infecta la raíz en la extremidad de los pelos radicales provocando la curvatura de éstos. Se promueve la penetración de la bacteria, formando el llamado "hilo de infección", en el interior del cual se desarrollan los microorganismos, éstos continúan hasta llegar al cortex radical. La infección conduce a la formación del meristemo nodular. La producción de los factores de nodulación induce, a distancia, la división celular a nivel del cortex.

Se estima que, actualmente, la FBN es de 200 millones de toneladas por año, es decir, dos veces la producción de fertilizantes nitrogenados producidos por síntesis industrial. Una de las simbiosis más efectivas es la que se establece entre *Bradyrhizobium japonicum*-soya, donde un 70% de FN por la bacteria es asimilada por la planta. En Brasil se ha empleado con éxito la fertilización biológica de soya con *B. japonicum* y 0% de aporte de N como fertilizante químico,



ello ha conducido a que este país sea el segundo productor de soja a nivel mundial.¹

Existe una gran diversidad de simbiosis entre las no-leguminosas y las cianobacterias y aun entre los actinomicetos como *Frankia*; en este último caso, el estudio de la FBN tiene importancia a nivel de la reforestación; especies de este género se han aislado frecuentemente de árboles.

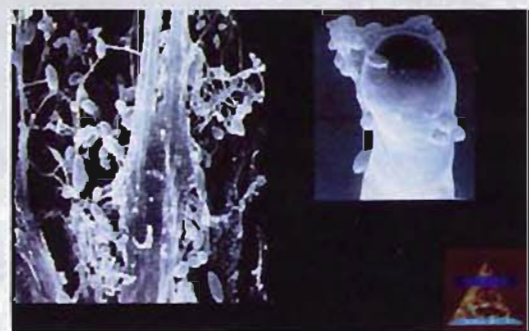
La FN en gramíneas es un reto biotecnológico. Las gramíneas cereales constituyen el componente más importante de la alimentación humana. El arroz, cuya producción anual es de 470 millones de toneladas, constituye el alimento primordial para un tercio de la población mundial. Tomando en consideración el desarrollo demográfico actual, se estima que su producción mundial deberá aumentar un 40% para el año 2020. Cantidades sustanciales de N son fijadas biológicamente en la agricultura del trópico, en particular por cultivos que reciben poco o nada de fertilizante químico nitrogenado. La investigación en bacterias FN asociadas a gramíneas condujo en los años setenta al descubrimiento de un género FN: *Azospirillum*, que rápidamente se denominó PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), "bacteria promotora del desarrollo vegetal"; siendo además un sistema modelo de estudio de la interacción microorganismo-planta, para las monocotiledóneas; estas asociaciones no desarrollan estructuras diferenciadas en las que se alberguen los microorganismos.³ En este caso las bacterias FN se localizan en la superficie de la raíz y en el

suelo que la envuelve, la rizosfera de la planta hospedera; esta asociación es identificada por medio de una tinción *in situ* (Figura 2), en donde se observan las células firmemente adheridas a la superficie de la raíz.

Hasta el presente, los rendimientos obtenidos por la inoculación del microorganismo a las gramíneas han aportado resultados muy variables, pero esperanzadores. Es claro que el actual conocimiento de la interacción planta-microorganismo es aún limitado para poder ser utilizado a nivel masivo; sin embargo, en países subdesarrollados, aumentos de rendimiento en la producción del grano, aun pequeños, podrían repercutir en la economía de estos países.¹

En los últimos años se ha descrito otro tipo de asociación de diazotrofos en la cual la bacteria (llamada bacteria endófito) se localiza en el interior de la raíz, el tallo y las hojas de la planta. El sistema de la raíz de la planta ofrece varios microambientes para el desarrollo del microorganismo; algunos se aíslan en número importante (más de 10^6 células por gramo de peso seco de la raíz) a partir de la superficie de las raíces "esterilizadas". Sin embargo, estos métodos de aislamiento no son suficientes para demostrar que los diazotrofos pueden colonizar los tejidos internos de la planta; es necesario localizar e identificar a la bacteria por estudios microscópicos que aseguren que las células aisladas se localizan en el interior y no por contaminación de los tejidos internos durante el procedimiento. Este estudio se ha aplicado en aislamientos de diazotrofos de plantas forrajeras de Pakistán, en donde se identificó un nuevo FN llamado *Azoarcus*; este microorganismo se localiza en las capas ex-

FIGURA 2. Colonización de la superficie de la raíz de trigo por *Azospirillum brasilense*.



PANEL A. La coloración azul es debida a la presencia de un gene, que permite la detección de la bacteria; se observa también el aumento considerable de los pelos radicales.



PANEL B. Testigo de la raíz no colonizada.

temas del cortex; una vez en el interior de la planta se disemina a los tejidos aéreos probablemente por medio de los vasos del xilema. En experimentos de inoculación con *Azoarcus* al arroz, se logró la colonización del microorganismo y la expresión de la nitrogenasa. La bacteria invade las raíces en la zona de alargamiento y diferenciación, coloniza el cortex intra e intercelularmente, penetrando en el sistema vascular en los vasos del xilema, permitiendo la diseminación sistémica del tallo del arroz; este resultado estimula a continuar con un análisis más detallado de la interacción *Azoarcus*-Arroz e iniciar el empleo del microorganismo en el mejoramiento de la producción del cereal.⁸

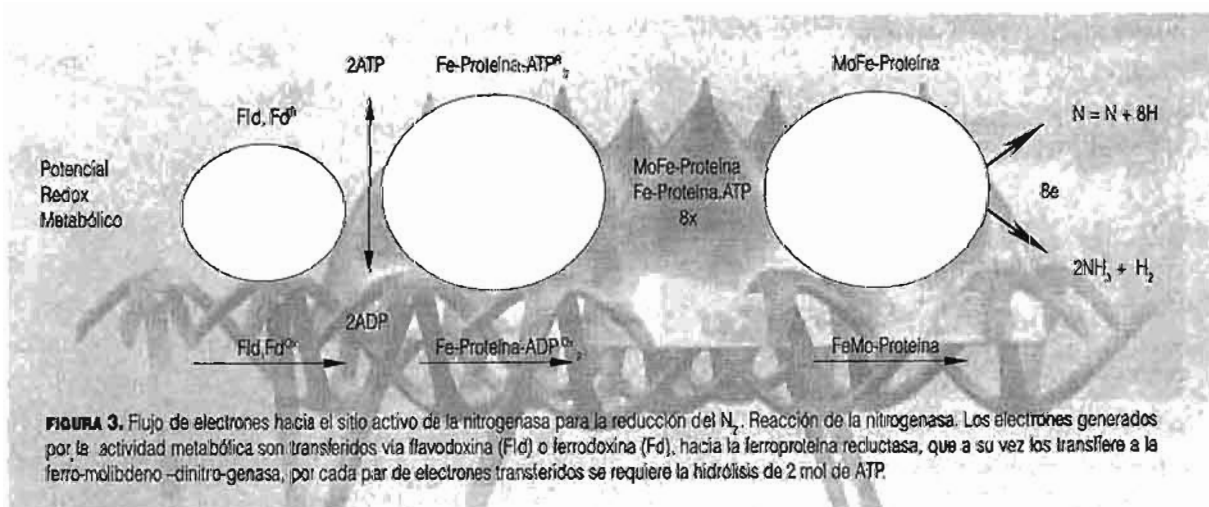
La colonización de tallo y hojas por *Acefobacter diazotrophicus* es especialmente pronunciada en la caña de azúcar; este microorganismo ha sido aislado recientemente de la rizosfera del café por investigadores de nuestro centro de investigación (Grupo de Microbiología del Suelo),⁵ extendiendo la colonización endofítica a plantas no gramíneas. En la asociación de *A. diazotrophicus* con algunos cultivos de caña de azúcar en Brasil, se han descrito rendimientos de FN de 160 Kg/N por hectárea, una fijación similar se ha observado en las leguminosas.¹

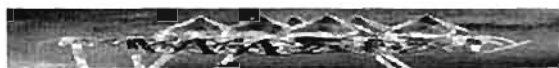
NITROGENASAS

Todos los microorganismos que convierten el N_2 en amoníaco lo hacen gracias a la actividad del complejo enzimático Nasa; la enzima requiere de la colaboración de otras dos proteínas llamadas ferredoxina y flavodoxina; éstas actúan como donadores de electrones y reductores naturales de la Nasa.

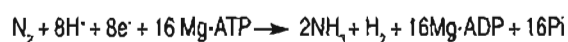


El complejo enzimático Nasa, que cataliza la reducción del N_2 en amoníaco, está constituido por dos metaloproteínas, y contiene tres tipos de grupos prostéticos. La nomenclatura para designar estas proteínas es variable. Así, la proteína I es llamada también dinitrogenasa o "Fierro-molibdeno-proteína". El otro componente, la proteína II, es igualmente nombrada dinitrogenasa reductasa o "Fierro-proteína". Para su funcionamiento, el complejo requiere un donador de electrones de bajo potencial, de la hidrólisis de ATP y de un ambiente estrictamente anaerobio. La proteína I es un tetrámero de alrededor de 220,000 Da, formado por dos tipos de subunidades $\alpha_2\beta_2$, de masa molecular semejante, y que son los productos de los genes *nifDK*. Esta proteína contiene el cofactor con hierro y molibdeno (FeMo-Co). La composición metálica global de la proteína I es de 2Mo, 30 Fe y 30S. Por lo tanto, la proteína contiene además dos grupos prostéticos diferentes: cuatro grupos 4Fe-4S, llamados grupos P ligados de manera covalente a residuos de cisteína de las subunidades α y β y los dos grupos FeMoCo unidos a la subunidad α , donde se propone que son transportados los electrones y es reducido el N_2 . La proteína II es un dímero de alrededor de 68,000 Da, formado por dos subunidades idénticas unidas por un grupo prostético único de 4Fe-4S. El gene responsable de la síntesis de esta proteína es *nifH*. Esta proteína tiene la función de transportar los electrones del donador fisiológico de electrones (ferrodoxina o flavodoxina), hacia la proteína I para llevar a cabo la reducción de la





molécula de N_2 , (Figura 3). La Nasa es sumamente lábil a la inactivación por el O_2 ; de hecho, para su purificación se requieren condiciones anaeróbicas estrictas debido a que el cofactor FeMoCo es irreversiblemente desnaturalizado y oxidado (Figura 4). La FBN es un proceso que requiere un gasto considerable de energía, de ahí que su biosíntesis esté sometida a una estricta regulación. Ha sido determinado que, bajo condiciones de laboratorio, se requieren 16 moléculas de Mg-ATP y se produce además una molécula de H_2 . La ecuación global es:



En condiciones naturales se ha estimado que la demanda energética es mucho mayor de 20-30 moléculas de ATP. Por esta razón, los microorganismos han seleccionado mecanismos para inactivar a la enzima cuando está disponible el nitrógeno combinado; esto le permite mantener las necesidades del microorganismo y evitar un gasto energético inútil.

La hidrólisis de ATP está acoplada a la transferencia de electrones (e^-) hacia la proteína I; dos moléculas de ATP son hidrolizadas por cada par de e^- transferidos. Se piensa que los grupos P tienen una función en la transferencia de e^- . De manera similar, el complejo de la Nasa cataliza igualmente la reducción de análogos estéricos del N, en particular el acetileno, que es reducido a etileno. Esta propiedad es la base de un método relativamente sencillo para analizar la actividad de la Nasa por cromatografía en fase gaseosa. Este método ha permitido también el descubrimiento de otros diazotrofos utilizando el sencillo medio de cultivo sin nitrógeno llamado *nfb* (nitrogen fixation biological), descrito en Brasil por Joana Döbereiner.¹ En este medio se adiciona una fuente de carbono y algunas sales, la fuente de N es el molecular, por lo tanto los únicos microorganismos que se desarrollarán serán aquellos que sean capaces de FN. Se inocula al medio una porción de raíz, del nódulo o bien la bacteria ya aislada por picadura y el desarrollo del microorganismo se realizará en la zona en la cual exista una pO_2 menor a 0.02% (microaerofilia) debido a que, como ya se mencionó, la enzima es sumamente sensible a este gas. Este método ha permitido aislar e identificar diazotrofos de diferentes habitats.

En 1972, Dixon y Postgate (citado en 3), transfirieron los genes *nif* (por nitrogen fixation) de *Klebsiella pneumoniae* a

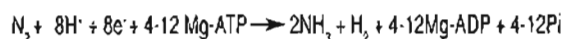
Escherichia coli creando una nueva especie fijadora de nitrógeno. Ello condujo a proponer, como una solución al problema de la nutrición vegetal, la transferencia directa de los genes *nifHDK* a las plantas. Este objetivo está lejos de ser obtenido, ya que la genética de la FBN ha resultado sumamente compleja y está sometida a un control estricto y refinado, justamente por la importante demanda energética. Se han descrito alrededor de 20 genes involucrados en la FBN, cuya secuencia y funciones han sido ya determinadas. Se ha descrito también que los genes estructurales de la Nasa están sumamente conservados, así como un cierto número de otros genes cuyos productos juegan un papel en la maduración de la enzima, la síntesis del cofactor, el transporte de Molibdeno (Mo) y la regulación.³

En el microorganismo diazotrofo de vida libre *Azotobacter vinelandii*, se describieron por vez primera tres Nasas diferentes. Una de ellas es la "convencional" Nasa a Mo. Esta Nasa-1 es expresada en medio que contiene Mo. Las otras dos, llamadas Nasas "alternativas", incluyen a la Nasa-2; ésta es un complejo enzimático que contiene Vanadio (V) en lugar de Mo. Tal complejo enzimático está formado por dos componentes: la dinitrogenasa reductasa-2, un dímero de dos subunidades idénticas, y la dinitrogenasa-2, la cual es un hexámero de MMr 240,000 Da con tres tipos diferentes de subunidades (α , β y δ). La dinitrogenasa reductasa-2 tiene una masa molecular relativa de alrededor 62,000 Da, contiene cuatro átomos de Fe y cuatro grupos -SH ácido lábil por dímero; la dinitrogenasa-2 contiene dos átomos de V, 23 átomos de Fe y 20 grupos -SH ácido lábil por molécula. El cofactor FeVaCo análogo al FeMoCo se ha extraído de la dinitrogenasa. La Nasa-3 contiene Fe en lugar de Mo y V. Constituida también por dos componentes, la dinitrogenasa reductasa es un dímero de 65,000 Da y dos subunidades idénticas; la dinitrogenasa es un tetrámero de dos subunidades (α y β); esta última Nasa tiene un gasto energético de ATP mucho mayor.²

Un reciente y excitante hallazgo realizado por investigadores alemanes (Meyers y cols.⁴), se refiere a una Nasa aislada de *Streptomyces thermoautotrophicus*, la cual presenta varias características originales: los requerimientos energéticos (ATP) son considerablemente menores, la reacción está acoplada a la oxidación del monóxido de carbono (CO) por una enzima adicional, la molibdeno CO deshidrogenasa, que transfiere los electrones derivados de la oxidación

de CO al O_2 , produciendo radicales del anión superóxido (O_2^-). Una superóxido reductasa reoxida los aniones O_2^- a O_2 y transfiere los electrones a la Fe-Mo S dinitrogenasa para la reducción de N_2 a amonio; la enzima no es capaz de reducir etileno y eteno; además, es relevante destacar que los componentes de la Nasa son expresados constitutivamente; todo lo anterior hace a esta nueva Nasa sumamente atractiva para su estudio molecular. En resumen, una de las más sorprendentes propiedades del complejo enzimático de la Nasa de *S. thermoautotrophicus* es su dependencia del O_2 y la insensibilidad de todos los componentes al O_2 y H_2O_2 . Los componentes de esta Nasa son estructuralmente diferentes de las otras Nasas, por lo tanto, los genes que codifican para este complejo enzimático no están relacionados con los genes de las "Nasas convencionales y alternativas".⁹

Estequiometría de la Nasa de *S. thermoautotrophicus*.



CONCLUSIONES

El avance de las investigaciones en los últimos 20 años ha sido muy importante, si se considera la complejidad de los sistemas enzimáticos involucrados, la fisiología del microorganismo en relación con la producción de energía, las

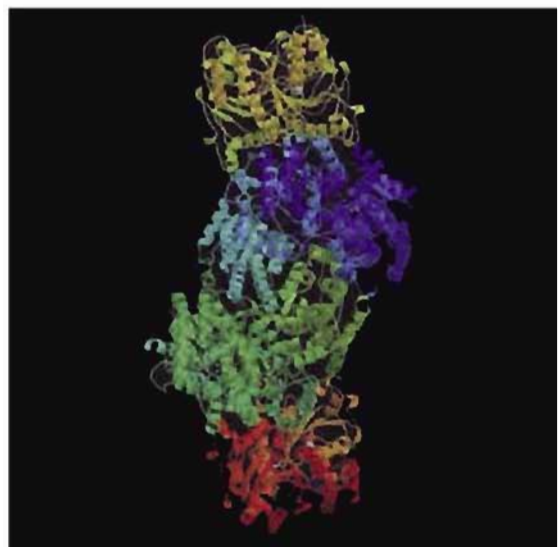


FIGURA 4 Estructura tridimensional del complejo enzimático Nitrogenasa a hierro y molibdeno, de *Azotobacter vinelandii* obtenido por difracción rayos X. Componente I Hierro-Molibdeno dinitrogenasa reductasa, heterodímero cadenas α y β (azul, verde). Componente II Hierro-proteína homodímero (amarillo, rojo, naranja). Tomado de: Structure of Adp Xa14(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. 1997. H. Schindelin, C. Kisker, J.L. Schlessman, J.B. Howard and D. Rees., *Nature* 387:370.



características de la interacción microorganismo-planta y las estrategias seleccionadas en el proceso evolutivo para el control de la FBN. La FBN a amonio es realizada únicamente por procariotes y, en microorganismos con Nasas "convencionales", es un proceso muy sensible al oxígeno. Por otra parte, el proceso de FBN es un componente crítico en el ciclo global del nitrógeno de relevante importancia ecológica. Los mejores fijadores son los que establecen una simbiosis con plantas superiores en la cual la energía para la FN y, en general, el sistema de protección al O_2 es proporcionado por la planta. Dentro de los diazotrofos se incluyen los asociados, de vida libre, simbióticos y endófitos.

La FBN es el mecanismo principal de aporte de N en los ecosistemas naturales y es muy importante en la agricultura del trópico. En varios suelos tropicales, debido al bajo intercambio de iones y a la mínima retención de agua de la fracción mineral, la fertilidad del suelo está estrechamente relacionada con el contenido de materia orgánica del suelo. Como el N_2 es el elemento más fácilmente perdido cuando la mineralización de la materia orgánica del suelo es estimulada por el arado del suelo, es frecuente que este elemento controle la materia orgánica del suelo y, por lo tanto, su fertilidad. La aplicación continua de fertilizantes no puede ser una opción sostenida para el tercer mundo, ya que los precios de los energéticos son muy elevados, son contaminantes de los mantos acuíferos y muchas veces son perdidos por lixiviación.

El nitrógeno de la biósfera está sujeto a un rápido recambio, y debido a que es perdido como N_2 a la atmósfera, su mantenimiento requiere de un continuo reemplazo con N reducido a partir del N_2 atmosférico. La Nasa de *S. thermoautotrophicus* puede ser una enzima que esté distribuida en microorganismos aislados de ambientes extremos, aspecto que no había sido explorado con anterioridad y abre expectativas alentadoras para la manipulación por ingeniería genética de este complejo enzimático debido a su tolerancia hacia el oxígeno, de tal manera que será relativamente más sencilla su caracterización bioquímica, genética y molecular.

Esta revisión reconoce el papel de la FBN como una manera más efectiva, menos cara y no contaminante, para mejorar la fertilidad del suelo comparada con otras vías (como la fertilización química y la orgánica), las cuales presentan altos niveles de contaminación con metales pesados, sales nitrogenadas y microorganismos patógenos para el hombre. En nuestro estado



de conocimiento actual, tomando en consideración la producción obtenida, la simbiosis *Rhizobium-leguminosa* es superior a los otros sistemas FN; sin embargo, la investigación reciente realizada con los endófitos podría representar la mejor fuente de fertilizantes "ideales", por lo que demandan un gran interés como área de futura investigación.

REFERENCIAS

- ¹ Baldani, J. I., Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goi, S. R., and Döbereiner, J., 1997. Recent advances in BNF with non-legumes plants. *Soil Biol. Biochem.* 29:911-922.
- ² Bishop, P.E., and Premakumar, R., 1992. Alternative nitrogen fixation systems. In *Biological nitrogen fixation*. Eds G. Stacey, R.H. Burris, and H. J. Evans. pp736-762., Chapman & Hall.
- ³ Eimerich, C., 1993. Fixation biologique de l'azote. *Ann. Institut Pasteur*, 4:133-153.
- ⁴ Hussein Zahran, H., 1999. *Rhizobium-Legume* symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:968-989.

- ⁵ Jiménez-Salgado T., Fuentes-Ramírez, L. E., Tapia-Hernández, A., Mascaraña-Esparza, M., Martínez-Romero, E., and Caballero-Mellado, J., 1997. *Colletia arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing *Acetobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3676-3683.
- ⁶ Levellay, J., 1988. L'azote et la vie: l'œuvre de Jean Baptiste Boussingault. *Vies Scientifiques CRS*, 59-72.
- ⁷ Nutman, P.S., 1987. Centenary lecture, *Phil Trans Real Society London B* 317: 69-106.
- ⁸ Reinhold-Hurek, B., and Hurek, T., 1998. Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* 139:139-143.
- ⁹ Ribbe, M., Gadkari, D., and Meyers, O., 1997. N_2 fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple reduction to the oxidation of superoxide produced from O_2 by molybdenum-CO dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 272:26627-26633.

Beatriz Eugenia Baca y Lucía Soto Urzúa son Investigadoras del Centro de Investigaciones Microbiológicas del ICUAP; Patricia A. Pardo Ruiz es profesora de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Puebla.



