

La tecnología de los inoculantes microbianos es el resultado de investigaciones diversas, realizadas con el fin de aprovechar al máximo los beneficios de la fijación biológica de nitrógeno. Este es un maravilloso proceso natural que, por reducción enzimática, transforma el nitrógeno atmosférico en amonio disponible para las plantas para la síntesis de sus proteínas, aprovechando la energía solar a través de la fotosíntesis. Sus beneficios explican el equilibrio de los ecosistemas y los rendimientos en zonas con agricultura tradicional.

La economía del nitrógeno en la biosfera es regulada por la diversidad de sistemas fijadores, que incluyen desde microorganismos autotróficos (bacterias de vida libre y algas fotosintéticas), hasta microorganismos heterotróficos asimbióticos (*Azotobacter*, *Spirillum*, *Bijerinckia*, etc.), y los que realizan asociaciones simbióticas o mutualistas con plantas de diferentes clases, incrementando los contenidos de nitrógeno en ecosistemas acuáticos y terrestres.

Actualmente son reconocidas y estudiadas las asociaciones específicas de plantas con sistema fotosintético eficiente, C_4 , tales como pastos tropicales, sorgo, caña de azúcar y cereales, con bacterias que contribuyen a elevar los rendimientos y calidad de las cosechas y constituyen otro campo de amplia investigación y grandes expectativas.

La fijación de nitrógeno por algas verde-azules en arrozales de las zonas tropical y subtropical en Asia ha sido reconocida desde hace muchos años y actualmente es motivo de investigación y experimentación. Muy promisorio es por su parte el helecho acuático *Azolla* en simbiosis con el alga *Anabaena* que puede fijar hasta 313 kilogramos de nitrógeno por hectárea al año (kg N/Ha/año). La simbiosis con plantas no leguminosas es de gran significado económico y ecológico especialmente en los bosques, por ejemplo, la especie *Alnus* que en simbiosis con el actinomiceto *Frankia* puede llegar a fijar hasta 156 kg N/Ha/año.

La más eficiente, elaborada y estudiada es la asociación obligatoria entre la bacteria *Rhizobium* y las plantas leguminosas, caracterizada porque la infección por la bacteria desarrolla en las raíces de las plantas una estructura especial llamada nódulo, y es allí donde se realiza el proceso de fijación del nitrógeno. La interacción específica de los simbiosientes produce la reducción de la forma molecular de este elemento, mediante la enzima nitrogenasa aportada por la bacteria, hasta la forma de amonio que la planta usa rápidamente en la síntesis de aminoácidos, amidas y ureidos que luego son transformados en proteínas.

FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO

DESARROLLO DE UNA TECNOLOGIA

Nery Mora de González*

El proceso se verifica gracias a la energía solar mediante la fotosíntesis que aporta, además, poder reductor y el esqueleto carbonado para la síntesis de aminoácidos. La enzima nitrogenasa requiere para su actividad una baja concentración de oxígeno, que se logra en el nódulo por la acción de la leghemoglobina, sintetizada por el aporte de los dos simbiosientes: la globina proviene de la planta y el grupo hemo proviene del genoma de la bacteria, lo que evidencia su interacción.

La eficiencia de este sistema fijador depende tanto de la especie leguminosa, como de la cepa del rizobio y de las condiciones ambientales y nutricionales. El nitrógeno fijado se ha evaluado entre 50 y 350 kg/Ha/año y se acepta un valor prome-

dio de 100 Kg/Ha/año para la mayoría de las leguminosas de grano y forrajeras. Entre el 60 y el 90% de nitrógeno fijado se acumula en las semillas y forrajes y el resto se mineraliza en el suelo incrementando el contenido del elemento y beneficiando de manera indirecta los cultivos de plantas no leguminosas, tanto en los cultivos mixtos como en los de rotación.

Las leguminosas contribuyen a la producción agrícola, suministrando granos que, como la arveja, fríjol, soya, lenteja, haba, garbanzo y maní entre otros, tienen un alto contenido proteínico y por esta razón son de gran importancia para la alimentación humana; forrajes, con porcentajes de proteínas entre 18 y 27%, por ejemplo tréboles, alfalfa, Kudzú, *Desmodium*, y *Stylosanthes*; abonos verdes como lupinos, crotalaria, canavalia y *calopogonium*; árboles de rápido crecimiento, valiosos en sistemas forestales como la *Leucaena*, y especies productoras de maderas, gomas, resinas y colorantes. Sin embargo, a pesar de los usos valiosos de las leguminosas no se ha dado atención especial a las técnicas específicas para obtener el máximo beneficio de la fijación de nitrógeno. La fijación por esta asociación se ha estimado en 70×10^6 toneladas M/año de N_2 , que representa el 40% del total del nitrógeno fijado biológicamente cada año. El manejo racional del sistema suelo-planta-bacteria puede producir notables incrementos de nitrógeno fijado reduciendo el consumo de fertilizantes nitrogenados y aumentando el rendimiento y la calidad de los cultivos de leguminosas.

La necesidad mundial de producción de alimentos con alto contenido de proteínas y los costos elevados de los fertilizantes nitrogenados, ha estimulado la búsqueda y desarrollo de agrotecnologías basadas en la explotación del potencial de la fijación biológica de nitrógeno, que impliquen reducción de los costos de fertilizantes y que eviten los graves

* Química. Profesora titular. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia —Ciudad Universitaria. Bogotá.

problemas ecológicos derivados del uso indebido de los fertilizantes, tales como la eutroficación de las aguas y el aumento de nitratos en el agua potable.

El desarrollo de esas agrotecnologías requiere investigación básica multidisciplinaria (química, genética, fisiología, bioingeniería, agronomía, microbiología) que permita el conocimiento profundo de los mecanismos implicados en las etapas del proceso en los diferentes sistemas fijadores y que establezca las limitaciones en las condiciones ambientales especiales en que funcionan, con el fin de determinar las prácticas culturales que logren una mayor ganancia de nitrógeno.

Inoculantes: El objetivo de la tecnología de los inoculantes, en el sistema fijador *Rhizobium* —leguminosas es la introducción de poblaciones altas de cepas seleccionadas, en la rizosfera de plántulas de leguminosas para inducir una nodulación abundante y efectiva, en áreas donde se determine la necesidad de rizobios eficientes por ausencia o bajas poblaciones. El éxito de la inoculación depende del reconocimiento y establecimiento de las condiciones requeridas por los dos simbioses.

El método común de inoculación es la aplicación del rizobio a la semilla y su sobrevivencia depende de la forma del inóculo, el método de aplicación y de la clase de semilla, pues algunas contienen en la cubierta compuestos tóxicos al microorganismo.

Se expondrán a continuación de manera sucinta las etapas y aspectos que la investigación debe enfrentar con el fin de lograr con éxito los inoculantes y su aplicación.

Selección del microsimbionte: La selección de la cepa apropiada es factor decisivo en el éxito del inoculante. Muchas leguminosas son hospederos específicos, mientras otras son noduladas por diversas cepas de rizobios. Por esta razón es importante elegir cepas compatibles con la especie particular. Además, las cepas deben ser efectivas o sea

hábiles para fijar grandes cantidades de nitrógeno; compatibles con una gama amplia de especies y variedades; competitivas, es decir, capaces de inducir nodulación en presencia de cepas nativas invasivas pero poco eficientes y adicionalmente deben fijar el elemento en presencia de niveles moderados de nitrógeno en el suelo. El mecanismo de competición entre cepas no está bien explicado aún y la razón de la selectividad atribuida a lectinas y exudados de la raíz y de la envoltura de la semilla es aún motivo de investigación.

Además de las características intrínsecas de las cepas, debe estudiarse su adaptación a terrenos de baja fertilidad y el desempeño en condiciones de deficiencia o exceso de algunos nutrientes del suelo. La



1. Raíces nodulares de soja

selección de cepas en ensayos de laboratorio e invernadero es complementada con ensayos de campo para observar la respuesta a las condiciones climáticas y a las características físicas, químicas y biológicas del suelo. Algunos pueden tener poblaciones antagónicas. Otro aspecto que se debe tener en cuenta es que las cepas seleccionadas no sólo deben propagarse en el suelo para asegurar buena nodulación, sino que el rizobio debe sobrevivir en él.

A corto plazo se espera que la genética y la bioingeniería eliminen la especificidad y la producción de cepas tolerantes a niveles altos de nitrógeno combinado del suelo.

Selección del macrosimbionte: La selección de genotipos de alto rendimiento, resistencia a enfermedades e insectos y sobre todo, de alta capacidad simbiótica, es tan importante como la selección de la bacteria. Las leguminosas por ejemplo, son especialmente susceptibles a patógenos y su control es necesario para mantener el vigor de la planta y la actividad fijadora. Fitomejoradores y genetistas pueden inducir mutaciones en la planta o cruzar variedades con cualidades deseables, tales como resistencia a enfermedades y limitaciones en la fotorespiración para inducir incrementos en los fotosintatos. El desarrollo de la hibridación somática abre grandes esperanzas. Sin embargo, la transmisión de la capacidad fijadora de los organismos procarotes a células vegetales continúa bajo estudio y es aún incierta.

DETERMINACION DE FACTORES AMBIENTALES Y NUTRICIONALES LIMITANTES DEL PROCESO DE FIJACION DEL NITROGENO

Los factores del medio ambiente tales como temperatura, humedad, luz, presión de dióxido de carbono y de oxígeno pueden llegar a limitar o inhibir la actividad nodular y la fijación. Esta última y los rendimientos altos se obtienen cuando están disponibles los nutrientes esenciales para el desarrollo de la planta y la bacteria.

Las leguminosas son muy poco tolerantes a la acidez del suelo, a la toxicidad del aluminio y a deficiencias de nutrientes tales como calcio, fósforo y molibdeno. Sin embargo, muchas leguminosas forrajeras tropicales están bien adaptadas a los suelos ácidos y resulta necesaria la recolección de este germoplasma.

De especial interés es la limitación debida al nitrógeno combinado del suelo, que retarda o inhibe la nodulación y fijación de nitrógeno, y sus efectos son dependientes del hospedero y de la cepa de rizobio.

La determinación de los factores que limitan la fisiología de la planta y el proceso de fijación, indicará las prácticas culturales y la fertiliza-

ción, así como la forma de inoculación, con el fin de dar al rizobio máxima protección contra el medio físico y biológico y permitirle una infección rápida de la planta y la expresión de su capacidad fijadora. Por estas razones la tecnología de los inoculantes no es transferible y las cepas y métodos de inoculación apropiadas para una zona no son aplicables a otras regiones.

Producción de Inoculantes: A pesar de las grandes ventajas que presenta esta tecnología para la productividad agrícola, sólo en Estados Unidos, Australia, Brasil, Uruguay, Argentina, India y Egipto ha sido desarrollada a escala comercial. En otros países, sólo en universidades y centros de investigación se producen inoculantes para experimentación, a escala de planta piloto.

Aunque los principios básicos de la tecnología se conocen desde hace muchos años, por falta de transferencia en los países en desarrollo no ha llegado a los agricultores y productores potenciales. La falta de personal especializado y entrenado es limitante para el desarrollo de programas de investigación orientados a una producción que permita realizar, desde el aislamiento y selección de cepas, hasta la adaptación de técnicas de inoculación que puedan tener éxito en las condiciones de clima y suelo de regiones tropicales y subtropicales. Otros temas que también requieren estudio son los relativos a selección del tipo de inoculante adecuado (de aplicación a la semilla o al suelo); forma del inoculante (líquido, granular, peletizado, liofilizado, etc); clase de soporte y su adecuación (turba, carbón, lignito, compost, vermiculita, bagazo, paja, entre otros); manejo del inoculante (empaquete, transporte y almacenamiento) y control de calidad. Necesarios e importantes son también los programas de extensión y las estrategias de introducción de los inoculantes al mercado.

Actividades investigativas sobre la fijación de nitrógeno por leguminosas.

Las siguientes instituciones integran el núcleo inicial de participa-

ción del país en la Red Latinoamericana de Biotecnología en el área de la fijación simbiótica de nitrógeno. Los programas de investigación respectivos se han integrado en un plan de investigación a nivel nacional, el cual ha sido presentado a Colciencias a través del Comité Nacional de Rizobiología.

A continuación se resumen muy brevemente los aspectos más relevantes de la investigación que se realiza en cada institución: La Universidad Nacional de Colombia, a través del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias en Bogotá, adelanta en los programas de



2. Ensayo de selección de cepas en jarras de Leonard



3. Ensayo de selección de cepas en campo.

Química Agrícola trabajos orientados a determinar la necesidad y efectos de la inoculación con cepas seleccionadas de rizobio en cultivos de trébol blanco y arveja en suelos de la sabana de Bogotá. Se determinan también los factores del suelo, limitantes del proceso; la selección de soportes adecuados para los inoculantes y, actualmente, se inician los estudios de evaluación de los efectos de inoculación con hongos vesículoarbusculares sobre la fijación de nitrógeno.

También en el mismo departamento, el grupo de investigación de Bioquímica estudia los mecanismos por los cuales se establece la simbiosis Rizobium-leguminosa, evaluando las lectinas de semilla y raíz en diferentes especies de leguminosas, la especificidad de la interacción lectina-rizobium y la influencia de las condiciones de crecimiento de la bacteria en esta interacción. La Universidad Pedagógica Nacional en Bogotá, a través de su Departamento de Biología, adelanta estudios sobre aspectos biológicos de rizobios y de hongos micorrizicos vesículo-arbusculares.

En Palmira, el Centro Internacional de Agricultura Tropical, lleva a cabo programas de selección de cepas de rizobios y de genotipos de fríjol y de leguminosas forrajeras tropicales. Evalúa también el efecto de la inoculación con rizobios y con hongos micorrizógenos (MVA) en la fijación de nitrógeno en pastos tropicales. Actualmente desarrolla

inoculantes liofilizados en medios oleosos con ventajas para las zonas tropicales.

La Empresa Colombiana de Productos Veterinarios, Vecol, realiza ensayos conducentes a la producción a nivel industrial de inoculantes para soya y trébol blanco. Recientemente, la facultad de Agronomía de la Universidad de Nariño inició su programa de investigación sobre la fijación de nitrógeno en cultivos de frijol en la región del altiplano de Pasto. Por su parte, el Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, en sus sedes de Tibaitatá (Mosquera) y de Palmira, adelanta investigación sobre selección de cepas de rizobios y de genotipos de trébol y soya y evalúa los efectos de la inoculación en ensayos de campo en diferentes zonas.

El plan de investigación a nivel nacional propone fomentar las actividades investigativas en los siguientes aspectos:

- Aislamiento y selección de cepas de *Rhizobium*.
- Determinación de la necesidad y efectos de la inoculación en diferentes regiones.
- Estudio de factores bióticos y abióticos que puedan limitar la eficiencia del proceso de fijación del nitrógeno.
- Efecto de las micorrizas en la fijación simbiótica.
- Producción de inoculantes comerciales.
- Manejo agronómico de leguminosas.
- Bioquímica de la interacción *Rhizobium*-leguminosas.

Finalmente, debe anotarse que para lograr una eficiente acción científica y tecnológica, deben difundirse y hacerse del dominio público la comprensión de los beneficios de esta tecnología y las necesidades implícitas de la investigación, incluyendo un equipo de investigadores y extensionistas que trabajen en programas estables, bien financiados y a largo término. ■

HACIA UNA...

Viene de la pág. 13

te menú, la selección de aspectos concretos sobre los cuales concentrar esfuerzos mediante *programas* y *proyectos coordinados* no debería ser una tarea demasiado complicada y el país ha recorrido ya parte de este camino.

Sin embargo, existe una prioridad más fundamental, de cobertura tanto vertical como horizontal, la que, de no ser satisfecha, convertirá cualquier tipo de determinación de prioridades en un ejercicio estéril y frustrante: hablamos de los recursos humanos calificados. Sin ellos, sin un grupo mínimo de científicos dispuestos y entrenados para encarar y resolver problemas, cualesquiera otras medidas y políticas que se adopten resultarán vanas, improductivas o, a lo más, ineficientes.

Por ello consideramos que cualquier proyecto biotecnológico debe cumplir, además de sus objetivos intrínsecos, con dos requisitos educacionales:

- Contribuir significativamente a la formación de grupos de investigadores, tanto a nivel de pregrado como de posgrado, y, lo que es más importante, a la génesis de escuelas activas y efectivas, capaces de autoperpetuarse dentro de un proceso dinámico y flexible.
- Inducir a científicos experimentados a que adquieran conciencia de que estamos rodeados de un buen número de problemas importantes, de repercusión económica y práctica, que deben ser objeto de investigación de alta calidad y cuya solución puede resultar en la clarificación de interrogantes biológicos fundamentales.

Para muchos investigadores formados sigue siendo motivo de degradación la mera consideración de problemas prácticos concretos a resolver en el corto o en el mediano plazo. Esta manera de ver las cosas nunca hubiera permitido a un Pasteur realizar los cruciales descubrimientos microbiológicos que resultaron de su atención a los proble-

mas de la industria del vino y la cerveza, entre otros. Y tampoco contaríamos hoy con los avances trascendentales que Bárbara McClintock logró en genética vegetal cuando se ocupó de la variabilidad de ciertas características del maíz. Consideraciones análogas pueden hacerse respecto a los fundamentales avances alcanzados en inmunología, generados por investigaciones concretas sobre enfermedades tropicales en Africa, con miras al desarrollo de extensas regiones de este continente. Y la lista sigue...

Pero este tipo de consideraciones es simétrico: si aceptamos que los resultados del estudio serio de temas "aplicados" pueden rebasar ampliamente el territorio del problema inicial y asumir cualidades "básicas" imprevistas, debemos también reconocer que los conocimientos generados por la investigación fundamental encuentran luego clientes inesperados e insospechados, ejemplos de los cuales está llena la historia de la ciencia y de la tecnología, muchos en el campo de la biología y en el de la biotecnología, la vieja y la nueva. Las dos caras de la moneda vienen a cuento porque es preciso percatarse de la necesidad de hacer ciencia básica de alto nivel, por un lado, y de la responsabilidad de identificar soluciones o aplicaciones de los resultados que se obtienen, por el otro.

Cooperación Internacional

En cualquier planteamiento de política de desarrollo científico y tecnológico la cooperación técnica internacional desempeña, o debe desempeñar, un papel decisivo. Es un hecho, sin embargo, el que, en un buen número de casos, los países en desarrollo no hayan explotado este recurso al máximo por falta de organización y coordinación internas y de criterios claros sobre el contenido y alcance de dicha cooperación.

En el caso de la biotecnología y sus áreas satélites, muchas de las organizaciones de cobertura mundial o regional, no obstante sus bien conocidas restricciones financieras,