

FIJACIÓN DE NITRÓGENO POR ALGAS CIANOFÍCEAS EN LOS
ARROZALES DE LA ALBUFERA DE VALENCIA

V. Vidal*

M.J. Jara*

M^a. C. Hernández Mariné**

P. Martínez-Germes*

y

E. Hernández*

*Cátedra de Microbiología

E.T.S.I. Agrónomos.

Camino de Vera, 14.

Valencia-20

**Cátedra de Botànica

Facultat de Farmàcia

Universitat de Barcelona

RESUMEN

Se realizan recuentos, aislamiento, identificación y determinación de la actividad Nitrogenasa de algas azules en muestras de suelo y agua, durante dos ciclos de cultivo del arroz.

Los recuentos se realizan por la técnica del "Plate Count", utilizando el medio de Chu y los resultados muestran grandes fluctuaciones en las muestras de agua, manteniéndose más altos y uniformes en las muestras de suelo.

Después del aislamiento e identificación, llegamos a obtener colonias algales correspondientes en su mayor parte a los géneros Anabaena y Nostoc, las cuales se someten posteriormente a ensayos de reducción del acetileno, para determinar su actividad fijadora de nitrógeno. La especie identificada como N. humifusum, es en nuestras condiciones, la que posee mayor actividad fijadora, además de ser la más común en los dos campos de arroz ensayados.

ABSTRACT

Nitrogen fixation by algae (Cyanophyceae) in rice paddy fields in the "Albufera lake". Valencia.

Recounts, isolation, identification and Nitrogenase activity determination by blue-green algae in samples of water and soil along two cultivate rice cycles has been made.

The recounts are accomplished by Plate Count technique, using the Chu's medium and the results show high variations in the number of colonies among the water samples, while the soil samples show a distribution more uniform in the total number of colonies.

After the isolation and identification of the algae

we have found species mainly belonging to the Anabaena and Nostoc genera . They are been submitted to the Acetylene Reduction Technique, to determine its nitrogen fixing activity. According this method, the species N. humifusum is the highest nitrogen fixer in ours conditions and moreover is the most common in the two rice fields tested.

Las algas cianofíceas tienen gran importancia, tanto ecológica como agronómica, debido a su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico en forma de amonio, el cual puede ser utilizado para la biosíntesis de aminoácidos y proteínas, contribuyendo así al mantenimiento de la fertilidad del suelo.

Está bien demostrado que los suelos inundados y especialmente los campos de arroz poseen condiciones adecuadas para la fijación de nitrógeno atmosférico, siendo las cianofíceas uno de los principales agentes responsables de dicha fijación (ALIMAGNO y YOSHIDA, 1977. RODGERS y cols., 1979).

Desde su primera descripción por HARDY en 1968, para demostrar la fijación de nitrógeno, se utiliza el ensayo de la reducción del acetileno a etileno como el método más fácil y sensible para determinar la presencia de la enzima nitrogenasa (POSTGATE, 1971).

MATERIAL Y METODOS

Toma de muestras y recuentos

Se eligieron dos campos de arroz de situación diferente, tomando muestras en ambos de agua y suelo con una periodicidad aproximadamente mensual y durante dos ciclos del cultivo del arroz. A partir de las muestras se hacen determinaciones de pH y temperatura, así como recuento del número total de algas capaces de fijar nitrógeno, los cuales se realizan por la técnica del recuento en placa, utilizando como medio de cultivo la solución libre de nitrógeno de Chu (GERLOFF, FITZGERALD y SKOOG, 1950), solidificando con el 1,4% de agar y adicionado de 10 ppm de gentamicina para inhibir el crecimiento bacteriano.

La incubación se realiza a temperatura ambiente con luz natural, durante 4 a 5 semanas.

Aislamiento

Las colonias algales aparecidas en las placas de recuento, después de varios pases sobre el mismo medio de Chu sólido, se aíslan en tubos de agar inclinado.

Ensayo de reducción del acetileno

Las cepas más comunes se someten al ensayo para detectar la actividad nitrogenasa.

Se utilizan dos series de siete matraces de 40 ml de capacidad, conteniendo 5 ml de solución de Chu libre de nitrógeno combinado.

El inóculo se prepara a partir de un cultivo de 4 semanas en agar inclinado y suspendiendo las células en la misma solución. Los matraces se inoculan con 1 ml de la suspensión algal de aproximadamente 10^3 - 10^5 cel/ml, dejando dos

TABLA I
CICLO ANUAL DEL CULTIVO DEL ARROZ

FECHA	NIVEL LAGO	PTO.	ESTADO CAMPO	CICLO ARROZ	LABORES TRATAMIENTOS
octubre	min-med	1	seco	-	quema paja
		2	seco	-	"
noviembre	ascend.	1	inundado (70 cm.)	-	lavado
		2	inundado (8-10 cm.)	-	"
diciembre	máximo	1	inundado (100 cm.)	-	"
		2	inundado (15 cm.)	-	"
1 de enero — apertura de compuertas					
enero	descend.	1	inundado (70 cm.)	-	"
		2	fangoso	-	saneamiento
febrero	mínimo	1	inundado (50 cm.)	-	lavado
		2	fangoso	-	secado
marzo	min-med	1	fangoso	-	saneamiento
		2	seco	-	labor de fondo
abril	medio	1	seco	-	labor de fondo, labrado y abonado
		2	seco	-	
1 de mayo — inundación de los campos					
mayo	medio	1	inundado (10 cm.)	siembra	escardá y herbicidas
		2	inundado (5-7 cm.)	"	" "
junio	medio	1	inundado (20 cm.)	crecimiento	enjugado y herbicidas
		2	inundado (10 cm.)	"	
finales de junio — aixugó					
julio	medio	1	fangoso	"	
		2	fangoso	"	
15-20 de julio — inundación de los campos					
agosto	medio	1	inundado (10 cm.)	maduración	insecticida
		2	inundado (10 cm.)	"	"
septiembre	máximo	1	fangoso	"	
		2	"		
20-25 de septiembre — recolección del arroz					

Tabla II
Producción de etileno expresado en nmoles de C_2H_4 /vial/hora⁻¹ por una cepa de N. humifusum.*

Tiempo Incubac. (Horas)	Atmosfera	Control 1	Control 2	Control 3	Ensayo	
					\bar{x}	D.T.
1	Normal	4,16	4,16	4,99	7,49	0,83
	Ar:O ₂ (80:20)	6,65	3,32	4,99	19,97	4,78
7	Normal	0,59	0,47	0,47	3,35	1,50
	Ar:O ₂ (80:20)	0,89	0,47	0,71	32,84	13,36
24	Normal	0,28	0,00	0,14	4,10	1,64
	Ar:O ₂ (80:20)	0,24	0,00	0,31	62,75	7,31

* Cepa ensayada en medio líquido.

Control 1.- Sin sembrar, con acetileno. Control 2.- Sembrado, sin acetileno. Control 3.- Sembrado, con acetileno y adicionado de 0,4% de sulfato amónico. \bar{x} .- Media sobre cuatro determinaciones. D.T..- Desviación típica.

Tabla III

Producción de etileno expresada en nmoles de C_2H_4 /vial/hora⁻¹ por una cepa de N. paludosum.

Tiempo Incubación (Horas)	Atmósfera	Control 1	Control 2	Control 3	Ensayo	
					\bar{x}	D.T.
2	Normal	13,72	1,66	19,14	23,92	12,31
	Ar:O ₂ (80:20)	2,08	1,25	0,00	32,29	14,68
7	Normal	3,15	0,47	3,86	11,05	3,76
	Ar:O ₂ (80:20)	0,59	0,36	0,83	36,75	28,62
24	Normal	1,14	0,17	1,39	14,21	4,47
	Ar:O ₂ (80:20)	0,17	0,17	0,24	43,68	23,36

* Cepa ensayada en medio líquido.

Control 1.- Sin sembrar, con acetileno. Control 2.- Sembrado, sin acetileno. Control 3.- Sembrado, con acetileno y adicionado de 0,4% de sulfato amónico. \bar{x} .- Media sobre cuatro determinaciones. D.T.- Desviación típica.

de ellos como controles sin sembrar. En la primera serie se reemplazan los tapones de algodón por otros de goma estériles y se sustituye la fase del gas por una mezcla de Argón: Oxígeno (80:20). El segundo grupo se mantiene con el tapón de algodón a presión parcial de $O_2=1$. Cada serie consta además, de un segundo control creciendo en el medio de Chu conteniendo 0,4% de sulfato amónico.

Todos los matraces se preincuban en una cámara de cultivo con fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, con intensidad de 2000 lux y temperaturas que oscilan entre $26^{\circ}C \pm 1$ en la fase luminosa y $24^{\circ}C \pm 1$ durante la fase oscura.

Después de 24 h de preincubación los tapones de algodón del segundo grupo se sustituyen por otros de goma y el 10% de la atm. interna en ambas series se sustituye por acetileno, dejando un vial de cada serie como control sin acetileno.

Muestras de gas de 0,2 ml se toman a intervalos entre 1 y 24 horas para el cromatógrafo de gases según describe POSTGATE, 1971.

RESULTADOS Y DISCUSION

Ciclo del arroz

La Tabla I, resume el ciclo del cultivo, para ambos campos enclavados geográficamente en puntos opuestos de la Albufera, teniendo condiciones distintas sobre todo en lo que respecta al estado de inundación.

Se producen a lo largo del ciclo 3 inundaciones sucesivas de finalidad diferente, seguidas por sus respectivos períodos de campo en seco.

La primera inundación de los campos se efectúa en noviembre, permaneciendo en fase de lavado hasta el 1 de enero, en que se abren las compuertas y las aguas de la Albufera descienden de nivel; durante esta inundación, en el punto 1, las aguas alcanzan los 100 cm de altura sobre el campo, debido a que esta zona está a nivel más bajo que las aguas del lago. En el punto 2, las aguas sobre el campo no sobrepasan los 15 cm de altura.

La segunda inundación se produce en mayo, dando paso a la siembra, a la que sigue la "Escardá" química por herbicidas, para eliminar las plántulas de Echinochloa sp.

La última inundación se realiza para finalizar el "Eixugó" o secado del campo, a mediados de julio, dando paso a la maduración del arroz.

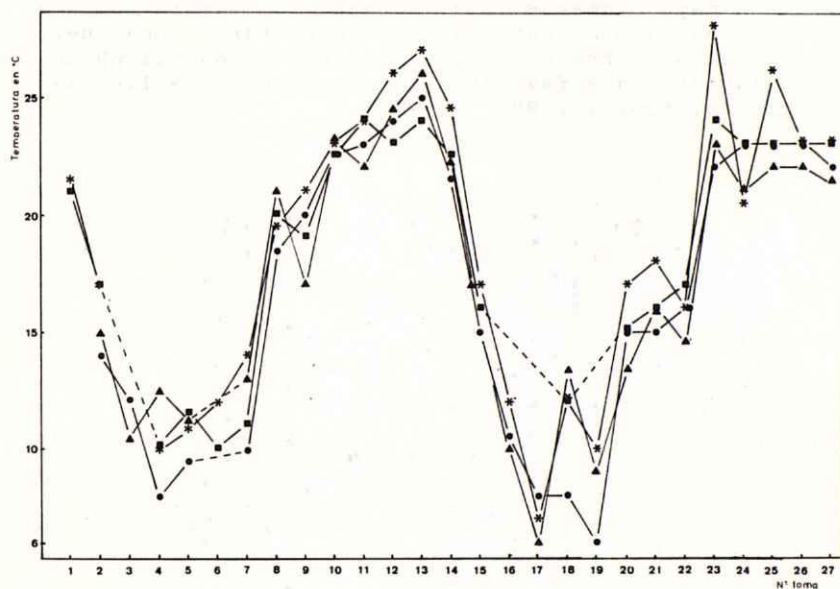
Temperaturas

En los meses más fríos, las temperaturas (Gráf. I) se mantienen entre los 6 y $12^{\circ}C$ y se elevan bruscamente al comenzar la siembra en mayo, estabilizándose sobre todo en las muestras de suelo, entre 20 y $25^{\circ}C$, durante el crecimiento de las plantas; mientras que el agua sufre mayores fluctuaciones.

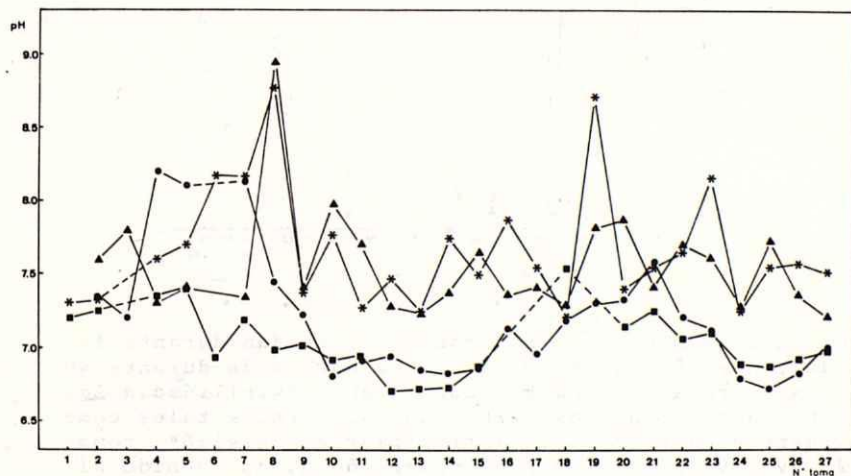
pH

Respecto a las variaciones de pH, (Gráf. II), se da una

gran oscilación en las muestras de agua de los dos puntos, alcanzando valores superiores a 8 durante los meses de invierno y hasta la siembra, descendiendo a partir de ella a niveles ligeramente alcalinos. Sin embargo, en el suelo de los arrozales los pHs son más constantes todo el año y de tendencia alcalina cuando las tierras están sin cultivar, bajando a partir de la siembra a pHs ligeramente ácidos.



Graf. I.- EVOLUCION DE LA TEMPERATURA EN SUELO DE ARROZALES Y AGUA DE LA ALBUFERA DE VALENCIA.
Punto 1: tierra=■, agua=●. Punto 2: tierra=▲, agua=▲.

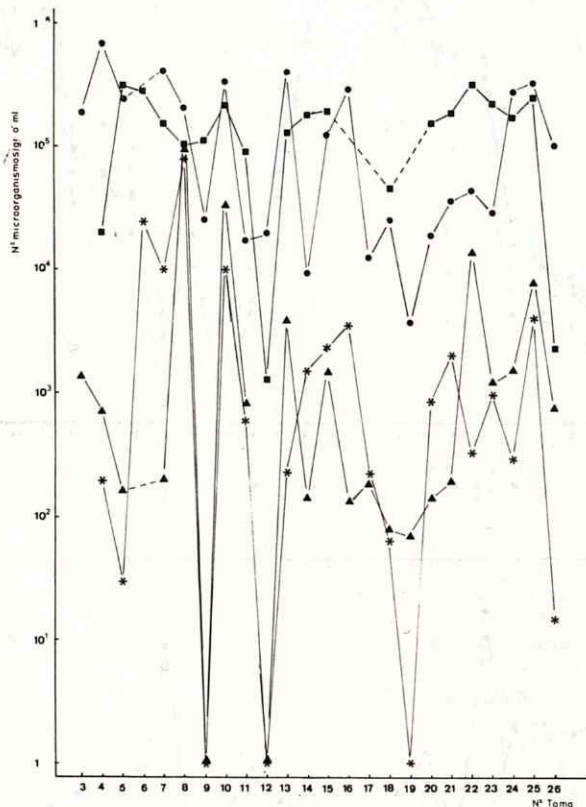


Graf. II.- EVOLUCION DEL pH EN SUELO DE ARROZALES Y AGUA DE LA ALBUFERA DE VALENCIA.
Punto 1: tierra=■, agua=●. Punto 2: tierra=▲, agua=▲.

Evolución en el número total de algas

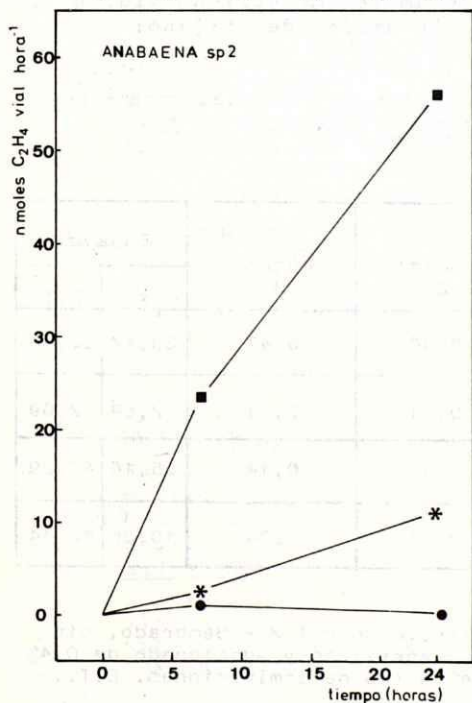
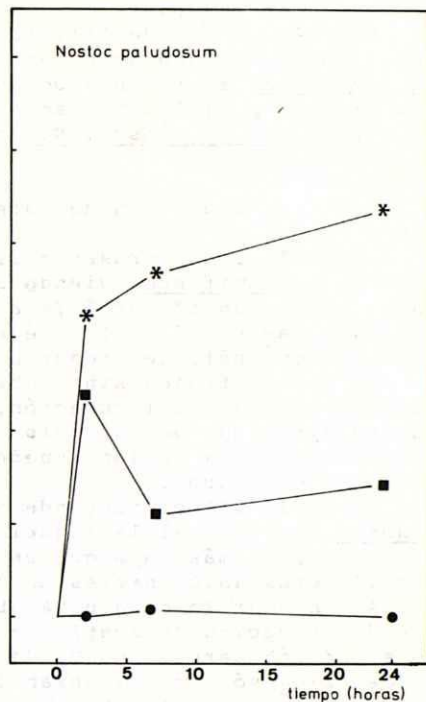
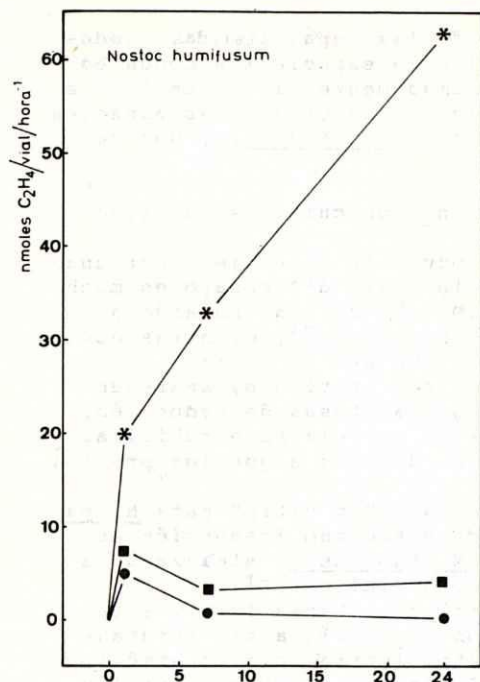
Los resultados, de los recuentos durante los dos ciclos de cultivo indican, (Graf. III), que las muestras de suelo, mantienen valores altos durante todo el ciclo, oscilando entre 10^3 y 10^5 cel/gr de tierra, dándose los mínimos en las tomas 12 y 26, que corresponden al final del "Eixugó" y después del tratamiento con herbicidas.

Las muestras de agua dan mayores variaciones, alcanzando 10^4 cel/ml en mayo (tomas 8, 22), durante la siembra, coincidiendo con un marcado aumento de las temperaturas, una fuerte radiación solar sobre el campo y una elevación del pH del agua, tres factores que favorecen el crecimiento de las algas cianofíceas, ROGER, 1980.



Gráf. III.- VARIACIÓN ANUAL DEL CONTENIDO EN ALGAS CIANOFÍCEAS EN SUELO DE ARROZALES Y AGUAS DE LA ALBUFERA DE VALENCIA.
Punto 1: tierra= ■, agua=*. Punto 2: tierra=●, agua= ▲.

Los valores mínimos, próximos al 0, se dan durante la "Escardá", después de dejar actuar el herbicida durante 48 horas. La flora algal, muestra pues gran sensibilidad a los compuestos activos de los herbicidas utilizados tales como el molinate y el bentazón. Al finalizar el "Eixugó", tomas 12 y 26, vuelve a descender el número de algas, debido al estado seco del campo y otra dosis de herbicida.



Graf. IV.- PRODUCCION DE ETILENO POR
 CEPAS DE *N. humifusum*, *N.*
paludosum y *Anabaena sp2*
 CRECIENDO EN MEDIO LIQUIDO
 A DISTINTAS CONDICIONES:
 Atm. normal= , atm. Ar:O₂
 (80:20)= , atm. Ar:O₂(80:
 20)+ (NH₄⁺) al 0,4%= .

Especies aisladas

Después de la identificación de las cepas aisladas, podemos señalar que en ambos arrozales la especie más común es N. humifusum, representando aproximadamente el 90% de las cepas aisladas, el 10% restante lo componen otras tres especies de Nostoc, N. paludosum, N. commune y N. minutum, y dos cepas de Anabaena.

Tests de reducción del acetileno con cultivos puros de algas

La Tabla II, representa la producción de etileno por una cepa de N. humifusum, viendo que la media del ensayo es mucho mayor incubando con atmósfera Ar:O₂ (80:20), alcanzando a las 24 horas 62,75 nmoles de etileno/vial/h⁻¹, mientras que a pO₂=1 atm. sólo se producen 4,10 nmoles.

En los controles sin sembrar y sin acetileno, aparecen al principio de la incubación, pequeñas tasas de reducción, que se aproximan a 0 a medida que el sistema se estabiliza. Estos niveles de etileno pueden ser debidos a que los propios gases no son puros.

La Tabla III corresponde al ensayo "in vitro" para N. paludosum, en el cual la fijación de nitrógeno (reducción de acetileno) es más baja que en el N. humifusum, alcanzando a las 24 horas 43,68 nmoles de etileno/vial/hora⁻¹.

Al ensayar la cepa de Anabaena sp2, (Tabla IV), las tasas de reducción de acetileno, son mucho más altas incubando a presión parcial de O₂ de 1 atm. Mientras con la atmósfera de Ar:O₂ sólo se alcanzan 10,96 nmoles de etileno/vial/h⁻¹, en atmósfera normal sobrepasa los 56 nmoles de etileno.

Tabla IV

Producción de etileno expresado en nmoles de C₂H₄/vial/hora⁻¹ por una cepa de Anabaena sp2.*

Tiempo Incubac. (Horas)	Atmosfera	Control 1	Control 2	Control 3	Ensayo	
					\bar{x}	D.T.
7	Normal	0,59	0,00	0,47	23,47	30,58
	Ar:O ₂ (80:20)	0,59	0,71	0,71	2,59	2,09
24	Normal	0,14	0,00	0,14	56,16	47,29
	Ar:O ₂ (80:20)	0,24	0,31	0,24	10,96	10,14

* Cepa ensayada en medio líquido.

Control 1.- Sin sembrar, con acetileno. Control 2.- Sembrado, sin acetileno. Control 3.- Sembrado, con acetileno y adicionado de 0,4% de sulfato amónico. \bar{x} .- Media sobre cuatro determinaciones. D.T.- Desviación típica.

Tanto para N. humifusum, con atm. Ar:O₂ y para Anabaena sp2, con atm. normal, la fijación de nitrógeno es lineal, mientras que en N. paludosum, alcanza tasas altas de fijación en las primeras dos horas y a partir de las 7 horas de incubación, disminuye su velocidad de producción. (Graf. IV).

En las dos especies del género Nostoc ensayadas, la fijación de nitrógeno atmosférico es siempre mayor a presiones parciales de O₂ reducidas, y atmósferas controladas, ya que el N₂ del aire puede competir con el acetileno por la nitrogenasa, (POSTGATE, 1971). Sin embargo, Anabaena sp2, se comporta de modo distinto, puesto que es mayor su actividad nitrogenasa con atmósfera normal, coincidiendo estos resultados con las experiencias de LAMBERT y COL., 1979, según los cuales A. cylindrica es capaz de fijar nitrógeno en presencia de aire, porque sus heterocistos protegen su nitrogenasa oxígeno-lábil del O₂ del aire.

BIBLIOGRAFIA

- ALIMAGNO, B.V. y YOSHIDA, T., 1977. In situ acetylene-ethylene assay of biological nitrogen fixation in lowland rice soils. Plant and Soil. 47, 239-244.
- CAIOLA, M.G., 1974. Structural and Ultrastructural Aspects of Nostoc punctiforme and Nostoc commune under Culture Conditions. Nova Hedwigia. XXV (1/2):259-277
- DAVID, K.A.V. y FAY, P., 1977. Effects of long-term treatment with acetylene on nitrogen-fixing microorganism. Appl. Environ. Microbiol. 47, 640-646.
- GEITLER, L., 1932. Cyanophyceae Rabenhorst, Kryptogamenflora, 1196 pp. Akad. Verlag., Leipzig.
- GERLOFF, G., FITZGERALD, G. y SKOOG, F., 1950. The isolation, purification and nutrient solution requirements of blue-green algae. En The culturing of algae, Symposium, 1949:27-44. Ed. Brunel, Prescott & Tiffany, New York.
- KANTZ, T. y BOLD, H., 1969. Morphological and taxonomic investigations of Nostoc and Anabaena in culture. Phycol. Stud. Univ. Texas, 6924
- LAMBERT, G.R., DADAY, A. y SMITH, G.D., 1979. Effects of ammonium ions, oxygen, carbon monoxide, and acetylene on anaerobic and aerobic hydrogen formation by Anabaena cylindrica B629. Appl. Environ. Microbiol. 38, 521-529.
- NORRIS, J.R. y RIBBONS, R.W., 1971. Methods in microbiology. Vol. 6B. Academic Press Inc. London.
- POSTGATE, J.R., ed., 1971. The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation. 326 pp. Plenum Press. London.
- RINAUDO, G., BALANDREAU, J. y DOMMERGUES, Y., 1971. Algal and bacterial non-symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. Plant and Soil, Special volume, 471-479.
- RODGERS, G.A., BERGMAN, B., HENRIKSON, E. y UDRIS, M., 1979. Utilisation of blue-green algae as biofertilisers. Plant and Soil, 52, 99-107.
- ROGER, P.A., KULASOORIYA, S.A., TIROL, A.C. y CRASWELL, E.T. 1980. Deep placement: A method of nitrogen fertilizer application compatible with algal nitrogen fixation in wetland rice soils. Plant and Soil 57, 137-142.
- STEWART, W.D.P., 1970. Algal fixation of atmospheric nitrogen. Plant and Soil 32, 555-588.

- TROLLENIER, G., 1977. Influence of some environmental factors on nitrogen fixation in the rhizosphere of rice. Plant and Soil 47, 203-217.
- WATANABE, I., LEE, K.K. y GUZMAN, M., 1978. Seasonal change of N_2 fixing rate in rice field assayed by in situ acetylene reduction technique. II.- Estimate of nitrogen fixation associated with rice plants. Soil Sci. Plant. Nutr., 24(4), 465-471.
- WITTY, J.F., KEAY, P.J., FROGATT, P.J. y DART, P.J., 1979. Algal nitrogen fixation on temperate arable fields. The broadbalk experiment. Plant and Soil 52, 151-164.