

AVANCES EN UN NUEVO MODELO PARA LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD NITROGENÁSICA EN AGUAS SOMERAS

A. Quesada, E. Sánchez Maeso & E. Fernández Valiente

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid.

RESUM

S'han realitzat millores per a la determinació de la fixació biològica de nitrogen in situ, i s'ha desenvolupat un mètode útil per a ecosistemes palustres com els arrossars. El mètode consisteix en una ampolla de plàstic rígid i transparent, sense fons, suplementada amb sistemes d'agitació i de recollida de mostres. Les dades analitzades indiquen la validesa del mètode, com també la comoditat i autonomia que suposen durant el període de mostreig.

Es comparen les dades de fixació biològica de nitrogen de dues campanyes de mostreig: juny, amb cultiu d'arròs, i gener, sense cap cultiu i s'observen uns valors similars a altres arrossars en el mes de juny; per contra, en el mes de gener no es va obtenir cap valor d'activitat nitrogenàsica.

RESUMEN

Se han realizado mejoras para la determinación de la fijación biológica de nitrógeno in situ, desarrollándose un método útil para ecosistemas palustres como los arrozales. El método consiste en una botella de plástico rígido transparente, desprovista de fondo, suplementada con sistemas de agitación y de recogida de muestras. Los datos analizados indican la validez del método, así como la comodidad y autonomía que suponen durante el período de muestreo.

Se comparan los datos de fijación biológica de nitrógeno de dos campañas de muestreo: junio, con cultivo de arroz, y enero, sin cultivo alguno, observándose unos valores similares a otros arrozales en el mes de junio; por el contrario, en el mes de enero no se obtuvo valor ninguno de actividad nitrogenásica.

ABSTRACT

Some improvements in the method for the estimation of in situ biological N_2 -fixation in wetlands, such as shallow-water ricefields have been develop. The device consists of a rigid transparent bottomless plastic bottle provided with an agitation system and with a system of withdrawn of aliquots. Analyzed data show that the device is usefull and is convenient to use it in the field.

We compare data of biological dinitrogen fixation of two season: June, with rice cultivation, and January without cultivation. We saw similar values to other ricefields in June, for the contrary we didn't get any results about the nitrogenase activity in January.

Key words: acetylene reducing activity, dinitrogen fixation, N_2 -fixing cyanobacteria, rice fields.

INTRODUCCIÓN

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso muy importante en algunos sistemas, ya que puede suponer una entrada importante de nitrógeno disponible para toda la biocenosis (Roger & Kulasooriya, 1980).

Las cianobacterias fijadoras de N_2 son un grupo mayoritario entre los microorganismos fijadores de N_2 presentes en ecosistemas palustres como son los arrozales. En este punto radica la importancia de su estudio en hábitats naturales o antropizados (arrozales), en los que pueden llegar a suponer una fertilización natural no contaminante (Roger & Kulasooriya, 1980).

La determinación de la fijación de N_2 en ambientes naturales se ha llevado a cabo por varios métodos, como son la medida de N total por el método Kjeldahl, usado por varios autores (Roger & Kulasooriya, 1980), la incorporación de $^{15}N_2$, utilizado bastante menos (Marumoto, 1986) y finalmente la actividad reductora del acetileno (ARA) que lleva a cabo el complejo enzimático Nitrogenasa presente exclusivamente en los microorganismos fijadores de N_2 . Cada método presenta sus ventajas e inconvenientes pero quizás el más sencillo, rápido y sensible sea el basado en la actividad reductora del acetileno.

La determinación in situ de la fijación biológica del nitrógeno por el método de la ARA se llevó a cabo por primera vez en 1967 por Stewart et al., desde entonces se han realizado numerosas variaciones (Alimagno & Yoshida, 1977; Lee & Watanabe, 1977; Lee et al., 1977). Actualmente la determinación de esta actividad biológica in situ está siendo abandonada. La causa de este abandono se debe principalmente a los problemas que conlleva, como son la baja difusión en agua de los gases que intervienen (acetileno y etileno) (Lee & Watanabe, 1977), los largos períodos de incubación necesarios, y el consecuente calentamiento de la cámara de ensayo por el efecto invernadero (Roger & Kulasooriya, 1980). Otros autores están reemplazando estas técnicas por otras pseudotécnicas in situ que toman el material a determinar y lo introducen en envases cerrados en los que poder extraer e introducir cómodamente los gases e incluso transportarlos para incubarlos bajo condiciones de laboratorio (Lee & Yoshida, 1977). Nosotros pensamos que estas técnicas presentan la ventaja de facilidad de manejo y eliminan los problemas anteriores, pero modifican el medio en el que se desenvuelven los microorganismos fijadores.

Para evitar variar las condiciones fisicoquímicas a las que están sometidos los microorganismos fijadores hemos diseñado un sistema que permite una rápida y cómoda determinación de la fijación biológica de N_2 in situ, sin alterar el medio. Así mismo hemos mejorado el método de forma que se pueden almacenar las muestras de gas durante un período de al menos 1 mes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la cámara de incubación

El modelo ha sido desarrollado para determinar la fijación de N_2 en sistemas palustres como son los arrozales. El modelo consiste en una cámara de incubación a la que se aplica el método de la reducción del acetileno.

La cámara de incubación (Fig. 1) se basa en una botella de plástico rígido y transparente de 5 l. de volumen a la que se ha eliminado el fondo. El modelo además comprende un sistema de agitación consistente en un motor provisto de una hélice y una batería, este motor está sujeto a una varilla por medio de una pinza especialmente diseñada para este fin, que permite sumergir de forma constante la hélice a una profundidad de 2 a 5 mm evitando así la turbidez del agua.

Finalmente hay un sistema de recogida de muestras mediante una doble aguja de jeringuilla y una serie de tubos vacutainer a los que se les hizo el vacío, tapados con un tapón de goma.

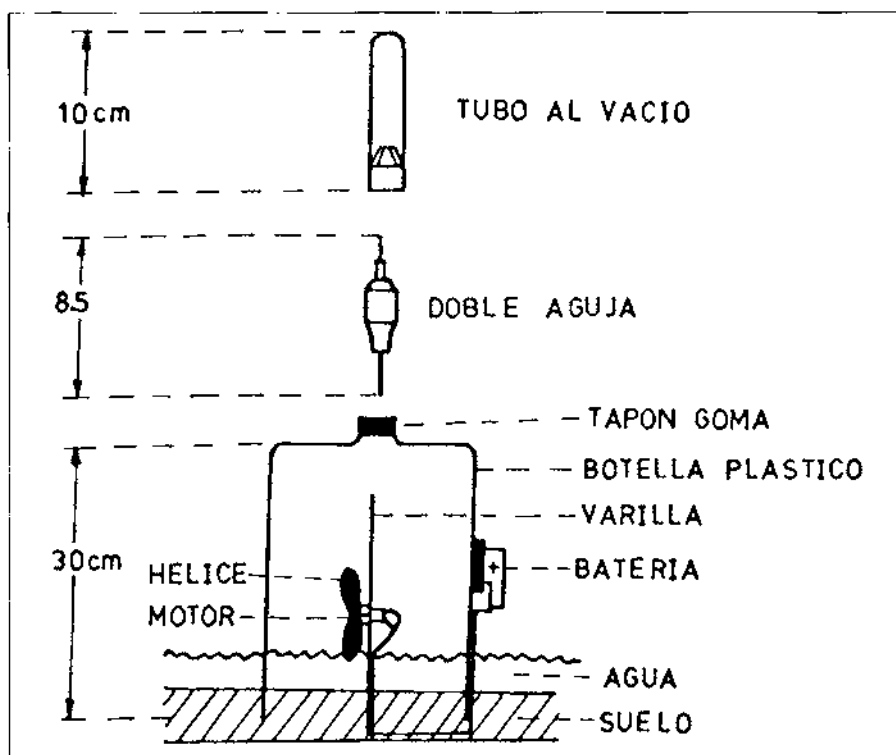


Figura 1. Diagrama de la cámara de ensayo utilizada para la determinación in situ de la actividad reductora del acetileno en aguas someras.

El modelo diseñado permite un rápido montaje de la cámara de incubación con su sistema de agitación y una cómoda recogida de muestras.

Experimentos en el campo

Los experimentos fueron llevados a cabo en los arrozales valencianos que rodean el lago de La Albufera. Se realizaron en dos épocas distintas del año, la primera durante el período de cultivo del arroz en 1988 (junio); en ésta se comprobó la validez del sistema (Quesada et al., 1989). Y otra en el mes de enero de 1989 cuando no había ningún cultivo. Las condiciones ambientales eran netamente diferentes.

La metodología seguida fue la misma en los dos períodos de muestreo: en cada punto se disponían 2 cámaras de incubación, una de ellas como control, sin acetileno, con el fin de deducir el etileno ambiental, y otra a la que se reemplazaba el 10% del aire de su interior por acetileno. En las dos cámaras de incubación se recogían 3 alicuotas a intervalos de 1 hora durante 5 h, estas alicuotas se recogían en tubos al vacío hasta que se podía medir el etileno formado en un cromatógrafo de gases.

Paralelamente a la determinación de la ARA, en cada punto de muestreo se midió el pH, irradiancia y temperatura, así como la cantidad de P soluble y de compuestos nitrogenados (NH_4 , NO_3^- , NO_2^-). También de cada punto se recogió un alicuota de suelo para contar el número de cianobacterias fijadoras existentes. Estas determinaciones se explican detalladamente en Quesada et al. (1989).

Experimentos de laboratorio

Para asegurarnos de la total fiabilidad del método desarrollado, se hacía necesario comprobar que las muestras recogidas y almacenadas en los tubos vacutainer no sufrían alteraciones ni pérdidas durante el tiempo que estaban en los mencionados tubos. En este sentido se hicieron pruebas para comprobar el vacío real que presentaban los tubos, a fin de ver el factor de dilución y la permanencia del gas. Para estos ensayos se trabajó con distintos recipientes herméticos a los gases.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El muestreo realizado en el mes de junio sirvió para comprobar la validez del modelo. En esta época la fijación biológica del N_2 era variable, dependiendo del punto de muestreo medido. Sin embargo, en las medidas realizadas durante el mes de enero de 1989, la fijación biológica del N_2 dió resultados negativos, independientemente del punto de muestreo elegido.

Los resultados anteriormente citados pueden deberse a que las condiciones ambientales que había en las dos épocas de muestreo eran muy diferentes entre sí (Tabla 1). En el mes de junio resultaban muy adecuadas para la actividad cianobacteriana (Roger & Kulasoorya, 1980), pero en el mes de enero las condiciones eran desfavorables, con valores de irradiancia y temperatura bajos.

Tabla 1. Condiciones ambientales y número de cianobacterias presentes en el arrozal en las épocas de muestreo.

Mes de muestreo	Temperatura del agua. Media/σ (°C)	Irradiancia Máx. Mín. ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	Núm. de cianobacterias. Media/σ (C.F.U.)
Junio	26,4/1,6	150 - 2000	$3,3\times 10^5/6,3\times 10^5$ *
Enero	10,8/2,3	25 - 1050	$3,3\times 10^7/5,0\times 10^7$ **

* C.F.U. l^{-1} ** C.F.U. cm^{-2}

En cada punto de muestreo se determinaron también parámetros químicos y biológicos del agua (Tabla 2). El conteo de cianobacterias fijadoras en ambas épocas presentaba unos valores similares a los descritos en otros arrozales estudiados (Roger et al., 1987); sin embargo la actividad nitrogenásica que presentaban en cada mes era muy distinta: mientras que en el mes de junio se obtuvieron valores máximos de unos $950 \mu\text{mol}$ de etileno. $\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, en el mes de enero los valores máximos encontrados estaban próximos al límite de error del método. Esta aparente contradicción puede ser motivada por las condiciones desfavorables encontradas en el mes de enero, que inducirían un estado de latencia de las cianobacterias en su hábitat; por otro lado es sabido que el método usado para el conteo de cianobacterias (dilución-plaqueo) no tiene en cuenta el estado fisiológico de los microorganismos contados; por este motivo en el conteo están también incluidas las formas latentes de resistencia.

En una primera aproximación del método, las muestras de gases eran recogidas directamente en jeringuillas y trasladadas desde el punto de muestreo hasta el

Tabla 2. Contenido en compuestos nitrogenados (NH_4 , NO_3^- , NO_2^-), P soluble en el agua del arrozal, así como la actividad reductora del acetileno (ARA), en las distintas temporadas de muestreo.

Muestreo	Punto	NH_4 (mg. l^{-1})	NO_3^- (mg. l^{-1})	NO_2^- (mg. l^{-1})	P soluble (mg. l^{-1})	A.R.A. μmol de etileno. $\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$
Junio	A	0,8	0,0	0,13	2,17	944,1
	S	0,12	35,2	0,03	0,15	0,0
	X	0,24	8,8	0,27	0,07	3,1
Enero	A	0,43	0,0	0,03	1,8	0,0
	H	0,85	13,2	0,66	0,7	0,0
	J	0,24	0,0	0,0	0,11	0,0
	S	0,12	61,6	0,2	0,13	0,0
	X	0,12	6,6	0,18	0,15	0,0

Tabla 3. Estudio de la estanqueidad de los tubos Vacutainer. El factor de dilución calculado para los distintos lotes de tubos era de $1,3 \pm 0,02$.

Punto 15-1-89	Repetición 27-2-89	% Permanencia	% Permanencia
H	1	100	100,1
	2	100	82,3
J	1	100	94,0
	2	100	93,6
S	1	100	96,5
	2	100	110,0
V	1	100	104,2
	2	100	96,4

cromatógrafo de gases más próximo, distante varios Km, con una periodicidad de unas 2 horas (Quesada et al., 1989), lo que hacía bastante incómoda la determinación. En trabajos posteriores, las muestras de gases obtenidas eran almacenadas en tubos de ensayo al vacío, según se describe en materiales y métodos. Para estar seguros de la validez del sistema había que comprobar la estanqueidad de los tubos a los gases (Tabla 3), viéndose que el contenido de gases se mantenía constante durante al menos 1 mes, ya que las variaciones observadas parecen ser debidas a diferencias de la sensibilidad de la columna del cromatógrafo, y no a errores del método, ya que no parece probable un incremento de los gases con el tiempo. Se tomaron también varios tubos al azar, de distintos lotes, para comprobar que el vacío era estándar, ya que si no lo era podía distorsionar las medidas realizadas. Los datos obtenidos demuestran que prácticamente todos los tubos tenían el mismo vacío con un coeficiente de variación del 1,53 %.

Se comprobó también la posible presencia de acetileno y etileno dentro de los tubos vacutainer, encontrándose sólo cantidades traza que estaban muy por debajo del margen de error del método, calculado en un 2%.

En el muestreo que se llevó a cabo en invierno, las muestras se almacenaron en los tubos vacutainer y su contenido se midió por cromatografía de gases una semana después y un mes después, obteniéndose unos resultados muy similares.

La última modificación añadida al método diseñado por nosotros facilita la determinación de la fijación de nitrógeno en el campo, ya que hace posible el almacenamiento de las muestras, sin que éstas sufran variaciones significativas, durante toda la campaña de muestreo, pudiéndose medir juntas todas las muestras recogidas ya en el laboratorio base.

CONCLUSIONES

Como conclusiones finales podemos decir que, por un lado, el método utilizado para determinar la actividad nitrogenásica in situ es factible y probablemente mejora los métodos anteriores, ya que aumenta la fiabilidad de la determinación al no modificar el medio en que se encuentran los microorganismos fijadores de nitrógeno, a la vez que disminuye el tiempo de incubación necesario.

Por otro lado, la mejora del método en el sistema de recogida de muestras permite una más cómoda y a la par fiable toma de muestras, permitiendo una autonomía de todo el período de muestreo, al poder almacenar las muestras sin variaciones aparentes de los resultados.

Finalmente podemos concluir que en los puntos muestreados durante el mes de enero de 1989 no se detectó actividad nitrogenásica, probablemente debido a las desfavorables condiciones ambientales.

Agradecimientos

Agradecemos a Dña. Rocío Alonso la colaboración prestada en las determinaciones de campo. Este trabajo fue subvencionado por la C.A.I.C.Y.T. (Nº PB85-0280) y por la Conselleria d'Agricultura de la Generalitat Valenciana.

Bibliografía

- ALIMAGNO, B.V. & YOSHIDA, T. (1977). In situ acetylene-ethylene assay of biological nitrogen fixation in lowland rice soils. *Pl. Soil.*, 47: 239-244.
- LEE, K.K. & WATANABE, I. (1977). Problems of the acetylene reduction technique applied to water-saturated paddy soils. *Appl. envir. Microbiol.*, 34: 654-660.
- LEE, K.K. & YOSHIDA, T. (1977). An assay technique of measurement of nitrogenase activity in root zone of rice for varietal screening by acetylene reduction method. *Pl. Soil.*, 46: 127-134.
- LEE, K.K.; ALIMAGNO B. & YOSHIDA, T. (1977). Field technique using the acetylene reduction method to assay nitrogenase activity and its association with the rice rhizosphere. *Pl. Soil.*, 47: 519-526.
- MARUMOTO T. (1986). Microbial Nitrogen Fixation and its Availability to Rice Plants as Revealed with the use of $^{15}\text{N}_2$ in Japan. *JARQ*, 20: 2, 108-114.
- QUESADA, A.; LEGANÉS, F.; SÁNCHEZ MAESO, E. & FERNÁNDEZ VALIENTE, E. (1988). Study of the presence of heterocystous cyanobacteria in rice fields of Valencia (Spain). VI Symposium on photosynthetic Prokaryotes, Noordwijkertiout, The Netherlands, 181.
- QUESADA, A.; SÁNCHEZ MAESO, E. & FERNÁNDEZ VALIENTE, E. (1989). A new incubation device for in situ measurement of acetylene reducing activity in ricefields. *J. appl. Phycol.* (en prensa).
- ROGER, P.A. & KULASOORIYA, S.A. (1980). Blue-green algae and Rice. The International Rice Research Institute. Los Baños, Laguna, Philippines. 112 pp.
- ROGER, P.A.; SANTIAGO-ARDALES, S.; REDDY, P.M. & WATANABE, I. (1987). The abundance of heterocystous blue-green algae in rice soils and inocula used for application in rice fields. *Biol. Fertil. Soils* 5: 98-105.

STEWART, W.D.P.; FITZGERALD, G.P. & BURRIS, R.H. (1967). In situ studies on N₂ Fixation using the acetylene reduction technique. *Procc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 58: 2071-2078.