

La Fijación Biológica de Nitrógeno: el Caso de la Caña de Azúcar

MSc. Oscar Acuña N.

Centro de Investigaciones Agronómicas

Universidad de Costa Rica.

oscar.acuna@ucr.ac.cr

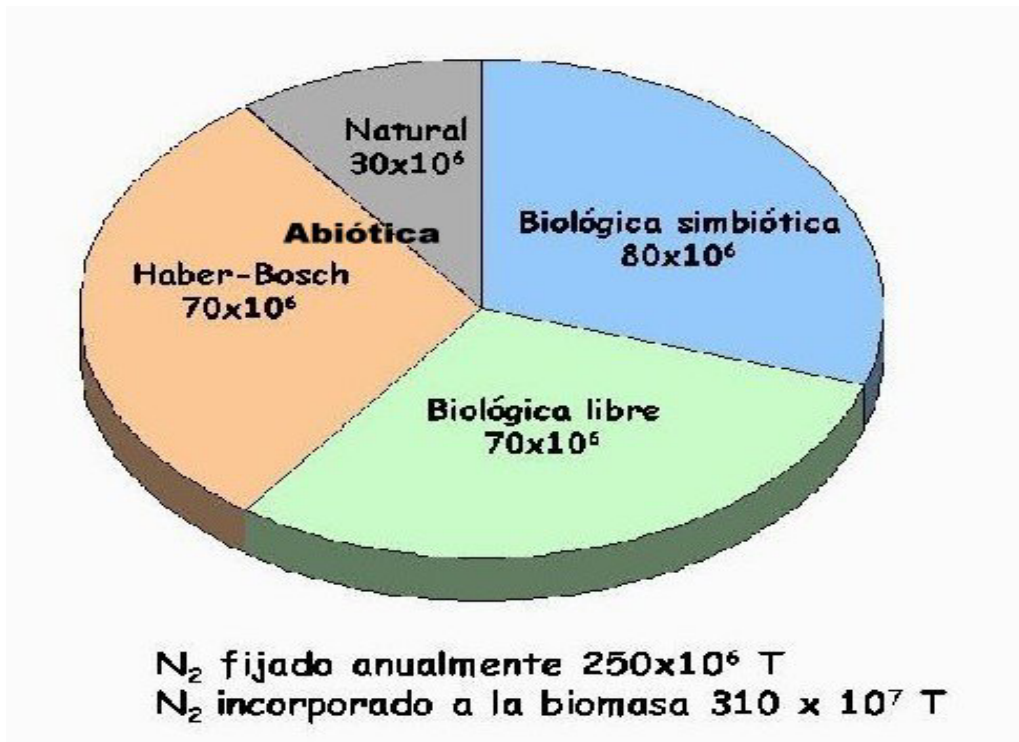
RESUMEN

El nitrógeno es considerado un elemento básico e indispensable para el desarrollo y producción de la gran mayoría de los cultivos agrícolas, especialmente por su papel en la formación y síntesis de aminoácidos y proteínas. Generalmente, la incorporación del éste elemento se realiza con la aplicación de fertilizantes nitrogenados, pero, tomando en cuenta el incremento en los precios de los mismos, su baja eficiencia o aprovechamiento por los cultivos y otros problemas generados por el uso excesivo como la contaminación de fuentes acuíferas con nitratos, en los últimos años se ha dado énfasis a las investigaciones sobre otras alternativas para incorporar el nitrógeno a los cultivos. Actualmente son prioritarios los estudios relacionados con la fijación biológica de nitrógeno y el uso de insumos generados con bacterias fijadoras (biofertilizantes), ya que se puede llegar a suplir de forma eficiente y altamente aprovechable hasta 250 kg de N/ha/año a los cultivos. El cultivo de la caña de azúcar presenta asociaciones importantes con diferentes microorganismos fijadores de nitrógeno en la rizosfera, de allí que se cuenta con un alto potencial como alternativa para suplir en parte y hasta un 50% de las necesidades de este elemento en el cultivo.

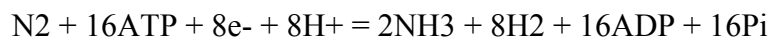
EL PROCESO DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

A pesar de que la atmósfera está constituida por casi el 80 por ciento de nitrógeno, nutriente que, junto con el agua, es factor limitante para el crecimiento de las plantas, la mayoría de los seres vivos son incapaces de aprovecharlo en la forma en que se encuentra (N_2) y sólo algunos organismos procarióticos pueden reducirlo a amonio, en un proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno. Esta incorporación de nitrógeno a los cultivos ocurre gracias a la presencia de microorganismos fijadores que generan la enzima nitrogenasa, capaz de realizar en las condiciones ambientales normales, una reacción química que, permite romper el enlace triple del nitrógeno y producir así dos moléculas de amonio, el cual puede ser asimilado por el cultivo vía sistema vascular. Esto es comparable al procedimiento industrial para la fabricación de fertilizantes nitrogenados, en donde se requiere más de 800 oC de temperatura y bastantes atmósferas de presión (proceso Haber Bosch) por el que se llegan a producir unos 70 millones de Ton de amonio al año. La cantidad global de nitrógeno fijado biológicamente se estima que puede ser alrededor de unos 200 a 250 millones de Ton/ año. La dificultad de una estimación fiel deriva de la gran variedad de microorganismos fijadores y de los diferentes ecosistemas posibles. Una parte importante de esa cifra global corresponde al nitrógeno fijado en el mar por las cianobacterias que allí se desarrollan, y algo menos de la mitad se atribuye a la fijación por microorganismos de vida libre, ya que la simbiótica, aunque sea más alta en los cultivos, está limitada a unas pocas especies vegetales.

El Cuadro siguiente muestra las fuentes de nitrógeno en el planeta, donde se observa que las dos terceras partes provienen de la fijación de nitrógeno



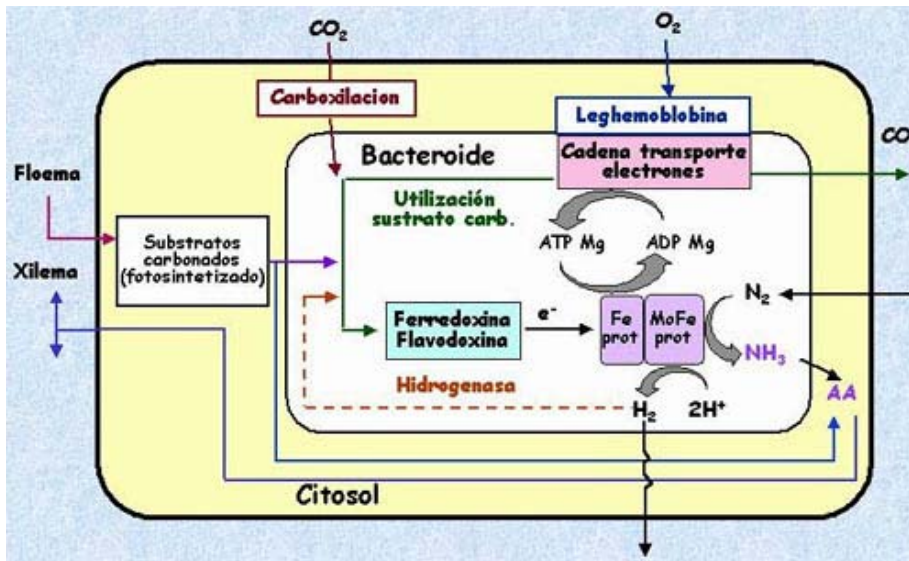
La fijación de nitrógeno es un proceso altamente consumidor de energía. La reducción y la provisión de los electrones necesarios requiere el consumo de bastante moléculas de ATP, hasta 24 por N₂, este trabajo es llevado a cabo por la enzima nitrogenasa con el consumo de 16 moléculas de ATP por N₂ reducido, según la ecuación:



Algunos fijadores libres, como *Azotobacter*, requieren hasta 100 unidades de equivalentes de glucosa por unidad de nitrógeno fijado. Por ello su significación agrícola es baja. Esta significación se incrementa considerablemente en el caso de la fijación simbiótica, como *Rhizobium*-leguminosa, donde la relación disminuye a unas 12 unidades de glucosa por unidad de nitrógeno. En este caso, además, la fuente de energía son compuestos carbonados

suministrados directamente por la planta derivados de la fotosíntesis, mientras que los fijadores libres han de tomarlos del suelo donde no existen en las cantidades necesarias.

La siguiente figura representa el proceso de fijación biológica del nitrógeno:



.La enzima nitrogenasa, además de reducir el N_2 , es capaz de transferir electrones a otros sustratos que también presentan un triple enlace.. Se considera que esta enzima es importante en la detoxificación del ambiente por lo se cree su participación en otros procesos antes de la reducción del nitrógeno tal como es conocida hoy. Uno de estos compuestos es el acetileno que es reducido muy eficientemente a etileno. Esta característica permite evaluar la fijación por un método rápido y sencillo y ha contribuido al un rápido avance en los conocimientos sobre el proceso de fijación a nivel bioquímico y genético, ya que con un análisis en cromatógrafo de gases, se pudo conocer que unos 20 genes estaban relacionados directamente con la reducción del N_2 ..

LOS SISTEMAS DE FIJACIÓN DE NITRÓGENO

Dentro de la fijación simbiótica, la asociación mutualista *Rhizobium-leguminosa* ha sido la más estudiada por su alto potencial de fijación. La asociación de Frankia, un actinomiceto fijador, con plantas leñosas, como el baúl, tiene un interés más forestal y ecológico. Otro tipo de fijadoras lo constituyen las bacterias diazótrofes, las que no requieren de estar asociadas con algún organismo para fijar nitrógeno, por ejemplo especies de arqueobacterias, *Clostridium* spp. y *Paenibacillus* spp. De hecho, algunas de estas bacterias no se asocian a otros organismos, por lo que se conocen como fijadoras de vida libre. Otras diazótrofes se encuentran formando asociaciones con plantas pero esto no es requisito para fijar nitrógeno, como las especies del género *Azospirillum* y la acetobacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*. En estos casos, la caña de azúcar y otras plantas de zonas cálidas son los hospederos mayoritarios pero sin la especificidad característica de las leguminosas. Estos microorganismos son fijadores claros en microaerobiosis, favoreciendo un mayor desarrollo de las plantas infectadas. La producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal (fitohormonas) parece ser, por lo menos en el caso de *Azospirillum*, la causa del efecto beneficioso encontrado cuando se usa como inóculo de la caña de azúcar o maíz. Puede considerarse más que fijador un PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), grupo que involucra microorganismos con la capacidad de producir fitohormonas, sideroforos y compuestos que como el ácido salicílico parecen inducir una resistencia sistémica en la planta contra patógenos. Las cianobacterias, algas fijadoras que pueden formar asociaciones muy interesantes con helechos, contribuyen también de forma

substantial al conjunto total del nitrógeno fijado, siendo esta contribución especialmente relevante en ciertos hábitats



Nódulos de *Rhizobium* en leguminosas

La importancia de la fijación biológica de nitrógeno no deriva solamente de su contribución a la nutrición de las plantas, sino también porque contrarresta el nitrógeno combinado que pasa a la atmósfera por desnitrificación, actividad microbiana muy importante en suelos poco aireados. Aunque todos los organismos y sistemas fijadores son aprovechados en agricultura, hay algunos más útiles por su eficiencia del proceso, por los niveles de nitrógeno que incorporan y por su asociación con cultivos de interés agrícola. Los sistemas potencialmente más útiles implican un hospedero con el que la bacteria establece la asociación beneficiosa.

Entre ellos, un sistema recoge lo que se llaman rizocenosis asociativas, por no formarse en la asociación microbio-planta estructuras especializadas en las raíces. Entre estas asociaciones se encuentra la formada por plantas C4 del tipo maíz o caña de azúcar y las

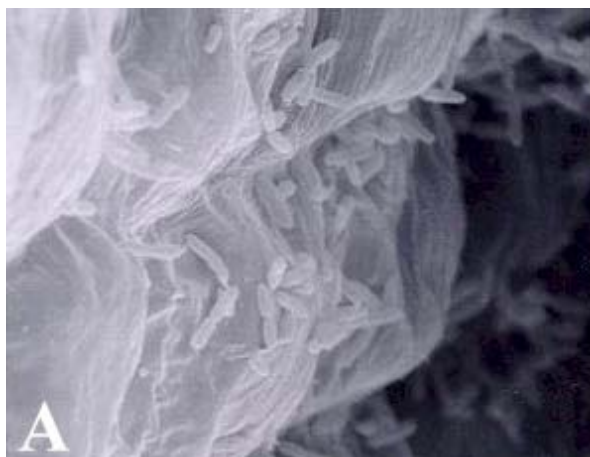
bacterias *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum* o *Azospirillum*. Aquí la bacteria fija nitrógeno a expensas del exudado radical que aprovecha muy bien al colonizar los espacios intercelulares del cortex de la raíz. Aunque estas asociaciones han dado mucho que hablar, pues se ha asociado siempre la mayor producción vegetal a la fijación de N₂, por lo menos, en el caso de *Azospirillum*, está demostrado que el efecto beneficioso de la asociación es debido mayoritariamente a la capacidad que posee la bacteria de producir fitohormonas que determinan un mayor desarrollo del sistema radical y, por tanto, la posibilidad de explorar un volumen más amplio de suelo. Así como *Rhizobium* está evolutivamente especializado en proporcionar nitrógeno a la planta cuando se encuentra asociado a ella (las formas bacterianas que fijan nitrógeno en los nódulos, los llamados bacteroides, no se multiplican por lo que todo el nitrógeno fijado es traspasado al hospedero), el N₂ que fijan estas otras bacterias no es exportado y solamente puede ser aprovechado después de su muerte y lisis y una vez que haya sido mineralizado. El caso de *G. diazotrophicus*, descubierto después que *Azospirillum*, presenta su utilidad como PGPRs (rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal)

ACETOBACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO EN CAÑA DE AZÚCAR

Las acetobacterias son un grupo de microorganismos gramnegativos, en donde la mayoría de los géneros soportan altas concentraciones de sacarosa y sus componentes, glucosa y fructosa. Son capaces de crecer en presencia de ácido acético, produciendo acidificación cuando crecen en presencia de etanol. Actualmente la familia Acetobacteraceae está conformada por los géneros *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* y *Kozakia*. Muy posiblemente las acetobacterias son de las bacterias

más difundidas en ambientes relacionados con plantas, tan sólo del año 2000 a la fecha se han descrito 13 nuevas especies y dos nuevos géneros procedentes de distintos ambientes.

Entre las acetobacterias existen especies fijadoras y no fijadoras, pero de todas ellas se tiene muy poco conocimiento de su ecología. Así, no se sabe qué papel desempeñan cuando se desarrollan en las superficies de las plantas (epífitas) o en su interior (endófitas). En la familia de las acetobacterias hasta la fecha sólo se han detectado fijadores de nitrógeno en un género. Estos fijadores son las especies *Gluconacetobacter diazotrophicus* (anteriormente *Acetobacter diazotrophicus*), *G. azotocaptans* y *G. johannae*. Un indicio de su probable papel en la naturaleza lo han dado algunos experimentos de inoculación en caña de azúcar. En dichos experimentos se ha observado que las actividades de fijación de nitrógeno y de producción bacteriana de una fitohormona podrían tener un efecto de incremento de biomasa de la planta.



Fotografía electrónica del tallo de caña de azúcar colonizado por *Acetobacter diazotrophicus*.

Se ha demostrado que al menos en ciertos cultivares de caña de azúcar la inoculación de ciertos genotipos de *G. diazotrophicus* provocaron un importante aumento de biomasa en la planta. También en experimentos de inoculación de esta bacteria en caña de azúcar se observó que una vez en el interior de la planta, la bacteria colonizó conductos del xilema de tallo y hojas y probablemente el floema. Aunque no se ha demostrado cómo *G. diazotrophicus* coloniza distintos tejidos de la planta, la colonización de xilema sugiere que el mismo puede constituir una vía de movilización de la bacteria. La colonización y el establecimiento de *G. diazotrophicus* en la caña de azúcar son afectados por la concentración de nitrógeno disponible en un sustrato o en el suelo. La diversidad genética de las cepas de *G. diazotrophicus* asociadas a caña de azúcar es limitada si se compara con la de otros organismos, esta baja diversidad se relaciona con el hecho de que *G. diazotrophicus* es una bacteria endófito. Este organismo mantiene una tasa baja de intercambio genético a nivel genómico global, sin embargo aún no se han realizado estudios para conocer cómo se comportan a este respecto regiones limitadas de su genoma.

LA APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTES

El término biofertilizante se define como la utilización de microorganismos vivos para mejorar el crecimiento de las plantas, que mejoran su nutrición por una mayor disponibilidad de los nutrientes requeridos y por la producción de fitohormonas. También se utilizan los términos biocontrol y biorremediación cuando con la inoculación de microorganismos se busca incrementar la respuesta defensiva de la planta a patógenos o eliminar compuestos xenobióticos del medio. Para lograr una mayor eficiencia con la aplicación de los biofertilizantes, se deben tomar en cuenta las características del suelo,

como la acidez, textura, compactación, aireación, sequía, etc. ya que influyen en la persistencia de los microorganismos.

La importancia en la adición o inoculación del suelo con bacterias fijadoras estriba en que suelos en condiciones naturales, con pocas bacterias presentes, la infección de la planta se ve reducida y el rendimiento del cultivo no logrará superar el 40 por ciento potencial. Con la inoculación con cepas efectivas se puede llegar hasta el 80 por ciento y el 20 por ciento restante sólo se obtendrá con manipulación genética y el manejo adecuado de la asociación. Los intentos de utilizar fertilizante nitrogenado para incrementar el rendimiento, aparte del costo económico que tienen, pueden inhibir el establecimiento de una asociación efectiva y el aprovechamiento del nitrógeno, ya que la FBN se ve afectada por la presencia de nitrógeno combinado en el medio. La aplicación de nitrógeno en forma de nitrato o amonio puede provocar un alargamiento del ciclo vegetativo y disminuir drásticamente la cosecha. El suministro continuo de nitrógeno derivado de la fijación va cubriendo las necesidades del cultivo, por lo menos hasta el inicio del período reproductivo, cuando el fotosintetizado se dirige al llenado del fruto.

Los biofertilizantes deben de estar constituidos por cepas seleccionadas por su alta capacidad infectiva y competitiva (posibilidad para colonizar en presencia de las cepas nativas normalmente menos funcionales), y por su capacidad para fijar nitrógeno con la especie vegetal correspondiente. En todos los inoculantes sería además deseable que las cepas que los constituyen tengan alguna estrategia que impida la transferencia genética horizontal para salvaguardar la biodiversidad de la microbiota del medio y tolerar condiciones adversas en el medio como la salinidad, sequía, pH bajo, presencia de pesticidas, etc.

Uno de los países donde se tienen mayores experiencias en el uso de biofertilizantes en caña de azúcar es Cuba, lográndose suplir hasta un 50% de las necesidades de nitrógeno del cultivo.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

CABALLERO-MELLADO, J. Y MARTÍNEZ-ROMERO, E.,1994. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*, Appl. Environ.Microbiol.,vol.60,pp.1532-1537.

CABALLERO-MELLADO, J., FUENTES-RAMÍREZ, L. E., REIS, V. M. Y MARTÍNEZ-ROMERO, E.,1995. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group, Appl. Environ. Microbiol., vol. 61, pp. 3008-3013.

CAVALCANTE, V. A. Y DÖBEREINER, J. A.1988. new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane, Plant Soil, vol. 108, pp. 23-31.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E., CABALLERO-MELLADO, J., SEPÚLVEDA, J., Y MARTÍNEZ-ROMERO, E.1999. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization, FEMS Microbiol. Ecol., vol. 29, pp. 117-127.

JAMES, E. K., REIS, V. M., OLIVARES, F. L., BALDANI, J. I. Y DÖBEREINER, J., 1994 Infection of the sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*,J.Exp.Bot.,vol.45,pp.757-766.

JIMÉNEZ-SALGADO, T., FUENTES-RAMÍREZ, L. E., TAPIA-HERNÁNDEZ, A., MASCARÚA-ESPARZA M. A., MARTÍNEZ-ROMERO, E. Y CABALLERO-MELLADO, J.1997., *Coffea arabica* L., new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and

isolation of other nitrogen fixing acetobacteria. Appl. Environ. Microbiol., vol. 63, pp. 3676-3683.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Y CABALLERO-MELLADO, J.1996., *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity, Crit. Rev. Plant Science, vol. 15, pp. 113-140.

ROLDÓS, J.; F. GONZÁLEZ; MARLÉN PÉREZ; E. GARCÍA; J. HERNÁNDEZ; A. GIL Y A. MENÉNDEZ. 1992. La aplicación de biopreparados a base de *Azospirillum* y su efecto sobre la productividad de la caña de azúcar. Resúmenes del I Taller Internacional sobre biofertilizantes en los Trópicos, La Habana, 127p.

SEVILLA, M., DE OLIVEIRA, A., BALDANI, I. Y KENNEDY, C.1998., Contributions of the bacterial endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition: a preliminary study, Symbiosis, vol.25, pp.181-196.

SIEVERS, M., LUDWIG, W. Y TEUBER, M. 1994. Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodopila* and *Acidiphilium* species as a branch of acidophilic bacteria in the a-subclass of Proteobacteria based on 16S ribosomal DNA sequences, Syst. Appl. Microbiol., vol.17, pp.189-196.

SWINGS, J.1992. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*, en The prokaryotes, A. Ballows, H. Trüper, M. Dworkin, W. Harder y K.-H. eds., Schleifer Springer Verlag, 2da. ed., cap.3, vol.3, Berlín, pp.2268-2286.

TAPIA-HERNÁNDEZ, A., JIMÉNEZ-SALGADO, T., BUSTILLOS-CRISTALES, R., CABALLERO-MELLADO, J. Y FUENTES-RAMÍREZ, L. E.2000. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants, Microb. Ecol., vol. 39, pp. 49-55.