

FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO: UNA FORMA SOSTENIBLE DE PRODUCIR ALIMENTOS

por ROSA M. ESQUINAS-ARIZA, ÁNGELA ROMÁN Y MANUEL MATAMOROS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL, ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE AULA DEI, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES

CIENTÍFICAS, AVENIDA MONTAÑANA 1005, 50059 ZARAGOZA, ESPAÑA

RESQUINAS@EEAD.CSIC.ES; AROMAN@EEAD.CSIC.ES; M.MATAMOROS@CSIC.ES

Resumen: El nitrógeno gaseoso o dinitrógeno (N_2) constituye aproximadamente el 78 % del aire, pero no puede ser utilizado por la mayoría de los organismos. Solamente las formas oxidadas como el nitrato (NO_3^-) o las reducidas como el amonio (NH_4^+) son asimilables por las plantas. Un gran número de leguminosas son capaces de establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en el suelo, conocidas genéricamente como rizobios, lo que les permite reducir el N_2 a amonio en los nódulos. La fijación biológica del nitrógeno puede ser una alternativa al uso de fertilizantes industriales, cuya producción es muy costosa y conlleva múltiples problemas medioambientales, como la emisión de gases que causan el efecto invernadero y la contaminación de los suelos y del agua.

Abstract: Nitrogen gas or dinitrogen (N_2) represents about 78 % of air but cannot be used by most organisms. Only the oxidized forms like nitrate (NO_3^-) or the reduced forms like ammonium (NH_4^+) can be assimilated by plants. Many legumes can establish symbiotic relationships with soil nitrogen-fixing bacteria, collectively known as rhizobia, which allows them to reduce N_2 to ammonia in nodules. Biological nitrogen fixation may be an alternative to the use of industrial fertilizers, which are costly to produce and cause numerous environmental problems such as the greenhouse effect and soil and water pollution.

Palabras clave: Leguminosas, fijación de nitrógeno, rizobio, endosimbiosis, nitrogenasa, fertilizantes

Keywords: Legumes, nitrogen fixation, rhizobium, endosymbiosis, nitrogenase, fertilizers

El nitrógeno, un elemento esencial para la vida

La atmósfera está compuesta principalmente por nitrógeno (78 %) y oxígeno (21 %) y, en menor cantidad, otros gases como el argón (0,93 %) y el dióxido de carbono (0,04 %). El nitrógeno es un elemento crucial para los seres vivos debido a que forma parte de las proteínas, los ácidos nucleicos, algunas hormonas y metabolitos secundarios, y biomoléculas tan importantes como la clorofila. Sin embargo, el nitrógeno es un nutriente limitante en los ecosistemas debido a que se encuentra en la atmósfera en forma de gas inerte. La molécula de N_2 posee un triple enlace muy estable (figura 1), por lo que su conversión a compuestos asimilables requiere mucha energía. Estos compuestos asimilables son principalmente el nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+).



Figura 1. El nitrógeno molecular o dinitrógeno (N_2) es una molécula formada por dos átomos de nitrógeno unidos mediante un enlace covalente triple. Ambos átomos comparten 3 de sus 5 electrones de valencia.

¿Cómo incorporan los organismos el nitrógeno?

Se cree que, en los orígenes de la vida, el N_2 se fijaba en forma de óxidos de nitrógeno principalmente por la acción de tormentas eléctricas (Mathesius, 2022). Sin embargo, hace aproximadamente de 3500 a 2200 millones de años la demanda de nitrógeno superó el suministro por fuentes abióticas (Navarro-González,

2001), lo que supuso un proceso clave en la evolución de la vida en la Tierra. Algunos microorganismos adquirieron entonces la capacidad de combinar el N₂ con oxígeno o hidrógeno para dar lugar a nitrato, amonio y otras moléculas asimilables por los seres vivos. Este proceso se denomina fijación biológica de nitrógeno, y los organismos capaces de realizarla se conocen como diazótrofos. Pueden ser bacterias de vida libre o en asociaciones simbióticas. Entre estas últimas se encuentran varios géneros de cianobacterias, actinobacterias y rizobios (Aparicio-Tejo, 2008). Todas estas bacterias fijadoras de nitrógeno proporcionan amonio para la formación de aminoácidos a una gran variedad de organismos marinos y terrestres, desde organismos unicelulares hasta animales y plantas. Las cianobacterias son capaces de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno en ausencia y presencia de oxígeno, además, algunas de ellas (*Nostoc*, *Anabaena*) son capaces de establecer simbiosis con algunos hongos y plantas (como la azolla). Otros diazótrofos, como el actinomiceto *Frankia*, fijan nitrógeno en simbiosis con las raíces de árboles y arbustos, conocidos como plantas actinorrícticas. Los rizobios se asocian con plantas leguminosas.

Las leguminosas como artífices de la fijación

Dentro de las plantas que establecen simbiosis fijadoras de nitrógeno se encuentra la familia de las leguminosas (Fabaceae o Leguminosae). El primer fósil encontrado de esta familia data de hace 64 millones de años (Brea *et al.*, 2008). Tras el impacto del cometa Chicxulub, que causó cambios climáticos globales y extinciones masivas hace alrededor de 66 millones de años (Renne *et al.*, 2013), las leguminosas evolucionaron rápidamente. Se produjeron sucesivas duplicaciones del genoma, lo que ha permitido su diversificación (Koenen *et al.*, 2021). Las leguminosas (figura 2) son plantas ampliamente extendidas por prácticamente todos los ecosistemas, desde los bosques tropicales hasta las regiones semiáridas (Sprent *et al.*, 2017). Son capaces de asociarse, en un proceso de endosimbiosis, con los rizobios del suelo para mejorar la disponibilidad de nitrógeno (Bhatla y Lal, 2018). A cambio, la planta proporciona a la bacteria energía en forma de ácidos orgánicos derivados de la sacarosa y un ambiente óptimo para la fijación biológica del nitrógeno. Este intercambio ocurre en unos órganos asociados a la raíz, llamados nódulos (figura 3).



Figura 2. Tipos de legumbres.

La diversidad de las leguminosas y su amplia distribución en sistemas agrícolas de todo el planeta es un reflejo de la variedad de productos que se obtienen de ellas. Las semillas son una fuente de nutrientes que aporta el 30 % de proteínas de consumo humano y las hojas son pasto para los animales. Además, las leguminosas se utilizan en cultivos rotacionales y para producir biocombustibles, aceites, especias, madera, pigmentos, fármacos y compuestos antimicóticos o bactericidas que se pueden usar para controlar las enfermedades causadas por algunos hongos y otros patógenos (Lewis *et al.*, 2005). Pero ¿cómo se forman los nódulos? Cuando escasea el nitrógeno en el suelo, las leguminosas emiten señales específicas (desde el punto de vista químico son flavonoides) que atraen a los rizobios de vida libre hacia la raíz. A su vez, el rizobio libera factores de nodulación (factores Nod) que desencadenan una cascada de señales (figura 4A). Se produce así la curvatura de algunos pelos radicales, lo cual permite que los rizobios entren en la raíz a través de un cordón o canal de infección formado por invaginación de la pared celular y de la membrana plasmática. La infección provoca una rápida división de las células de la raíz, cuyo resultado final es la formación del nódulo (Kondorosi *et al.*, 2013).

Durante la infección, se liberan las bacterias (rizobios) en el citoplasma de las células de la raíz, dentro de un nuevo orgánulo denominado simbiosoma. Este está rodeado por una membrana de origen vegetal, a través de la cual tiene lugar el intercambio de nutrientes. Al mismo tiempo, las bacterias experimentan una diferenciación morfológica y funcional que las convierte en bacteroides o formas fijadoras de nitrógeno,

lo que les permite adaptarse a las condiciones de baja concentración de oxígeno en el nódulo (figura 4B).



Figura 3. Nódulos en la raíz de una planta leguminosa (*Lotus japonicus*).

Los bacteroides llevan a cabo la fijación biológica de nitrógeno por acción del complejo enzimático nitrogenasa. Este complejo está constituido por dos metaloproteínas (una ferroproteína y una molibdoferroproteína) y es capaz de reducir el N_2 a amonio con el aporte de energía suministrado por la planta. Para evitar la inactivación de la nitrogenasa, que es muy sensible al oxígeno, en el citoplasma de las células infectadas se mantienen condiciones de hipoxia mediante varios mecanismos. Uno de ellos es la abundancia de leghemoglobina, una proteína parecida a la hemoglobina de la sangre que se une al oxígeno con gran afinidad y a la que se debe el característico color rojizo de los nódulos (figura 3).

¿Es la fijación de nitrógeno una alternativa a la fertilización?

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso vital en los ecosistemas y en la agricultura moderna. Debido a la poca cantidad de nitrógeno disponible en los suelos, la conversión del N_2 a formas asimilables resulta fundamental para cubrir las necesidades que tienen las plantas y todos los seres vivos. De manera industrial, el amonio se produce mediante la reacción de Haber-Bosch, en la cual el N_2 es reducido a amoníaco (NH_3). Se requieren unas condiciones de

temperatura y de presión muy altas (400-500 C y 150-300 atm) para lograr romper el enlace $N≡N$. La mayor parte de este nitrógeno asimilable está destinado a la producción de fertilizantes, cuyo uso masivo conlleva un gran consumo de combustibles fósiles, la emisión de gases de efecto invernadero, el aumento de los riesgos de contaminación del agua por el exceso de nitratos, y la eutrofización de ríos y lagos (Sutton *et al.*, 2011). Una manera de reducir la producción industrial de fertilizantes nitrogenados pasaría por la fijación biológica de nitrógeno por la simbiosis entre el rizobio y la leguminosa. Muchas de estas plantas son cultivos ampliamente utilizados porque necesitan muy poco fertilizante, ya que los rizobios pueden fijar el nitrógeno en los nódulos. Utilizadas en rotación, las leguminosas sirven de abono para los cultivos posteriores, ya que parte del nitrógeno fijado permanece en el suelo.

La fijación biológica de nitrógeno aporta múltiples beneficios:

1. Mayor disponibilidad de nitrógeno: la simbiosis rizobio-leguminosa fija anualmente entre 40 y 60 millones de toneladas de nitrógeno en los campos de cultivo, a las que hay que sumar otras 3 a 5 millones de toneladas fijadas por las leguminosas en los ecosistemas naturales.
2. Suelos más fértiles: la fijación biológica de nitrógeno enriquece el suelo con nitrógeno asimilable, lo que beneficia tanto a las leguminosas cultivadas como a las plantas que crecen a su alrededor.
3. Beneficios económicos y ambientales al reducir el uso de fertilizantes nitrogenados industriales.
4. Suelos más sanos y sostenibilidad a largo plazo de los sistemas agrícolas al reducir el aporte externo de nitrógeno. Esto es importante también para la rotación de cultivos donde antes hayan crecido leguminosas.
5. Impacto positivo en la comunidad de microrganismos del suelo, ya que algunos establecen una interacción beneficiosa con los rizobios.
6. Resistencia al estrés ambiental: la fijación biológica de nitrógeno proporciona una fuente constante de nitrógeno esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, lo que las hace más resistentes a estreses ambientales como la sequía o la salinidad.

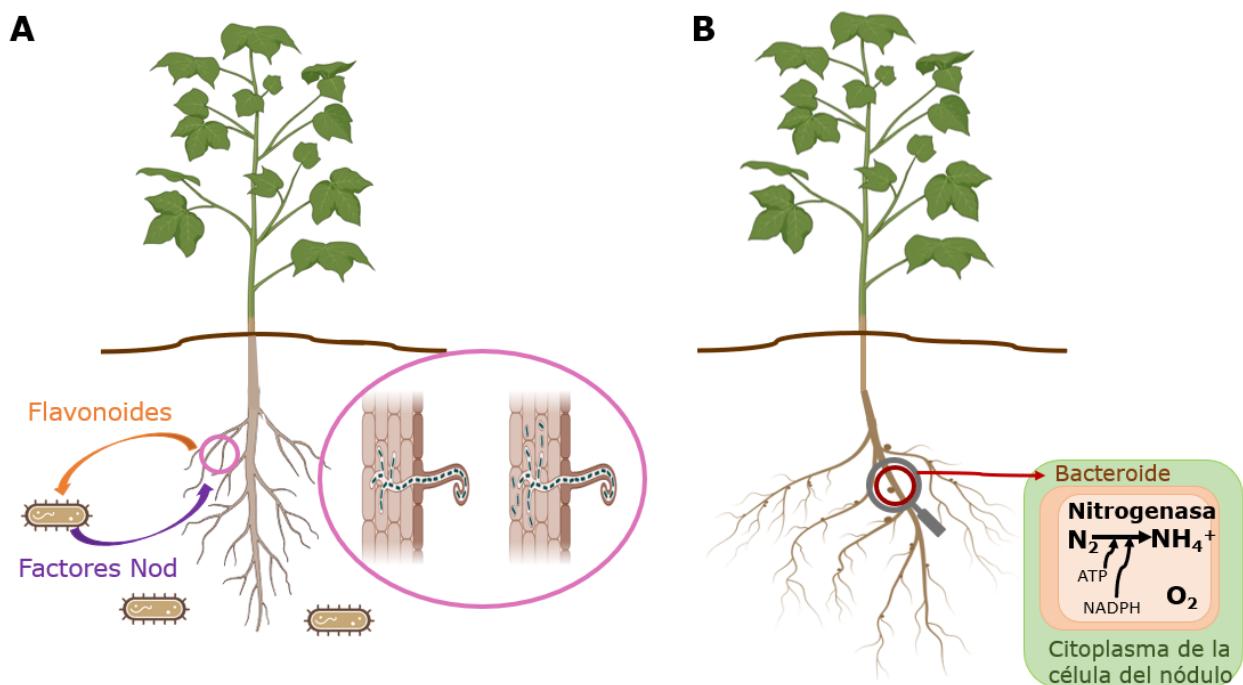


Figura 4. Interacción entre la leguminosa y el rizobio. **A)** Las señales específicas entre la leguminosa y el rizobio dan lugar a cambios morfológicos y metabólicos para promover la formación del nódulo. **B)** Como consecuencia, los rizobios se diferencian a bacteroides, estructuras donde se produce la fijación de nitrógeno atmosférico gracias a la actividad del complejo enzimático nitrogenasa.



Figura 5. Beneficios de la fijación biológica de nitrógeno en las leguminosas. En el sentido de las agujas del reloj: mejora de la productividad agrícola, disminución del uso de fertilizantes nitrogenados, interacción beneficiosa entre microorganismos del suelo, aumento de la resistencia a estreses abióticos. Este proceso permite un avance hacia sistemas agrícolas más sostenibles (imagen central).

Cómo mejorar la producción.

Con el objetivo de avanzar hacia una agricultura más respetuosa con el medio ambiente, y evitar el uso excesivo de fertilizantes minerales, los científicos están trabajando en diversas líneas de investigación

destinadas a desarrollar tecnologías con las que incorporar la fijación biológica de nitrógeno en los cultivos que no pueden establecer simbiosis con bacterias. Una estrategia, ya utilizada en la actualidad, es la “biofertilización nitrogenada”, es decir, la adición de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre al suelo para que proporcionen compuestos de nitrógeno asimilables por los cultivos. Aunque esta estrategia es interesante, influyen diversos factores en el rendimiento de la fijación de nitrógeno como pueden ser: la capacidad de supervivencia de los microorganismos añadidos al medio, el aporte a la planta del nitrógeno fijado, desplazamiento a la rizosfera de otros microorganismos perjudiciales para la planta, etc. Además, los biofertilizantes son específicos de cada especie o variedad, por lo que no existe un biofertilizante universal para todos los cultivos. Otra estrategia es el uso de bacterias modificadas, como *Xanthobacter autotrophicus*, que poseen la enzima nitrogenasa, pero carecen de una fuente de hidrógeno para sintetizar amonio. La modificación de estos organismos consiste en proporcionarles el hidrógeno necesario para que puedan producir amoniaco una vez añadidos a las plantas (Liu *et al.*, 2017). Una tercera estrategia sería generar cereales que expresen componentes clave de la nitrogenasa en las mitocondrias o en los cloroplastos para que puedan fijar el nitrógeno at-

mosférico directamente en el interior de las células de las plantas (López-Torrejón *et al.*, 2016). Asimismo, otros grupos están estudiando las bases genéticas de la simbiosis para poder transferirla a otros cultivos de interés agronómico, principalmente los cereales

(Stokstad, 2016). Estos esfuerzos pretenden que la fijación biológica de nitrógeno contribuya en el futuro a reducir el uso de fertilizantes químicos y al desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles.

Referencias

- [1] Aparicio-Tejo, P.M., Arrese-Igor, C. and Becana, M. (2008). Fijación biológica de nitrógeno. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid. pp. 305-322.
- [2] Bhatla, S.C. and Lal, M.A. (2018). *Plant Physiology, Development and Metabolism*.
- [3] Brea, M., Zamuner, A., Matheos, S., Iglesias, A., and Zuccol, A. (2008). Fossil wood of the Mimosoideae from the early Paleocene of Patagonia, Argentina. *Alcheringa*, 32: 427-441.
- [4] Koenen, E.J.M., Ojeda, D.I., Bakker, F.T., Wieringa, J.J., Kidner, C., Hardy, O.J., Pennington, R.T., Herendeen, P.S., Bruneau, A. and Hughes, C.E. (2021). The origin of the legumes is a complex paleopolyploid phylogenomic tangle closely associated with the Cretaceous-Paleogene (K-Pg) mass extinction event. *Systematic Biology*, 70: 508-526.
- [5] Kondorosi, E., Mergaert, P., and Kereszt, A. (2013). A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of rhizobium bacteria provoked by host plant factors. *Annual Review of Microbiology*, 67: 611-628.
- [6] Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M., (2005). Legumes of the World. *The Royal Botanical Gardens, Kew*.
- [7] Liu C, Sakimoto KK, Colón BC, Silver PA, Nocera DG (2017). Ambient nitrogen reduction cycle using a hybrid inorganic biological system. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 6450-6455.
- [8] López-Torrejón, G., Jiménez-Vicente, E., Buesa, J., Hernández J.A., Verma, H.K., Rubio L.M. (2016). Expression of a functional oxygen-labile nitrogenase component in the mitochondrial matrix of aerobically grown yeast. *Nat Commun* 7, 11426.
- [9] Mathesius, U. (2022). Are legumes different? Origins and consequences of evolving nitrogen fixing symbioses. *Journal of Plant Physiology* 276, 153765.
- [10] Navarro-González R., McKay C.P. and Mvondo D.N. (2001). A possible nitrogen crisis for Archaean life due to reduced nitrogen fixation by lightning. *Nature* 412: 61-64.
- [11] Renne, P. R., Deino, A. L., Hilgen, F. J., Kuiper, K. F., Mark, D. F., Mitchell, W. S., Morgan, L. E., Mundil, R., and Smit, J. (2013). Time scales of critical events around the Cretaceous-Paleogene boundary. *Science* 339: 684-687.
- [12] Sprent, J.I., Ardley, J. and James, E.K. (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist* 215: 40-56.
- [13] Stokstad, E. (2016). The nitrogen fix. *Science* 353: 1225-1227.
- [14] Sutton, M.A., Oenema, O., Erisman, J. W., Leip, A., van Grinsven, H., and Winiwarter, W. (2011). Too much of a good thing. *Nature* 472: 159-161.