



*IMPORTANCIA Y FUNCIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE
NITRÓGENO (FBN) EN EL CULTIVO DE LA SOYA*

IMPORTANCIA Y FUNCIÓN DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO (FBN) EN EL CULTIVO DE LA SOYA

*Ing. Agr. José Eduardo Abela Gisbert
jose@fertimax.com*

El crecimiento de todos los organismos está determinado por la disponibilidad de nutrientes minerales, cabe resaltar dentro de estos últimos la participación del nitrógeno (N) al ser uno de los elementos esenciales para la vida. La importancia del nitrógeno se evidencia en la demanda de grandes cantidades del mismo como un componente esencial, sobre todo, de las proteínas y los ácidos nucleicos. Estas moléculas gigantes, propias de los organismos vivos, son las responsables de la conservación de la información genética, de su transmisión y de su transformación en hojas, tallos, raíces y en otros órganos funcionales.

En la agricultura, el nitrógeno es el principal nutriente para el crecimiento de las plantas. Cuando la planta

tiene suficiente nitrógeno sus hojas y tallos crecen rápidamente, en cambio la deficiencia del mismo origina la clorosis en las hojas (amarillamiento) a partir de la base, y la falta de desarrollo y debilidad de todas las partes de la planta. En los suelos pobres o carentes de nitrógeno los rendimientos de los cultivos son bajos.

DEMANDA DE NITRÓGENO POR EL CULTIVO DE SOYA

La soya es una leguminosa cuyo grano tiene un alto contenido de proteína, entre 37 y 45% de su peso, esta es una de las razones por las que se la considera como cultivo altamente demandante de nitrógeno. Con la misma cantidad de nitrógeno



requerido por la soya, se podría producir una doble cantidad de girasol, una triple cantidad de sorgo o trigo, cuatro de maíz y cinco de arroz.

LA DEMANDA DE NITRÓGENO EN NÚMEROS

Las diversas publicaciones indican una exportación del campo de 50 a 60 kg de nitrógeno por tonelada de grano; o también que para producir una tonelada de grano se requerirían alrededor de 80 kg de nitrógeno, 50 de los cuales se exportarían en el grano y 30 quedarían en los residuos.

El cultivo de soya cubre su demanda de nitrógeno balanceando el nitrógeno presente en la solución salina del suelo (proveniente de la descomposición de la materia orgánica o de los fertilizantes) con el nitrógeno fijado biológicamente (FBN) por las bacterias presentes en los nódulos radiculares.

Como la FBN representa para la planta un gasto de energía mayor que la asimilación de amonio o nitratos disueltos en el agua del suelo, ante la abundancia de estos últimos la FBN deja de ser importante. De hecho, existe un proceso regulador que interrumpe la FBN ante la presencia de tenores altos de nitrógeno de fácil asimilación. En términos prácticos la situación permite la recomendación de no aplicar más de 20 kg de N por hectárea, como fertilización de base, de lo contrario se activaría el bloqueo de la FBN, desperdiciando sus beneficios. Lo expuesto explica, en parte, la poca respuesta a la inoculación en suelos de alta fertilidad.

FUENTES DE NITRÓGENO

SUELO: Los suelos de Bolivia son muy variables en sus características físicas y químicas. Estas variaciones son más notorias en los suelos de origen aluvial de Santa Cruz, sobre los que descansa la producción de soya. Por esto las generalidades que se presentan, necesarias para exponer conceptos y criterios en esta publicación, no deben tomarse como base de recomendaciones; estas últimas deben referirse a las condiciones específicas de cada explotación.

Para las plantas, el nitrógeno del suelo es la fuente principal de abastecimiento, sin embargo se trata de una fuente agotable que disminuye en cantidad

por la extracción del nutriente, ocurrida durante las cosechas sucesivas. El nitrógeno, casi en su totalidad, se encuentra formando parte de la materia orgánica (MO) y asociado a los minerales de la arcilla; menos del 0.1%, que se encuentra en formas disponibles como el nitrato y el amonio intercambiable (N-disponible), que son las formas en que lo aprovechan las plantas.

Los resultados de los análisis de suelo están expresados por lo general en % de materia orgánica o en % de nitrógeno total (N-total). Se puede evidenciar que el N-total fluctúa alrededor del 5% de la materia orgánica. La relación no es directa porque los resultados surgen de diferentes métodos de análisis a los que se somete la muestra de suelo.

Es importante aclarar que, no existe una conversión directa de los resultados de los análisis a N-disponible. En esta conversión influyen tanto la textura del suelo como otros factores que afectan los procesos microbiológicos: población microbiana del suelo, tipo de materia orgánica, aireación, humedad y temperatura. Para Bolivia se ha establecido que, en general, entre el 1 y 2% del N-total es N-disponible para que lo puedan absorber las plantas durante su ciclo vegetativo.

A modo de ejemplo, vamos a referirnos a los resultados de los análisis de suelos realizados en campos sojeros de la zona norte del departamento. Los mismos muestran que el 70 % de los suelos presentan tenores moderados de materia orgánica (2.0% a 3.0%), mientras que el 30% restante presenta valores por debajo del 2 % (bajos). También muestran promedios de 0.13% de N-total para las zonas de San Pedro y Colonia Piraí, y de 0.14% para Chané.

Para responder a la pregunta ¿Qué significan los resultados de análisis de suelo en términos de N-disponible para su cultivo? tomamos, como ejemplo, un análisis de suelo de la localidad de Chané en el cual el contenido de N-total es 0.13%. Los resultados nos muestran que los suelos franco limosos, con 0.13% de N-total (representativos de la zona norte de Santa Cruz), sólo pueden suministrar a la planta 68 kg de nitrógeno, insuficientes para producir 1 tonelada de grano de soya. El hecho de que normalmente se obtengan rendimientos superiores a 1 t/ha sólo se explica

porque el cultivo toma nitrógeno de otras fuentes, además del suelo.

1 ha = 10000 m² x 0.2 m x 1.3 (a)= 2.600 TN
 2.600 TN x % N-Total (0.13 %)= 3.38 TN N-total
 N-total (3.380 kg.) x % N-disp. (2%) = 67.6 kg. de N
 a) Densidad aparente

FERTILIZANTES NITROGENADOS: Las acumulaciones de materia orgánica rica en nitrógeno, como el estiércol del ganado, la gallinaza de la industria avícola y el guano de las aves marinas son empleadas en la agricultura como abonos orgánicos naturales.

La industria de los fertilizantes se ha originado como respuesta a la necesidad de recuperar la fertilidad de los suelos cansados. Fritz Haber y Carl Bosch desarrollaron el proceso industrial que fija nitrógeno gaseoso en amoníaco a gran escala.

Actualmente, las aplicaciones de fertilizantes han

duplicado la cantidad de nitrógeno fijado que se aporta al suelo. Esta “solución” para mantener altos rendimientos origina problemas medioambientales ya que se estima que entre el 10 y el 75% del nitrógeno de los fertilizantes se pierde por lixiviado y desnitrificación. Por ejemplo, si se aplica 174 kg de urea se oferta al cultivo los 80 kg de N que necesitaría para producir 1 tonelada de soya, pero se debe considerar que, de acuerdo a diversos estudios, en una aplicación de urea sólo el 50 % de la misma es aprovechada por el cultivo.

AIRE: Constituye una fuente inagotable de nitrógeno. Mediante la fijación biológica de nitrógeno (FBN) las plantas de soya pueden usar esta fuente de nitrógeno. Algunos trabajos publicados por EMBRAPA, el año 2001, mencionan que la cantidad de N-fijado por un cultivo de soya fluctúa entre 109 y 250 kg/ha, aclarando que son suficientes para producir entre 1.36 y 3.12 toneladas de grano de soya. Las cifras muestran que la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es la principal vía de asimilación de nitrógeno para la soya. La importancia del proceso señalado exige su desarrollo a continuación:

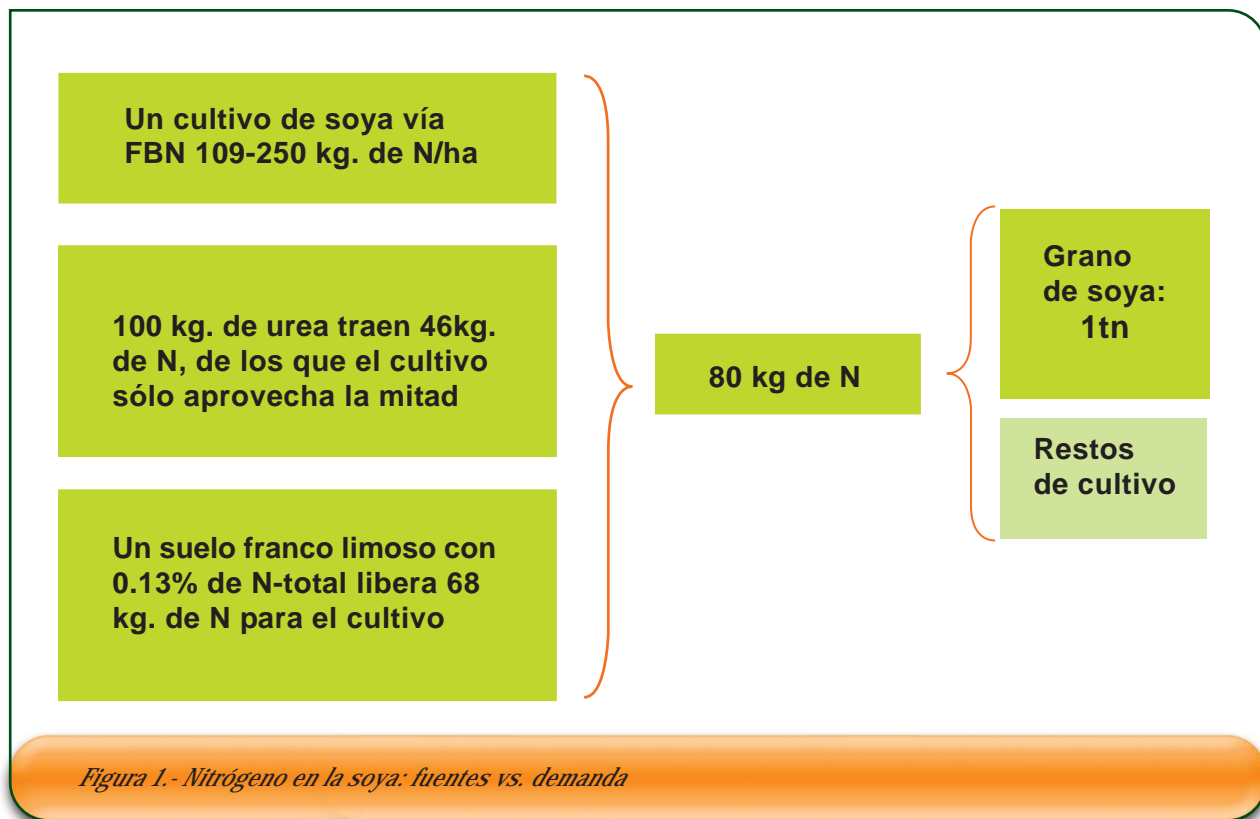


Figura 1.- Nitrógeno en la soya: fuentes vs. demanda

FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO (FBN)

Aunque empíricamente ya era aprovechada por los romanos cuando observaron el efecto beneficioso de rotar cereales con leguminosas, por lo que representa en cuanto al aporte de nitrógeno a las plantas, la FBN ha sido objeto de intensa investigación desde que fue descubierta en 1888. La fijación biológica aporta; globalmente, con la mitad del nitrógeno utilizado por los cultivos. La otra mitad procede casi en su totalidad del amonio sintetizado vía Haber Bosch, con un gasto energético que requiere del 1% de la energía consumida a nivel mundial.

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso metabólico exclusivo de algunos microorganismos que produce amonio (NH_3) a partir de gas nitrógeno (N_2) presente en el aire.

Los microorganismos capaces de fijar nitrógeno están equipados con un complejo enzimático llamado nitrogenasa, formado por la Fe-proteína y la Fe-Mo-proteína. Este complejo procesa el nitrógeno gaseoso en sucesivos ciclos que lo reducen hasta amoníaco.

La nitrogenasa de todos los organismos fijadores aparentemente es la misma, o muy similar ya que se ha logrado la fijación en sistemas de células libres (en laboratorio) donde la Fe-proteína era de una bacteria y la Fe-Mo-proteína de otra bacteria diferente.

La fijación biológica es altamente demandante de energía. En los sistemas de fijación simbiótica, como los de *Rhizobium*-leguminosa, esta energía proviene del sol, vía fotosíntesis realizada por la planta; mientras que los fijadores de vida libre como *Azospirillum*, *Azotobacter* y otros deben extraer la energía de la materia orgánica del medio, que no siempre abunda. De ahí la gran diferencia en la fijación. Se estima que los sistemas simbióticos fijan entre 75 y 300 kg de N/ha

año, mientras que los no simbióticos no superarían los 15 kg de N/ha. A pesar de estas diferencias, la fijación libre, sola, representa a nivel global algo menos de la mitad de los 200-250 millones de toneladas de N_2 fijado por año, ya que la simbiótica (aunque sea más eficiente) está limitada a unas pocas especies vegetales, entre ellas las leguminosas.

EL RIZOBIO BACTERIA DE VIDA LIBRE

Los rizobios son bacterias que promueven el crecimiento hipertrófico de las raíces de plantas leguminosas para formar un órgano nuevo llamado nódulo, en el cual habitarán para fijar nitrógeno.

Los rizobios se presentan como bacterias de vida libre: unicelulares, bacilares y flageladas, formando un grupo más de la asombrosa diversidad de microorganismos del suelo. En la actualidad, los investigadores estiman que en 100 g de suelo viven 10^9 microorganismos de 10.000 especies diferentes.



Conteos, realizados en suelos de Bolivia, dan como resultados poblaciones en el orden de 10^4 a 10^5 rizobios, por cada gramo de suelo. Los controles de calidad de los inoculantes fabricados con turba

esterilizada, que permiten la colonización total del medio por los rizobios evidencian poblaciones en los rangos 10^8 , 10^9 y ocasionalmente 10^{10} rizobios vivos, por gramo. Los controles de calidad de los inoculantes líquidos no muestran tanta variación y se sitúan más en poblaciones del orden de 10^9 rizobios por mililitro.

Las técnicas de multiplicación masiva de inoculantes generalmente llegan a los $2-5 \times 10^{10}$ rizobios por mililitro, aunque existen técnicas especiales para alcanzar $6-7 \times 10^{10}$ rizobios/ml, valor que puede considerarse como máximo para las poblaciones industriales de Bradyrhizobium.

En el caso de la soya, las cepas recomendadas para la fabricación de inoculantes son de las especies Bradyrhizobium japonicum y B. elkanii, que pertenecen al grupo de rizobios de crecimiento rápido. Las mismas, bajo condiciones no limitantes del medio, pueden duplicar su población cada 5 ó 6 horas.

Estas bacterias cuando se asocian con las leguminosas adoptan una forma más redondeada y residen en las células de los nódulos, en grupos de pocos a decenas de rizobios, aislados del citoplasma celular por una membrana propia y formando unidades conocidas como "simbiosomas".

¿CÓMO LOS RIZOBIOS DE VIDA LIBRE PASAN A RESIDIR EN SIMBIOSOMAS, EN LAS CÉLULAS DE LOS NÓDULOS?

Las interacciones rizobio-leguminosa comprenden varios procesos controlados por el intercambio de señales moleculares. Estas señales moleculares no son otra cosa más que la expresión de genes de la planta y de la bacteria que conducen la infección, el desarrollo del nódulo, la liberación de los rizobios en el interior de las células y el establecimiento funcional de la simbiosis. El porqué los rizobios sólo pueden asociarse con una determinada leguminosa y no con otras se explica por la alta especificidad de este diálogo químico.

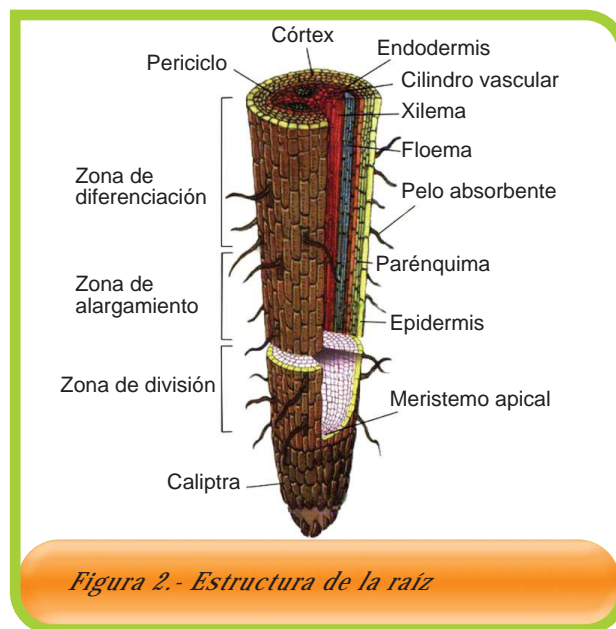


Figura 2.- Estructura de la raíz

PROCESO DE INFECCIÓN Y LAS PRIMERAS SEÑALES

La primera señal la emiten las raíces en crecimiento liberando flavonoides en la rizosfera. Estos compuestos son a menudo exudados por células de la zona de alargamiento de la raíz (ver figura 2), región que es altamente susceptible de infección por los rizobios. Guiados por las señales moleculares, los rizobios deben estar presentes en el sitio, en el momento exacto y en número suficiente para tener éxito en su intento. Se ha demostrado que las células de la zona de alargamiento son vulnerables sólo transitoriamente; si el ataque se demora entre 3 y 5 horas estas células, ya algo más viejas, no permiten la infección.

En el primer minuto las bacterias comienzan a adherirse a las raíces. Estas zonas, a la observación microscópica, muestran ya desde el primer minuto rizobios adosados a las células de la raíz, generalmente de punta. Durante la primera hora el número aumenta considerablemente. La distribución de los microorganismos no es homogénea; algunas células de la raíz están densamente cubiertas hasta por varias capas de rizobios mientras que otras tienen pocos y dispersos o ninguno. Esto indica una participación activa de los rizobios, primero para moverse hacia la raíz y luego para dirigirse preferentemente a ciertas células, en las cuales intentarían el asalto.

Durante las primeras 12 horas ocurre una severa curvatura de los pelos radiculares. Aun por fuera de la célula y en respuesta a las señales de la raíz, los rizobios comienzan a sintetizar y a excretar compuestos conocidos como factores-Nod, algunos de los cuales inducen la deformación de los pelos radiculares. El pelo afectado crece muy poco y con la punta totalmente doblada sobre si mismo. Transcurridas 24 horas se aprecia el inicio de la formación del hilo de infección, el que tarda 24 horas en construirse hasta la base del pelo radicular. Los rizobios entran a través de las perturbaciones en la pared celular de los extremadamente deformados pelos radiculares, donde son rodeados por una estructura tubular. Se trata del llamado hilo de infección, que los guiará a través del pelo, y del cortex radicular, hasta penetrar las células del nódulo. Para las bacterias estas estructuras son como tubos (que penetran las células, linealmente o ramificándose) por cuyo interior se desplazan.

de factores-Nod, excretados por las bacterias, se difunde alcanzando el cortex radicular (ver figura 2). Estos factores disparan cambios metabólicos en células del cortex contiguas al pelo infectado, como el aumento de su citoplasma en preparación a su división. A pesar de que las bacterias crean un gran número de puntos de infección sólo en unos pocos se consolidan los puntos de crecimiento. En estos mismos las primeras divisiones ocurren entre 12 y 24 horas después de la inoculación. Se sabe que las leguminosas cuentan con sistemas de autorregulación de nodulación que mediante señales químicas de larga distancia controlan la persistencia de la actividad meristemática, así como el tamaño y el número de nódulos, impidiendo un excesivo desarrollo nodular que pueda restar recursos para el crecimiento de la planta.

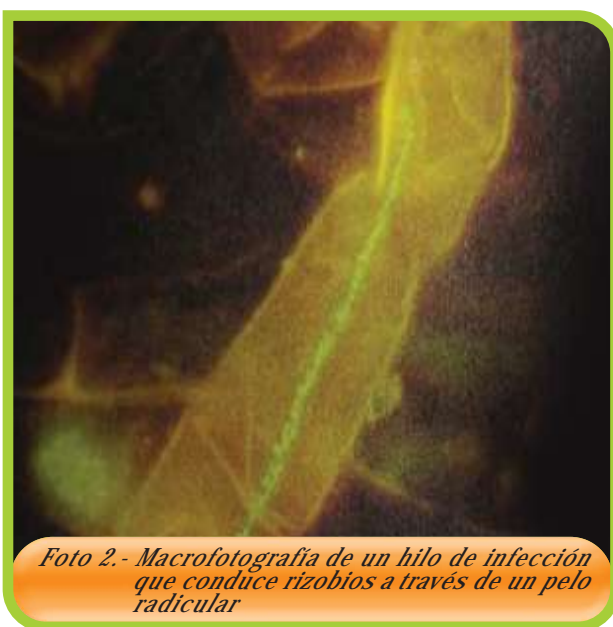


Foto 2.- Macrofotografía de un hilo de infección que conduce rizobios a través de un pelo radicular

NODULACIÓN

A los 4 días se ha formado un meristema de nódulo o punto de crecimiento. La formación del nódulo es un proceso independiente que normalmente ocurre al mismo tiempo que la infección. La iniciación de la actividad meristemática que originará el nódulo sucede con anterioridad a la deformación del pelo y la construcción del hilo de infección. Se sabe que otro grupo



Foto 3.- Deformación del cortex por inicio de actividad meristemática.

El nódulo es una estructura especializada para contener rizobios que fijan nitrógeno (foto 4). Su estructura esta internamente conectada al floema de la raíz (foto 5). Por esta vía recibe fotosintatos generados por la planta a cambio del nitrógeno fijado.



Foto 4. - Nódulo en crecimiento.



Foto 5. - Nódulo formado.

LIBERACIÓN DE LOS RIZOBIOS AL INTERIOR DE LAS CÉLULAS

El hilo de infección progresa penetrando en el meristema nodular. Inicialmente permanece extracelular para luego penetrar en los citoplasmas. Un nuevo grupo de señales permite la liberación de los rizobios desde el hilo de infección. Al momento de su liberación los rizobios son rodeados por una membrana propia que evita su contacto directo con el citoplasma de la célula, formando lo que se denomina un simbiosoma. De esta forma el

simbiosoma se constituye en elemento funcional, en el interior de la célula cuya función es la de fijar nitrógeno. Mientras no se inicie la fijación, las bacterias pueden multiplicarse en el interior de los simbiosomas hasta que se transforman en unidades fijadoras o bacteroides. Se ha sugerido que la fijación y la división celular son procesos incompatibles. De hecho, cuando se inicia el proceso de fijación cesa la división celular; el crecimiento del nódulo continúa por el agrandamiento de sus células.

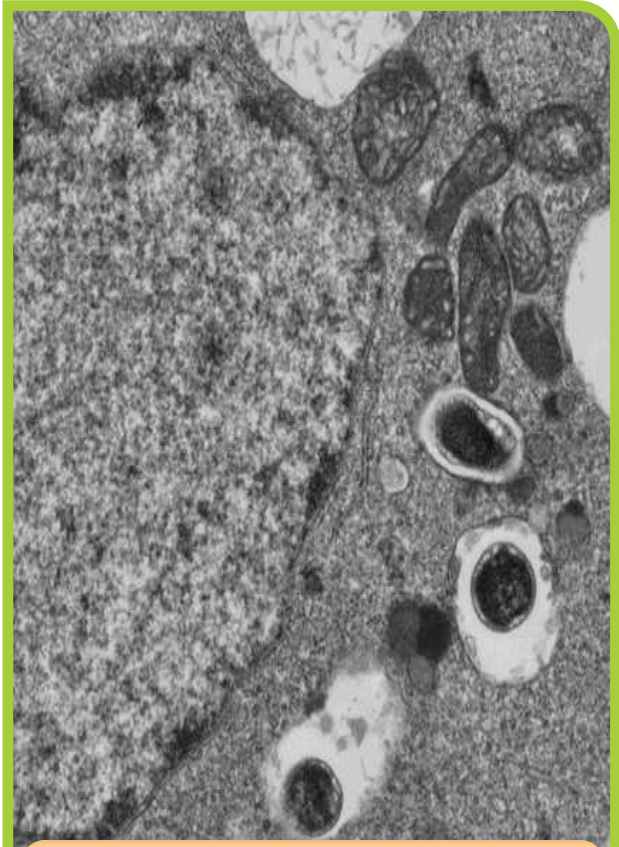


Foto 6. - Fotografía que muestra a la izquierda la mitad del núcleo celular. En el campo superior derecho 7 simbiosomas llenos de rizobios y debajo de ellos 2 hilos de infección cortados transversalmente.

El complejo enzimático (nitrogenasa) que opera la fijación de nitrógeno no funciona en presencia de oxígeno. Para que ocurra la fijación la planta debe producir Leg-hemoglobina (en el interior del nódulo), molécula que absorbe el oxígeno presente para prevenir que interfiera con el proceso de fijación. Como la Leg-hemoglobina es roja, el interior de un nódulo en fijación activa tiene color rosado.

BIBLIOGRAFÍA

- Bhuvaneswari, T. B., Bhagwat, A. A. & Bauer W. D. 1981. Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by rhizobia. *Plant Physiol.* 68: 1144-1149
- Broughon, W.J., Kobayashi H., Saad M., Marie C., Skorpil K., Staehelin C., Perret X. & Deakin W.J. 2004. Fine tuning of nodulation by complementary rhizobial signals. En: Reis V.M. & Bahia M. editors. Abstracts. 22th Latin-american conference on Rhizobiology & 1st Brazilian conference on Biological Nitrogen Fixation. RELAR 2004
- Campo R. J. & Hungria M. 2000. Compatibilidade de uso de inoculante e fungicidas no tratamento de sementes de soja. Embrapa Soja. Circular Técnica # 26.
- Ciampitti I.A. 2007. en Requerimientos y Fertilidad de Cultivos. Agrigro Fertilizantes.
- Deacon J. The microbial world: The nitrogen cycle and nitrogen fixation. www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/nitrogen.htm
- Delwiche. C.C. 1972. El ciclo del nitrógeno. En: La Biosfera. Scientific American - Alianza Editorial
- Embrapa. 2003. Tecnologías de Producto de soja Region Central do Brasil 2003. Embrapa.
- Flores R. & Aguanta G.; Editores. 2003. Guía de recomendaciones técnicas para el cultivo de soja 2003/2004. ANAPO.
- Gonzáles R. & Chincheros J. 1997. Estudios preliminares de la población microbiana en suelos de siete localidades de la zona altiplánica del Departamento de La Paz. En: Memorias de la III Reunión Nacional en Leguminosas & IV Reunión Boliviana de Rhizobiología. UMSA/ABRYL/PROSUKO/IBTEN/MAGDR.
- Hubbell D.H. & Kidder G. Biological Nitrogen Fixation. . University of Florida
- Nakasato R., Acosta M., Mitinori C., Navarro, J.C., Uriona E., Porcel M. & Cabrera J.A.; Editores. 2004. Boletín de difusión técnica de soja. FUNDACRUZ.
- Neves M.C & Franco A. 1990. Fixacao biologica e metabolismo de nitrogenio em plantas. En: I Simposio brasileiro sobre nitrogenio em plantas. UFRRJ – Departamento de solos. EMBRAPA-CNPBiologia do Solo.
- Newcomb W., Sippell D. & Peterson R. L. 1979. The early morphogenesis of Glycime max and Pisum sativum root nodules. *Canadian Journal of Botany.* Vol 57: 2603-2616.
- Oka-Kira E. & Kawaguchi M. 2006 Long-distance signaling to control root nodule number. *Curret Opinion in Plant Biology* 9:496-502
- Turgeon B. Gillian & Bauer Wolfgang D. 1982. Early events in the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. Time course and cytology of the initial infection process. *Canadian Journal of Botany,* Vol 60: 152-161.
- Valenzuela R. 2006. El cultivo de soja y sus repercusiones en Bolivia. www.fertimax.com
- Verma D.P. 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytocis of *Rhizobium*. *The Plant Cell,* Vol 4, 373-382. American Society of Plant Physiologists
- Villarroel J. 1998. Manual para la interpretación de análisis de suelos. Recomendaciones. Santa Cruz.