Gestión y sostenibilidad ambiental

Artículo de revisión

Técnicas aplicadas en la investigación agrícola para cuantificar la fijación de nitrógeno: una revisión sistemática

Techniques applied in agricultural research to quantify nitrogen fixation: a systematic review

Dania Fonseca-López,[1*] Nelson José Vivas Quila,[2] Helber Enrique Balaguera-López[3]

[1] Estudiante, Doctorado Ciencias Agrarias y Agroindustriales, Universidad del Cauca, Investigador Grupo Gibna. Popayán, Colombia. Correo: daniafo@unicauca.edu.co. Orcid: https://orcid.org/0000-0003-3877-3730
[2] Docente, Universidad del Cauca, Investigador Grupo Nutrición Agropecuaria. Popayán, Colombia. Correo: nvivas@unicauca.edu.co. Orcid: https://orcid.org/0000-0003-0165-2863
[3] Docente, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Facultad Ciencias Agropecuaria. Tunja, Boyacá. Correo: helber.balaguera@uptc.edu.co. Orcid: https://orcid.org/0000-0003-3133-0355

Editor temático: Alexander Rebolledo Roa (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA])

Fecha de recepción: 03/04/2019
Fecha de aprobación: 04/09/2019

Para citar este artículo: Fonseca-López, D., Vivas, N. J., & Balaguera-López, H. E. (2020). Técnicas aplicadas en la investigación agrícola para cuantificar la fijación de nitrógeno: una revisión sistemática. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, *21*(1), e1342

DOI: https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num1_art:1342

Esta licencia permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de la obra de modo no comercial, siempre y cuando se dé el crédito y se licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

* Avenida Central del Norte 39-115, edificio Central, tercer piso, oficina 331, Tunja, Colombia.

2020 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

Resumen

La economía del nitrógeno es un tema que viene creciendo a nivel mundial, especialmente en la actividad agrícola cuando por mal manejo de la fertilización ocurren pérdidas por lixiviación que contribuyen a la eutrofización del agua, lo que incrementa la población de algas y, como efecto, reduce la disponibilidad de oxígeno, acelerando el proceso de desnitrificación en el que se produce N_2O, conocido por su efecto en el calentamiento global. Igualmente, parte del fertilizante es emitido a la atmósfera por volatización. Esto ha impulsado la creación de técnicas que permiten cuantificar el nitrógeno utilizado por las plantas y el fijado en el suelo a través de microrganismos para hacer más eficiente el empleo del nitrógeno en los sistemas agrícolas. Sin embargo, dentro de las mayores limitantes se encuentra su sensibilidad, especificidad, costo y tecnología que se requiere para aplicarlas. Esto ha conducido a la innovación de procedimientos y a la creación de técnicas que tienen una tasa de error muy bajo. El objetivo de este trabajo fue realizar la descripción de las principales técnicas utilizadas para cuantificar la fijación del nitrógeno con énfasis en los antecedentes, procedimientos, expresiones matemáticas que se usan, y escenarios futuros. La información se describe a partir del análisis de ensayos disponibles en la base de datos Scopus. Este trabajo consolida las técnicas que continúan vigentes para cuantificar el nitrógeno y facilita entender su uso a través del tiempo con modelos de predicción, así como su importancia, ventajas y desventajas.

Palabras clave: aplicación de abonos, eutrofización, fijación del nitrógeno, isótopos, técnicas de predicción

Abstract

Nitrogen economy is a subject that is growing in popularity at the global level, especially in relation to the agricultural activity, due to nutrient leaching caused by fertilization, as it contributes to the eutrophication of water. As a result, the population of algae increases, and thus, oxygen availability is reduced by accelerating the denitrification process in which N_2O is produced, known mostly for its effect on global warming. Likewise, part of the fertilizer is emitted into the atmosphere by volatilization. This has led to the creation of techniques that allow quantifying the nitrogen used by plants and the one that is fixated in the soil through micro-organisms to make more efficient the use of nitrogen in agricultural systems. However, the most significant limitations are their sensitivity, specificity, cost, and the technology that is required to apply them. This has also led to the innovation of procedures and the creation of techniques that have a very low error rate. The aim of this work was to describe the main techniques used to quantify nitrogen fixation with emphasis on the background, procedures, mathematical expressions that are used and future scenarios. The information is described from the analysis of available trials included in the Scopus database. This work consolidates the techniques that continue to be used to quantify nitrogen and facilitates their use over time with prediction models, as well as their importance, advantages, and disadvantages.

Keywords: eutrophication, fertilizer application, forecasting, isotopes, nitrogen fixation

Introducción

Las moléculas nitrogenadas que tienen importancia en la nutrición de las plantas son el nitrato y el amonio, cuya disponibilidad se relaciona con la aplicación de fertilizantes químicos y orgánicos, y por las transformaciones del nitrógeno en el suelo por efectos físicos, químicos y biológicos. La fijación de este elemento (N) la realiza un grupo de bacterias simbióticas (como rizobios formadores de nódulos de la raíz) y diazótrofos no simbióticos (de vida libre) (Angel et al., 2018). No obstante, es posible que la eficiencia en su fijación se pierda por factores ambientales, de manejo, integridad y número de los nódulos de las plantas, y por el tipo de microorganismo asociado a la raíz (Chalk & Craswell, 2018). Por ello, surge la necesidad de analizar la dinámica de este elemento desde su fijación para el diseño e implementación de estrategias que permitan aprovechar el proceso biológico y reducir la aplicación de fertilizantes sin sacrificar el rendimiento productivo de los cultivos. Sin embargo, existen varias limitantes para cuantificar la fijación del nitrógeno, por ejemplo, el grado de complejidad del proceso, costos y sensibilidad de las técnicas, equipos de alta tecnología, mano de obra calificada, disponibilidad de reactivos, entre otros.

Dentro de los métodos utilizados se destacan las técnicas de última generación como identificación de genes nifH, 16S rRNA (Rampadarath, Bandhoa, Puchooa, Jeewon, & Bal, 2017); los métodos de dilución de isótopos de nitrógeno; uso de espectros de reflactancia hoja/dosel para identificar ^{15}N, y técnicas menos precisas como diferencia del N total, balance del N en el sistema, diferencia de N total en las plantas, masa nodular, suministro de carbohidratos a la raíz, contenido de ureidos, reducción de acetileno, modificaciones del Kjeldahl (Yan et al., 2017), contenido de Leg-hemoglobina en nódulos y el ensayo GlnLux a partir de sensores que detectan glutamina (Thilakarathna & Raizada, 2018). No obstante, en campo la forma práctica de relacionar la absorción eficiente de nitrógeno es con la producción de materia seca (Mondal, Datta, & Mondal, 2017), el número de hojas/tallos (Bilal, Ayub, Tariq, Tahir, & Nadeem, 2017) y la producción de biomasa verde (Bionda, Babini, Martino, Salas, & Lajmanovich, 2018; Dutta, Datta, & Mandal, 2017).

El interés en el análisis del ciclo del nitrógeno y los agentes que intervienen en su emisión y fijación mediante el uso de técnicas de laboratorio se relaciona con el alto costo de la urea y fertilizantes utilizados en campo para la siembra y la pérdida de moléculas nitrogenadas tanto por lixiviación como por volatización, que contribuyen a la contaminación de la atmósfera y el agua. Esto ha impulsado el estudio de procedimientos más eficientes para el análisis de los flujos de la entrada y salida del nitrógeno en los sistemas agropecuarios, aunque también se han utilizado en otros sectores económicos, principalmente en la industria. El objetivo de este trabajo fue presentar una revisión de las principales técnicas utilizadas para cuantificar la fijación del nitrógeno con énfasis en los antecedentes, procedimientos, expresiones matemáticas que se usan y escenarios futuros.

Materiales y métodos

Búsqueda en bases de datos

Se hizo una búsqueda sistemática de artículos, libros, series de libros y conferencias publicados en la base de datos Scopus a nivel mundial, mediante la ruta de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (techniques fixation of nitrogen and bacteria), que incluye los documentos en cuyo título, resumen y palabras clave aparecen los descriptores de interés separados por los conectores booleanos "of" y "and".

Procesamiento y análisis de los datos

El número de publicaciones se organizó en Microsoft Office Excel® por año y se analizaron los principales países y áreas en las que se ha trabajado el tema desde 1967 hasta el 2018. La evaluación de la tendencia mundial de publicación por año se realizó con el *sofware* SigmaPlot12®, mediante la predicción de curvas de regresión no lineal, en el que la variable independiente correspondió al tiempo y la variable dependiente al número de publicaciones; los modelos empleados fueron los siguientes: sigmoidal 3-4

2020 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

parámetros, logístico 4, gompertz 3, hill 3-4 parámetros con un *p*-valor < 0,05. Se corroboró la independencia de los datos con el estadístico Durbin Watson y normalidad con Shapiro-wilk. Para determinar las técnicas que continúan vigentes y las tendencias a nivel mundial, solo se tuvieron en cuenta artículos publicados en el periodo comprendido entre 2016 y 2018, a partir de la metodología de revisiones sistemáticas (Pai et al., 2004), en la que los criterios de inclusión de los artículos fueron los siguientes: artículos publicados con una antigüedad no mayor a tres años, en revista indexada con la descripción y nombre genérico de la técnica, mientras que el criterio de exclusión fue literatura no indexada y generalidad de los métodos utilizados. En total se analizaron 50 artículos.

Resultados y discusión

Se encontró que existen 1.016 documentos publicados en la base de datos Scopus distribuidos en artículos (967), libros (22), series de libros (22) y conferencias (5) desde 1967 y hasta el 2018. Además, las técnicas de fijación de nitrógeno se han aplicado desde 1967 con tendencia regular y su máximo uso fue en el 2017. La pertinencia de estas radica en su utilidad para analizar la eficiencia del uso del nitrógeno por los diferentes emisores y captadores en el ecosistema, como estrategia para hacer más eficientes los sistemas productivos y empresariales desde el punto de vista ambiental. Por ello, hacen parte de una tecnología que tiene un crecimiento que se ajusta a un modelo sigmoidal y cuyo punto declive se estima hacia el 2053 ($R^2 = 0,99$; $p < 0,01$) por ser el punto de inflexión con mayor ajuste (R^2) y cuyo valor Durbin Watson estuvo más cercano a 2; sin embargo, puede ser antes o después de dicha fecha, debido a la poca diferencia entre los valores de R^2, ya que hay una complejidad en la dinámica de evolución de cualquier tecnología como resultado de la rápida madurez o el desarrollo de innovaciones (tabla 1).

Tabla 1. Modelos de regresión no lineal para la ecuación "*techniques fixation of nitrogen and bacteria*" analizados desde 1967

Modelo	Año de inflexión	R^2 ajustado	Valor *t*	Valor t (a)	Valor t (b)	Valor *p*	Durbin Watson
Sigmoidal 3	2028,7	0,998	727,8	6,466	38,386	0,0001	0,2456
Sigmoidal 4	2050,2	0,998	177,3	1,537	23,514	0,0001	0,4694
Sigmoidal Logistic, 4	2053,3	0,999	150,0	1,308	23,56	0,0001	0,4733
Sigmoidal; Gompertz, 3	2191,6	0,998	60,71	1,143	7,87	0,001	0,3487
Sigmoidal; Hill, 3	2074,4	0,899	27,27	0,323	17,2695	0,001	0,0198
Sigmoidal; Hill, 4	2064,29	0,973	76,05	0,94	34,90	0,001	0,0634

Nota: el estadístico *t* y los valores *a* y *b* pertenecen a los diferentes modelos logísticos.
Fuente: Elaboración propia

Esta variación en el punto de declive que tiende a prolongarse indica que estas técnicas se encuentran en una fase de innovación, que se caracteriza por una curva en la que la mayoría de los datos se agrupan al inicio del modelo, de acuerdo con la interpretación que se le da a la curva en S como herramienta para el análisis del ciclo de vida de un producto. Por esa razón, los esfuerzos de las empresas deben ir encaminados a fortalecer sus técnicas, realizar inversiones masivas para conservar el mercado y mantener su posicionamiento frente a nuevos competidores (Aguilar et al., 2012) (figura 1), de modo que las técnicas utilizadas para cuantificar la fijación de nitrógeno aún no han llegado a un punto de equilibrio durante el tiempo, y la difusión de sus procedimientos se realiza desde los países desarrollados, que es en donde se ostenta su propiedad; sin embargo, las técnicas más aplicadas en los países menos desarrollados corresponden a las más económicas y sencillas por la menor disponibilidad de recursos.

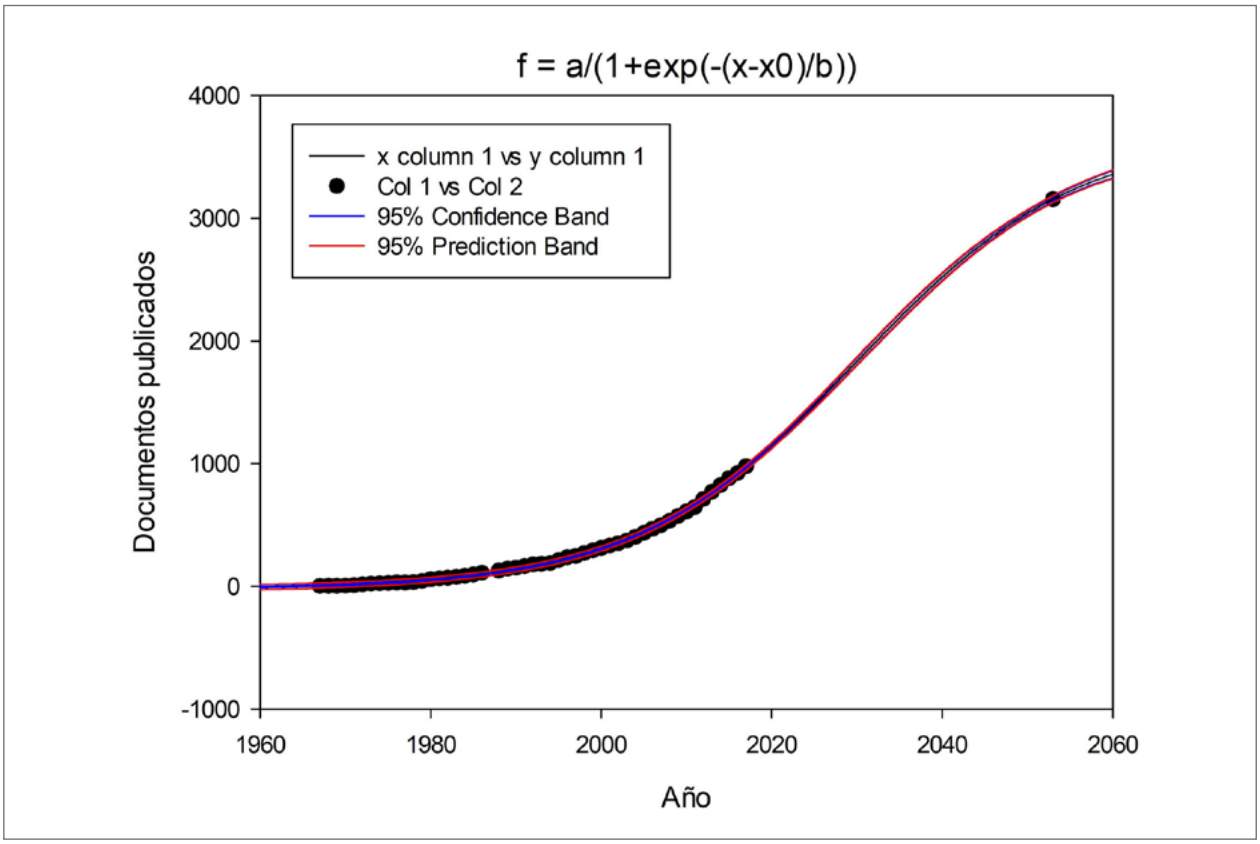

Figura 1. Curva de predicción de publicaciones, programa Sigmaplot (SigmoidalLogistic4).
Fuente: Elaboración propia

El modelo de predicción en curvas en S muestra un rápido crecimiento, es decir que las técnicas utilizadas para cuantificar la fijación de nitrógeno se encuentran en pleno desarrollo y es posible que surjan nuevos competidores con novedades en los procesos más económicos y de fácil adopción (Aguilar et al., 2012), debido a que la mayor limitante en su aplicación es el alto costo y la poca adaptabilidad directa en campo. De este modo, los países que usan con mayor frecuencia las técnicas de última generación son los países desarrollados, mientras que en países menos desarrollados como los latinoamericanos siguen implementando las técnicas más antiguas, porque su aplicación está limitada por la tecnología (tabla 2); por ejemplo, Colombia cuenta con una participación de tan solo el 0,68 % a nivel mundial.

2020 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

Tabla 2. Países destacados por la mayor publicación de investigaciones en las que se han aplicado técnicas para cuantificar la fijación de nitrógeno

Países destacados	Publicaciones por año en la base de datos Scopus (%)
Estados Unidos	23,7
Alemania	9,94
Brasil	9,94
China	8,07
Francia	7,80
Canadá	5,60
Australia	5,30
Japón	5,10

Fuente: Elaboración propia

Sin embargo, su uso no se limita solo al área de agricultura y ciencias biológicas (32,02 %), sino también se han utilizado en inmunología y microbiología (24,60 %), química y genética (19,20 %), ciencias ambientales (9,79 %), medicina (5,01 %), ciencias de la tierra (2,02 %) entre otras (7,26 %). Lo anterior demuestra el creciente interés en la economía del nitrógeno y en determinar los agentes más eficientes en su fijación para reemplazar el uso de productos químicos e innovar con técnicas no destructivas. Se estima que a partir del año 2029 (predicho por el modelo Sigmoidal 3), que es el tiempo más cercano al periodo de análisis de las publicaciones (1967-2018), se pueda presentar un proceso de madurez en su desarrollo, por la cantidad de avances y productos en el mercado, de acuerdo con el ciclo de vida de las tecnologías que se resume en etapa de difusión inicial, etapa de crecimiento temprano, etapa de crecimiento tardío y etapa de conocimiento público (Aguilar et al., 2012).

Técnicas utilizadas para estimar la fijación del nitrógeno

Los métodos más antiguos para verificar la eficiencia del uso del nitrógeno en los cultivos se relacionan con la estimación de la producción de materia seca y la fijación de nitrógeno en las diferentes partes de la planta. Con el tiempo, los estudios se han enfocado en el análisis específico de los agentes que intervienen en el ciclo del nitrógeno, en especial el suelo (capas de diferente profundidad), las plantas (análisis de *Rhizobium*, nódulos, contenido de ureidos, medición de leghemoglobina) (Sainju, 2017) y los microorganismos, debido a que el proceso de fijación está directamente relacionado con acción biológica (diazótrofos de vida libre y en simbiosis). Las principales técnicas se resumen a continuación.

Técnica de dilución isotópica ^{15}N

Se basa en la detección de isótopos en las fuentes de nitrógeno disponible para el crecimiento de las plantas (N-suelo, N- fertilizante y nitrógeno), a partir de la diferencia entre los isótopos que abundan naturalmente (^{15}N) o que han sido adicionados o empobrecidos en el suelo o en el sustrato, lo que permite identificar en la planta el nitrógeno proveniente de las distintas fuentes (marcadas y no marcadas con el trazador ^{15}N) (Braun et al., 2018).

La técnica de dilución isotópica ^{15}N fue reportada por McAuliffe para estimar la proporción de nitrógeno fijado en las leguminosas por acción biológica

(FBN), mediante la comparación con una planta de referencia que no fija, a partir de la diferencia en la concentración de átomos isotópicos cuando estas crecen en un suelo que ha sido enrriquecido con isótopos ^{15}N (Chalk & Craswell, 2018), que son agregados en soluciones de 1 a 10 % de exceso al suelo o en el fertilizante (Kg N/ ha) ($^{15}NH4$ y $^{15}NO_3$), previo a la siembra en la misma cantidad para la planta que fija y la que no fija (Braun et al., 2018; Wambeke et al., 2018). De modo que en el método clásico se utiliza la siguiente ecuación para calcular el nitrógeno de origen atmosférico que ha sido fijado:

$$P\ atm = 1 - \frac{E\ leguminosa}{E\ planta\ referencia}$$

En donde *E* representa el porcentaje de átomos isotópicos ^{15}N que han sido agregados en exceso (Chalk & Craswell, 2018). Esta técnica es costosa por el uso de espectrómetros de masas para la obtención de los gases y la identificación de los isómeros. Para ello, es común que se utilicen sistemas acoplados que consisten en un espectofotómetro conectado a un sistema de combustión (horno) (Hamawaki & Kantartzi, 2018). Sin embargo, como alternativa se ha optado por el uso de espectros de reflactancia hoja/dosel para identificar el isómero ^{15}N (Thilakarathna, Moroz, & Raizada, 2017). El método se resume en la aplicación de soluciones con 1 a 10 % de exceso de átomos ^{15}N al suelo (Braun et al., 2018; Wambeke et al., 2018) o en el fertilizante (Kg N/ha) previo a la siembra, y se estima la relación de isótopos en las plantas, en el suelo, en los microrganismos y en el aire. En plantas se cuantifica el ^{15}N en muestras que se han secado, por ejemplo: en soya muestras de raíces, nódulos y semillas se han dejado a 70 °C por 72 horas (Hamawaki & Kantartzi, 2018). La detección del isótopo ^{15}N es posible debido a su mayor peso (15 masa atómica) en comparación con los átomos de nitrógeno que se encuentran en la atmósfera (14 masa atómica), lo que permite que durante el proceso se separen y, posteriormente, sean colectados y cuantificados en el espectofotómetro. Para estimar el porcentaje de isótopos se puede utilizar la siguiente fórmula, en la que se tiene en cuenta el aporte de isótopos en el aire (0,3663 % átomos ^{15}N) (Hamawaki & Kantartzi, 2018):

$$\%\ átomos\ ^{15}N\ \text{ex} = \%\ átomos\ ^{15}N\ muestra - \%\ átomos\ ^{15}N\ \text{en el}\ N_2\ del\ aire$$

En cambio, para la evaluación de la masa microbiana se hacen aislamientos y se establecen modelos matemáticos (Hamawaki & Kantartzi, 2018). También es posible que se haga una incubación *in situ* para raíces y suelos en parafilm, a partir de la inyección de gas enriquecido con ^{15}N, se reporta de 4,5 a 20 mL de gas ^{15}N en relación con el aire del ambiente (Ritchie & Raina, 2016) y, al finalizar la incubación, las muestras se secan, se muelen y se pesan para luego determinar la concentracion de ^{15}N. Sin embargo, existe la posibilidad de sobreestimar la fijación si no se tienen en cuenta cambios potenciales en la concentración del nitrógeno, como resultado de la desnitrificación, y si la forma comercial de isótopos utilizados se encuentra contaminada con otros gases que pueden ser absorbidos por plantas y microrganismos (Roley et al., 2018), aunque en un estudio, en el que se utilizó un marcador de $^{15}N\text{-}NH_4^+$ en cantidad de 10 % de átomos en la atmósfera para corroborar esta hipótesis, no se encontró ninguna relación, si bien no se descarta que la cantidad aplicada haya sido leve (Braun et al., 2018).

Algunas desventajas de la técnica son las siguientes:

1. Lixiviación del trazador ^{15}N en las soluciones enriquecidas que se aplican al suelo, de modo que se necesita su reincorporación diaria, lo que incrementa costos de mano de obra.
2. En sistemas cerrados se pueden presentar fugas.
3. La distribución homogénea del material enriquecido (^{15}N) en el suelo es difícil.
4. La asincronía en la captación de nitrógeno mineral por la leguminosa y la planta de referencia contribuyen a la obtención de resultados variantes (Chalk & Craswell, 2018)
5. El costo de los medios enriquecidos con isótopos ^{15}N y de los equipos es elevado.

2020 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

6. Consumo del trazador ^{15}N-NH_4 en muestras de suelo por efecto de la fijación en minerales arcillosos y sustancias húmicas, o por la absorción microbiana, lo que puede alterar los resultados (Braun et al., 2018)
7. Variación en el contenido de ^{15}N en la planta durante las diferentes etapas de crecimiento (Hamawaki & Kantartzi, 2018) y fácil contaminación de medios artificiales como soluciones hidropónicas y el material soporte (arena, perlita o vermiculita o mezclas de estas, p.ej. 70 % de turba, 20 % de perlita y 10 % de vermiculita) (Hamawaki & Kantartzi, 2018).

Sin embargo, es el método recomendado para analizar la dinámica del nitrógeno en el suelo, de modo que según el enfoque del estudio se marca el producto objetivo en el análisis que en el caso de la mineralización es el NH_4 con el trazador enriquecido ($^{15}N - NH_4$) (Braun et al., 2018).

Técnica de abundancia natural ($\delta^{15}N$)

Esta técnica se basa en la cuantificación de ^{15}N disponible de forma natural en las plantas y en el suelo, derivado de la fijación atmosférica (De Carvalho et al., 2017), debido a que el fraccionamiento de ^{15}N y el nitrógeno orgánico se observa durante la nitrificación (Chalk & Craswell, 2018); es decir, por baja absorción de nitrato debe haber una mayor concentración de isótopos en el suelo. Para ello, se establece la diferencia en el porcentaje de átomos de ^{15}N entre el material evaluado y la abundancia natural de la atmósfera (0,3663 átomos %^{15}N) (Fuertes-Mendizábal et al., 2018). Se utiliza la siguiente ecuación para estimar la proporción del nitrógeno fijado por la leguminosa derivado de la atmósfera (*P atm*) (Chalk & Craswell, 2018):

$$\%N = 100 \left(\frac{^{15}N\,ref - {}^{15}Nleg}{^{15}Nref - B}\right)$$

En donde *B* representa la abundancia de isótopos (^{15}N) en la planta leguminosa, dependiente únicamente del proceso de fijación biológica del nitrógeno, $^{15}N\ ref$ es la abundancia del isótopo ^{15}N en la planta de referencia, y $^{15}N\ leg$ es la abundancia del isótopo ^{15}N en la leguminosa (Van Vugt, Franke, & Giller, 2018). Las muestras usadas son generalmente brotes que se secan a 65 °C durante 72 h o hasta alcanzar un peso constante. Posterior al secado se pesan, se mulen y se cuantifica el ^{15}N en un espectrofotómetro de masas (De Carvalho et al., 2017), pero también se ha validado el uso de tejido de grano (2,5 mg), de modo que la eficiencia del nitrógeno fijado se puede estimar como kilogramo de grano producido por kilogramo de absorción de nitrógeno de brotes en la etapa de crecimiento (Polania, Poschenrieder, Rao, & Beebe, 2016). Algunas plantas fijadoras de nitrógeno tienen un valor de referencia (B): para fríjol de soya se reporta -2 ‰ (Van Vugt et al., 2018), -3,09 ‰ en brote, -2,44 ‰ en grano para los genotipos con hábito etapa de crecimiento II (Polania et al., 2016), aunque tambien se ha observado -0,80 ‰ (Van Vugt et al., 2018), y en gramíneas por lo general se usa como valor 0 (De Carvalho et al., 2017). Dichas diferencias en la misma especie ocurren porque dentro de la planta hay discriminación en la distribución de ^{15}N en sus órganos (Polania et al., 2016). El método de abundancia natural solo funciona si el ^{15}N de la leguminosa esta entre el valor 'B' y el ^{15}N de la planta de referencia (Van Vugt et al., 2018). Además, es posible calcular la cantidad de nitrógeno acumulado por las plantas multiplicando el nitrógeno total por su biomasa, respectivamente (De Carvalho et al., 2017).

Por otra parte, también es posible establecer la cantidad de nitrógeno fijado por acción biológica, para lo cual se usan medios hidropónicos, arena u otro soporte esterilizado que no contenga nitrógeno, en ensayos controlados para establecer la abundancia de isótopos ^{15}N, que son fijados y no tienen un origen diferente. También se han hecho ensayos en campo abierto en parcelas sin marcar y marcadas con el trazador ^{15}N, con el objetivo de establecer la concentración de isótopos en las plantas en relación con su disponibilidad en el aire (Van Vugt et al., 2018). El ^{15}N fijado por microorganismos varía en las leguminosas (Chalk & Craswell, 2018), debido a las diferentes especies de *Rhizobium* y el soporte utilizado que puede contribuir al grado de

error, por la presencia de moléculas que aporten iones de amonio. En general, la técnica, tiene varios inconvenientes:

1. Se debe utilizar una planta de referencia que permita conocer la disponibilidad del isótopo ^{15}N derivado del suelo para hacer estimaciones adecuadas.
2. Es necesario determinar el valor B, ya que difiere por especie y por el tipo de cepa asociada a la leguminosa, por lo que asumir valores de referencia no garantiza la exactitud de los resultados.
3. El tipo de planta y la muestra utilizada también son factores que influyen en esta técnica (Chalk & Craswell, 2018).
4. La abundancia del isótopo ^{15}N en el suelo es variable, ya que factores como la lluvia influyen en su concentración debido a que es un mecanismo de reincorporación de este elemento al suelo (Polania et al., 2016).

Por ello, al aplicarse es ideal el uso de otras técnicas como la dilución isotópica y variaciones como rastrear el isótopo ^{15}N en ARN microbiano con el uso de microespectectroscopía SIP-Raman, a partir de muestras incubadas durante tres días con bacterias diazótrofas y ^{15}N; posteriormente, se hace la identificación de los microrganismos que fijan nitrógeno en su biomasa de una manera altamente sensible en entornos diversos. Si bien esta técnica no tiene la misma sensibilidad en todas las cepas microbianas que fijan nitrógeno en simbiosis y de vida libre (Angel et al., 2018), tiene como ventaja la alta precisión para estimar isótopos en el material evaluado por la sensibilidad de los equipos; además, como no es necesaria la aplicación de fertilizantes marcados con isótopos, es relativamente más económica que la técnica de dilución isotópica.

Método ARA (reducción de acetileno)

A partir del descubrimiento de Schoöllhorn, Burris, y Dilworth en 1966 (Dilworth, 1966; Schoöllhorn & Burris, 1967) acerca de que la nitrogenasa reduce el acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4), se sugirió que la tasa de reducción de acetileno se puede usar como índice de la tasa de fijación de nitrógeno (Stewart, Fitzgerald, Burris, & Nov, 1967). Desde entonces, se utiliza esta técnica en la que se requiere de un cromatógrafo de gases y se reemplaza 10-20 % (Chauhan et al., 2017) del volumen del aire por acetileno en una cámara de incubación que se deja a 28-30 °C durante 2 a 5 días (Chauhan et al., 2017; Das & De, 2018; Yong et al., 2018). Asimismo, se pueden analizar plantas completas, suelo, muestras de nódulos y de bacterias (Camelo-Rusinque, Moreno-Galván, Romero-Perdomo, & Bonilla-Buitrago, 2017). Cuando se usan nódulos la fijación de nitrógeno se calcula con la siguiente ecuación (mL/h/planta) (Yong et al., 2018):

$$ARA = actividad\ de\ nitrogenasa \times peso\ seco\ de\ los\ nódulos$$

Cuando la muestra corresponde a bacterias, las cepas se cultivan en medios semisólidos (Nfb) en viales (García et al., 2017) por 5 días a 28 °C y se exponen a atmósferas con 10 % de acetileno durante 2 a 5 días; posteriormente, se hace la extracción de 1 mL de muestra y se analiza por cromatografía de gases (Chauhan et al., 2017). Una de las mayores limitantes en esta técnica se relaciona con la integridad de los nódulos de la planta para que no se altere la actividad de la nitrogenasa (Chalk & Craswell, 2018). Incluso el acetileno es considerado un tóxico para algunos microorganismos (Angel et al., 2018) y se requiere alta disponibilidad de plantas y suelo para que el análisis sea más confiable; sin embargo, dentro de las ventajas que ofrece esta técnica se destacan los siguientes aspectos: 1) es más económica que los métodos de dilución isotópica y abundancia natural; 2) el cromatógrafo de gases es un equipo menos complejo que un espectrofotómetro de masas, y 3) se pueden tener resultados más rápidos, reportándose reducciones de acetileno a etileno después de cinco segundos a 30 minutos (Stewart et al., 1967). Pero como desventajas se encuentran los siguientes: 1) es menos sensible y no se recomienda aplicarla en muestras donde la actividad diazotrófica es baja o esporádica, y 2) además se puede presentar fuga de gases durante la incubación (Angel et al., 2018).

2020 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

Bioensayo microbiano

Esta técnica se desarrolló como alternativa a la técnica de reducción de acetileno por Das y De (2018), quienes aplican un enfoque directo para la cuantificación de nitrógeno fijado a partir del cultivo de bacterias diazotrofas en medio Jensen (composición: sacarosa 20 g/L, fosfato de dipotasio 1 g/L , sulfato magnésico 0,5 g/L , cloruro sódico 0,5 g/L, sulfato ferroso 0,1 g/L, molibdato sódico 0,005 g/L, carbonato cálcico 2 g/L, agar 15 g/L).

Para ello, se toman muestras de suelo de los primeros 5 cm en el área que se va a analizar y se transportan en refrigeración; luego, son tamizadas y una parte es secada en estufa hasta obtener su peso constante y 10 g de muestra representativa se lava con solución isotónica de tampón fosfato y se filtra. A partir de esta suspensión, se hace una dilución en serie hasta 10^{-4} y 1 mL se inocula en medio Jensen y se incuba durante dos semanas a 30 °C, procedimiento que se repite 10 veces para garantizar la obtención de colonias puras; después, la cantidad de nitrógeno de las células microbianas se determina por el método de oxidación catalítica a alta temperatura (HTCO) y la tasa de fijación de nitrógeno se estima con la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa de } N_2 = \frac{(\text{N en células bacterianas 2 sem}) - (\text{N en células bacterianas total})}{(\text{Periodo de incubación}) \times (\text{Masa seca de suelo})}$$

En donde las células bacterianas totales se calculan a partir de la multiplicación entre el número de colonias y la cantidad de bacterias encontradas (Das & De, 2018). Los autores indican que existe una correlación positiva entre este método y el ensayo ARA, pero también observaron que, al ser una técnica directa, la cuantificación de nitrógeno fijado es mayor en comparación con ARA, aunque aún faltan más ensayos que corroboren su sensibilidad. Otras ventajas de esta técnica son las siguientes: 1) menor costo, ya que no se utilizan equipos complejos, y 2) sirve para analizar cualquier tipo de suelo (Das & De, 2018). Sin embargo, la mayor limitante es que es una técnica demorada, ya que los resultados se obtienen después de 140 días aproximadamente, y pueden presentarse problemas de contaminación; además, es posible que no toda la masa microbiana fijadora de nitrógeno se pueda recuperar en este medio (Das & De, 2018).

Contenido de ureidos

En las leguminosas exportadoras de ureido, el nitrógeno fijado por los rizobios dentro de los nódulos radiculares se asimila en el aminoácido glutamina (Gln) y se metaboliza en los ureidos alantoina y ácido alantóico, cuya importación hacia el xilema se hace a partir de ureido permeazas (UPS1) (Carter & Tegeder, 2016; Santos et al., 2018); luego, se distribuyen en la planta, pero se acumulan en mayor proporción en tallos (Carter & Tegeder, 2016; Thilakarathna & Raizada, 2018), en especial en el estado vegetativo de las leguminosas, aunque durante el estado reproductivo son transferidos de los tallos a las vainas y a las semillas (Yong et al., 2018), por lo que para la toma de muestras se debe tener en cuenta el estado de desarrollo de la planta.

Esta técnica es una forma indirecta de evaluar la fijación biológica de nitrógeno, debido a que una reducción en el contenido de ureidos indica menor fijación de los compuestos nitrogenados (Santos et al., 2018), de modo que por no ofrecer resultados exactos de la fijación de nitrógeno está en desuso a corto y mediano plazo (Thilakarathna & Raizada, 2018). Las muestras generalmente corresponden a hojas, tallos, vainas y granos. Se pesa 0,4 g del material a evaluar y se mezcla con tampón fosfato (80 °C) durante cinco minutos; posteriormente, se centrifuga (5.000 rpm) el doble de tiempo, y el sobrenadante se recoge y se almacena (-20 °C); depués, se toma 1,5 mL de esta solución y se expone a NaOH (0,5 mL), HCl (0,5 mL) y clorhidrato de fenilhidrazina (0,5 mL) (Tai-wen et al., 2018) para romper los tejidos y, a continuación, se mide la cantidad de ureidos en un espectofotómetro (Kataria & Baghel, 2016). Este método tiene las siguientes ventajas: 1) es más económico en comparación con las técnicas de dilusión isotópica, abundancia natural y reducción de acetileno, 2) y es relativamente rápido, aunque se require alto número de muestras para incrementar la confiabilidad de los resultados.

Ensayo GlnLux

La glutamina (Gln) es una forma de transporte primario del nitrógeno una vez es absorbido por la raíz de la planta (Thilakarathna et al., 2017). En el ensayo GlnLux, la glutamina es detectada por biosensores que son células enteras que emiten luz cuando entran en contacto con este aminoácido. Dichas células corresponden a cepas de *Escherichia coli* auxótrofas para Gln y que expresan un operón lux constitutivo (Thilakarathna et al., 2017), de modo que la fijación de nitrógeno se asocia con el gasto de luz que puede medirse con ayuda de un luminómetro; en general, el ensayo se basa en medir la salida de Gln utilizando el biosensor GlnLux (Thilakarathna et al., 2017). Además, se ha logrado comprobar que su sensibilidad es comparable con estudios hechos en cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) según un estudio en el que se analizaron hojas de maíz (*Zea mays* L.).

El procedimiento consiste en tomar muestras de la primera a la tercera hoja en orden de emergencia con un disco de perforación manual para tejido foliar (6,35 mm de diámetro) y almacenarlas inmediatamente en nitrógeno líquido; luego, se homogeneizan agregando arena esteril y 20 µL de proteasa (0,1 %) y se centrifugan. El sobrenadante se diluye 100 veces y se refrigera (-20 °C); después, 10 µL de extracto de la planta se mezclan con 10 µL de células GlnLux y 80 µL de medio M9, y se incuban por dos horas para la activación del biosensor; posteriormente, se cuantifica la salida de Gln con el luminómetro (Thilakarathna et al., 2017), pero las proporciones mencionadas pueden cambiar.

La mayor limitante de este método es que solo informa la cantidad relativa de Gln y no la cantidad absoluta (Thilakarathna et al., 2017). Pero tiene las siguientes ventajas: 1) es una técnica rápida, en la que no se requiere alta cantidad de muestras (hojas jóvenes); 2) el biosensor GlnLux tiene alta sensibilidad; 3) permite el procesamiento de varias muestras, y 4) facilita el análisis de la dinámica de absorción, asimilación y redistribución del nitrógeno en la planta a partir de la detección de Gln (Thilakarathna et al., 2017).

Técnicas PCR identificación de los genes nifH

Las técnicas PCR se han utilizado para identificar bacterias diazótrofas que se aíslan de raíces (Castanheira et al., 2017), suelos, hojas y tallos. Por lo general se toman entre 0,25 g a 0,5 g de muestra para el ensayo y se realiza el protocolo de extracción de ADN, en el que se utilizan solventes para lisar la pared de las células y dejar libre el ADN que se precipita y se conserva en viales refrigerado; posteriormente, se corrobora la calidad del ADN por electroforesis en gel de agarosa y se continua con la amplificación del ADN mediante PCR en un termociclador con cebadores específicos para el gen nifH (por ejemplo: ATGCCTGCAGGTCGACTCTAG (cebador directo) y CCTTGTACTTGGTCGTGTTTGAC) (Ritchie & Raina, 2016; Roley et al., 2018; Tchuisseu, Berger, Patz, Fankem, & Ruppel, 2018). Los genes nifH se encuentran diversificados y su transcripción está controlada por la ARN polimerasa, que es una holoenzima alternativa, y también necesita una proteína activadora nifA (Satyanarayana, Krishna, Pavan, & Jeereddy, 2018). Otros genes identificados por PCR son 16S rRNA (Akemi et al., 2017; Jaiswal, Msimbira, & Dakora, 2017; Tahon & Willems, 2017), porque permite una clasificación filogenética más detallada a nivel de especie (Osei, Abaidoo, Ahiabor, & Boddey, 2018; Ribeiro et al., 2018), genes rec A, atpD, gln II y nod C con análisis de secuencia multilocus (MLSA) (Leite et al., 2017; Mwenda, Hara, De Meyer, Howieson, & Terpolilli, 2018; Rigonato et al., 2017). Con esta técnica, se ha logrado identificar el gen nifH en géneros *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pantoea* (Ndungu et al., 2018), que no son reconocidos por fijar nitrógeno, de modo que es posible que hayan obtenido la capacidad de fijación de nitrógeno a través de la transferencia lateral de genes; sin embargo, las fuerzas evolutivas de la transferencia lateral de genes no son bien conocidas (Khalifa & AlMalki, 2018).

Aunque es una técnica específica, es necesario que cuando se utilice se haga la caracterización morfológica y bioquímica de los microorganismos (Liu et al., 2017). Tiene las siguientes ventajas: 1) permite la caracterización ampliada de los microorganismos

2020 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

a partir de la identificación del gen nifH; 2) es una prueba rápida y se pueden utilizar kits de extracción de ADN para agilizar el procedimiento, y 3) es altamente sensible en la detección del gel nifH (Leite et al., 2017). Sin embargo, algunas limitantes de la técnica son las siguientes: 1) alto costo en el procedimiento; 2) la calidad de la plantilla del cebador determina la sensibilidad y amplificación confiable del ADN, por lo que se requiere corroborar el estado del material genético por electroforesis, y 3) no admite ningún grado de contaminación tanto en el procedimiento como en los reactivos (Tahon & Willems, 2017).

Masa nodular

La masa nodular es un método indirecto en el que se relaciona el número de nódulos, su masa (Arshi, 2017), distribución en el sistema radicular (Thilakarathna & Raizada, 2018) y características estructurales (Akemi et al., 2017), con la capacidad de la planta para fijar nitrógeno, ya que los nódulos se desarrollan como consecuencia de la asociación simbiótica entre planta y bacterias, de modo que alta actividad de la nitrogenasa se asocia a un buen estado nodular. En esta técnica se recolectan muestras de plantas completas o solamente el sistema radicular en bolsas herméticas y se transportan en condiciones de refrigeración (4 °C); posteriormente, se realiza un análisis físico de la estructura de los nódulos que incluye color, integridad, tamaño y número total por planta; luego, los nódulos son separados de la raíz, se lavan con agua destilada, se desinfectan con peróxido de hidrógeno (30 %) por tres minutos y nuevamente se lavan con agua esterilizada; finalmente, se secan a 70 °C hasta alcanzar un peso constante, y después se pesan (Argaw & Mnalku, 2017; Yong et al., 2018). Sin embargo, cabe resaltar que el número y masa de los nódulos cambia de acuerdo con la edad de los cultivos leguminosos y factores como la sequía (Hashem et al., 2018), el manejo y la salinidad del suelo, que a su vez influyen en las funciones de simbiosis (De Andrade Albenísio, Bonifacio, Cerqueira, & Barreto, 2018) y modifican el desarrollo nodular. De este modo, la técnica tiende a ser poco precisa al requerirse muestras en todos los estados de las plantas y mantenerlas bajo las mismas condiciones con el objetivo de disminuir el error de muestreo, pero tiene las siguientes ventajas: 1) es un método económico, que no requiere de equipos complejos; 2) no necesita personal altamente calificado; 3) se obtienen resultados rápidos, y 4) es una forma indirecta de estimar la simbiosis efectiva de bacterias *Rhizobium* que se inoculan en los cultivos (De Andrade et al., 2018).

Medición de leghemoglobina

El proceso de fijación biológica de nitrógeno es catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa que es altamente susceptible a la presencia de oxígeno, de modo que un mecanismo de protección para evitar su inactivación es la expresión de la proteína leghemoglobina que se encuentra dentro de los nódulos y capta el oxígeno que entra a la célula; así, esta hemoproteína (Santos et al., 2018) evita la oxidación de la nitrogenasa y garantiza la fijación eficiente del nitrógeno (Kataria & Baghel, 2016). El procedimiento consiste en tomar entre 1,25 g y 2 g de nódulos radiculares frescos, que se lavan y se mezclan homogéneamente con cinco volúmenes de solución buffer fosfato (5 °C; pH 6,8; 6,8 mol/L); las muestras se centrifugan a 100 rpm por 15 min a 15 °C; posteriormente, se descarta el sedimento y se vuelve a centrifugar a 39.000 rpm por 20 min a 15 °C, cuyo sedimento rojo luego se mide con un espectrofotómetro (Yong et al., 2018). Cabe destacar que existe una estrecha relación entre el contenido de SeO en el suelo y la concentración de leghemoglobina en los nódulos, que fue comprobado en un ensayo en el que se agregó 0,1 y 1 mg/kg de suelo en forma de Na_2SeO_4 para el cultivo de soya, lo que se debe a que este actúa como un antioxidante que reduce la peroxidación de lípidos, de modo que suministrado en bajas concentraciones estimula el crecimiento, la fotosíntesis y la producción de leghemoglobina en los nódulos (Kataria & Baghel, 2016).

Algunas ventajas de esta técnica son las siguientes: 1) genera resultados rápidos que permiten analizar la actividad de la nitrogenasa de forma indirecta, y 2) tiene un menor costo, ya que el único equipo que se requiere es un espectofotómetro (Yong et al., 2018). Sin embargo, no es exacto y laceraciones

en los nódulos pueden afectar los resultados; por ello, el muestreo se debe realizar con precaución y no debe pasar mucho tiempo entre su recolección y procesamiento (Kataria & Baghel, 2016).

Técnicas usadas en diferentes sistemas productivos

Los cultivos en los que más se han realizado estudios de identificación de microorganismos fijadores de nitrógeno que hacen simbiosis, de vida libre y endófitos corresponden en su mayoría a especies que tienen importancia económica como recurso alimentario y pecuario (gramíneas y leguminosas) y por su uso forestal (por ejemplo, en eucalipto la identificación de endófitos con el gen nifH) (Fonseca et al., 2017) (tabla 3). En estas técnicas, la aplicación de fertilizantes sintéticos suele ser alta para garantizar la producción que se demanda a nivel mundial. Esto favorece la tendencia a estudios enfocados en el uso eficiente del nitrógeno por el alto costo de los fertilizantes, y debido a que su aplicación indiscriminada puede alterar la calidad biológica de los cultivos y el rendimiento, así como contaminar los mantos freáticos (Bilal et al., 2017; Yong et al., 2018). Esto se lleva a cabo para el diseño de estrategias que permitan reducir su dosificación y frecuencia de aplicación, así como hacer más eficientes los sistemas productivos desde una perspectiva económica y ambiental.

La preferencia entre una técnica y otra depende de la sensibilidad que pueden tener al momento de detectar diferentes concentraciones de nitrógeno en las muestras, el costo, la rapidez para la obtención de resultados, el acceso a los equipos y la complejidad del procedimiento. Por lo general, se utilizan muestras de rizósfera y de las raíces de las plantas para aislar microorganismos asociados en simbiosis, pero cuando se trata de organismos fijadores de nitrógeno de vida libre se utilizan muestras de suelo (Angel et al., 2018). La sensibilidad de las técnicas está relacionada con la disponibilidad de nitrógeno en la muestra, que a su vez depende de la capacidad fijadora de nitrógeno del microorganismo presente en asociación con la planta o de vida libre, de tal manera que si es alta resulta fácilmente detectable, tal como se ha observado al utilizar reducción de acetileno y dilución isotópica ^{15}N (Angel et al., 2018). Pero puede diferir por cultivo evaluado, por ejemplo: con la técnica de abundancia natural se ha observado distinto porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera, reportándose valores de 12,8 % a 19,4 % para caña de azúcar, 22,4 % para maíz, 20,9 % para pasto guinea y 24,7 % a 31,2 % para sorgo (De Carvalho et al., 2017). Con respecto a cultivos de leguminosas como la soya, con valores hasta de 65 % en especies locales y de 53 % en variedades mejoradas (Van Vugt et al., 2018), lo que se debe a la alta actividad de la nitrogenasa en especies que nodulan; esto mismo se ha observado en ensayos con fríjol común, destacándose diferencias en el porcentaje de nitrógeno fijado en muestras de raíces y de grano por genotipo (Polania et al., 2016).

Estas técnicas, al igual que la prueba de detección del gen nifH, son utilizadas para detectar diazótrofos y analizar su actividad en el suelo asociado a cultivos permanentes y transitorios (tabla 3). Sin embargo, ARA no es tan sensible en muestras donde la actividad diazotrofica es baja o esporádica, pero sí lo es la dilución isotópica (Angel et al., 2018); por dicha variabilidad, es común que se prefiera corroborar la capacidad diazotrófica mediante detección del gen nifH, independiente del cultivo origen de las muestras o su naturaleza con una caracterización morfológica complementaria.

Por supuesto, características de la planta como la capacidad de producir ureidos y la presencia de nódulos únicamente en leguminosas limitan la aplicación de algunas técnicas para plantas que las presenten o en su defecto obligan a realizar modificaciones que consisten en utilizar reactivos más agresivos, aumentar o disminuir su concentración o el tiempo de exposición. De este modo, en cultivos permanentes como el eucalipto, que se caracteriza por tener mayor dureza en las raíces por su ciclo productivo, se reporta la modificación en el tratamiento de las muestras de raíz para análisis de microorganismos endófitos (Fonseca et al., 2017).

2020 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

Dicha modificación incluye exposición a luz UV durante 5 min, lavado con etanol al 70 % durante 1 min e hipoclorito de sodio al 2 % durante 2 min para la preparación de las muestras de raíz antes de aislar microorganismos endófitos (Fonseca et al., 2017), prueba adaptada de un ensayo en muestras de cítricos, mientras que en muestras de raíces de gramíneas como el pasto varilla (*Panicum virgatum* L.) tan solo se reporta esterilización de superficie con hipoclorito de sodio al 1,5 % (Roley et al., 2018). Esto indica que la preparación de la muestra es un paso decisivo que suele adaptarse según las características del material evaluado.

Tabla 3. Técnicas usadas en diferentes sistemas productivos

Técnica	Cultivos	Fuente
Técnica de dilución isotópica ^{15}N	Añil (*Indigofera volkensii* Taub.), haya común (*Fagus sylvatica* L.), pasto varilla (*Panicum virgatum* L.), soya (*Glycine max* (L.) Merr.), trema (*Themeda triandra* Forssk.)	Braun et al. (2018), Hamawaki y Kantartzi (2018), Ritchie y Raina (2016), Roley et al. (2018)
Ensayo GlnLux	Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), lentejas (*Lens culinaris* Medik.), soya (*G. max*)	Thilakarathna et al. (2017)
Técnicas PCR para identificación de los genes nifH	Arroz (*Oryza sativa* L.), añil (*Indigofera volkensii*), eucalipto (*Eucalyptus urograndis* S. T. Blake), fríjol (*Phaseolus vulgaris*), garbanzo (*Cicer arietinum* L.), maíz (*Zea mays*), nuez (*Juglans regia* L.), soya (*G. max*) trema (*Themeda triandra*), trigo (*Triticum aestivum* L.)	Fonseca et al. (2017), Leite et al. (2017), Liu et al. (2017), Ritchie y Raina (2016), Satyanarayana et al. (2018)
Reducción de acetileno (ARA)	Caupi (*V. unguiculata*), mangle (*Rhizophora mangle* L.), soya (*G. max*), valeriana (*Valeriana jatamansi*)	Angel et al. (2018), Chauhan et al. (2017), Das y De (2018), Kataria y Baghel (2016), Santos et al. (2018), Yong et al. (2018)
Lephemoglobina	Caupi (*V. unguiculata*), Soya (*G. max*)	Carter y Tegeder (2016), Kataria y Baghel (2016), Santos et al. (2018), Yong et al. (2018)

(Continúa)

(Continuación tabla 3)

Técnica	Cultivos	Fuente
Contenido de ureidos	Caupi (*V. unguiculata*), soya (*G. max*)	Carter y Tegeder (2016), Santos et al. (2018), Yong et al. (2018)
Masa nodular	Sófora plateada (*Sophora tomentosa* L.), Soya (*G. max*)	Akemi et al. (2017), De Carvalho et al. (2017), Kataria y Baghel (2016),
Técnica de abundancia natural	Caña de azucar (*Saccharum* spp.), maíz (*Zea mays* L.), pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.), pasto elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach.), pasto salina (*Cenchrus ciliaris* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), soya (*G. max*)	Polania et al. (2016), Van Vugt et al. (2018)

Fuente: Elaboración propia

Conclusiones

Desde 1967 ha incrementado el uso de técnicas para estimar la tasa de fijación de nitrógeno en la investigación agrícola con mínimo una publicación al año, ajustándose a un modelo de crecimiento sigmoidal con punto de declive hacia el año 2053. De este modo, esta tecnología se encuentra en una fase de rápido crecimiento que se caracteriza por la aparición de modificaciones, innovaciones y nuevos métodos como el bioensayo microbiano, el ensayo GlnLux y técnicas moleculares de última generación, para analizar la dinámica del nitrógeno en los sistemas agrícolas y los factores que intervienen en el ciclo. Esto refleja el esfuerzo económico para fortalecer su mercado y difusión desde los países desarrollados, que es donde se ostenta su posesión, así como para lograr el reconocimiento de sus productos a partir de su adaptación a las necesidades de la investigación por las desventajas que han surgido durante su aplicación.

Los procedimientos y sensibilidades de las técnicas utilizadas para determinar la tasa de fijación de nitrógeno en el suelo difieren, lo que se relaciona con su rusticidad y capacidad de detección, pero también influye el tipo de muestra y el procedimiento de su colecta. En general, las técnicas indirectas como el número de nódulos y la masa nodular son poco confiables, y se puede sobrestimar o subestimar la fijación del nitrógeno porque la tasa de detección es baja; no obstante, existe una estrecha relación entre la masa nodular y el contenido de nitrógeno fijado. Por lo anterior, el método más sensible en la actualidad se considera que es de dilución isotópica, debido a que con este es posible identificar bajas tasas de ^{15}N, lo que no se logra con los métodos ARA o masa nodular. A pesar de ello, es difícil controlar todos los factores externos y los agentes involucrados en el ciclo del nitrógeno, ya que suele ser episódico como cualquier proceso biogeoquímico, por lo que la acción de microrganismos fijadores de nitrógeno puede presentarse solo cuando tienen suficiente humedad, y elementos minerales.

2020 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

Todo esto explica los resultados de máxima respuesta agronómica de cultivos que se establecen en condiciones de buena fertilidad. Por ello, existe probabilidad de error en todas las técnicas y quizás la más confiable sea la identificación de genes, pero la mayor limitante es el costo y la tecnología necesaria para su aplicación, aunque por efecto de la competencia en el mercado estas pruebas han reducido su precio comercial; sin embargo, y a pesar de su especificidad, es necesario que vayan acompañadas de alguna prueba mencionada.

Como escenarios futuros se prevé que las tecnologías de fácil uso en campo sean utilizadas con mayor frecuencia, ya que las pruebas que se realizan en condiciones controladas no siempre reflejan la dinámica natural, debido a que el nitrógeno varía en el cultivo y en el suelo por factores edafoclimáticos y de manejo. Se propone la implementación de técnicas que permitan determinar las transformaciones del nitrógeno después de su aplicación en función de las características del suelo, el clima y el cultivo para el uso eficiente del nitrógeno, en conjunto con tecnologías de punta con *software* para prever la fertilidad de los suelos a partir del análisis de resultados históricos de la dinámica del nitrógeno en el sistema agrícola, su modelamiento y predicción de la cantidad de fertilizante que se debe aplicar. No obstante, las técnicas antiguas seguirán utilizándose por su difusión en países en desarrollo en especial aquellas que son más económicas.

Agradecimientos

Los autores manifiestan agradecimientos al sistema general de regalías, a la gobernación del departamento de Boyacá, a Colciencias y a la Universidad del Cauca. El documento se realizó en el marco del desarrollo de la convocatoria 779 de 2017.

Descargos de responsabilidad

Todos los autores realizaron aportes significativos al documento, están de acuerdo con su publicación y manifiestan que no existen conflictos de interés en este estudio.

Referencias

Aguilar, S., Ávalos, A. F., Giraldo, D. P., Quintero, S., Zartha, J. W., & Cortés, F. B. (2012). La curva en S como herramienta para la medición de los ciclos de vida de productos. *Journal of Technology Management & Innovation*, *7*(1), 238-249. doi:10.1016/j.bjm.2017.03.007.

Akemi, M., Soares, T., Carvalho, D., Azarias, A., Martins, E., ... Moreira, D. S. (2017). Tripartite symbiosis of Sophora tomentosa, rhizobia and arbuscular mycorhizal fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, *48*(4), 680-688. doi:10.1016/j.bjm.2017.03.007.

Angel, R., Panhölzl, C., Gabriel, R., Herbold, C., Wanek, W., ... Woebken, D. (2018). Application of stable-isotope labelling techniques for the detection of active diazotrophs. *Environmental Microbiology*, *20*(1), 44-61. doi:10.1111 /1462-2920.13954.

Argaw, A., & Mnalku, A. (2017). Symbiotic effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. vicieae isolated from major highland pulses on field pea (Pisum sativum L.) in soil with abundant rhizobial population. *Annals of Agrarian Science*, *15*(3), 410-419. doi:10.1016/j.aasci.2017.04.005.

Arshi, A. (2017). Reclamation of coalmine overburden dump through environmental friendly method. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *24*(2), 371-378. doi:10.1016/j.sjbs.2015.09.009.

Bilal, M., Ayub, M., Tariq, M., Tahir, M., & Nadeem, M. A. (2017). Dry matter yield and forage quality traits of oat (*Avena sativa* L.) under integrative use of microbial and synthetic source of nitrogen. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, *16*(3), 236-241. doi:10.1016/j.jssas.2015.08.002.

Bionda, C., Babini, S., Martino, A. L., Salas, N. E., & Lajmanovich, R. C. (2018). Impact assessment of agriculture and livestock over age, longevity and growth of populations of common toad Rhinella arenarum (Anura: Bufonidae), central area of Argentina. *Global Ecology and Conservation*, *14*, 1-12. doi:10.1016/j.gecco.2018.e00398.

Braun, J., Mooshammer, M., Wanek, W., Prommer, J., Walker, T. W. N., ... Richter, A. (2018). Full 15 N tracer accounting to revisit major assumptions of dilution approaches for gross nitrogen mineralization N isotope pool. *Soil Biology and Biochemistry*, *117*, 16-26. doi:10.1016/j.soilbio.2017.11.005.

Camelo-Rusinque, M., Moreno-Galván, A., Romero-Perdomo, F., & Bonilla-Buitrago, R. (2017). Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial como biofertilizante. *Revista Argentina de Microbiología*, *49*(3), 289-296. doi:10.1016/j.ram.2016.06.005.

Carter, A. M., & Tegeder, M. (2016). Increasing nitrogen fixation and seed development in soybean requires complex adjustments of nodule nitrogen metabolism and partitioning processes. *Current Biology*, *26*(15), 2044-2051. doi:10.1016/j.cub.2016.06.003.

Castanheira, N. L., Dourado, A. C., Pais, I., Semedo, J., Scotti-Campos, P., Borges, N., ... Fareleira, P. (2017). Colonization and beneficial effects on annual ryegrass by mixed inoculation with plant growth promoting bacteria. *Microbiological Research*, *198*, 47-55. doi:10.1016/j.micres.2017.01.009.

Chalk, P. M., & Craswell, E. T. (2018). An overview of the role and significance of 15 N methodologies in quantifying biological N 2 fixation (BNF) and BNF dynamics in agro-ecosystems. *Simbiosis*, *75*(1), 1-16. doi:10.1007/s13199-017-0526-z.

Chauhan, A., Guleria, S., Balgir, P. P., Walia, A., Mahajan, R., ... Shirkot, C. K. (2017). Tricalcium phosphate solubilization and nitrogen fixation by newly isolated *Aneurinibacillus aneurinilyticus* CKMV1 from rhizosphere of *Valeriana jatamansi* and its growth promotional effect. *Brazilian Journal of Microbiology*, *48*(2), 294-304. doi:10.1016/j.bjm.2016.12.001.

Das, S., & De, T. K. (2018). Microbial assay of N_2 fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay. *MethodsX*, *5*, 909-914. doi:10.1016/j.mex.2017.11.010.

De Andrade, A., Albenísio, J., Bonifacio, A., Cerqueira, A., & Barreto, V. (2018). Antioxidant response of cowpea co-inoculated with plant growth-promoting bacteria under salt. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49*(3), 513-521. doi:10.1016/j.bjm.2017.12.003.

De Carvalho, E. X., Simões, R., Menezes, C., Dolores, A., De Freitas, S., ... De Queiroz, R. O. (2017). The ^{15}N natural abundance technique to assess the potential of biological (BNF) in some important C4 grasses. *Australian Journal of Crop Science*, *11*(12), 1559-1564. doi:10.21475/ajcs.17.11.12.pne729.

Dilworth, M. J. (1966). Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum. Biochim Biophys Acta*, 127(2), 285-294

Dutta, S., Datta, J. K., & Mandal, N. C. (2017). Evaluation of indigenous rhizobacterial strains with reduced dose of chemical fertilizer towards growth and yield of mustard (*Brassica campestris*) under old alluvial soil zone of West Bengal, India. *Annals of Agrarian Science*, *15*(4), 447-452. doi:10.1016/j.aasci.2017.02.015.

Fonseca, S., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Balieiro, D. C., Tiedje, J. M., ... Rachid, C. (2017). The microbiome of eucalyptus roots under different management conditions and its potential for biological nitrogen fixation. *Microbial Ecology*, *75*(1), 183-191. doi:10.1007/s00248-017-1014-y.

Fuertes-Mendizábal, T., Estavillo, J. M., Duñabeitia, M. K., Huérfano, X., Castellón, A., ... González-Moro, M. B. (2018). 15 N natural abundance evidences a better use of N sources by late nitrogen application in bread wheat. *Frontiers in Plant Science*, *9*(853), 1-11. doi:10.3389/fpls.2018.00853.

2020 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

García, J. E., Maroniche, G., Creus, C., Suárez-Rodríguez, R., Ramirez-Trujillo, J. A., & Groppa, M. D. (2017). In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiological Research*, *202*, 21-29. doi:10.1016/j.micres.2017.04.007.

Hamawaki, R. L., & Kantartzi, S. K. (2018). Fixação de nitrogênio na fase inicial e final de desenvolvimento da soja. *Acta Scientiarum - Agronomy*, *40*(1), 1-10. doi:10.4025/actasciagron.v40i1.36372.

Hashem, A., Kumar, A., Al-Dbass, A. M., Alqarawi, A. A., Al-Arjani, A. F., Singh, G., ... Allah, A. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi and biochar improves drought tolerance in chickpea. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(3), 614-624 doi:10.1016/j.sjbs.2018.11.005.

Jaiswal, S. K., Msimbira, L. A., & Dakora, F. D. (2017). Phylogenetically diverse group of native bacterial symbionts isolated from root nodules of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in South Africa. *Systematic and Applied Microbiology*, *40*(4), 215-226. doi:10.1016/j.syapm.2017.02.002.

Kataria, S., & Baghel, L. (2016). Influence of UV exclusion and Selenium on Carbon fixation, Nitrogen fixation and yield of soybean variety JS-335. *South African Journal of Botany*, 103, 126-134. doi:10.1016/j.sajb.2015.09.003.

Khalifa, A. Y. Z., & AlMalki, M. (2018). Polyphasic characterization of *Delftia acidovorans* ESM-1, a facultative methylotrophic bacterium isolated from rhizosphere of *Eruca sativa*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 1-6. doi:10.1016/j.sjbs.2018.05.015.

Leite, J., Ribeiro, S., Simões-Araújo, J. L., Gouvêa, N., Ribeiro, G., & Édson, J. (2017). Genomic identification and characterization of the elite strains *Bradyrhizobium yuanmingense* BR 3267 and *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262 recommended for cowpea inoculation in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49*(4), 703-713. doi:10.1016/j.bjm.2017.01.007.

Liu, H., Zhang, L., Meng, A., Zhang, J., Xie, M., ... Qiu, L. (2017). Isolation and molecular identification of endophytic diazotrophs from seeds and stems of three cereal crops. *PLoS ONE, 12*(10), 1-11. doi:10.1371/journal.pone.0187383.

Mondal, T., Datta, J. K., & Mondal, N. K. (2017). Chemical fertilizer in conjunction with biofertilizer and vermicompost induced changes in morpho-physiological and bio-chemical traits of mustard crop. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, *16*(2), 135-144. doi:10.1016/j.jssas.2015.05.001.

Mwenda, G. M., Hara, G. W. O., De Meyer, S. E., Howieson, J. G., & Terpolilli, J. J. (2018). Genetic diversity and symbiotic effectiveness of Phaseolus vulgaris -Nodulating rhizobia in Kenya. *Systematic and Applied Microbiology*, *41*(4), 291-299. doi:10.1016/j.syapm.2018.02.001.

Ndungu, S. M., Messmer, M. M., Ziegler, D., Gamper, H. A., Mészáros, É., ... Thonar, C. (2018). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) hosts several widespread bradyrhizobial root nodule symbionts across contrasting agro-ecological production areas in Kenya. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *261*, 161-171. doi:10.1016/j.agee.2017.12.014.

Osei, O., Abaidoo, R. C., Ahiabor, B. D. K., & Boddey, R. M. (2018). Bacteria related to *Bradyrhizobium yuanmingense* from Ghana are effective groundnut micro-symbionts. *Applied Soil Ecology*, *127*, 41-50. doi:10.1016/j.apsoil.2018.03.003.

Pai, M., Mcculloch, M., Gorman, J. D., Pai, N., Enanoria, W., Kennedy, G., ... Colford, J. M. (2004). Systematic reviews and meta-analyses : an illustrated, step-by-step guide. *Clinical Research Methods*, *17*(2), 86-95.

Polania, J., Poschenrieder, C., Rao, I., & Beebe, S. (2016). Estimation of phenotypic variability in symbiotic nitrogen fixation ability of common bean under drought stress using 15 N natural abundance in grain. *European Journal of Agronomy*, *79*, 66-73. doi:10.1016/j.eja.2016.05.014.

Rampadarath, S., Bandhoa, K., Puchooa, D., Jeewon, R., & Bal, S. (2017). Early bacterial biofilm colonizers in the coastal waters of Mauritius. *Electronic Journal of Biotechnology*, *29*, 13-21. doi:10.1016/j.ejbt.2017.06.006.

Ribeiro, D., Ferreira, A., Idaline, M., Cavalcanti, P., Elena, I., ... Fernandes-júnior, P. I. (2018). Phenotypic, genetic and symbiotic characterization of *Erythrina velutina* rhizobia from Caatinga dry forest. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49*(3), 503-512. doi:10.1016/j.bjm.2017.09.007.

Rigonato, J., Kent, A. D., Gumiere, T., Henrique, L., Branco, Z., ... Paulo, S. (2017). Temporal assessment of microbial communities in soils of two contrasting mangroves. *Brazilian Journal of Microbiology*, *49*(1), 87-96. doi:10.1016/j.bjm.2017.04.008.

Ritchie, M. E., & Raina, R. (2016). Effects of herbivores on nitrogen fixation by grass endophytes, legume symbionts and free-living soil surface bacteria in the Serengeti. *Pedobiologia*, *59*, 233-241. doi:10.1016/j.pedobi.2016.09.001.

Roley, S. S., Xue, C., Hamilton, S. K., Tiedje, J. M., & Philip, G. (2018). Isotopic evidence for episodic nitrogen fixation in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Soil Biology and Biochemistry*, *129*, 99-98. doi:10.1016/j.soilbio.2018.11.006.

Sainju, U. M. (2017). Determination of nitrogen balance in agroecosystems. *MethodsX*, *4*, 199-208. doi:10.1016/j.mex.2017.06.001.

Santos, A. A., Silveira, J. A. G., Guilherme, E. A., Bonifacio, A., Rodrigues, A. C., & Figueiredo, M. D. V. B. (2018). Changes induced by co-inoculation in nitrogen–carbon metabolism in cowpea under salinity stress. Brazilian Journal of Microbiology, 49(4), 685-694. doi:10.1016/j.bjm.2018.01.007.

Satyanarayana, S. D. V, Krishna, M. S. R., Pavan, P., & Jeereddy, S. (2018). In silico structural homology modeling of nif a protein of rhizobial strains in selective legume plants. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 16(2), 731-737. doi:10.1016/j.jgeb.2018.06.006.

Schoŏllhorn, R. & Burris, R. H. (1967). Acetylene as a competitive inhibitor of N_2 fixation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *58*, 213-216

Stewart, W. D., Fitzgerald, G. P., Burris, R. H., & Nov, N. (1967). In situ studies on N_2 fixation using the acetylene reduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *58*(5), 2071-2078.

Tahon, G., & Willems, A. (2017). Isolation and characterization of aerobic anoxygenic phototrophs from exposed soils from the Sør Rondane Mountains, East Antarctica. *Systematic and Applied Microbiology*, *40*(6), 357-369. doi:10.1016/j.syapm.2017.05.007.

Tai-wen, Y., Ping, C., Quian, D., Quing, D., Feng, Y., Xiao-chun, W., Wei-guo, L., & Wen-yu, Y. (2018). Optimized nitrogen application methods to improve nitrogen use efficiency and nodule nitrogen fixation in a maize-soybean relay intercropping system. *Journal of Integrative Agriculture*, *17*(3), 664-676. doi: 10.1016/S2095-3119(17)61836-7.

Tchuisseu Tchakounté, G. V., Berger, B., Patz, S., Fankem, H., & Ruppel, S. (2018). Community structure and plant growth-promoting potential of cultivable bacteria isolated from Cameroon soil. *Microbiological Research*, *214*, 47-59. doi:10.1016/j.micres.2018.05.008.

Thilakarathna, M. S., Moroz, N., & Raizada, M. N. (2017). A biosensor-based leaf punch assay for glutamine correlates to symbiotic nitrogen fixation measurements in legumes to permit rapid screening of rhizobia inoculants under controlled conditions. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1-11. doi:10.3389/fpls.2017.01714.

Thilakarathna, M. S., & Raizada, M. N. (2018). Challenges in using precision agriculture to optimize symbiotic nitrogen fixation in legumes: progress, limitations , and future improvements needed in diagnostic testing. *Agronomy*, 8(5), 1-21. doi:10.3390/agronomy8050078.

Van Vugt, D., Franke, A. C., & Giller, K. E. (2018). Understanding variability in the benefits of N_2-fixation in soybean-maize rotations on smallholder farmers' fields in Malawi. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, *261*(36), 241-250. doi:10.1016/j.agee.2017.05.008.

Wambeke, F. Van, Gimenez, A., Duhamel, S., Dupouy, C., & Lefevre, D. (2018). Dynamics and controls of heterotrophic prokaryotic production in the western tropical south Pacific ocean: links with diazotrophic and photosynthetic activity. *Biogeosciences*, *15*(9), 2669-2689. doi:10.5194/bg-15-2669-2018.

Yan, K., Ranjitkar, S., Zhai, D., Li, Y., Xu, J., ... Lu, Y. (2017). Current re-vegetation patterns and restoration issues in degraded geological phosphorus-rich mountain areas: a synthetic analysis of central Yunnan, SW China. *Plant Diversity*, *39*(3), 140-148. doi:10.1016/j.pld.2017.04.003.

Yong, T. W., Chen, P., Dong, Q., Du, Q., Yang, F., Wang, X. C., ... Yang, W. Y. (2018). Optimized nitrogen application methods to improve nitrogen use efficiency and nodule nitrogen fixation in a maize-soybean relay intercropping system. *Journal of Integrative Agriculture*, *17*(3), 664-676. doi:10.1016/S2095-3119(17)61836-7.

2020 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria