


Contribución de gramíneas forrajeras a la fijación biológica de nitrógeno y su respuesta a la inoculación de diazótrofes. Revisión



Dania Fonseca López ^a

Nelson Vivas Quila ^b

Raúl Cuervo Mulet ^c

Carlos Eduardo Rodríguez Molano ^{d*}

^a Universidad Santo Tomás. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Sostenible. Tunja, Colombia.

^b Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación NUTRIFACA. Popayán, Colombia.

^c Universidad de San Buenaventura. Facultad de Ingeniería. Cali, Colombia.

^d Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia UPTC. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Tunja, Colombia.

* Autor de correspondencia: carlos.rodriguez@uptc.edu.co

Resumen:

El uso de insumos de origen químico ha generado pérdida de la diversidad microbiana que interviene en el ciclo del N como bacterias diazótrofes, que son inhibidas por saturación de los receptores encargados de activar la nitrogenasa. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) en gramíneas forrajeras puede ser utilizada como servicio ecosistémico. El objetivo de este artículo de revisión fue analizar la contribución de gramíneas forrajeras a la FBN y su respuesta a la inoculación de diazótrofes no simbióticas para encontrar oportunidades de estudio. El análisis de la información se realizó a partir de la metodología prisma de revisiones sistemáticas y meta-análisis. Se destaca que las principales especies forrajeras que contribuyen con la FBN corresponden a *Brachiaria* sp. y *Pennisetum* sp. La inoculación de

Azospirillum sp. ha generado efecto promotor de crecimiento en gramíneas, pero, la respuesta del forraje inoculado depende principalmente de la sinergia entre planta – bacteria presentándose efectos neutros, antagonicos y positivos.

Palabras clave: Fertilización, Fijación nitrógeno, Forraje, Nitrogenasa, Pastos.

Recibido: 23/08/2023

Aceptado: 21/12/2023

Introducción

En los sistemas ganaderos la alimentación de los animales resulta viable económicamente cuando la ración está conformada principalmente por forraje. Pero, es necesario producir pasto en un escenario ecoeficiente para compensar la huella ambiental ocasionada por la ganadería, teniendo en cuenta que en Colombia ocupa el 80 % del suelo con vocación agrícola⁽¹⁾. Las estrategias propuestas incluyen el uso de especies forrajeras mejoradas, la diversificación del sistema⁽¹⁾ y el aprovechamiento de fenómenos naturales como la fijación biológica de nitrógeno (FBN)⁽²⁾. Este, es un proceso en que diazótrofes transforman nitrógeno (N) atmosférico en amonio a partir del complejo enzimático nitrogenasa, y aporta cerca del 62 % lo que equivale a 11.29 millones de toneladas (Mt) de nitrógeno al año que ingresa al ecosistema agrícola Latinoamericano, mientras que la fertilización química contribuye aproximadamente con 6.81 Mt N al año⁽³⁾. La FBN es un recurso que puede ser utilizado como herramienta tecnológica para reducir la aplicación de fertilizantes nitrogenados de origen sintético que tienen baja eficiencia (aproximadamente 40-50 %), y contribuyen con la emisión de gases efecto invernadero (amonio, amoniaco y el óxido nitroso)⁽⁴⁾ y salinización del suelo⁽⁵⁾. Sin embargo, poco se conoce sobre el aporte de las gramíneas forrajeras a la FBN y las especies bacterianas con mejor efecto productivo. Por esto, el objetivo de este trabajo fue analizar la contribución de gramíneas forrajeras a la FBN, y su respuesta a la aplicación de biofertilizantes constituidos por bacterias diazótrofes no simbióticas puras, y en consorcio a partir de una revisión sistemática de literatura para encontrar oportunidades de estudio.

Se utilizó la metodología prisma de revisiones sistemáticas⁽⁶⁾, las bases de datos consultadas fueron Scopus y Web of Science; para la búsqueda de información se establecieron los siguientes criterios: a) especificidad, a partir del uso de operadores booleanos, b) sensibilidad, con descriptores CAB; c) exhaustividad, a través de la comprobación de los descriptores de interés. La estrategia de búsqueda fue a partir de las rutas: TITLE-ABS-KEY (“Biofertilizer”) y TITLE-ABS-KEY (“Biofertilizer and Grass”). Con la búsqueda general se encontraron en total 6,813 registros entre las bases Scopus (n=4,621) y Web of Science (n= 2,192). La

búsqueda se limitó a los conectores boléanos “Biofertilizer and Grass” a partir de los cuales se encontraron 128 registros (Scopus: 84 registros y Web of Science: 44 registros) que fueron importados al software Mendeley y se agruparon por años; el análisis se limitó al periodo 2012-2022 (n= 80 registros), luego se eliminaron los documentos duplicados (n= 2 registros). Se incluyeron en el análisis artículos donde se evaluó el efecto de la aplicación de biofertilizantes en forrajes o la contribución de nitrógeno fijado por estas plantas. Se excluyeron publicaciones con un título por fuera de la búsqueda de interés (n= 5) y con información únicamente descriptiva que no cumplían los criterios de inclusión (n= 13 registros). Cada registro se revisó de forma independiente por todos los autores para un total de 50 estudios incluidos dentro de la revisión. Se definieron como resultados del análisis: a) Nitrógeno fijado por gramíneas forrajeras, b) Biofertilizantes aplicados y su efecto en gramíneas forrajeras. Los datos de interés de estudio (Nitrógeno fijado y efecto en planta) fueron tabulados y agrupados por tema para medir su efecto. Se realizó un análisis de regresión no lineal con el número de los registros obtenidos a partir de los modelos sigmoideal 3,4, Gompertz 3, y Hill 3. Los modelos con mayor ajuste se seleccionaron de acuerdo con el valor de significancia y ajuste del coeficiente de determinación para establecer la tendencia global del área de interés.

Fijación biológica de nitrógeno en gramíneas forrajeras

En esta revisión se identificó que la prueba de elección para determinar el nitrógeno fijado por gramíneas forrajeras es abundancia natural de $^{15}\text{N}^{(7)}$. En las principales investigaciones donde se reporta N fijado por forraje, se destaca que la tasa de fijación de N difiere entre especies (Cuadro 1). Esto tiene una relación directa con las poblaciones de bacterias diazótroficas que interactúan con cada tipo de forraje, en *Brachiaria* sp. se estima aproximadamente de 10^2 a 10^8 UFC g^{-1} suelo⁽⁸⁾. Mientras que en *Pennisetum* sp. se reporta que la población bacteriana diazótropa es de 10^2 a 10^6 UFC g^{-1} suelo⁽⁹⁾.

Cuadro 1: Algunos reportes de especies forrajeras que contribuyen con la fijación biológica de nitrógeno según análisis de revisión

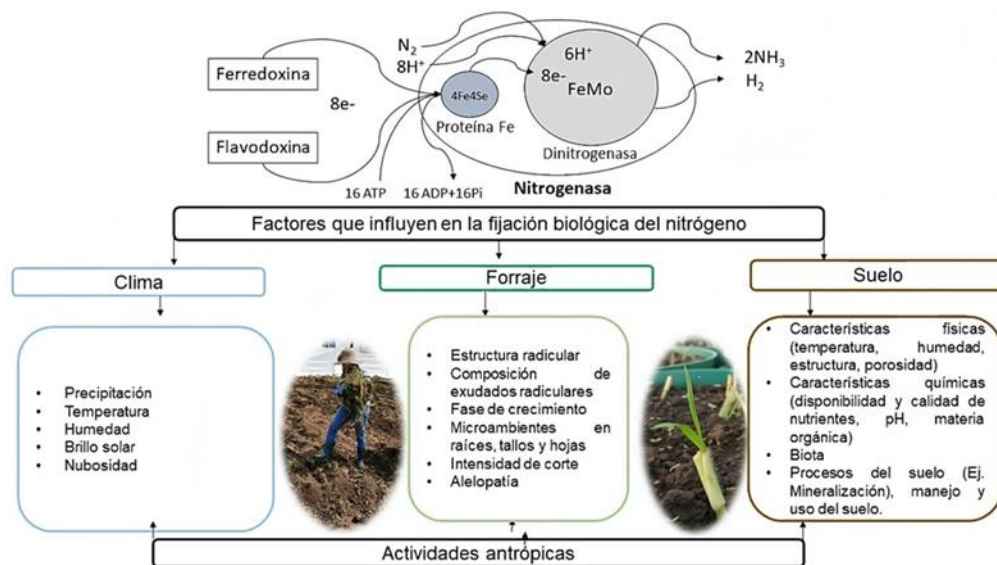
Cultivo	N fijado (%)	Fuente
<i>Aristida laevis</i>	36	Marques AC, <i>et al</i> ⁽²⁾
<i>Pennisetum purpureum</i>	18-70	De-Morais RF, <i>et al</i> ⁽¹⁰⁾
<i>Megathyrsus maximus</i> sp.	16 - 39	De-Carvalho EX, <i>et al</i> ⁽¹¹⁾
<i>Brachiaria</i> sp.	5.1 – 45	Leite RDC, <i>et al</i> ⁽¹²⁾
<i>Miscanthus giganteus</i>	16	Leite RC, <i>et al</i> ⁽¹³⁾

Fuente: elaborado a partir de citas indicadas.

Se encontró que los principales géneros bacterianos que persisten en rizosfera y tejido vegetal de *Brachiaria* sp., *Pennisetum* sp., *Megathyrsus* sp. y *Panicum* sp., corresponden a *Enterobacter* sp. (6 %)⁽¹⁰⁾, *Azospirillum* sp. (25 %)^(12,13,14), *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp.

(14 %)^(2,15), *Herbaspirillum* sp. (11 %), *Burkholderia* sp. (8 %)⁽¹⁴⁾, *Bradyrhizobium* sp. (6 %), *Klebsiella* sp. (5 %)^(11,16), *Sphingomonas* sp. (4 %)⁽¹⁷⁾, otras (2 %). Aunque, su distribución en raíces, hojas y tallos varía por especie forrajera, localidad y tipo de suelo⁽¹⁸⁾. Estos microorganismos no causan modificaciones estructurales en la planta y están codificados con el gen *nifH*⁽⁴⁾. El proceso de FBN lo realizan en sitios con menor saturación de oxígeno para evitar la inactivación de la nitrogenasa, como en las arcillas o a través de la reducción en la concentración de oxígeno intracelular a partir del incremento en la respiración celular⁽¹⁹⁾. Durante la reacción, ocho electrones son bombeados a alta velocidad desde un agente donante (ferredoxina o flavodoxina) hacia el complejo enzimático nitrogenasa constituido por las metaloenzimas dinitrogenasa reductasa o proteína Fe codificada por el gen *nifH* y la metaloenzima dinitrogenasa codificada por los genes *nifD* y *nifK*⁽²⁰⁾. La dinitrogenasa reductasa trasfiere cada electrón a la dinitrogenasa y son almacenados en el cofactor FeMo, sitio de unión del N hasta que es reducido a NH₃, de este modo, se consumen 16 ATP y se producen 2 mol de amonio y 1 mol de H₂ por cada molécula de N fijada⁽²¹⁾. Como resultado de la revisión, se encontró que las diferencias en los rangos de nitrógeno fijado entre forrajes y especies del mismo género está determinada principalmente por los factores: planta, suelo, actividades antrópicas y clima (Figura 1).

Figura 1: Factores que influyen en la fijación biológica del N en gramíneas forrajeras



Fuente: elaborada a partir de las citas^(2,5,11,18,21,22).

Efecto del clima en la FBN de forrajes

Aunque son escasos los estudios en los que se analiza el efecto del clima sobre el proceso de FBN, se destaca que la nubosidad influye negativamente en este proceso, por la menor disponibilidad de fotoasimilados que se producen en las hojas y se distribuyen hacia las raíces para la formación de rizoexudados⁽²³⁾. La mayor producción de fotoasimilados parece tener

una relación directa con la persistencia de diazótrofos inoculados, lo que favorece su efecto; por ejemplo, con la aplicación de *Azospirillum brasilense* en *Urochloa brizantha* se ha observado que al comienzo de la estación seca en la cual incrementa la radiación solar, la masa de las raíces de plantas inoculadas fue un 27 % mayor que en plantas no inoculadas, y aunque durante la época de transición disminuyó la producción de pasto, en plantas inoculadas se redujo en solo 7 % y su altura incrementó un 16 % respecto a plantas no inoculadas, por la mayor absorción de nutrientes⁽¹²⁾. Respuestas similares se reportan con la aplicación de *Bacillus* sp. en *Megathyrus maximus*⁽²⁴⁾.

Garantizar la persistencia de comunidades diazótroficas puede reducir la dependencia de fertilización nitrogenada⁽¹³⁾; sin embargo, en época lluviosa la fijación de N por efecto bacteriano puede disminuir quizás por el arrastre de los microorganismos^(1, 9). Esto puede explicar por qué se reporta que al final de la estación húmeda la biomasa radicular disminuye en 15 % en plantas inoculadas y se presenta menor contenido de N en las hojas respecto a plantas fertilizadas con N⁽¹²⁾.

En ambientes deficientes de N la FBN incrementa como una respuesta de control cuando hay bajas tasas de mineralización^(4,25). De este modo se reporta mayor N acumulado en otoño que en primavera por efecto de una menor temperatura en los forrajes *Axonopus affinis* (37.6 kg N ha⁻¹), *Paspalum notatum* (27.7 kg N ha⁻¹) y *Andropogon lateralis* (1.6 kg N ha⁻¹) estimándose que en promedio el porcentaje de N proveniente de la FBN es de 33 %, 22 % y 25 % respectivamente⁽²⁾.

Efecto del suelo en la FBN de forrajes

Las características del suelo también influyen en la FBN⁽²²⁾ destacan mayor diversidad de poblaciones diazótroficas en suelos con alta materia orgánica. La persistencia de estos microorganismos está modulada por el tipo y calidad de nutrientes en el suelo⁽²²⁾ explican, que los diazótrofos incrementan su actividad con presencia de hierro (Fe), molibdeno (Mo) y vanadio (V) debido a que estos elementos pueden intercambiarse para hacer parte de la estructura de la nitrogenasa. Esta enzima, al inactivarse con el oxígeno, requiere de micrositios anaerobios para catabolizar la fijación de nitrógeno, por esto, parece que en suelos arcillosos hay mayor movilización química, mineral, y eventualmente mayor FBN⁽²¹⁾.

Efecto de las actividades antrópicas en la FBN de forrajes

El suelo es un sistema que se autorregula naturalmente, pero, cambios bruscos en sus características por actividades antrópicas de manejo (labranza, fertilización) y uso (pastos permanentes con y sin intervención, ganadería), causan desbalance en las comunidades bacterianas, ya que alteran la estructura de los poros, la disponibilidad de elementos, el

contenido de carbono orgánico y el pH, factores que determinan la riqueza, uniformidad y diversidad de microorganismos^(2,22).

La aplicación excesiva de Ca, nitrato y N durante la fertilización tiene un efecto negativo en las poblaciones diazótrofes⁽¹⁷⁾. La principal causa se relaciona con el pH del suelo^(12,22); variaciones en 1.5 del valor del pH del suelo puede reducir el crecimiento de los microorganismos hasta en 50 % en suelos con un pH entre 5 y 7^(12,22). Se reporta, la inhibición en el crecimiento de algunas poblaciones microbianas, como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Gluconoacetobacter diazotrophicus* con altas dosis de fertilización con N^(2,10,26), por ejemplo, con la aplicación de 430 kg N ha⁻¹ en *B.brizanta* y *B. ruziziensis*⁽²⁷⁾. Sin embargo, el tipo y cantidad de fertilizante aplicado influye en la abundancia y diversidad de las poblaciones microbianas; se ha observado incremento de metanótrofos con aportes mayores de 200 µg N g⁻¹ de amoníaco al superarse el sitio activo del amonio monooxigenasa⁽²⁸⁾. En general, la modificación estructural de la comunidad bacteriana es un mecanismo natural de control del estado de nitrógeno en el suelo⁽²⁾.

Efecto del factor planta en la FBN de forrajes

Las características morfo fisiológicas de las gramíneas generan microambientes disímiles en hojas, tallos y raíces, que promueven el crecimiento selectivo de miembros de la población bacteriana durante la fase de crecimiento⁽⁴⁾. En la fase temprana, es mayor la actividad de poblaciones diazótrofes rizosféricas por incremento en las rizodeposiciones como mecanismo de recuperación de la planta posterior al pastoreo⁽¹³⁾. La interacción entre las bacterias diazótrofes y la planta, sucede a partir de las rizodeposiciones que incluyen varias moléculas como azúcares, polisacáridos, ácidos orgánicos inorgánicos, aminoácidos, vitaminas, flavonoides, sideróforos, péptidos, proteínas y ácidos grasos⁽²⁹⁾. Estas señales químicas controlan las interacciones que suceden en el suelo y son las responsables de promover el crecimiento selectivo de miembros de la comunidad rizosférica y permiten el desplazamiento de las bacterias hacia la raíz de la planta y los pelos radiculares⁽²⁴⁾. La diversa capacidad funcional de las bacterias diazótrofes permite modular la respuesta de crecimiento del forraje y generar interacciones positivas, negativas o neutras. A continuación, se discuten los principales hallazgos encontrados en relación con la respuesta de forraje con la inoculación de diazótrofes.

Biofertilizantes constituidos por diazótrofes que han sido utilizados en gramíneas

A partir de 1985 se reportan los primeros estudios científicos en el área de biofertilizantes aplicados a forrajes, aunque históricamente es una práctica que data del año 500 A.C. originaria de la India, país que continúa liderando los avances científicos con un 30 % de

participación mundial seguido de Brasil (10 %) y China (8.8 %). En el área de biofertilizantes aplicados en forrajes se destacan autores como Gupta *et al*⁽⁴⁾, Li H *et al*⁽¹⁵⁾ y De Sousa *et al*⁽³⁰⁾. Se estima un rápido crecimiento en el área con un punto de inflexión para el año 2034 (Cuadro 2), proyección que muestra la existencia de oportunidades de estudio que van ligadas con el fenómeno de cambio climático y el reto de utilización de estrategias de fertilización sostenibles que reduzcan la aplicación de productos químicos obtenidos por la quema de combustibles fósiles como la urea.

Cuadro 2: Modelos de regresión no lineal obtenidos para las búsquedas “Biofertilizer” y “Biofertilizer and grass”

Código booleano	Modelo	Año de inflexión	Durbin Watson	a	b	R ²	Valor P
Biofertilizer	Sigmoidal 3 Parameter	2034	1.07	10988	5.7	0.99	0.01
	Sigmoidal, 3 Parameter	2029	1.87	21.42	4.34	0.96	0.01
	Sigmoidal, 4 Parameter	2018	2.89	26.96	5.4	0.90	0.01
Biofertilizer and grass	Gompertz, 3 Parameter	2018	2.93	33.68	10.42	0.90	0.01
	Hill,3 Parameter	2016	0.82	21.34	92.85	0.58	0.01

Fuente: Elaboración propia.

La tendencia de uso de biofertilizantes en forrajes es sigmoideal con un punto de inflexión hacia el año 2029 como se observa en el modelo logístico con mayor ajuste que obtuvo un valor Durbin Watson cercano a 2⁽⁷⁾, aunque, la predicción por los modelos Gompertz y Hill es anterior, pero con un menor ajuste (R²), por lo tanto, no predicen un comportamiento confiable (Cuadro 2). El punto de inflexión se asocia con la fase de rápido crecimiento de la tecnología y corresponde al valor máximo de la curva a partir del cual se prevé empiezan a disminuir las publicaciones relacionadas con biofertilizantes. Estas predicciones con alta variación se relacionan con áreas de aplicación en creciente desarrollo, y es que la fertilización orgánica empieza a cobrar importancia en el sector ganadero por el alza en el costo de los fertilizantes químicos.

A partir del análisis de revisión se encontró, que los biofertilizantes utilizados en pastos han sido aplicados por inoculación de semilla en el producto durante 30 min a 24 h seguido de un tiempo de secado previo a la siembra^(2,31) o por aspersión en dosificaciones que varían entre 200 – 500 ml de inoculante ha⁻¹ diluido en agua al 0.1 - 1.3 % en una concentración mínima de 10⁶ UFC ml⁻¹ o 10⁶ UFC g⁻¹⁽³²⁻³⁶⁾.

La inoculación de microorganismos puede modificar el desarrollo del forraje con alta variabilidad entre géneros y cepas aplicadas o incluso no causar efecto, o generar una respuesta negativa⁽³⁵⁾ (Cuadro 3). Cuando los biofertilizantes se han aplicado junto con una fuente de N sintético, se han logrado respuestas superiores o equivalentes a la aplicación del 100 % del requerimiento de N por una absorción más eficiente, reduciéndose las pérdidas de N causadas por lixiviación hasta en un 95 %⁽³⁶⁾. Los mejores resultados en términos productivos y económicos se han observado con la aplicación combinada del inoculante y N⁽³⁶⁻⁴⁰⁾.

Cuadro 3: Algunos estudios del efecto de la aplicación de diazótrofos en gramíneas forrajeras

Forraje	Inoculante	Incremento porcentual de parámetros biológicos comparado con plantas no inoculadas	Fuente
<i>Brachiaria decumbens</i>	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> y <i>H. seropedicae</i>	12 % en la proteína cruda	(1)
<i>Megathyrsus maximus</i>	<i>Bacillus</i> sp y <i>Bacillus megaterium</i>	7.32 %, 25.3 %, 3.32 %, 20.3 %, 2.43 % en la altura, biomasa de raíz, digestibilidad, proteína y fibra detergente neutro respectivamente.	(15)
<i>Avena saliva</i> L.	<i>Klebsiella</i> sp.	20 % en biomasa	(16)
<i>Panicum virgatum</i> L.	<i>Burkholderia phytofirmans</i>	27 % en la altura	(19)
<i>Brachiaria ruziziensis</i>	<i>A. brasilense</i>	31.49 % en el contenido relativo de agua de las hojas	(27)
<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	63 y 51 % en la producción de masa seca de las plantas y biomasa respectivamente	(32)
<i>Brachiaria brizantha</i>	<i>Burkholderia pyrrocinia</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>	770 %, 300 %, 17 % en biomasa de raíz, materia seca y clorofila respectivamente	(33)
<i>Panicum virgatum</i> L.	<i>Azospirillum brasilense</i>	23 % en biomasa	(34)
<i>Avena saliva</i> L.	<i>Sinorhizobium meliloti</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>A. chroococum</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.	10.34 y 28.92 % en altura y longitud de raíz (28.92 %)	(37)

<i>Pennisetum clandestinum</i>	<i>Klebsiella</i> sp., <i>Beijerinckia</i> sp., <i>Achromobacter</i> sp.	52 %, 170 %, 134 % en la longitud del brote, peso seco del brote y longitud de raíz respectivamente	(41)
<i>Megathyrsus maximus</i>	<i>Bacillus</i> sp.	30.8 % y 12.7 % en la producción de biomasa y altura respectivamente	(42)
<i>Avena saliva</i> L.	<i>Providencia rettgeri</i> , <i>Advenella incenata</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Serratia plymuthica</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	81.19 %, 26.89 %, 10.94 % en la altura, longitud de raíz y clorofila respectivamente	(43)
<i>Avena saliva</i> L.	<i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>B. thuringiensis</i>	92 % en semillas germinadas	(44)
<i>Phleum pratense</i> L.	<i>Bacillus subtilis</i>	26.6 % y 63.8 % en brotes y raíces respectivamente	(45)
<i>Pennisetum purpureum</i> Schumach	<i>Sphingomonas</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Enterobacter</i>	Incrementado de 116.01 % en el peso seco del brote	(46)
<i>Sorghum bicolor</i> L.	<i>Azotobacter</i> sp y <i>Burkholderia</i> sp.	21.5 % y el 16.8 % en la proteína cruda y digestibilidad de materia seca respectivamente	(47)

Fuente: elaborada a partir de las citas indicadas.

La respuesta positiva de la planta con la inoculación de diazótrofos se da por dos condiciones principalmente, primero por favorecer la disponibilidad de nitrógeno en el suelo que es un elemento que hace parte de las proteínas, aminoácidos, ADN, ARN, citocromos, ácidos nucleicos y la clorofila^(2,21); y segundo por la producción de metabolitos secundarios de origen bacteriano como: a) auxinas que están involucradas en el crecimiento, diferenciación y división celular⁽¹⁶⁾, b) giberelinas, que son hormonas que intervienen la regulación de la división y el alargamiento celular, en la germinación de semillas, aparición de yemas y en el crecimiento de los tallos⁽⁴⁸⁾, c) citocinas que están relacionadas con la regulación del crecimiento celular⁽⁴⁸⁾, d) sideróforos que son compuestos que pueden unirse al hierro dejándolo disponible para ser utilizado en procesos metabólicos⁽²⁶⁾ y e) biosurfactantes que son agentes químicos que forman micelas y permiten mejor interacción entre la membrana de los microorganismos y los nutrientes disueltos en el suelo y en las rizodeposiciones⁽⁴⁹⁾.

De estas biomoléculas las más estudiadas son las auxinas; se destaca el ácido indol acético que es sintetizado a partir de triptófano que puede derivarse de las vías: indol-3-acetronilo, indole-3-acetamina, ácido indol-3-piruvico o de triptamina^(48,50). Esta hormona es producida por algunos diazótrofos, por ejemplo: *Stenotrophomona* spp., *Pseudomona* spp⁽⁴⁹⁾,

Azospirillum spp⁽⁵¹⁾, *Azotobacter* spp. y *Pseudomonas* spp⁽²⁶⁾. Su principal efecto se relaciona con la modificación de la estructura, elongación e incremento de biomasa de raíz del forraje⁽³⁷⁾, lo que se favorece la absorción de nutrientes.

El estímulo hormonal que puede causar indirectamente la aplicación de diazótrofos en la planta puede favorecer su plasticidad fenotípica en ambientes sombreados⁽²³⁾, en condiciones de sequía⁽¹⁵⁾ o suelos salinos⁽⁴⁶⁾. Fisiológicamente, la tolerancia a condiciones de estrés se relaciona con un incremento en la actividad de las enzimas superóxido-dismutasa y catalasa que eliminan el H de los radicales libres generados en condiciones estresantes⁽³²⁾. También, se reporta incremento en los contenidos de prolina, glutatión-reductasa⁽⁴²⁾, y en ACC-deaminasa⁽⁴⁶⁾.

Por otro lado, mayor disponibilidad de N en el suelo por efecto bacteriano, permite que la planta pueda aumentar la producción de clorofila al constituir parte de su estructura química, lo que conlleva a un incremento en la tasa fotosintética de la planta y en consecuencia en la producción de biomasa⁽³²⁾. Composicionalmente, puede favorecer el contenido de proteína cruda del forraje⁽¹⁾ y la producción de ácidos grasos insaturados⁽¹⁴⁾.

Pese a los sinergismos mencionados, se reportan repuestas antagónicas con la inoculación de diazótrofos⁽²⁾, por efecto de la inactivación de la nitrogenasa por la exposición a altas dosis de N. Aunque la falta de respuesta también puede deberse a una baja dosis de inoculante aplicado⁽²³⁾, que puede ser inhibido por control alelopático de la planta, lo que genera baja supervivencia, adaptación, y persistencia de los microorganismos inoculados. Incluso, la variabilidad entre el ecosistema puede limitar la respuesta de las bacterias debido a que el proceso de FBN se da solo en ambientes favorables que permiten la persistencia del grupo taxonómico de alfa-proteobacterias^(9, 51).

Conclusiones

La FBN es la principal fuente de N en praderas perennes donde no se aplica N de origen sintético y en áreas de fuerte sequía, donde la planta logra mantener su crecimiento gracias a adaptaciones estructurales como la reducción del material aéreo para incrementar la longitud radicular. Se desconocen los mecanismos específicos de señalización que permiten la expresión de proteínas para la producción de hormonas y enzimas que hacen posibles dichas modificaciones y potencializan comunidades microbianas especializadas en la FBN para favorecer la supervivencia de la planta a condiciones extremas. Sin embargo, se ha identificado que las especies *Brachiaria* spp. y *Pennisetum* spp. tienen alto potencial en contribuir con el proceso de FBN, por la persistencia de alfa proteobacterias en la rizosfera y en el tejido de raíces, tallos y hojas.

Se destaca *Azospirillum* spp. y *Azotobacter* spp., pero de estos, *Azospirillum brasilense* tiene mayor potencial en fijar N por la capacidad de infectar tejido del forraje, lo que facilita eventualmente su supervivencia. Sin embargo, se desconoce si la colonización de este aislado junto con otros microorganismos endófitos resiste el sistema de defensa de la planta durante tiempos de exposición prolongados, y quizás esto, se relacione con la falta de respuesta productiva con la aplicación de algunos inoculantes. Es por esto que el desarrollo biotecnológico de estos productos apunta al estudio de microorganismos nativos, para evitar una respuesta alelopática negativa por la planta.

El incremento de materia seca con la aplicación de biofertilizantes es la principal respuesta observada según el análisis de revisión, este efecto puede permitir eventualmente intervalos entre pastoreos más cortos e intensificar las rotaciones en los sistemas ganaderos. También se ha observado que la aplicación de diazótrofos puede estimular la plasticidad fenotípica de la planta en condiciones de sombra, razón por la que el uso de biofertilizantes puede ser una opción rentable en sistemas silvopastoriles.

Aún existen desafíos como garantizar interacciones positivas entre los microorganismos aplicados y las cepas nativas; desarrollar biofertilizantes combinados con fertilizantes químicos y bioestimulantes; reducir los costos técnicos de aislamiento, masificación y obtención del producto final; formular productos por cultivo y de acuerdo con la etapa de crecimiento; utilizar métodos de seguimiento para la detección y cuantificación de poblaciones bacterianas persistentes que permitan ajustar la dosificación y frecuencia de uso de los biofertilizantes de acuerdo al manejo, cultivo, condiciones ambientales y tipo de suelo; y fomentar su aplicación en los sistemas de granja como servicio eco sistémico.

Agradecimientos y conflicto de interés

A Minciencias convocatoria 779 de 2017, regalías de la Gobernación del departamento de Boyacá – Colombia por el apoyo financiero y Universidad del Cauca proyecto ID. 5150 por el apoyo técnico, además a la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia UPTC y al Grupo de Investigación En Bioquímica y Nutrición Animal GIBNA.

Los autores no tienen conflicto de interés.

Literatura citada:

1. Pinheiro PL, Passos R, Peçanha A, Mendonça A. Application of biofertilizer in degraded pasture modified C dynamics and improved forage yield in a short-term period at the tropical region. *Aust J Crop Sci* 2020;14(12):1889-1897. doi: 10.21475/ajcs.20.14.12.2666.

2. Marques AC, De-Oliveira LB, Nicoloso FT, Jacques RJ, Giacomini SJ. Biological nitrogen fixation in C4 grasses of different growth strategies of South America Natural Grasslands. *Appl Soil Ecol* 2017;(113):54-62. doi:10.1016/j.apsoil.2017.01.011.
3. Guareschi R, Boddey RM, Rodrigues B, Sarkis L, Martins M, Jantalia C, *et al.* Balanço de nitrogênio, fósforo e potássio na agricultura da América Latina e o Caribe. *Terra Latinoam* 2019;37(2):105-119. doi:10.28940/terra.v37i2.423.
4. Gupta V, Kroker S, Hicks M, Davoren C, Descheemaeker K, Llewellyn R. Nitrogen cycling in summer active perennial grass systems in South Australia: Non-symbiotic nitrogen fixation. *Crop Pasture Sci* 2014;65(10):1044-1056. doi:10.1071/CP14109.
5. Acurio R, España C. Aislamiento, caracterización y evaluación de *Trichoderma* spp. como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*). *Lgr* 2016;25(1):53-61. doi:10.17163/lgr.n25.2017.05.
6. Pague M, Mckenzie JE, Bossuyt P, Hoffmann TC, Mulrow C, Shamseer L, *et al.* The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 2021;372(71):1-9. doi:10.1136/bmj.n71.
7. Fonseca LD, Vivas QN, Balaguera LH. Técnicas aplicadas en la investigación agrícola para cuantificar la fijación de nitrógeno: una revisión sistemática. *Cienc Tecnol Agropec Méx* 2019;21(1):1-19. doi:10.21930/rcta.vol21_num1_art:1342.
8. Ribeiro NV, Vidal MS, Barrios SC, Baldani VL, Baldani JI. Genetic diversity and growth promoting characteristics of diazotrophic bacteria isolated from 20 genotypes of *Brachiaria* spp. *Plant Soil* 2020;(451):187-205. doi:10.1007/s11104-019-04263-y.
9. Videira SS, Oliveira DM, Morais RF, Borges WL, Baldani VL, Baldani JI. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. *Plant Soil* 2012;(356):51-66. doi:10.1007/s11104-011-1082-6.
10. De-Morais RF, Quesada DM, Reis VM, Urquiaga S, Alves BJ, Boddey RM. Contribution of biological nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). *Plant Soil* 2012;356(1-2):23-34. doi:10.1007/s11104-011-0944-2.
11. De-Carvalho EX, Menezes CRS, Santiago-De-Freitas AD, Valadares-De-Sa BSE, Simões NDE, *et al.* The ¹⁵N natural abundance technique to assess the potential of biological nitrogen fixation (BNF) in some important C4 Grasses. *Aust J Crop Sci* 2017;11(12):1559-1564. doi:10.21475/ajcs.17.11.12.pne729.

12. Leite RDC, Dos-Santos JG, Silva EL, Alves CR, Hungria M, Leite RD, *et al.* Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. *Crop Pasture Sci* 2019;70(1):61-67. doi:10.1071/CP18105.
13. Leite RC, Santos AC, Santos JG, Leite RC, Oliveira L, Bernardes T, *et al.* Mitigation of Mombasa Grass (*Megathyrsus maximus*) dependence on nitrogen fertilization as a function of inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Rev Bras Cienc Solo* 2019;(43):e0180234. doi: 10.1590/18069657rbcs20180234.
14. Castanheira N, Dourado A, Kruz S, Alves P, Delgado RA, Pais J, *et al.* Plant growth-promoting *Burkholderia* species isolated from annual ryegrass in Portuguese soils. *J Appl Microbiol* 2016;120(39):724-739. doi:10.1111/jam.13025.
15. Li H, Qiu Y, Yao T, Ma Y, Zhang H, Yang X. Effects of PGPR microbial inoculants on the growth and soil properties of *Avena sativa*, *Medicago sativa*, and *Cucumis sativus* seedlings. *Soil Tillage Res* 2020;(199):104577. doi:10.1016/j.still.2020.104577.
16. Gagné-Bourque F, Bertrand A, Claessens A, Aliferis KA, Jabaji S. Alleviation of drought stress and metabolic changes in timothy (*Phleum pratense* L.) colonized with *Bacillus subtilis* B26. *Front Plant Sci* 2016;7(584):1-16. doi:10.3389/fpls.2016.00584.
17. Soman CH, Keymer DP, Kent AD. Edaphic correlates of feedstock-associated diazotroph communities. *Glob Change Biol Bioenergy* 2018;10(5):343-352. doi:10.1111/gcbb.12502.
18. Antunes GD, Santana SR, Escobar IE, Brasil MD, Araújo GG, Voltolini TV, Fernandes PI. Associative diazotrophic bacteria from forage grasses in the Brazilian semi-arid region are effective plant growth promoters. *Crop Pasture Sci* 2019;70(10):899-907. doi:/10.1071/CP19076.
19. Lowman S, Kim-Dura S, Mei C, Nowak J. Strategies for enhancement of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) performance under limited nitrogen supply based on utilization of N-fixing bacterial endophytes. *Plant Soil* 2016;405(1-2):47-63. doi:10.1007/s11104-015-2640-0.
20. Mus F, Colman DR, Peters JW, Boyd ES. Geobiological feedbacks, oxygen, and the evolution of nitrogenase. *Free Radic Biol Med* 2019;(140):250-259. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.050.
21. Herrero A, Flores E, Imperial J. Nitrogen assimilation in bacteria. *Encyclopedia of Microbiology* 2019;(231):280-300. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20680-8.

22. Yulei J, Zhen L, Lifang W, Jianchao B, Biaosheng L, Hui L, *et al.* Effects of chemical fertilizer reduction and co-application with a JUNCAO nitrogen-fixing biofertilizer on growth and nutritional quality of *Pennisetum giganteum* and soil nutrient status. *Acta Agric Sin* 2021;30(3):215-223. doi:10.11686/cyxb2020047.
23. Lopes M, Dias-Filho M, Castro T, Silva G. Light and plant growth-promoting rhizobacteria effects on *Brachiaria brizantha* growth and phenotypic plasticity to shade. *Grass Forage Sci* 2017;73(2):493-499. doi:10.1111/gfs.12336.
24. Abril JL, Roncallo B, Bonilla R. Efecto de la inoculación con bacterias del género *Bacillus* sobre el crecimiento de *Megathyrus maximus Jacq*, en condiciones de estrés hídrico. *Rev Agr Agron Noroeste Argent* 2017;37(1):25-37.
25. Roley SS, Duncan DS, Liang D, Garoutte A, Jackson RD, Tiedje JM, Robertson P. Associative nitrogen fixation (ANF) in switchgrass (*Panicum virgatum*) across a nitrogen input gradient. *PLoS ONE* 2018;13(6):e0197320. doi:10.1371/journal.pone.0197320.
26. Cardenas D, Garrido M, Roncallo B, Bonilla R. Inoculación con *Azospirillum* spp y *Enterobacter agglomerans* en pasto Guinea (*Panicum maximum Jacq.*) en el departamento de Cesar (Colombia). *Rev Fac Nac Agron Medellin* 2014;67(2):7271-7280. doi:10.15446/rfnam.v67n2.44168.
27. Hungria M, Nogueira MA, Araujo RS. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agric Ecosyst Environ* 2016;221(1):125-131. doi:10.1016/j.agee.2016.01.024.
28. Shankar J, Strong PJ. Biologically derived fertilizer: A multifaceted bio-tool in methane mitigation. *Ecotoxicol Environ Saf* 2016;(124):267-276. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.10.018.
29. Castanheira N, Dourado A, Kruz S, Alves P, Delgado-RA, Pais J, *et al.* Plant growth-promoting *Burkholderia* species isolated from annual ryegrass in Portuguese soils. *J Appl Microbiol* 2016;120(39):724-739. doi:10.1111/jam.13025.
30. De-Souza M, Florentino LA, Rabêlo FH, De Rezende AV, Roman Da-Costa SF, Borgo L. Características morfológicas, produtivas e bromatológicas do Capim-xaraés: adubação nitrogenada em cobertura versus inoculação com bactérias diazotróficas. *Cienc Anim Bras* 2019;(20):1-12.
31. Bauer JT, Kleczewski NM, Bever JD, Clay K, Reynolds HL. Nitrogen-fixing bacteria, arbuscular mycorrhizal fungi, and the productivity and structure of prairie Grassland communities. *Oecologia* 2012;170(4):1089-1098. doi:10.1007/s00442-012-2363-3.

32. Bulegon LG, Guimarães VF, Urbanski JC. *Azospirillum brasilense* affects the antioxidant activity and leaf pigment content of *Urochloa ruziziensis* under water stress. *Pesqui Agropecu Trop* 2016;46(3):343-349. doi:10.1590/1983-40632016v46i4a1489.
33. Fei H, Crouse M, Papadopoulos Y, Vessey JK. Enhancing the productivity of hybrid poplar (*Populus* × hybrid) and switchgrass (*Panicum virgatum* L.) by the application of beneficial soil microbes and a seaweed extract. *Biomass Bioenergy* 2017;(107):122-134. doi:10.1016/j.biombioe.2017.09.022.
34. Pedreira BC, Barbosa PL, Pereira LE, Mombach MA, Domiciano LF, Pereira DH, *et al.* Tiller density and tillering on *Brachiaria brizantha* cv. Marandu pastures inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2017;69(4):1039-1046. doi:10.1590/1678-4162-9034.
35. Bonadiman RL, Ferreira OG, Coelho RA, Costa OA, Farias PP, Rosa PP, *et al.* Nitrogen fertilization associated to inoculation with *Azospirillum brasilense* about structural characteristics of annual ryegrass. *Rev Electron Vet* 2018;19(3):031822.
36. Paungfoo LC, Redding M, Pratt C, Wang W. Plant growth promoting rhizobacteria increase the efficiency of fertilizers while reducing nitrogen loss. *J Environ Management* 2019;233(1):337-341. doi:10.1016/j.jenvman.2018.12.052.
37. Bilal M, Ayub M, Tariq M, Tahir M, Nadeem MA. Dry matter yield and forage quality traits of oat (*Avena sativa* L.) under integrative use of microbial and synthetic source of nitrogen. *J Saudi Soc Agric Sci* 2017;16(3):236-241. doi: 10.1016/j.jssas.2015.08.002.
38. Sá GC, Hungria M, Carvalho CL, Moreira A, Nogueira M, Heinrichs R, *et al.* Nutrients uptake in shoots and biomass yields and roots and nutritive value of zuri Guinea grass inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Commun Soil Sci Plant Anal* 2019;50(22):2927-2940. doi:10.1080/00103624.2019.1689256.
39. Heinrichs R, Meirelles GC, De-Melo SLF, Da-Silva MV, De-Marcos A, Nogueira MA, *et al.* *Azospirillum* inoculation of 'Marandu' palisade grass seeds: Effects on forage production and nutritional status. *Semin Cienc Agrar* 2020;41(2):465-478. doi:10.5433/1679-0359.2020v41n2p465.
40. Romero PF, Ocampo GJ, Camelo RM, Bonilla R. Plant growth-promoting rhizobacteria and their potential as bioinoculants on *Pennisetum clandestinum* (Poaceae). *Rev Biol Trop* 2019;67(4):825-832.
41. Moreno GAE, Cortés PS, Romero PF, Uribe VD, Bashan Y, Bonilla RR. Proline accumulation and glutathione reductase activity induced by drought-tolerant rhizobacteria as potential mechanisms to alleviate drought stress in Guinea grass. *Appl Soil Ecol* 2020;(147):103367. doi:10.1016/j.apsoil.2019.103367.

42. Mendoza LJ, Romero PF, Hernández JP, Uribe D, Buitrago RB. Enhancement of drought tolerance on guinea grass by dry alginate macrobeads as inoculant of *Bacillus* strains. *BioRxiv* 2019:1-30. <https://doi.org/10.1101/761056>.
43. Hashmi I, Paul C, Al-Dourobi A, Sandoz F, Deschamps P, Junier T, *et al.* Comparison of the plant growth-promotion performance of a consortium of Bacilli inoculated as endospores or as vegetative cells. *FEMS Microbiol Ecol* 2019;65(11):1044-1056. doi:10.1071/CP14109.
44. Sapre S, Gontia I, Tiwari S. *Klebsiella sp.* confers enhanced tolerance to salinity and plant growth promotion in oat seedlings (*Avena sativa*). *Microbiol Res* 2018;(206):25-32. doi:10.1016/j.micres.2017.09.009.
45. Li X, Geng X, Xie R, Fu L, Jiang J, Gao L, *et al.* The endophytic bacteria isolated from elephant Grass (*Pennisetum purpureum schumach*) promote plant growth and enhance salt tolerance of hybrid Pennisetum. *Biotechnol Biofuels* 2016;9(1):1-16. doi:10.1186/s13068-016-0592-0.
46. Kaur OH, Gulab P, Anureet K. Effect of pre-sowing seed inoculation with liquid Biofertilizers on fodder yield and quality of sorghum (*Sorghum bicolor*). *Indian J Agron* 2020;65(1):100-106.
47. Castanheira N, Dourado A, Alves PI, Cortés AM, Delgado AI, Prazerez A, *et al.* Annual ryegrass-associated bacteria with potential for plant growth promotion. *Microbiol Res* 2014;169(9-10):768-779. doi:10.1016/j.micres.2013.12.010.
48. Stamenov D, Jarak M, Durić S, Milošev D, Hajnal T. Plant growth promoting rhizobacteria in the production of English ryegrass. *Plant Soil Environ* 2012;(58):477-480. doi:10.17221/132/2012-PSE.
49. Stajković O, Delić D, Kuzmanović D, Protić N, Rasulić N, Knežević J. Growth and nutrient uptake in oat and barley plants as affected by rhizobacteria. *Rom Biotechnol Lett* 2014;19(3):9429-9436.
50. Criollo PJ, Obando M, Sánchez ML, Bonilla R. Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecu* 2013;13(2):189-195. doi:10.21930/rcta.vol13_num2_art:254.
51. Bahulikar RR, Torres I, Worley E, Craven K, Udvardi MK. Diversity of nitrogen-fixing bacteria associated with switchgrass in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. *Appl Environ Microbiol* 2014;80(18):5636-5643. doi:10.1128/AEM.02091-14.