



TESIS GANADORA DEL
“VII PREMIO CÁTEDRA AGROBANK A LA MEJOR TESIS DOCTORAL”

eman ta zabal zazu

Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Nitrification control in the framework of sustainable agriculture: the use of synthetic and biological nitrification inhibitors with ammonium-based fertilizers

Autor
Adrián Bozal Leorri

Directores
**Dra . Carmen González Murua
Dr. Pedro Aparicio Tejo**

NH_4^+ NO_3^- N_2O

Tesis Doctoral
2022

RESUMEN DE LA TESIS GANADORA DEL “VII PREMIO CÁTEDRA AGROBANK A LA MEJOR TESIS DOCTORAL”

Autor: Dr. Adrián Bozal Leorri

Director: Dra. Carmen González Murua y Dr. Pedro Aparicio Tejo

Título: Nitrification control in the framework of sustainable agriculture: the use of synthetic and biological nitrification inhibitors with ammonium-based fertilizers.

Introducción

La disponibilidad de nitrógeno es, junto con la del agua, uno de los principales factores limitantes para la productividad de los cultivos, razón por la cual la agricultura intensiva es dependiente del uso de fertilizantes nitrogenados para maximizar el rendimiento de las cosechas. Para el año 2050 se espera que su aplicación alcance las 300.000 toneladas de nitrógeno por año, requiriendo un gran aporte de energía, ya que, aproximadamente, el 2% de la energía mundial se emplea para la síntesis de dichos fertilizantes. Sin embargo, la totalidad del nitrógeno aplicado no es absorbido por el cultivo. Si bien el aporte de fertilizantes se ha multiplicado por 9 desde la década de los 60, el uso de nitrógeno por parte de los cultivos ha descendido desde el 68% al 47%. El nitrógeno no asimilado por el cultivo en la mayoría de los sistemas agrícolas se pierde en forma de nitrógeno reactivo, convirtiéndolos, así, en los principales responsables de su producción, superando a la cantidad originada por los procesos naturales terrestres. Las vías mayoritarias de pérdidas de nitrógeno reactivo que causan un impacto medioambiental son la lixiviación de nitrato (NO_3^-), la volatilización de amoníaco (NH_3) y las emisiones de gases nitrogenados como el óxido nítrico (NO) y el óxido nitroso (N_2O). Todas estas formas nitrogenadas causan un impacto medioambiental que repercute en la salud de los ecosistemas y en la salud humana.

El N_2O es el principal gas de efecto invernadero generado en la agricultura como consecuencia del uso excesivo de fertilizantes nitrogenados. Se estima que el sector agrícola es responsable de la emisión de más de 11.500 toneladas de N_2O por año, lo que supone el 1% del nitrógeno aplicado por los fertilizantes y representa alrededor del 19% del total de N_2O emitido mundialmente y el 49% de las emisiones de N_2O de origen antropogénico. El N_2O es una molécula con gran potencial de calentamiento global, siendo 298 veces superior al dióxido de carbono (CO_2); por lo que pequeños cambios en el flujo neto de este gas pueden contribuir significativamente al cambio climático. Los procesos microbianos de los suelos como la nitrificación y, mayoritariamente, la desnitrificación son los responsables de la generación y emisión de este gas a la atmósfera.

La nitrificación es la oxidación aeróbica secuencial de formas reducidas de nitrógeno a NO_3^- . En suelos con disponibilidad de oxígeno, el amonio (NH_4^+) es oxidado a hidroxilamina (NH_2OH) por la acción del enzima amonio monooxigenasa (AMO) que poseen arqueas y bacterias oxidantes de amonio (AOA y AOB). La NH_2OH se oxida a nitrito (NO_2^-) y, por último, las bacterias oxidantes del nitrito (NOB) lo oxidan a NO_3^- . El NO_3^- formado es un anión cargado negativamente que se repele por los coloides del suelo, que también presentan carga negativa y, por tanto, es susceptible de perderse por lixiviación, causando eutrofización y contaminación de las reservas de aguas subterráneas. En suelos poco aireados, es decir, con baja concentración o ausencia de oxígeno, el NO_3^- es utilizado por organismos desnitrificantes como último aceptor de electrones. Así, durante la desnitrificación, el NO_3^- es secuencialmente reducido a NO_2^- , NO , N_2O y/o a nitrógeno molecular (N_2).

Por todo ello resulta crucial orientar la agricultura hacia criterios de sostenibilidad que nos permitan mantener unos niveles de producción adecuados a la vez que reducimos la cantidad de nitrógeno reactivo que se libera en el medioambiente. Desde la industria se ha potenciado la

utilización de nuevas formulaciones de fertilizantes con el objetivo de mejorar su eficiencia y reducir su impacto ambiental.

Principalmente existen dos líneas de actuación: la adición de fertilizantes de liberación lenta y el uso de inhibidores sintéticos de la nitrificación (SNIs) como el 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP) y la mezcla isomérica 2-(3,4-dimetil-1H-pirazol-1-il) succinato (DMPSA). El DMPP y el DMPSA son compuestos sintéticos añadidos a los fertilizantes de base amoniacal con el fin de inhibir la actividad de la enzima AMO lo que permite mantener el nitrógeno en forma amoniacal en el suelo durante periodos de tiempo más prolongados. Se ha constatado que los SNIs aumentan el uso eficiente del nitrógeno por parte de la planta entre un 7% y un 16% de media, a la vez que reducen las emisiones de N_2O entre un 35% y un 40%.

Desafortunadamente, el uso de los SNIs no es una práctica extendida entre los agricultores de todo el mundo, sobre todo en países en desarrollo, puesto que presentan varios inconvenientes como su coste de aplicación y, en ocasiones, falta de rentabilidad. Su eficiencia se ve seriamente afectada por las características físico-químicas del suelo, la temperatura y la volatilidad del compuesto. Sin embargo, las sustancias alelopáticas de exudados de raíces de cultivos como el sorgo (*Sorghum bicolor*), conocidas por su actividad como inhibidores biológicos de la nitrificación (BNIs), se han mostrado como una alternativa prometedora. Los BNIs del sorgo se exudan directamente en la rizosfera, que es el principal lugar de nitrificación debido a la gran abundancia de AOA y AOB. Además, estos BNIs pueden liberarse hasta cerca de la madurez fisiológica del cultivo, lo que aseguraría su presencia durante todas las etapas de desarrollo del mismo. La acción inhibitoria de la nitrificación de estas moléculas parece ser relativamente estable en un rango de pH de 3,0 a 9,0 y para temperaturas entre 20 y 30 °C. Debido a todas estas ventajas que ofrece la exudación de BNIs, se abogaría por el uso del sorgo en la rotación de cultivos, en intercultivo o como cultivo de cobertura.

Lamentablemente, los cereales de mayor interés agrícola, como por ejemplo el trigo, no poseen la capacidad de producir BNIs debido a la gran domesticación que han sufrido a lo largo de la historia. Su cultivo requiere una fertilización intensiva debido a su alta dependencia de nitrógeno y es, por ello, uno de los cultivos donde más se ha recomendado el empleo de SNIs. Recientemente, una red de investigadores pertenecientes a una colaboración entre el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (México), el Japan International Research Center for Agricultural Sciences (Japón) y la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) ha logrado identificar la región cromosómica que confiere capacidad de exudar BNIs a *Leymus racemosus*, un pariente silvestre del trigo. Tras este logro y con la idea de dotar a los cultivares modernos de trigo de la capacidad de exudar BNIs, se consiguió posteriormente transferir, mediante retrocruzamiento, dicha región cromosómica a dos cultivares de trigo élite, ROELFS y MUNAL, con producción superior a 10 toneladas de grano por hectárea. Finalmente, se consiguieron las líneas ROELFS-BNI y MUNAL-BNI, con capacidad de producir BNIs al mismo tiempo que mantenían todas las características de un trigo de alto rendimiento. ROELFS-BNI y MUNAL-BNI son capaces de aumentar la disponibilidad de NH_4^+ en suelos ácidos y reducir la formación de NO_3^- , disminuyendo su probabilidad de pérdida por lixiviación o emisiones gaseosas. Además, se ha observado que la capacidad de producir BNIs no tiene un coste metabólico para las nuevas líneas ROELFS-BNI y MUNAL-BNI ya que presentan un nivel similar de producción de grano.

Hipótesis principal y objetivos

La hipótesis de esta tesis fue que el control de la nitrificación mediante el uso de inhibidores sintéticos o biológicos permite conseguir una agricultura sostenible al reducir las pérdidas de nitrógeno reactivo al medio ambiente derivadas del uso de fertilizantes con base amoniacal. Para ser testada, se dividió el trabajo en 5 objetivos.

1. Muchos estudios informan de que el aumento de la concentración de CO₂ modifica la asimilación fotosintética y el metabolismo de las plantas, así como el ciclo del carbono del suelo, lo que también podría interferir con el ciclo del nitrógeno del suelo. Por lo tanto, no está claro si la eficacia de los SNIs DMPP y DMPSA también podría verse afectada en condiciones climáticas futuras de aumento de CO₂.

Objetivo 1: Verificar que los SNIs DMPP y DMPSA siguen siendo igual de eficaces con concentraciones atmosféricas elevadas de CO₂.

2. El modo de acción de DMPP y DMPSA parece estar relacionado con su capacidad para quelar los cationes Cu₂⁺ que necesita la enzima AMO y, aunque se ha demostrado su capacidad quelante, no se ha confirmado que su modo de acción dependa de esta capacidad.

Objetivo 2: Evaluar en cultivos puros de la bacteria nitrificante *Nitrosomonas europea* la efectividad de la inhibición de DMPP y DMPSA, así como estudiar si un aumento de la concentración de Cu₂⁺ en el medio la reduce.

3. La exudación de BNIs en el sorgo se mantiene durante todo el crecimiento del cultivo. Sin embargo, los estreses abióticos que afectan al crecimiento de los cultivos, como la sequía, podrían modificar la tasa de exudación de BNIs que está relacionada con el estado fisiológico y el desarrollo de la planta.

Objetivo 3: Determinar el efecto que una sequía moderada produce en la exudación de BNIs de plantas de sorgo.

4. Los SNIs son herramientas eficaces para reducir las pérdidas de nitrógeno. Sin embargo, no son ampliamente adoptados por los agricultores debido a su falta de rentabilidad y a su limitada estabilidad y movilidad en el suelo. Por otro lado, los BNIs parecen ser una alternativa prometedora, ya que se liberan directamente en el lugar donde se lleva a cabo la nitrificación.

Objetivo 4: Analizar los efectos de una rotación veza-sorgo-trigo, con uso del sorgo como cultivo de cobertura durante el verano, en vez de barbecho, sobre las poblaciones nitrificantes del suelo, así como en las emisiones de N₂O y producción de trigo.

5. El logro de las nuevas líneas ROELFS-BNI y MUNAL-BNI supone un nuevo hito para la agricultura sostenible. No obstante, es necesario validar su eficacia en diferentes condiciones edafoclimáticas y tipos de fertilizantes, ya que su uso potencial pretende llegar a agricultores de todo el mundo.

Objetivo 5: Estudiar el comportamiento de las líneas ROELFS-BNI y MUNAL-BNI en suelo alcalino y con fertilización amoniacal y nítrica, y su efecto sobre las poblaciones nitrificantes y contenido de nitrógeno mineral.

Resultados

El uso de DMPP y DMPSA logró inhibir el crecimiento de los microorganismos nitrificantes en ambas concentraciones de CO₂, siendo ligeramente más efectiva en elevado CO₂. La adición de los SNIs también logró que el mantenimiento de NH₄⁺ en el suelo fuera mayor en elevado CO₂ y, por consiguiente, se produjera un menor contenido de NO₃⁻. Ello condujo a una disminución del sustrato que puede ser parte de la desnitrificación y, por lo tanto, se redujeron aún más las emisiones de N₂O. Además, el aumento de la disponibilidad de carbono en elevado CO₂ permitió una asimilación más eficiente de NH₄⁺. Estos resultados indican que el uso de DMPP y DMPSA en escenarios climáticos futuros es muy recomendable con el objetivo de alcanzar una agricultura sostenible.

A pesar de la eficiencia demostrada por el DMPP y el DMPA en el campo, el DMPA no fue capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos nitrificantes en cultivos puros de *Nitrosomonas europea*. Para que el DMPA ejerciera su poder inhibitorio tuvo que romperse para liberar DMP, lo que se logró mediante procesos biológicos de los microorganismos del suelo. No obstante, dado que la ruptura del DMPA es realizada por la actividad biológica del suelo; el tipo de suelo y las condiciones ambientales podrían modificar su eficiencia. Por otro lado, la capacidad inhibitoria del DMPP no se vio alterada por un aumento en las concentraciones de Cu^{2+} . Por lo tanto, parece ser que el modo de acción de estos SNIs no está relacionado con su capacidad quelante. Además, se demostró que el DMPP es altamente específico ya que inhibe exclusivamente la enzima AMO.

La exudación de BNIs en sorgo parece estar relacionada con la disponibilidad de agua ya que, bajo condiciones de sequía, las plantas de sorgo aumentaron la liberación de BNIs para aumentar la competencia con los microorganismos nitrificantes por el NH_4^+ del suelo. Esta especie podría ser considerada como una mejor alternativa al barbecho durante el verano en lugares de clima Mediterráneo húmedo ya que redujo el exceso de nitrógeno del suelo del cultivo anterior y sus residuos fueron capaces de evitar un aumento en la abundancia de microorganismos nitrificantes después de la fertilización nitrogenada con la misma eficiencia que el DMPP. Además, los BNIs de sorgo no presentaron ningún efecto sobre la abundancia total de bacterias, ni sobre los microorganismos desnitrificantes.

Desafortunadamente, aunque los residuos del cultivo de sorgo lograron inhibir el crecimiento de microorganismos nitrificantes, su uso como cultivo de cobertura no resultó ser una opción adecuada para mitigar la contaminación por nitrógeno en una rotación de cultivos de veza-sorgo-trigo de invierno. La mayor disponibilidad de carbono de los rastrojos de sorgo aumentó la desnitrificación heterótrofa y, por lo tanto, también aumentaron las emisiones de N_2O . Para contrarrestar esta mayor liberación de N_2O derivada del uso del sorgo como cultivo de cobertura sugerimos la aplicación de DMPP ya que ello retrasó la oxidación del NH_4^+ del suelo, disminuyó la formación de NO_3^- y, por tanto, mitigó el aumento de la desnitrificación heterótrofa resultante de una mayor disponibilidad de carbono en la rotación veza-sorgo-trigo.

La solución para evitar la amenaza de un aumento de la desnitrificación debido a una mayor disponibilidad de carbono por los residuos de cultivos de cobertura es que sea el propio cultivo quien exude BNIs. Las líneas de trigo ROELFS-BNI y MUNAL-BNI representan una tecnología biológica eficiente que fue capaz de reducir la abundancia de microorganismos nitrificantes en suelos básicos, manteniendo más altos los niveles de NH_4^+ en el suelo y provocando una reducción en la formación de NO_3^- . Además, las líneas de trigo ROELFS-BNI y MUNAL-BNI también redujeron el contenido de NO_3^- del suelo bajo la fertilización con nitrato potásico (KNO_3). Por otro lado, debido a un mayor mantenimiento de NH_4^+ en el suelo, las líneas de trigo ROELFS-BNI y MUNAL-BNI pudieron cambiar su metabolismo para tener una nutrición más amoniacal. Además, pueden mejorar la eficiencia en el uso del nitrógeno del trigo ya que mejoraron la absorción de nitrógeno independientemente de cuál fue la fuente del mismo.

Conclusión general

Los resultados de esta tesis demuestran que tanto los SNIs como los BNIs reducen la pérdida de nitrógeno reactivo. Los SNIs seguirán siendo efectivos, incluso en condiciones climáticas futuras, y los BNIs se presentan como una opción para suplir las faltas de los SNIs, siendo capaces de reducir la nitrificación durante todo el desarrollo del cultivo. Por lo tanto, se confirma nuestra hipótesis inicial, ya que el control de la nitrificación mediante el uso de inhibidores sintéticos o biológicos permite conseguir una agricultura sostenible al reducir las pérdidas de nitrógeno reactivo al medio ambiente derivadas del uso de fertilizantes con base amoniacal.