

La simbiosis rizobio-leguminosa.  
Árboles fijadores de nitrógeno y su importancia en los  
ecosistemas

Milagros León Barrios  
Profesora Titular de Microbiología.  
Departamento de Microbiología y Biología Celular.  
Universidad de La Laguna



*XIX Jornadas Forestales  
de Gran Canaria*

# LA SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA. ÁRBOLES FIJADORES DE NITRÓGENO Y SU IMPORTANCIA EN LOS ECOSISTEMAS

Milagros León Barrios

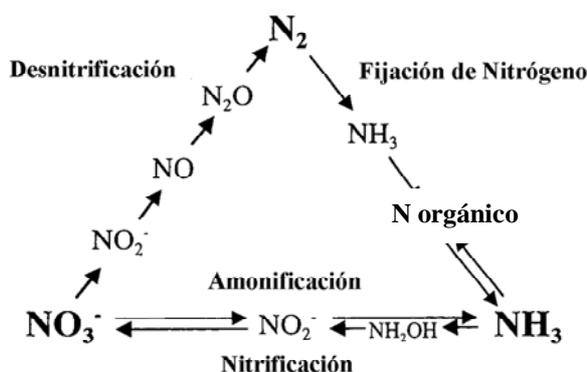
Profesora Titular de Microbiología.

Departamento de Microbiología y Biología Celular. Universidad de La Laguna

[mileonba@ull.es](mailto:mileonba@ull.es)

## LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO (FBN)

El nitrógeno (N) es un elemento básico para la vida de todos los seres vivos, siendo, tras el carbono, el oxígeno y el hidrógeno, uno de los más abundantes en la materia viva, donde se encuentra formando parte de moléculas tan esenciales como las proteínas y los ácidos nucleicos. Los distintos grupos de seres vivos utilizan distintas formas de este elemento, orgánicas e inorgánicas, que se reciclan en lo que conocemos como el ciclo del nitrógeno. El nitrógeno orgánico, procedente de la degradación de las proteínas de organismos superiores y sus excreciones, se convierte en nitrógeno inorgánico, amoníaco, en los procesos de amonificación (pueden realizarlo muchos microorganismos). El amonio, en las rutas de nitrificación llevadas a cabo por las denominadas bacterias nitrificantes, es oxidado a nitrito (por bacterias como *Nitrosomonas*) y finalmente a nitrato (por bacterias como *Nitrobacter*). El nitrato, mediante la acción de las bacterias desnitrificantes (por ejemplo, *Pseudomonas*, *Bacillus*), es reducido en los procesos de desnitrificación hasta óxidos de nitrógeno y dinitrógeno molecular que escapan a la atmósfera. El dinitrógeno atmosférico, un gas inerte, puede volver a entrar en los ecosistemas mediante el proceso fijación del nitrógeno, en el cual el dinitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) es reducido hasta amonio, una forma combinada del nitrógeno asimilable por otros seres vivos. Las diversas formas de nitrógeno inorgánico, oxidadas y reducidas, son asimiladas por plantas y microorganismos, pasando de nuevo a formar parte de la materia viva, y circular a lo largo de las cadenas de alimentación.



Ciclo del Nitrógeno. Los intermediarios primarios están indicados en negrita en los vértices del triángulo

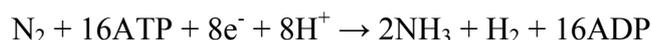
El nitrógeno suele ser, después del agua, el principal factor limitante para el desarrollo de los vegetales. Paradójicamente, la atmósfera contiene alrededor de un 79% de su volumen en nitrógeno, lo que significa que sobre cada hectárea de terreno, teniendo en cuenta el espesor de la capa atmosférica, existen varias toneladas de nitrógeno. Sin embargo, el dinitrógeno atmosférico es un gas inerte no utilizable por la mayoría de seres vivos. Solamente un pequeño grupo de seres vivos, todos ellos de naturaleza procariótica, conocidos como bacterias diazotróficas (como *Azotobacter*, *Rhizobium* o *Frankia*), son capaces de fijar el nitrógeno. El nitrógeno puede ser también fijado mediante procesos no biológicos. La fijación espontánea del nitrógeno es un proceso natural en el cual el nitrógeno es reducido utilizando la energía liberada por ejemplo durante las descargas eléctricas producidas en las tormentas. A principios del siglo XX se comercializó un proceso industrial de fijación química, el de Haber-Bosch, donde el amoníaco se obtiene combinando el nitrógeno (N<sub>2</sub>) con hidrógeno (H<sub>2</sub>) a altas temperaturas (unos 500°C), alta presión (200 atmósferas) y en presencia de catalizadores metálicos. Si se estima la fijación de nitrógeno en la biosfera en unos 275 millones de Tm anuales, unos 175 corresponden a la fijación biológica, 70 a la industrial, y 30 a la espontánea. Por lo tanto, la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) supone más del 60 % del nitrógeno fijado, y es, por lo tanto, el proceso de fijación más importante. La FBN es, junto con la fotosíntesis, uno de los procesos metabólicos más importantes para el mantenimiento de la vida en la Biosfera. Aunque no se conoció el origen bacteriano de la fijación de nitrógeno por las leguminosas hasta 1888 (Hellriegel y Wilfarth, 1988), empíricamente era ya aprovechada por los romanos, cuando observaron el efecto beneficioso de la rotación de los cultivos de leguminosas y cereales.

El uso de fertilizantes químicos nitrogenados es una práctica habitual y, en muchos casos necesaria, para el desarrollo de la agricultura. El desarrollo de procesos industriales de síntesis química de fertilizantes nitrogenados, la denominada revolución verde, supuso un incremento necesario en la producción de alimentos, pero el uso excesivo de fertilizantes químicos también produce efectos perjudiciales que afectan al equilibrio de la vida en este Planeta. Un exceso de fertilización nitrogenada acarrea problemas importantes medioambientales como la eutrofización de ríos, lagos y costas marinas, acidificación de suelos, liberación a la atmósfera de óxidos de nitrógeno (que ha aumentado un 8% desde que comenzó la revolución industrial) que dañan la capa de ozono y contribuyen al efecto invernadero y a la lluvia ácida. Además, la contaminación con nitratos de las aguas de abasto se relaciona con algunos problemas de salud humana. Se hace por tanto necesario un uso más racional de los fertilizantes nitrogenados de síntesis química. Otra solución complementaria es el incremento de los cultivos de leguminosas, que pueden cultivarse de manera sostenible y más compatible con el medio ambiente, usando la inoculación con rizobios como biofertilizantes nitrogenados. El uso de estos biofertilizantes es una práctica relativamente común en el cultivo de leguminosas de interés agrícola. Pero además de la agricultura, otros sistemas naturales podrían beneficiarse de las leguminosas fijadoras de nitrógeno.

Está claro que el uso masivo y abusivo de estos fertilizantes químicos ha traído consigo importantes efectos colaterales no deseables. Por ello, en los últimos años se ha incrementado el interés por el uso de prácticas de cultivos más respetuosas con el medioambiente. En este sentido los microorganismos fijadores de nitrógeno adquieren protagonismo.

## BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO.

Las bacterias fijadoras del nitrógeno pueden dividirse en dos grandes grupos, las que son capaces de fijar el nitrógeno en vida libre, y las que lo hacen en simbiosis con plantas. Estas bacterias diazotrofas pertenecen a grupos fisiológicos y filogenéticos muy diversos, pero todas comparten una característica fundamental que les permite fijar el nitrógeno, la existencia de la enzima nitrogenasa, un complejo enzimático que es capaz de romper el triple enlace del dinitrógeno produciendo amoníaco en una reacción altamente consumidora de energía, que se corresponde con la ecuación:



### Fijadores libres de nitrógeno.

Se han descrito más de 60 géneros de bacterias fijadoras libres de nitrógeno que pertenecen a distintos grupos fisiológicos: aerobias, facultativas, anaerobias, autótrofas y heterótrofas, y de hábitats terrestres y acuáticos. En la Tabla siguiente se recogen una pequeña representación de algunos de los principales géneros de bacterias que contienen fijadores libre de nitrógeno.

<b>Géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre</b>	
<b>Aerobios y Facultativos</b>	<b>Anaerobios</b>
<b>Quimioorganotrofos</b>	<b>Quimioorganotrofos</b>
<i>Azotobacter</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Azomonas</i>	<i>Desulfovibrio</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Desulfotomaculum</i>
<i>Beijerinckia</i>	<b>Fototrofos</b>
<i>Klebsiella</i>	<i>Chromatium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<b>Fototrofos</b>	<i>Heliobacterium</i>
Cianobacterias (no todas)	<b>Quimiolitotrofos</b>
<b>Quimiolitotrofos</b>	<i>Methanococcus</i>
<i>Thiobacillus</i>	<i>Methanosarcina</i>

Los microorganismos fijadores de vida libre, si bien importantes en número, tienen un escaso rendimiento fijador de nitrógeno, debido a que se requiere el consumo de una gran cantidad de energía en el proceso y la disponibilidad de sustratos necesarios para obtener dicha energía son poco abundantes en los suelos. Así por ejemplo, un fijador libre como *Azotobacter* requiere 100 gramos de glucosa para fijar un gramo de  $\text{N}_2$ . Los diazótrofos fotosintéticos, como las Cianobacterias, al poder obtener la energía de la luz solar son, entre los fijadores libres, los que más contribuyen a la entrada de nitrógeno a los ecosistemas.

## FIJADORES SIMBIÓTICOS DE NITRÓGENO

Las bacterias fijadoras simbióticas del nitrógeno pueden ser agrupados en dos grandes grupos, filogenéticamente muy alejados: el grupo de los rizobios y las bacterias del género *Frankia*.

*Frankia* es una bacteria grampositiva filamentosa del *Phylum Actinobacteria*. Es el único género de la familia *Frankiaceae*. La clasificación taxonómica de este grupo en especies se ha visto obstaculizada por la dificultad de estas bacterias para crecer en cultivo puro y su lenta velocidad de crecimiento en condiciones de laboratorio, de tal manera que aunque han sido aisladas cientos de cepas, sólo una especie, *F. alni*, es válidamente reconocida (Whitman et al., 2012). *Frankia* establece simbiosis con 25 géneros de plantas distribuidos en 8 familias (*Myricaceae*, *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Eleagnaceae*, *Rhamnaceae*, *Rosaceae*, *Coriariaceae* y *Datisceae*), que se conocen como plantas actinorrízicas, y que con una excepción (género *Datisca*) son árboles o arbustos perennes. En 1996, Normand et al., realizaron un extenso análisis de la secuencia completa del gen 16S rDNA de cepas *Frankia* de diferentes grupos de infección, estableciendo una de las filogenias del género más aceptada hasta el momento, con 4 grupos filogenéticamente congruentes. El grupo 1, muy diverso, incluye las cepas infectivas de *Alnus*, *Casuarina* y *Myrica*. El grupo 2 contiene cepas infectiva, no cultivables, de las familias *Coriariaceae*, *Datisceae*, *Rosaceae* y al género *Ceanothus*. El grupo 3 incluye las cepas infectivas de las familias *Elaeagnaceae* y *Rhamnaceae*. Y el grupo 4 está formado por las llamadas cepas atípicas, que no son capaces de nodular ni de fijar nitrógeno. Una característica propia de *Frankia* es que no sólo fija nitrógeno en simbiosis sino que también es capaz de hacerlo en vida libre.

Los rizobios son un grupo de bacterias gramnegativas pertenecientes al *Phylum Proteobacteria* y, con alguna excepción, establecen la simbiosis sólo con plantas de la familia de las leguminosas. "Rizobio" es un término que en sentido estricto se usaba para referirse a los miembros del género *Rhizobium*, pero que en los últimos años se ha usado en un sentido más general para referirse a las bacterias capaces de nodular y fijar nitrógeno en asociación con leguminosas.

A pesar de que las leguminosas constituyen una de las familias más numerosas de plantas, con casi 20.000 especies, hasta las últimas dos décadas sólo se habían descrito especies para un pequeño número de rizobios que nodulan con leguminosas de interés agrícola. Sin embargo, en las últimas dos décadas estos estudios se han ampliado considerablemente a un número mayor de especies de leguminosas y a regiones geográficas muy diversas, lo que está revelando la existencia de una enorme diversidad de rizobios y conduciendo a profundos cambios en su taxonomía. Durante muchos años, todos los rizobios estuvieron incluidos en un solo género, *Rhizobium*, con unas pocas especies que fueron designadas principalmente por su rango de hospedadores, formando los llamados "grupos de inoculación cruzada". Así por ejemplo, se describió *R. japonicum* para los rizobios que nodulan soja, *R. loti* para los que nodulan los *Lotus*, o *R. ciceri* para los simbiosites de *Cicer arietium*. Sin embargo, numerosas incongruencias y solapamientos hicieron que hace unas tres décadas se abandonara esa clasificación. El desarrollo de nuevas técnicas moleculares ha supuesto la reordenación de las especies existentes hasta entonces y permitido la descripción de nuevos géneros y especies de rizobios, hasta alcanzar la situación actual en la que existen más de 50 especies de rizobios (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>) distribuidos en cinco géneros, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* distribuidos en cuatro familias diferentes de  $\alpha$ -Proteobacterias (Garrity, 2005). Estas familias tienen la particularidad de incluir tanto a rizobios como a bacterias no formadoras de simbiosis con leguminosas. La Familia *Rhizobiaceae* actual incluye los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*; el género *Mesorhizobium* está incluido en la Familia *Phyllobacteriaceae*; *Bradyrhizobium* se incluye en la Familia *Bradyrhizobiaceae* y *Azorhizobium* en la Familia *Hyphomicrobiaceae*. Una taxonomía polifásica (que

integra el mayor número posible de características diferentes, fenotípicas y genéticas) ha sido la responsable de esta nueva clasificación, que pretende ser lo más aproximada a la filogenia, pero los datos más relevantes han sido los derivados del análisis de las secuencias del ADN ribosómico 16S (Garrity, 2005). Por otro lado, los genes simbióticos son responsables de establecer la simbiosis con las plantas. Las secuencias de estos genes tienen historias evolutivas diferentes a la del ADNr 16S, debido a que se trata de ADN accesorio localizado en elementos fácilmente transferibles (plásmidos o islas simbióticas) por fenómenos de transferencia horizontal. Ahora bien, la filogenia de algunos genes de nodulación correlaciona bien con el rango de leguminosas que pueden servir de hospedadoras a un rizobio y, por ello, se usan para describir los diferentes biovares o simbiovares que pueden estar asociados con una determinada especie, así por ejemplo, *Rhizobium leguminosarum* simbiovar phaseoli, sería una especie de rizobio capaz de nodular y fijar nitrógeno con *Phaseolus vulgaris* (las judías).

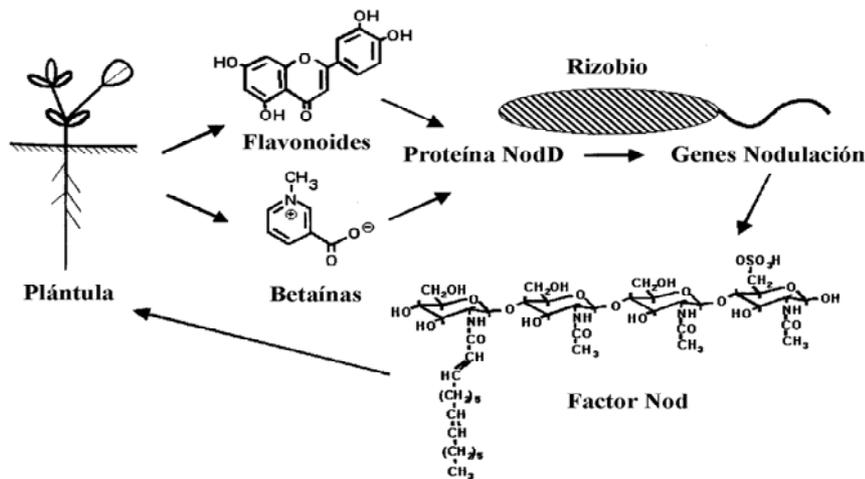
Como hemos comentado, la aplicación en las últimas décadas de las técnicas moleculares a colecciones de rizobios provenientes de especies de leguminosas y regiones geográficas no previamente estudiadas, está permitiendo revelar la enorme diversidad de rizobios existentes. Sin embargo, la diversidad de los simbioses fijadores de nitrógeno está aún lejos de estar resuelta. Aunque podemos considerar que una gran mayoría de las principales leguminosas de interés agrícola han sido intensivamente estudiadas en cuanto a sus simbioses rizobianos, los simbioses fijadores de nitrógeno con árboles, de las leguminosas o plantas actinorrízicas, han sido escasamente estudiados. Si bien hay varios trabajos que describen la existencia de nodulación, principalmente en unos pocos árboles tropicales (*Acacia*, *Albizia*, *Prosopis*), son casi inexistentes los trabajos donde se aislen y se caractericen los microsimbioses, y menos aún, aquellos donde se hagan ensayos de eficacia. Así podemos concluir que la fijación de nitrógeno en simbiosis con árboles ha sido grandemente ignorada.

## **SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA**

Desde que Hellriegel y Wilfarth en 1988, descubrieran el origen bacteriano de la fijación de nitrógeno por las leguminosas. La simbiosis rizobio-leguminosas ha sido ampliamente estudiada durante ya más de 100 años, por lo que se conoce con bastante detalle las características morfológicas, fisiológicas y genéticas del proceso. La simbiosis actinorrízica, por el contrario, ha sido menos estudiada, aunque en los últimos años se han ido estudiando diversos aspectos de esta simbiosis (para información leer la revisión de Hugo et al., 2008). Aquí comentaremos, aunque brevemente, el proceso de simbiosis tomando el esquema establecido para los rizobios y las leguminosas. Y es que la simbiosis fijadora de nitrógeno que se establece entre los rizobios y las plantas leguminosas es sin duda una de las asociaciones beneficiosas mejor conocidas. Los rizobios son bacterias del suelo capaces de vivir como saprofitos libres, pero también tienen capacidad para inducir en las raíces de las leguminosas la formación de nódulos radicales, dentro de los cuales son capaces de realizar la fijación del nitrógeno.

La formación de un nódulo radical fijador de nitrógeno es un proceso muy complicado, su descripción detallada va más allá del interés de esta charla (una revisión general se puede leer en Gutiérrez-Navarro et al., 1993), y podemos resumirlo de la siguiente manera. La primera etapa, la pre-infección, comienza antes de que exista contacto entre la planta y la bacteria, y en este periodo ambos simbioses intercambian señales de reconocimiento. Entre los exudados radicales, cada leguminosa libera al

medio un repertorio de compuestos de tipo flavonoide que la bacteria reconoce como inductores de los genes de nodulación (genes *nod*). En respuesta a esta señal de la planta, la bacteria sintetiza un factor de nodulación (factor nod) específico, una molécula compleja constituida por un esqueleto de 4 a 5 N-acetil glucosaminas con varias sustituciones que determinan la especificidad. Por su composición, estos factores nod se conocen también como lipoquitooligosacáridos (LCOs) y son responsables de inducir dos de las primeras modificaciones visibles en la raíz, esto es, la típica curvatura de los pelos radicales y la inducción de divisiones celulares en la corteza de la raíz.

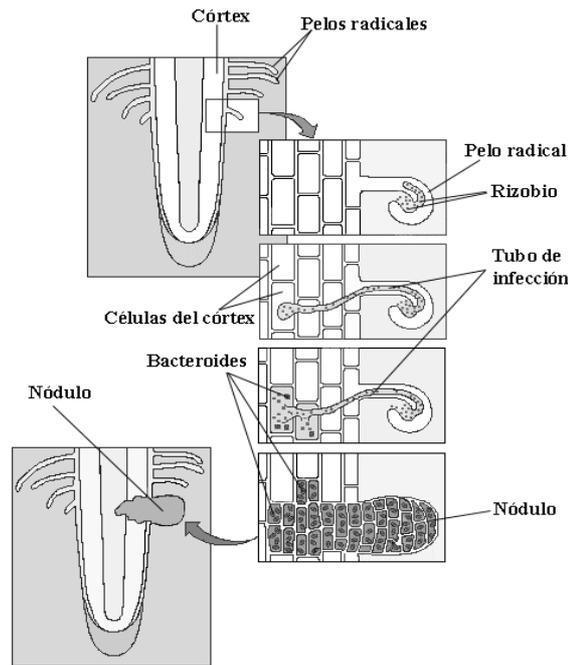



---

Fase de preinfección. Flavonoides (y betaínas en ocasiones) actúan como inductores de los genes de nodulación. El rizobio responde sintetizando un Factor de nodulación que dispara la formación de un nódulo en la planta (basado en Phillips, 2000).

---

Como consecuencia de la curvatura del pelo radical se forma una especie de bolsillo que atrapa a la bacteria. Mientras tanto, la estimulación de la división de células del córtex va a dar lugar a la formación de un primordio de nódulo. El rizobio atrapado en el pelo inicia entonces la invasión de la raíz a través de la formación del canal de infección que servirá para conducir a la bacteria desde el pelo hasta el primordio de nódulo, donde es liberado desde el extremo del canal por un proceso de exocitosis, que deja al rizobio rodeado por una membrana de origen vegetal constituyendo un “orgánulo” nuevo en la célula vegetal, el simbiosoma. La invasión del tejido radical conducirá finalmente a la formación de un nódulo radical maduro, en cuyo interior, perfectamente estructurado, el rizobio se diferencia a bacteroide, siendo ahora capaz de fijar el dinitrógeno atmosférico, es decir, reducirlo hasta una forma combinada asimilable por las plantas.



Invasión de la raíz a través de un pelo radical.

Esta simbiosis permite, por lo tanto, a las leguminosas crecer sin el aporte de fertilización con compuestos químicos nitrogenados. A cambio, el rizobio encuentra dentro del nódulo un ambiente protegido, donde la nitrogenasa, una enzima muy sensible a la presencia de oxígeno es protegida por la presencia de leg-hemoglobina, una proteína simbiótica característica de las simbiosis eficaces. Además, la demanda energética para la reducción del dinitrógeno queda suplida por el carbono aportado por los fotosintatos de la planta.

Si tenemos en cuenta que la familia *Leguminosae* incluye numerosas plantas de gran interés agronómico y ecológico, queda claro el valor económico de la FBN en el cultivo de leguminosas. Las leguminosas enriquecen además en nitrógeno los suelos donde crecen, recuperando muchos suelos para la práctica agrícola (la FBN incorpora a la biosfera unas  $180.10^6$  toneladas de nitrógeno al año). La FBN es también una alternativa ecológica frente a los fertilizantes químicos nitrogenados que son caros y contaminan suelos y acuíferos.

## ÁRBOLES FIJADORES DE NITRÓGENO

La capacidad para formar nódulos radicales se ha confirmado en unas 648 especies de árboles y arbustos (Brewbaker et al., 1990), de los cuales la gran mayoría de especies, 520, corresponden a plantas leguminosas pertenecientes a las subfamilias *Mimosoideae* (321 especies), *Papilionoideae* (173 especies) y *Caesalpinioideae* (26 especies), mientras que se han dado datos de nodulación para algo más de 100 especies de plantas actinorrizas leñosas, que se incluyen en las familias *Betulaceae* (38especies), *Casuarinaceae* (20 especies), *Coriariaceae* (16 especies), *Elaeagnaceae* (10especies), *Myricaceae* (14 especies), *Rhamnaceae* (14 especies) y *Rosaceae* (5 especies). La

fijación de nitrógeno por parte de estos nódulos se supone, pero realmente no se ha comprobado en la mayoría de los casos.

El uso de árboles fijadores de nitrógeno, al ser especies pioneras en la colonización, puede ser una buena opción en la recuperación de terrenos degradados y en el desarrollo de sistemas agroforestales. Los suelos degradados son abundantes en todo el mundo y su aprovechamiento agropecuario es muy difícil, antieconómico o directamente impracticable. El establecimiento de plantaciones forestales constituye una de las posibilidades de utilización de suelos degradados. Una extensa revisión del uso de árboles fijadores de nitrógeno en suelos degradados se recoge en el trabajo de Ferrari y Wall, 2004. Sin embargo, a menudo estas plantaciones fracasan debido a la baja disponibilidad de nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno) y a las deficientes condiciones físicas de los suelos. Los árboles fijadores de nitrógeno suelen ser una buena opción para muchos tipos de suelos degradados, al ser su desarrollo independiente del nitrógeno disponible en los suelos y al incluir especies adaptadas a los diversos tipos de estreses existentes en los suelos degradados. En países como África donde a la pobreza se une la existencia de suelos generalmente pobres en nutrientes, los proyectos agroforestales con árboles fijadores de nitrógeno es una gran promesa para incrementar la producción de las cosechas (Glover et al., 2012).

Algunos de los géneros de árboles fijadores de nitrógeno más utilizados en proyectos forestales y agroforestales son diversas especies de *Acacia*, *Prosopis*, *Sesbania*, *Albizia* y *Leucaena* entre las leguminosas, y *Casuarina*, *Alnus*, *Elaeagnus* entre los árboles actinorrhizales

## Referencias

1. Brewbaker, J. L., K. B. Willers & B. Macklin. 1990. Nitrogen fixing trees: validation and prioritization. Nitrogen Fixing Tree Research Report 8: 8-16
2. Cleveland, C, CC, Townsend AR, Schimel DS, Fisher H, Howarth RW, Hedin LO, Perakis SS, Latty, EF, (1999). Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation in natural ecosystems. Global Biochemical cycles, 13: 623-645.
3. Ferrari, A. E. & L. G. Wall (2004). Utilización de árboles fijadores de nitrógeno para la revegetación de suelos degradados. Revista de la Facultad de Agronomía, 105: 63-87.
4. Garrity, G. (Ed). 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Ed. Vol. 2: The Proteobacteria, parts A, B, C. Springer, New York
5. Glover D., J. R. Reganold and C. M. Cox. (2012). Plant perennials to save Africa's soils. Nature 489: 359-361.
6. La Fijación Simbiótica del Nitrógeno. Una Revisión General (1993). Gutiérrez-Navarro, A.M., León-Barríos, M. y J. Corzo. Rev. Acad. Canar. Cienc. 4, 59-115.
7. Hugo H., B. Guerrero y M. Valdés (2008). *Frankia* y la simbiosis actinorrhizica. Revista Latinoamericana de Microbiología, 50:90-102.
8. Normand, P., S. Orso, B. Cournoyer, P. Jeannin, C. Chapelon, J. Dawson, L. Evtushenko and A. K. Misra (1996). Molecular Phylogeny of the Genus *Frankia* and Related Genera and Emendation of the Family *Frankiace*. Int. J. System. Evol. Microbiol. 46: 1-9.

9. Olivares-Pascual, J. Fijación Biológica del nitrógeno (<http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/index.html>)
10. Redondo-Nieto M., I. Bonilla and L. Bolaños. Fijación biológica del nitrógeno. [http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/bolarios/Investigacion/fijacionN.htm](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/Investigacion/fijacionN.htm)
11. Rodríguez Barrueco C., F. Sevillano García, P. Subramaniam (1984), Temas de divulgación, 1ª Edición. La fijación de Nitrógeno atmosférico una Biotecnología en la Producción Agraria. IRNA, CSIC.
12. Werner D y Newton (eds.) (2005). Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment. Springer, The Netherlands.
13. Whitman, W.B.; Goodfellow, M.; Kämpfer, P.; Busse, H.-J.; Trujillo, M.E.; Ludwig, W.; Suzuki, K.-i.; Parte, A. (Eds.) (2012), The Actinobacteria Vol. 5, In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer.