

## REFERENCIAS

1. Ragauskas AJ, et al. (2006) The path forward for biofuels and biomaterial. *Science* 311(5760):484-489.
2. Sorda G, et al. (2009) An overview of biofuel policies across the world. *Energy Policy* 38(11):6977-6988.
3. St. James C. (2009) La Argentina y los biocombustibles de segunda y tercera generación. Cámara Argentina de Energías Renovables. <http://www.cader.org.ar/>
4. Balat M, H Balat (2009) Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *App Energy* 86(11):2273-2282
5. Brennan L, Owende P (2010) Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energy Rev* 14(2):557-577.
6. Anemaet IG, et al. (2010) Algal photosynthesis as the primary driver for a sustainable development in energy, feed, and food production. *Mar Biotechnol* (NY) 12(6): 619-29.
7. Borowitzka MA (2013) Techno-economic modeling for biofuels from microalgae. *Algae biofuels energy* (Springer, Netherlands), pp 255-264.
8. Do Nascimento M, Ortiz-Márquez JCF, Sanchez-Rizza L, Echarte M, Curatti L (2012) Bioprospecting for fast growing and biomass characterization of oleaginous microalgae from south-eastern Buenos Aires, Argentina. *Bioresour Technol* 125:283-290.
9. Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25(3): 294-306.
10. Ortiz-Marquez JCF, Do Nascimento M, Zehr JP, Curatti L (2013) Genetic engineering of multi-species microbial cell-factories as an alternative for bioenergy production. *Trends Biotechnol* 31(9):521-529.
11. Do Nascimento M, Dublan MA, Ortiz-Márquez JCF, Curatti, L (2013) High lipid productivity of an *Ankistrodesmus-Rhizobium* artificial consortium. *Bioresour Technol* 146:400-407.
12. Ortiz-Marquez J.F, Do Nascimento M, Dublan MA, Curatti, L (2012) Association with an ammonium-excreting bacterium allows diazotrophic culture of oil-rich eukaryotic microalgae. *Appl Environ Microbiol* 78(7):2345.
13. Ortiz-Márquez JCF, Do Nascimento M, Curatti L (2014). Metabolic engineering of ammonium release for nitrogen-fixing multispecies microbial cell-factories. *Metabol Eng* 23:154-164.

## CAPÍTULO 14

# Fijación biológica del nitrógeno como estrategia alternativa a la producción industrial de fertilizantes nitrogenados

Juan César Federico Ortiz Marquez, Andrés Arruebarrena Di Palma, Rafael Ambrosio, Joaquín Inchaurredo, Leonardo Curatti

Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INBIOTEC-CONICET), Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. [lcuratti@fiba.org.ar](mailto:lcuratti@fiba.org.ar)

## RESUMEN

La creciente aplicación de fertilizantes nitrogenados es uno de los factores clave para responder a la demanda progresiva de alimentos a nivel mundial. La reciente diversificación de la agricultura para la producción de agrobiocombustibles ha incrementado la demanda de este insumo. El proceso industrial de Harber-Bosch constituye en la actualidad la principal fuente de fertilizantes nitrogenados y consume aproximadamente el 2% de la energía mundial. En contraposición con los beneficios que la síntesis química de fertilizantes ha representado para la Humanidad, su uso desmedido en los países más desarrollados y emergentes ocasiona una diversidad de efectos perjudiciales para el medioambiente. Por otra parte, los países menos desarrollados tienen acceso restringido a este insumo y sufren la baja productividad de sus cultivos.

El cultivo de microalgas representa una alternativa promisoriosa como complemento a la agricultura para la producción de alimentos, biocombustibles y biomateriales. Sin embargo, dado el alto contenido de nitrógeno de la biomasa

algal, su cultivo masivo representaría una práctica inviable si no se contemplan alternativas a la aplicación convencional de fertilizantes.

La fijación biológica del nitrógeno consiste en la biosíntesis de amonio a partir del nitrógeno del aire y representa una forma natural de fertilización nitrogenada. La aplicación de bioinoculantes conteniendo bacterias fijadoras de nitrógeno se viene utilizando exitosamente desde hace décadas en el cultivo de leguminosas. La gran especificidad de esta interacción planta-bacteria limita una mayor versatilidad de los inoculantes.

En nuestro laboratorio desarrollamos prototipos de inoculantes bacterianos de amplio espectro. La mayor parte de los mismos utilizan la bacteria modelo *Azotobacter vinelandii*, en la cual se combinan diferentes mutaciones por medio de herramientas de ingeniería genética que contribuyen a la desviación del flujo fisiológico del nitrógeno para optimizar la excreción de amonio como fertilizante nitrogenado de óptima calidad. Estas bacterias mutantes permitieron el reemplazo de una parte sustancial del fertilizante químico cuando fueron introducidas en el cultivo de microalgas hiperproductoras de aceite, como materia prima para biodiésel. En estos modelos de sistemas productivos, la energía necesaria para la fijación del nitrógeno proviene de productos de desecho ricos en energía que producen las microalgas, estableciéndose una estrecha relación funcional entre el cultivo y el inoculante.

Otro desarrollo del laboratorio consiste en la obtención de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, a bajo costo y procesamiento de biomasa, para la producción de un biofertilizante nitrogenado natural, el cual se demostró que mejora el rendimiento de biomasa algal en relación a los fertilizantes convencionales.

En el futuro inmediato el laboratorio se dispone a la optimización de estos inoculantes y a expandir su potencial campo de aplicación a otros cultivos, incluyendo plantas de interés agronómico.

## INTRODUCCIÓN

### Los fertilizantes nitrogenados en la agricultura

Los fertilizantes nitrogenados han tenido un gran impacto en la sociedad ya que han permitido incrementar la productividad agrícola en muchas regiones del mundo con un cambio relativamente pequeño de la superficie cultivada. Se ha estimado que entre el 40 y el 60% del rendimiento de los principales cultivos puede ser atribuido al uso de fertilizantes en climas templados e incluso superar el 90% al segundo año de raleado en suelos tropicales [1].

En la actualidad, a nivel global, se cree que cerca de la mitad de la población mundial puede ser alimentada gracias a la utilización de fertilizantes nitrogenados en los cultivos [2]. Contrariamente, en otras regiones del mundo como por ejemplo en África subsahariana, los rendimientos de los cultivos de los principales cereales continúan siendo magros debido al bajo uso de fertilizantes, entre otras cuestiones. En gran medida esto se debe a los elevados costos de exportación y transporte interno de estos insumos e incipiente desarrollo de la industria local, entre otras cuestiones de otra índole [3].

Los fertilizantes nitrogenados se obtienen principalmente por medio del proceso industrial de Haber-Bosch. En este proceso se mezclan el  $N_2$  del aire con  $H_2$  o metano en condiciones de muy alta temperatura y presión sobre un catalizador metálico para producir amonio/amoniaco o urea. La electricidad o gas natural necesarios para producir  $H_2$  representan el 90% del costo de producción del fertilizante y hasta el 2% de la energía producida en el mundo [2].

El consumo de fertilizantes nitrogenados se ha incrementado en un 13% durante la última década y se anticipa que continuará incrementándose en un 2% en los próximos años [4].

El creciente uso de productos primarios de la agricultura para la producción masiva de biocombustibles de primera generación durante la última década ha profundizado la demanda de agroinsumos, en general, y de fertilizantes nitrogenados, en particular. En términos simplificados, el problema radica en que la crisis energética mundial debida al agotamiento de las reservas de combustibles fósiles obliga al desarrollo de fuentes alternativas de energía, que a su vez generen un menor impacto sobre el medio ambiente (principalmente sobre el efecto invernadero y el cambio climático global) [6].

Los biocombustibles de primera generación, básicamente bioetanol producido a partir de maíz o caña de azúcar y biodiésel a partir de aceites de soja, colza o palma, representaron una alternativa inmediata a este problema. Sin embargo, su explotación masiva en los términos actuales no representa una práctica sustentable a largo plazo, principalmente debido a la competencia por tierras fértiles con la agricultura tradicional dedicada a la nutrición, el incremento de la demanda de agroinsumos derivados del petróleo (por ejemplo los fertilizantes nitrogenados) y la capacidad limitada de reducir los niveles de emisión de gases causantes del efecto invernadero [6]. En tal sentido, cada vez más se asocia a la producción industrial masiva de fertilizantes nitrogenados y su utilización en la agricultura con efectos ambientales adversos tales como la eutrofización de cuerpos de agua, la contaminación de las napas de agua potable, y la alteración de la atmósfera relacionada con el cambio climático global, entre otros. Gran parte de esto se debe a la baja eficiencia del uso de nitrógeno por parte de los cereales que ha ido decreciendo durante las últimas décadas desde 80% en 1960 hasta 30% en 2000 para los principales cereales [3]. En gran medida, esto se debe a la falta de una implementación más generalizada de prácticas de agricultura de precisión. De esta manera, aproximadamente el 40% de los fertilizantes nitrogenados esparcidos en el ambiente es desnitrificado según un proceso metabólico llevado a cabo por bacterias del suelo que usa el nitrato como aceptor terminal de electrones y lo reduce (bajo ciertas condiciones específicas) hasta  $N_2$  gaseoso. Si bien en principio este hecho no generaría efectos ambientales adversos en forma directa, el ciclo completo de síntesis de fertilizantes nitrogenados mediante el proceso de Haber–Bosch y su posterior de desnitrificación por procesos naturales (reversión completa del proceso) representa un desperdicio de energía que aproximadamente equivale al 1% de la energía utilizada globalmente. El resto del fertilizante no aprovechado por los cultivos permanece en ambientes terrestres, acuáticos, y en la atmósfera, ocasionando los efectos adversos antes mencionados [6].

La implementación de cultivos energéticos con características específicas para la producción de bioetanol y biodiésel de segunda generación a partir de tierras subóptimas o incluso no aptas para la agricultura tradicional permitiría resolver parte de los efectos adversos de los biocombustibles de primera generación.

Las microalgas representan una alternativa muy atractiva como cultivo energético para la producción de este tipo de biocombustibles avanzados. Es-

tos microorganismos fotosintéticos, habitualmente acuáticos y unicelulares, presentan una productividad potencial de hasta cien veces mayor a la soja y su cultivo es independiente de la fertilidad del suelo [7]. Sin embargo, en la actualidad, los costos de producción, no justifican su producción masiva para productos de bajo valor agregado como los biocombustibles [8].

Uno de los principales interrogantes es la elevada demanda de fertilizante nitrogenado necesario para lograr el potencial de rendimiento de las microalgas, lo que convertiría a su cultivo en una práctica considerablemente más nitrógeno-intensiva que la agricultura convencional. Dado que la biomasa seca de microalgas presenta un contenido de nitrógeno del 4–8%, se estima que se necesitarían aproximadamente 0,2 kg de urea para producir un 1 kg de triacilglicerol (materia prima directa para el biodiésel), o 2,5 ton/h/año para una producción continua en granjas acuáticas a la intemperie.

### **Fijación biológica del nitrógeno atmosférico como alternativa a los fertilizantes nitrogenados de sintéticos**

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico (FBN) es una parte esencial del ciclo del nitrógeno en el planeta y da cuenta de la producción de las dos terceras partes del nitrógeno biológicamente activo disponible para la gran mayoría de formas de vida de la biosfera. Solo un grupo relativamente pequeño de microorganismos pertenecientes a Bacterias y Archeobacterias, conocidos como diazotrofos, presentan la capacidad de la FBN [9]. La FBN es un proceso que tiene lugar en condiciones anaeróbicas/micro-aeróbicas y solo excepcionalmente en condiciones aeróbicas, debido a la alta sensibilidad al oxígeno de las enzimas implicadas [3]. La FBN es llevada a cabo por las enzimas nitrogenasas que reducen el dinitrógeno del aire a amonio en una reacción que requiere 8 electrones y al menos 16 ATP por molécula de dinitrógeno fijado. La nitrogenasa más común es la nitrogenasa de hierro y molibdeno formada por las proteínas NifD y NifK (dinitrogenasa) y NifH (dinitrogenasa reductasa) como donador específico de electrones. Estas proteínas tienen varios centros metálicos, algunos de ellos en sus sitios catalíticos, que le confieren la característica sensibilidad al oxígeno [3].

Algunos organismos superiores (plantas y algas, por ejemplo) establecen relaciones del tipo simbióticas o mutualistas con bacterias diazotróficas que les permiten obtener nitrógeno del aire, aunque en forma indirecta, es de-

cir mediada por los microorganismos. La relación entre ciertas leguminosas y bacterias conocidas como rizobios se ha explotado con fines agronómicos con resultados satisfactorios durante las últimas décadas. Aunque con menor consistencia, también se han obtenido resultados exitosos en la inoculación de cereales con bacterias diazotróficas, que sin llegar a establecer una relación simbiótica formal con las plantas, colonizan el interior de las raíces y proveen productos de la FBN [10].

## APORTES DE NUESTRO GRUPO DE INVESTIGACIÓN

### Investigación y desarrollo de biofertilizantes nitrogenados

Nuestro laboratorio se interesa en la investigación y desarrollo (I&D) de inoculantes bacterianos versátiles como biofertilizantes nitrogenados, con especial énfasis en el cultivo de microalgas, como campo de I&D de incipiente avance tanto en el país como en el mundo [11].

Hemos logrado aislar bacterias nativas promotoras del crecimiento algal, varias de ellas capaces de crecer diazotróficamente en condiciones micro-aeróbicas en medios de cultivo optimizados para tal fin. Sin embargo, en condiciones de cultivo que promueven el desarrollo algal (elevada tasa de fotosíntesis generadora de oxígeno) no hemos podido verificar que la inoculación con estas bacterias pudiera representar una fuente de nitrógeno biológicamente activo para las algas. En cambio, hemos propuesto que la promoción del crecimiento algal estaría mediada por hormonas del tipo vegetal (auxinas) y probablemente vitamina B12 producidas por la bacteria a cambio de productos de la fotosíntesis excretados por el alga. [12].

Siguiendo la hipótesis de una posible incompatibilidad entre la FBN y la fotosíntesis oxigénica [11], enfocamos nuestros estudios a dos de los casos excepcionales y paradigmáticos de FBN aeróbica: *A. vinelandii* y *Nostoc* spp.

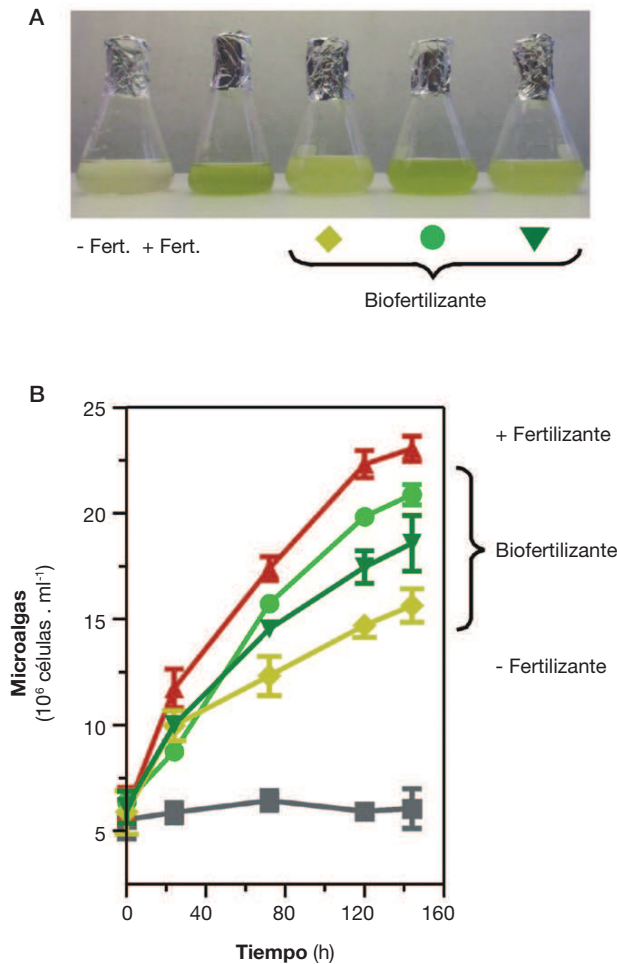
### Ingeniería genética del metabolismo del nitrógeno en *Azotobacter vinelandii*

*A. vinelandii* es una proteobacteria diazotrófica de vida libre comúnmente aislada del suelo que presenta la capacidad excepcional de FBN aún bajo concentraciones de oxígeno supra-ambientales. Se cree que esto se debe a una

multiplicidad de adaptaciones tales como una muy elevada tasa de respiración aeróbica a expensas de azúcares y la posesión de cubiertas celulares parcialmente impermeable al aire, entre otras [13]. De manera similar a otros diazotrofos de vida libre, *A. vinelandii* solo fija nitrógeno atmosférico para cubrir sus propios requerimientos y presenta un muy sofisticado sistema metabólico y genético para controlar sensiblemente la homeostasis celular del nitrógeno. La proteína NifL es uno de los principales sensores de los niveles celulares del nitrógeno fijado en forma de amonio que comunica esta señal a la proteína NifA que activa un centenar de genes que aumentan su expresión durante la FBN, en varias bacterias diazotróficas [14]. Hemos construido cepas mutantes de *A. vinelandii* con su gen *nifL* inactivado, que ya no pueden sentir el estado de suficiencia de nitrógeno fijado, continúan expresando los genes de la FBN y producen un exceso de amonio que liberan al medio circundante [15]. Estas bacterias mutantes presentan altos requerimientos energéticos y son menos eficientes en su crecimiento y producción de amonio en condiciones restrictivas de energía [16].

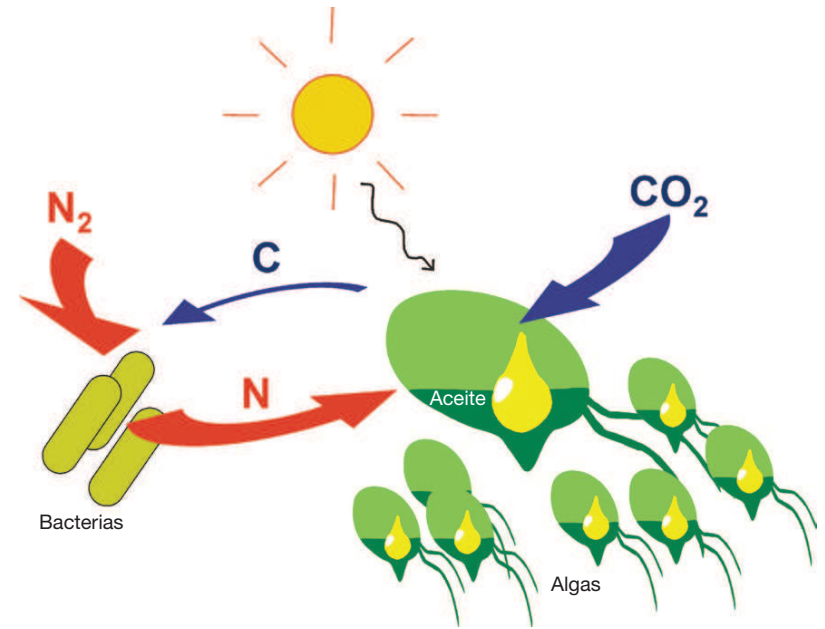
Con el objeto de continuar mejorando las posibles propiedades biofertilizantes de *A. vinelandii*, generamos cepas mutantes con un cambio en un aminoácido del sitio activo de la enzima glutamina sintetasa, las cuales presentan actividad reducida. Esta enzima es la encargada de sintetizar el aminoácido glutamina a partir de amonio y es el principal punto de convergencia del metabolismo del carbono y del nitrógeno. A partir de la glutamina (y el glutamato que se sintetiza a partir de la misma) se sintetizan el resto de las biomoléculas nitrogenadas de las células. De esta manera, estas cepas mutantes tienen una capacidad reducida de procesar el amonio producido por la FBN y lo liberan al medio extracelular y por otro lado presentan un menor requerimiento energético, menor consumo de azúcares y menor generación de biomasa bacteriana. La modificación genética a ambos niveles (disrupción de la homeostasis del nitrógeno celular y de la síntesis de aminoácidos) incrementó aditivamente la tasa inicial de excreción de amonio, sin embargo solo se verificaron incrementos transientes de esta propiedad junto con síntomas de disfunción celular severa [16].

Cuando se utilizaron estas cepas como bioinoculantes en el cultivo de una diversidad de microalgas oleaginosas, se observó que permitían cubrir los requerimientos de nitrógeno de las mismas hasta un nivel equivalente a 0,5 mM de amonio (Fig. 1). Como resultado de la inoculación pudo producirse aceite



**Figura 1.** Los biofertilizantes nitrogenados permiten sustituir parte de los fertilizantes químicos durante el cultivo de microalgas.

(A) cultivos de microalgas *Chlorella sorokiniana* con o sin el agregado de fertilizante nitrogenado (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) o con bacterias biofertilizantes. (B) curvas de crecimiento de *C. sorokiniana* en ausencia (■) o presencia (▲) de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> o los biofertilizantes bacterianos *A. vinelandii* Δ*nifL* (◆), *A. vinelandii* D49S (●); o extracto de *Nostoc* sp. M2 (▼).



**Figura 2.** Esquema del intercambio carbono (C) – nitrógeno (N) entre microalgas y las bacterias biofertilizantes. La inoculación de microalgas con bacterias biofertilizantes permite la acumulación de biomasa algal rica en aceites (hasta el 50% de su masa seca) a expensas del carbono y el nitrógeno del aire y la energía solar.

algal (hasta el 50 % de la biomasa seca) a partir del carbono y del nitrógeno del aire. Se cree que en estos sistemas la microalga provee la energía necesaria para la FBN de la bacteria por medio de la excreción de productos fotosintéticos carbonados [15, 16] (Fig. 2).

### Tecnología del uso de *Nostoc* spp. como biofertilizante nitrogenado

*Nostoc* spp. son cianobacterias filamentosas que realizan la FBN aeróbica por medio de células especializadas para tal fin. Mientras que las células vegetativas de los filamentos llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica y la asimilación del carbono, los heterocistos, que se diferencian a intervalos más o menos regulares

a lo largo de los filamentos de células vegetativas, pierden estas capacidades y en cambio llevan a cabo la FBN. De esta manera, el crecimiento armónico de los filamentos se sustenta en un intercambio de carbono por nitrógeno fijado entre ambos tipos celulares.

*Nostoc* sp. cepa M2 fue aislada en el sudeste de la provincia de Buenos Aires y en cultivo permite fijar unos 22 mg de nitrógeno del aire  $\cdot L^{-1} \cdot d^{-1}$  bajo condiciones controladas de laboratorio y unos 15 mg  $L^{-1} \cdot d^{-1}$  en fotobiorreactores tubulares a la intemperie en primavera/verano en la ciudad de Mar del Plata. Además de su gran capacidad de fijar nitrógeno del aire, esta cepa presenta otras propiedades de interés biotecnológico tales como: 1) crecimiento en forma de agregados laminares de filamentos, que facilitan notablemente su cosecha; y 2) fragilidad celular que permite obtener con facilidad preparaciones concentradas de su contenido celular con un contenido proteico (principal destino del nitrógeno fijado) del 50%. Estas preparaciones contienen además un complemento de enzimas hidrolíticas que degradan las proteínas hasta un tamaño accesible para una diversidad de microalgas. Estas preparaciones de proteínas de *Nostoc* sp. M2 pueden ser convertidas en proteínas de microalgas con una eficiencia que tiende al 100%.

Hemos observado también, en experimentos preliminares, que estas preparaciones podrían ser útiles como biofertilizantes para plantas.

### **Bacterias asociadas a microalgas como posible fuente de bioinoculantes nitrogenados para plantas**

Durante nuestros estudios de bacterias asociadas a microalgas hemos notado que estas poblaciones suelen estar enriquecidas en géneros de bacterias comúnmente asociados a plantas tales como *Rhizobium* spp., *Herbaspirillum* spp., *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp, etc [12]. Esta observación motivó nuestro interés en estudiar las propiedades de biofertilizantes de algunas de ellas. En estudios preliminares hemos observado un efecto positivo de la inoculación de plantas de trigo con una cepa de *Herbaspirillum* spp. aislada de un cultivo de microalgas de nuestra zona en cultivos hidropónicos, en condiciones controladas, en cámaras de cultivo. Se observaron diferencias en el porcentaje de germinación, la elongación, contenido de clorofila y peso fresco foliares, y la elongación y peso fresco de las raíces. Estos efectos de la inoculación fueron considerablemente mayores en cultivos hidropónicos sin el agregado de una fuente de nitrógeno.

### **PERSPECTIVAS Y POSIBILIDADES DE INTERCAMBIO Y TRANSFERENCIA**

Actualmente se continúan optimizando los inoculantes para microalgas como principal actividad de innovación de nuestro grupo. Se continuarán profundizando las líneas de investigación referidas a la ingeniería genética de *A. viennelandii* y a la tecnología del procesamiento de la biomasa de *Nostoc* sp. M2. El primer caso representa un modelo de estudio fructífero para desafiar distintas hipótesis sobre la factibilidad de distintos desarrollos de ingeniería genética para la optimización de biofertilizantes nitrogenados. El segundo enfoque explora áreas de aplicación más concretas y está actualmente abocado a refinar los detalles de productividades de biomasa de la cepa M2 que podrían lograrse regionalmente en zonas aledañas a los posibles sitios de uso de los mismos, como así también a la posible formulación de estos preparados para optimizar su eficacia y estabilidad durante un posible almacenamiento. Nos interesa, además, conocer más detalles de las propiedades nutricionales y otros posibles factores promotores del crecimiento.

El desarrollo de bioinoculantes para plantas es una actividad ya bien establecida tanto en Argentina como el resto del mundo. Sin embargo, confiamos en que nuestro enfoque experimental mixto con algas y cianobacterias podría aportar una perspectiva alternativa interesante para el mejoramiento e innovación en el campo de los agroinsumos de última generación para una agricultura sustentable.

## REFERENCIAS

1. Stewart WM, Roberts TL (2012) Food security and the role of fertilizer in supporting it. *Proc Eng* 46:76–82.
2. Erisman JW, Sutton MA, Galloway J, Klimont Z, Winiwarter W (2008) How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nat Geosci* 1:636–639.
3. Curatti L, & Rubio L M (2014) Challenges to develop nitrogen-fixing cereals by direct nif-gene transfer. *Plant Sci* 225:130–137.
4. Current world fertilizer trends and outlook to 2016 (2012) FAO, Rome, Avail-able online at <ftp://ftp.fao.org/ag/agp/docs/cwfto16.pdf>.
5. Tilman D *et al.* (2009) Beneficial biofuels—the food, energy, and environment trilemma. *Science* 325(5938):270.
6. Aneja VP, Schlesinger WH, Erisman JW (2008) Farming pollution. *Nat Geosci* 1(7):409–411.
7. Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25(3): 294–306.
8. Borowitzka MA (2013) Techno-economic modeling for biofuels from microalgae. *Algae for biofuels and energy*. Springer, Netherlands pp 255–264.
9. Dos Santos PC, Fang Z, Mason SW, Setubal JC, Dixon R (2012) Distribution of nitro-gen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes, *BMC Genomics* 13:162.
10. Zehr JP (2013) Interactions with partners are key for oceanic nitrogen-fixing-cyanobacteria: ocean-dwelling cyanobacteria associate with a variety of other-microorganisms, including those that are photosynthetic, *Microbe* 8:117–122.
11. Ortiz-Marquez JCF, Do Nascimento M, Zehr JP, Curatti L (2013) Genetic engineering of multispecies microbial cell factories as an alternative for bioenergy production. *Trends Biotechnol* 31(9):521–529.
12. Do Nascimento M, Dublan MDLA, Ortiz-Marquez JCF, Curatti L (2013) High lipid productivity of an Ankistrodesmus–Rhizobium artificial consortium. *Bioresource Technol* 146:400–407.
13. Setubal JC *et al* (2009) Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol* 191(14):4534–4545.
14. Sarkar A, Reinhold-Hure KB (2014) Transcriptional profiling of nitrogen fixation and the role of NifA in the diazotrophic endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *PLoS One* 9(2):e86527.
15. Ortiz-Marquez JCF, Do Nascimento M, de los Angeles Dublan M, Curatti L (2012) Association with an ammonium-excreting bacterium allows diazotrophic culture of oil-rich eukaryotic microalgae *Appl Environ Microbiol* 78(7):2345–2352.
16. Ortiz-Marquez JCF, Do Nascimento M, Curatti L (2014) Metabolic engineering of ammonium release for nitrogen-fixing multispecies microbial cell-factories. *Metab Eng* 23:154–164.