

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

## FACULTAD DE AGRONOMIA



FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO POR  
LEGUMINOSAS FORRAJERAS.

---

### TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO AGRONOMO

P R E S E N T A N:

FELIPE DE JESUS ARROYO BERASTEGUI

JOSE GODINEZ ANGUIANO

JOSE ANTONIO ORDAZ SUAREZ

Las Agujas Mpio. de Zapopan, Jal., 1994

---



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**FACULTAD DE AGRONOMIA**  
**COMITE DE TITULACION**

**SOLICITUD Y DICTAMEN**

**SOLICITUD**

M.C. SALVADOR MENA MUNGUIA.  
PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION.  
P R E S E N T E.

Conforme lo indica la Ley Orgánica de la Universidad de Guadalajara y su Reglamento, así como lo establece el Reglamento Interno de la Facultad de Agronomía, he reunido los requisitos necesarios para iniciar los trámites de Titulación, por lo cual solicito su autorización para realizar mi TESIS PROFESIONAL, con el tema:

FIJACION BIOLCGICA DEL NITROGENO FCR LEGUMINCAS FCRRAJERAS

ANEXO ORIGINAL Y DOS COPIAS DEL PROYECTO DEL TRABAJO DE TITULACION.

MODALIDAD: Individual ( ) Colectiva (x).

Nombre del Solicitante	Código	Generación	Orientación o Carrera	Firma del Solicitante
FELIPE DE JESUS ARROYO BERASTEGLI	080318464	80-85	FITOTECNIA	
JOSE GODINEZ ANGLIANC	080424329	80-85	GANADERIA	
JOSE ANTONIO ORDAZ SUAREZ	077460144	80-85	GANADERIA	
-----	-----	-----	-----	-----
-----	-----	-----	-----	-----

Fecha de Solicitud: 14 DE FEBRERO DE 1994

**DICTAMEN**

Vo. Bo. de Aprobación

M. EN C. SALVADOR MENA MUNGUIA

PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION

**AUTORIZACION DE IMPRESION**

Q.F.B. MARIA ELENA VILLASENOR QUINTERO

DIRECTOR

M.C. JUAN RUIZ MONTES  
ASESOR

M.C. MIGUEL CRENC GARCIA  
ASESOR

VO.BO. PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION

M. EN C. SALVADOR MENA MUNGUIA

FECHA: 20 de junio de 1994

Original: Solicitante. Copia: Comité de Titulación.

man



BIBLIOTECA CENTRAL

**REVISION BIBLIOGRAFICA ACERCA DE LA FIJACION  
DEL NITROGENO POR LEGUMINOSAS FORRAJERAS**

AGRADECIMIENTO

A DIOS.

A MI UNIVERSIDAD

FACULTAD

A MI DIRECTOR Y ASESORES DE TESIS

Q.F.B. MARIA ELENA VILLASEÑOR QUINTERO

M. C. JUAN RUIZ MONTES

M. C. HUGO MORENO GARCIA

A MIS MAESTROS

A MIS COMPAÑEROS

## INDICE

	Págs.
1.1 RESUMEN.....	1
1.2 INTRODUCCION.....	4
1.3 IMPORTANCIA DEL NITROGENO EN LA PRADERA.....	5
1.4 CICLO DEL NITROGENO EN LA NATURALEZA.....	6
1.5 CLASIFICACION DE <u>Rizobium</u> Y ALGUNAS CARACTERIS- TICAS.....	9
1.6 LEGUMINOSAS Y FIJACION DEL NITROGENO.....	10
1.7 INFECCION Y FORMACION DE NODULOS.....	11
1.8 FUNCION DE LOS NODULOS.....	12
1.9 LA NITROGENASA Y SU FUNCION EN LA FIJACION DEL- NITROGENO.....	13
1.10 FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN LA FIJACION DE NITROGENO ATMOSFERICO.....	15
1.10.1 HUMEDAD DEL SUELO.....	15
1.10.2 TEMPERATURA DEL SUELO.....	16
1.10.3 ACIDEZ O REACCION DEL SUELO.....	17
1.10.4 NUTRIMENTOS PRESENTES EN EL SUELO.....	18
1.11 IMPORTANCIA DE LA INOCULACION.....	18
1.12 ASOCIACION RIZOBIO-LEGUMINOSAS FORRAJERAS EN LA FIJACION DE NITROGENO.....	20

	Págs.
1.13 USO DE LA BIOTECNOLOGIA PARA LA PRODUCCION - INDUSTRIAL DE <u>Rhizobium</u> .....	23
1.13.1 MANEJO DE CEPAS DE <u>Rhizobium</u> .....	23
1.13.2 RECOLECCION Y PRESERVACION DE LOS NO DULOS.....	24
1.13.3 AISLAMIENTO DE <u>Rhizobium</u> .....	24
1.13.4 IDENTIFICACION DE CEPAS.....	25
1.13.5 EFECTIVIDAD POTENCIAL.....	26
1.14 PRESERVACION Y RECONSTITUCION DE CEPAS DE RI ZOBIOS.....	26
1.14.1 LIOFILIZACION Y RECONSTITUCION DE CE PAS DE <u>Rhizobium</u> .....	27
1.15 PREPARACION DE INOCULANTES.....	28
1.15.1 MULTIPLICACION DEL INOCULANTE.....	28
1.15.2 PREPARACION, EMPAQUE, MADURACION Y - ALMACENAMIENTO DEL INOCULANTE.....	28
1.16 EVALUACION DE CALIDAD DE LOS INOCULENTES....	30
1.17 CONCLUSIONES.....	32
1.18 LITERATURA CITADA.....	33
1.19 ANEXOS.....	37



BIBLIOTECA CENTRAL

## RESUMEN

Los fertilizantes químicos nitrogenados son ampliamente -- utilizados para obtener mejores rendimientos en las cosechas. -- Recientemente se han buscado alternativas más económicas para -- incrementar la producción y calidad de las pasturas y aumentar -- la eficiencia de la productividad animal. Un sistema presente -- en la naturaleza, es la asociación biológica del Rhizobium-Legu -- minosa, donde las bacterias fijadoras de nitrógeno reciben de -- la planta hospedera los nutrimentos necesarios para su desarro -- llo y las plantas leguminosas obtienen de aquellas, compuestos -- amoniacales con los que sintetizan proteínas. Existen legumino -- sas forrajeras como la Centrosema pubescens (Bejuco de patito), Desmodium intortur (Bejuco), Pueraria phaseloides (Kudzu), --- Sthylosanthes guayanensis (Yerba de la gallinera), Medicago sa -- tiva (Alfalfa) y Leucaena leucocephala (Guaje) entre otras, que -- tienen un alto potencial de nitrógeno que varía de 150 a 500 -- kg/ha/año. Se ha reportado incrementos substanciales en rendi -- mientos de materia seca (MS) de un 78% con la inoculación en -- Leucaena leucocephala. Así en pasturas asociadas, (Dygitaria -- decumbens) con leguminosas forrajeras tropicales se han obteni -- do rendimientos promedios de 10.5 toneladas de MS con un conte -- nido de proteínas en las pasturas de 10.2% y una fijación de -- 130 kg de N/ha/año. Sin embargo, las condiciones climáticas y -- edáficas incluyen fuertemente en el desarrollo de la asociación

simbiótica y por lo consiguiente en la fijación del nitrógeno - en las diferentes especies. El objetivo de esta revisión bibliográfica es analizar y discutir la información existente sobre el potencial de la simbiosis Leguminosa-Rhizobium en el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico.

## REFERENCIAS SOBRE EL TEMA

- Alexander, M. 1980. Introducción a la Microbiología del suelo. Libro y Editores, S.A. México, D.F. p. 82, 83 y 433.
- Brill, W.J. 1977. Fijación biológica de nitrógeno. Investigación y Ciencia. Barcelona, España. p. 44-54.
- Date, R.A. 1970. Microbiological promems in the inoculation -- and nodulation of legumes. Plant and soil 32:703-725.
- Somasegara, P. and Hoben, H.J. 1985. Methods in Legume-Rhizo-bium. Thechnology. Univ. of Hawaii. "NIFTAL proyect and MTRCEN". Departament of Agronomy and soil science. 365 p.

## FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO POR LEGUMINOSAS FORRAJERAS

### 1.2 INTRODUCCION

Los fertilizantes químicos son ampliamente utilizados para obtener mejor rendimiento en las cosechas. Sin embargo, debido al alto precio alcanzado últimamente por estos productos, se tiene la necesidad de buscar alternativas económicas para sustentar rendimientos adecuados de productos básicos y en la producción de pastizales con leguminosas forrajeras.

Un sistema eficiente que existe en la naturaleza es la asociación biológica de Rhizobium-Leguminosa, en que las bacterias reciben de la planta hospedera los nutrimentos necesarios para su desarrollo y las leguminosas obtienen de aquellos diferentes compuestos entre los que destacan los amoniacales con los que sintetizan proteínas. Con este simple proceso, que utiliza sólo energía derivada de la fotosíntesis, se aprovecha alrededor del 40% de las aproximadamente 150 mil toneladas que se fijan anualmente en el mundo por vía biológica (Brill, 1977).

La utilización de leguminosas forrajeras asociadas con los pastos y/o como banco de proteína, constituyen una de las alternativas importantes en la alimentación de las explotaciones ganaderas de carne y leche en el país. Estas representan una ---

fuelle de forraje de alta calidad nutritiva, con un mayor contenido de digestibilidad de la proteína cruda y un alto contenido de calcio y fósforo. Además retienen su valor nutritivo en etapas de crecimiento avanzados.

La capacidad de fijación de nitrógeno por la familia de las leguminosas, ha sido conocido desde 1888 (Burns y Hardy, 1975) aunque mucho antes se sabía que las leguminosas eran capaces de enriquecer el suelo. Por lo tanto, se planteó como objetivo de esta revisión bibliográfica analizar y discutir la información existente sobre el potencial de la simbiosis Leguminos-Rhizobium en el proceso de fijación del nitrógeno atmosférico.

### 1.3 IMPORTANCIA DEL NITROGENO EN LA PRADERA

El nitrógeno es uno de los factores limitantes en el crecimiento de las plantas y de los animales; la falta de este nutriente en el suelo repercute fuertemente en la producción de los cultivos agrícolas y forrajeros (Bill, 1977).

En los trópicos, es frecuentemente el nutrimento más deficiente en el suelo y su falta es una de las causas principales de la baja producción de los cultivos (Young, 1976). Es un constituyente característico de las proteínas y además muchos componentes de la célula viva lo contienen como son los ácidos nucleicos, purina, vitaminas, pirimidinas, porfirinas y alcaloi

des (Towsend, 1973).

Por otro lado, aún cuando es un elemento, que compone casi el 80% de la atmósfera terrestre, solamente puede ser aprovechado cuando se incorpora en los sistemas biológicos, es decir, fijándose o combinándose con ciertos elementos como el hidrógeno o el oxígeno (Brill, 1977). El proceso de fijación se da por la reducción del nitrógeno divalente ( $N_2$ ) a amoníaco ( $NH_3$ ) usando materiales energéticos provenientes directa o indirectamente de la fotosíntesis de las plantas (Dobereiner, 1978).

La fijación de nitrógeno es una facultad encontrada en unos cuantos géneros de bacterias y otros microorganismos; ningún organismo superior ha desarrollado esta capacidad (Brill, 1977).

#### 1.4 CICLO DEL NITROGENO

El ciclo del nitrógeno comprende varios procesos microbiológicos, químicos y físicos; como resultado de estos procesos ocurre una serie de transformaciones simultáneas y en diverso sentido, que involucran componentes orgánicos, inorgánicos y volátiles, como lo describe Alexander (1980) (Figura 1).

Los principales procesos involucrados en el ciclo del nitrógeno son:

- 1.- Fijación: En este proceso, una parte del N<sub>2</sub> atmosférico es reducido a la forma amoniacal, por ciertos microorganismos del suelo, ya sean simbióticos o de vida libre. El proceso de fijación constituye un aporte muy importante al suelo que varía de 100 hasta 500 -- kg/ha/año (Alexander, 1980).
- 2.- Precipitación: En la atmósfera, una parte del nitrógeno molecular se convierte en amonio por la acción de las tormentas eléctricas. El amonio llega al suelo con el agua de las lluvias, este proceso constituye otro aporte de N al suelo en el ciclo del nitrógeno, que representa de 50 hasta 100 kg de N/ha/año en las regiones tropicales (Alexander, 1980).
- 3.- Inmovilización: Cuando el nitrógeno del suelo es asimilado por las plantas y los microorganismos, este es incorporado a compuestos orgánicos mediante procesos biológicos del suelo y pasa a formar parte de la materia orgánica estable del mismo. La mayor parte del nitrógeno del suelo se encuentra como nitrógeno orgánico, que puede convertirse en forma aprovechable para las plantas a través de la mineralización, la cual es favorecida por una alta humedad y temperatura en el suelo (Date, 1976).
- 4.- Mineralización: Por el proceso de mineralización se descompone el nitrógeno orgánico en compuestos inorgánicos.

nicos y se libera así, nitrógeno disponible para el crecimiento vegetal y microbial. La mineralización comprende dos etapas: Amonificación, en la cual el nitrógeno orgánico se convierte en amonio y la nitrificación, donde el nitrógeno amoniacal es convertido a nitritos y después a nitratos. En los suelos donde no se realizan aplicaciones de fertilizantes que provienen de la mineralización, es la principal fuente para el crecimiento de las plantas no fijadoras (Ortiz, S., 1984).

- 5.- Desnitrificación: Cuando se presentan condiciones anaeróbicas en el suelo, los nitratos son reducidos a compuestos volátiles de nitrógeno ( $N_2$ , NO) mediante la intervención de bacterias desnitrificantes, que utilizan los nitratos como fuente de oxígeno. Este proceso se presenta especialmente cuando el suelo se encuentra inundado (Worthen y Aldrich, 1980).
- 6.- Lixiviación: Este proceso no involucra una transformación del nitrógeno, simplemente consiste en el arrastre de iones nitrato, que por su alta solubilidad se mueven por flujos de masa disueltos en la solución del suelo cuando el agua se percola a través del perfil, con lo cual son arrastrados hacia las capas más profundas (Alexander, M., 1980).

7.- Volatilización: Es otro proceso que conlleva a pérdidas de nitrógeno al suelo en formas volátiles ( $\text{NH}_3$ ). Esto es más pronunciado en suelos alcalinos y en sitios con orina depositada por el ganado en las pasturas. También la quema de materia orgánica, por ejemplo, de residuos de cultivos o de potreros para provocar el rebrote del pasto, causan volatilización del nitrógeno (Andrew, 1977).

#### 1.5 CLASIFICACION DEL Rhizobium Y ALGUNAS DE SUS CARACTERISTICAS

Las bacterias del género Rhizobium (Familia Rhizobiaceas) comprenden un grupo de microorganismos genéticamente diversos y fisiológicamente heterogéneos, que se han clasificado juntos, debido a su habilidad para nodular plantas del grupo de las leguminosas (Sosasegaran, Hoben y Halliday, 1981).

Jordan (1983) cita tres géneros de bacterias que forman la familia Rhizobiaceae, que son: Rhizobium, Gradyrhizobium y Agrobacterium. Las diferencias entre ellas consisten en sus requerimientos de temperatura, pH, morfología de las colonias, crecimiento en agar-levadura-manitol (ALM), tiempo para producir turbidez en caldo y utilización de carbohidratos entre otros.

Las células de Rhizobium, normalmente son redondeadas, móviles y gram negativas (Pelczar, Reid y Chan, 1977): tienen un diámetro que va de 0.5 a 0.9  $\mu\text{m}$  y de 1.2 a 3.0  $\mu\text{m}$  de largo, su-

movilidad la presentan mediante 2 a 6 flagelos peritricos. Se conocen seis especies que son: Rhizobium meliloti, Rhizoibium leguminosarum, Rhizobium phaseoli, Rhizobium trifoli, Rhizobium iaponicum (Alexander, 1980).

Este mismo autor cita a Vincent (1974), quien propuso a -- Rhizobium loti como un grupo taxonómico debido a su rápido crecimiento y flagelo polar o subpolar que nodula a un amplio rango de leguminosas como Lotus corniculatus, Lotus tenuis, Lupi--nus densiflorus, Anthyllis vulneraria, Ornithopus sativus, Ci--cerarietinus, Caragana arborecens y Leucaena leucocephala; sin embargo, advierte que algunas de estas especies pueden ser nodu-- ladas por Bradyrhizobium. (Anexo: Cuadro 1).

## 1.6 LEGUMINOSAS Y FIJACION DEL NITROGENO

Las leguminosas comprenden tres familias: La Caesalpina-- ceae, Mimosaceae, Papilionaceae que contiene alrededor de 500 a 700 géneros con 12,000 a 17,800 especies (Hutchinson, 1964). - Por otro lado Date (1976) cita a Allen y Allen (1961) quienes - informan que de la familia Caesalpinaceae nodulan el 23% de las especies, de la Mimosaceae el 87% y de la Papilionaceae el 93%.

Dobereiner (1978) agrega que la simbiosis leguminosa-rizo-- bio es la más elaborada y la más eficiente asociación entre --- plantas y bacterias. De esta forma, las cepas seleccionadas pa-- ra nuevos ambientes deben ser genética y geográficamente afines

al hospedero (Date y Halliday, 1979). La necesidad de un Rhizobium especializado es importante en la agricultura, sobre todo cuando se introducen leguminosas en nuevos sitios (Date, 1976).

### 1.7 INFECCION Y FORMACION DE NODULOS

En el desarrollo de la estructura nodular, el paso inicial involucra la liberación dentro de la zona radical, de productos excretados por la planta que estimula a la bacteria (Alexander, 1980). Los Rhizobium penetran a la raíz a través de un pelo radical, la pared celular de éste los invagina constituyéndose un tubo de infección que contiene un enjambre de células Rhizobium proliferantes. Muchas de estas infecciones abortan, pero algunas avanzan hacia la base del pelo radical por repetición del proceso de invaginación se introducen en las células corticales de la raíz. El ápice del tubo de infección puede romperse liberando las bacterias dentro de las células corticales, lo que determina una dilatación tumoral o sea un nódulo radical (Brill, 1977). Por su parte Bergensen (1982) agrega que el punto de proliferación es en el protoxilema, en donde la cepa de células más internas se convierte en el punto de crecimiento del nódulo.

Fillat (1961) señala además la transformación de bacterias a bacteroides, la síntesis de Leghemoglobina e inicio de la fijación de nitrógeno. La leghemoglobina es un compuesto proteínico que se localiza entre la membrana peribacteroide del nódulo y las células bacteroides, su importante función es suminis-

trar oxígeno a estos organismos aerobios y mantiene el  $O_2$  libre a bajos niveles (Bergensen, 1961).

### 1.8 FUNCION DE LOS NODULOS

El color interno de nódulos efectivo por lo general es rojo o rosado, lo cual es debido a la presencia activa de la Leghemoglobina. Si el color interno del nódulo es blanco o verde, generalmente es inefectivo. Sin embargo, la presencia de nódulos grandes, abundantemente y de color interno rojo pueden indicar alta fijación de  $N_2$ , estos no son parámetros definitivos para evaluar la fijación de  $N_2$ ; los nódulos rojos y abundantes -- pueden ser inefectivos. Un nódulo efectivo puede mostrar simultáneamente zonas blancas, rojas y verdes que indican respectivamente las áreas de crecimiento de los nódulos, la fijación activa del nitrógeno y la senescencia (Jordan, 1984).

Además de la energía requerida para la formación y el mantenimiento del nódulo, la actividad de fijación de nitrógeno -- también dependen de un suministro adecuado de carbohidratos por parte de la planta. Durante la fase vegetativa, la actividad de fijación de nitrógeno alcanza un nivel máximo y luego declina a alinearse la competencia por carbohidratos para la producción de semillas.

## 1.9 LA NITROGENASA Y SU FUNCION EN LA FIJACION DEL NITROGENO

La molécula clave en la ruta de la fijación del nitrógeno- que cataliza la reducción de  $N_2$  a  $NH_3$  es llamada enzima nitroge nasa (Brill, 1977), que se localiza en el interior de las mem- branas de las células de los organismos fijadores de nitrógeno. Esta enzima tiene dos distintos componentes en el complejo enzi mático activo. El primero usualmente llamado protefna-Fe (PM - aprox. 60,000 Daltons), consiste en dos unidades aparentemente idénticas con un grupo de cuatro átomos de Fe y cuatro de S lá- bil. El arreglo completo de la molécula es algo similar al de- la Ferredoxina bacteriana pero más larga. El segundo componen- te, la protefna Mo-Fe (PM aprox. 200,000 Daltons) consiste en - cuatro subunidades posiblemente en dos partes diferentes. Su - estructura es menos clara que la del protefna-Fe, con estimacio- nes de 1-2 Mo, 12-13 Fe y 24 átomos de S se encuentran asocia- dos en grupos de 4+4, como en la protefna-Fe, pero otros tienen diferentes arreglos estructurales (Alexander, 1984), debido a - que la reducción del nitrógeno se realiza sobre la protefna --- Mo-Fe, se ha sugerido llamar a este componente nitrogenasa, y - la protefna-Fe, nitrogenasa reductasa. Esta terminología es -- adaptada en la siguiente descripción (Resumida en la figura 2)- de cómo la reducción del nitrógeno a amonio es comunmente enten- dible.

Una molécula reductora a bajo potencial redox (aprox.-430- mv), dona un electrón a la nitrogenasa reductasa, lo cual capa-

cita para reaccionar con el ATP-Mg. Mientras tanto, la molécula de nitrógeno a reducirse, ha combinado con el molibdeno de la nitrogenasa. Así los dos componentes fluyen sólo de la nitrogenasa reductasa a la nitrogenasa con la concomitante reducción de dos moléculas de ATP (Sprent, 1979). Se cree que el nitrógeno se reduce en tres etapas de dos electrones: requiriendo así de seis complejos nitrogenasa reductasa-Mg-ATP. Los protones necesarios para completar la formación de dos moléculas de amonio resultante se derivan del mismo acervo celular.

El proceso de reducción del nitrógeno a amonio parece ser eficiente sólo en un 80%, de modo que el valor del 15 ATP por molécula de nitrógeno reducido (Sprent, 1979).

Producción de hidrógeno. Una forma en que el complejo de la enzima nitrogenasa es ineficiente, es que permite que los electrones se desvíen en nitrógeno, y en cambio se combinen directamente con los protones para formar gas hidrógeno, el cual puede ser desprendido. Esto no sólo desperdicia poder reductivo, sino también energía, desde que el ATP es utilizado hasta antes que ocurra la reducción de protones (Evans, et al, 1979).

Versatibilidad del sustrato de la nitrogenasa. En la edición al nitrógeno y a los protones, la nitrogenasa puede catalizar la reducción de otra variedad de otros sustratos, principalmente con enlaces N-N, N=N y C=N. Es evidente que no todos los sustratos se unen a la nitrogenasa en el mismo sitio; por-

ejemplo, el nitrógeno y el acetileno pueden ocupar diferentes sitios. Esta es una de las muchas razones por la que se debe tener cuidado en la extrapolación de acetileno reducido a nitrógeno fijado (Sprent, 1979). En teoría se sabe que dos electrones son usados para reducir una molécula de acetileno, y seis electrones son usados para reducir una molécula de nitrógeno a amonio, la reducción acetileno-nitrógeno es de 1:3. Sin embargo, esto no considera dos hechos: 1) que en presencia de N<sub>2</sub>, pero mucho menos en presencia de acetileno, los electrones son enviados a la reducción de protones; y 2) que el acetileno puede inhibir la captura de N<sub>2</sub>. Debe entenderse también, que en la evolución de H<sub>2</sub> varía con los organismos y con las condiciones ambientales (Alexander, 1984).

#### 1.10 FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN LA FIJACION DE NITROGENO ATMOSFERICO

Estos factores pueden ser climáticos, edáficos y de manejo. Los factores del suelo que fundamentalmente afectan la simbiosis Rhizobium-Leguminosa son: Humedad, temperatura, acidez, contenido nutrimental y ausencia de depredadores del Rhizobium en el suelo (Graham y Hubell, 1974).

##### 1.10.1 HUMEDAD DEL SUELO

La variación periódica de una población de Rhizobium está directamente asociada con las fluctuaciones de humedad. La su-

pervivencia de tres especies de rizobio en el suelo, mostró que Rhizobium trifolli tuvo más tolerancia a la sequía que Rhizobium melliloti contra el desecamiento y temperaturas altas del suelo, o un Rhizobium loti (Fouids, 1971). Marshall y Roberts- (1963) demostraron que la presencia de arcilla mormonillorita o illita, dieron más protección a Rhizobium trifolli contra el desecamiento y temperaturas altas en el suelo. En general se considera un rango óptimo de humedad del suelo para la nodulación y fijación de N<sub>2</sub> entre 60 y 70% de capacidad de retención del agua (Marshall, 1970).

#### 1.10.2 TEMPERATURA DEL SUELO

Aunque las leguminosas tienen una temperatura óptima más alta; para la nodulación y fijación del nitrógeno de las bacterias que se asocian con ellas no son necesariamente más tolerantes a las temperaturas altas, por ello Norris (1970) insiste en el uso de turba y aplicación de altos contenidos de bacterias en los inoculantes para el trópico ya que las temperaturas del suelo a una profundidad de 2.5 a 5.0 cm. en muchas áreas es de 40 a 45 °C durante seis horas diarias, afectando negativamente el sistema.

Galetti et al (1971) encontraron que temperaturas máximas diarias de 33 °C redujeron el inicio de la formación y eficiencia de nódulos en leguminosas de clima templado. Así mismo Ferrari y Manifaes (1967) comprobaron que los efectos de la tempe

ratura afectan principalmente a la fijación simbiótica, pues el crecimiento de Glycine javanica se estimuló a 40 °C. se aplicó - nitrógeno mineral, que los mejores rendimientos en plantas nodu- ladas se obtuvieron entre 30 y 36 °C.

Gibson (1971) señala que la temperatura óptima para la no- dulación y fijación del nitrógeno en zonas templadas es de 20 a 25 °C y para regiones tropicales es de 25 a 30 °C.

### 1.10.3 ACIDEZ O REACCION DEL SUELO

Las leguminosas tropicales difieren mucho en su sensibili- dad a la acidez del suelo (Andrew, 1976), pudiendo desarrollar- se entre un pH de 3.5 a 8.0; con un rango óptimo entre 5 a 6. - El efecto de la acidez en la sobrevivencia del género Rhizobium es variable, siendo más tolerantes las pertenecientes al ----- "caupi" (Loneragan, 1972).

Andrew y Norris (1961) encontraron que las leguminosas tro- picales toleraban más la acidez, ya que eran más eficientes que las de regiones templadas para extraer el calcio. Estos mismos autores encontraron en un suelo con un pH de 5.5 y 3% de satura- ción de calcio que Desmodium intortum, Centrosema pubescens, - Stylosanthes guyanensis y Macroptylidium lathyroides no mostra- ron deficiencia de calcio y nodulación, y en cambio Medicago sa- tiva, M. trunculata y Trifolium repens mostraron severas defi- ciencias y una pobre nodulación.

La acidez del suelo afecta directamente la sobrevivencia del Rhizobium, en acidez extrema la bacteria puede sufrir alteraciones morfológicas, pérdida de virulencia o capacidad de eficiencia; y los efectos indirectos impiden la absorción de nutrientes como fósforo, magnesio y molibdeno, solubilizando los elementos tóxicos como aluminio y manganeso (Kornelius y Stamel, 1973).

#### 1.10.4 NUTRIMENTOS PRESENTES EN EL SUELO

Para estudiar la relación entre los nutrientes y las leguminosas, Andrew (1977) los agrupa de la siguiente manera: a) - aquellos nutrientes que tienen efectos directos en la iniciación y desarrollo de los nódulos (N, Ca, P, S y B): b) los que influyen en la eficiencia de la simbiosis (Mo, P y S): y c) los que intervienen directamente en el metabolismo y crecimiento de las plantas. Independientemente de la simbiosis, en este grupo se ubican todos los nutrientes esenciales, con especial énfasis en el fósforo. El molibdeno es esencial en el segundo y tercero y el P en los tres.

#### 1.11 IMPORTANCIA DE LA INOCULACION

La habilidad de las capas para la formación de nódulos se le denomina infectividad y a la habilidad de los nódulos para fijar el N<sub>2</sub> se le denomina efectividad. La evaluación de las capas para determinar su efectividad e infectividad potencial,-

se deben conducir bajo condiciones óptimas de crecimiento y sin competencia de otros microorganismos (Date, 1977).

Ciertas especies de leguminosas sólo forman nódulos con un rango limitado de capas de rizobios. Estas leguminosas se denominan específicas (Date, 1977). Otras leguminosas forman nódulos con un rango amplio de rizobios aislados de diferentes especies de leguminosas y se denominan promiscuas.

Existen poblaciones nativas de rizobios en casi todos los suelos. Sin embargo, estas poblaciones varían en cantidad, especificidad y efectividad (Brill, 1977). Se puede utilizar la inoculación para modificar la población de rizobios en el suelo. Es más probable que una leguminosa específica responda a la inoculación en el campo que una leguminosa promiscua, debido a la escasez de capas en el suelo que nodulan con leguminosas promiscuas que forman nódulos abundantes con las capas nativas, están sujetas a varios factores que afectan la efectividad de la simbiosis en el campo; por ejemplo: 1) la mezcla de capas nativas en el suelo puede no incluir capas efectivas; 2) una capa infectiva puede competir con las capas efectivas y provenir la nodulación; 3) el ambiente puede modificar la efectividad de la simbiosis cuando una leguminosa crece bajo condiciones de campo.

Como resultado de estos factores, una leguminosa, clasificada como promiscua puede requerir inoculación bajo condiciones

de campo al igual que una leguminosa específica (Sylvester et al, 1983). Comúnmente se observa que las leguminosas promiscuas demuestran nodulación "semi-efectiva" con las cepas nativas en el campo (nodulan pero fijan una cantidad tan reducida de N<sub>2</sub>, que no les permite alcanzar su potencial de rendimiento). En este caso es necesario que las cepas en el inoculante sean capaces de competir con las cepas nativas por los sitios de nodulación. Por otro lado, si el inoculante falla no se tiene una consecuencia muy grave porque las cepas nativas fijan algo de nitrógeno, aunque no sea una cantidad muy alta pero de bajo costo.

Cuando se inoculan leguminosas específicas que no nodulan con las cepas nativas en el suelo, no hay problema de competencia entre las cepas nativas y el inoculante. Pero si el inoculante falla por otro motivo, la planta sufrirá deficiencias agudas de nitrógeno (Sylvester et al, 1983).

#### 1.12 ASOCIACION RIZOBIO-LEGUMINOSAS FORRAJERAS EN LA FIJACION DE NITROGENO

Como ya se ha mencionado, los Rhizobium forman nódulos en las raíces de las plantas leguminosas en las que fijan y transforman N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> que es utilizado por las plantas para la síntesis de aminoácidos (Brill, 1981). Esta simbiosis leguminosa-rizobio aporta aproximadamente el 20% de todo el nitrógeno fijado biológicamente al suelo (Franco, 1978), el cual está en forma -

orgánica por lo que sólo existen pequeñas pérdidas. Así podemos decir que 100 kg de nitrógeno fijado biológicamente equivalen a más de 100 kg de nitrógeno proveniente de fertilizantes químicos (Date, 1970). En esta simbiosis, la energía para la fijación es proveniente del sol, a través de los productos sintetizados por la planta. Esto representa un ahorro de energía necesaria para la fertilización nitrogenada. Esto justifica la intensa investigación para incrementar la eficiencia de este sistema biológico y aún extenderlo a plantas no leguminosas (Brill, 1981).

Se ha observado que las leguminosas son capaces de fijar por lo menos 100 kg de N/ha/año (Cuadro 3), así tenemos que la Leucaena leucocephala en monocultivo es capaz de fijar hasta 500 kg de N/ha/año, habiendo pocas especies por debajo de la media general. Por esto, tenemos que poner especial atención al proceso de fijación de nitrógeno, si se quiere aprovechar las leguminosas forrajeras al máximo.

Es común que las leguminosas forrajeras del trópico, sean infectadas con capas de baja calidad, encontrándose variaciones en la efectividad que pueden ser muy grandes (Bradly, 1980). En un ensayo de selección e inoculación cruzada de leguminosas tropicales con Rhizobium sp nativos del estado de Tabasco, (Velasco 1980) infiere que aún cuando se encuentre abundante cantidad de rizobio en el suelo, no todos son efectivos con una leguminosa y menos con varias especies. Una intensa investigación-

sobre selección de Rhizobium-Leguminosa y su efectividad en la fijación de nitrógeno atmosférico encontraron que el siratro -- (Macroptilim atropurpureum) y Centrosema sp son muy promiscuas, al compararlas con Leucaena leucocephala, que es muy específica.

Velasco et al (1981) emplearon diferentes niveles de fertilización fosfórica, potásica y micronutrientes como el cobre, zinc y molibdeno, en el establecimiento y nodulación de Desmodium intortum en la Sierra de Tabasco y encontraron mayores rendimientos de MS por plantas con niveles de 00-100-70, lo cual coincide con un mayor peso seco de los nódulos; no encontraron respuesta con los micronutrientes; con la inoculación se obtuvo un incremento en la MS de un 62% por plantas con respecto al -- testigo sin inoculante.

Peñaloza et al, (1984) en la región templada de Oaxaca evaluaron la respuesta del cultivo de la alfalfa a la inoculación con cepas de Rhizobium meliloti, nativa de la región y el efecto de los fertilizantes nitrogenados, fosforados y estiércol. Estos autores encontraron que en la población nativa rizobial, pocas cepas resultaron eficientes en la fijación de nitrógeno y su acción se estimuló por la humedad y el fertilizante fosforado y fue inhibida por el fertilizante nitrogenado; el estiércol no tuvo ninguna influencia en el incremento de la población ni en el rendimiento.

Castellanos y Rodríguez (1987) en un estudio que realiza--

ron sobre la respuesta de la alfalfa a la inoculación y fertilización nitrogenada en los suelos de la región lagunera, determinaron que el 30% de estos suelos responden a la fertilización nitrogenada o a la inoculación de cepas efectivas, lo cual podrá ser más redituable en el cultivo. En pasturas asociadas, Digitaria decumbens con leguminosas forrajeras tropicales se han obtenido rendimientos promedio de 10.5 toneladas con un contenido de proteínas de 10.2% y una fijación media de 130 kg de N/ha/año (Krestschmer, 1970) (Cuadro 3).

### 1.13 USO DE LA BIOTECNOLOGIA PARA LA PRODUCCION INDUSTRIAL DE Rhizobium

#### 1.13.1 MANEJO DE CEPAS DE Rhizobium

El manejo de las cepas de rizobios comprende un conjunto de procedimientos que se llevan a cabo con la finalidad de aislar, manipular y multiplicar las cepas o cultivos de rizobios. Además, por tratarse de un producto biológico, se requieren condiciones especiales para garantizar su conservación adecuada (Sylvester, et al, 1983). El manejo de las cepas constituye una parte muy importante en los trabajos de evaluación de la simbiosis leguminosa-rizobio y requiere de un laboratorio dotado con equipo específico para realizar los procedimientos de aislamiento, identificación, evaluación y preservación de las cepas de rizobio, así como para preparar los inoculantes necesarios para los ensayos y evaluar su calidad.

### 1.13.2 RECOLECCION Y PRESERVACION DE LOS NODULOS

Uno de los propósitos en la recolección de nódulos es disponer de una fuente de cepas de rizobios provenientes de diferentes ambientes y ecotipos de leguminosas, para realizar los estudios posteriores en cuanto a su potencial como inoculante.

Los nódulos una vez recolectados se descomponen rápidamente si no se conservan en tubos que contengan un desecante (Date y Halliday, 1979). Estos tubos, previamente preparados, deben ser llevados en los viajes de colección para poner dentro los nódulos inmediatamente después.

La época de recolección de nódulos más apropiada (según Date, 1976) es durante la fase de crecimiento vegetativo de la planta. Por otra parte, si no es posible recolectar los nódulos durante la estación de crecimiento rápido, puede recolectarse suelo alrededor de las raíces y posteriormente inocular una planta con esta muestra de suelo, para que se formen nódulos con rizobios procedentes del sitio de origen de la planta (Brill, 1981).

### 1.13.3 AISLAMIENTO DE Rhizobium

El aislamiento de rizobio se realiza estelizando la superficie del nódulo, aplastándolo y estriándolo sobre medios de cultivo LMA (levadura-manitol-agar) con el pH apropiado (Sylves

ter et al, 1983).

En el proceso de incubación se observan colonias que van apareciendo y se pueden escoger las más típicas de rizobios y éstas deben replicarse y volverse a estriar en un medio de agar por lo menos de tres veces para obtenerse cultivos puros de las cepas de rizobios.

Estas colonias típicas de rizobios se reconocen por su apariencia, su tasa de crecimiento y la producción de alcalinidad o acidez. En los medios de cultivos se puede incluir un indicador de pH, por ejemplo: en medio de LMA con un pH de 6.8 se incluye el azul de bromotimol que torna el medio amarillo con la producción de acidez y azul con la alcalinidad; por otra parte, se puede incorporar el indicador rojo congo al medio LMA; esto presenta ayuda para diferenciar los rizobios de otras bacterias; generalmente en tanto que muchas otras bacterias adquieren el color rojo con mayor intensidad como lo determina Somasegaran y Hoben (1985). La tasa de crecimiento también ayuda en el reconocimiento de las colonias de rizobios, debido a muchos contaminantes crecen más rápido que los rizobios.

#### 1.13.4 IDENTIFICACION DE CEPAS

Existen otros tipos de pruebas que se realizan para autenticarlas o identificarlas:

- a) Crecimiento en peptona-glucosa
- b) Prueba de Ketolactasa
- c) Reacción de Gram
- d) Habilidad para nodular

En medio de peptona-glucosa los rizobios no crecen bien; - la ausencia de Ketolactasa comprueba que el aislamiento es un - rizobio y no un *Agrobacterium*; los aislamientos gram positivos- son otras bacterias menos Rh; y sólo Rhizobium y Agrobacterium-tumefaciens son capaces de formar nódulos en las células de las raíces de las leguminosas (Date, 1976).

#### 1.13.5 EFECTIVIDAD POTENCIAL

Las pruebas de efectividad potencial se conducen para evaluar la habilidad de las cepas de rizobios en la fijación de N<sub>2</sub> con una leguminosa bajo condiciones óptimas. Es importante medir el potencial genético de la simbiosis para fijar N<sub>2</sub> para lo cual es necesario eliminar todos los factores limitantes para - el crecimiento de las plantas. Las jarras de Leonard fueron di señadas con este propósito: sin embargo, también es necesario - optimizar la intensidad de la luz, la disponibilidad de nutrientes, etc. (Dobereiner, 1978).

#### 1.14 PRESERVACION Y RECONSTITUCION DE CEPAS DE RIZOBIOS

Una adecuada desecación es la mayor manera de mantener los

cultivos de rizobios en condiciones genéticamente estables. Es ta forma de almacenamiento es la base de toda colección importante. Sin embargo, los rizobios como la mayoría de las bacterias gram negativas, son relativamente vulnerables a la desecación; por esta razón es importante tomar precauciones con el fin de asegurar una cantidad suficiente de organismos vivos, so bre todo en la etapa inicial del desecamiento (Sylvester, et al, 1983). En estas condiciones las cepas se pueden preservar por períodos de seis meses o más después de que las cepas de rizobios hayan sido aisladas y autenticadas, es necesario preservar las adecuadamente para conservar su viabilidad y estabilidad genética. Las cepas se pueden preservar de 2 a 3 meses en medio de Agar Levadura Manitol (LMA) manteniéndolas refrigeradas. Algunas cepas tropicales pueden ser sensibles a temperaturas bajas.

#### 1.14.1 LIOFILIZACION Y RECONSTITUCION DE CEPAS DE Rhizobium

La liofilización o desecamiento en frío es un medio ampliamente utilizado para la preservación de microorganismos (Somasegaran y Hoben, 1981). Consiste en un rápido enfriamiento de las cepas a temperaturas muy bajas, seguido de una rápida deshi dratación mediante sublimación de alto vacío.

Las cepas liofilizantes se conservan al vacío en ampollitas de vidrio. Para reconstruirlas se sacan las cepas, se suspenden las células en solución salina o medios de cultivos y se

siembran en medio de LMA; sin embargo, éstas pueden demorar en crecer más que los cultivos frescos. Los cultivos liofilizados pueden permanecer viables durante varios años. Existen otras técnicas de preservación en fragmentos de porcelana; en aceite mineral (Dobereiner, 1978).

#### 1.15 PREPARACION DE INOCULANTES

Se llaman inoculantes a la mezcla de un cultivo de cepas de rizobios con turba u otro soporte. El inoculante permite la supervivencia y fácil manipulación de los rizobios para asociar los con la leguminosa deseada (Date, 1976).

##### 1.15.1 MULTIPLICACION DEL INOCULANTE

Para poder producir cantidades grandes de inoculantes es necesario multiplicar las cepas en un medio líquido. Para cantidades pequeñas se puede multiplicar en una superficie de agar y suspenderlas en el caldo. Esto tiene la ventaja de que permite fácilmente controlar en forma visual la pureza del cultivo, mientras que en un medio líquido es necesario tomar otras medidas como pH final, examen al microscopio y cultivo en medio de peptona-glucosa para asegurar esto (Somasegaran y Hogen, 1981).

##### 1.15.2 PREPARACION, EMPAQUE, MADURACION Y ALMACENAMIENTO DEL INOCULANTE

Para preparar el inoculante se mezcla directamente el cal-

do o suspensión de células con la turba. La proporción de caldo o turba es de 1:2. Si se utiliza esterilizada se puede inyectar el caldo directamente a las bolsas, tomando precauciones necesarias para evitar contaminación. Factores como pH y la humedad final de la turba afectan la sobrevivencia de los rizobios- (Date, 1976). El inoculente con base en turba no estéril se empaca en bolsas de plástico delgado, que permita el intercambio- de gases con el ambiente.

En algunos laboratorios se incuban los inoculentes frescos a temperatura de 25 a 30 oC durante una semana, para permitir- la multiplicación de los rizobios en la turba; este proceso se- llama "maduración" del inoculente (Sylvester, et al, 1981).

El inoculente es un producto biológico, por lo tanto no -- puede ser almacenado y manipulado como un fertilizante inerte, - sino que es necesario tomar precauciones para su preservación y uso. El inóculo, cuando está en turba estéril, se puede almacenar a la temperatura ambiental; sin embargo, la conservación -- del inóculo en turba no estéril es mejor realizarla a temperaturas bajas, con lo cual se previene el crecimiento de hongos contaminados. Algunas cepas tropicales no toleran temperaturas bajas y no deben almacenarse en enfriador, lo que reduce el tiempo de almacenamiento (Somasegaran y Hoben, 1981).

## 1.16 EVALUACION DE CALIDAD DE LOS INOCULENTES

Aunque un inoculente supuestamente contenga cepas efectivas de rizobios, existe la posibilidad de que el medio de cultivo esté contaminado o que ha ocurrido una alta mortalidad de éstos en el inoculente o en las semillas inoculadas. Por esto es recomendable realizar recuentos de los rizobios tanto en el inoculente como en las semillas inoculadas. Esto ayuda a definir las causas de una falta de respuesta a la inoculación en el campo.

Somasegaran y Hoben (1981) consideran que 20 millones de rizobios por gramo de inoculente ó 300 rizobios por semilla son las cantidades mínimas requeridas para obtener una nodulación adecuada. Sin embargo, estos mismos autores recomiendan niveles mayores de 10 mil a 1 millón de rizobios por semilla, especialmente cuando existen competencias con cepas nativas.

Para evaluar la calidad de los inoculentes existen en general dos métodos: el recuento de células de rizobios en cajas de petri y la formación de nódulos en plantas de leguminosas.

Debido a la gran variación del número de rizobios que pueden existir en los inoculentes (entre 1 millón a 10 millones/gr) es conveniente hacer previamente una serie de diluciones para efectuar los recuentos. Además se hacen los recuentos en caja Petri sólo se realizan si la muestra está libre de conta

minantes. Este método supone que cada colonia se origina a partir de una célula de Rhizobium. Para hacer recuentos se hacen por métodos de diluciones en medio de LMA en cajas Petri, se hace recuento en la cual las colonias crezcan bien separadas (30-300 por caja).

## C O N C L U S I O N E S

- Las condiciones climáticas y edáficas tienen una marcada influencia en la fijación del nitrógeno por Rhizobium.
- La formación de nódulos de una leguminosa con cepas del suelo nativas e introducidas no garantizan la fijación de nitrógeno.
- Las leguminosas que nodulan con cepas específicas de Rhizobium y que pueden fijar de 150 a 500 kg de N/ha/año son: Centrosema, Desmodium, Pueraria, Stylosanthes, Medicago, Trifolium y Leucaena.
- La Biotecnología permite seleccionar y manipular cepas de Rhizobium de mayor capacidad fijadora de nitrógeno y así aumentar los rendimientos y calidad de forrajes.

## 1.18 LITERATURA CITADA

- Andrew, C. S., Norris, D.O., Comparative responses to calcium of five tropical and four temperate legume species. Aust. J. Agric: Res. 12:40-45.
- Andrew, C.S. 1976. Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. I Nodulation and growth. Aust. J. Agriculture Research. 27:611-623.
- Andrew, C.S., 1977. Nutrition restrain on legume-Symbiosis. - CSIRO. División of tropical crops and pasture. 12:62-84.
- Alexander, M., 1984. Biological Nitrogen Fixation. Ecology -- Technology and Physiology. Plenum Press, N.Y. and London. 247 p.
- Bergensen, I.J., 1982. Root nodules of legumes. Structure and Functions. Research Studies Press. Jhon Wiley and sons.- Great Britain. 614 p.
- Brill, W.J., 1977. Fijación biológica de nitrógeno. Investigación y Ciencia. Barcelona, España. p. 44-54.
- Brill, W.J., 1981. Nitrogen fixing maize. En: Ondarza. R.N., Robert M. y Bolivar, F. (Eds.). Transplante y Movilización de genes. CONACYT. México, D.F. 169 p.
- Burris, H.R., 1974. Biological Nitrogen Fixation. Plant Physiology. 54 (4):443-449.
- Burns, R.C., Hardy, R.W.F., 1875. Nitrogen and Fixation in bacteria and higher plants. Spreinger Verlag, Berlín. ISEÑ 3-540-07192-x. 480 p.
- Date, R.A., 1970. Microbiological problems in the inoculation and de nodulation of legumes. Plant and soil. 32:703-725.

- Date, R.A., 1976. Especificidad en la simbiosis Rhizobium-Legu  
minosa. p. 42-89. En: VIII Reunión Latinoamericana so-  
bre Rhizobium Celebrada en el CIAT. Cali, Colombia. 381-  
p.
- Date, R.A. and Hallyday, J., 1979. Collection, Isolation. Cha-  
racterizacion and Conservation of Rhizobium Strains. Proc.  
of the seventh Rhizobium conference Texas, A.E.M. Texas.-  
285 p.
- Dobereiner, J., 1978. Potencial for nitrogen fixation in tropi-  
cal legumes and grasses. p. 13-24. In: Limitations and -  
Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropic.  
J. Dobereiner, R.H. Burris and Hollander, A. (Eds.) Ple-  
num Press. New York, U.S.A. 581 p.
- Epstein, E., 1972. Mirenal nutrition of plants: Principles and-  
perspectives. Jhon Wiley and Sons., Inc. U.S.A. 322 p.
- Evans, H.J.; Everich, D.W.; Lepo, J.E.; Maier, R.J.; Carter, A.  
K.; Hanus, F.J. and Russell, S.A., 1979. Hydrogenase in -  
nodule bacteroids and free-living rhizobia. Eric Goltze -  
KG. Gottingen, West Germany. 349 p.
- Ferrari, E. y Manifaes, S.A., 1967. Efeito de Temperatura do -  
solo na nodulacao e no desenvolvimento de soja perenne --  
(Glycine iavanica). Presq. Agrop. Brasil. 2:461-466.
- Fillat, A., 1961. La inoculación de leguminosas. p. 81-112. -  
Anuario de la Sociedad de Mejoramiento de Praderas. Monte-  
video, Uruguay. 225 p.
- Franco, A.A., 1978. Contribution of the Legums-Rhizobium Sym-  
biosis to the Ecosystem and Food Production. 65-75. In:-  
Dobereiner, Burris, Hollaender, Franco, Neyra and Scott.
- Dobereiner, Burris, Hollaender, Franco, Neyra and Scott. (Eds.)  
Limitation and Potential for Biological Nitrogen Fixations  
in the Tropics. Plenum Publishing Corp. 405 p.
- Galetti, P., Franco, A.A., Acevedo, H. y Dobereiner, J., 1971.-  
Efeito de temperature do solo na simbiosis de soja anual.-  
Presq. Agrop. Brasil. Ser. Agron. 6:1-8.

- Gibson, A., 1971. Factors in the Physiological and Biological-environment effecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. Plant and Soil Special Pub. p. 139-152.
- González, R.G. y Garza, T.R., 1980. Infectividad y efectividad de la simbiosis de Rhizobium sp. con leguminosas forrajeras tropicales. Rev. Mex. de Producción Animal AMPA. 12: 71.
- Graham, P.H., Hubell, D.H., 1975. Legume-Rhizobium relationships in tropical agriculture. Florida Agric. Exp. Station Journal Series No. 5424. p. 205-220.
- Jordan, D.C., 1984. Family Ghizobiaceae. In: Krieg N.R. and J.R. Holt (Eds.). Bergey's manual of sistematic bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore. p. 234-244.
- Kornelius, E. y Stammel, J.G., 1973. Respostas do duas leguminosas tropicais a foaforo e calcario en um solo acido de Rio Grande do Sul. Agron. Sulriograndense. Porto Alegre. Brasil. 9 (2):177-190.
- Loneragan, J.F., 1972. The chemical environment in relation to symbiotic nitrogen fixation. LAEA. Tech Rept 430 p.
- Marshall, W.L. and Roberts, F.J., 1963. Influence of fine particle materials on survival of Rhizobium trifolli in sandy soils. Nature. 198:410-415.
- Norris, D.O., 1970. Nodualation of pasture legumes. In: Grass lands. p. 339-348. R.M. Moore (Ed). Australian Press - Canberra. 624 p.
- Ortíz, V.B. y Ortíz, S.A., 1984. Edafología 4a. Ed. Univ. Autónoma Chapingo. Depto de Suelos. México, D.F. 372 p.
- Pelczar, J.M.; Reid, R.D. and Chan, C.C.S., 1977. Microbiology Fourth Edition. Tata McGraw-Hill. Publishing. Co. Ltd.-New, Dheli. 952 p.
- Peñaloza, V.A.; Castro, E.T. y Valdez, R.M., 1984. Inoculación de Alfalfa (Medicago sativa L.) con cepas de Rhizobium meliloti en los Valles Centrales de Oaxaca. Agríc. Tec. en México. 10:17-30.

- Sprent, J.I., 1979. The biology of nitrogen-fixing organisms.- McGraw-Hill Book Co. (UK) Limited. 324 p.
- Sylvester, B.R.; Ayarza, M.A.; Méndez, J.E. and Moriones, R., - 1983. Use of Undisturbed soil cores for evaluation of Rhizobium strain and methods for inoculation of Tropical fora ge legumes in a Colombian Oxisol. Plant and Soil. 74:237-247.
- Somasegaran, P.; Hoben, H. y Hallyday, J., 1981. Ejercicios -- prácticos en Tecnología Rhizobium-Leguminosa. Traducido - del inglés por E. Cuautle. NIFTAL Project. U. of Hawaii, U.S.A. 87 p.
- Townsend, W.N., 1973. An introduction to the Scientific Study- of the Soil. Edward Arnold. London. 135 p.
- Velazco, Z.M.; Valdez, R.M.; González, J.A. y Meléndez, N.F., - 1980. Inoculación cruzada de leguminosas forrajeras tropi cales con Rhizobium sp nativo del Estado de Tabasco.
- Velazco, Z.M.; Rivera, J.G. y Meléndez, N.F., 1981. Fertiliza- ción de P y K en el establecimiento y nodulación natural - del Desmodium intortum. En: la Sierra de Tabasco. Agric. Trop. del CSAT.; Cárdenas, Tabasco. 2 (2): 116-125.
- Worthen, L.E. y Aldrich, R.S., 1980. Suelos Agrícolas, su con- servación y fertilización. 2a. Ed. traducido por De la Lo ma José Luis: Editorial UTEHA, S.A. de C.V. 403 p.
- Sylvester, Gradley Rosemary, Kipe Nolt Judith, 1987. Simbiosis Leguminosa-Rhizobium. (CIAT) Cali, Colombia. Pág. 17.



## "CICLO DEL NITROGENO"

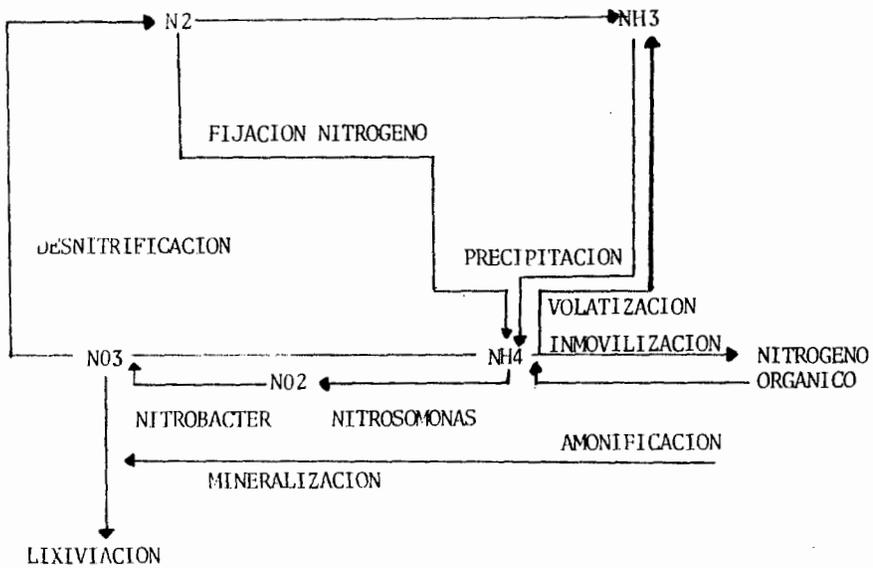


Fig. 1. Ciclo del Nitrógeno en la Naturaleza

FUENTE: Alexander.

CUADRO 1. ESPECIES DE Rhizobium y Bradyrhizobium

BACTERIAS	LEGUMINOSAS HOSPEDERAS
DE CRECIMIENTO RAPIDO	
<u>Rhizobium meliloti</u>	<u>Medicago</u> , <u>Melilotus</u> , <u>Trygonella</u>
<u>Rhizobium leguminosarum</u>	
<u>Rhizobium trifoli</u>	<u>Trifolium</u>
<u>Rhizobium phaseoli</u>	<u>Phaseolus vulgaris</u> , <u>Phaseolus</u> - <u>multifloris</u> , <u>Pisum</u> , <u>Lathyrus</u> , - <u>lens</u>
<u>Rhizobium Viceae</u>	<u>Vicia</u>
<u>Rhizobium loti</u>	<u>Lupinus</u> , <u>Lotus</u> , <u>Anthyllis</u> , ---- <u>Ornithopus</u> , <u>Leucaena</u>
DE CRECIMIENTO LENTO	
<u>Bradyhisobium japonicum</u>	<u>Glycine max</u>
<u>Bradyrhisobium sp (VIGNA)</u>	<u>Vigna</u> , Leguminosas forrajeras - y muchas otras
<u>Bradyrhisobium sp (LUPINUS)</u>	<u>Lupinus sp</u>

FUENTE: JORDAN, 1984.

Cantidades estimadas de nitrógeno por diferentes leguminosas de grano en cantidades de campo.

PLANTA	NITROGENO FIJADO kg N/ha/año
<u>Leguminosas alimenticias</u>	
Calopo-----	Calopogonium mucumoides---378-450
Hobra-----	Vicia faba----- 45-552
Guanda-----	Cajomus cajan-----168-288
Caupi-----	Vigna unguiculata----- 73-342
Mung bean-----	Vigna mungo----- 63-342
Guar-----	Cyomoposis tetragonoloba-- 41-228
Soja-----	Glycine max----- 60-168
Garbanzo-----	Cecer anietemun-----103
Lenteja-----	Lene esculenta----- 88-114
Maní-----	Arachis hypogia----- 72-124
Arbeja-----	Pisoum sativiem----- 52-77
Parato-----	Phasealus siuigaxis----- 48-78

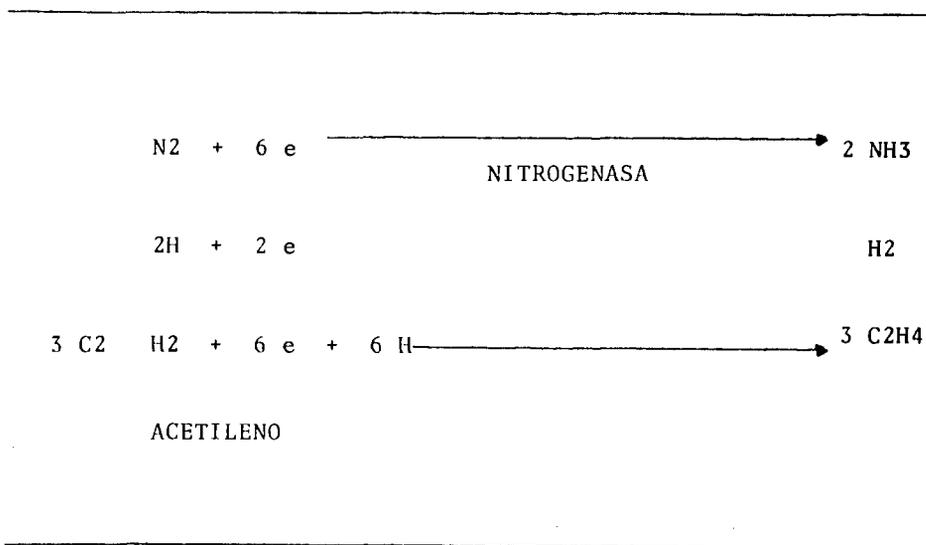
FUENTE:

LEGUMINOSAS FORRAJERAS

Trébol "Tick"-----	Desmodium intortum-----	897
Sesbania-----	Sesbania cammabena-----	542
Leucaena-----	Leucaena bucocephala-----	74-584
Centro-----	Centrosema pubescens-----	126-398
Alfalfa-----	Medicago sativa-----	229-290
Trébol suletemane-----	Trifolium subterraneum-----	207
Trébol ladino-----	Trifolium repens var. giganteum-----	165-189
Trébol lellano-----	Trifolium pratense-----	128
Stylo-----	Stylosanthes spp-----	34-220
Vicia-----	Vicia villosa-----	110
Puero-----	Pueraria phaseoloides-----	99

FUENTE: Inoculantes para leguminosas y su uso, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Roma, 1985. pág. 5.

CUADRO 2. Reacción de la enzima nitrogenasa en el proceso de la fijación del nitrógeno y la reducción del acetileno.



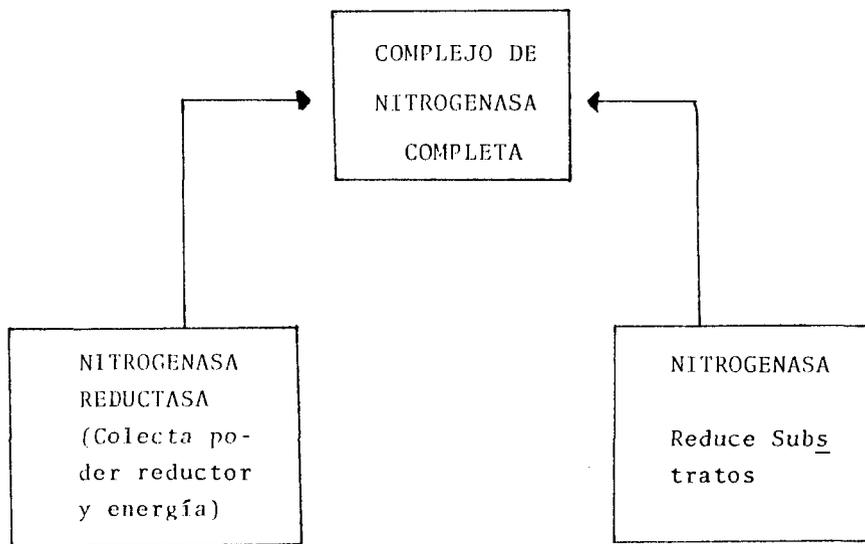
FUENTE: Jordan, D.C., 1984.

CUADRO 3. Estimación del nitrógeno fijado por algunas leguminosas tropicales forrajeras.

ESPECIE	MANEJO DEL CULTIVO	KG N/HA /AÑO	A U T O R
<u>C. pubescens</u>	Cultivo puro	269.0	Whitney <u>et al</u> (1967)
<u>C. pubescens</u>	<u>P. purpureum</u> y <u>Digitaria decumbens</u>	123.0	Whitney <u>et al</u> (1967)
<u>C. Pubescens</u>	<u>C. Plectostachyus</u>	200.0	Moore (1962)
<u>Desmodium canum</u>	<u>Digitaria decumbens</u>	97.0	Whitney y Green (1969)
<u>D. intortum</u>	<u>Pennisetum clandestinum</u>	313.0	Whitney (1967)
<u>D. intortum</u>	<u>Digitaria decumbens</u>	264.0	Whitney y Green (1969)
<u>D. uncinatum</u>	<u>S. anceps cv spanacela</u>	60-150	Tnairu (1972)
<u>D. uncinatum</u>	Cultivo puro	100-150	Hansell <u>et al</u>
<u>L. Leucocephala</u>	Cultivo puro	500	Brewbaker (1976)
<u>Pueraria atropurpureum</u>	Cultivo puro	70-130	Jones <u>et al</u> (1976)
<u>Stylosanthes guyanensis</u>	Cultivo puro	165	Jones <u>et al</u> (1976)

FUENTE: Whitney, (1976); Moore, (1962); Whitney y Green, (1969); Tnairu, (1972); Brewbaker, (1976); Jones, (1967); Hansell.

FIGURA 2. Diagrama de las dos partes de la enzima nitrogenasa y la posible combinación en el efecto de la reducción del nitrógeno.



FUENTE: SPRENT, 1979.

CUADRO 4. Fijación de nitrógeno y ganancias de nitrógeno en suelos de Ithaca, Nueva York.

CULTIVO	N COSECHADO POR CULTIVO EN 4 AÑOS (KG/HA)	BALANCE DE NITROGENO EN EL SUELO	
		a AÑOS (KG/HA)	PROM./AÑO (KG/HA)
Pasto Timothy	157.0	45.0	11.0
Pasto Bromo	132.0	43.0	11.0
Pasto Timothy + N*	400.0	-47.0	-37.0
Pasto Bromo + N*	535.0	-69.0	-17.0
Pasto Timothy + Trébol	778.0	823.0	208.0
Pasto Bromo + Alfalfa	1169.0	1169.0	292.0
Tébol	809.0	876.0	216.0
Alfalfa	1146.0	1168.0	292.0

\*Adición total de 695 kg de N/ha

FUENTE: Alexander, 1900.

CUADRO 5. Rendimiento en materia seca, nitrógeno y proteína cruda de algunas leguminosas asociadas con pasto pangola.

ESPECIES	RENDIMIENTO MS KG/HA/AÑO	PROTEINA %	NITROGENO KG/HA/AÑO
<u>Digitaria decumbens</u>	5,240.0	6.0	50.0
<u>Macroptilium atropurpureum</u>	11,610.0	9.6	179.0
<u>Centrosema pubescens</u>	9,490.0	9.9	150.0
<u>Glycine jayanica</u>	9,440.0	8.9	134.0
<u>Stylosanthes humilis</u>	9,940.0	8.3	133.0
<u>Phaseolus lathyroides</u>	8,500.0	7.9	107.0
<u>Alysicarpus vaginalis</u>	8,470.0	7.5	102.0
<u>Desmodium sandwicense</u>	7,300.0	8.2	97.0

FUENTE: Crestchumer, 1970.

CUADRO 6. Efecto de la inoculación en Centrosema durante el establecimiento en el campo (Carimagua, Colombia, 1985. Tercer).

E S P E C I E S	KG DE MS/HA/CORTE		INCREMENTO
	NO INOCULADO	INOCULADO	
<u>Centrosema brasilianum</u>	401.5	566.3	41.0%
<u>Centrosema sp</u>	290.2	581.9	100.5%
<u>Centrosema macrocarpum</u>	110.2	538.6	388.7%

FUENTE: Harris, D.J., CIAT, 1985.

CUADRO 7. Efecto de la inoculación de Rhizobium en la producción de materia seca por corte en Centrosema pubesoes. kg/ha (Carimagua, Colombia, 1985).

No. DE CEPAS	RENDIMIENTO DE MS KG/HA/CORTE	INCREMENTO (%) RESPECTO A - I
+ N*	551.4 a	145.6
3,101	498.7 ab	112.1
1,670	490.3 ab	118.4
1,780	446.0 b	90.6
49	353.4 c	57.4
- I	224.5 d	- -

\* 160 kg/ha/año total en cuatro aplicaciones.

FUENTE: Sylvester et al, CIAT, 1985.