

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS



COMPARACION DEL POTENCIAL EN DESARROLLO
VEGETATIVO EN SUELOS INOCULADOS CON
BACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO

TRABAJO RECEPCIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

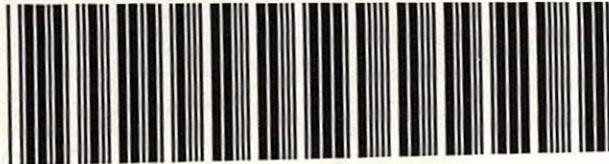
PRESENTA
SILVIA GUADALUPE
MALACARA GALICIA
SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P. 1985

11

8651

13

C. 1



1080075047

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



**" COMPARACION DEL POTENCIAL EN DESARROLLO
VEGETATIVO EN SUELOS INOCULADOS CON
BACTERIAS FIJADORAS DE NITROGENO "**

TRABAJO RECEPCIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A

SILVIA GUADALUPE

MALACARA GALICIA

SAN LUIS POTOSI, S.L.P. 1983

X
S651
M3



EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN LOS
DEPARTAMENTOS DE SUELOS E HIDROGEOQUIMICA
SECCION BACTERIOLOGIA DEL INSTITUTO DE
INVESTIGACION DE ZONAS DESERTICAS, A CUYO
DIRECTOR SR. BIOL. FERNANDO MEDELLIN LEAL
EXPRESO MI AGRADECIMIENTO;
ASI COMO AL SR. M.C. RAUL GRANDE LOPEZ Y AL
ING. ENRIQUE DIAZ DE LEON SANCHEZ, POR SU
EFICAZ ASESORAMIENTO EN LA REALIZACION DEL
MISMO.

**EXPRESO MI AGRADECIMIENTO AL PERSONAL DE LA GERENCIA
DE CAMPO DE FERTILIZANTES MEXICANOS, S.A.**

**ASI COMO AL ING. GREGORIO TRUJILLO GONZALEZ POR SU
VALIOSA AYUDA HACIA EL PRESENTE TRABAJO .**

**AL ING. OSCAR POSADAS BAEZ DE FERTILIZANTES MEXICANOS
DE SAN LUIS POTOSI.**

DEDICO ESTE TRABAJO CON ESPECIAL CARIÑO A MIS PADRES:

ENRIQUE MALACARA ES: INOSA
ESTHER GALICIA MIRANDA DE M.

A MIS HERMANOS: ROMAN ENRIQUE

MA. DEL SOCORRO

CLAUDIA JUDITH

A MI ESPOSO: ANTONIO ARMENDAREZ ARREDONDO Y A NUESTROS
PEQUEÑOS KARLA ESTHER Y MARCO ANTONIO.

C O N T E N I D O.

I	.- INTRODUCCION	1
II	.- REVISION BIBLIOGRAFICA	3
III	.- MATERIALES Y METODOS DE ESTUDIO	
	a).- MUESTREO DE SUELOS	19
	b).- METODOS DE LABORATORIO PARA ANALISIS DE SUELOS.	20
	c).- METODO PARA DETERMINACION DE NITROGENO EN SUELOS Y PLANTAS	22
IV	.- SELECCION DE BACTERIAS DEL GENERO <u>RHIZOBIUM</u> .	
	a).- RECOLECCION DE NODULOS EN RAICES DE ALFALFA Y FRIJOL DE SOYA	25
	b).- AISLAMIENTO DE <u>RHIZOBIUM</u> A PARTIR DEL NODULO	26
	c).- PREPARACION DEL MEDIO PARA AISLAMIENTO DE <u>RHIZOBIUM</u> .	28
	d).- PROCESO DE NODULACION EN LEGUMINOSAS	29
	f).- PREPARACION DE LA SOLUCION DE CRONE	31
	g).- COLORACION DE UN FROTIS CON FUCSINA FENICADA	32
	h).- COLORACION CON CARBOL ERITROSINA	33
	i).- COLORACION DE GOMAS DEL <u>RHIZOBIUM</u> POR METODO DE BARLOW.	34
V	.- RESULTADOS	35
VI	.- DISCUSION E INTERPRETACION DE RESULTADOS	38
VII	.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
VIII	.- RESUMEN	46
IX	.- BIBLIOGRAFIA	48

I.- INTRODUCCION

Considerando que el valor agrícola del suelo depende en -- gran parte del contenido de nutrientes, así como las condicie nes físicas en que se encuentra el suelo; un aspecto que revis te interés desde el punto de vista para el desarrollo de vege tales, es el proceso de autofertilización natural del suelo me diante la fijación de nitrógeno atmosférico por las bacterias radicales o rizobios, en simbiosis con las leguminosas.

Esta situación presenta especial interés en los suelos de zonas áridas, en virtud de que los contenidos de este elemento presentan niveles pobres y muy pobres, como consecuencia de la reducida actividad biótica en el suelo, dando como resultado una disminución de los materiales orgánicos y por consiguiente los constituyentes de la materia orgánica como nitrógeno y car bono se presentan en proporción muy reducida.

En el presente trabajo se estudia el proceso de fijación - de nitrógeno atmosférico en suelos cultivados con frijol de so ya (Glicine max L. Merrill) y alfalfa (Medicago sativa L.), lo calizados en los Ejidos de Pozos y La Pila pertenecientes al - municipio de la capital del Estado de San Luis Potosí.

Se trabajó con suelos superficiales y subsuelo así como - con semillas inoculadas con las bacterias mencionadas, ésto - con el objeto de establecer antecedentes de tipo cuantitativo acerca de los incorporamientos de nitrógeno en el suelo por es te proceso, los principales objetivos de esta investigación - están encauzados de tal manera a determinar cuando menos en - parte los niveles de fertilidad antes y después de los trata-- mientos, y por otra parte establecer las condiciones físicas y químicas actuales de estos suelos agrícolas para probar el

grado de productividad, que es tan importante conocer a nivel parcelario en los terrenos de cultivo de riego de nuestras zonas semiáridas.

II.- REVISION BIBLIOGRAFICA

Los antecedentes bibliográficos que a continuación se mencionan y su relación con la simbiosis rizobio - leguminosa, sirven de referencia para la ubicación de los objetivos del presente estudio. Estos trabajos consultados incluyen aspectos complementarios que se relacionan con: Suelos, Microbiología Agrícola y Vegetación.

Las plantas necesitan nutrientes en cantidad suficiente y equilibrio adecuado para su crecimiento y desarrollo normal.
(7)

Del aire y del agua, las plantas toman el carbono, oxígeno e hidrógeno. El carbono lo absorben principalmente por medio de las hojas en forma de bióxido de carbono, y en pequeñas cantidades de bicarbonato por las raíces. La mitad del peso seco de la planta es carbono, que forma parte esencial de los carbohidratos (azúcares almidones y celulosa) y se emplea en la elaboración de proteínas, grasas y otros compuestos orgánicos. Del 70 - 90 % del peso de la planta antes de secarse es agua, el 90 % de este peso es oxígeno, el cual a menudo representa el 40 % o más del peso seco de la planta. El oxígeno desempeña un papel importante en la composición de los carbohidratos, proteínas o grasas; es necesario en los procesos vitales de la planta para producir energía; y su presencia en las raíces es indispensable para ayudar a la absorción de nutrientes.

Las plantas toman del suelo, relativamente grandes cantidades de nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio y magnesio. Ciertos cultivos absorben grandes cantidades de sodio.

El nitrógeno que constituye del 2 al 4 % del peso seco de la planta, es esencial para la formación de nuevas células y es una parte básica de las proteínas y la clorofila.

Indirectamente las plantas también reciben nitrógeno del aire mediante ciertos microorganismos, los más importantes de los cuales crecen en las raíces de las leguminosas.

También se menciona que el éxito de la producción de cosechas depende en gran parte de la adición de nutrientes requeridos por la planta, que puede efectuarse de la siguiente forma:

1.- Uso de fertilizantes comerciales, que comprende los fertilizantes inorgánicos y orgánicos.

2.- Estiércol, residuos vegetales, desperdicios de origen animal y excrementos humanos.

3.- Abonos verdes, que son plantas que se incorporan al suelo.

Los nutrientes deben encontrarse disponibles en el suelo en forma asimilable para ser absorbidos por éstas en un 50% del requerimiento total durante el comienzo; y el resto a la mitad del ciclo de crecimiento hasta que la planta alcanza su madurez fisiológica.

La materia orgánica del suelo es una fuente de nutrientes para las plantas. Aporta alimentos para los microorganismos del suelo y en el curso de su descomposición ayuda a transformar en solubles los compuestos minerales de la tierra y mejora las propiedades físicas de los suelos.

La incorporación del nitrógeno al suelo puede llevarse a cabo por: Descargas eléctricas atmosféricas, fertilizantes y por fijación biológica de nitrógeno atmosférico por medio de

los microorganismos que llevan vida libre, y de los microorganismos que en simbiosis con la planta toman de ella su alimentación hidrocarbonada, a cambio de los compuestos nitrogenados que producen.

CLASIFICACION TAXONOMICA. (10)

REINO	VEGETAL
TIPO I	PROTOFITAS
CLASE	ESQUIZOMICETOS O BACTERIAS
ORDEN	EUBACTERIALES
FAMILIA	RIZOBIACEAS
GENERO	<u>RHIZOBIUM</u>
ESPECIE	<u>R. japonicum</u> y <u>R. meliloti.</u>

DESCRIPCION GENERAL.

Género Rhizobium.- Son microorganismos aerobios estrictos que producen nódulos en las raíces de las leguminosas, estableciendo una relación de simbiosis con la planta huésped

Son bacilos Gram negativos de dimensiones 0.5 - 0.9 u de ancho por 1.2 - 3.0 u de largo, generalmente móviles cuando son jóvenes teniendo flagelos peritricos y pasando a la forma bacteroide durante la simbiosis en los nódulos, o en medios artificiales que contengan alcaloides o glucósidos, y en extrema acidez.

No forman esporas y las células viejas no se tiñen, tienen granos altamente refráctiles de butirato polimérico B hidroxi; los cuales dan una apariencia de bandas de citoplasma teñidas.

Son heterótrofos, su temperatura óptima de desarrollo es de 25° C - 30° C.

Crecen bien en medios que contengan agua de levadura, manitol extractos de plantas, malta y otros materiales.

El pH óptimo de crecimiento es de 5.5- 7.0, dependiendo de la naturaleza de la planta.

No licúan la gelatina o lo hacen muy ligeramente, no utilizan nitritos y reducen ligeramente los nitratos; utilizan el nitrógeno en simbiosis con la planta leguminosa huésped.

CARACTERISTICAS DE LA COLONIA.

Los aislamientos de Rhizobium que se obtienen de los nódulos, son de acuerdo a su crecimiento en medios líquidos o sólidos.

FORMA: por lo general son colonias discretas, redondas, en forma de cúpula o a menudo cónicas en la superficie del agar.

COLOR Y TEXTURA: Las colonias pueden ser blancas, opacas o lechosas, hasta translúcidas, pero pueden desarrollar centros oscuros y márgenes ribeteados.

TASA DE CRECIMIENTO: Se requieren días para que la colonia llegue al máximo de su tamaño sobre el agar de crecimiento, o en medio líquido el tiempo varía de acuerdo a la temperatura de incubación óptima.

TAMAÑO: Cuando están bien separadas en el agar, el tamaño de las colonias pueden variar entre 1 mm para las de crecimiento lento y de 4 - 5 mm para las de crecimiento rápido. Algunas pueden llegar a confluír. (3)

EL PROCESO DE INFECCION DE LAS LEGUMINOSAS POR EL RHIZOBIUM.

(8)

La infección en las raíces de las leguminosas ocurre por los pelillos radicales. Antes de que el proceso infectivo - ocurra, debe haber colonización de la rizosfera por el rizobio el crecimiento del microorganismo es estimulada por secreciones de la raíz.

Al mismo tiempo de la colonización de la raíz por el rizo**bio** se presenta el fenómeno de la adsorción del rizobio a las raíces. En este fenómeno están involucradas las lectinas que se encuentran sobre la superficie de las raíces adventicias y que son proteínas o glicoproteínas que tienen la capacidad de unirse a ciertos azúcares en una forma muy específica, según Dazzo, esta lectina sería bivalente y formaría un puente entre dos antígenos comunes absorbiendo la bacteria a la superficie de la raíz.

A medida que el rizobio crece en la rizosfera produce -- substancias que deforman los pelos radicales; existiendo varias categorías de deformación según los estudios de Yao y Vincent en 1976, y que son las siguientes.

1.- Deformación moderada que puede ser causada por rizo**bios** heterólogos.

2.- La ramificación de los pelos radicales producida por un polipéptido pequeño, este tipo es más específico que el -- primero, pero se observa en combinaciones no homólogas.

3.- La deformación extrema consistente en el torcimiento de 180 grados de la punta del pelo radical y se observa en

combinaciones homólogas Rhizobium + leguminosa, y que es producida por un factor unido a la superficie de la bacteria.

El siguiente paso de la infección es la formación del hilo infectivo; se ha demostrado la síntesis de ácido indol - acético (IAA) por el rizobio según (Kefford, et al, 1960) aunque el IAA puede tener un papel menor en el encurvamiento de los pelos de la raíz, se ha demostrado que estimula el crecimiento del filamento de infección. En 1956 Nutman sugirió la hipótesis de que la infección ocurre por invaginación de la pared celular del pelo radical.

Estudios de Fahraeus y Ljunggren en 1959 sugirieron que la infección se iniciaba por la producción de la enzima vegetal poligalacturonasa, en presencia de un determinado polisacárido producido por los rizobios, con el consecuente ablandamiento de la pared celular y formación del hilo infectivo. En trabajos recientes se han obtenido resultados positivos avoyando la teoría de Fahraeus sobre la inducción específica de la producción de poligalacturonasas (Palomares, 1975; Olivares et al, 1977; Verma et al, en preparación)

Recientemente Hubbell et al, 1978 demostraron que el rizobio creciendo en forma libre es capaz de producir enzimas pectolíticas. Algunos trabajos de microscopía electrónica indican que hay cierta destrucción de la pared celular vegetal cerca a las bacterias invasoras. Además en el caso de la infección de maní estudiadas por Chandler en 1978, el rizobio penetra la raíz intercelularmente y algo adentro de la corteza radical es cuando viene a introducirse a las células. Se ha sugerido que no solo se producen pectinasas durante el proceso de infección sino también celulasas y hemicelulasas. También se ha demostrado que el rizobio produce celulasas y otra enzima - que no ha sido caracterizada pero se sospecha de una hemicelulasa (Martínez Molina et al, en publicación)

DESARROLLO NODULAR SIGUIENTE A LA INFECCION DE RAICES DE LAS LEGUMINOSAS

Siguiendo la penetración del rizobio en el pelo de la raíz un filamento de infección crece en el interior de la célula - (Fahraeus, 1957), mientras el filamento penetra en el pelo de la raíz el rizobio continúa dividiéndose; el material en el que la bacteria está embebida en el filamento, es de una densidad uniforme, sin estructura visible y puede estar compuesto de mucílagos bacteriales. El filamento infectivo se aproxima a las células de la corteza radical, mientras ciertas células corticales se dividen, probablemente inducidas por productos secretados - por el avance del filamento de infección.

El filamento de infección pasa a través de las células corticales hasta que penetra a la corteza interior; las bacterias son cedidas en las células corticales y cada rizobio se encierra en una porción del plasmalemma (membrana peribacteroide). En algunas leguminosas se encuentran varios bacteroides en esta membrana, probablemente resultado de varias divisiones de células rizobiales antes de la diferenciación a bacteroides, (Kidby, - Goodchild, 1965).

Al mismo tiempo que el filamento cede los rizobios, la célula huésped invadida y también varias capas de células vecinas no invadidas sufren una rápida división celular y la diseminación del rizobio se ve facilitada por esta división mitótica. Este incremento celular proliferativo en células infectadas y - adyacentes da por resultado la formación de los nódulos característicos.

El nódulo puede dividirse en cuatro zonas distintas:

1.- La corteza nodular, compuesta de células parenquimatosas indiferenciadas no infectadas.

2.- Región meristemática que constituye el punto creciente del nódulo y del que se originan los tejidos especializados del nódulo.

3.- Sistema vascular, que funciona como transporte de nutrientes de la planta al nódulo y regresar sustancias nitrogenadas del rizobio a la planta huésped. Este tejido vascular se continúa con el de la planta y contiene los componentes encontrados normalmente en un sistema vascular radical.

4.- La porción central del nódulo que es la zona bacteroidal y el sitio de la fijación de nitrógeno, está compuesta de células infectadas en las que los rizobios sufren la transformación a bacteroides que es el estado de maduración de las bacterias y crecen hasta cuarenta veces su tamaño.

Los cambios bioquímicos que ocurren en la transformación de rizobios a bacteroides incluyen:

Síntesis de la enzima Nitrogenasa (Bergersen y Turner, - 1967).

Formación de nuevos pigmentos citocrómicos y oxidasas - (Appleby, 1969; a,b).

Cambios en la planta que incluye la síntesis de Leghemo-globina y enzimas para la asimilación de amonio.

LEGHEMOGLOBINA

La leghemoglobina es un pigmento rojo de los nódulos de raíces de las leguminosas, identificada como una hemoproteína capaz de tomar y ceder oxígeno molecular. Existe una amplia relación entre la fijación de Nitrógeno y presencia de leghe-moglobina.

La proteína leghemoglobina mantiene un alto flujo de oxígeno a los bacteroides suficiente para la reacción oxidativa, pero no en exceso para inactivar la nitrogenasa. El grupo hem es sintetizado por los bacteroides (Cutting y Schulman, 1972). Según (Verma y Bal, 1976) localizando la proteína por medio - de métodos inmunocitoquímicos, demostraron que el sitio de la síntesis de Apo-leghemoglobina es en polisomas libres en el citoplasma vegetal del huésped. (Coventry y Dilworth, 1976) tam

hién demostraron que la apo-leghemoglobina es sintetizada en ribosomas vegetales. Así mismo estudios recientes de Verma y Bal, en 1976 concluyeron que la leghemoglobina está localizada en la parte vegetal del nódulo, y no en el saco entre el bacteroide y la membrana bacteroidal.

NITROGENASA. (15)

Todos los organismos que fijan nitrógeno contienen una enzima que no varía su estructura de una especie a otra. Esta enzima es la nitrogenasa, que consta de dos proteínas - llamadas Componente I y II.

Componente I.- Su peso molecular es de 220 000, contiene 24 átomos de hierro y dos átomos de molibdeno, está formado de cuatro subunidades, que son cada una de ellas una cadena de aminoácidos.

Componente II.- Tiene un peso molecular de 55 000, consiste en dos subunidades proteicas que incluyen cuatro átomos de hierro.

La función de los dos átomos de molibdeno en la nitrogenasa, parece ser el sitio activo de la enzima. El molibdeno está unido a un pequeño cofactor que contiene algo de los átomos de hierro asociados con el componente I.

El primer paso en la fijación de nitrógeno, es la reducción del componente II de la enzima, mediante otra enzima externa que es portadora de electrones, (las ferredoxinas y flavodoxinas son los únicos transportadores de electrones capaces de transferirlos a la nitrogenasa).

El componente II reducido reaccionará con el ATP y después reduce al componente I. Este componente reduce al nitrógeno molecular para dar finalmente amoníaco. No se han descubierto sustancias intermedias entre el nitrógeno y el amoníaco, y tal parece que deben permanecer unidos a la nitrogenasa

ASIMILACION Y DESTINO DE LOS PRODUCTOS DE FIJACION.

El amoníaco que producen las bacterias se combina con los compuestos de carbono que forma la planta por fotosíntesis, - formándose aminoácidos que se incorporan a las proteínas vegetales.

La primer etapa en la asimilación de amonio es la síntesis de glutamina por medio de la glutamino sintetasa vegetal.

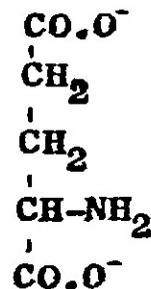
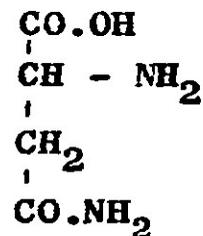
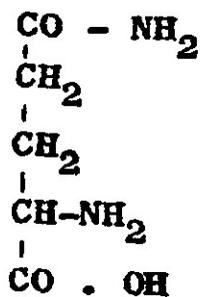
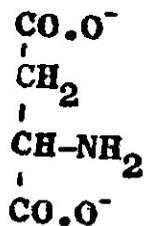
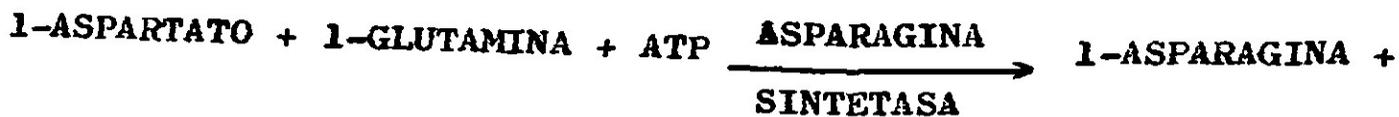


Enseguida de la incorporación de amonio en glutamina, en la fracción nodular, esta glutamina es desaminada en presencia de alfa-ceto glutarato, y por medio de la enzima glutamato sintetasa con la resultante formación de glutamato.



+NADP NAD

Parece probable que la asparagina, que es el mayor producto exportado de los bacteroides del nódulo hacia las hojas de las leguminosas, pueda ser sintetizada por la fracción vegetal del nódulo, por una glutamina dependiente de la asparagina sintetasa (Rognes, 1970; Streeter, 1970; 1973).



INFLUENCIA DEL MEDIO EN LA FIJACION DE NITROGENO

La cantidad de nitrógeno atmosférico fijado por las leguminosas varía de acuerdo al tipo de las mismas (Erdman, 1953) y con el de la cepa bacteriana en simbiosis.

De acuerdo con los estudios de Nutman, 1946 - 1956, Wilson 1939, Hughtrk, 1948; el número de nódulos formados, la presencia o ausencia de los mismos, la velocidad con la cual aparecen y los factores que influyen sobre la efectividad y el desarrollo de los nódulos son regulados genéticamente por la planta.

Los factores del medio ambiente que modifican la fijación de nitrógeno son: físicos, nutricionales y biológicos.

FACTORES FISICOS

Aire.- El libre acceso de aire tiene efecto benéfico sobre la reproducción de las bacterias, una buena estructura del suelo es favorable para el establecimiento del rizobio. Cuando existe carencia de oxígeno no hay formación de leghemoglobina.

(Engle y Munding, 1954) encontraron un noble crecimiento de leguminosas y un bajo contenido de leghemoglobina en los nódulos cuando los suelos eran de textura fina.

Humedad del suelo.- El rizobio es muy sensible a la sequía sólo unas cuantas logran sobrevivir cuando la mezcla de suelo contiene aire seco. Un exceso de agua puede limitar la aireación, la mezcla más favorable depende del tipo de suelo.

Luz.- Es necesario que exista un óptimo en la intensidad de luz para tener una máxima nodulación y por lo tanto, fijación de nitrógeno (Fred y Wilson, 1934) (Fred y colaboradores, 1938, Bayus 1936, 1939).

Un exceso de luz induce una formación excesiva de carbohidratos que trae como consecuencia una disminución en la fijación de nitrógeno.

Temperatura.- Fred y colaboradores notaron que el rizobio es resistente a bajas temperaturas pero muy sensibles a las altas.

Reacción del suelo.- Es de gran importancia, pues no solo afecta el desarrollo de los rizobios y la producción de nódulos sino también el crecimiento y la captación de nitrógeno por las plantas.

Los suelos ácidos generalmente causan deficiencias de elementos básicos como calcio, magnesio, potasio y frecuentemente fósforo y nitrógeno.

Pueden originar liberación de elementos tóxicos como aluminio y manganeso, y aumentar la concentración de iones hidrógeno.

FACTORES NUTRICIONALES

Nitrógeno.- Existe un efecto depresor de los compuestos de nitrógeno sobre la producción, tamaño y función de los nódulos y varía también dependiendo del tipo de vegetal. Posiblemente este efecto sea debido a una baja relación de carbohidratos - nitrógeno en la planta, como consecuencia de que ésta no suministra suficiente cantidad de carbohidratos a la raíz (Allison y Ludwing, 1935; Kamata, 1957; Wilson, 1935).

En contraste con lo antes mencionado, se ha encontrado que a veces se favorece la infección agregando pequeñas cantidades de nitrógeno combinado (Diener, 1950; Ludwing y Allison, 1935).

Potasio.- Robert y Okoń, 1942 encontraron que no había estimulación en la fijación de nitrógeno por el fósforo si no existía en el suelo adecuada cantidad de potasio. El número de nódulos aumenta por acción del potasio.

Fósforo.- La leguminosa requiere un alto contenido de fósforo debido a que este elemento es un constituyente de las proteínas. La densidad de los nódulos existentes en la raíz es -- fuertemente estimulada por el fósforo así como el tamaño de los mismos. Estimula el desarrollo de las raíces y aumenta la fijación de nitrógeno.

Calcio.- Este elemento tiene influencia en la reacción - pues las leguminosas no nodulan bien en suelos ácidos, de ahí - su importancia en el desarrollo de la planta y supervivencia de los rizobios.

Magnesio.- Estimula la producción de nódulos.

Hierro.- El efecto más característico de su deficiencia lo constituye la clorosis.

Azufre.- Es un constituyente de las proteínas. Los efectos que causa su deficiencia son similares a los producidos por deficiencia de nitrógeno.

Manganeso.- Cuando se encuentra en altas concentraciones - en forma soluble (suelos ácidos), este elemento se vuelve tóxico para las leguminosas.

Boro.- Es necesario para el buen desarrollo de las plantas y en forma específica para las raíces. Cuando existe deficiencia de boro el tejido vascular de los nódulos se desarrolla en forma anormal afectando el aspecto bacteroide; otro efecto es - acumulación anormal de carbohidratos en las plantas.

Cobre.- La planta necesita pequeñas cantidades para su desarrollo y cuando existe deficiencia, el metabolismo de carbohidratos se altera. Erkoma ha demostrado que cuando hay deficiencia de cobre se forma una menor cantidad de leghemoglobina, así como una pobre síntesis de proteínas.

Zinc.- Los requerimientos de zinc difieren con los diversos tipos de leguminosas.

Molibdeno.- Este elemento posee doble función, en pequeñas cantidades se requiere para reducción de nitratos a amoníaco y relativamente en grandes cantidades para la fijación de nitrógeno por las leguminosas ya que forma parte del componente I de la enzima nitrogenasa.

Cloro.- Es también esencial para las leguminosas.

Cobalto.- Con relación a este elemento no ha sido posible esclarecer la cantidad mínima requerida por las leguminosas pero el hecho de que se encuentre en los nódulos, hace pensar que es un elemento esencial.

FACTORES BIOLÓGICOS

Microorganismos.- Varios microorganismos patógenos como hongos y virus pueden causar una considerable reducción en la -

fijación de nitrógeno.

También existe competencia entre los rizobios nativos, y entre los efectivos e inefectivos. Además los rizobios pueden ser eliminados por la acción de bacteriófagos.

Muchos organismos pueden ejercer una acción antagónica para los rizobios lo cual trae como consecuencia una disminución en la fijación de nitrógeno (Allen y Allen, 1950).

Plantas superiores.- La nodulación puede ser afectada por secreciones de la raíz de la leguminosa o de otras especies vegetales (Nutmán, 1953).

Insectos.- Estos causan un efecto negativo en la fijación de nitrógeno, el Sinotema linealus ocupa un lugar especial pues sus larvas destruyen los nódulos de varias leguminosas.

LA IMPORTANCIA DE LAS LEGUMINOSAS EN MEXICO.

Se ha utilizado para el beneficio de la civilización la simbiosis entre las bacterias fijadoras de nitrógeno y las leguminosas, aún antes que se conociera el fenómeno de la fijación; pues desde hace muchísimo tiempo se había observado que al establecer cultivos de leguminosas en suelos con escaso contenido de nitrógeno, se mejoraba su condición con respecto a dicho elemento. Incluso al sembrar leguminosas y asegurar su presencia, se emplean rizobios a nivel comercial.

Los siguientes datos nos da una idea de su gran importancia:

	3 millones de Hectáreas de leguminosas
FRIJOL	1'941,000
ALFALFA	433,303
SOYA	299,120
GARBANZO	187,350
HABA	53,697
CACAHUATE	51,744
CHICHARO	18,521
FRIJOL EJOTERO	9,041
LENTEJA	8,323
ARVEJON	5,068
	<hr/>
TOTAL	3'007,217

Fuente.- programas nacionales agrícolas SARH, 1978.

III .- MATERIALES Y METODOS DE ESTUDIO.

El proceso de muestreo y las determinaciones analíticas se efectuaron de acuerdo a los métodos que se llevan a cabo en el Departamento de Suelos del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Las muestras de suelo en las cuales se verificó el estudio comparativo del desarrollo vegetativo en suelos inoculados con bacterias fijadoras de nitrógeno, corresponden a la región de Villa de Pozos y La Pila, ambos ejidos pertenecientes al municipio de la capital del estado de San Luis Potosí.

La utilización de estos suelos corresponden a cultivos de alfalfa y frijol.

TECNICA DE MUESTREO DE SUELOS.

Para la obtención de las muestras se utilizó una barrena - tipo holandesa de 1.5m de longitud, graduada a intervalos de 10 cm para medir la profundidad de las muestras obtenidas. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno, con sus datos correspondientes.

Se obtuvieron en total 5 sitios de muestreo que corresponden a 8 muestras representativas de suelo individual, lo que constituye el material de trabajo investigado.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA ANALISIS.

Secado de las muestras.- Se colocan sobre papel y se dejan secar a temperatura ambiente en el laboratorio. Una vez seco se rompen los grumos con un pisón.

Posteriormente se pasa por un tamiz de dos milímetros de abertura, que es el límite superior para las arenas, se procede al cuarteo de la muestra para reducirla a un kilogramo aproximadamente, se coloca en un frasco de vidrio con tapa de rosca. Se registran en el laboratorio y se les asigna un número que va colocado en una tarjeta de identificación dentro del frasco, en la parte exterior del frasco se coloca una tela adhesiva con el

mismo número, lo cual permite una identificación rápida de la muestra.

Unicamente para la determinación de materia orgánica es necesario efectuar un segundo tamizado por la malla núm. 100 de 0.149 mm de abertura.

DETERMINACIONES

DETERMINACION DE TEXTURA.- Se siguió el método de Bouyucos, 1928, que está basado en la densidad de una suspensión acuosa de suelo, que varía de acuerdo con la cantidad de partículas en suspensión, y con el tiempo dicha cantidad disminuye, debido a que las partículas se van sedimentando según su densidad. El tamaño de las partículas se clasifica de la siguiente manera: (U.S.D.A. 1960)

FRACCION	DIAMETRO EN MM.
Arenas	2.0 - 0.05
Limo	0.05 - 0.002
Arcillas	menos de 0.002

Debido a la sedimentación de las partículas se puede obtener el porcentaje de arena, limo y arcilla, para la clasificación de textura se obtiene directamente del diagrama triangular de texturas.

POR CIENTO DE SATURACION.- En la interfase suelo solución preparada con una cantidad de agua que se añade a la muestra de suelo, hasta alcanzar el punto de saturación, en el que la pasta deberá presentar las siguientes condiciones: deberá ser lustrosa, que se deslice libre y fluidamente, en las depresiones de la superficie no deberá colectarse agua.

CONDUCTIVIDAD ELECTRICA.- Esta determinación se emplea para obtener indirectamente las concentraciones aproximadas de sales en el extracto de saturación de suelo, el extracto se obtiene de la pasta de suelo saturada con agua y efectuando la filtración al vacío.

En un puente de Wheatstone Solu-bridge, tester RD-26 con celda de pipeta, se determina la conductividad eléctrica del extracto de suelo saturado, reportando las lecturas en milimhos/cm a 25°C.

POR CIENTO DE SALES EN EL EXTRACTO.- Se multiplica una constante de 0.064 por la conductividad eléctrica.

POR CIENTO DE SALES EN EL SUELO. Es igual al porcentaje de saturación por el porcentaje de sales en el extracto de suelo saturado sobre 100 (Grande, L.R., 1974)

DETERMINACION DE pH. Se siguió el método electrométrico - trabajando con una suspensión acuosa del suelo en relación 1:2.5 las lecturas se efectuaron en un potenciómetro Beckman Zeromatic SS - 31. (Grande L.R., 1974).

DETERMINACION DE MATERIA ORGANICA.

Se efectuó por el método indirecto de combustión húmeda de Walkley y Black modificado (Jackson, 1964), en el cual se cuantea el carbono orgánico que es un constituyente constante en la materia orgánica.

Por este método la muestra de suelo es tratada con un oxidante (dicromato de potasio), utilizando el calor de dilución del ácido sulfúrico concentrado para que se lleve a cabo la reacción de oxidación. El exceso de dicromato de potasio se determina por titulación con sulfato ferroso, utilizando como indicador el sulfato ferroso de ortofenantrolina.

DETERMINACION DE FOSFORO.

Por el método Olsen, et al. U.S.D.A. circ 939, 1954; para suelos alcalinos en los cuales se verificó la extracción con solución de bicarbonato de sodio. El resultado se reporta en kilogramos por hectárea.

DETERMINACION DE POTASIO.

Por el método de emisión espectroflamométrica, utilizando el aparato Evans Electrolux. La extracción se verificó con solución buffer de ácido acético y acetato de amonio de pH 7, las lecturas

se efectuaron a una longitud de onda de 7670 (Grande, L.R., 1974).

DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL EN SUELOS Y PLANTAS.

El nitrógeno total en los suelos, varía de 0.01 % a varias unidades en %, sin embargo la gama habitual en suelos no turbosos, ni abonados con estiércol va de 0.05 a 0.30 % de nitrógeno.

El nitrógeno en las plantas irá comúnmente de 0.2 a 4% - dependiendo de las especies, la parte de la planta y su edad. (Homer D., Parker F., 1976).

Para esta determinación se empleó:

METODO KJELDAHL MODIFICADO PARA INCLUIR A LOS NITRATOS.

MATERIAL Y EQUIPO

Equipo digestor y destilador Kjeldahl

Matraces Kjeldahl de 800 ml

Matraces Erlenmeyer de 500 ml

Microbureta de 5 ml

Probeta de 50 ml

Papel filtro Whatman No. 2 de 11 cm de diámetro.

REACTIVOS

ACIDO SULFURICO - ACIDO SALICILICO.- A 30 ml de ác. sulfúrico concentrado se le añade 1g de ác. salicílico.

MEZCLA DE DIGESTION.- Se mezclan 10 g de sulfato de potasio, 1g de sulfato ferroso y 0.5g de sulfato de cobre. Se muele la mezcla.

HIDROXIDO DE SODIO AL 40 % .- Disolver 3 000 g de hidróxido - en 4 500 ml de agua destilada, agitando constantemente para - que no se forme una masa sólida en el fondo del recipiente.

ACIDO BORICO AL 2%.- Disolver 20g de ácido bórico en agua destilada y aforar a 1000 ml.

ACIDO SULFURICO 0.1 N .- Prepárese diluyendo 3ml de ác. Sulfú

rico concentrado en agua destilada, y aforar a 1000 ml. Determinar la concentración exacta por titulación con solución estándar de hidróxido de sodio 0.1 N, utilizando fenolftaleína, como indicador.

INDICADOR VERDE DE BROMOCRESOL Y ROJO DE METILO.- Prepárese verde de bromocresol al 0.1 % en alcohol etílico, agregando 2 ml de hidróxido de sodio 0.1 N por cada 0.1 g de indicador; preparar rojo de metilo al 0.1 % en alcohol etílico al 95 %, añadiendo 3 ml de hidróxido de sodio 0.1 N por cada 0.1 g del indicador.

Mézclese 37.5 ml de indicador verde de bromocresol con 12.5 ml de indicador rojo de metilo. Dilúyase a 100 ml con alcohol etílico.

TIOSULFATO DE SODIO, polvo seco.

GRANALLA DE ZINC.

PROCEDIMIENTO.

Pesar la muestra (5g para material de suelo y 0.5g de tejido de planta) y colocarla en el papel filtro. Envolverla convenientemente y pasarla al matraz Kjeldahl. Se agrega 50 ml de la mezcla de ác. sulfúrico - ác. salicílico y revuélvase de tal modo que se ponga en contacto íntimo la muestra seca con el reactivo. Déjese en reposo hasta el día siguiente. Añádanse 5g de tiosulfato de sodio y caliéntese suavemente durante 5 minutos, evitando la formación de espuma. Enfríese, se agrega 10 g de la mezcla digestora, y en el aparato Kjeldahl digiérase a pleno calor. Con materiales de suelos, plantas y semillas se prosigue la digestión por una hora después que la solución se haya aclarado.

Cuando se completa la digestión, se enfría y se añaden 300 ml de agua destilada y 100 ml de hidróxido de sodio concentrado un pedazo grande de zinc, y dos cucharadas de cuentas de vidrio. Conéctese a la cabeza de destilación, agítese y destílese 150 ml en solución de ác. bórico al 2 %. Al destilado se le añaden 10 gotas del indicador y se titula con el ác. sulfúrico 0.1 N hasta la aparición de un color rosa pálido.

El mismo procedimiento se sigue a un blanco.

CALCULOS.

$$\% \text{ de NITRÓGENO} = (T - B) 1.4 N/S$$

T= Volúmen de ácido empleado en la titulación de la muestra.

B= Volúmen de ácido empleado en la titulación del blanco.

N= Normalidad del ácido valorado.

S= Peso de la muestra en gramos.

RECOLECCION DE NODULOS DE LAS RAICES DE ALFALFA Y SOYA.

La recolección de los nódulos para el aislamiento de los rizobios, deberá coincidir con la época del crecimiento vegetativo y con la adecuada humedad del suelo. (Halliday J.; Date R.A., 1979).

Deberá evitarse hacer la recolección al borde de carreteras y otros sitios donde se haya disturbado el suelo, y en especial en los sitios donde las condiciones del suelo, de la planta y de la nodulación no sean típicas de la región. Se deben buscar leguminosas que pertenezcan a ecosistemas naturales estables.

Para obtener los nódulos de las plantas leguminosas, es necesario excavar alrededor de la planta, hacer una raspadura alrededor de la corona de la raíz y en raíces adventicias. Es posible examinar el sistema radical, fragmentando el suelo con las manos.

Si la raíz muestreada está abundantemente nodulada, la sección de algunos nódulos se presentan pigmentados de color blanco, rosado o verde. Según Virtanen, 1945 a,b, 1947, la pigmentación roja es debida a la presencia de leghemoglobina en el nódulo; el pigmento rojo se vuelve verde cuando cesa la fijación de nitrógeno en plantas anuales, al final del desarrollo vegetativo o cuando se colocan las plantas en la obscuridad por varios días. En este caso los bacteroides de los nódulos desaparecen y solo se encuentran bastoncillos en ellos. Los nódulos blancos son formados por rizobios no eficaces, o sea que no fijan activamente el nitrógeno atmosférico.

La forma de los nódulos es diferente en cada tipo de leguminosa, los nódulos del frijol de soya son grandes y redondos, los nódulos de la alfalfa son de forma dactilar.

AISLAMIENTO DE RHIZOBIUM A PARTIR DEL NÓDULO.

R. japonicum y

R. meliloti.

MATERIALES.

Pinzas, portaobjetos, asa, mechero.

Cajas de Petri para lavado y esterilización de los nódulos.

Alcohol al 95 %

Solución de cloruro mercúrico 1 : 1 000

Solución de fuscina fenicada 1 : 10

Tubos con medio 79 de Fred y Waskman.

PROCEDIMIENTO:

Lavar perfectamente las raíces noduladas con agua corriente, separar un nódulo y colocarlo en alcohol de 95 % durante - 30 segundos y sumergirlo en solución de cloruro mercúrico por 3 minutos, lavar cuidadosamente por lo menos seis veces con agua destilada estéril para eliminar el exceso de cloruro mercúrico.

Triturar el nódulo asépticamente sobre un portaobjeto, utilizando las pinzas flameadas. Agregar una o dos gotas de agua destilada estéril al nódulo triturado y emulsionar con el asa. - Hacer diluciones transportando una gota de la emulsión nodular a una nueva gota de agua destilada estéril.

Utilizando una o dos gotas de las diferentes diluciones se transportan a tubos que contengan medio 79 previamente licuado a 45°C. Enseguida se vacían a las cajas de Petri y se deja solidificar el medio, incubar a temperatura de 26°C de 5 a 10 días.

Observar la característica de la colonia, separando una típica para volver a estriar en placas con medio 79 de Fred y W. Identificar al rizobio directamente por sus características culturales y su morfología, aunque la identificación del rizobio - va a depender de la infección en la planta huésped adecuada.

Hacer un frotis de la emulsión nodular utilizada para las diluciones y teñir con fuscina fenicada diluida 1 : 10, asimis-

no se prepara un frotis a partir de una colonia típica del ri
zobio, por el método de la Fucsina fenicada (n.º.32). Obser
var la morfología de los microorganismos obtenidos de los cul
tivos, con los obtenidos de los nódulos.

PREPARACION DEL MEDIO PARA AISLAMIENTO DE RHIZOBIUM.

Medio 79 de Fred y Waksman.

CARBONATO DE CALCIO	3.0 g
CLORURO DE SODIO	0.2 g
SULFATO DE MAGNESIO HEPTAHIDRATADO	0.3 g
FOSFATO ACIDO DIPOTASICO	0.5 g
SULFATO DE CALCIO DIHIDRATADO	0.1 g
MANITOL	10.0 g
AGAR	20.0 g
AGUA DE LEVADURA	100.0 ml
AGUA DESTILADA	900.0 ml

PREPARACION:

Se mezclan los reactivos secos y se disuelven en agua destilada restante.

Colocar aproximadamente 15 ml del medio en tubos de ensaye de 15 X 25 se tapa la boca del tubo con torundas de algodón; Se somete a esterilización a 15 libras de presión durante 20 minutos.

NOTA.- El agua de levadura se prepara agregando 100g de levadura fresca a 1000 ml. de agua destilada, calentando a baño María tres horas y esterilizando a 15 Libras de presión durante 20 minutos.

PROCESO DE NODULACION EN LEGUMINOSAS.

Glicine max L. Merrill

Medicago sativa L.

MATERIALES:

Semillas de alfalfa y soya.

Alcohol de 95 %

Solución de bicloruro de mercurio dilución 1:1 000

Agua destilada estéril.

Cajas de Petri sembradas con R. japonicum y R. meliloti

Macetas con muestras de suelo.

METODO GENERAL STANDAR:.

Esterilización de las semillas.- Lavar con agua destilada las semillas de alfalfa y soya, esterilizar con alcohol de 95% y dejar reposar de 3 a 5 minutos, se elimina el alcohol y agitar vigorosamente con bicloruro de mercurio y dejar en reposo 3 a 5 min. Enseguida lavar con agua destilada estéril por lo menos 6 veces.

Las semillas estériles se siembran como sigue:

Sobre la muestra de suelo colocada en macetas plantar 10 semillas utilizando el asa estéril para colocarlas en el substrato, al tiempo de plantar, inocular con el microorganismo adecuado de la manera siguiente:

1.- En condiciones asépticas preparar una suspensión de los rizobios cultivados en medio 79 durante 5 días para R. meliloti, y 10 días de incubación para R. japonicum a temperatura ambiente.

2.- Usar 1 ml de esta suspensión para la inoculación de las semillas.

3.- Las macetas se regaron durante la primer semana con so

lución de Crone (n.º. 34). Durante el tiempo siguiente se regaron con agua destilada para la conservación húmeda del - suelo.

4.- Cabe hacer notar que por cada muestra de suelo se colocaron dos macetas con semillas inoculadas y dos macetas con semillas sin inoculación, que actuaron como controles.

Después de 10 semanas de crecimiento de las leguminosas, se lavaron las raíces para observar si hubo nodulación.

Notar las diferencias de altura, color, entre las plantas inoculadas y las testigos.

El hecho de efectividad más importante nos la demostrará la determinación de nitrógeno total; la relación del rendi-- miento y el porcentaje de nitrógeno variará si las plantas re cibieron Nitrógeno fijado simbióticamente.

Hacer preparaciones con los nódulos y teñir con carbol - eritrosina y colorante de Barlow.

**PREPARACION DE LA SOLUCION DE CRONE
(MODIFICACION DE ROVIRA & SOIL 1956).**

REACTIVOS:

FOSFATO ACIDO DIPOTASICO	1.0 g
CLORURO DE POTASIO	7.0 g
SULFATO DE CALCIO	2.5 g
SULFATO DE MAGNESIO HEPTAHIDRATADO	2.5 g
FOSFATO DE CALCIO	0.5 g
FOSFATO DE FIERRO	0.5 g
NITRATO DE POTASIO	2.0 g

P R O C E D I M I E N T O:

Se mezclan todos los reactivos y se muelen. Tomar de esta mezcla 1.5 g y disolverla en 1 000 ml de agua destilada, y se somete a esterilización durante 20 minutos a 15 libras de presión.

Esta mezcla sirve para mantener el suelo húmedo durante la primera semana de crecimiento de las leguminosas.

COLORACION DE UN FROTIS DE RHIZOBIUM CON
FUCSINA FENICADA

MATERIALES:

PORTAOBJETOS.

ASA DE PLATINO.

MECHERO

COLORANTE DE FUCSINA FENICADA:

Fucsina básica	1 g
Alcohol etílico	10 ml
Solución de fenol al 5 %	100 ml

PREPARACION:- Se disuelve la fucsina básica en el alcohol y se mezcla con la solución de fenol al 5 %.

PROCEDIMIENTO:

De un cultivo de Rhizobium tomar con el asa una nequeña porción, y colocarla en un portaobjeto flameado y enfriado que contenga una gota de agua destilada estéril y extenderla perfectamente.

Dejarla secar al aire y enseguida pasarla sobre la flama una vez, esperar a que se enfríe cubrir el frotis con el colorante durante 20 segundos.

Enseguida se procede a lavar la preparación en el chorro de agua y se deja secar, examinar en el microscopio con el objetivo de inmersión.

COLORACION CON CARBOL ERITROSINA

(Sánchez Marroquín, 1964)

MATERIALES:

Portaobjetos,
asa de platino.

Colorante Carbol eritrosina:

ERITROSINA	2.0 g
FENOL	0.5 g
AGUA	100.0 ml

PREPARACION.- Se disuelve el fenol en el agua destilada, se añade la eritrosina.

PROCEDIMIENTO:

Triturar un nódulo asépticamente sobre un portaobjetos utilizando las pinzas flameadas, agregar una gota de agua - destilada estéril al nódulo triturado, y emulsionar con el asa, hacer diluciones transportando una gota de la emulsión nodular a un portaobjeto que contenga una gota de agua destilada estéril, mezclarla y extenderla perfectamente.

- Secar al aire.
- Fijar con alcohol etílico durante 30 segundos.
- Teñir un minuto con carbol eritrosina
- Lavar con agua, secar y
- Observar a inmersión.

**COLORACION DE UN FROTIS DE RHIZOBIUM
METODO DE BARLOW**

MATERIALES:

Portaobjetos,
asa de platino

Colorante de Barlow:

GLUCOSA	50g
GLICEROL	50ml
AGUA DESTILADA	50 ml
VIOLETA DE GENCIANA	3 g

PREPARACION:

Se disuelve la glucosa en la solución acuosa de glicerol por calentamiento, agregar el violeta de genciana. Se lleva la mezcla a ebullición y enfriar, colocar en un frasco gotero.

P R O C E D I M I E N T O:

Triturar un nódulo asépticamente sobre un portaobjeto, utilizando las pinzas flameadas, agregar una gota de agua destilada estéril al nódulo y emulsionar con el asa, hacer diluciones trans portando una gota de la emulsión nodular a un portaobjeto que - contenga una gota de agua, mezclarla y extenderla bien.

-Dejarla secar al aire.

- Cubrir el frotis con el colorante durante 30 seg a 1 minuto.

- Lavar con agua corriente.

- Quitar el exceso de agua con papel filtro.

- Secar por calentamiento ligero y por último

- Examinar en el microscopio usando el objetivo de inmersión.

TABLA No. 1

RELACION DE DATOS Y ANALISIS PARA LOS SUELOS ESTUDIADOS CORRESPONDIENTES
A LOS EJIDOS DE VILLA DE POZOS Y LA PILA.

PERFIL	No. DE MUESTRA	PROFUNDIDAD EN CENTIMETROS	CULTIVO ESTABLECIDO	ANALISIS MECANICO				CONDUCTIVIDAD ELECTRICA		% DE SATURACION	% DE SALES EN EL EXTRACTO	% DE SALES EN EL SUELO	PH	MATERIA ORGANICA		NITROGENO T. CALCULADO		NITROGENO TOTAL KJELDAHL OBTENIDO		FOSFORO		POTASIO			
				ARENAS	LIMO	ARCILLAS	CLASIFICACION TEXTURAL	INT.	M MHO S/CM A 25°C.					INT.	SUSPENSION ACUOSA REL. 1.25.	INT.	%	INT.	%	INT.	%	INT.	%	ANTES DE INOCULACION	DESPUES DE INOCULACION
1	77/79	0-25	FRIJOL DE SOYA	22.76	32.36	44.88	ARCILLA	PESADO	0.20	NS	65	0.0128	0.0072	8.2	AF	2.540	M	0.127	M	0.131	0.170	7.8	P	128.0	MP
	78/79	25-30	FRIJOL DE SOYA	20.40	32.72	46.88	ARCILLA	PESADO	0.30	NS	57	0.0192	0.0122	8.0	AF	2.159	M	0.107	M	0.125	0.170	7.8	P	128.0	MP
2	111/79	0-25	ALFALFA	52.56	30.00	17.44	MIGAJON ARENOSO	LIGERO	0.52	NS	29	0.0332	0.0096	8.7	AF	2.080	M	0.104	M	0.106	0.118	78.0	MR	640.0	MR
	112/79	25-30	ALFALFA	53.56	29.00	17.44	MIGAJON ARENOSO	LIGERO	0.35	NS	27	0.0224	0.0060	8.8	AF	1.950	P	0.097	P	0.073	0.078	102.0	MR	792.0	MR
3	115/79	0-20	FRIJOL DE SOYA	56.20	21.36	22.44	MIGAJON ARCILLO ARENOSO	MEDIO	0.32	NS	25	0.0204	0.0051	7.3	N	1.040	P	0.052	P	0.050	0.164	20.0	R	360.0	R
4	117/79	0-20	ALFALFA	56.56	22.00	21.44	MIGAJON ARCILLO ARENOSO	MEDIO	0.42	NS	32	0.0268	0.0086	8.6	AF	1.690	P	0.084	P	0.070	0.112	42.0	MR	992.0	MR
5	121/79	0-20	ALFALFA	55.20	20.00	24.80	MIGAJON ARCILLO ARENOSO	MEDIO	0.25	NS	30	0.0160	0.0048	8.3	AF	1.040	P	0.052	P	0.049	0.110	18.0	R	496.0	MR
	122/79	20-40	ALFALFA	54.20	21.00	24.80	MIGAJON ARCILLO ARENOSO	MEDIO	0.10	NS	27	0.0064	0.0017	8.2	AF	0.780	MP	0.039	MP	0.043	0.110	16.0	M	496.0	MR

CE

NS = NO SALINO

A = ALCALINIDAD

F = FUERTE

N = NEUTRO

INTERPRETACION

PARA

MO, N, P, K,

MP = MUY POBRE

P = POBRE

M = MEDIO

R = RICO

MR = MUY RICO

TABLA No. 2

RELACION DE DATOS Y ANALISIS PARA LOS SUELOS ESTUDIADOS CORRESPONDIENTES
A LOS EJIDOS DE VILLA DE POZOS Y LA PILA,

No. DE MUESTRAS	CULTIVO ESTABLECIDO	No. PLANTAS COSECHADAS	TAMAÑO PROMEDIO EN CM.	PESO PROMEDIO EN VERDE EN g.	PESO PROMEDIO EN SECO EN g.	PROMEDIO PARA NITROGENO T. KJELDHAL EN %	
77/78	INOCULADA	FRIJOL DE SOYA	10	17.87	1.67	0.500	3.36
77/78	TESTIGO	FRIJOL DE SOYA	10	16.35	1.71	0.460	3.12
115/79	INOCULADA	FRIJOL DE SOYA	1	30.00	6.02	1.356	3.49
115/79	TESTIGO	FRIJOL DE SOYA	1	17.00	2.30	0.428	2.88
111/112 /79	INOCULADA	ALFALFA	15	10.26	0.39	0.060	3.92
111/112 /79	TESTIGO	ALFALFA	13	5.88	0.16	0.032	3.03
117/118 /79	INOCULADA	ALFALFA	20	8.90	0.31	0.050	3.75
117/118 /79	TESTIGO	ALFALFA	17	7.86	0.23	0.040	3.61
121/122 /79	INOCULADA	ALFALFA	18	5.05	0.21	0.033	3.65
121/122 /79	TESTIGO	ALFALFA	20	5.33	0.16	0.026	3.50

TABLA No.3

CARACTERISTICAS DEL RHIZOBIUM

DESARROLLO EN AGAR LEVADURA MANITOL	TEMPERATURA	PERIODO DE INCUBACION	ASPECTO DE LA COLONIA				COLORANTE BARLOW	COLORANTE FUCSINA FENICADA	COLORANTE CARBOL ERITROSINA	INFECTIVIDAD DE LEGUMINOSAS
			FORMA	COLOR	TEXTURA	TAMAÑO				
RHIZOBIUM MELILOTI	25° C	6 DIAS	REDONDEADA	BLANCA TRASLUCIDA	PRODUCCION ABUNDANTE DE GOMA	APROXIMADA- MENTE DE 5 mm.	COLORACION DE GOMAS DE RHIZOBIUM	LOS BACTEROIDES SE ENCUESTRAN EN FORMA DE X,Y Y OTRAS SE PRESENTAN HINCHADAS EN UN EXTREMO	POSITIVA FORMACION NODULOS	
RHIZOBIUM JAPONICUM	25° C	10 DIAS	REDONDEADA	BLANCO	MENOR PRODUCCION DE GOMA	1 Y 2 mm	COLORACION DE GOMAS DE RHIZOBIUM	LOS BACTEROIDES SE ENCUESTRAN EN FORMA DE BASTONES Y ALGUNOS VACUOLADOS	FORMACION DE NODULOS	

FIG. 1 y 2.- COLONIAS TÍPICAS DE RHIZOBIUM MELILOTI EN
MEDIO DE CULTIVO DE FRED Y WAKSMAN, SEMBRADAS POR DILUCION

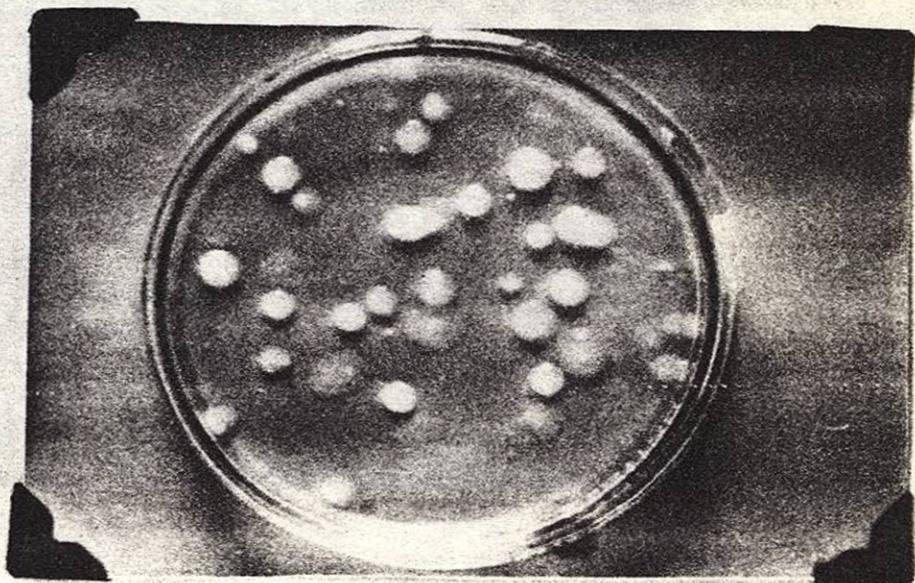


FIG. 1

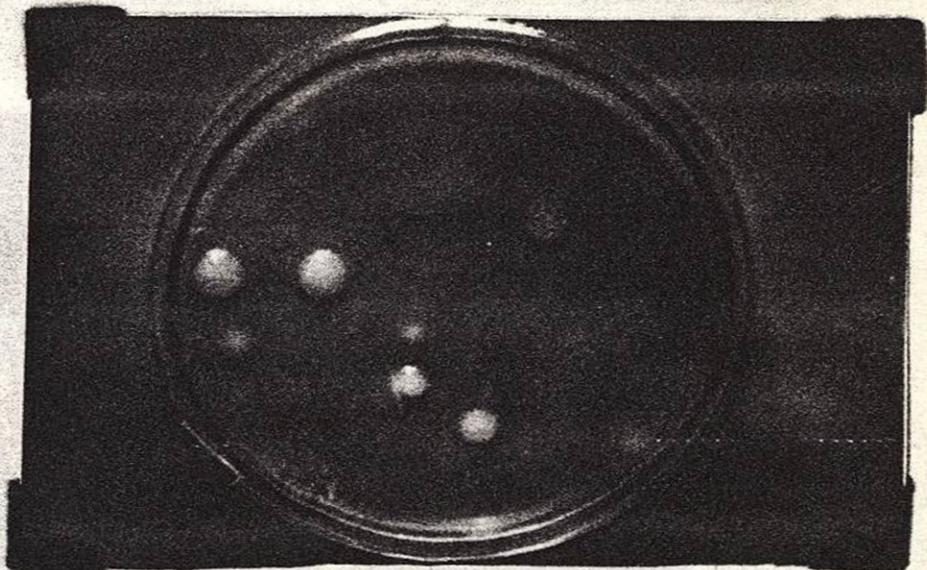


FIG. 2

FIG. 3 ASPECTO DE LAS COLONIAS DE Rhizobium meliloti
EN MEDIO DE FRED Y WAKSMAN, SEMBRADAS POR ESTRIAS



FIG. 4 OTRO ASPECTO DE LAS COLONIAS DONDE SE OBSERVA QUE
LLEGAN A CONFLUIR.

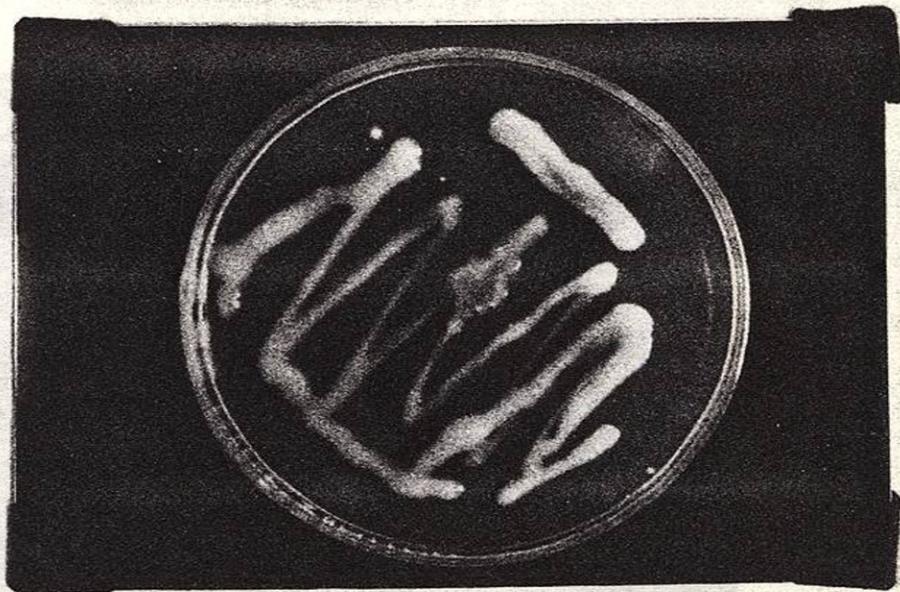


FIG. 5 NOTESE EL EFECTO DE LOS MICROORGANISMOS EN EL CRECIMIENTO DE LAS LEGUMINOSAS EN ESTE CASO DE ALFALFA.



FIG. 6 EFECTO DE LOS MICROORGANISMOS EN EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE FRIJOL DE SOYA.



VI.- DISCUSION E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.

Las tablas del 1 al 2 corresponden a las determinaciones analíticas practicadas en los suelos estudiados, así como los materiales vegetales que se obtuvieron como plantas cosechadas. Por otra parte la tabla núm. 3 corresponde a las propiedades observadas en las bacterias y sus características.

Como primera parte de esta discusión e interpretación de resultados, se procede a la caracterización de los suelos muestreados, éstos fueron obtenidos en los Ejidos de Villa de Pozos y La Pila que administrativamente pertenecen al Municipio de la Capital; las profundidades correspondientes se ubican en la parte superficial o suelo y la capa adyacente o subsuelo, y varían para el suelo de 0 a 20 cm y 0 a 25 cm, para el subsuelo de 20 a 40 y 25 a 50 cm.

Interesa caracterizar las condiciones del suelo para tener un punto de partida que nos permita ubicar los posibles fenómenos e hipótesis de campo que se pudieran presentar, y esto en función principalmente de las propiedades físicas y químicas.

De las propiedades físicas la de mayor significación corresponde a la composición granulométrica del suelo, que también se conoce como textura, los valores para los separados del suelo que son: arenas, limo y arcillas presentan una variación constante, ya que para la fracción de las arenas es de 20.40 a 56.56 por ciento, la fracción limosa varía de 20 a 32.72% y las arcillas o sea las proporciones más finas y que deciden en gran parte el valor agrícola del suelo están dentro del rango de 17.44 a 46.88 %.

La interpretación de la clasificación textural para estos suelos va desde la clase arcillosa a la de migajón arenoso, con una clase intermedia de migajón arcillo arenoso; esta situación

refleja la naturaleza aluvial de los suelos que corresponden a parte del Valle de San Luis Potosí, donde las fases de acarreo están representadas por la fracción arenosa, y las partes de a acumulación por la fracción arcillosa. No existe constancia de finida en el aspecto de acumulación ya que las arcillas pueden presentarse en el horizonte superficial de 0 a 25, o también - pueden acumularse en la parte inferior de 25 a 50, en términos generales estos suelos presentar condiciones adecuadas para el desarrollo de la mayor parte de los cultivos principalmente de leguminosas.

Respecto a la Conductividad Eléctrica, esta determinación nos indica en forma indirecta el grado de salinidad del suelo, existiendo una constancia entre la textura y la conductividad eléctrica; ya que en ningún caso se presentó salinidad, observando la table núm 1, en la que todos los suelos corresponden a niveles no salinos, debido a la naturaleza arenosa del suelo y como la fracción arcillosa no se encuentra en forma definida es de esperar que todas las sales se desplacen o percolen hacia el interior del perfil.

Otro factor de tipo edáfico que tiene importancia al establecer cultivos en el suelo, es el Por Ciento de Sales en la fase líquida que es el extracto del suelo. Así también el Por Ciento de Sales en el volúmen total de la fase sólida del suelo, éstas dos determinaciones concuerdan con la conductividad eléctrica ya que en los máximos y mínimos para conductividad se corresponden para los porcentajes de sales en el suelo y en el extracto, se confirma igualmente la condición de que estos suelos se encuentren libres de sales.

Se adjunta una columna para el Por Ciento de Saturación, que nos indica la cantidad de agua que puede retener el suelo en un término de 24 a 48 horas después de un período de riego o lluvia, esto cuando el suelo se considera con drenaje normal el porcentaje de saturación se considera de acuerdo a la granulometría de los suelos, ya que la textura arcillosa donde pre-

dominan las fracciones finas, tiene un porcentaje que va de acuerdo con su naturaleza física.

Para los suelos de naturaleza arcillosa corresponden los mayores porcentajes de saturación, la cantidad de agua que retiene el suelo tiene importancia tanto para el desarrollo del cultivo, como para la biota del mismo, ya que para los microorganismos es necesario que las condiciones entre la fase líquida y gaseosa es tén en proporciones adecuadas.

Otra de las determinaciones que influye sobre los cultivos, es la reacción del suelo, que nos indica el grado de acidez o al calinidad del mismo. Para estos suelos el rango no presenta variaciones significativas dentro de la escala de alcalinidad, ya que varían de 7.3 a 8.88, este rango de alcalinidad es favorable para cultivos como la alfalfa que se considera tolerante para las condiciones de salinidad y alcalinidad. El aspecto que pudiera presentar algún riesgo es en el perfil 2 donde se observan cifras de 8.7 y 8.8², es decir condiciones de alcalinidad que caen dentro del mínimo de sodicidad, encontrándose una correspondencia entre el valor del pH y el por ciento de arcillas que es de 17.44, entonces los fenómenos hidrolíticos del sodio intercambiable del -- complejo coloidal quedan compensados en parte por la baja proporción de arcillas ya que éstas también tienen cargas eléctricas ne gativas.

En general los valores de pH son adecuados para el tipo de cultivos de leguminosas.

En Materia Orgánica se tienen dos condiciones, una que presen ta una marcada deficiencia con niveles pobres y muy pobres; otra en que los niveles se consideran medianamente adecuados y clasifi cados como medios, las proporciones varían de 0.780 a 2.540 %. En realidad es de esperarse esta situación, ya que los suelos contie nen una baja cantidad de materia orgánica, como consecuencia de la reducida actividad biótica. El objeto de establecer cultivos de leguminosas es de inducir cuando menos en parte los procesos de autofertilización del suelo por medio de las bacterias fijadoras de nitrógeno, con las que se trabajó en el presente estudio.

En lo que respecta al contenido de Nitrógeno Total calculado a partir de los datos de materia orgánica (M.O.) que es el sistema que se sigue desde el punto de vista agrícola, los niveles más bajos en M.O. corresponden a los datos de nitrógeno que también son deficientes, y los de contenido medio concuerdan para M.O. como para nitrógeno. Otra constancia en las observaciones de estos datos es que las mejores proporciones para la M.O. coinciden con los mayores datos para nitrógeno en las capas superficiales o suelo, y el mínimo correspondiente a la capa inferior o subsuelo. Esto se justifica teniendo en cuenta que en la parte superficial es mayor la actividad biótica y como consecuencia los materiales de procedencia orgánica tienden a acumularse.

En la misma tabla núm. 1 se presentan dos columnas referentes a la determinación de nitrógeno total por el método Kjeldahl, una indica la cantidad de nitrógeno existente en el suelo antes de la inoculación con los rizobios, y puede compararse con la columna de nitrógeno total calculado, notándose una concordancia de valores en los datos obtenidos entre uno y otro método.

La columna de nitrógeno total obtenido por el método Kjeldahl nos muestra los valores existentes posteriores al establecimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno relativas a este estudio, y puede observarse un ligero aumento en los valores de nitrógeno total, comparando con la columna anterior, correspondiente a los datos de nitrógeno total antes de la inoculación.

El nitrógeno se reporta en por ciento debido a que se encuentra en cantidades más bajas en el suelo, en cambio el potasio y el fósforo se reportan en Kg/Ha porque se presentan en mayor proporción.

En lo que respecta al fósforo se tienen los niveles pobre, medio y muy rico, lo que llama la atención es la muestra núm. 112 que corresponde al perfil 2, tiene un nivel de muy rico en una proporción de 102 Kg/Ha en comparación con el mínimo que se presenta en dos horizontes en suelos arcillosos con 7.8 Kg/Ha, esto

se debe en parte por la naturaleza alcalina del suelo ya que el fósforo tiende a precipitar en condiciones de alcalinidad como fosfato de calcio, este compuesto representa una de las fuentes potenciales desde el punto de vista de fertilidad. Nótese también que el mayor contenido de fósforo corresponde a un pH de 8.8, esto justifica la hipótesis de que parte de los fosfatos se encuentra precipitado como fosfato de calcio y al establecerse los cultivos las condiciones de acidez tienden a liberar el fosfato aprovechable por las plantas.

Como es de esperar para el potasio únicamente se encontraron dos niveles muy pobres, todos los demás se encuentran bien abastecidos de este nutrimento, la mayoría de los niveles localizados corresponden a muy rico, y uno rico, esto de acuerdo a la ubicación de los suelos en el ambiente ecológico en que se encuentran, es decir en una zona semidesértica ya que las pérdidas de potasio se favorecen principalmente por las lluvias. El potasio como uno de los elementos más solubles tiende a perderse por los lavados, en las zonas desérticas y semidesérticas la cantidad de agua de lluvia es poca y no es suficiente como para que se pierda por lixiviación.

Los niveles más pobres, muestras núm. 77 y 78 con 128 Kg/Ha, se atribuyen a fenómenos de fijación en la fracción arcillosa ya que el potasio en solución se encuentra como catión monovalente, y las arcillas que tienen cargas negativas tienden a fijarlo en parte.

Lo anterior representa una caracterización de la forma física y química de suelo, que puede servir como base de acuerdo con los distintos usos que se les dé. En el presente estudio estuvo encauzado al establecimiento de cultivos de leguminosas e inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno al suelo.

En la tabla núm 2 el caso correspondiente al número de plantas cosechadas, tenemos dos cultivos: uno de frijol de soya y otro de alfalfa establecidas sobre muestras de suelo colocadas en macetas. Llama la atención el hecho de que el número de plantas cosechadas

de frijol de soya presenta una diferencia entre el núm.77/78 donde se obtuvieron un total de diez plantas, y la núm. 115 sólo se cosechó una, ésto puede deberse al índice de germinación, y a las condiciones específicas del suelo, la muestra núm. 77 es clasificada como arcillosa y en consecuencia retiene más nutrientes, y la muestra núm. 115 con textura de tipo migajón arcillo arenoso en donde la porción de separados finos baja a 22.44 %.

En el tamaño promedio de las plantas ubicado en cm. la muestra núm.115 se encuentra la mayor cifra en tamaño promedio, ésto puede explicarse por lo siguiente: hubo menor índice de germinación entonces los sistemas radiculares en el suelo tuvieron un - mayor volúmen y en consecuencia, es factible que obtuvieran una mayor cantidad de nutrientes para su desarrollo. Es decir cuando hubo menor número de plantas de frijol de soya, se obtuvo un tamaño promedio de 17.87 cm. en cambio cuando germinó solo una - la altura fué de 30 cm.

El peso en seco y en verde nos da una idea del desarrollo y vigor de las plantas, como es de suponer el peso verde corresponden a cifras mucho más altas, en cambio el peso seco promedio es menor debido a la pérdida de agua.

El contenido de nitrógeno si presenta un aspecto más definido y constituye uno de los objetivos del estudio, el promedio del peso en seco de las plantas inoculadas tiene mayor contenido de nitrógeno en comparación con los valores del peso en seco de las plantas no inoculadas.

En lo que respecta a la alfalfa se encuentra una situación más uniforme ya que de las plantas cosechadas siempre hubo mayor índice de población, el máximo de plantas cosechadas fue de 20 y el mínimo de 13, ésto se debe en parte al tipo de cultivo, ya que la alfalfa es uno de los cultivos que se adapta a las condiciones de alcalinidad de estos suelos, y por otra parte las propiedades físicas como la textura y químicos como el pH y los contenidos de fósforo y potasio que favorecen más al cultivo de alfalfa, por ser tolerante a esas condiciones.

El tamaño promedio si presenta variaciones ya que en un caso se obtiene una altura de 10 y un mínimo de 5.05; a ésto hay - que atribuir al tipo de sistema foliar del cultivo ya que la alfalfa presenta un folíolo más vigoroso aunque más pequeño en tamaño de hoja.

En la tabla núm.3 correspondiente a las características - que presentan las bacterias del género Rhizobium, los datos que se obtuvieron respecto al desarrollo de las bacterias en el medio nutritivo agar levadura manitol fueron: para R. meliloti .- El crecimiento de las colonias fue más rápido (5 días) en relación con R. japonicum ya que el período de incubación de éste fue -- aproximadamente 10 días. Ambas a Temperatura de 25^oC.

En los dos casos las colonias se presentan en forma redondeada y de color blanco.

En el mismo cuadro se puede apreciar que existió una mayor producción de goma del R. meliloti que en la de R. japonicum. El tamaño de la colonia fue 5 mm. y 2 mm. respectivamente.

Por medio del colorante de Barlow se logra observar las gomas que son producidas por las bacterias. Las tinciones con los colorantes Fucsina fenicada y Carbol eritrosina permiten comprobar las diversas formas que existen de los bacteroides que pueden ser desde bastones delgados y algunos vacuolados para R. japonicum y en forma de X y Y para R. meliloti.

Por último la infectividad de las leguminosas fue positiva - debido a la formación de nódulos eficaces, es decir fijadores de nitrógeno, en las raíces de las plantas leguminosas de alfalfa y frijol de soya inoculados con los microorganismos correspondientes. Los nódulos de alfalfa son dactilares y pequeños, de color rosado, y los del frijol de soya son esféricos y de gran tamaño.

VII.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Como conclusiones definitivas de este estudio, se puede establecer que al inocular los suelos con bacterias fijadoras de nitrógeno del género Rhizobium y al establecerse una simbiosis entre estos microorganismos y las plantas leguminosas, contribuyen a elevar las proporciones de nitrógeno total en el suelo aumentando el nivel de fertilidad en lo que respecta a este nutriente, así como la cantidad de nitrógeno fijado por las plantas.

La cantidad de nitrógeno atmosférico fijado por las leguminosas del tipo de frijol de soya y alfalfa, fue superior en las muestras inoculadas en comparación con las no inoculadas o controles. Respecto al método seguido para la determinación de Nitrógeno total fué el de Kjeldahl modificado, asimismo se calculó el por ciento de nitrógeno a partir de la Materia Orgánica y puede ser confiable puesto que los datos obtenidos se asemejan a los resultados a partir del método de Kjeldahl.

De las condiciones adecuadas del suelo va a depender la supervivencia de los microorganismos, tales como la humedad del suelo, así como el pH del suelo en las muestras utilizadas que en este estudio varían de 7.3 a 8.8 , y de una cantidad suficiente del fósforo y potasio, así como los demás nutrientes.

Es recomendable cuando los suelos son relativamente pobres en materia orgánica y por consiguiente en nitrógeno total, hacer inoculaciones a nivel parcelario con los microorganismos en cuestión, incluso ya existe la venta de inoculantes a nivel comercial para los diferentes tipos de leguminosas.

También es aconsejable practicar la inoculación en los suelos localizados en las zonas desérticas y semidesérticas para incrementar los procesos bióticos de los mismos y estimular la incorporación de nitrógeno atmosférico.

VIII.- R E S U M E N .

En el presente trabajo se determinó la proporción de Nitrógeno atmosférico que se fija al suelo por medio de la simbiosis entre bacterias fijadoras de nitrógeno y leguminosas.

La secuencia del estudio se inició con una revisión bibliográfica, para establecer el punto de partida de las actividades, asimismo se identificaron las condiciones físicas y químicas que presentaron los suelos en estudio. Se pretendió hacer comparaciones entre los suelos en su condición actual y potencial al ser inoculados para inferir en forma cuantitativa al estado de autofertilización del suelo por medio de los microorganismos.

Para aumentar la proporción de Nitrógeno en el suelo, se inocularon las semillas de las leguminosas en cuestión, con una suspensión de rizobios (bacterias fijadoras de nitrógeno del género Rhizobium), que se desarrollan en las células de la raíz leguminosa, originando nódulos. Estas bacterias utilizan el Nitrógeno atmosférico y sintetizan compuestos nitrogenados que utiliza la planta.

La selección de los microorganismos dependió de la capacidad para producir nódulos activos que fijaran el nitrógeno de la atmósfera, efectuándose ensayos de laboratorio.

Los materiales y métodos de estudio así, como la obtención de datos, incluyen actividades de campo (muestreo de suelos) en las localidades de Pozos y La Pila, S.L.P. y además los Análisis de laboratorio: Físico, Químico y Bacteriológico en suelos y tejidos vegetales; tales como: Análisis mecánico del suelo, Conductividad eléctrica, Por ciento de saturación, Por ciento de Sales en el extracto acuoso, Por ciento de sales en el suelo en lo que se refiere a Análisis físico del suelo.

En lo que respecta a Análisis Químico: Determinación de Ni

trógeno (en suelos y tejidos vegetales), Materia Orgánica, Fósforo y Potasio.

Bacteriológico: comenzando con el aislamiento de los microorganismos, incubación en el medio nutritivo adecuado, y observación en el desarrollo de los mismos.

Después se efectuó la inoculación a las semillas de leguminosas para asegurar el establecimiento de los rizobios en el suelo. Posteriormente se determinó la comparación entre los suelos antes y después de la inoculación.

Durante los ensayos de laboratorio se utilizaron testigos.

A partir de la página 35 a 37 se encuentran los cuadros de resultados y en el capítulo VI la discusión e interpretación de los mismos, las conclusiones y recomendaciones en el capítulo VII, para concluir con los datos sobre la bibliografía consultada.

IX.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- BARRY SCOTT, D. "Recent developments in the biochemistry of nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis" Río de Janeiro, 1977. (mimeografiado) 10p.
- 2.- CHAPMAN, D.H., PAPER, F.P. "Métodos de análisis para suelos, plantas y agua. Trad. Contín, A.; 1a. ed. México, Trillas, - 1976. 195 p.
- 3.- DATE, R.A., HALLIDAY, J. "Colección, aislamiento, caracterización y conservación de razas de Rhizobium". Trad. Gómez Enciso, C.; Curso rápido de tecnología de Rhizobium UFRGS. Porto Alegre, Brasil, 1979 (mimeografiado) 30.p
- 4.- GIRARD H., ROUGIEUX R. "Técnicas de Microbiología Agrícola" Trad. Moll, Marco. Zaragoza, España. ed. Acribia, 1964. 267 p.
- 5.- GRANDE, L.R. "Métodos para análisis físicos y químicos en suelos agrícolas" Universidad Autónoma de San Luis Potosí, IIZD, 1974. (mimeografiado) 74 p.
- 6.- GRAY GENEVIEVE. "Witton's Microbiología". Trad. Colchero F. 1a. ed. México, Continental, 1977. 774 p
- 7.- IGNATIEFF, V. "El uso eficaz de los fertilizantes" Boletín de la FAO
- 8.- MORALES, V.M. y HUBELL, D.H. "Avances recientes en el estudio del proceso de infección de las leguminosas por el Rhizobium" IX Reunión Latinoamericana de Rhizobium. Cocoyoc, México, 1978. 8 p.
- 9.- RICHARDS, B.N. "Introduction to the soil ecosystem" Grain Britain, Longman, 1974.

- 10.-SALLE, A.J. "Bacteriología" Versión García Ignacio, 4a. ed. Barcelona, Gustavo Gili, 1957. 846p.
- 11.-SANCHEZ MARROQUIN, A. "Microbiología Agrícola" Chapingo, Dpto. de Promoción y Divulgación de la Esc. Nacional de Agricultura, 1964. 393 p.
- 12.-SAUMELL, HUGO. "Soja, información técnica para su mejor conocimiento y cultivo" Buenos Aires, Hemisferio Sur, 1977.
- 13.-TRUJILLO GONZALEZ, G. (comunicación personal)
- 14.-VINCENT, J.M. " Manual Práctico de Rizobiología", 1a. ed. Buenos Aires, Hemisferio sur, 1975. 200 p.
- 15.-WINSTON, J. BRILL. "Fijación biológica del nitrógeno atmosférico" Ciencia y Desarrollo, núm. 17, México, 1977. 10 p.

IMPRESO EN:

copiroyal®

1983

