

**LA FIJACION BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO POR SIMBIOSIS COMO
HERRAMIENTA PARA INCREMENTAR LA PRODUCTIVIDAD DE LOS
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

DOUGLAS GIOVANNI RIZZO RIVAS

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
VICERECTORÍA DE INVESTIGACIONES POSTGRADOS Y RELACIONES
INTERNACIONALES
PASTO - COLOMBIA
2009**

**LA FIJACION BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO POR SIMBIOSIS COMO
HERRAMIENTA PARA INCREMENTAR LA PRODUCTIVIDAD DE LOS
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

DOUGLAS GIOVANNI RIZZO RIVAS

**Monografía presentada como requisito parcial para optar al título de especialista en
Producción de Recursos Alimentarios para Especies Pecuarias**

**Asesor:
ARTURO LEONEL GALVEZ CERON. Zoot., M.Sc.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
VICERECTORÍA DE INVESTIGACIONES POSTGRADOS Y RELACIONES
INTERNACIONALES
PASTO - COLOMBIA
2009**

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1° del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

ARTURO GALVEZ CERÓN Zoot., Ms. C. (Asesor)

HERNAN OJEDA JURADO Zoot., Esp. (delegado)

JORGE FERNANDO NAVIA I.A., M. Sc., Ph. D. (Jurado).

Pasto, Agosto de 2009.

Dedico a:

MIS HIJOS

DOUGLAS GIOVANNI RIZZO RIVAS

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

ARTURO GALVEZ CERON

Zoot., M. Sc.

HERNAN OJEDA FURADO

Zoot. Esp

JORGE NAVIA

I.A M. Sc., Ph. D.

LUIS ALFONSO SOLARTE

Zoot., Esp

OSCAR ANTONIO MONCAYO OTERO

Zoot., Esp

Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño.

Todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la culminación de este trabajo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	13
2 JUSTIFICACION	15
3 OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GENERAL	16
3.1.1 Objetivos Específicos	16
4. MARCO TEORICO	17
4.1 IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO EN LA FERTILIDAD DE LOS SUELOS.	17
4.1.1 Definición de fertilidad de suelo.	17
4.1.2 El nitrógeno.	18
4.2 EL CICLO DEL NITRÓGENO	18
4.2.1 Fijación de nitrógeno atmosférico	20
4.2.2 Mineralización del Nitrógeno	22
4.2.3 Nitrificación – desnitrificación	23
4.3 LAS LEGUMINOSAS EN LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO	26
4.3.1 Iniciación del nódulo.	28
4.3.2 Invasión y formación del canal de infección	30
4.4 INOCULACIÓN DE LAS PLANTAS FIJADORAS DE NITRÓGENO	31
4.4.1 Inoculación – simbiosis	31
4.4.2 Inoculación convencional	33
4.4.3 Peletización	33
4.4.4 Limitaciones de la simbiosis	34

	pág.
4.5 PRODUCTIVIDAD VIA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	35
4.5.1 Asociación gramíneas – leguminosas	35
4.6 PERSPECTIVAS FUTURAS DE LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO	37
5 CONCLUSIONES	39

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1 Ciclo del nitrógeno en la naturaleza	19
Figura 2. Modelo esquemático de los factores Nod	29

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Grupos de inoculación cruzada y asociaciones de rhizobium – leguminosa	32

INTRODUCCION

En la mayoría de los países tropicales se observa un rápido aumento de la población; comportamiento que impone severas restricciones a los recursos naturales y con un subsecuente deterioro progresivo de los suelos (Del Castillo y Montes de Oca, 1994)¹. Adicionalmente, la deforestación, agricultura intensiva y prácticas irracionales de manejo ganadero como el sobrepastoreo y el fuego han ocasionado una baja en la fertilidad de los suelos tropicales (Sanchez y Salinas, 1981)², lo cual limita la producción y calidad de las pasturas, y por consiguiente no cubre los requerimientos de los animales.

De acuerdo a lo anterior, las leguminosas arbustivas forrajeras toman una importancia relevante debido a que por su particular fisiología utilizan, para sus procesos fisiológicos, el nitrógeno atmosférico fijado simbióticamente por algunos géneros de bacterias de la familia *Rhizobiaceae*. Parte de ese nitrógeno puede ser transferido a la gramínea acompañante, aunque la proporción de esa transferencia puede ser influenciada por muchos factores: especie, condiciones edafoclimáticas, densidad de siembra, etc. (Blair *et al.*, 1990)³.

De todos modos la cantidad de nitrógeno en el suelo es pequeña, mientras que la consumida anualmente por los cultivos es comparativamente grande. A veces, el nitrógeno del suelo es demasiado soluble y así desaparece por drenaje, a veces se volatiliza, otras es definitivamente inasimilable por las plantas superiores. Además sus efectos sobre las plantas son muy notables y rápidos, de esta manera, sus aplicaciones excesivas son realmente perjudiciales (Botha¹⁹⁹⁹)⁴.

Desde este punto de vista es factible la rehabilitación de suelos degradados donde se ha recomendado proyectos de reforestación y sistemas agroforestales con plantas diversas fijadoras de nitrógeno (Acacias, Leucaena, Poroto, Lupino, etc), en procura de la utilización de estos suelos (Botha¹⁹⁹⁹)⁵, que son abundantes en todo el mundo y su aprovechamiento agropecuario es muy difícil, antieconómico o definitivamente impracticable haciendo uso de especies vegetales capaces de adaptarse a bajas demandas de nutrientes y permitir un

¹ Del Castillo, P. A. y Montes de Oca, F. Efecto del uso de bacterias solubilizadoras de fósforo y fijadoras de nitrógeno sobre el rendimiento de la papa (*Solanum tuberosum*). II Taller sobre biofertilización en los trópicos. 16-18 de noviembre. La Habana. Cultivos Tropicales 15 (3). 1994: 67.

² Sánchez, P. y J. Salinas. 1981. Low-Input technology for managing oxisols and ultisols in Tropical America. *Advances in Agronomy*, 34: 274.

³ Blair, G., D. Catchpoole y P. Horne. 1990. Forage tree legumes: Their management and contribution to the nitrogen economy of wet and humid tropical environments. *Advances in Agronomy*, 44:27-54.

⁴ Botha, P. 1999. The persistence of clovers in grassclover pastures. Dpt. Econ. Aff., Agric and Tourism. Southern Cape ADC. OuteniquaExp.Farm. George, Australia. 8p.

⁵ Ibid., 8p.

eficiente reciclado externo de los mismos a través de la descomposición de hojarasca y de raíces muertas (Burbano, 1989)⁶.

⁶ Burbano, H. 1989. El suelo: una visión sobre sus componentes bioorgánicos. Pasto: Universidad de Nariño, 447p.

2 JUSTIFICACION

Existe gran cantidad de Información científica y técnica respecto de la fijación del Nitrógeno, incluso desde hace más de un siglo. Las plantas capacitadas para realizarla son principalmente especies de leguminosas (Familia *Leguminosae*) que, como todos los vegetales, absorben nitrógeno mineral del suelo, pero además pueden obtener nitrógeno atmosférico. Para que esto ocurra, debe existir en el suelo bacterias que infectan y colonizan las raíces, provocando las deformaciones conocidas como nódulos (Twornlow²⁰⁰⁴)⁷

En contraste con lo anterior, el uso de nitrógeno sintético en los últimos 40 años ha aumentado de 3.5 millones a 80 millones de toneladas, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, incrementándose sus costos de producción a más de \$ 20 billones USD anualmente, (Urzúa, 2000)⁸. El óxido nitroso (N₂O) además es otro gran factor contaminante producto del excesivo uso de fertilizantes nitrogenados, elemento que, conjuntamente con el CO₂, metano (CH₄) y los clorofluorcarbonos, es un gas invernadero causante en gran medida del calentamiento global (Twornlow²⁰⁰⁴)⁹.

Así, para incentivar la producción animal sin detrimento del medio ambiente, es necesario no solamente mejorar las pasturas y la genética de los animales, sino implementar programas con visión holística enfocadas a preservar el medio ambiente, lo que se logrará, en gran medida favoreciendo la fijación biológica de nitrógeno, que permite una excelente nutrición nitrogenada, y ahorros importantes en fertilizantes nitrogenados con evidentes ventajas económicas (Primavesi, 1982)¹⁰. La FSN resulta ser, entonces, una tecnología limpia de producción y una forma concreta de proteger el medio ambiente (Montañez et al., 2003)¹¹.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, es preciso adelantar una exhaustiva revisión de la literatura disponible en nuestro medio, de tal manera que nos permita disminuir el uso exagerado y arbitrario de fertilizantes químicos nitrogenados y conocer mejor las posibilidades de fijación simbiótica de Nitrógeno por leguminosas en el trópico, que contribuya a una producción armónica con el entorno.

⁷ Twornlow, S. 2004. Increasing the role of legumes in smallholder farming systems. The future challenge. En: Rachid Serraj (ed.) Symbiotic Nitrogen Fixation. Sci. Publ. Inc. USA. 382 pp.

⁸ Urzúa, H. 2000 a. Nutrición nitrogenada de arvejas y frejoles para uso fresco o agroindustrial en la Región Metropolitana. Informe Final, Proyecto FONDECYT 1980/582. Santiago. 45 pp.

⁹ Ibid., p. 273.

¹⁰ Primavesi, A. 1982. Manejo ecológico del suelo. La agricultura en regiones tropicales. Buenos Aires: El Ateneo. 499 p.

¹¹ Montañez, A., C. Labandera, and L. Solari. 2004. Fijación de nitrógeno a una escala nacional. LEIZA, Revista de Agroecología (Uruguay). 19:33

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Compilar y analizar literatura relacionada con la fijación biológica del Nitrógeno por simbiosis en leguminosas.

3.1.1 Objetivos específicos

Analizar la importancia del nitrógeno y su fijación simbiótica en la fertilidad de los suelos así como en la productividad de los cultivos

Describir las principales formas de fijación del nitrógeno atmosférico y utilización de este por los cultivos

Analizar el papel de las leguminosas en la fijación biológica del nitrógeno

Contrastar la vía fijación biológica y la aplicación química del nitrógeno y sus impactos sobre el ambiente

Concluir sobre las fortalezas, debilidades y posibilidades de investigación del tema propuesto.

4 MARCO TEORICO

4.1 IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO EN LA FERTILIDAD DE LOS SUELOS.

4.1.1 Definición de fertilidad de suelo. Según Bernal la fertilidad del suelo se define como:

La cualidad que este posee para suministrar los nutrientes apropiados, en cantidades adecuadas y balanceadas para el crecimiento normal de las plantas, cuando otros factores como la luz, temperatura, humedad y condiciones físicas son favorables. La fertilidad del suelo, puede dividirse en: a) fertilidad actual: la cual se define como el nivel inmediato de un nutriente disponible en el perfil agrícola, b) fertilidad potencial: la cual se refiere al nivel de materia orgánica y de allí al nivel de nitrógeno total, es decir, al nutriente en su forma global no disponible inmediatamente para las plantas¹²

Para Torres, la fertilidad de suelos en definiciones más modernas se incluye la rentabilidad y la sustentabilidad de los agro-ecosistemas. Además argumenta que:

La fertilidad de los suelos muchas veces se divide a la fertilidad en “química”, “física” y “biológica” para su abordaje particular, pero muchas veces resulta complicado separarlas.

La “*fertilidad química*” se refiere a la capacidad que tiene el suelo de proveer nutrientes esenciales a los cultivos. En este sentido, se evalúa la disponibilidad de nutrientes en el suelo a través de análisis de suelos y/o plantas a través de un proceso de diagnóstico y posteriormente se definen estrategias de fertilización.

La “*fertilidad física*” esta relacionada con la capacidad del suelo para brindar condiciones estructurales adecuadas para el sostén y crecimiento de los cultivos. Aspectos como la estructura, espacio poroso, retención hídrica, densidad aparente, resistencia a la penetración, entre otras.

La “*fertilidad biológica*” se vincula con los procesos biológicos del suelo, relacionados con sus organismos, en todas sus formas. Los organismos del suelo son imprescindibles para sostener diversos procesos del suelo. Posiblemente sea el área de conocimiento edafológico menos desarrollada, pero con algunos avances interesantes en los últimos años en lo que se refiere a estudios enzimáticos y ecología microbiana de suelos¹³

¹² BERNAL, Jorge. Pastos y forrajes tropicales. 3a ed. Bogotá, Colombia: Buda. 1994. p 66

¹³ TORRES, Mattín. ¿Qué es la Fertilidad del Suelo?: Fertilidad Física, Química y Biológica. [On line] 28/01/2008 [Citado Noviembre 26 de 2008], sp. Available from World Wide: <http://weblogs.madrimasd.org/universo/archive/2008/01/29/83481.aspx>

4.1.2 El nitrógeno. Según menciona Vidal: “El nitrógeno (N) es un elemento indispensable para la fotosíntesis, es decir, para que las plantas fijen el carbono del aire, acumulen materia seca y produzcan rendimientos económicamente atractivos. Sin embargo, el N es un nutriente casi universalmente deficiente por las pérdidas de este elemento causadas por el mal manejo a que han sido sometidos los suelos y por la agresión que se hace de sus reservas orgánicas”¹⁴.

Ello ocasiona que, en general, el N se deba agregar al suelo en grandes cantidades como fertilizante nitrogenado o abono orgánico, para satisfacer la demanda de los cultivos. Sólo una parte de este N adicionado puede ser usado por las plantas en el corto plazo, y el resto se escapa hacia estratos más profundos del suelo o hacia la atmósfera, siendo fuente de contaminación en ambos casos. La eficiencia de uso depende del tipo de agroecosistema, planta y fertilizante, así como de las prácticas de manejo. Cualquier esfuerzo que se haga para conservar el N adicionado y el nativo en la zona de máxima absorción de las raíces, contribuye a aumentar la eficiencia de uso del fertilizante nitrogenado, se traduce en ahorro para productores y causa menor daño al medio ambiente.

En este sentido, Rodríguez comenta que: “El suministro de N, que depende de la mineralización, está dado por dos componentes: a) el N mineral residual que corresponde al N mineral que permanece en el suelo o que fue mineralizado durante el período cosecha-siembra, y b) por el N que se mineraliza durante el período de cultivo, el cual se estima mediante el N potencialmente mineralizable con una tasa constante de mineralización (k)”¹⁵.

Es evidente entonces que el nitrógeno ocupa una posición única entre los elementos esenciales para el crecimiento de las plantas; ya que se requieren grandes cantidades en la producción de cosechas, es evidente también que la reserva principal de este elemento es la atmósfera, en donde se encuentra en forma de N², pero esta molécula no puede ser utilizada por la mayoría de los seres vivos (exceptuando algunas bacterias). Esas bacterias y algas cianofíticas que pueden usar el nitrógeno del aire juegan un papel muy importante en el ciclo de este elemento al fijar el nitrógeno, convierten el N² en otras formas químicas (nitratos y amonio) asimilables por la planta.

4.2 EL CICLO DEL NITRÓGENO

El ciclo del nitrógeno corresponde a un proceso cíclico natural en el curso del cual este elemento se incorpora al suelo y pasa a formar parte de los organismos vivos antes de regresar a la atmósfera. Al respecto Vidal sostiene que:

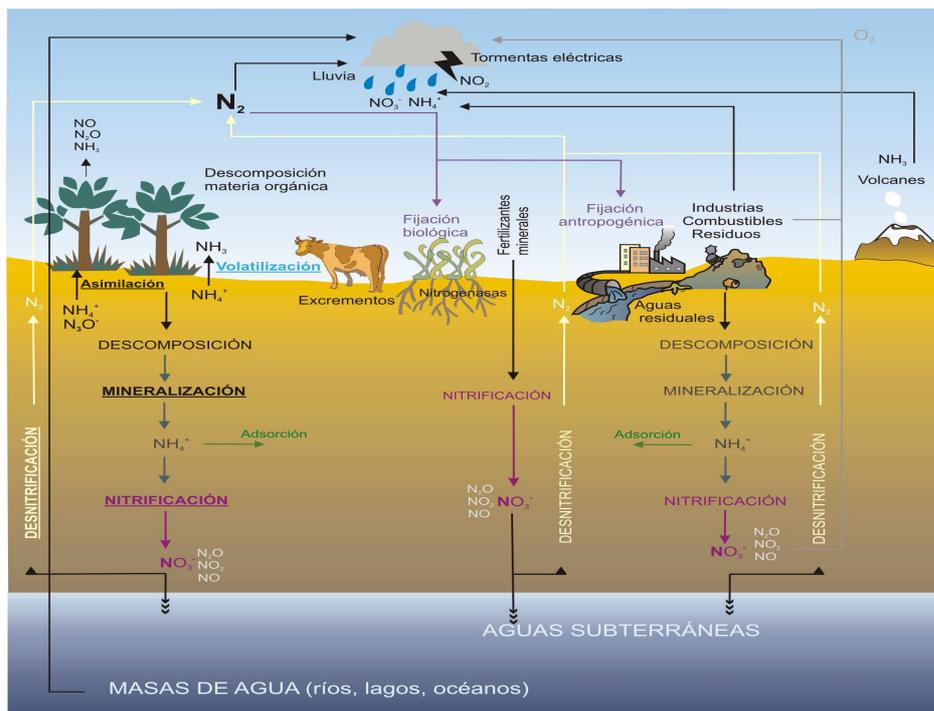
¹⁴ VIDAL, Ivan. Dinámica del nitrógeno bajo diferentes rotaciones, sistemas de labranza y manejo de residuos en el cultivo de trigo. [On line] [Citado Noviembre 26 de 2008] p1. Available from World Wide: <http://www.monografias.com/trabajos906/dinamica-nitrogeno-trigo/dinamica-nitrogeno-trigo.shtml>

¹⁵ RODRÍGUEZ, J. 1993. La fertilización de los cultivos. Un método racional. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía, Santiago, Chile. 237 p.

El nitrógeno, elemento básico de la vida, se encuentra en una proporción del 79% en la atmósfera, pero el nitrógeno gaseoso debe ser transformado en una forma químicamente utilizable antes de poder ser usado por los organismos vivos. Esto se logra a través del ciclo del nitrógeno, en el que el nitrógeno gaseoso es transformado en amoníaco o nitratos.

La energía aportada por los rayos solares y la radiación cósmica sirven para combinar el nitrógeno y el oxígeno gaseosos en nitratos, que son arrastrados a la superficie terrestre por las precipitaciones. La fijación biológica, responsable de la mayor parte del proceso de conversión del nitrógeno, se produce por la acción de bacterias libres fijadoras del nitrógeno, bacterias simbióticas (*Rhizobium radicicola*) que viven en las raíces de las plantas (sobre todo leguminosas y alisos), algas verde-azuladas, ciertos líquenes y epifitas de los bosques tropicales (Figura 1)

Figura 1 Ciclo del nitrógeno en la naturaleza



Fuente: Vidal, 2008

De lo anterior se deduce que, el nitrógeno se pierde por diferentes vías como la desnitrificación, lixiviación, erosión. Sin embargo, estas cantidades que dejan el sistema pueden ser reemplazadas por el proceso de fijación y otras fuentes de nitrógeno externas. Por otra parte, la influencia del hombre en el ciclo, puede contribuir a una disminución del nitrógeno, o que se produzca una sobrecarga en el sistema como sucede con los cultivos intensivos y la tala de bosques.

Desde este punto de vista, es importante destacar la importancia del conocimiento de cada una de las fases que hacen parte del ciclo del nitrógeno a fin de determinar cuales podrían considerarse puntos débiles y que deberían atacarse de forma puntual para evitar las pérdidas de nutrientes por mal manejo.

4.2.1 Fijación de nitrógeno atmosférico: Según menciona Rodríguez, Sevillano y Subramaniam: “Este proceso consiste en la reducción del nitrógeno presente en la atmósfera a compuestos nitrogenados, es decir, en combinar el nitrógeno atmosférico con hidrógeno para formar principalmente amoníaco, El N elemental se puede fijar de varias formas tal como se observa en el cuadro 1¹⁶”

Cuadro 1 Principales formas de fijación del Nitrógeno atmosférico.

Fijación N	Físico-química	Electroquímica		
		Fotoquímica		
	Biológica	Simbiótica	Nódulos	
			Rizosfera	
		No simbiótica	Bacterias anaerobias facultativas	
			Bacterias anaerobias estricto	
			Bacterias aerobias	<i>cianobacterias</i>
			bacterias microaerófilas	

Fuente: Rodríguez, Sevillano y Subramaniam, 2008

Es de importancia anotar que el término fijación incluye una fijación antropogénica, es decir, la realizada por actividades humanas (producción de energía, producción de fertilizantes y cultivos) que produce N “reactivo” (NO_x, NH_y y N orgánico)

Lo anterior es corroborado por Torres quien argumenta que aunque:

El término fijación normalmente se usa para definir la fijación de N por bacterias (fijación biológica), sin embargo, también incluye la fijación por transformaciones no biológicas (fijación físico-química) que incluyen las reacciones de tipo electroquímico (tormentas eléctricas) y fotoquímico (reacciones entre el ozono y el N₂ atmosférico para la fabricación de amoníaco y ácido nítrico).

La fijación del N desde el estado gaseoso a la forma orgánica se lleva a cabo biológicamente por microorganismos especializados que convierten el N² en otras formas químicas (amonio y nitratos) asimilables por las plantas. Este

¹⁶ RODRÍGUEZ, C., SEVILLANO, F y SUBRAMANIAM, P. La fijación de nitrógeno de atmosférico una biotecnología en la producción agraria. [On line] [Citado Diciembre 4 de 2008] p 13. Available from Word Wide:

http://www.ceresnet.com/ceresnet/esp/servicios/teleformacion/agroambiente/nitrogeno_atmosferico.pdf

proceso consiste en combinar el nitrógeno atmosférico con hidrógeno para formar amoníaco. *Rhizobium leguminosarum* es una bacteria simbiótica que se encuentra en unos nódulos que hay en las raíces de las leguminosas; parte del nitrógeno que fija lo cede a las plantas en forma de un componente soluble en el citoplasma celular.

En el caso de bacterias del suelo, como *Clostridium* y *Azotobacter*, el amoníaco queda fijado en él. La acción de los descomponedores sobre los cadáveres y los productos de desecho del metabolismo también enriquecen el suelo en amoníaco mediante un proceso que se denomina amonificación¹⁷.

Por su parte Burbano¹⁸ menciona que las bacterias (organismos procariontes) que llamamos fijadoras de nitrógeno pueden hacer la función de convertir el nitrógeno atmosférico en amonio gracias a la acción de una enzima llamada nitrogenasa. Algunas de estas bacterias viven en "vida libre", es decir, en ciertos nichos, pero no necesariamente asociadas con otro organismo, y otro grupo de bacterias, que pueden hacer esta función, únicamente la realizan cuando se asocian en simbiosis con alguna planta, por ejemplo, un género de bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno, llamado "*Rhizobium*".

Desde el punto de vista morfológico de los *Rhizobium* Somasegaran y Hoben afirman que:

Las *Rhizobiaceae* son una familia de bacterias (División Proteobacteria) en forma de bacilos, con pared celular de bajo porcentaje de peptidoglucano, característica que las incluye en el grupo de las bacterias Gram negativas, carecen de esporas, son aerobias y su tamaño oscila entre 0.5 a 0.9 x 1.2 a 3 μ . La mayoría de las cepas producen abundantes polisacáridos mucilaginosos extracelulares que van desde una goma acuosa a altamente densa, cuya composición varía con la cepa. Los Rhizobios sufren un cambio morfológico dentro de las células del nódulo para formar los bacteroides. Estas células son agrandadas, vacuoladas y en algunos casos claramente ramificadas, carecen de flagelos y quizá no son capaces de reproducirse. Los bacteroides están encerrados en membranas de origen de la planta huésped, a veces aislados y a veces en grupo, dependiendo de la especie. Al final de la vida activa del nódulo los bacteroides se desintegran.¹⁹

Por otra parte, la funcionalidad de este tipo de bacterias está en función de las condiciones del ambiente circundante, que corresponde a la rizósfera que es el medio donde las se multiplican y es en esta zona donde las raíces de las plantas liberan exudados como aminoácidos, azúcares y polisacáridos. Cabe destacar que dicho ambiente puede ser

¹⁷ TORRES, Mattín, Op. cit., sp.

¹⁸ Burbano, H. Op. cit., p. 213

¹⁹ SOMASEGARAN, P. Y H. J. HOBEN. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, New York, 450 pp.

influenciado positiva o negativamente por el manejo cultural aplicado al suelo, puesto que se podrían modificar las características de dinamismo y movilidad de sus elementos componentes.

Lo anterior es deducible a partir de las afirmaciones de Smit, *et al*, quienes argumentan que:

En dependencia de las condiciones del sustrato las bacterias son capaces de detectar las sustancias producidas por las raíces de las plantas y presentar quimiotaxis positiva o negativa. Algunos exudados de las raíces de las leguminosas conocidos como flavonoides, activan los genes encargados de la producción de factores de nodulación (Nod) en *Rhizobium*. Dentro de estas sustancias encontramos lipooligosacáridos (LOS) que generan una variedad de eventos en la planta como, encurvamiento del pelo radicular, división celular y secreción de inductores de genes nod adicionales e iniciación del hilo de infección²⁰.

4.2.2 Mineralización del Nitrógeno. En esta fase es importante destacar la importancia del manejo antrópico del recurso suelo si se hace referencia a los conceptos de sistemas de labranza y fertilización puesto que de estos depende en gran medida la potencial mineralización del nitrógeno, es decir, la planificación de las labores culturales en los cultivos con un concepto crítico y holístico puede redundar en un considerable beneficio económico y un invaluable beneficio ecológico.

Teóricamente Acosta y Moncayo²¹ manifiestan que la mineralización del Nitrógeno incluye dos procesos: amonificación y nitrificación. La primera consiste en la formación de compuestos amoniacales realizada por microorganismos heterótrofos, entre los que se encuentran bacterias y hongos. La segunda, es la oxidación del amonio (NH_4^+) a nitrato (NO_3^-), en dos etapas realizadas por dos tipos de microbios, que obtienen de ellas toda la energía que necesitan para su crecimiento. En la primera etapa de la nitrificación, las bacterias del nitrógeno del género *Nitrosomas* oxidan el amonio a nitrito según:



En la segunda etapa, bacterias del nitrógeno *Nitrobacter* convierten el nitrito en nitrato:
 $2\text{NO}_2^- + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{NO}_3^-$ nitrito nitrato

Adicionalmente, Rodríguez, Sevillano y Subramaniam sostienen que:

²⁰ SMIT, G., A. A. VANDERBAAN, J. M. KIJNE Y B. J. LUGTENBERG. 1986. The attachment mechanisms of *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 52: 362-363

²¹ ACOSTA, Wilmer. y MONCAYO, Oscar. Valor nutritivo del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hochst) bajo dos sistemas de labranza y fertilización orgánica y/o mineral en zona de ladera. Tesis Zoot. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, 2002. 213 p .

La velocidad de mineralización es un factor importante en la determinación de la fertilidad del suelo. Se calcula que, en general, del 1 al 3 por ciento del nitrógeno de la materia orgánica presente en un suelo agrícola se mineraliza en una estación, lo que indica una cierta resistencia del nitrógeno orgánico a la mineralización. Gran parte del amonio formado es retenido por minerales de la arcilla en el llamado complejo de cambio del suelo, donde podrá ser canjeado por otros cationes y entonces ser nitrificado o absorbido por las plantas, lo que puede ocurrir en suelos alcalinos²².

Por otra parte, el proceso opuesto a la mineralización se conoce como inmovilización. En ella, los microbios heterótrofos convierten, por amonificación, el nitrógeno orgánico, nitrógeno amoniacal, parte del cual es utilizado para su crecimiento, inmovilizándolo o haciéndolo no disponible para la alimentación de las plantas. En resumen, la cantidad de nitrógeno del suelo en forma asimilable por las plantas, y en ausencia de aportes nitrogenados externos, es función de la cantidad de nitrógeno orgánico de reserva en el mismo, y particularmente de los factores que afectan a su mineralización e inmovilización tal como mencionan Rodríguez, Sevillano y Subramaniam²³

De lo anterior se deduce que la productividad de un cultivo es factorial con una interacción fluida y dinámica entre diversos componentes. Si se habla por ejemplo de praderas naturalizadas como es el caso del Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) Acosta y Moncayo²⁴ realizaron un trabajo donde evaluaros el efecto de la aplicación de diferentes sistemas de labranza y fertilización sobre la productividad de una pradera del mencionado pasto, donde encontraron que los tratamientos donde se aplicó labranza mínima y fertilización orgánica mostraron conteos de poblaciones bacteriales de especificidad nitrificadora superiores a 200×10^3 microorganismos por gramo de suelo seco. Los menores promedios se encontraron en los tratamientos sin labranza y fertilización química con valores menores de 30×10^3 microorganismos por gramo de suelo seco.

Se observó un marcado efecto de la labranza y niveles de fertilización sobre esta variable, la interacción positiva ($P < 0.01$) entre estos dos factores, probablemente incrementó la población nitrificadora debido a los beneficios aportados por la aireación superficial y la incorporación de la materia orgánica al horizonte agrícola ya mencionados.

4.2.3 Nitrificación - desnitrificación. Al respecto Allen y Allen argumentan que:

La Nitrificación tiene lugar con rapidez en la mayoría de los suelos, constituyendo el nitrato la fuente de nitrógeno más importante para la mayoría de las plantas, donde enzimas nitrato-reductasas, lo convierten en amonio, que

²² RODRÍGUEZ, C., SEVILLANO, F y SUBRAMANIAM, P, Op. cit., p. 14.

²³ Ibid., p. 14.

²⁴ Acosta y Moncayo, Op. cit., p. 86

es utilizado en la síntesis de aminoácidos y proteínas. Hay que señalar que, a diferencia del amonio, el nitrato no es retenido fácilmente por el suelo, sino que es transportado por el frente acuoso en un proceso de lixiviación, de modo que si la pluviosidad es alta y el suelo es muy permeable, puede ser arrastrado a profundidades inaccesibles para las raíces. Este lavado de nitratos es un importante factor de pérdida de nitrógeno que puede ser del 50 por ciento, durante época lluviosa.

En otras circunstancias, cuando falta oxígeno, como ocurre por ejemplo en terrenos encharcados, algunas bacterias son capaces de respirar sustituyendo el oxígeno libre, del que no disponen en esas condiciones, por el nitrato o nitrito, formándose óxidos de nitrógeno y nitrógeno molecular, gases que escapan a la atmósfera en un proceso de desnitrificación o reducción no asimiladora de nitrógeno, o en contraposición con la reducción asimiladora efectuada por las nitrato reductasas de las plantas²⁵.

Araujo y Thot²⁶ por su parte afirman que la nitrificación es la oxidación microbiana del NH_4^+ y el nitrógeno orgánico en NO_2^- y NO_3^- . Se reconocen 2 clases de nitrificación: autotrófica y heterotrófica. La nitrificación quimioautotrófica es exclusivamente bacteriana y es llevada a cabo por bacterias litotróficas. Es un proceso predominante en suelos neutros a alcalinos y está inhibido por bajas concentraciones de acetileno. La nitrificación heterotrófica es llevada a cabo por diversas bacterias y hongos heterótrofos. Es un proceso dominante en suelos ácidos (suelos forestales) y no se ve inhibida por acetileno. En la nitrificación quimioautotrófica las bacterias que la llevan a cabo son quimioautótrofos Gram negativos. Su existencia se debe a la oxidación del NO_2^- o el NO_2^- para obtener NO_2^- y NO_3^- respectivamente. La fuente de energía es NH_4^+ o NO_2^- en lo que respecta al donador de electrones. Existen dos grupos nitrificantes:

Oxidantes de amonio NH_4^+ □ NO_2^- - prefijo nitroso. Ej. Nitrosoma, Nitrosalobus

Oxidantes de nitrito NO_2^- □ NO_3^- — prefijo nitro. Ej.: Nitrobacter, Nitrospina

De acuerdo a lo sustentado por los anteriores autores se deduce que los procesos de nitrificación – desnitrificación ocurren como consecuencia de las condiciones físicas del suelo, las cuales a su vez están influenciadas por los sistemas de laboreo y fertilización que pueden en un evento dado modificar sustancialmente las proporciones de los elementos componentes del sustrato suelo.

²⁵ ALLEN, O. N. and ALLEN, E. K. (1981): The leguminosae. MacMillan Publishers Ltda. London. 812 pp.

²⁶ ARAUJO, Carolina y TOTH, Sofía, “El Ciclo Del Nitrógeno: La Nitrificación” Universidad Nacional Del Comahue Escuela Superior De Salud Y Ambiente, [On line] [Citado Abril 18 de 2009] p. Available from Word Wide: http://essa.uncoma.edu.ar/academica/materias/microbiologia_ambiental/informes_seminarios_2006/2_la_nitrificacion.pdf

Desde este punto de vista, la productividad de un cultivo, ya sea que corresponda este a una pradera o cualquier otro, puede ser influenciada positiva o negativamente por las condiciones de nitrificación – desnitrificación puesto que esto se traduce en la utilización adecuada del nitrógeno por parte de los cultivos o su pérdida por lixiviación y/o volatilización siendo los factores ambientales los que regulan estos procesos.

En este sentido Acosta y Moncayo²⁷ encontraron que en cultivos de pradera de cobertura densa como es el caso del Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) el oxígeno es importante en la nitrificación ya que las bacterias nitrificantes quimioautotróficas son aerobios obligados. La nitrificación también se produce en suelos sumergidos en donde hay una difusión suficiente de oxígeno. Sin embargo, se ve limitada por la temperatura. Por debajo de 5°C y por encima de 40 °C la nitrificación es muy baja. Adicionalmente, el pH es un factor decisivo, puesto que la nitrificación es más rápida en suelos neutros que alcalinos y las bacterias nitrificantes son raras o inexistentes en suelos ácidos. Por debajo de pH 5 no se registra nitrificación en cultivos puros.

Es de anotar, que lo afirmado por Acosta y Moncayo no es un descubrimiento pues infinidad de autores concuerdan en estas afirmaciones, sin embargo, la importancia radica en que si propiciamos un ambiente adecuado para la normal actividad bacteriana en el suelo podemos potencializar positivamente la utilización del nitrógeno por el cultivo; por ejemplo la sola inclusión de árboles dentro de la pastura podría normalizar la temperatura de la rizósfera disminuyendo ostensiblemente los picos que afectan a los microorganismos encargados de la solubilización, no solo del Nitrógeno sino del fósforo y otros elementos indispensables para una adecuada productividad.

Por otra parte la nitrificación heterotrófica tal como menciona Harrison:

Es la formación de NO₂⁻ y NO₃⁻ a partir de NH₄⁺ y NO₂⁻ y nitrógeno orgánico por parte de los organismos heterótrofos. En algunos suelos la nitrificación heterotrófica constituye la mitad de la nitrificación. Éstos suelos suelen ser ácidos, donde la población autótrofa es baja. Los organismos heterótrofos nitrificantes suelen ser hongos o bacterias. Algunas bacterias son: *Arthrobacter*, *Aerobacter*, *Mycobacterium*. En comparación con la nitrificación autotrófica, la nitrificación heterotrófica no se ve afectada por el acetileno²⁸.

Hasta aquí se ha analizado el proceso de nitrificación, sin tener en cuenta los efectos perjudiciales de esta en la salud pública y el ambiente.

²⁷ Acosta y Moncayo., Op. cit., p.65.

²⁸ HARRISON, Arthur El Ciclo del Nitrógeno De Microbios y de Hombres, [On line] [Citado Abril 18 de 2009] sp. Available from Word Wide:
http://www.visionlearning.com/library/module_viewer.php?mid=98&l=s

En este sentido Gross²⁹ argumenta que la formación de nitratos que llegan a las aguas por lixiviación, esta íntimamente ligada con: la eutrofización, es decir, la abundancia en las aguas de un nutriente cuya concentración previa era escasa, el resultado es que las algas y las cianobacterias encuentran pocas restricciones para crecer y su posterior descomposición priva de oxígeno a peces y crustáceos reduciéndolos o eliminándolos; la metahemoglobinemia o enfermedad del niño azul, originada por grandes niveles de nitratos, ya que el pH de los intestinos de los niños favorece la producción de nitritos que envenena la hemoglobina, impidiendo que ésta acepte y transfiera oxígeno; el calentamiento global y la destrucción de la capa de ozono se ven favorecidos por la emanación de óxido nítrico y óxido nitroso en la nitrificación, así como también la formación del smog fotoquímico en presencia de luz solar y otros agentes contaminantes (solo por acción del óxido nítrico).

De otra parte, la lixiviación del nitrato en los suelos esta relacionada directamente con el tipo de suelo, el cual será el factor que acentúa las pérdidas o las reduzca en relación a algunas practicas culturales como por ejemplo el riego.

Debemos actuar de forma que la estructura no se dañe, ya que el buen funcionamiento de la actividad biológica depende de esta, debido a su relación con la circulación del aire como ya se ha mencionado. El laboreo del suelo, en periodos desfavorables es un agente destructor de esta, el sodio es un agente dispersor de los coloides del suelo, la acción del agua en muchos casos también es perjudicial, al formarse costras en ocasiones. Por lo tanto debemos evitar en cobertera el empleo de abonos sódicos. Por el contrario la aplicación de materia orgánica, y calcio al suelo son muy favorables para el mantenimiento de los agregados tal como lo menciona Gros³⁰.

Adicionalmente, es preciso anotar que la aplicación de fertilizantes nitrogenados de forma irracional además de las consecuencias desfavorables mencionadas produce un retraso en la maduración: la planta demasiado bien alimentada en nitrógeno continua desarrollándose, y tarda en madurar, lo que generalmente es un inconveniente, aumenta la sensibilidad a las enfermedades: los tejidos permanecen verdes y vulnerables mas tiempo.

Si mencionamos a los pastos de crecimiento erecto como los raigrases y avenas, las cañas son menos rígidas, el gran desarrollo foliar impide que la luz ilumine y fortalezca el pie de las plantas, por lo que los tallos tiende a tumbarse.

4.3 LAS LEGUMINOSAS EN LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO

Las plantas leguminosas juegan un papel importante en la agricultura sostenible en cuanto a su eficiente manejo de fertilizantes, mejoramiento del suelo y protección del agua ante la contaminación por fertilizantes químicos. Pueden producir su propio fertilizante

²⁹ GROS, Andre 1992 Abonos; guía practica de la fertilización. Mundi–Prensa. Madrid. Grabek M. 1993, 99 p.

³⁰ Ibid., p. 87

nitrogenado a través de la fijación simbiótica de nitrógeno en asociación con bacterias del suelo como ya se ha mencionado anteriormente y proveer nitrógeno libre a la tierra.

E Así mismo, por la relevancia de este tipo de plantas en la alimentación humana y animal, la investigación a nivel mundial sobre aspectos básicos y tecnológicos de su biología es intensa. Se utiliza metodología de frontera que involucran ciencias genómicas, genética molecular y biotecnología para conocer dichos sistemas biológicos e incidir en el mejoramiento de los cultivos tanto en su producción como en su calidad nutricional.

Desde este punto de vista, está fuera de toda duda el papel importante que las leguminosas juegan en el aprovechamiento de tierras marginales por sus menores requerimientos y en zonas donde la fertilización nitrogenada está limitada por motivos económicos. La fijación de nitrógeno proporciona una gran parte de las altas necesidades que tienen estas plantas por este elemento. Es evidente que se puede mejorar, pero en la asociación mutualista microbio-planta hay que contemplar ambos simbiosomas. Las plantas deben ser seleccionadas para producir altos rendimientos en circunstancias concretas con el mínimo de requerimientos. Las bacterias, por otra parte, deben ser las adecuadas para proporcionar el máximo de nitrógeno que permita el conjunto equilibrado del resto de nutrientes y, además de fijar nitrógeno en las condiciones exigidas, ser capaces de competir con las cepas naturalizadas, en el caso de que las hubiera, generalmente muy bien adaptadas al medio pero poco fijadoras.

En este sentido Redondo, Bonilla y Bolaños argumentan que:

A diferencia de las cianobacterias y las bacterias pertenecientes al género Frankia, las rizobiáceas no pueden generar un ambiente anaerobio o microaerobio en donde poder realizar la fijación de nitrógeno por si mismas. Para llevar a cabo el proceso estas bacterias han de encontrarse en las inmediaciones de plantas de la familia de las fabáceas e interactuar con las mismas, originando una serie de reacciones en la planta que desencadenarán la formación de un órgano mixto nuevo, el nódulo simbiótico, en el cual se proporciona un entorno controlado, así como los nutrientes necesarios para que la bacteria pueda efectuar el proceso de fijación.

Antes de llegar a la consecución del nódulo, tanto la planta como la bacteria han de seguir un protocolo, de tal manera que, si cualquiera de ellos incumple alguna de las condiciones establecidas, la formación del nódulo abortará. Dicho protocolo se puede resumir en:

- 1) Intercambio de señales de naturaleza química entre la planta y el microorganismo.
- 2) Activación del ciclo celular en células del córtex e iniciación del nuevo órgano en la planta.

- 3) Infección por parte de la bacteria, formación del canal de infección e invasión de los tejidos recién formados.
- 4) Diferenciación de la bacteria a forma especializada³¹.

4.3.1 Iniciación del nódulo. La señalización entre la planta y *Rhizobium* es decir el proceso bioquímico de comunicación entre la planta y el microorganismo se lleva a cabo en la zona de rizósfera; zona que según mencionan Sanchez *et al*:

Se puede definir como a la porción de suelo íntimamente asociada a las raíces de plantas en crecimiento con propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las del resto del suelo y con una estructura extraordinariamente compleja en la que inciden gran número de variables y en la que se establecen multitud de relaciones biológicas. De hecho, las características físico-químicas de dicha región hacen de ella un lugar muy adecuado para el crecimiento de microorganismos, de los cuales los más abundantes son las bacterias, en gran parte propiciado por la presencia de los exudados de la planta ricos, entre otros, en compuestos carbonados. Entre el 10% y el 30% de los fotosintatos de la planta son secretados en los exudados radiculares abarcando carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos y derivados fenólicos.

Entre dichos compuestos se encuentran los flavonoides (derivados del 2-fenil-1,4-benzopirona) cuya composición va a variar dependiendo de la especie, y que además de ser metabolizados, desencadenan una serie de respuestas específicas en los rizobios circundantes apropiados. Así, algunos de estos flavonoides a concentraciones nanomolar, provocan la quimiotaxis activa de los rizobios hacia la superficie radical. En cambio, estos mismos flavonoides a concentración micromolar, activan en *Rhizobium* a los genes responsables de la nodulación³².

Este tipo de comportamientos a nivel microscopio en el sustrato suelo ha sido estudiado también en profundidad por Redondo Bonilla y Bolaños³³ quienes afirman que cada *Rhizobium* expresa constitutivamente un grupo de factores de transcripción hélice-lazo-hélice de la familia LysR conocidos como NodD cuyo número y regulación va a depender de la especie de *Rhizobium*, así por ejemplo en *Sinorhizobium meliloti* hay tres copias de NodD, siendo dos de ellas, NodD1 y

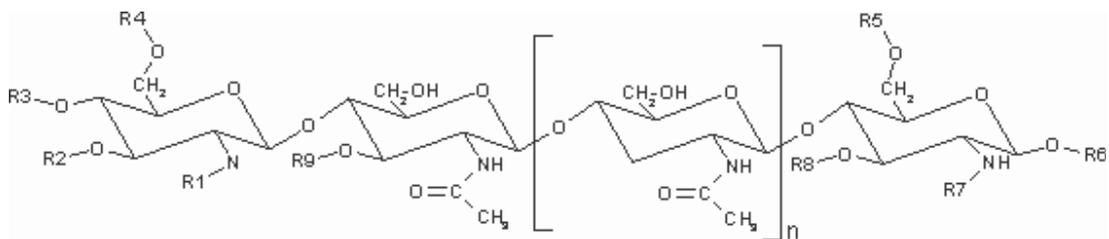
³¹ REDONDO, Miguel, BONILLA, Ildelfonso y BOLAÑOS, Luis. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas. [On line] [Citado Mayo 16 de 2009] sp. Available from Word Wide: www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/Investigacion/fijacionN_archivos/image017.jpg&imgrefurl

³² SÁNCHEZ, M., MARTÍN, M; VILLACIEROS, F; O’GARA, I; BONILLA, R and RIVILLA, R. 2002. Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* 184: 1587–1596.

³³ REDONDO, Miguel, BONILLA, Ildelfonso y BOLAÑOS, Luis, Op. cit., sp.

NodD2, activadas por flavonoides mientras que NodD3 es activada por SyrM (Symbiotic Regulator), homólogo de NodD que además de regular NodD3 induce la síntesis de exopolisacárido (EPS) independientemente de la presencia de flavonoides. NodD se encuentra normalmente unida a unas regiones de ADN de 49 pb conocidas como “nod boxes”, que se encuentran en las regiones promotoras de muchos genes implicados en la nodulación, sólo se produce la inducción de estos genes cuando NodD se une a sus activadores. Entre los genes activados por NodD se encuentran los genes nod, que codifican todo un paquete de enzimas encargadas de la producción de los factores Nod. Los factores Nod están compuestos por un esqueleto de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β-1,4 sintetizado por NodA, NodB y NodC, que presenta una serie de modificaciones dependiendo de la estirpe de *Rhizobium* y que van a otorgar de cierta especificidad al proceso de nodulación tal como se muestra en la Figura 2

Figura 2. Modelo esquemático de los factores Nod



Fuente Redondo, Bonilla y Bolaños, 2009

De otra parte la comunicación bioquímica se da también en la otra vía; es decir entre la bacteria en este caso *Rhizobium* y la planta; lo que al respecto Martínez *et al*³⁴ se refieren afirmando que:

La mera presencia de los factores Nod en concentraciones del orden 10^{-12} M es suficiente para que en la planta se produzca la deformación de los pelos radiculares, pero se necesitan niveles mayores, del orden de 10^{-7} a 10^{-9} M para provocar la formación de los pre-canales de infección, la división de las células corticales y la inducción de genes implicados en las fases previas a la nodulación, las nodulinas tempranas. Esta elevada sensibilidad a los factores

³⁴ MARTÍNEZ, GRANERO, F., S. CAPDEVILA, M. SÁNCHEZ-CONTRERAS, M. MARTÍN, AND R. RIVILLA. 2005. Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* 151:975–983.

Nod hace suponer que debe existir un mecanismo mediado por receptores aunque aún no se han podido ni determinar el número ni identificarlos, no obstante se han propuesto hipótesis:

- 1) Modelo de un único receptor: se propone la existencia de un único receptor cuya actividad va a venir dada por la estructura del factor Nod, el cual se integraría en la membrana celular de la planta a través del grupo acilo.
- 2) Modelo de dos receptores: con esta hipótesis se plantea la posible presencia de dos receptores, ambos necesarios para iniciar el proceso de nodulación. Uno de los receptores no posee una especificidad muy elevada en el reconocimiento de los factores Nod pero puede inducir la deformación del pelo radicular, la formación del primordio del canal de infección y la división de las células corticales aún en ausencia de la bacteria. El segundo receptor es más específico e induce la formación del canal de infección y del nódulo aunque siempre es necesaria la presencia de la bacteria. Este modelo actualmente es el que va cobrando más fuerza. Así se ha descubierto un posible receptor de factores Nod, que presenta una elevada homología a receptores tirosina quinasa, y que además presenta dominios de unión a otras proteínas. Una de estas proteínas podría ser una proteína G de membrana la cual también es necesaria para la percepción de los factores Nod

Así mismo Sanchez, *Et al* afirman que:

Uno de los primeros efectos que se observa tras la percepción del factor Nod en el pelo radicular es la entrada de Ca^{2+} al citoplasma. Ello conduce a la activación de ciertos canales aniónicos que originan la expulsión de Cl^- y por tanto la despolarización de la membrana del pelo. No se conocen los mecanismos que inducen la entrada de Ca^{2+} , aunque se ha propuesto que podría estar mediado por proteínas G y mantenido por canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje. Esta entrada de Ca^{2+} , además de servir como mensajero para la inducción de genes y activación de proteínas implicadas en la nodulación, induce una reorganización del citoesqueleto, que contribuye a la deformación del pelo radicular hasta llegar a una forma característica del fenómeno de la nodulación, el “cayado del pastor” (Shepherd’s crook en inglés). Esta estructura generará una pequeña cavidad en donde la bacteria puede crecer y prosperar³⁵.

4.3.2 Invasión y formación del canal de infección. La unión de las bacterias a la superficie de la raíz es un paso preliminar muy importante que precede a la invasión. Después de esto según mencionan Martínez *Et al*:

Fibrillas de celulosa producida por la bacteria pueden ayudar a enredar al rizobio en la superficie mucilaginosa de la raíz, proceso reforzado por la presencia de proteínas dependientes de Ca^{2+} , ricadhesinas, producidas por la

³⁵ SANCHEZ, *Et al*, Op.cit., p. 1102.

bacteria. Es por ello que los polisacáridos y proteínas producidos por *Rhizobium* pueden jugar un papel importante en la interacción física entre la planta y la bacteria. Así, mutantes que carecen de EPS ni invaden ni forman canales de infección. Aunque aún no se conoce el papel específico del eps en los prolegómenos de la relación entre la planta y la bacteria, sí se ha hipotetizado sobre dichas funciones. Entre otras, el eps podría enmascarar la superficie bacteriana para evitar el desencadenamiento de una respuesta de defensa por parte de la planta, encapsular a la bacteria contra el estrés fisiológico que existe en el canal de infección, identificar a la bacteria ante el receptor de la planta adecuado.

Otro factor a considerar es el hecho de que esta matriz extracelular puede formar una estructura gelatinosa en presencia de iones de calcio. Dicha capacidad podría servir para retirar los iones de Ca^{2+} presentes en el entorno de la pared vegetal, que normalmente son utilizados para estabilizar y organizar a las pectinas recién sintetizadas y, por tanto, debilita esa zona de la pared habilitando así un lugar propicio para la infección. Además, la presencia de un gel de naturaleza tan rígida puede servir a la bacteria como punto de apoyo para entrar en el pelo aprovechando la presión que ejercen las sucesivas divisiones de la bacteria. De este modo se origina una invaginación de la membrana del pelo por la cual las bacterias infectan a la planta³⁶.

4.4 INOCULACIÓN DE LAS PLANTAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

Las especies que integran la familia de las leguminosas, árboles y arbustos fijadores de nitrógeno, tienen una gran avidez por este elemento el cual es fundamental para su desarrollo y es además un integrante indispensable en la formación de proteínas, es escaso en determinados suelos. Sin embargo, el buen funcionamiento de la simbiosis rizobio-leguminosa disminuye el consumo de N del suelo manteniendo su fertilidad para lo cual el proceso de inoculación debe realizarse con el mayor esmero y criterio profesional.

4.4.1 Inoculación – simbiosis. Según afirma Peticari la inoculación se puede definir como:

La tecnología desarrollada con la finalidad de incorporar rizobios altamente infectivos y altamente eficientes en las leguminosas de interés agropecuario. El proceso productivo comienza con una exhaustiva selección de las cepas de rizobios contemplando infectividad y efectividad en laboratorio, invernáculo y campo. Las cepas más eficientes son aquellas que tienen mayor cantidad de nódulos medianos y grandes, arracimados y/o palmados siendo rojos en su interior, ubicados en raíz primaria y tienen rápida y prolongada fijación. Acompañada por una mayor producción de materia seca y de peso total de N

³⁶ MARTINEZ, *Et al.* Op.cit. p. 76.

En cambio las rizobios menos eficientes tienen nódulos más pequeños, ubicados en raíces secundarias y tienden a paralizar la FBN en etapas más tempranas presentando en esos casos nódulos de coloración verde. Los biotipos ineficientes tienen nódulos pequeños, alargados y son en su interior blancos desde etapas muy tempranas. Estos no realizan la FBN y son consideradas cepas parásitas.

Finalmente se cultiva la cepa deseada en fermentadores a fin de incrementar su número. Con este caldo se procede a la obtención de diferentes tipos de formulados. Estos productos llamados inoculantes en el caso de alfalfa pueden presentarse como pulverulentos. Entre los pulverulentos tenemos con soporte turba, dolomita o arcilla, etc.

Cuadro 1. Grupos de inoculación cruzada y asociaciones de rhizobium – leguminosa

Grupo de Inoculación cruzada	Especies de Rhizobium	Género hospedero	Leguminosa incluida
Grupo de alfalfa	R. meliloti	Medicago Melilotus Trigonella	Alfalfa Trebol dulce Alholva
Grupo del trebol	R. leguminosarum biovar trifolii	Trifolium	Trebol
Grupo del Chícharo	R. leguminosarum biovar vicia	Pisum Vicia Canthyrus Lens	Chícharo Haba Almorta Lenteja
Grupo del frijol	R. leguminosarum biovar phaseoli hoy R etli	Phaseolus	Frijol
Grupo de la soya	Bradyrhizobium Japonicum	Glycine	Soya
Grupo del caupí	Bradyrhizobium ssp	Lupinus Arachis Vigna	Altramuz Cacahuete Caupí

Fuente: Tamez y Peña-Cabriales, 1989

El método empleado para agregar el inoculante deben permitir que todas las semillas sean inoculadas de manera tal que por lo menos un 80 % de las plantas nacidas sean noduladas con 3 o más nódulos sobre la parte superior de las raíces, luego de 25 días de sembradas³⁷.

4.4.2 Inoculación convencional. De acuerdo con Racca *Et al*³⁸, para esto se procede impregnando el inoculante sobre la semilla a tratar según lo indicado por el fabricante. El método húmedo o en pasta es el más recomendable, para ello previamente se prepara una pasta mezclando el inoculante con agua azucarada al 10% o con el agregado de adhesivo provisto por el fabricante. Esto debe realizarse a la sombra, evitando la exposición a la luz, el contacto con fertilizantes ácidos como superfosfato triple y aplicando productos curasemillas compatibles con los rizobios.

Este sistema no asegura una alta supervivencia de los rizobios por la tanto la semilla debe ser sembrada inmediatamente a la aplicación. Tampoco protege a las rizobios en suelos ácidos, situación relativamente frecuente en siembras de alfalfa, cuyo rizobio es el más sensible a la acidez.

4.4.3 Peletización. Peticari describe esta tecnología como:

Un proceso que permite extender el período de supervivencia de los rizobios sobre la semilla y por otra parte adecua al medio ambiente que rodea la semilla logrando una mejor implantación de la pradera. Entre las ventajas podemos mencionar una mayor protección en suelos ácidos y en condiciones de deficiencia hídrica en el momento de la siembra, evitando la germinación hasta que los niveles de humedad no se eleven a valores cercanos a capacidad de campo.

Los materiales que contemplan son a) semilla, b) Inoculante, c) Adhesivo y d) Polvo de recubrimiento y si fuese necesario curasemillas compatibles. Entre los adhesivos que pueden utilizarse puede mencionar la goma arábica, los derivados de carboximetilcelulosa, etc. que preparados no dañen al rizobio, es decir no sean diluidos con agua clorada y con el pH ajustado entre 6,5 a 7,5. El carbonato de calcio extra liviano y precipitado es un buen ejemplo de polvo de recubrimiento recomendable. En un primer paso se agrega mezcla del inoculante con el adhesivo sobre la semilla y posteriormente se agrega polvo de recubrimiento tratando de no superar en ningún caso el 30% del peso de la semilla (no más de 300 g de polvo por kg de semilla).

³⁷ PERTICARI, Alejandro. Pasturas de alfalfa: importancia de una adecuada inoculación. IMYZA- CICVyA - INTA Castelar. [On line] [Citado Mayo 16 de 2009] p.1 . Available from Word Wide: http://www.ipcva.com.ar/files/Pasturas%20de%20alfalfa%20-%20importancia%20de%20una%20adecuada%20inocul_.doc

³⁸ RACCA, R; COLLINO, D; DARDANELLI, J; BASIGALUP, D; GONZÁLES, N; BREZONI, E; HEIN, N. Y M. BALZARINI. 2001. Contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la nutrición nitrogenada de alfalfa en la región pampeana. Ediciones INTA 56 pág.

Para obtener el mejor provecho de este sistema se requiere el empleo de materiales de alta calidad y rigurosidad en el protocolo y sobremanera evitar las combinaciones indeseables que provoquen una falla parcial o total del procedimiento. Entre las fallas más comunes se encuentra el exceso de polvo de recubrimiento, adhesivo mal preparado, la excesiva pildorización que atenta incluso con la germinación de la semilla, dado que esta última necesita respirar. Una buena peletización puede almacenarse desde poco días hasta un mes según calidad final del pellet y el polvo usado.

4.4.4 Limitaciones de la simbiosis. El sistema simbiótico requiere que no haya condicionantes por exceso o por defecto para el desarrollo normal del cultivo. Uno de los factores que limitan la fijación de nitrógeno es la presencia de formas combinadas de nitrógeno en el suelo.

Al respecto Peticari argumenta que: “Los suelos fértiles con moderada o alta disponibilidad de formas inorgánicas de N en el momento de la siembra y/o importantes tasas de mineralización durante el ciclo del cultivo afectan al establecimiento de la simbiosis ya que retardan el inicio de la nodulación y/o inhiben el funcionamiento del sistema fijador³⁹”

Martinez *Et al*, por su parte sostienen que

Altas concentraciones de nitratos inhiben el proceso de infección, el desarrollo de los nódulos y la expresión de la actividad nitrogenasa. Hay evidencia de que cuando la relación C/N es baja el limitado suplemento de C al nódulo retrasa la FBN. Para la planta, es más económico tomar N del suelo y/o de fertilizante que de la FBN. A mayor presencia de N en el suelo menores posibilidades hay para la FBN y a la inversa a menor presencia de N del suelo hay más N de la FBN. Al limitarse la FBN, el balance de N del suelo resulta negativo en extremo, porque convierte a la soja como expoliadora más que restauradora de la fertilidad del suelo. Las carencias de P, K, Ca, S y de micronutrientes disminuyen la formación de nódulos y por consiguiente la FBN⁴⁰.

Es necesario mencionar que el proceso de agriculturización en la región alto andina de Nariño, caracterizada por sus zonas de ladera ha provocado continuadas modificaciones físicas, con procesos erosivos y pérdida de materia orgánica, lo que hace extremadamente necesaria la implementación de practicas de fertilización no convencionales, entre ellas la FBN. Dadas estas condiciones de suelo es de anotar que la simbiosis es sensible a condiciones de anegamiento, con sólo 2-3 días de inundación se puede provocar una alta mortandad de nódulos. La compactación es una de las limitaciones más frecuentes

³⁹ Peticari, Op. cit., p. 43.

⁴⁰ Martinez, *Et al*. Op. cit. P. 954.

observadas para el cultivo de alfalfa y como consecuencia también son bajos los aportes de la simbiosis por menor cantidad y menor tamaño de nódulos.

En este orden de ideas Racca *Et al* argumentan que

En suelos ácidos, se ha observado que la respuesta a la inoculación es baja debido a diferentes factores incluyendo entre estos la limitada sobrevivencia de *S. meliloti* y restricciones para la asociación simbiótica rizobio-alfalfa bajo acidez. Los efectos del estrés hídrico son directos sobre la nodulación y la FBN: Las siembras en condiciones secas provocan la mortandad de bacterias y disminuyen la posibilidad de lograr una nodulación apropiada; la falta de agua en etapas tempranas retrasa la aparición de los nódulos y la falta de agua en etapas reproductivas limita la FBN, restringiendo los rendimientos por menor aporte de N para la formación de granos.

Con temperaturas bajas se retrasa el proceso de infección y la nodulación. No todas las cepas de rizobios toleran temperaturas superiores a los 40°C. La salinidad y la falta de aireación en el suelo también influyen en forma negativa sobre la simbiosis⁴¹.

4.5 PRODUCTIVIDAD VIA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

4.5.1 Asociación gramíneas – leguminosas. Como se ha anotado anteriormente, leguminosas arbustivas forrajeras adquieren una importancia relevante debido a su particular biología respecto a la utilización del nitrógeno atmosférico. Parte de ese nitrógeno puede ser transferido a la gramínea acompañante, aunque la proporción de esa transferencia puede ser influenciada por muchos factores: especie, condiciones edafoclimáticas, densidad de siembra, etc.

En este orden de ideas, se han realizado experimentos con asociaciones de gramíneas y leguminosas arbustivas donde se han encontrado aumentos en la cantidad de biomasa y mejoras en la calidad de la gramínea tal como lo mencionan Escobar *et al*⁴², elevando significativamente la productividad por unidad de superficie, razón por la cual se asume que la leguminosa está siendo determinante en la asociación y que la fijación y transferencia de nitrógeno a la gramínea acompañante es considerable.

Por otra parte, de acuerdo con Bohlool *et al.*: “Se sabe que la fertilización no sólo aumenta considerablemente los costos de producción, sino que también puede causar problemas de contaminación ambiental. En este sentido, la asociación de leguminosas arbustivas y gramíneas en los potreros, resultaría en una disminución del uso de fertilizantes químicos,

⁴¹ Racca, *Et al.* Op. cit., p. 17

⁴² ESCOBAR, A., J. DE COMBILLAS, A. OJEDA y E. ROMERO. 1995. El Mata Ratón (*Gliricidia sepium*). Su integración a los sistemas de alimentación de rumiantes. Convenio Universidad Central de Venezuela Fundación Polar. Informe Proyecto. pp.32-43.

mantenimiento del equilibrio ecológico, disminución de la contaminación y aporte de fuentes alimenticias a las explotaciones ganaderas”⁴³.

De lo anterior se deduce que la reducción de los costos de producción mediante la implementación de estas prácticas debe ser significativo, y esto es evidente únicamente en el momento de medir la productividad de una pradera entendiéndose como productividad las unidades obtenidas de una producción animal en particular por unidad de área de terreno dedicada al cultivo de pastos cualquiera que sea su propósito.

De hecho en algunos estudios se han reportado resultados interesantes en este aspecto tal es el caso de Campillo, Urquiaga y Pino quienes en una investigación sobre fijación biológica de nitrógeno en trébol blanco mediante técnicas isotópicas del ^{15}N , en un suelo derivado de cenizas volcánicas encontraron que las producciones acumuladas de MS de la pradera combinada con la leguminosa fueron superiores ($P < 0,05$) a las especies creciendo en monocultivo. Es interesante destacar que las producciones del trébol blanco de la mezcla siempre fueron mayores que las producciones de gramínea perenne, aunque estas diferencias no siempre fueron significativas⁴⁴.

Como el caso expuesto existen innumerables investigaciones donde se muestra las bondades de la inclusión de leguminosas en los cultivos como elementos acompañantes, con lo cual no solamente se mejora ostensiblemente la productividad de la pradera sino también la composición botánica y valor nutritivo de la mezcla.

Teniendo en cuenta lo anterior la apropiación de los conceptos en especial a nivel de los pequeños productores que caracterizan nuestra zona de trópico de altura donde la disponibilidad de pasturas es limitada, debe encaminarse en lo posible a la adopción de medidas estratégicas de manejo para este tipo de alternativas.

En este sentido, Rodríguez, Sevillano y Subramaniam mencionan que:

En teoría, se obtiene mayor beneficio para el suelo cuando el cultivo de leguminosas se hace con fines de conseguir abono verde, enterrándolo al final de la estación de crecimiento. Aproximadamente los dos tercios del nitrógeno total se encuentran en la parte aérea de la planta, de forma que si ésta se retira como heno, por pastoreo, o por cosecha de la semilla, redundará en perjuicio del suelo disminuyendo la cantidad de nitrógeno que va a parar a él. La práctica de abonado en verde está particularmente extendida en las regiones

⁴³ BOHLOOL, B., J. LADHA, D. GARRITY Y T. GEORGE.1992. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. *Plant and Soil*, 141: 1-11.

⁴⁴ CAMPILLO R, Ricardo, URQUIAGA C, Segundo y PINO N, Inés. Fijación biológica de nitrógeno en trébol blanco mediante técnicas isotópicas del ^{15}N , en un suelo derivado de cenizas volcánicas. *R.C. Suelo Nutr. Veg.* [online]. jun. 2002, vol.2, no.1 [citado 12 Junio 2009], p.25-34. Disponible en la World Wide Web: http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-27912002000100004&lng=es&nrm=iso

tropicales y subtropicales, zonas donde la posibilidad de crecer plantas en cualquier época del año facilita la introducción de abonos verdes en el intervalo que existe entre los cultivos más importantes, tales como arroz, caña de azúcar y otros, si bien en regiones con estaciones de crecimiento cortas puede darse también esta práctica, siendo un ejemplo el uso del lupino en la recuperación de suelos arenosos para la agricultura en Holanda⁴⁵.

Así mismo, Allen y Allen argumentan que:

El tiempo que media desde el enterrado de la leguminosa hasta la siembra del cultivo principal es un factor crítico, pues ha de transcurrir un período de tiempo suficiente para la descomposición del abono verde, pero no excesivo, para evitar que haya pérdidas por drenaje. El estado de madurez en que se encuentra la leguminosa en el momento de enterrarla constituye otro factor importante en el aumento de la fertilidad del suelo⁴⁶.

En el caso particular de nuestra región en el empleo de mezcla de gramíneas y leguminosas para la alimentación animal se debe elegir una que tenga calidad nutritiva aceptable, y que sea capaz de persistir y regenerarse aun cuando el pastoreo sea intensivo. Alfalfa, vezas y tréboles, entre otras, poseen esas propiedades, así como algunas gramíneas, por lo que las asociaciones gramínea-leguminosa son muy utilizadas para pastos, proporcionando no sólo un alto nivel de compuestos nitrogenados sino también un aumento de la digestibilidad e ingestibilidad de la mezcla para el animal.

Desde este punto de vista Rodríguez, Sevillano, y Subramaniam⁴⁷ encontraron que con mezcla de gramínea-leguminosa al 30 por ciento, y con un abonado de fondo de 100Kg/N por ha/año se obtuvo una media de 18.000 Kg. de materia seca (90.000 Kg. De forraje verde por año). Si se tienen en cuenta que una vaca necesita consumir al día una cantidad equivalente al 2 por ciento de su peso en forma de materia seca de buen pasto, tendremos que una vaca de 500Kg., necesita de 10 Kg. diarios para estar bien alimentada.

En consecuencia, tenemos que una Ha. de gramíneas-leguminosa al 30 por ciento puede alimentar casi 5 vacas perfectamente durante todo el año. Por el contrario, en otro experimento con gramíneas en suelo de idénticas características a las del anterior, para obtener aproximadamente la misma cantidad de Kg. de materia seca se tuvo que abonar con 150 unidades de nitrógeno por ha/año. Y a esto hay que añadir la peor calidad que este alimento tiene para el ganado, ya que el heno de gramíneas es más fibroso y contiene menos proteínas digestibles por lo que hay que complementar con algún pienso como por ejemplo algarrobas, vezas, soja, etc.

⁴⁵ RODRÍGUEZ, Barrueco; SEVILLANO, García; SUBRAMANIAM, P. 1984. La fijación de nitrógeno atmosférico una biotecnología en la producción agraria. Instituto de recursos naturales y agrobiología. temas de divulgación. 1ª edición. Salamanca, España. 659 p.

⁴⁶ ALLEN, O. N. and ALLEN, E. K. 1981 The leguminosae. MacMillan Publishers Ltda. London. 812 pp.

⁴⁷ RODRÍGUEZ, Barrueco; SEVILLANO, García; SUBRAMANIAM, P, Op. cit., p 54.

4.6 PERSPECTIVAS FUTURAS DE LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO

No cabe duda de que la fijación biológica de nitrógeno puede y debe ser explotada más eficientemente. Las perspectivas, a corto plazo, incluyen la expansión del uso de las simbiosis existentes, el estudio de las más conocidas, y la búsqueda de nuevas; a medio plazo, la mejora de la eficacia de los sistemas simbióticos conocidos, y a largo plazo, el desarrollo de nuevos sistemas fijadores.

En este orden de ideas Bond menciona que:

El aumento de la eficiencia de los sistemas fijadores depende en muchos casos de las condiciones de cultivo y de las plantas utilizadas, por lo que la selección de variedades adecuadas y una práctica agrícola conveniente pueden aumentar sensiblemente los rendimientos. Así, en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, aparte de la selección de razas de *Rhizobium* puede seleccionarse la planta con vistas a obtener cultivares que den lugar a simbiosis más efectivas, práctica que promete ser muy fructífera y que muchas veces se ha olvidado con las leguminosas.

Actualmente se realizan numerosos estudios sobre la fisiología de la fijación simbiótica y la influencia ambiental, tratando de encontrar la combinación bacteria- leguminosa más adaptada a una situación ambiental concreta, así como el manejo óptimo del cultivo, poniendo énfasis en la resistencia a temperaturas extremas, sequía, salinidad y en la influencia de la fertilización nitrogenada y aplicación de productos fitosanitarios. Pero es sin duda la utilización de la más moderna y sofisticada técnica, como es la ingeniería genética, lo que ha despertado las mayores expectativas y la que ofrece más interés en la presente biotecnología, en gran parte debido a su novedad y a sus posibilidades casi ilimitadas⁴⁸.

Sabemos que las instrucciones contenidas en el programa genético de un organismo pueden alterarse de forma natural en determinadas condiciones, y que estas alteraciones pueden ser forzadas por el hombre por medio de la manipulación genética. De hecho, los métodos genéticos han sido utilizados desde los primeros tiempos de la agricultura, representados por la selección empírica de plantas a fin de obtener variedades más productivas, pero es a partir de los años 70 cuando con la aparición de las técnicas de ingeniería genética, como la del ADN recombinante, se abren posibilidades espectaculares.

La propia naturaleza del material genético, universalmente único, permite, mediante su manipulación, el desarrollo de proyectos con unos objetivos de gran interés aplicado, como son la alteración de los genes de una forma específica y predeterminada o la transferencia de genes de interés de unos organismos a otros, adicionándolos o sustituyendo parte de su dotación genética. De este modo puede lograrse un incremento de la eficacia de la fijación de nitrógeno.

⁴⁸ BOND, G. 1977 Some reflections on Ainus-type root nodules. In: Recent developments in Nitrogen-Fixation. Ed. W. E. Newton, J. R. Postgate and C. Rodríguez-Barrueco. Academic Press. London. 622 pp.

5 CONCLUSIONES

La fijación biológica del nitrógeno (FBN) se constituye como el principal mecanismo de aporte de nitrógeno en los ecosistemas naturales, adicionalmente, como el N_2 es el elemento más fácilmente perdido cuando la mineralización de la materia orgánica del suelo es estimulada por el arado del suelo, es frecuente que este elemento controle la materia orgánica del suelo y, por lo tanto, su fertilidad.

Esta revisión reconoce el papel de la FBN como una manera más efectiva, menos cara y no contaminante, para mejorar la fertilidad del suelo comparada con otras vías (como la fertilización química y la orgánica), las cuales presentan altos niveles de contaminación con metales pesados, sales nitrogenadas y microorganismos patógenos para el hombre.

La capacidad fijadora de N_2 de *Rhizobium* en asociación con las leguminosas es importante en los sistemas agrícolas de producción y especialmente en la rotación de cultivos, por lo cual es conveniente favorecer su aplicación generalizada, ya que la inoculación es una opción natural, que no contamina el ambiente y favorece la conservación del suelo. Por tanto el manejo adecuado de la tecnología de inoculantes a base de *Rhizobium* puede, por lo menos asegurar el rendimiento de las leguminosas de manera ecológica.

Para numerosos campesinos pobres la FBN es una opción viable y económica o una solución complementaria a los fertilizantes nitrogenados industriales, sin embargo se hace necesario una transferencia adecuada de tecnología la cual les permita una apropiación del conocimiento en este campo y la utilización eficiente de esta opción

La mayor parte de las ciencias aplicadas de FBN tienen posibilidades de generar beneficios ambientales mundiales al reducir las emisiones de gases que producen el efecto invernadero y la contaminación del agua, proteger la biodiversidad y promover una utilización más sostenible de las tierras agrícolas". Al contribuir a que haya una mejor cubierta vegetal de los suelos y a la acumulación de la materia orgánica de los mismos.

Incluir leguminosas que fijan el nitrógeno en los sistemas agrícolas podría reportarle importantes beneficios a los pequeños agricultores: incremento de la producción, mejores medios de sustento y mayor seguridad alimentaria. Los cultivos mixtos y la rotación de cultivos con leguminosas además reducen los riesgos de plagas y enfermedades, e incrementan la sostenibilidad del ecosistema.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, Wilmer. y MONCAYO, Oscar. Valor nutritivo del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst) bajo dos sistemas de labranza y fertilización orgánica y/o mineral en zona de ladera. Tesis Zoot. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, 2002. 213 p .

ALLEN, O. N. and ALLEN, E. K. 1981 *The leguminosae*. MacMillan Publishers Ltda. London. 812 pp.

ARAUJO, Carolina y TOTH, Sofía, “El Ciclo Del Nitrógeno: La Nitrificación” Universidad Nacional Del Comahue Escuela Superior De Salud Y Ambiente, [On line] [Citado Abril 18 de 2009] p. Available from Word Wide: http://essa.uncoma.edu.ar/academica/materias/microbiologia_ambiental/informes_seminarios_2006/2_la_nitrificacion.pdf

BERNAL, Jorge. Pastos y forrajes tropicales. 3a ed. Bogotá, Colombia: Buda. 1994. 569 p.

BOHLOOL, B., J. LADHA, D. GARRITY Y T. GEORGE.1992. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. *Plant and Soil*, 141: 1-11.

BOND, G. 1977 Some reflections on Ainus-type root nodules. In: *Recent developments in Nitrogen-Fixation*. Ed. W. E. Newton, J. R. Postgate and C. Rodríguez-Barrueco. Academic Press. London. 622 pp.

CAMPILLO R, Ricardo, URQUIAGA C, Segundo y PINO N, Inés. Fijación biológica de nitrógeno en trébol blanco mediante técnicas isotópicas del ^{15}N , en un suelo derivado de cenizas volcánicas. *R.C. Suelo Nutr. Veg.* [online]. jun. 2002, vol.2, no.1 [citado 12 Junio 2009], p.25-34. Disponible en la World Wide Web: http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-27912002000100004&lng=es&nrm=iso

ESCOBAR, A., J. DE COMBILLAS, A. OJEDA y E. ROMERO. 1995. El Mata Ratón (*Gliricidia sepium*). Su integración a los sistemas de alimentación de rumiantes. Convenio Universidad Central de Venezuela Fundación Polar. Informe Proyecto. pp.32-43.

GROS, Andre 1992 *Abonos; guía practica de la fertilización*. Mundi–Prensa. Madrid. Grabek M. 1993, 99 p.

HARRISON, Arthur El Ciclo del Nitrógeno De Microbios y de Hombres, [On line] [Citado Abril 18 de 2009] sp. Available from Word Wide: http://www.visionlearning.com/library/module_viewer.php?mid=98&l=s

MARTÍNEZ, GRANERO, F., S. CAPDEVILA, M. SÁNCHEZ-CONTRERAS, M. MARTÍN, AND R. RIVILLA. 2005. Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* 151:975–983.

PERTICARI, Alejandro. Pasturas de alfalfa: importancia de una adecuada inoculación. IMYZA- CICVyA - INTA Castelar. [On line] [Citado Mayo 16 de 2009] p.1 . Available from Word Wide: http://www.ipcva.com.ar/files/Pasturas%20de%20alfalfa%20-%20importancia%20de%20una%20adecuada%20inocul_.doc

RACCA, R; COLLINO, D; DARDANELLI, J; BASIGALUP, D; GONZÁLES, N; BRENZONI, E; HEIN, N. Y M. BALZARINI. 2001. Contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la nutrición nitrogenada de alfalfa en la región pampeana. Ediciones INTA 56 pág.

REDONDO, Miguel, BONILLA, Ildefonso y BOLAÑOS, Luis. Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas. [On line] [Citado Mayo 16 de 2009] sp. Available from Word Wide: www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/Investigacion/fijacionN_archivos/image017.jpg&imgrefurl

RODRÍGUEZ, J. 1993. La fertilización de los cultivos. Un método racional. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía, Santiago, Chile. 237 p.

RODRÍGUEZ, C., SEVILLANO, F y SUBRAMANIAM, P. La fijación de nitrógeno de atmosférico una biotecnología en la producción agraria. [On line] [Citado Diciembre 4 de 2008] p 13. Available from Word Wide: http://www.ceresnet.com/ceresnet/esp/servicios/teleformacion/agroambiente/nitrogeno_atmosferico.pdf

SÁNCHEZ, M., MARTÍN, M; VILLACIEROS, F; O’GARA, I; BONILLA, R and RIVILLA, R. 2002. Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *J. Bacteriol.* 184: 1587–1596

SMIT, G., A. A. VANDERBAAN, J. M. KIJNE Y B. J. LUGTENBERG. 1986. The attachment mechanisms of *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 52: 362-363

SOMASEGARAN, P. Y H. J. HOBEN. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, New York, 450 pp.

TORRES, Mattín. ¿Qué es la Fertilidad del Suelo?: Fertilidad Física, Química y Biológica. [On line] 28/01/2008 [Citado Noviembre 26 de 2008], sp. Available from World Wide: <http://weblogs.madrimasd.org/universo/archive/2008/01/29/83481.aspx>

VIDAL, Ivan. Dinámica del nitrógeno bajo diferentes rotaciones, sistemas de labranza y manejo de residuos en el cultivo de trigo. [On line] [Citado Noviembre 26 de 2008] p1.

Available from World Wide: <http://www.monografias.com/trabajos906/dinamica-nitrogeno-trigo/dinamica-nitrogeno-trigo.shtml>