

SELECCIÓN IN VITRO DE *Rhizobium* TOLERANTE A ACIDEZ Y ALUMINIO

Selecting in vitro of *Rhizobium* for tolerance to acidity and aluminium

Por: Ricardo Campos Segura¹

RESUMEN

La apertura económica puso de presente la obligación de revisar las formas de producción de los cultivos comerciales, con el fin de competir adecuadamente en mercados Internacionales. Actualmente, leguminosas, como el frijol (*Phaseolus vulgaris*) se presentan, actualmente, como cultivo alternativo para reemplazar cultivos tradicionales en la Sabana de Bogotá.

Existe un alto porcentaje de suelos ácidos en Colombia, así como problemas nutricionales, en los cuales la deficiencia de nitrógeno es muy común.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de seleccionar "in vitro" cepas de *Rhizobium tropici* tolerantes a acidez y aluminio, en medios de cultivo diferentes. Inicialmente se hizo una preselección "in vitro" de cepas tolerantes a tres niveles de pH 4,0; 4,5 y 5,0, utilizando el medio líquido de Wood y Cooper y usando 50 cepas entre nativas y foráneas. En este caso, se seleccionaron las cepas RC 92, RC 117, C 7, C 11, C 14, C 53, Nifal 182, RC 70, RC 85, CIAT 899, CIAT 144 y Nifal 241. Posteriormente, se realizó una selección "in vitro" de cepas tolerantes a dos niveles de pH: 4,5 y 5,0 y a cuatro niveles de aluminio: 0,5; 10 y 20 M, utilizando dos fuentes de aluminio: $AlCl_3$ y $AlK(SO_4)_2$ y empleando dos medios de cultivo: el líquido de Wood y Cooper y el sólido de Keyser y Munns.

Las cepas RC 85, C 11, CIAT 899, CIAT 144 y Nifal 182, fueron seleccionadas como las de mejor comportamiento.

Palabras claves: Selección; *Phaseolus*; *Rhizobium*; Acidez; Resistencia.

ABSTRACT

Fifty strains of *Rhizobium tropici* isolated of Sabana de Bogotá soils and foreign collections were screened for tolerance of acidity and aluminium in liquid and solid culture. Assessment of visible turbidity and colonies growth, respectively, indicated five (5) strains tolerant of pH 4.5 and pH 5.0 and 10 or 20 μ M Aluminium. Strains that tolerated the lowest pH values in culture were tolerant of the highest aluminium concentrations.

The cultural test should be used to predict the ability of *Rhizobium* to growth and for use as inoculants in low pH area.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es considerado de gran importancia en Colombia, por constituir una fuente adicional proteínica para la dieta humana, especialmente para la población de menor capacidad económica (Caja Agraria, 1987). Además, es fuente de ingresos para un amplio sector de pequeños agricultores y es considerado como un cultivo "benéfico" para los suelos, debido a su aporte de nitrógeno fijado al mismo, lo cual es de gran interés y actualidad en el manejo del ecosistema agrícola y de la agricultura sostenible. El problema en la producción del cultivo ha llevado a importaciones en los últimos años, así, por ejemplo, en 1991, la superficie sembrada fue calculada en 161.900 hectáreas con una producción de 129.700 toneladas (CEGA, 1993).

Se resalta la importancia de la fijación simbiótica de nitrógeno efectuada en las raíces del frijol por las bacterias del género *Rhizobium*. De un lado, por el beneficio directo en la economía del nitrógeno al sustituir en parte la fertilización nitrogenada sintética y, por otra parte, en la incidencia ecológi-

¹ Profesor asociado. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.

ca de reemplazar un componente químico de la producción por uno biológico, ayudando, a su vez, al equilibrio del ecosistema.

Algunas de las razones de los aún bajos rendimientos promedios del cultivo de frijol en Colombia, tienen que ver con problemas de acidez de los suelos y deficiencias de nitrógeno y fósforo. La acidez, es un factor que incide directamente en cada una de las etapas de desarrollo de la interacción Rhizobium-leguminosa y, de una manera marcada, en la sobrevivencia de las bacterias (rizobios) en el suelo y en la consecuente infección y formación nodular previa a la fijación de nitrógeno propiamente dicha (Gómez y Franco, 1984. Munns, 1986. Brockwell et al, 1991 y Graham et al, 1994). En Colombia un porcentaje muy importante de los suelos presentan problemas de acidez y, en las zonas productoras de frijol, éste factor puede ser uno de los principales limitantes para los rendimientos (Bastidas, 1989).

El objetivo principal de este trabajo, es disponer de cepas de *Rhizobium tropici* que tengan habilidad para fijar nitrógeno y que, además, sean tolerantes a las condiciones de acidez de los suelos. Se hace necesario obtener cepas de la bacteria que puedan ser utilizadas directamente como inoculantes para suministrar los agricultores o como materia prima para su producción a grande escala. Cepas de *Rhizobium tropici* de suelos de diferentes localidades de la Sabana de Bogotá se aislaron, con el fin de identificar las cepas nativas más efectivas y tolerantes a la acidez en competencia con cepas de colecciones internacionales ya probadas y, así seleccionar las más promisorias.

De esta manera, se desarrolló una metodología destinada a seleccionar cepas de rizobio tolerantes a factores de acidez, lo mismo que altas concentraciones de aluminio y bajo pH, utilizando medios líquido y sólido y sus respuestas se sometieron a comparación y, así, determinar las cepas mas promisorias.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en dos etapas:

1. Recolección de cepas de *Rhizobium tropici* en cultivos de frijol de la Sabana de Bogotá y zonas aledañas.
2. Selección de las cepas de *Rhizobium* tolerantes a pH bajo y a toxicidad del aluminio, mediante su crecimiento en medio de cultivo en diferentes condiciones.

Muestreo y recolección de cepas

En diferentes cultivos de la Sabana de Bogotá y zonas aledañas, en lugares con suelos de naturaleza ácida, nódulos de las raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

En cada sitio, se hizo muestreo al azar de diez plantas de frijol, a las cuáles se les removieron los nódulos más grandes para el aislamiento de la bacteria.

Selección in vitro de cepas de *Rhizobium tropici*/tolerantes a acidez

A las 38 cepas nativas recolectadas se le sumaron 12 cepas reportadas como tolerantes a acidez en distintas colecciones internacionales (Ciat, 1987). Del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) y de NIFTAL (Hawaii) se recibieron las cepas detalladas en el Cuadro 1.

En las cepas nativas, se efectuó el aislamiento del *Rhizobium* a partir de los nódulos recolectados y se utilizó la técnica de Burton (Ferrera, 1984).

También se realizó, la prueba de autenticación, para la cual se germinaron semillas de frijol en cajas de Petri estériles y con papel filtro, adicionando agua estéril y luego se sembraron en los vasos de Leonard, con un sustrato formado por arena esterilizada donde se inocularon las plántulas (cuatro

Cuadro 1. Relación de cepas de *Rhizobium tropici* reportadas como tolerantes a la acidez en colecciones internacionales.

CLASE	ORIGEN
Niftal 182	Hawaii
Niftal 220	Hawaii
Niftal 232	Hawaii
Niftal 241	Hawaii
CIAT 45	Brasil
CIAT 144	Colombia
CIAT 905	Brasil
CIAT 40	U.S.A
CIAT 899	Colombia
CIAT 57	Australia
CIAT 166	Colombia
CIAT 876	Colombia

por unidad, de las cuales se retiraron dos a los 8 días), con una suspensión de rizobios de 10^9 bacterias/ml. Las 12 cepas foráneas recibieron en ampogetas y por lo cual se procedió a su multiplicación directamente en el medio de cultivo utilizado para las nativas.

La selección para tolerancia a la acidez se realizó comparando dos medios de cultivo: uno, el líquido de Wood y Cooper (Wood y Cooper, 1985) y el otro sólido, de Keyser y Munns (Keyser y Munns, 1979).

Evaluación de tolerancia a pH ácido

Los medios fueron ajustados con HCl 1N y/o KOH al 10% con el objeto de obtener tres niveles de pH: 4,0; 4,5 y 5,0. Para el caso del medio líquido, se utilizó la siembra de las cepas, hasta obtener una concentración de 1×10^9 células bacteriales por milímetro, medida que fue realizada utilizando el método nefelométrico basado en la escala de McFarland (Vincent, 1982).

En el caso del medio de Keyser y Munns, las cepas fueron sembradas empleando el método de siembra en estrías y se dejaron en incubación a 28°C y se realizaron observaciones de control de crecimiento bacterial desde las 12 horas después de la siembra.

Los tratamientos generados en ésta preselección están registrados en el Cuadro 2.

Se efectuaron tres repeticiones para cada tratamiento y un control no inoculado (Testigo).

Las lecturas en el espectrofotómetro, en el caso del medio líquido, se realizaron a una longitud de onda de 540 nm. en agitación constante desde las 12 horas de incubación. En el caso del medio sólido,

se tuvo en cuenta crecimiento denso a los 8 y 12 días de las fechas de siembra.

Tolerancia a alta concentración de aluminio

A medida que se cumplía la primera fase de selección por tolerancia a pH bajo, se escogieron las cepas que entraban a la fase de tolerancia al aluminio. En este caso, se escogieron dos fuentes: AlCl_3 y $\text{ALK}(\text{SO}_4)_2$, agregándolas en, cada caso, hasta concentraciones de 0,5, 10 y 20 M de AL.

El pH fue ajustado a 4,5 y 5,0 y se utilizaron los medios líquido de Wood y Cooper y sólido de Keyser y Munns.

Los tratamientos se registran en el Cuadro 3.

Se efectuaron dos repeticiones para cada tratamiento y un control no inoculado (testigo). Las lecturas, en el caso del medio líquido, se realizaron en el espectrofotómetro a 540 nm. de longitud de onda. En el caso del medio de cultivo sólido, se tuvo en cuenta el buen crecimiento y la densidad del cuerpo bacterial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección in vitro de cepas de *Rhizobium tropici*/tolerantes a acidez

Los resultados de las observaciones de crecimiento bacterial en medio líquido (Wood y Cooper, 1985) se presentan en el Cuadro 4.

En este experimento, se determinó como parámetro de crecimiento la producción de turbidez en el medio, como consecuencia del desarrollo bacterial.

La preselección de rizobios basada en crecimiento por turbidez en el medio líquido a diferentes valores de pH resultó en que cinco de las 50 cepas fueron tolerantes a pH 4,0, mientras que 43 lo fueron a pH 4,5 y, sólo dos cepas no tuvieron crecimiento a pH 5,0.

El tiempo en días para producirse la turbidez, osciló entre dos y nueve días, aunque la oscilación más común fue entre dos y tres días para los valores de pH 4,5 y 5,0.

En el caso de pH 4,0, la turbidez se presentó en forma tardía entre cinco y diez días en las cepas en las cuales la prueba fue positiva, aunque la turbidez inicial fue tenue en todos los casos.

Con este experimento, se preseleccionaron las cinco cepas tolerantes a pH 4,0 y las siete cepas que lo fueron para pH 4,5 y 5,0 presentaron turbidez en el menor tiempo. Para este caso, se consideró que

Cuadro 2. Tratamientos de selección in vitro por tolerancia a pH ácido

Tratamiento 1:	pH 4.0 Medio líquido
Tratamiento 2:	pH 4.5 Medio líquido
Tratamiento 3:	pH 5.0 Medio líquido
Tratamiento 4:	pH 4.0 Medio sólido
Tratamiento 5:	pH 4.5 Medio sólido
Tratamiento 6:	pH 5.0 Medio sólido

CUADRO 3. Tratamientos para la selección por tolerancia a aluminio.

Tratamiento					
1	Medio líquido	pH 4,5	+	0	mM AL
2	Medio líquido	pH 4,5	+	5	mM AL (como AlCl ₃)
3	Medio líquido	pH 4,5	+	10	mM AL (como AlCl ₃)
4	Medio líquido	pH 4,5	+	20	mM AL (como AlCl ₃)
5	Medio líquido	pH 4,5	+	5	mM AL (como AlK(SO ₄) ₂)
6	Medio líquido	pH 4,5	+	10	mM AL (como AlK(SO ₄) ₂)
7	Medio líquido	pH 4,5	+	20	mM AL (como AlK(SO ₄) ₂)
8	Medio líquido	pH 5,0	+	0	mM AL
9	Medio líquido	pH 5,0	+	5	mM AL (como Al Cl ₃)
10	Medio líquido	pH 5,0	+	10	mM AL (como Al Cl ₃)
11	Medio líquido	pH 5,0	+	20	mM AL (como Al Cl ₃)
12	Medio líquido	pH 5,0	+	5	mM AL (como AlK(SO ₄) ₂)
13	Medio líquido	pH 5,0	+	10	mM AL (como AlK(SO ₄) ₂)
14	Medio líquido	pH 5,0	+	20	mM AL (como AlK(SO ₄) ₂)
15	Medio sólido	pH 4,5	+	0	mM AL (como AlK(SO ₄) ₂)
16	Medio sólido	pH 4,5	+	5	mM AL (como AlCl ₃)
17	Medio sólido	pH 4,5	+	10	mM AL (como AlCl ₃)
18	Medio sólido	pH 4,5	+	20	mM AL (como AlCl ₃)
19	Medio sólido	pH 4,5	+	5	mM AL (como AlK(SO ₄) ₂)
20	Medio sólido	pH 4,5	+	10	mM AL (como AlK(SO ₄) ₂)
21	Medio sólido	pH 4,5	+	20	mM AL (como AlK(SO ₄) ₂)
22	Medio sólido	pH 5,0	+	0	mM Al
23	Medio sólido	pH 5,0	+	5	mM AL (como AlCl ₃)
24	Medio sólido	pH 5,0	+	10	mM AL (como AlCl ₃)
25	Medio sólido	pH 5,0	+	20	mM AL (como AlCl ₃)
26	Medio sólido	pH 5,0	+	5	mM AL (como AlK(SO ₄) ₂)
27	Medio sólido	pH 5,0	+	10	mM AL (como AlK(SO ₄) ₂)
28	Medio sólido	pH 5,0	+	20	mM AL (como AlK(SO ₄) ₂)

dos días fue el tiempo más corto para la producción de turbidez, por lo cual se seleccionaron las cepas RC 92, RC 117, C 7, C 53, Nifital 182, C-14 y C-11.

Las cepas tolerantes a pH 4,0: RC 70, RC 85, Nifital 241, CIAT 144 y CIAT 899 pasaron a la siguiente prueba de medio ácido con aluminio adicionado a varios niveles de concentración.

Tolerancia a diferentes concentraciones de aluminio en medios de cultivo líquido y sólido con dos diferentes fuentes de aluminio

Los resultados de la prueba se presentan en el Cuadro 5.

Doce cepas tolerantes a acidez, cinco de ellas a pH 4,0 y las siete restantes de buen crecimiento en pH

Cuadro 4. Resultados de crecimiento de *Rhizobium tropici* en medio líquido de Wood y Cooper, medidos como tiempo empleado para desarrollar turbidez visible a diferentes valores de pH.

4,5 (medido como rapidez de crecimiento) fueron seleccionadas para esta prueba de tolerancia a 0; 5; 10 y 20 M de Aluminio, empleando dos fuentes pH 4,5 y 5,0 en medios líquido y sólido. Se observó que aunque se presentó mucha variación en las respuestas, tanto a las dos fuentes de aluminio como a los dos pH, las cepas que mostraron ser más sensibles a acidez (prueba de pH), igualmente, fueron más sensibles a las pruebas del aluminio. Este es el caso de las cepas RC 70, RC 85, CIAT 899 y, en menor proporción; Nifal 241, CIAT 144, C 7 y Nifal 182. Las cepas que fueron sensibles a aluminio, en concentraciones de 5; 10 y 20 M en medio líquido, también, lo fueron en medio sólido a pH 5,0. A pH 4,5, solamente, la cepa RC 85 tuvo turbidez a 20 M de aluminio como $ALK(SO_4)_2$, pero en una sola observación en el medio líquido. Este mismo tratamiento, pero en medio sólido, fue positivo para RC 85, CIAT 144, CIAT 899 y Nifal 182. Para el caso de $ALCl_3$ como fuente de 20 M de Aluminio a pH 4,5 en el medio sólido, solamente, las cepas RC 85 y CIAT 899 mostraron crecimiento.

En todos los casos, es claro que, al incrementar la acidez, se reduce la tolerancia al aluminio. Algunas cepas, como la C53 y la C14, que fueron seleccionadas por tolerancia a acidez en el primer experimento fueron sensibles en esta nueva prueba. Las razones de estas variaciones en las respuestas pueden ser causadas por manejo microbiológico, aunque se ha encontrado que las densidades bacteriales iniciales afectan la respuesta de *Rhizobium trifolii* a la acidez en el medio líquido de Wood y Cooper (Karanja y Wood, 1988). A pH 4,5 sin aluminio, todas las cepas tuvieron crecimiento en el medio sólido, mientras en el medio líquido el 25% de las cepas no se desarrolló. Con 5 M de aluminio como $ALCl_3$ en el medio líquido, el 50% de las cepas fue sensible a éste estrés, mientras que con $ALK(SO_4)_2$ fue el 25% de las cepas.

Estos resultados pueden ser debidos al efecto del potasio y del azufre como acompañantes, acompañando seguramente el efecto del aluminio en forma, quizás, de un mejor suministro nutricional. El efecto no se conoce realmente. Por otra parte, en el medio sólido con las dos fuentes de aluminio y

	Cepa	Turbidez (días a partir de siembra)		
		pH 4,0	4.5	5.0
1.	RC 70	5	2	2
2.	RC 81		3	2
3.	RC 83		3	3
4.	RC 84		2	
5.	RC 85	7	2	3
6.	RC 92		2	2
7.	RC 94			
8.	RC 95		5	3
9.	RC 97		4	2
10.	RC 98		2	2
11.	RC 99		2	3
12.	RC 101		3	2
13.	RC 117		2	2
14.	RC 119		3	3
15.	RC 121		3	3
16.	C 1		5	2
17.	C 2		3	2
18.	C 4		7	4
19.	C 5		6	3
20.	C 6		3	4
21.	C 7		2	2
22.	C 11		2	2
23.	C 12		8	3
24.	C 13		2	4
25.	C 14		2	2
26.	C 15			2
27.	C 16		4	2
28.	C 17			2
29.	C 18			2
30.	C 30			3
31.	C 31		3	7
32.	C 51		4	2
33.	C 52		2	4
34.	C 53		2	2
35.	C 54		5	2
36.	C 55		5	
37.	C 56		3	2
38.	C 57		8	3
39.	NIFTAL 182		2	2
40.	NIFTAL 220		3	2
41.	NIFTAL 232		2	3
42.	NIFTAL 241	10	2	
43.	CIAT 45		3	2
44.	CIAT 144	9	5	2
45.	CIAT 905			3
46.	CIAT 40		2	3
47.	CIAT 899	9	4	2
48.	CIAT 57		3	2
49.	CIAT 166		6	7
50.	CIAT 876		8	3

* Espacios en blanco indican no turbidez.

los pH 4,5 y 5,0, el 75% de las cepas toleraron el estrés, contra el 48% en el medio líquido.

Se puede resaltar que, en el medio sólido, se identificaron varias cepas tolerantes a los diferentes niveles de aluminio, inclusive 20 M a pH 4,5 y 5,0, cepas que fueron, a su vez, sensibles a estas concentraciones en el medio líquido. Por lo anterior, se puede decir que el medio sólido está sobreestimando la cantidad de cepas tolerantes a acidez y aluminio, en comparación con el medio líquido. El medio líquido proporciona una mayor distribución y uniformidad para estas pruebas de tolerancia, puesto que se obtienen unos resultados más estrictos que utilizando el medio sólido.

Las cepas RC 85, CIAT 144 y CIAT 899 fueron tolerantes a 20 M de aluminio en las dos fuentes a pH 4,5 y 5,0 en medio sólido, por lo cual se consideran como las de mejor comportamiento, puesto que, en el medio líquido, la Cepa RC 85 fue la única con crecimiento a ésta concentración de 20 M de aluminio como $AlK(SO_4)_2$ y las Cepas CIAT 144 y CIAT 899 crecieron, también, pero a pH 5,0. Las cepas NIFTAL 182 y C 11, también, lograron un buen crecimiento en medio sólido con la misma fuente.

CONCLUSIONES

De los resultados anteriores, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- * Las cepas de *Rhizobium tropici* trabajadas fueron, en su mayoría, tolerantes a condiciones de pH 4,5 y pH 5,0 en medio líquido. Al nivel de pH 4,0 se debe realizar una preselección eficaz de cepas.
- * De las pruebas de tolerancia a acidez y aluminio con concentraciones que, en términos de solución del suelo, pueden dar una condición real de estrés por aluminio, seleccionaron cepas de rizobio con alta capacidad de tolerancia.
- * Existe una alta diferencia en la utilización de medios de cultivo líquido o sólido en las pruebas de tolerancia a acidez y aluminio. El medio de cultivo sólido, utilizado tradicionalmente, sobreestima la cantidad de cepas con esa tolerancia.
- * El medio de cultivo líquido ofrece un mejor ambiente y uniformidad experimental en el estudio de cepas ácido-tolerantes a diferentes concentraciones de aluminio.

- * En estos experimentos, la cepa CIAT 899, trabajada por tolerancia a acidez por varios investigadores (Graham et al, 1982; Campos, 1991; Karanja y Wood, 1988), resultó, también, tolerante a acidez y aluminio.
- * Cepas nativas, como RC 85 y C 11, se comportaron al mismo nivel, incluso mayor, con respecto a la tolerancia a acidez y aluminio que presentó la cepa CIAT 899.
- * La utilización de fuentes diferentes de aluminio en la selección de tolerancia a este elemento, muestra comportamientos diferentes en las cepas del rizobio probadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. **BASTIDAS, R.G.** Producción e investigación de Frijol en Colombia, ASIAVA, 31 ed. p. 27-33. 1989.
2. **BROCWELL, J. PILKA, A.** and Holliday, R.A. Soil pH is a major determinant of the number of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils of New South Wales. Aust. J. Exp. Agric. 31: 211-219. 1991.
3. **CAJA AGRARIA.** La Caja Agraria ante el sector rural colombiano, proyecciones y brechas. Vol. 3, p. 53-54. 1987
4. **CAMPOS SEGURA R.** Sobrevivencia de *Rhizobium phaseoli* en condiciones de acidez. Suelos Ecuatoriales. Vol. XXI, No. 2. 1991.
5. **CEGA.** Importaciones y exportaciones agropecuarias en Colombia. Reporte. 1993
6. **CIAT.** Resúmenes analíticos sobre frijol. Reporte anual, Vol. XII. No. 3: p. 105-107. 1987
7. **FERRERA, C.R.** Manual curso fijación simbiótica del nitrógeno CEDAF. Capungo. Chapingo México. 1984
8. **GOMEZ, D.G. y A, FRANCO.** Selecao de estiofes de *Rhizobium* de leguminosas, florestais en meio de cultura tolerantes a acidez e á toxidez do aluminium, Pesq. Agrop. Bras. 19: 169-173. 1984.
9. **GRAHAM, P.H. S.E. VITERI, F. McKIE y A. PALACIOS.** Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. Fidd Crops Res. 5: 121-128. 1982.
10. **GRAHAM, P.H. DRAEGER K.J. FERREY M., CONROY M. HAMMER B. MARTINEZ E. AARONS, S. and QUINTO, C.** Can. Jour. of Microb. Vol. 40, 3: 198-207. 1994.

11. **KARANJA, N.K. and M, WOOD.** Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans in kenya. Plant and soil 112, 7-13. 1988
12. **KEYSER, H.H., and Munns, D.N.** Tolerance of rhizobia to acidity, aluminum and phosphate. Soil Sci. Soc. Am. J.43: 519-523. 1979b.
13. **MUNNS, D.N.** Acid soils tolerance in legumes and rhizobia. Adv. Plant Nutr. 2:63-91. 1986.
14. **VINCENT, J.M.** Nitrogen fixation in legumes. Ed. Academic Press. Sydney, 281 p. 1982.
15. **VOYSEST, D.** Variedades de frijol en América Latina y su origen, CIAT. Colombia. 87 p. 1983
16. **WOOD M. and J. COOPER.** Screening clover and lotus rhizobia for tolerance of acidity and aluminium. Soil Biol. Biochem (17) 473-497. 1985.