



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**



**Aislamiento e identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno
presentes en la rizosfera de plantas tolerantes a metales pesados**

Tesis

Para obtener el grado de Maestría en Ciencias

Presenta

Q.B.P. Emma Alejandra Hernández Mendoza

Directores

**Dra. Janet Jan Roblero
Dr. César Hugo Hernández Rodríguez**

México, D.F.

Junio, 2009.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología General, del departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Janet Jan Roblero y el Dr. César Hugo Hernández Rodríguez.

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN, como parte de los proyectos:

SIP 20060871. Estudio de la diversidad microbiana asociada a suelos rizosféricos de plantas que crecen en jales de minas a través de SARTS.

SIP 20070164. Diversidad microbiana asociada a rizosferas en ambientes extremos.

SIP 20080628. Análisis molecular de la diversidad bacteriana y de genes que participan en la nitrificación y desnitrificación en la rizosfera de plantas que crecen en suelos contaminados con metales pesados.

La sustentante fue becaria CONACYT y becaria PIFI en el periodo de Enero 2007 a Diciembre 2008.

Índice

Resumen	v
Abstract	vi
1. Introducción	1
1.1 Contaminación por metales pesados.....	1
1.2 Efecto de la contaminación por metales pesados.....	2
1.3 Relación planta-microorganismos en sitios contaminados con metales pesados.....	2
1.4 Fijación biológica de nitrógeno.....	5
1.5 Caracterización de diazótrofos en ambientes.....	9
2. Antecedentes	11
3. Justificación	13
4. Objetivos	14
5. Material y métodos	15
5.1 Diseño general del estudio.....	15
5.2 Enriquecimiento de poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	16
5.3 Análisis PCR-RAPD.....	17
5.4 Selección de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno.....	17
5.5 Actividad de nitrogenasa.....	18
5.6 Identificación molecular mediante el análisis del gen 16S rRNA.....	18
5.7 Amplificación de los genes <i>nif</i>	19
5.8 Análisis de secuencias.....	19
6. Resultados	21
6.1 Enriquecimiento de poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	21
6.2 Análisis PCR-RAP.....	21
6.3 Selección de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno.....	24
6.4 Identificación molecular.....	25
6.5 Determinación de la actividad de nitrogenasa.....	27
6.6 Amplificación de los genes <i>nif</i>	28
7. Discusión	32
8. Conclusiones	39
9. Prospectivas	40
10. Bibliografía	41

Índice de figuras

Figura 1. Árbol filogenético construido con las secuencias parciales de 16S rDNA por el método de agrupamiento de “Neighbor-Joining” (Tomado de Raymond <i>et al.</i> , 2004).....	6
Figura 2. Estructura del complejo enzimático de la nitrogenasa de <i>Azotobacter vinelandii</i> . Las subunidades de los dímeros de las dos proteínas están de color azul, café, rosa y gris. Las subunidades α de la proteína FeMo aparecen de color verde y amarillo y las subunidades β en rojo y azul intenso (Tomado de Dixon y Kahn, 2004)	7
Figura 3. Organización de los genes <i>nifDK</i> y <i>nifEN</i> en algunas arqueas y bacterias diazótrofás (Tomado de Fani <i>et al.</i> , 2000).....	8
Figura 4. Esquema general de trabajo.....	15
Figura 5. Patrones electroforéticos obtenidos por la técnica de PCR-RAPD del DNA genómico de las bacterias aisladas a partir de suelos no rizosféricos y rizosféricos de plantas colectadas en jales de minas de Zacatecas. Las muestras y los números de los aislados se indican en la parte superior de los pozos.....	23
Figura 6. Fotografía que muestra la amplificación del gen 16S rRNA de los aislados obtenidos a partir de suelo rizosférico de plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados. M, marcador de talla molecular, B2, B7, B8, C5, C7, C8 YE6, corresponden a los productos de PCR del gen 16S rRNA obtenidos a partir del DNA genómico de los aislados.....	25
Figura 7. Filograma de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de las bacterias aisladas de las rizosferas de plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados. El árbol se construyó mediante la comparación de 1300 bases, utilizando el método de agrupamiento “Neighbor Joining” y el índice de distancia Kimura 2 Parámetros. La topología se evaluó usando el método de remuestro tipo “Bootstrap” con 1,000 replicas. La barra indica el número de cambios en toda la secuencia.....	27
Figura 8. Fotografía que muestra la amplificación del gen <i>nifD</i> de <i>Azospirillum lipoferum</i> (B2 y F6) y <i>Bradyrhizobium</i> sp.(C5).....	28
Figura 9. Fotografía que muestra la amplificación del gen <i>nifH</i> con los iniciadores RFZ-1 y RFZ-2.....	30
Figura 10. Fotografía que muestra la amplificación del gen <i>nifD</i> a partir de DNA metagenómico de los cultivos de enriquecimiento de los suelos no rizosféricos y rizosféricos asociados a plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados.....	31

Índice de cuadros

Cuadro 1. Detección por PCR de genes relevantes del ciclo del nitrógeno en la rizosfera de plantas que crecen en jales de minas.....	12
Cuadro 2. Plantas recolectadas en la Mina de San Martín y Noria de los Ángeles.....	16
Cuadro 3. Iniciadores empleados para la amplificación de los genes <i>nifD</i> y <i>nifH</i>	19
Cuadro 4. Número de aislados encontrados en las muestras de suelo incluidas en el estudio.....	21
Cuadro 5. Clasificación de los aislados mediante la técnica de PCR-RAPD.....	22
Cuadro 6. Aislamientos que crecieron en ausencia de nitrógeno combinado.....	24
Cuadro 7. Cepas aisladas a partir de suelos rizosféricos de plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados	26
Cuadro 8. Actividad de la nitrogenasa de los aislados obtenidos a partir de las rizosferas de plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados.....	28
Cuadro 9. Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos de NifD de la cepa C5 con las secuencias con más alta homología del GenBank.....	29
Cuadro 10. Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos de NifH de la cepa F6 con las secuencias con más alta homología del GenBank.....	30

Resumen

La contaminación con metales pesados es un problema importante que se deriva, principalmente, de la actividad minera. Dicha contaminación se genera por la liberación parcial o gradual de elementos potencialmente tóxicos que se encuentran acumulados en depósitos conocidos como jales. Para limitar la dispersión de los contaminantes y remediar los sitios afectados por la acumulación de éstos, se propone la reforestación con plantas adaptadas al ambiente hostil de los jales. Dado que los residuos de minas no tienen las condiciones propicias para el desarrollo vegetal, debido a que poseen un bajo o nulo contenido de materia orgánica y poca disponibilidad de nutrientes esenciales, se sugiere una importante participación de bacterias asociadas a las raíces de plantas nativas en el aporte de elementos esenciales, particularmente de nitrógeno.

En este trabajo se exploró la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico de las bacterias asociadas a la rizosfera de plantas colectadas en jales de las minas de San Martín, Sombrerete y Noria de los Ángeles, ubicadas en el estado de Zacatecas. Se realizaron cultivos de enriquecimiento en medios libres de nitrógeno inoculados con suelos rizosféricos y no rizofericos colectados en los jales. El análisis de las secuencias parciales de los genes 16S rRNA de las bacterias aisladas a partir de cultivos de enriquecimiento permitió la identificación de los géneros *Azospirillum*, *Brevundimonas*, *Inquillus*, *Sphingomonas*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, las cuales pertenecen al grupo de las α -proteobacterias. Además, se identificaron actinomicetos pertenecientes al género *Agromyces*. La capacidad de fijación de nitrógeno se evidenció mediante la determinación de reducción de acetileno en cepas cuya identificación correspondió a *Azospirillum lipoferum*. Por otro lado, se realizó la detección de los genes que codifican para la subunidad α de la dinitrogenasa (*nifD*) y para la dinitrogenasa reductasa (*nifH*).

Los resultados de este trabajo demuestran que existen bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a las plantas colectadas en los jales del estado de Zacatecas, aún cuando fueron aisladas en baja proporción. Así mismo, se detectaron diazótrofos aún no cultivados.

Abstract

Heavy metal contamination is a major problem caused mainly from the mining industry. Such pollution is generated by the partial or gradual release of potentially toxic elements accumulated in deposits known as mine tailings. To limit the spread of contaminants and to remediate the affected sites by the accumulation of these, the reforestation with adapted plants to the hostile mine tailings environment had been suggested. Since, the mine tailings do not have the appropriated conditions for vegetal development, they have a low or zero content of organic matter and minor availability of essential nutrients, it has been suggested an important participation of bacteria associated with the roots of native plants, in providing essential elements, mainly nitrogen.

In this paper, we explored the ability to fix atmospheric nitrogen by bacteria associated with the rhizosphere of plants collected in the mine tailings from San Martin, Sombrete and Noria de los Angeles, located in the state of Zacatecas, Mexico. Enrichment cultures were performed in nitrogen-free media inoculated with rhizospheric and non- rhizospheric soils. The analysis of partial sequences of 16S rRNA genes of bacteria isolated from enrichment cultures allowed the identification of member of the genera *Azospirillum*, *Brevundimonas*, *Inquilius*, *Sphingomonas*, *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, which belong to α – proteobacteria phylum. In addition, we identified actinomycetes of the *Agromyces* genus. The ability of nitrogen fixation was confirmed by the determination of acetylene reduction in strains whose identification corresponded to *Azospirillum lipoferum*. Besides, the detection of genes encoding the α subunit of dinitrogenase (*nifD*) and the dinitrogenasa reductase (*nifH*) was performed.

The results of this study exhibited the presence of nitrogen-fixing bacteria associated with the roots of collected plants in the mine tailings from Zacatecas, Mexico, even though they were in isolated in a low proportion. Also, it was detected diazotrophs still uncultivated.

1. Introducción

1.1 Contaminación por metales pesados

Los metales pesados son un grupo de elementos con elevado peso molecular a los que se atribuyen efectos tóxicos. Dentro de este grupo se encuentran el Cd, Cu, Cr, Mg, Hg, Ni, Pb y Zn (Duffus, 2002). Algunos metales, como el Cu y Zn funcionan como micronutrientes esenciales para humanos, animales y plantas, pero en concentraciones elevadas tienen efectos tóxicos (Johnson *et al.*, 2007). Para metales como el Pb y el Hg no se conoce su función bioquímica.

La contaminación por metales pesados se genera por diversas operaciones como la aplicación de agroquímicos, riego con aguas residuales, fundición, manufactura de baterías alcalinas, forja de metal y minería; siendo esta última actividad la que genera el mayor problema en diversas partes del mundo.

México es un país con amplia tradición minera, destacando su producción a nivel mundial. En la actualidad ocupa el tercer lugar en la obtención de plata y el quinto en plomo, así como el sexto en molibdeno y zinc. En 2005, se estimó que la producción minera ascendió a 4 900 millones de dólares y en términos del Producto Interno Bruto (PIB), esta industria representó 1.6% (CAMIMEX, 2006). Se consideran a Sonora, Zacatecas, Coahuila, Durango, San Luis Potosí y Chihuahua como los principales estados mineros del país; sin embargo, la actividad se extiende a 24 de las 32 entidades federativas.

En el proceso de extracción de los minerales se generan grandes cantidades de residuos que son acumulados a cielo abierto en depósitos conocidos como jales. Los jales contienen gran cantidad de elementos potencialmente tóxicos (EPT) que pueden ser liberados parcial o gradualmente al ambiente (Puga *et al.*, 2006b). De encontrarse en forma disponible (principalmente sulfuros), los EPT pueden generar drenajes ácidos (Mendoza-Amézquita *et al.*, 2006) o bien afectar zonas circundantes a los jales. Lo anterior se debe a la dispersión de los polvos de la capa superficial de los jales por la acción del viento y la lluvia (Gutiérrez-Ruiz *et al.*, 2007).

Dado que los recursos obtenidos de las minas no son renovables, es necesario realizar la búsqueda de nuevos yacimientos. En consecuencia, el abandono de las minas y los jales puede generar impacto negativo en el ambiente, afectando principalmente el ámbito local;

ya que el deterioro dificulta el aprovechamiento de las tierras afectadas para desarrollar otras actividades productivas.

1.2 Efecto de la contaminación por metales pesados

A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales no pueden ser degradados, solo se transforman a otros estados de oxidación; disminuyendo así su movilidad y persistiendo en los ecosistemas mucho tiempo después de su introducción.

El suelo es uno de los ecosistemas más afectados por la contaminación de metales pesados. Se ha observado que la exposición a estos contaminantes, a corto o largo plazo, reduce de la diversidad microbiana y la actividad metabólica (Sandaa *et al.*, 1999; Gremion *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006), alterando incluso, la estructura de la comunidad microbiana. En suelos agrícolas, la acumulación de metales pesados causa efectos adversos en la calidad de los alimentos debido a que son absorbidos y acumulados en diferentes partes de las plantas ocasionando cambios en las características fisiológicas y morfológicas, lo que se traduce en una disminución de la producción (Singh *et al.*, 2007).

Por otro lado, la ingestión de vegetales contaminados deriva en problemas graves para la salud humana. En sitios mineros se considera un problema de salud pública, debido a que millones de personas están en contacto con los metales. Entre las patologías ocasionadas por la exposición prolongada a metales pesados se encuentran la alteración en la regulación de la respuesta inmune, desórdenes hematológicos, disfunción renal, daño hepático, cardíaco o a nivel del sistema nervioso central, incluso algunos compuestos pueden ser carcinógenos (Martelli *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2006; Schober *et al.*, 2006; Wise *et al.*, 2006).

1.3 Relación planta-microorganismo en sitios contaminados con metales pesados

Considerando el impacto ambiental que tienen los residuos mineros, se han propuesto diversas técnicas físicas y químicas para la recuperación de estos sitios. Dichas estrategias pretenden la eliminación de los contaminantes o bien disminuir su disponibilidad en el suelo. Entre las más utilizadas están la excavación y el relleno de minas, lixiviación ácida y fijación *in situ*. Las desventajas de estos procedimientos son los costos elevados y que posiblemente son poco prácticos, debido a que se deben cubrir

grandes áreas, además de que tienen efectos adversos para el ambiente (Dybowska *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006).

Una tecnología alterna, ecológica y rentable para la restauración de sitios contaminados con metales pesados es la fitorremediación. En esta, se utilizan plantas y su microbiota asociada para remover, transferir o estabilizar los contaminantes (Khan *et al.*, 2009). En el caso particular de los residuos mineros, se emplean dos estrategias de fitorremediación: a) fitoestabilización, que implica el uso de especies de plantas tolerantes a metales para inmovilizar metales pesados mediante la adsorción en las raíces o por precipitación de éstos en la rizosfera (Wong, 2003); y b) fitoextracción, en la que los metales pesados son removidos del suelo utilizando plantas que poseen la capacidad de almacenar concentraciones elevadas de estos elementos y movilizarlos a diferentes partes aéreas de la planta (Lasat, 2002).

Parte del éxito de la fitorremediación radica en hacer una selección cuidadosa de las plantas que serán utilizadas. Es importante que estas se encuentren adaptadas a las condiciones climáticas del área a remediar, para que la propagación no represente una dificultad. Por tal motivo, se sugiere que se utilicen plantas endémicas, que suelen ser encontradas recolonizando los jales (García *et al.*, 2003). Así, se han descrito diversas especies de plantas en muchos sitios, a fin de ser utilizadas en fitoestabilización, representando una opción efectiva y de costo bajo para estabilizar la superficie de los jales y disminuir los efectos de la erosión hídrica y eólica (Conesa *et al.*, 2006; González y González-Chávez, 2006). En el caso de la fitoextracción, uno de los requerimientos más importantes es la disponibilidad de plantas de rápido crecimiento y con capacidad de producir grandes cantidades de biomasa; de no ser así, la eliminación de los metales pesados podría requerir de mucho tiempo. Se ha observado que las plantas hiperacumuladoras presentan una tasa de crecimiento lento y producen cantidades limitadas de biomasa cuando la concentración de los metales pesados es elevada. Sin embargo, diversos trabajos demuestran que este problema disminuye cuando las plantas se encuentran asociadas a bacterias que promueven su crecimiento (Burd *et al.*, 1998; Kunito *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2006)

Además de las plantas, la eficiencia del proceso de fitorremediación está en función de la concentración y el tipo de metales presentes, las propiedades físicoquímicas del suelo,

como son, la cantidad de materia orgánica, tipos de arcillas, disponibilidad de agua y temperatura, pH, potencial de óxido-reducción y de manera muy importante, los microorganismos que se encuentren asociados a las raíces de las plantas (Kamnev y van der Lelie, 2000).

La interacción de las plantas con un gran número de microorganismos, aunado a las condiciones del suelo son determinantes para el crecimiento y proliferación de las plantas, dicha interacción se lleva a cabo en la porción de suelo que rodea estrechamente a las raíces de las plantas (rizosfera). Las bacterias presentes en la rizosfera o rizobacterias, son esencialmente atraídas por los exudados radicales, ya que contienen una amplia variedad de moléculas orgánicas que son utilizadas como nutrientes. En retribución, los microorganismos estimulan el crecimiento de la planta (Khan, 2005). El resultado de las interacciones planta–rizobacterias es una elevada actividad metabólica, lo cual es esencial para el establecimiento de las comunidades, particularmente en aquellos suelos con bajo contenido de materia orgánica, o bien, que están contaminados.

Se han descrito rizobacterias que tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas, denominadas PGPR (plant growth- promoting rhizobateria), y ejercen dicho efecto mediante diversos mecanismos; entre los que se encuentran la fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas como el ácido indol acético (AIA), solubilización de fosfatos y producción sideróforos (Lucy *et al.*, 2004). Otro proceso importante mediado por PGPR es la reducción de los niveles de etileno que sintetizan las plantas en respuesta al estrés ambiental. El mecanismo se basa en la capacidad de algunas bacterias para hidrolizar al 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC, precursor del etileno) y utilizarlo como fuente de N, debido a la acción de la enzima ACC desaminasa (Burd *et al.*, 1998). Así, el etileno generado por la presencia de contaminantes, como los metales pesados que inhibe el crecimiento de la raíz y afecta la eficiencia de la fitorremediación, es minimizado por la presencia de PGPR productoras de ACC desaminasa (Arshad *et al.*, 2007)

Dada la importancia de los procesos en los que participan las rizobacterias, se han estudiado las comunidades bacterianas asociadas a la rizosfera de plantas con uso potencial para la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados. El propósito es investigar la influencia que tienen las rizobacterias en plantas para tolerar la toxicidad de los metales pesados y favorecer su absorción por parte la planta.

El análisis de las comunidades microbianas ha demostrado que las rizobacterias de las plantas hiperacumuladoras tienen la capacidad de producir sideróforos, AIA y ACC desaminasa (Idris *et al.*, 2004, Dell'Amico *et al.*, 2005); y muchas de estas bacterias presentan niveles elevados de resistencia a metales pesados (Mengoni *et al.*, 2001; Sheng *et al.*, 2008). La presencia de las rizobacterias incrementa la tolerancia y la capacidad de adaptación de la plantas a los metales pesados debido a la protección que brindan contra la toxicidad de estos contaminantes (Kunito *et al.*, 2001, Xiong *et al.*, 2007).

Las rizobacterias pueden inmovilizar a los metales pesados en el suelo rizosférico por reducción del pH; o bien, pueden aumentar la solubilización y biodisponibilidad de los metales y aniones acompañantes mediante la catálisis de reacciones redox, que promueven el cambio en la movilidad de los metales en el suelo, aumentando la posibilidad de absorción de las raíces (Kamnev y van der Lelie, 2000; Abou-Shanab, 2003; Wu *et al.*, 2006).

Además de los mecanismos antes mencionados, los cuales promueven el crecimiento de plantas, existe otro más que se ha explorado poco en las comunidades asociadas a plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados: el proceso de la fijación de nitrógeno.

1.4 Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno constituye aproximadamente 78% de la atmósfera, misma que representa el mayor reservorio de este elemento. Forma parte de las macromoléculas, de manera que todos los organismos vivos requieren de nitrógeno combinado para incorporarlo a su biomasa. La presencia de este elemento es un factor limitante para el desarrollo de plantas y otros organismos, y por ende, también lo es para el establecimiento de ecosistemas.

La fijación biológica de nitrógeno es el proceso en el que el nitrógeno atmosférico es reducido a amonio, el cual, es la forma asimilable para los organismos vivos, utilizada en la síntesis de biomoléculas (Cheng, 2008). La capacidad de fijar nitrógeno está ampliamente distribuida entre bacterias y arqueas.

Los fijadores de nitrógeno o diazótrofos pertenecen a diversos grupos filogenéticos entre los que se encuentran las bacterias verdes del azufre, firmicutes, cianobacterias y todas las divisiones de las proteobacterias; mientras que en las arqueas, la diazotrofia se ha descrito sólo en metanógenos (Figura 1). Así mismo, los fijadores de nitrógeno presentan características fisiológicas muy diversas, incluyendo aerobios, anaerobios facultativos y estrictos, heterótrofos y quimiolitótrofos (Raymond *et al.*, 2004).

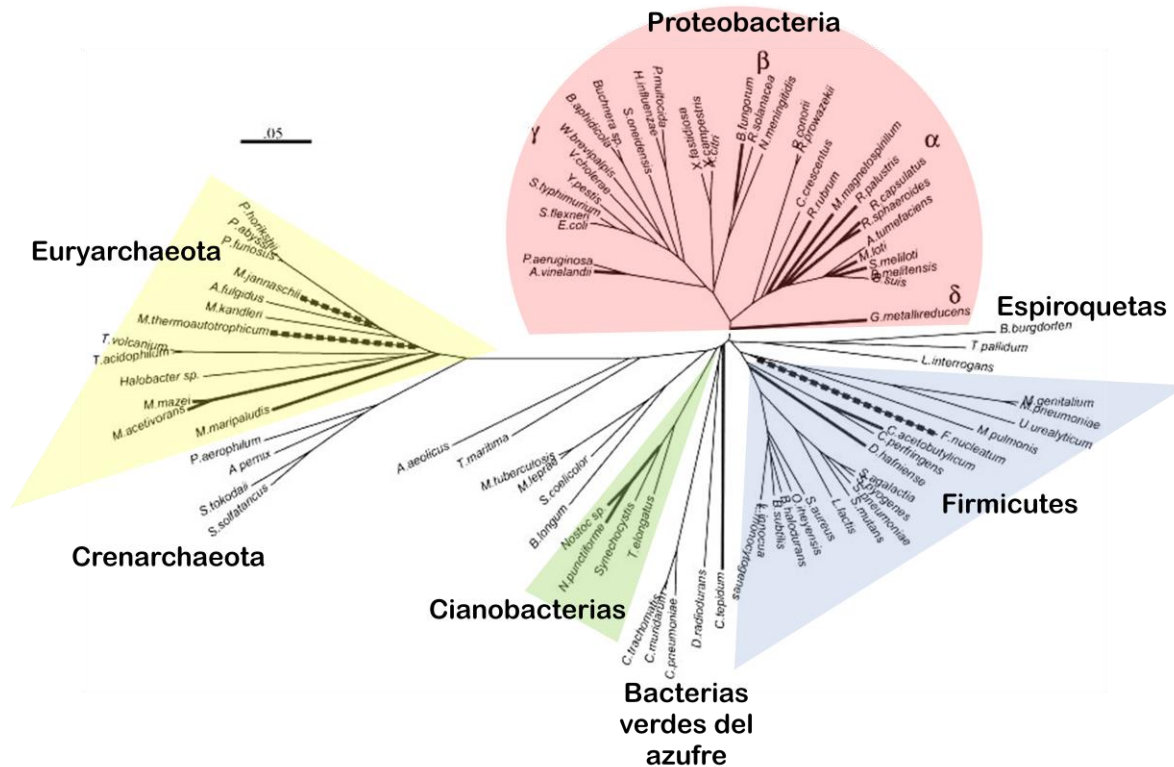


Figura 1. Árbol filogenético construido con las secuencias parciales de 16S rDNA por el método de agrupamiento de “Neighbor-Joining” (Tomado de Raymond *et al.*, 2004).

La fijación biológica de nitrógeno es una reacción catalizada por el complejo enzimático de la nitrogenasa, el cual consta de dos componentes, la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa, también denominada proteína hierro-molibdeno, es un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$, donde la subunidad α es codificada por el gen *nifD* y la subunidad β es el producto del gen *nifK*. Cada dímero α - β está unido por un grupo P [8Fe – 7S]. La subunidad α contiene el sitio activo donde se lleva a cabo la reducción del nitrógeno, el cual se conoce como cofactor Fe- Mo. La dinitrogenasa reductasa es un homodímero γ_2 que está codificado por el gen *nifH* con un solo grupo [4Fe-4S] unido entre las

subunidades (Figura 2). La proteína dinitrogenasa reductasa transfiere electrones a la nitrogenasa (Igarashi y Seefeldt, 2003).

Todos los diazótrofos poseen la nitrogenasa dependiente de molibdeno; sin embargo, se ha observado que en condiciones de baja disponibilidad de este elemento, se induce la síntesis de nitrogenasas que poseen Va o Fe como cofactores, en cuyo caso la nomenclatura *vnf* o *anf*, respectivamente, son utilizados para hacer referencia a los genes *nif*. Estas enzimas son llamadas nitrogenasas alternativas (Fallik *et al.*, 1991) y se encuentran en un número limitado de microorganismos fijadores de nitrógeno.

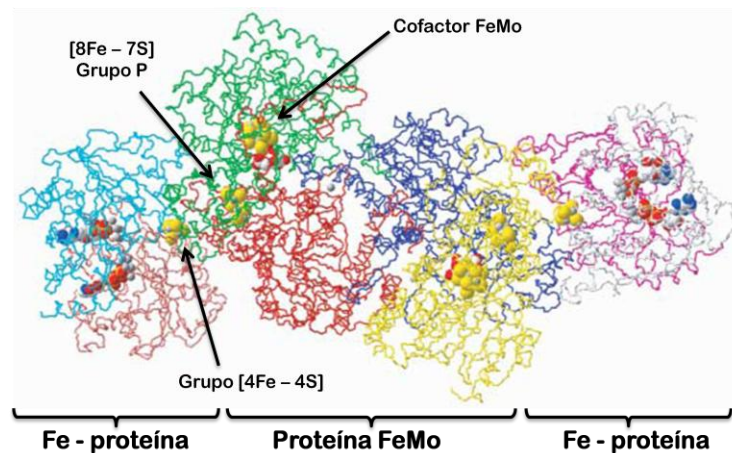


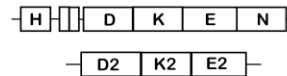
Figura 2. Estructura del complejo enzimático de la nitrogenasa de *Azotobacter vinelandii*. Las subunidades de los dímeros de las dos proteínas están de color azul, café, rosa y gris. Las subunidades α de la proteína FeMo aparecen de color verde y amarillo, y las subunidades β en rojo y azul intenso (Tomado de Dixon y Kahn, 2004).

La presencia de nitrogenasas alternativas sugiere una ventaja competitiva por la generación de nichos ecológicos que excluyen a microorganismos que carecen de nitrogenasas Mo independientes (Betancourt *et al.*, 2008).

Los genes *nif* están organizados en una unidad transcripcional altamente conservada. Generalmente, los operones de los genes *nif* se encuentran en el orden *nifH*, *nifD* y *nifK* (Figura 3).

Arqueas

M. thermoautotrophicum
Methanococcus maripaludis
Methanosarcina barkeri



Bacterias

Cyanotheca PCC 8801
Cyanotheca ATCC 51142
Anabaena variabilis
Anabaena PCC7120
Clostridium pasteurianum
Klebsiella pneumoniae
Enterobacter agglomerans
Azotobacter vinelandii
Azospirillum brasilense
Rhodobacter capsulatus
Rhizobium sp. NGR 234
Bradyrhizobium japonicum

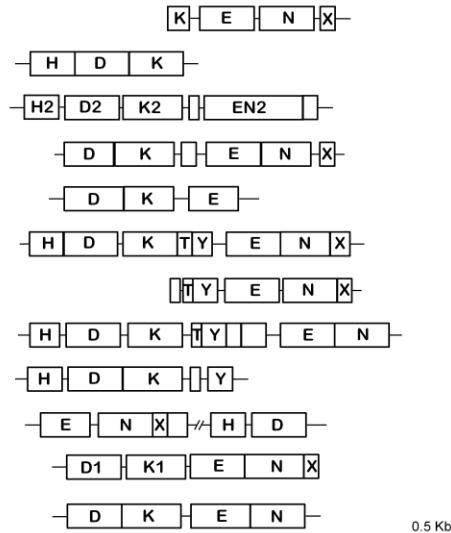


Figura 3. Organización de los genes *nifDK* y *nifEN* en algunas arqueas y bacterias diazótroficas (Tomado de Fani *et al.*, 2000).

La familia de genes de la nitrogenasa ha experimentado una historia genética compleja incluyendo duplicación de genes (Raymond *et al.*, 2004). Muchos organismos tienen copias múltiples u homólogos de los genes de la nitrogenasa. Por ejemplo, *Clostridium* posee 5 copias de los genes *nifH*, mientras que en heliobacterias se encuentra solo una copia de este gen (Enkh-Amgalan *et al.*, 2005). La similitud extensa entre NifD, NifK, NifE y NifN sugiere que los genes individuales se originaron a través de dos duplicaciones de un solo gen ancestral (Fani *et al.*, 2000). Los genes *nif* duplicados que comparten una función original se encuentran en varios diazótroficos, y existen reportes acerca de la diferenciación funcional (Iki *et al.*, 2007).

El requerimiento energético en el proceso de fijación de nitrógeno es muy elevado, por tanto, la síntesis y actividad de la nitrogenasa está altamente regulada.



La síntesis de la nitrogenasa está regulada a nivel transcripcional, en respuesta al nitrógeno disponible.

La sensibilidad de la nitrogenasa al oxígeno, impone características particulares a los diazótrofos, debido a la necesidad de proteger a la enzima del daño por este elemento. Las nitrogenasas convencionales son sensibles al oxígeno; sin embargo, se ha descrito una nitrogenasa que es insensible al oxígeno. Esta se encuentra solo por *Streptomyces thermoautotrophicus*, aunque la reacción catalizada por esta enzima es similar a las nitrogenasas previamente caracterizadas, esta enzima es más eficiente dado que requiere cuatro veces menos ATP que las nitrogenasas convencionales

1.5 Caracterización de diazótrofos en ambientes

En muestras ambientales, el estudio de la diversidad de diazótrofos se lleva a cabo mediante la amplificación del gen *nifH*, ya que la secuencia de la proteína codificada por este gen es altamente conservada y se cuenta con una colección extensa de secuencias albergada en el GenBank.

De esta forma se han detectado gran número de bacterias fijadoras de nitrógeno; sin embargo hasta la fecha, muchas de ellas no han podido cultivarse, debido a sus requerimientos de crecimiento exigentes (Zehr *et al.*, 2003; Bürgmann *et al.*, 2004). La desventaja de las técnicas moleculares es que no aportan información acerca de la fijación de nitrógeno *in situ*; por lo cual se han propuesto otras estrategias, como el uso de isótopos estables como el $^{15}\text{N}_2$ (Buckley *et al.*, 2007).

El análisis de la diversidad de diazótrofos, ha permitido observar que la estructura de las comunidades es diversa y que los filotipos obtenidos directamente de los ambientes no están relacionados con secuencias de cepas previamente caracterizadas.

Son pocos los trabajos que se han realizado para explicar la participación de las bacterias fijadoras de nitrógeno en la mejora de ambientes contaminados. En ellos se reconoce la participación de los diazótrofos en la degradación de hidrocarburos (Chen *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2005). Eckford *et al.*, (2002) aislaron diazótrofos de vida libre en suelos contaminados con derrames de combustibles. A pesar que su trabajo no aportó la evidencia de la fijación de nitrógeno *in situ*, propuso una hipótesis en la cual las bacterias fijadoras de nitrógeno proveen de nitrógeno a los microorganismos que son capaces de degradar hidrocarburos dentro del consorcio. En el caso de residuos mineros, el

conocimiento de los géneros bacterianos que participan en la fijación de nitrógeno, es escaso.

Con base en estudios realizados en invernadero, se sabe del efecto que tienen los metales pesados sobre la fijación de nitrógeno; por ejemplo, el Cd en elevadas concentraciones disminuye la capacidad de fijación de nitrógeno (Chen *et al.*, 2003).

2. Antecedentes

La descripción de plantas pioneras que crecen en jales de minas ubicadas en Zacatecas, México y su capacidad de almacenar metales pesados fue analizado por González y González-Chávez (2006). Con base en la cuantificación de metales presentes en los tejidos de estas plantas, se clasificaron como plantas tolerantes a metales pesados, debido a que poseen la capacidad de crecer en presencia de concentraciones elevadas de estos elementos, sin movilizarlos a sus estructuras aéreas.

El conocimiento acerca de la diversidad bacteriana y su participación en la capacidad de las plantas tolerantes a metales pesados para colonizar los residuos de minas es limitado. Por tal motivo, en nuestro grupo de trabajo se inició la exploración de la diversidad microbiana de las plantas identificadas en las minas de San Martín, Sombrerete y Noria de los Ángeles, ubicadas en Zacatecas. El análisis se realizó mediante técnicas dependientes e independientes del cultivo. Con la construcción de librerías de genes ribosomales a partir de las rizosferas de las plantas, *Viguiera linearis* y *Bahia xylopoda*, se detectaron filotipos bacterianos previamente descritos en residuos mineros que podrían participar en la adaptación de las plantas a la concentración elevada de metales pesados. Así mismo, se detectaron bacterias implicadas en ciclos biogeoquímicos importantes, como el diazótrofo *Azoarcus evansii*, asociado a la rizosfera de *V. linearis* (Navarro-Noya, 2007).

Un proceso tan importante como es la incorporación de nitrógeno a ambientes pobres en nutrientes, se exploró mediante la detección de genes relevantes en el ciclo del nitrógeno (Cuadro 1). Así, se detectaron los genes relacionados con la fijación del nitrógeno (*nifH*), la desnitrificación (*nirS*, *nosZ*), la oxidación del amonio (*amoA*) y la oxidación del nitrito (16S rRNA de miembros del género *Nitrobacter*) en cultivos enriquecidos, obtenidos a partir de la rizosfera de las plantas. Los resultados muestran que el ciclo del nitrógeno se encuentra estimulado.

Cuadro 1. Detección por PCR de genes relevantes del ciclo del nitrógeno en la rizosfera de plantas que crecen en jales de minas.

Gen	San Martín, Sombrerete				Noria de los Angeles			
	No rizosférico	<i>Aster gymnocephalus</i>	<i>Viguiera linearis</i>	<i>Polygonium aviculare</i>	No rizosférico	<i>Haplopappus venetus</i>	<i>Chlorix virgata</i>	<i>Bahia xylopoda</i>
<i>nifH</i> -	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterobacteria								
<i>nifH</i> -Rhizobia	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>nifH</i> -Clostridia	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>nifH</i> -	-	-	-	-	-	-	-	-
Azotobacter								
<i>nifD</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>amoA</i>	-	+	+	+	-	+	-	+
16S rDNA	+	-	+	-	-	+	+	-
<i>Nitrobacter</i>								
<i>nirK</i>	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>nirS</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>nosZ</i>	-	-	-	-	-	+	+	-

nifD* y *nifH: Genes que codifican para la dinitrogenasa y dinitrogenasa reductasa, respectivamente. ***amoA***: Gen que codifica para la amonio monooxigenasa. **16S rRNA de *Nitrobacter***: Detección de oxidadoras de nitrito. ***nirK***: Gen que codifica para la nitrito reductasa. ***nirS***: Codifica para el citocromo cd1. ***nosZ***: Gen que codifica para la oxido nítrico reductasa (Navarro-Noya, 2007)

Por otro lado, se realizó el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno que pertenecen al género *Paenibacillus*, en las cuales se demostró su capacidad diazotrófica mediante la determinación de la actividad de reducción de acetileno. La evidencia de que el ciclo del nitrógeno se encuentra estimulado en estos ambientes, nos sugiere una mayor diversidad de diazótrofos que podrían estar asociados a las rizosferas de las plantas pioneras encontradas en los jales (Navarro-Noya, 2007).

3. Justificación

Los residuos de minas no tienen las condiciones propicias para el desarrollo vegetal debido a que poseen bajo o nulo contenido de materia orgánica, disponibilidad baja de nutrientes esenciales, entre ellos fuente de nitrógeno. Se ha reportado que la asociación de las plantas con los microorganismos es relevante para obtener los elementos esenciales para su crecimiento; principalmente en los procesos que son mediados exclusivamente por microorganismos. Uno de estos mecanismos es la fijación de nitrógeno atmosférico, por lo que su asimilación a través de bacterias es de importancia para el desarrollo de las plantas y por ende para la biorremediación del sitio.

Por estos motivos, consideramos relevante explorar la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico de la microbiota asociada a plantas que crecen en suelos contaminados con metales pesados.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Aislar e identificar a las bacterias implicadas en el proceso de fijación de nitrógeno, presentes en la rizosfera de plantas que crecen en jales de minas en Zacatecas.

4.2 Objetivos particulares

- Promover el desarrollo de microorganismos fijadores de nitrógeno en diversos medios de cultivo a partir de suelo rizosférico de plantas que crecen en jales.
- Identificar los géneros bacterianos capaces de fijar nitrógeno atmosférico mediante la secuencia de sus genes 16S rRNA.
- Explorar por métodos moleculares el potencial de fijación de nitrógeno en la rizosfera de plantas que crecen en jales.

5. Material y métodos

5.1 Diseño general el estudio.

El diseño experimental se presenta en la Figura 4.

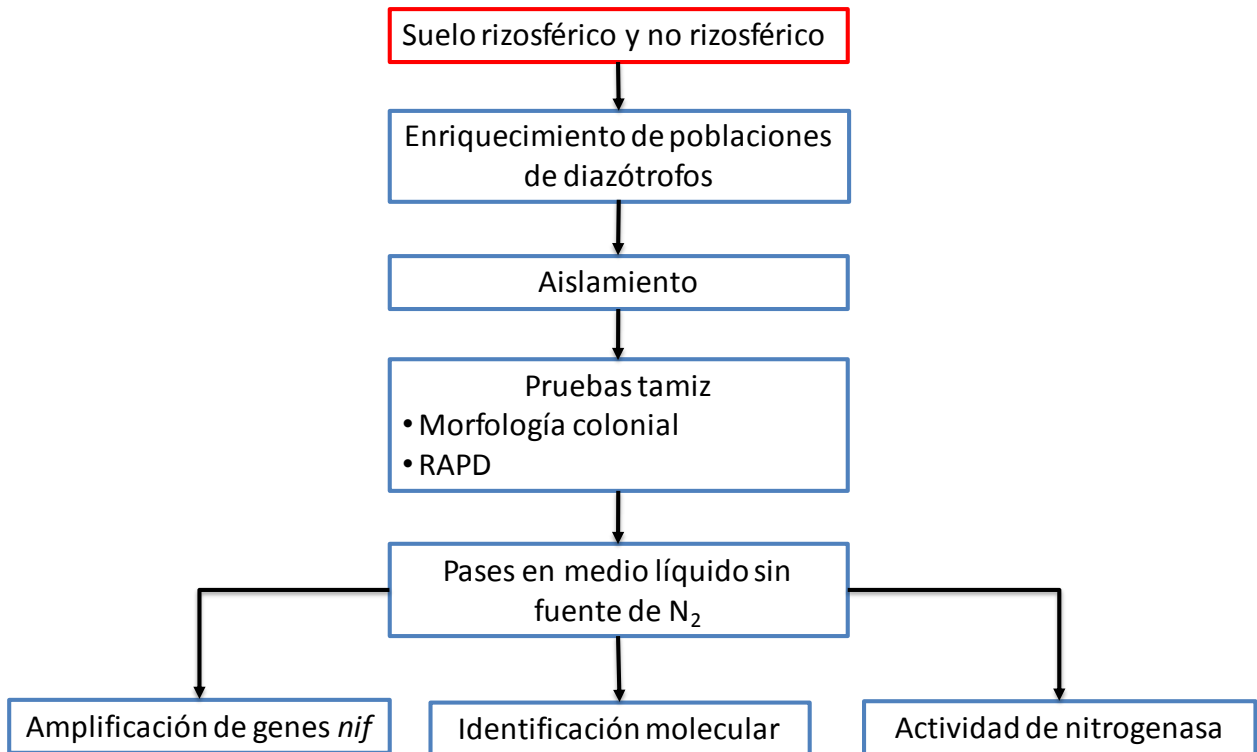


Figura 4. Esquema general de trabajo.

Las muestras de suelo rizosférico se obtuvieron de seis especies de plantas (Cuadro 2) que se encontraron colonizando jales de las minas en San Martín, Sombrerete y de Noria de los Ángeles, ubicadas en Zacatecas. Los suelos fueron proporcionados por la Dra. Ma del Carmen González Chávez, del Departamento de Edafología del Colegio de Posgraduados.

Cuadro 2. Plantas recolectadas en la Mina de San Martín y Noria de los Ángeles

Localidad	Familia	Planta
San Martín, Sombrerete	Compositae	<i>Aster gymnocephalus</i>
		<i>Viguiera linearis</i>
	Polygonaceae	<i>Polygonium aviculare</i>
		Suelo no rizosférico
Noria de los Ángeles	Compositae	<i>Bahia xylopoda</i>
		<i>Haplopappus venetus</i>
	Gramineae	<i>Chloris virgata</i>
		Suelo no rizosférico

5.2 Enriquecimiento de poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno

Se pesó 1g de suelo rizosférico y se suspendió en 100 ml de agua destilada estéril. Se disgregó con agitación durante 5 min a 200 rpm. Se inoculó 1.5 mL de la suspensión del suelo en 13.5 mL en cada uno de los medios de cultivo empleados.

Para el enriquecimiento de diazótrofos heterótrofos de vida libre se realizaron transferencias repetidas en el medio líquido libre de nitrógeno desarrollado por Winogradsky (Hashidoko *et al.*, 2002), el cual se preparó con la siguiente composición por litro de agua desionizada: 10 g de sacarosa, 0.1g de CaCO_3 y 5 mL de solución mineral. La solución mineral consistió de: 50 g/L de K_2HPO_4 , 25g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 g/L de NaCl, 1 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. El medio se ajustó a pH de 6.5 a 6.8 y esterilizó en autoclave. Los tubos inoculados se incubaron a 28 °C y sin agitación. El crecimiento microbiano se consideró como turbidez en el medio de cultivo, lo cual requirió de aproximadamente de 40 días. Posterior a esto se realizaron transferencias repetidas en medio líquido con la misma composición, que fueron incubadas aproximadamente 15 días a 28°C. Después de 5 subcultivos, se realizó el aislamiento de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno inoculando 50 μL de los cultivos de enriquecimiento en placas de medio de Winogradsky suplementado con 1% de extracto de levadura. El tiempo necesario para la aparición de colonias visibles en las placas oscilo entre 48 h y 5 días. De cada morfotipo observado en placa, se sembraron dos colonias. Cada colonia se inoculó en medio líquido PY e incubó durante 24 h a 28°C para ser cosechada y conservada en glicerol al 25% a -70°C, para su posterior procesamiento.

La búsqueda de diazótrofos anaerobios se realizó mediante el enriquecimiento en medio para clostridios sacarofílicos (Skinner, 1971). El contenido del medio, expresado en g/L de agua desionizada fue: 0.8 de K_2HPO_4 , 0.2 de KH_2PO_4 , 0.2 de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 de NaCl, 0.01 de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.01 de $CaCl_2$, 0.025 de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.1 de extracto de levadura, 10 de sacarosa, 1 de tioglicolato de sodio, 10 mL de extracto de suelo y 1 mL de solución de elementos traza. La solución de elementos traza se preparó con 50 mg/L de cada uno de los siguientes compuestos: $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, $CoNO_3 \cdot 6H_2O$, $CdSO_4 \cdot 2H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ y $MnSO_4 \cdot H_2O$. El extracto de suelo se obtuvo con pesos iguales de suelo de jardín y agua, se mezcló y calentó a 125°C durante una hora. Después de enfriado, se filtró y esterilizó en autoclave. Los tubos inoculados con la suspensión del suelo se incubaron en una jarra de anaerobiosis a 28°C durante 2 semanas.

5.3 Análisis PCR-RAPD

Se realizó PCR-RAPD (amplificación aleatoria del DNA polimórfico) como un criterio adicional a la morfología colonial para la selección de los aislados a identificar, partiendo del supuesto de que los perfiles desplegados similares corresponden a la misma especie bacteriana.

Se obtuvo el DNA genómico de cada uno de los aislamientos mediante la técnica de CTAB, previamente descrita (Sambrook *et al.*, 2002).

Para la PCR-RAPD se utilizó una mezcla de reacción que contenía 20 ng/ μ L de DNA templado, 2.5 μ L de buffer 10X (5 mM KCl, 1 mM Tris-HCl, pH 9), 3 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTP's, 50 pM del iniciador OPB-01 (5'-GTT TCG CTC C-3') (Williams *et al.*, 1990) y 1 U de Taq polimerasa, ajustando la reacción a 25 μ L con agua destilada. La amplificación se llevó a cabo con un ciclo inicial a 94°C durante 10 min; seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineamiento a 40°C por un min y extensión a 72°C por 2 min; y un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 min.

5.4 Selección de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno

Con el propósito de confirmar que los aislamientos recuperados a partir de los enriquecimientos eran capaces de crecer en ausencia de nitrógeno combinado, se realizó la inoculación de cada una de las colonias seleccionadas en medio líquido libre de N_2 . Se

consideraron posibles bacterias fijadoras de nitrógeno aquellas que crecieron después del segundo pase en medio líquido.

5.5 Actividad de la nitrogenasa

La actividad de nitrogenasa se determinó utilizando la técnica de reducción del acetileno que verifica la capacidad de fijación de nitrógeno por parte de los aislados. Para esto, se utilizaron los medios semisólidos de Winogradsky; el medio WAT4C (Bergue *et al.*, 1991) que incluye glucosa, almidón, ácido málico y manitol como fuentes de carbono; y el medio WAT4C modificado en el que se sustituyó el almidón por sacarosa.

Los cultivos puros se crecieron en frascos de 10 mL de volumen que contenían 5 mL de medio de cultivo. Después de 48 h de incubación a 30°C, los frascos fueron sellados herméticamente con tapones de hule y se les inyectó acetileno a una concentración de 1% por reemplazo de un volumen idéntico de aire y se incubó durante cinco días a 30°C. La cantidad de etileno producido se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a ionización de flama. Se realizaron tres replicas para validar el resultado, empleando la cepa de *Klebsiella variicola* F2R9 como testigo positivo y frascos sin inocular se emplearon como testigo negativo. La cantidad de etileno formado se expresó en nanomoles de etileno (C₂H₄) por hora por cultivo.

5.6 Identificación molecular mediante el análisis del gen 16S rRNA

La identificación de los microorganismos aislados se realizó mediante la amplificación del gen 16S rRNA, utilizando la siguiente mezcla de reacción: 20 ng/μL de DNA templado, 2.5 μL de buffer 10X, 3 mM de MgCl₂, 0.25 mM de DNTP's, 10 pM de cada iniciador, 1 U de Taq polimerasa, ajustando la reacción a 25 μL con agua destilada. Los iniciadores utilizados fueron 8 (5'-GCG GAT CCG CGG CCG CTG CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') y 1492 (5'-GGC TCG AGC GGC CGC CCG GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') descritos previamente (Relman, 1993). Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de desnaturalización a 94°C durante siete min; 35 ciclos de desnaturalización inicial a 94°C por un min, hibridación a 55°C por un min y extensión a 72°C por siete min; y un ciclo de extensión final a 72°C durante 7 min.

5.7 Amplificación de los genes *nif*

La detección de los genes *nifD* y *nifH* es de utilidad para explorar el potencial biológico de fijación de nitrógeno, tanto en ambientes como en cepas aisladas. La amplificación de los genes *nifH* se realizó utilizando un conjunto de iniciadores previamente descritos para diversos grupos microbianos, así como un par de iniciadores dirigidos a la secuencias del gen *nifD* (cuadro 3).

Cuadro 3. Iniciadores empleados para la amplificación de los genes *nifD* y *nifH*

Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Fragmento esperado (pb)	Tm (°C)	Referencia	
nifHEntero-F	ACACCATTATGGAGATGG	660	63	Navarro-Noya, 2007	
nifHEntero-R	CTGATGGAGTTCGGCATC				
nifHAzo-F	GACTCCACCCGCCTGATCCT	550	60		
nifHAzo-R	ATGACCGTGATCGAATACGATC				
nifHRFZ-F	TYGGCAAGTCCACCACC	400	55		
nifHRFZ-R	TCCGGYGAGATGATGGCGC				
nifD – F	CGCGGCTGCGCCTAYGCMGG	1100	64		
nifD – R	GARTGCATCTGRCGGAAMGG				
nifH – F	TACGGNAARGSGGNATCGGCAA	780	60		Laguerre <i>et al.</i> , 2001
nifH – I	AGCATGTCYTC SAGYTCNTCCA				

La mezcla de reacción utilizada para la PCR contenía: 10 – 100 ng/μL de DNA templado, 2.5 μL de buffer 10X (5 mM KCl, 1 mM Tris-HCl, pH 9), 3 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 10 pM de cada iniciador, 1.5 U de Taq polimerasa, ajustando la reacción a 25 μL con agua destilada. Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de desnaturalización inicial 94°C durante siete min, seguidos de 35 ciclos con temperaturas de desnaturalización, alineamiento y polimerización de 94°C por un min, Tm (temperatura definida para cada gen) por un min y 72°C por un min, respectivamente y un ciclo de extensión final a 72°C durante diez min.

5.8 Análisis de secuencias

Los amplificadores obtenidos se purificaron con el paquete de reactivos “DNA Purification Kit” (QIAGEN). La secuenciación de productos de PCR purificados se realizó de manera automatizada con un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE (Applied Biosystems), realizando reacciones de secuenciación a partir del extremo 5' y 3'.

Las secuencias obtenidas se sometieron a una búsqueda de secuencias similares en GenBank por medio del programa BLASTN versión 2.2.3 en la página de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para obtener el mejor alineamiento, se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias utilizando el programa CLUSTALX, versión 2.0.5, mismos que fueron editados manualmente con el programa Seaview.

Las relaciones filogenéticas entre las secuencias se estableció por métodos de distancia. El modelo de sustitución nucleotídica para estimar las distancias evolutivas (E_D) se eligió con base en las frecuencias nucleotídicas determinadas con el programa DAMBE y el índice de transiciones y transversiones se calculó con el programa MEGA versión 2.1. Para obtener los árboles filogenéticos se empleó el paquete de programas computacionales MEGA versión 2.1, se utilizó el método de agrupamiento de Neighbor Joining y se realizó un análisis de remuestreo tipo “bootstrap” con 1,000 aleatorizaciones. La afiliación filogenética se realizó con base en los criterios establecidos por Rosello-Mora y Amann (2001), los cuales consideran >95, 95>97.5 y >97.5% como límites para definir los niveles taxonómicos de familia, género y especie, respectivamente.

6. Resultados.

6.1 Enriquecimiento de poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno.

Para obtener a los diazótrofos heterótrofos aerobios se realizaron cultivos de enriquecimiento, inoculando el suelo rizosférico de plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados y suelos no rizosféricos en medio libre de nitrógeno, lo que permitió obtener 58 aislados (Cuadro 4). La morfología microscópica mostró que la mayoría de los aislados correspondieron a bacilos Gram negativos y en menor proporción a bacilos Gram positivos. Por otro lado, bajo las condiciones de cultivo probadas, no se observó crecimiento bacteriano en el medio empleado para el enriquecimiento de diazótrofos anaerobios.

Cuadro 4. Número de aislados encontrados en las muestras de suelo incluidos en el estudio

Localidad	Origen del suelo	Planta	Número de aislados
	No rizosférico	-----	3
San Martín, Sombrerete	Rizosférico	<i>Aster gymnocephalus</i>	9
		<i>Viguiera linearis</i>	12
		<i>Polygonum oviculare</i>	2
Noria de los Ángeles	Rizosférico	<i>Bahia xylopoda</i>	8
		<i>Haplopappus venetus</i>	8
		<i>Chloris virgata</i>	7
	No rizosférico	-----	9
		Total	58

6.2 Análisis PCR-RAPD

En el análisis se incluyeron los 58 aislados seleccionados mediante morfología colonial, de los cuales se obtuvo su perfil de RAPD utilizando el iniciador OPB-01. Así, se obtuvieron 30 perfiles de RAPD, 13 de los aislados no desplegaron ningún patrón con las condiciones probadas. Los aislados que no se asociaron a alguno de los patrones electroforéticos observados se incluyeron en los ensayos posteriores como si se tratara de perfiles de RAPD adicionales. Con base en este criterio, en los suelos provenientes de la mina de San Martín, Sombrerete, se observaron siete perfiles en los aislados de la rizosfera de *A. gymnocephalus*, nueve en los aislados de *V. linearis*, uno en los aislados

de la rizosfera de *P. oviculare* y tres en los del suelo no rizosférico. En las muestras colectadas en el jal de Noria de los Ángeles se determinaron siete perfiles en la rizosfera de *B. xylopoda*, seis en *H. venetus*, seis en *C. virgata* y ocho en el suelo no rizosférico (Cuadro 5).

Cuadro 5. Clasificación de los aislados mediante la técnica de PCR-RAPD

Mina	Origen	Perfil RAPD	Aislados	Mina	Origen	Perfil RAPD	Aislados
San Martín, Sombrete	Suelo no	I	A1	Noria de los Ángeles		XVII	E1
	Rizosférico	II	A2		SP ^a	E3	
		III*	A3		<i>Bahia</i>	XVIII	E4,E6
	<i>Aster gymnocephalus</i>	IV	B2,B3,B4		<i>xylopoda</i>	SP ^a	E5
		V	B5			XIX	E7
		VI	B6			XX*	E8
		VII	B7			XXI	E9
		VIII*	B8		<i>Haplopappus venetus</i>	VIII*	F1
		IX	B9			XX*	F2,F7,F8
		X	B10			XXII	F3
		XI	C1,C9,C10,C12			SP ^a	F4
	<i>Viguiera Linearis</i>	III*	C2		XXIII*	F5	
		SP ^a	C3		SP ^a	F6	
		SP ^a	C4		Suelo no rizosférico	SP ^a	G1
		XII	C5			SP ^a	G2
		XIII	C6			SP ^a	G3
		XIV	C7			XXIV	G4
		SP ^a	C8			XXIII*	G5,G7
	XV	C11	SP ^a			G6	
	<i>Polygonum Oviculare</i>	XVI	D1,D2			SP ^a	G8
			XXV	G9			
			<i>Chloris Virgata</i>	XXVI	H2,H6		
				XXVII	H3		
				XXVIII	H4		
				XXIX	H5		
				XXX	H7		
				SP ^a	H8		

^a : Aislados que no desplegaron ningún perfil bajo las condiciones probadas

* : Perfiles RAPD compartidos entre las rizosferas bajo estudio

Los aislados que compartieron perfiles de RAPD semejantes dentro de la misma rizosfera, se agruparon y solo un aislado representativo fue incluido en los siguientes análisis.

Mediante el análisis RAPD se observó que, en general, los aislados obtenidos de las distintas muestras de suelo exhibieron perfiles diferentes. Sin embargo, se pudo apreciar que entre los aislados de las rizosferas y del suelo no rizosférico, colectado en el mismo sitio, se encontraron perfiles similares; tal es el caso de *V. linearis* (perfil III) y *H. venetus* (perfil XIII). Por otro lado, se observó que las rizosferas de *B. xylopoda* y *H. venetus* presentan bacterias con perfil compartido (perfil XX). Interesantemente, se encontró un perfil de RAPD similar en los aislados de las rizosferas de *A. gymnocephalus* y *H. venetus* (Perfil VIII), dos plantas procedentes jales de minas diferentes (Figura 5).

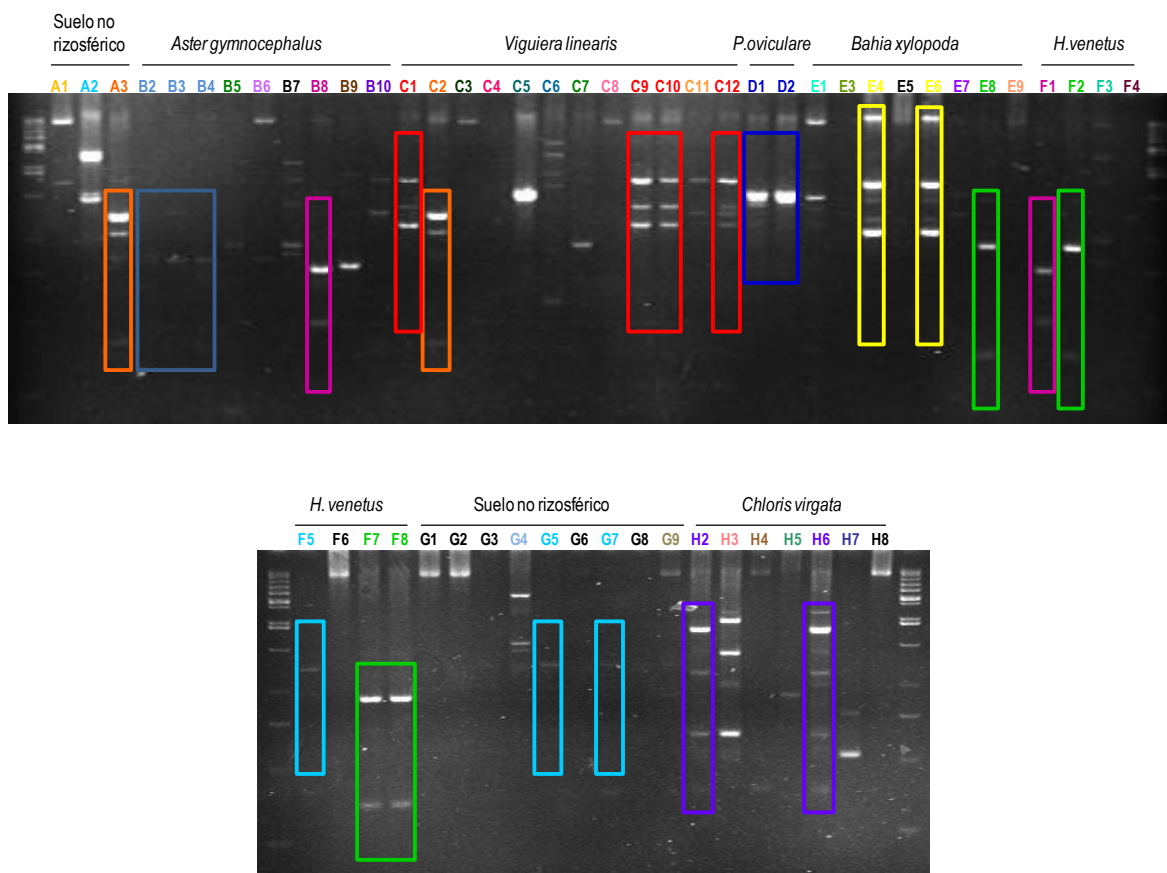


Figura 5. Patrones electroforéticos obtenidos por la técnica de PCR-RAPD del DNA genómico de las bacterias aisladas a partir de suelos no rizosféricos y rizosféricos de plantas colectadas en jales de minas de Zacatecas. Las muestras y los números de los aislados se indican en la parte superior de los pozos.

Los resultados muestran la importancia de incluir un criterio adicional a la morfología colonial, cuando se realiza el aislamiento de bacterias ambientales, ya que microorganismos que presentan la misma morfología colonial, pueden presentar diferencias genotípicas.

6.3 Selección de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno

El hecho de que una bacteria pueda crecer en un medio que no contiene fuente de nitrógeno, sugiere que se trata de un microorganismo diazotrofo. Sin embargo, se deben tomar en cuenta dos consideraciones: a) en medio sólido una bacteria no diazotrofa puede crecer utilizando las trazas de nitrógeno presentes en el agar y b) en los cultivos de enriquecimiento se desarrollan bacterias mutualistas que se valen del nitrógeno incorporado al medio por los diazotrofos para sustentar su crecimiento. Por tal motivo, es necesario corroborar la capacidad de cada uno de los aislados para crecer en ausencia de nitrógeno combinado.

Tomando como base los perfiles RAPD, 43 aislados representativos se sembraron en medio líquido libre de nitrógeno, de las cuales, 13 fueron capaces de crecer después de dos subcultivos. Todas ellas, excepto la cepa G1, estaban asociadas a las rizosferas analizadas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Aislamientos que crecieron en ausencia de nitrógeno combinado

Sitio	Origen	Planta	Aislado
	Suelo no rizoférico	----	----
San Martín, Sombrerete		<i>Aster gymnocephalus</i>	B2, B7, B8
	Suelo rizoférico	<i>Viguiera linearis</i>	C5,C7,C8
		<i>Polygonum aviculare</i>	----
Noria de los Ángeles		<i>Bahia xylopoda</i>	E6
	Suelo rizoférico	<i>Haplopappus venetus</i>	F2,F6
		<i>Chloris virgata</i>	H2,H3,H5
	Suelo no rizoférico		G1

6.4 Identificación molecular

Se realizó la amplificación del gen 16S rRNA a partir del DNA genómico de las 13 cepas asiladas con posible capacidad para fijar nitrógeno, obteniendo un producto de PCR de aproximadamente 1500 pb (Figura 6).

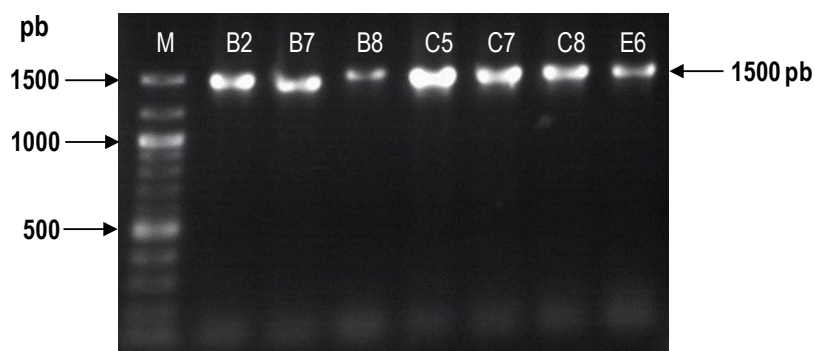


Figura 6. Fotografía que muestra la amplificación del gen 16S rRNA de los aislados obtenidos a partir de suelo rizosférico de plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados. M, marcador de talla molecular; B2, B7, B8, C5, C7, C8 y E6, corresponden a los productos de PCR del gen 16S rRNA obtenidos a partir del DNA genómico de los aislados.

El análisis de similitud entre las secuencias parciales del gen 16S rRNA de los aislados y las depositadas en el GenBank, mediante el análisis tipo BLAST mostró que 12 de los aislados de las rizoferas pertenecen a la división de las α -proteobacterias, y están relacionados con miembros de los géneros *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*, *Inquilinus*, *Sphingomonas* y *Rhizobium*. En tanto que uno de los aislados de la rizosfera de *V. linearis* pertenece al phylum Actinobacteria, y se relacionó con miembros del género *Agromyces* (Cuadro 7).

La identificación molecular nos permitió corroborar que algunos de los aislados que crecieron en medio libre de nitrógeno, efectivamente, son diazótrofos ampliamente estudiados como es el caso de los aislados B2 y F6, identificadas como *Azospirillum lipoferum*.

Los microorganismos que son miembros de los géneros *Sphingomonas xenophaga*, *Inquilinus ginsengisoli*, *Agromyces mediolanus* y *Brevundimonas vesicularis* no se han reportado como bacterias fijadoras de nitrógeno.

Cuadro 7. Aislados obtenidos a partir de suelos rizosféricos de plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados.

Cepa ^a	Secuencia con mayor homología (No. de acceso al GenBank)	% Similitud ^b	Identificación ^c
B2	<i>Azospirillum lipoferum</i> (DQ787328)	99.2	<i>Azospirillum lipoferum</i>
B7	<i>Sphingomonas xenophaga</i> (AY611716)	98.7	<i>Sphingomonas xenophaga</i>
B8	<i>Inquillinus ginsengisoli</i> (AB245352)	99.8	<i>Inquillinus ginsengisoli</i>
C5	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (FJ025097)	99.4	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
C7	<i>Sphingomonas xenophaga</i> (AY611716)	98.9	<i>Sphingomonas xenophaga</i>
C8	<i>Agromyces mediolanus</i> (D45052)	98.5	<i>Agromyces mediolanus</i>
E6	<i>Rhizobium huautlense</i> (AF025852)	97.2	<i>Rhizobium</i> sp.
F2	<i>Rhizobium galegae</i> (AY509213)	96.4	<i>Rhizobium</i> sp
F6	<i>Azospirillum lipoferum</i> (DQ787328)	98.8	<i>Azospirillum lipoferum</i>
G1	<i>Brevundimonas vesicular</i> (AJ227781)	99.1	<i>Brevundimonas vesicular</i>
H2	<i>Rhizobium huautlense</i> (AF025852)	99.5	<i>Rhizobium huautlense</i>
H3	<i>Rhizobium huautlense</i> (AF025852)	100	<i>Rhizobium huautlense</i>
H5	<i>Rhizobium etli</i> (AY509210)	96.5	<i>Rhizobium</i> sp.

^a Seleccionada por crecimiento en tres pases consecutivos en medio líquido

^b El porcentaje de similitud se obtuvo considerando el número de sustituciones nucleotídicas entre las secuencias analizadas dividida entre el total de pares de bases comparadas x 100.

^c Los porcentajes de similitud nucleotídica entre la secuencia problema y la secuencia con más homología define género y especie, 95 y 97.5 % respectivamente (Rosello-Mora y Amam, 2001).

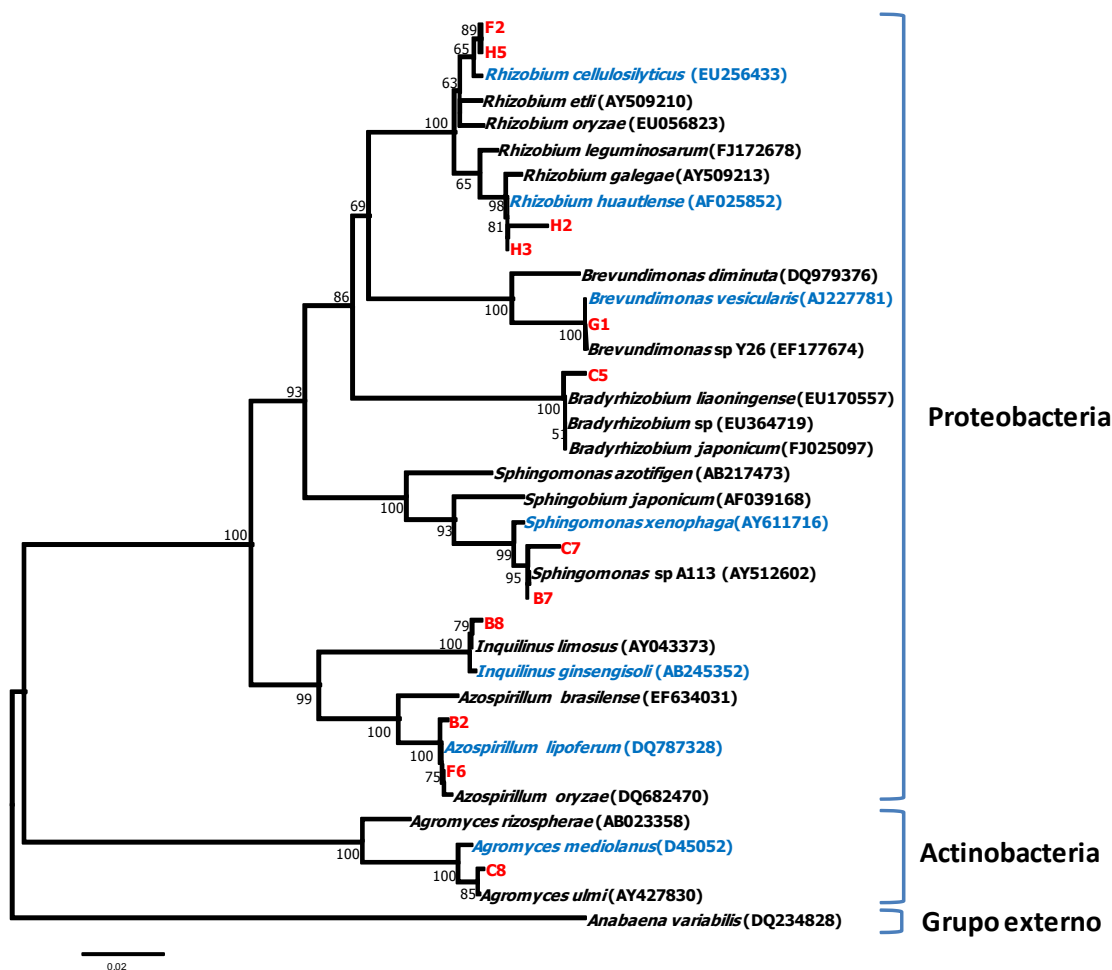


Figura 7. Filograma de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de las bacterias aisladas de las rizosferas de plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados. El árbol se construyó mediante la comparación de 1300 bases, utilizando el método de agrupamiento “Neighbor Joining” y el índice de distancia Kimura 2 Parámetros. La topología se evaluó usando el método de remuestro tipo “Bootstrap” con 1,000 replicas. La barra indica el número de cambios en toda la secuencia.

6.5 Determinación de la actividad de nitrogenasa

La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico por parte de los aislados identificados, se determinó mediante ensayos de actividad de reducción de acetileno (ARA). Se encontró que los aislados identificados como *Azospirillum lipoferum*, redujeron acetileno cuando el ensayo se realizó utilizando el medio WAT4C modificado. Los resultados se muestran en el Cuadro 8.

Las cepas identificadas como *Inquilinus ginsengisoli* (B8), *Bradyrhizobium* sp. (C5), *Sphingomonas xenophaga* (C7) y *Agromyces mediolanus* (C8) mostraron inconsistencias en la prueba de ARA cuando se realizaron las réplicas del ensayo. Se observó que dos de las tres réplicas no mostraron actividad. Se comprobó la pureza de los cultivos, descartando así la contaminación como posible causa de la inconsistencia. El resto de los aislados incluidos en el ensayo no mostraron actividad.

Cuadro 8. Actividad de la nitrogenasa de los aislados obtenidos a partir de las rizosferas de plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados

Cepa	Actividad de reducción de acetileno (nmol C ₂ H ₄ /h/tubo)*
<i>Azospirillum lipoferum</i> (B2)	0.84 ± 0.12
<i>Azospirillum lipoferum</i> (F6)	0.91 ± 0.12
<i>Klebsiella variicola</i> F2R9 ^a	64.46 ± 0.75

* Los valores son el promedio de 3 réplicas.

^a Cepa utilizada como control positivo.

6.6 Amplificación de los genes *nif*

6.6.1 Detección de los genes *nif* a partir del DNA genómico de los aislados identificados

Se realizó la amplificación de los genes *nifD* y *nifH* para detectar el potencial biológico de fijación de nitrógeno, a partir del DNA de los aislados reconocidos como posibles diazótrofos.

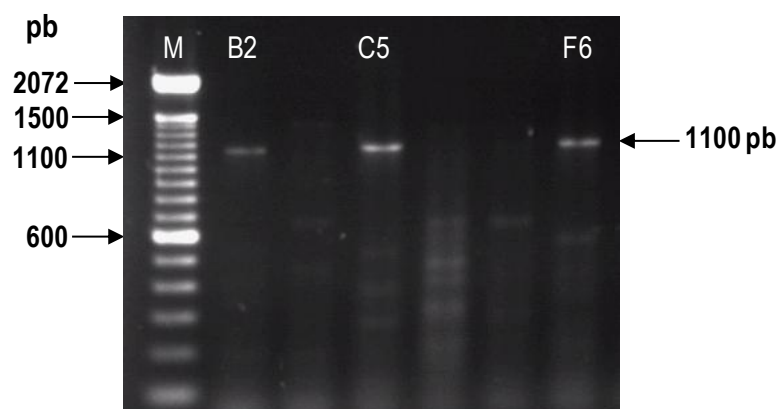


Figura 8. Fotografía que muestra la amplificación del gen *nifD* de *Azospirillum lipoferum* (B2 y F6) y *Bradyrhizobium* sp. (C5).

Con los iniciadores sugeridos para la amplificación del gen *nifD* se obtuvieron bandas que corresponden al tamaño esperado de 1100 pb en los aislados identificados como

Azospirillum lipoferum (B2, F6), *Bradyrhizobium* sp. (C5), *Sphingomonas xenophaga* (C7), *Agromyces mediolanus* (C8) y *Rhizobium* sp. (E6, F2, H5).

Hasta este momento, solo se tiene secuenciado el gen *nifD* de *Bradyrhizobium* sp. La secuencia de aminoácidos deducidos de la secuencia nucleotídica del gen *nifD* de dicha cepa mostró una alta similitud con la secuencia de NifD de *Bradyrhizobium* sp. disponible en la base de datos del GenBank. Se compararon 218 residuos de aminoácidos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos del NifD del aislado C5 con las secuencias con más alta homología del GenBank.

Microorganismo ^a (No. de acceso al GenBank)	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (ABQ45337)	<i>Azorhizobium</i> <i>caulinodans</i> (YP001523956)	<i>Xanthobacter</i> <i>autotrophicus</i> (YP00141500)	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (C5)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (ABQ45337)	ID	94.4	93.1	99.5
<i>Azorhizobium</i> <i>caulinodans</i> (YP001523956)	94.4	ID	96.7	94.0
<i>Xanthobacter</i> <i>autotrophicus</i> (YP00141500)	93.1	96.7	ID	92.6
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (C5)	99.5	94.0	92.6	ID

^a Elegidos con base en un análisis BLASTn y BLASTx

Por otro lado, se utilizaron los 4 pares de oligonucleótidos sugeridos para la amplificación del gen *nifH* de diferentes grupos microbianos. Con los iniciadores denominados RFZ (*Rhizobium*- *Frankia*- *Azospirillum*) se obtuvo una banda de aproximadamente 400 pb (Figura 9) en la cepa identificada como *Azospirillum lipoferum*. Los oligonucleótidos para detectar el gen *nifH* de bacterias relacionadas con *Azotobacter* (*nifH* Azo F y R), *Rhizobium* (*nifH*-F e I) y enterobacterias (*nifH*-entero F y R) no produjeron amplificadas.

La secuencia de aminoácidos deducidos de la secuencia nucleotídica del gen *nifH* de la cepa F6 mostró una alta similitud con la secuencia de NifH de *Azospirillum brasilense*, al comparar 135 residuos de aminoácidos (Cuadro 10), lo cual llama la atención considerando que la cepa fue identificada como *A. lipoferum* mediante el análisis de la secuencia parcial del gen 16S rRNA.

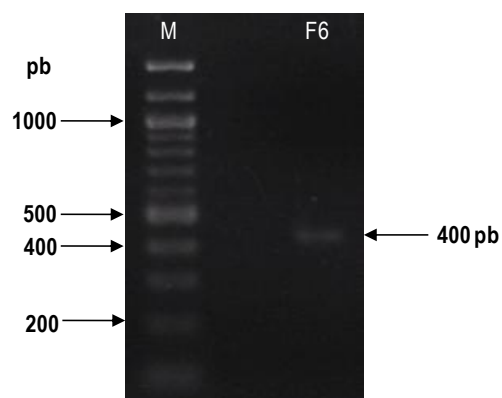


Figura 9. Fotografía que muestra la amplificación del gen *nifH* con los iniciadores RFZ-1 y RFZ-2

Cuadro 10. Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos de NifH de la cepa F6 con las secuencias con homología más alta del GenBank.

Microorganismo ^a (No. de acceso al GenBank)	<i>Azospirillum brasilense</i> (P17303)	<i>Azospirillum lipoferum</i> (AAV49035)	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (YP001600720)	F6
<i>Azospirillum brasilense</i> (P17303)	ID	98.5	97.0	99.2
<i>Azospirillum lipoferum</i> (AAV49035)	98.5	ID	95.5	97.7
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (YP001600720)	97.0	95.5	ID	96.2
F6	99.2	97.7	96.2	ID

^a Elegidos con base en un análisis BLASTn y BLASTx

6.6.2 Detección de los genes *nif* a partir del DNA metagenómico de los cultivos de enriquecimiento

Las características de cultivo de los diazótrofos son muy variadas debido a que la expresión de los genes que codifican para la nitrogenasa se ve afectada por factores como la cantidad de oxígeno presente en el medio, el cual suele ser requerido de manera diferente para cada tipo de microorganismo. Basados en esta premisa, se realizó la exploración de los diazótrofos que pudieran crecer solo en medio líquido mediante la detección de los genes *nif* a partir del DNA metagenómico de los cultivos de enriquecimiento.

Interesantemente, se obtuvo una banda del tamaño esperado para la amplificación del gen *nifD* en el suelo no rizosférico colectado en Noria de los Ángeles (Figura 10) y la

rizosfera de *Polygonum oviculare* (dato no mostrado); en estos suelos no se obtuvieron aislamientos con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.

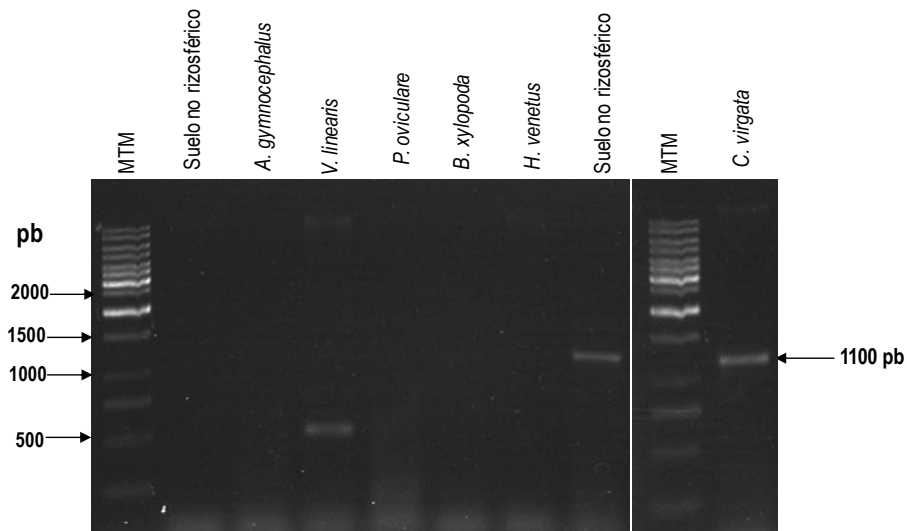


Figura 10. Fotografía que muestra la amplificación del gen *nifD* a partir de DNA metagenómico de los cultivos de enriquecimiento de suelos no rizosféricos y rizosféricos asociados a plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados.

Actualmente se están realizando esfuerzos para construir librerías de los genes obtenidos a partir del metagenoma de los cultivos de enriquecimiento para identificar a los posibles diazotrofos que no fueron cultivados.

Se realizó la búsqueda de los genes *nifH* utilizando los 4 pares de oligonucleótidos propuestos sin obtener amplificación en ninguno de los enriquecimientos.

7. Discusión

En ambientes donde el nitrógeno es un recurso limitado, las bacterias fijadoras de nitrógeno representan un componente muy importante del ecosistema. La estructura de la comunidad de los diazótrofos en un hábitat tiene un significado funcional, de manera que la tasa de fijación de nitrógeno varía en función de la diversidad de estos organismos (Hsu y Buckley, 2009).

Con el propósito de identificar a los géneros que componen la comunidad de diazótrofos asociadas a la rizosfera de plantas que colonizan sitios con una concentración elevada de metales pesados y con una disponibilidad baja de elementos nutricionales esenciales, se realizó el cultivo de bacterias fijadoras de nitrógeno.

Se obtuvieron 13 aislados que fueron capaces de crecer en medio libre de nitrógeno. Los aislados fueron identificadas mediante el análisis de la secuencia parcial del gen 16S rRNA como *Azospirillum lipoferum*, *Sphingomonas xenophaga*, *Inquilingus ginsengisoli*, *Bradyrhizobium* sp., *Agromyces mediolanus*, *Brevundimonas vesicularis*, *Rhizobium huautlense* y *Rhizobium* sp. Géneros como *Azospirillum* y los rizobios son diazótrofos estudiados ampliamente, mientras que el resto no ha sido reportado, hasta nuestro conocimiento, como especies capaces de fijar nitrógeno.

La escasa diversidad encontrada podría deberse a que los fijadores de nitrógeno de vida libre son muy sensibles a la contaminación por metales pesados (Oliveira y Pampulha, 2006). Es importante hacer notar, que posiblemente algunos de los microorganismos que están llevando a cabo el proceso de fijación de nitrógeno en este ambiente pertenezcan a la fracción no cultivable, o bien, que las condiciones en que se realizaron los cultivos, no fueron las adecuadas para dichos microorganismos.

Nuestros resultados concuerdan con reportes previos, en los que mediante métodos basados en el cultivo y técnica moleculares, se describió la presencia de diversas especies de *Rhizobium* y *Sphingomonas* en las rizosferas de plantas hiperacumuladoras de níquel, *Alyssum murale* y *Thlaspi goesingense* (Idris et al., 2004; Abou-Shanab et al., 2007); aunque en estos trabajos no se analizó el papel de *Rhizobium* como fijador de nitrógeno. Por otro lado, *Azospirillum* y *Bradyrhizobium* se han descrito en las rizosferas de plantas colonizantes (*Gymnostoma webbianum* y *Serianthes calycina*) de residuos mineros, donde el metal predominante era níquel (Héry et al., 2005). *Inquilingus*

ginsengisoli y *Brevundimonas vesicularis* no se han reportado en suelos rizosféricos de plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados.

Es importante mencionar que existen diferencias notables entre los resultados obtenidos en el presente trabajo y los derivados de una investigación previa realizada por Navarro-Noya (2007), en la que analizan las mismas rizosferas. Por un lado, los microorganismos obtenidos por enriquecimiento en medio libre de nitrógeno, a partir de las rizosferas de *Viguiera linearis* y *Bahia xylopoda*, no fueron detectados en las librerías de genes ribosomales construidas para analizar la diversidad microbiana asociada a estas plantas. Así mismo, los diazótrofos *Azoarcus evansii* (detectado en la librería de genes ribosomales de la rizosfera de *V. linearis*) y las cepas aisladas correspondientes al género *Paenibacillus* a partir de la rizosfera de *A. gymnocephalus*, no fueron aisladas utilizando el medio de Winogradsky. Esto se atribuye a que los requerimientos nutricionales de estas bacterias son diferentes a los proporcionados en el medio de empleado en este trabajo.

Uno de los hallazgos interesantes fue el aislamiento de *Rhizobium* en un medio libre de nitrógeno. Sin embargo, al realizar la prueba de ARA, no observamos actividad de esta cepa; dichos resultados han sido documentados por otros autores (Chowdhury *et al.*, 2007). Se debe tener en cuenta que las especies de *Rhizobium* son habitantes comunes del suelo; si bien, la simbiosis rizobios-leguminosa es altamente estable, la interacción no puede llamarse permanente u obligada (Kneip *et al.*, 2007). Una medida de la adaptación de *Rhizobium*, es la persistencia de las cepas en los suelos aun en ausencia de su planta hospedera. Se ha observado que los aislados simbióticos se encuentran en una frecuencia relativa de 1 en 40 con cepas de *Rhizobium* no simbióticos en la rizosfera de frijol (Segovia *et al.*, 1991; Sullivan *et al.*, 1996).

La capacidad de fijar nitrógeno *ex planta* por parte de *Rhizobium* es un hecho no aceptado, debido a que diversos estudios demuestran que la expresión de los genes implicados en la síntesis de la nitrogenasa y la regulación del proceso de fijación de nitrógeno requiere de señales transmitidas por la planta (Miller *et al.*, 2007) y de la diferenciación de *Rhizobium* a formas de bacteroides, lo cual solo ocurre dentro de los nódulos formados en la planta (Yang *et al.*, 1991). Sin embargo, existen trabajos en los que se demostró la actividad de nitrogenasa *in vitro* de cepas de *R. leguminosarum*,

cuando estas fueron cultivadas en medios que contenían succinato, uracilo o asparagina, bajo condiciones controladas de tensión de oxígeno (Stam *et al.*, 1986; Urban *et al.*, 1986).

Al igual que Chowdhury y cols, (2007), no se obtuvieron amplicones cuando se realizó la PCR para la detección de genes *nifH* en las cepas identificadas como *Rhizobium*, pero si obtuvimos bandas del tamaño esperado cuando se realizó la PCR con los iniciadores propuestos para el gen *nifD* de algunos de los aislados (E6, F2, H5). Las cepas de *Rhizobium* en las que no se obtuvo amplificado de *nifH* o *nifD*, fueron las dos cepas identificadas como *Rhizobium huautlense*. Esto puede deberse a que los iniciadores empleados no son adecuados; sin embargo, es importante verificar si las cepas contienen el plásmido que porta los genes *nif*. Esto podría realizarse mediante pruebas de nodulación o bien detectando la secuencia de los genes *nod*, ya que dichos genes están localizados en el mismo plásmido que los genes *nif* (Bender *et al.*, 1986; Chowdhury *et al.*, 2007).

Otro de los rizobios aislados fue *Bradyrhizobium*, el cual se encontró asociado a la rizosfera de *Viguiera linearis*. El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA, nos permitió identificar al género de *Bradyrhizobium*. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 7, este gen no es útil para identificar a nivel de especie ya que no nos permite resolver las relaciones entre el aislado obtenido y las secuencias depositadas en el GenBank. Para la identificación de este rizobio, a nivel de especie, es necesario realizar el análisis del ITS.

La capacidad de *Bradyrhizobium* para fijar nitrógeno en vida libre está bien documentada cuando se cultiva en medios que contienen glutamato (Bender *et al.*, 1986). Pese a esto, no se existen trabajos en el que se analice su importancia como diazótrofo de vida libre en los nichos en los que se encuentra.

Tanto *Rhizobium* como *Bradyrhizobium* se han aislado en suelos rizosféricos de plantas en ambientes estresados por metales pesados, observando que se comportan como PGPR, debido a que poseen la capacidad de producir AIA y sideróforos, además se ha probado que adquieren resistencia cuando se encuentran en suelos contaminados con metales pesados (Khan *et al.*, 2009). Esto sugiere una participación distinta a la fijación de

nitrógeno por parte de los rizobios, posiblemente inmovilizando metales pesados por efecto de los sideroforos o bien por la promoción en el crecimiento de las raíces.

Particularmente interesante fue aislar cepas de *Azospirillum*, ya que es uno de los géneros más estudiados por su importancia como PGPR. *Azospirillum lipoferum* es una bacteria Gram negativa, fijadora de nitrógeno de vida libre, que se encuentra generalmente como bacteria rizosférica y se ha encontrado asociada a diversos cultivos de interés agrícola (Basham *et al.*, 2004). En condiciones no favorables, como la desecación y limitación de nutrientes, algunas especies de *Azospirillum* pueden convertirse en formas alargadas parecidas a quistes (Sadasivan y Neyra, 1985). Su actividad como PGPR se debe a la capacidad para sintetizar fitohormonas (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). Aunque se considera que la mayor contribución de *Azospirillum* con las plantas con las que se relaciona, es la fijación biológica de nitrógeno (Pains *et al.*, 2008).

Cabe destacar, que a pesar de su amplia distribución en suelos, los reportes de la presencia de *Azospirillum* en ambientes contaminados con metales pesados es escasa. Algunos trabajos indican que especies como *A.brasilense* y *A. lipoferum* toleran altas concentraciones de Zn^{+2} , bajo condiciones de fijación de nitrógeno en condiciones de invernadero (Moreira *et al.*, 2008). Así, la fijación de nitrógeno podría ocurrir *in situ*, mediada por microorganismos de este género, pese a la elevada concentración de metales.

Al realizar la determinación de la actividad de nitrogenasa mediante el ensayo de ARA, las cepas de *Azospirillum lipoferum*, mostraron una actividad muy baja, entre 0.84 y 0.91 nmol de C_2H_4 /h/tubo; comparada con el testigo positivo empleado (*Klebsiella variicola* F2R9). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Pains y cols. (2008) quienes observan que la actividad de la nitrogenasa fue variable entre las cepas de *Azospirillum*, encontrando que solo el 9% de los aislados mostró elevada actividad de nitrogenasa. Otro trabajo, indica que la actividad de ARA por parte de los cultivos de *A. lipoferum* obtenidos de suelos de diferentes regiones varió de 0 a 155 nmol de C_2H_4 . Notablemente, las cepas que presentaron las más bajas tasas de fijación de nitrógeno fueron aisladas de suelos con una textura ligera y bajo pH. En dichas condiciones ambientales, posiblemente se han

seleccionado cepas especializadas con una reducción capacidad disminuida para fijar nitrógeno (Han and New, 1998).

Las aislamientos identificados como *Agromyces mediolanus*, *Brevundimonas vesicularis*, *Inquilinus ginsengisoli*, *Sphingomonas xenophaga*, son especies que no se han reportado previamente como bacterias fijadoras de nitrógeno.

La interpretación de la capacidad de fijar nitrógeno por parte de los microorganismos aislados en este trabajo, basados solo en el hecho de su capacidad para crecer en medio libre de nitrógeno debe realizarse con cautela. En reportes previos, algunos organismos se catalogaron erróneamente como diazótrofos, por su capacidad para crecer en ausencia de nitrógeno combinado, sin considerar que se trataban de organismos oligotróficos que pueden desarrollarse con una cantidad mínima de NH_3 captado del ambiente (Martínez- Romero, 2006).

Agromyces pertenece a la clase actinobacteria. Actualmente, este género consta de 18 especies que poseen características diversas, incluyendo actinomicetos filamentosos y no filamentosos, catalasa y oxidasa variable, los cuales son abundantes en el suelo (Jung *et al.*, 2007). Los miembros del género *Agromyces* están implicados en la degradación de compuestos xenobióticos como oligómeros de nylon (Yasuhira *et al.*, 2007), compuestos recalcitrantes como los organofosfonatos (Panas *et al.*, 2006) y xylano (Rivas *et al.*, 2004). Otras especies como *A. rhizophere* se aislaron de la rizosfera de mangles (Takeuchi y Hatano, 2001).

La cepa C8, identificada como *Agromyces mediolanus*, se aisló de la rizosfera de *Viguiera linearis*. Al teñirse mediante la técnica de Gram, se observaron bacilos irregulares, Gram positivos que no producen esporas. Se ha descrito que puede formar un micelio rudimentario (Suzuki *et al.*, 1996), lo cual no se observó en este estudio.

Cuando se realizó la búsqueda de los genes *nif* en la cepa de *Agromyces mediolanus*, se obtuvo un amplificado que corresponde al tamaño esperado para *nifD*. De comprobarse, que la secuencia corresponde al gen *nifD*, podríamos sugerir que se trata de una bacteria fijadora de nitrógeno. Este hallazgo fue reportado previamente por Zakhia y cols (2006) en la que se describe una cepa de *Agromyces* sp. que posee una secuencia de *nifH*

relacionada con *Sinorhizobium meliloti*. Este fenómeno demuestra la importancia de la transferencia horizontal de genes en la distribución de la capacidad de fijar nitrógeno entre los grupos bacterianos.

Dentro del orden de los Actinomicetales, la fijación de nitrógeno se ha demostrado en los géneros *Frankia* (Mirza *et al.*, 2009), *Micromonospora* (Valdés *et al.*, 2005), los cuales llevan a cabo el proceso de fijación cuando están en simbiosis con *Casuarina equisetifolia*; y *Streptomyces* (Ribbe *et al.*, 1997) es un diazótrofo de vida libre.

Las cepas B7 y C7, identificadas como *Sphingomonas xenophaga* se aislaron de las rizosferas de *Aster gymnocephalus* y *Viguiera linearis*, respectivamente. Aún cuando, dichas plantas se colectaron del mismo jal, las bacterias aisladas presentaron diferencias en los perfiles RAPD. Además, solo en la cepa C7 se obtuvo un amplificado que corresponde al tamaño esperado para *nifD*.

Recientemente la especie *Sphingomonas xenophaga* fue reclasificada como *Sphingobium xenophagum* (Pal *et al.*, 2006) y posee la capacidad de degradar naftalensulfonato y dimetilanilina (Stolz *et al.*, 2000). Sin embargo, no existen reportes de la capacidad de fijación de nitrógeno por parte de miembros del género *Sphingobium*.

En las cepas identificadas como *Inquilingus ginsengisoli* y *Brevundimonas vesicularis* no se detectaron los genes *nifH* o *nifD*, y no mostraron actividad de nitrogenasa cuando se realizó el ensayo de ARA. Sin embargo, deben realizarse estudios adicionales para determinar si estos microorganismos son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, debido a que la técnica de ARA se ve afectada por diversos factores, entre ellos se encuentra la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo (Estrada-de los Santos *et al.*, 2001; Tejera *et al.*, 2004), la concentración de acetileno inyectada (Staal *et al.*, 2001) y la cantidad de oxígeno y amonio presentes en el sistema (Reis y Döbereiner, 1998; Medeiros *et al.*, 2006). La estrategia utilizada para la confirmación de la capacidad diazotrófica es la prueba de incorporación de ^{15}N .

Si bien, la capacidad de fijar nitrógeno es sensible a pequeñas concentraciones de metales pesados (Athar y Ahmad, 2001), los resultados de este trabajo muestran que algunos diazótrofos se han adaptado a la presencia de dichos contaminantes y podrían

estar realizando la fijación de nitrógeno aun en ambientes hostiles como los son los jales. Por otro lado se observa la influencia que tienen las plantas en la selección de las poblaciones que se establecen en la rizosfera.

8. Conclusiones

- Se evaluó la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en la rizosfera de plantas que crecen en sitios contaminados con metales pesados.
- La cantidad de bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en los jales, asociadas a la rizosfera de las plantas en este ambiente es baja.
- Existen bacterias fijadoras de nitrógeno no cultivadas en este ambiente.

9. Prospectivas

- ✓ Realizar la prueba de incorporación de ^{15}N para confirmar la capacidad de fijar nitrógeno por parte de los aislados, en los casos en que la prueba de reducción de acetileno resultó negativa.
- ✓ Probar condiciones distintas de clonación, para la construcción de librerías del gen *nifD* obtenido a partir del DNA metagenómico de los enriquecimientos.
- ✓ Determinar si las cepas identificadas como *Rhizobium* poseen los genes de nodulación.
- ✓ Determinar la resistencia a metales pesados por parte de los aislados, mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima y detección de los genes responsables de la resistencia.
- ✓ Verificar la capacidad de los aislamientos para producir compuestos que promueven el crecimiento de las plantas, como el AIA y ACC desaminasa.

10. Bibliografía

- Abou-Shanab RA, Angle JS, Delorme TA, Chaney RL, Berkum P, Moawad H, Ghanem K, Ghazlan HA. 2003. Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytol*; 158:219-224.
- Abou-Shanab RA, van Berkum P, Angle JS. 2007. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*; 68:360-367.
- Arshad M, Saleem M, Hussain S. 2007. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends Biotechnol*; 25:356-362.
- Athar R, Ahmad M. 2002. Heavy metal toxicity: Effect on plant growth and metal uptake by wheat, and on free living *Azotobacter*. *Water Air Soil Pollut*. 138:165:180
- Basham Y, Holguin G, de-Basham LE. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997 – 2003). *Can J Microbiol*; 50:521-577
- Bender GL, Plazinski J, Rolfe BG. 1986. Asymbiotic acetylene reduction by a fast-growing cowpea *Rhizobium* strain with nitrogenase structural genes located on a symbiotic plasmid. *Appl Environ Microbiol*; 51:868-871.
- Betancourt DA, Loveless TM, Brown JW, Bishop PE. 2008. Characterization of diazotrophs containing Mo-independent nitrogenases, isolated from diverse natural environments. *Appl Environ Microbiol*; 74:3471-3480.
- Buckley DH, Huangyutitham V, Hsu SF, Nelson TA. 2007. Stable isotope probing with $^{15}\text{N}_2$ reveals novel noncultivated diazotrophs in soil. *Appl Environ Microbiol*; 73:3196-3204.
- Bürgmann H, Widmer F, Von Sigler W, Zeyer J. 2004. New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. *Appl Environ Microbiol*; 70:240-247.
- Burd GI, Dixon DG, Glick BR. 1998. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl Environ Microbiol*; 64:3663-3668.
- Cheng Q. 2008. Perspectives in biological nitrogen fixation research. *J Integrative Plant Biol*; 50:786-798.
- Chowdhury SP, Schmid M, Hartmann A, Tripathi AK. 2007. Identification of diazotrophs in the culturable bacterial community associated with roots of *Lasiurus sindicus*, a perennial grass of Thar desert, India. *Microb Ecol*; 54:82-90.
- Coenye T, Goris J, Spilker T, Vandamme P, LiPuma JJ. 2002. Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol*; 40:2062-2069.
- Conesa HM, Faz A, Amaldos R. 2006. Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings of semiarid Cartagena-La Union mining district (SE Spain). *Sci Total Environ*; 366:1-11.
- Dell'Amico E, Cavalca L, Andreoni V. 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*; 52:153-162.

- Dixon R, Kahn D. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat rev Microbiol*; 2:621-631.
- Duffus JH. 2002. "Heavy metals"- A meaningless term? *Pure Appl Chem*; 74: 793-807.
- Dybowska A, Farago M, Valsami-Jones E, Thornton I. 2005. Remediation strategies for historical mining and smelting sites. *Sci Prog*; 89:71-138
- Eckford R, Cook FC, Saul D, Aislabie J, Foght. 2002. Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated Antarctic soils. *Appl Environ Microbiol*; 68:5181-5185.
- Fallik E, Chan Y, Robson R. 1991. Detection of alternative nitrogenases in aerobic Gram-negative nitrogen-fixing bacteria. *J Bacteriol*; 173:365-371.
- Fani R, Gallo R, Lió P. 2000. Molecular evolution of nitrogen fixation: the evolutionary history of the *nifD*, *nifK*, *nifE*, and *nifN* genes. *J Mol Evol*; 51:1-11
- García G, Faz A, Conesa HM. 2003. Selection of autochthonous plant species from SE Spain for soil lead phytoremediation purposes. *Water Air Soil Pollut Focus*; 3:243-250.
- González RC, González-Chavez MC. 2006. Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes. *Environ Pollut*; 144:84-92.
- Gremion F, Chatzinotas A, Kaufmann K, Von Sigler W, Harms H. 2004. Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment. *FEMS Microbiology Ecology*; 48:273-283.
- Guo G, Zhou Q, Ma LQ. 2006. Availability and assessment of fixing additives for the in situ remediation of heavy metal contaminated soils: A review. *Environ Monit Assess*; 116:513-528.
- Gutiérrez-Ruiz M, Romero FM, González-Hernández G. 2007. Suelos y sedimentos afectados por la dispersión de jales inactivos de sulfuros metálicos en la zona minera de Santa Bárbara, Chihuahua, México. *RMGC*; 24:170-184.
- Han SO, New PB. 1998. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. *Microb Ecol*; 36:193-201.
- Hashidoko Y, Tada M, Osaki M, Tahara S. 2002. Soft gel medium solidified with gellan gum for preliminary screening for root-associated, free-living nitrogen-fixing bacteria inhabiting the rhizosphere of plants. *Biosci Biotechnol Biochem*; 66:2259-2263.
- Héry M, Philippot L, Mériaux E, Poly F, Le Roux X, Navarro E. 2005. Nickel mine spoils revegetation attempts: effect of pioneer plants on two functional bacterial communities involved in the N-cycle. *Environ Microbiol*; 7:486-498.
- Hsu S, Buckley DH. 2009. Evidence for the functional significance of diazotroph community structure in soil. *ISME J*; 3:124-136.
- Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW, Sessitsch A. 2004. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl Environ Microbiol*; 70:2667-2677.
- Igarashi RY, Seefeldt L. 2003. Nitrogen Fixation: The mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 38:351-384.

- Iki T, Aono T, Oyaizu H. 2007. Evidence for functional differentiation of duplicated *nifH* genes in *Azorhizobium caulinodans*. FEMS Microbiol Lett; 274:173-179
- Johnson AR, Munoz A, Gottlieb JL, Jarrard DF. 2007. High dose zinc increases hospital admissions due to genitourinary complications. J Urol; 177:639-643
- Jung SY, Lee SY, Oh TK, Yoon JH. 2007. *Agromyces allii* sp. Nov., isolated from the rhizosphere of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. Int J Syst Evol Microbiol; 57:588-593.
- Kamnev AA, van der Lelie D. 2000. Chemical and biological parameters as tools to evaluate and improve heavy metal phytoremediation. Biosci Rep; 20:239-258.
- Khan AG. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. J Trace Elem Med Biol; 18:355-364
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M. 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. Environ Chem Lett; 7:1-19.
- Kneip C, Lockhart P, VoB C, Maier UG. 2007. Nitrogen fixation in eukaryotes- New models for symbiosis. BMC Evol Biol; 7:55.
- Kunito T, Saeki K, Nagaoka K, Oyaizu H, Mutsumoto S. 2001. Characterization of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. Eur J Soil Biol; 37:95-102.
- Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. Microbiology; 147:981-993.
- Lasat MM. 2002. Phytoextraction of toxic metal: a review of biological mechanisms. J Environ Qual; 31:109-120.
- Lucy M, Reed E, Glick BR. 2004. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Antonie van Leeuwenhoek; 86:1-25.
- Martelli A, Rousselet E, Dycke C, Bouron A, Moulis JM. 2006. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. Biochimie; 88:1807-1814.
- Martínez-Romero, E. 2006. Dinitrogen-Fixing Prokaryotes. En M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, KH Schleifer, E Stackebrandt (eds). The Prokaryotes, 3^a ed. Springer-Verlag. New York. 793-817.
- Mendoza-Amézquita E, Armienta-Hernández MA, Ayora C, Soler A. Ramos-Ramírez E. 2006. Potencial lixiviación de elementos traza en jales de las minas de La Asunción y Las Torres, en el Distrito Minero de Guanajuato, México. Revista Mexicana de Ciencias Geológicas; 23:75-83.
- Mengoni A, Barzanti R, Gonnelli C, Gabbrielli R, Bazzicalupo M. 2001. Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentine soil. Environ Microbiol; 3:691-698.
- Miller SH, Elliot RM, Sullivan JT, Ronson CW. 2007. Host-specific regulation of symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Microbiology; 153:3184-3195.

- Mirza BS, Welsh A, Rasul G, Rieder JP, Paschke MW, Hahn D. 2009. Variation in *Frankia* populations of the *Elaeagnus* host infection group in nodules of six host plant species after inoculation with soil. *Microb Ecol*. En prensa.
- Mishra KP, Chauhan UK, Naik S. 2006. Effect of lead exposure on serum immunoglobulins and reactive nitrogen and oxygen intermediate. *Human Exp Toxicol*; 25:661-665.
- Moreira FM, Lange A, Klauberg-Filho O, Siqueira JO, Nóbrega RS, Lima AS. 2008. Associative diazotrophic bacteria in grass roots and soils from heavy metal contaminated sites. *An Acad Bras Cienc*; 80:794-761.
- Muyzer G and Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73:127-141.
- Navarro-Noya YE. 2007. Análisis molecular de la diversidad bacteriana y de genes que participan en el ciclo del nitrógeno asociados a las rizosferas de plantas que crecen en jales de minas de Zacatecas. Tesis de maestría. ENCB-IPN
- Oliveira A, Pampulha ME. 2006. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. *J Biosci Bioeng*; 102:157-161.
- Pains RE, Santos RL, Martinez OAL, Divan BVL, dos Santos TKR, Urquiaga S, Massena RV. 2008. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L). *Plant Soil*; 302:249-261.
- Pal R, Bhasin VK, Lal R. 2006. Proposal to reclassify [*Spingomonas*] *xenophaga* Stolz *et al.*, 2000 and [*Spingomonas*] *taejonensis* Lee *et al.*, 2001 as *Sphingobium xenophagum* comb. nov. and *Sphingopyxis taejonensis* comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*; 56:667-670.
- Panas P, McMullan G, Dooley JSG. 2006. RT-TGGE as a guide for the successful isolation of phosphonoacetate degrading bacteria. *J Appl Microbiol*; 103:237-244.
- Puga S, Sosa M, Lebgue T, Quintana C, Campos A. 2006b. Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecol Apl*; 5: 149-155.
- Raymond J, Siefert JL, Staples CR, Blankenship RE. 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol Biol Evol*; 21:541-554.
- Relman DA (1993) Universal bacterial 16S rRNA amplification and sequencing. En American Society of Microbiology (ed) *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Nueva York. pp 489-495.
- Ribbe M, Gadkari D, Meyer O. 1997. N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J Biol Chem*; 272:26627-26633.
- Rivas R, Trujillo ME, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E. 2004. *Agromyces ulmi* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from *Ulmus nigra* in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*; 54:1987-1990.
- Rossello-Mora R, Amann R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*; 25:39-67.

- Sadasivan L, Neyra CA. 1985. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. J Bacteriol; 167:716-723.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual. 3^a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez O, Diestra E, Esteve I, Mas J. 2005. Molecular characterization of an oil-degrading cyanobacterial consortium. Microb Ecol; 50:580-588.
- Sandaa R, Enger O, Torsvik V. 1999. Abundance and diversity of *Archea* in heavy-metal-contaminated soils. Appl Environ Microbiol; 65:3293-3297.
- Schober SE, Mirel LB, Graubard BI, Brody DJ, Flejal KM. 2006. Blood lead levels and death from all causes, cardiovascular disease and cancer: results from the NHANES III mortality study. Environ Health Perspect; 114:1538-1541
- Segovia L, Piñero D, Palacios R, Martínez-Romero E. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. Appl Environ Microbiol; 57:426-433.
- Sheng XF, Xia JJ, Jiang CY, Quian M. 2008. Characterization of heavy metal-resistant endophytic from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. Environ Pollut; 156:1164-1170.
- Singh R.P., Agrawal, M. 2007. Effects of sewage sludge amendment on heavy metal accumulation and consequent responses of *Beta vulgaris* plants. Chemosphere; 67:2229-2240.
- Stam H, van Verseveld HW, Stouthamer AH. 1986. Derepression of nitrogenase in chemostat cultures of the fast growing *Rhizobium leguminosarum*. Arch Microbiol; 135:199-204.
- Steenhoudt O, Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol Rev; 24:487-506
- Stolz A, Schmidt-Maag c, Denner EBM, Busse HJ, Egli T, Kämpfer P. 2000. Description of *Sphingomonas xenophaga* sp. nov. for strains BN6^T and N,N which degrade xenobiotic aromatic compounds. Int J Syst Evol Microbiol; 50:35-41.
- Sullivan JT, Eardly BD, van Berkum P, Ronson CW. 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobial isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. Appl Environ Microbiol; 62:2818-2825
- Suzuki K, Sasaki J, Uramoto M, Nakase T, Komagata K. 1996. *Agromyces mediolanus* sp. nov. rev., a species for "*Corynebacterium mediolanum*" Mamoli 1939 and for some aniline-assimilating bacteria which contain 2,4-diaminobutyric acid in the cell wall peptidoglycan. Int J Syst Bacteriol; 46:88-93.
- Takeuchi M, Hatano K. 2001. *Agromyces luteolus* sp. nov., *Agromyces rhizopherae* sp. nov. and *Agromyces brachium* sp. nov., from the mangrove rhizosphere. Int J Syst Evol Microbiol; 51:1529-1537.
- Urban JE, Davis LC, Brown SJ. 1986. *Rhizobium trifolii* 0403 is capable of growth in the absence of combined nitrogen. Appl Environ Microbiol; 52:1060-1067.

- Valdés M, Pérez N, Estrada-de los Santos P, Caballero-Mellado J, Peña-Cabriales JJ, Normand P, Hirsch AM. 2005. Non-*Frankia* actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Appl Environ Microbiol*; 71:460-466.
- Wang Y, Shi J, Wang H, Lin Q, Chen X, Chen Y. 2006. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicol Environ Saf*; 67:75-81.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalsky JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*; 18:6531-6535.
- Wise SS, Holmes AL, Wise JP Sr. 2006. Particulate and soluble hexavalent chromium are cytotoxic and genotoxic to human lung epithelial cells. *Mutat Res*; 610:2-7.
- Wong MH. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*; 50:775-780
- Wu SC, Cheung KC, Luo YM, Wong MH. 2006. Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environ Pollut*; 14:124-135.
- Xiong J, He Z, Liu D, Mahmood Q, Yang X. 2007. The role of bacteria in the heavy metals removal and growth of *Sedum alfredii* Hance in an aqueous medium. *Chemosphere*; 70:489-494.
- Yasuhira K, Uedo Y, Takeo M, Kato D, Negoro S. 2007. Genetic organization of nylon-oligomer-degrading enzymes from alkalophilic bacterium, *Agromyces* sp. KY5R. *Journal of Bioscience and Bioengineering*; 104:521-524.
- Zakhia F, Jeder H, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. 2006. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH*-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microb Ecol*; 51:375-393.
- Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol*; 5:539-554.