

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

---

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
Departamento de Microbiología

**DIVERSIDAD DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO  
AISLADAS DE SUELO DE CHINAMPA Y SU EFECTO EN PLANTAS  
DE INTERES AGRICOLA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**Q.B.P. Claudia Leonor Ibarra Sánchez.**

**BAJO LA DIRECCIÓN DE:**

**DR. EN TAO WANG HU  
DRA MARÍA SOLEDAD VASQUEZ MURRIETA**



**México, D. F. Junio 2010**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Ecología Microbiana del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. En Tao Wang Hu y la Dra. María Soledad Vásquez Murrieta.

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Investigación y Posgrado y por el Instituto de Ciencia y Tecnología del D.F como parte de los proyectos:

**SIP20080322** Bacterias endofíticas y simbióticas de las plantas de fresa y frijol

**PIC508-3** Diversidad bacteriana en suelos de las chinampas de Xochimilco y su importancia agrícola y ecología.

La sustentante fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y Programa Institucional para la Formación de Investigadores (PIFI) en el periodo Enero 2008 a Diciembre-2009.

## ÍNDICE GENERAL

<b>Tema</b>	<b>Pag.</b>
<b>1.- Introducción</b>	<b>1</b>
1.1.- Chinampa.	1
1.2.- Diversidad microbiana en el suelo.	5
1.3.- Interacción plata: microorganismo.	5
1.4.- Ciclo del nitrógeno.	6
1.5.- Fijación biológica de nitrógeno.	7
1.6.- Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.	9
<b>2.- Justificación</b>	<b>10</b>
<b>3.- Objetivos</b>	<b>11</b>
3.1.- Objetivo general.	11
3.1.- Objetivos particulares.	11
<b>4.- Materiales y métodos</b>	<b>12</b>
4.1.- Muestreo	12
4.2.- Análisis fisicoquímico del suelo	13
4.2.1 pH.	13
.-	
4.2.2 Humedad.	13
.-	
4.2.3 Capacidad de retención de agua.	14
.-	
4.2.4 Contenido de materia orgánica.	14

.-		
4.2.5	Nitrógeno y fosforo total.	15
.-		
4.3.-	Reducción de acetileno en suelo total.	15
4.4.-	Cuantificación de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre por le método del NMP	15
4.5.-	Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno.	16
4.5.1	Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre	16
.-		
4.5.2	Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas.	16
.-		
4.6.-	Identificación molecular de los aislados.	16
4.6.1	Extracción de DNA total.	16
.-		
4.6.2	Amplificación del gen 16S rRNA	17
.-		
4.6.3	Secuenciación.	18
.-		
4.6.4	Análisis de las secuencias obtenidas.	19
.-		
4.6.5	Detección de genes <i>nifH</i> y <i>nifD</i> .	19
.-		
4.7.-	Caracterización fenotípica de los aislados.	20

4.7.1	Actividad de nitrogenasa (Reducción de acetileno) en los aislados.	20
.	-	
4.7.2	Solubilización de fosfato.	21
.	-	
4.7.3	Producción de índoles con actividad de fitohormona.	21
.	-	
<b>4.8</b>	Evaluación del efecto de inoculo productor de fitohormona sobre el	21
.	desarrollo de plantas a nivel de invernadero.	
4.8.1	Efecto en trigo.	22
.	-	
4.8.2	Efecto en alfalfa.	23
.	-	
<b>4.9</b>	Efecto de inoculo de bacterias fijadoras de nitrógeno en el desarrollo	24
.	de plantas a nivel invernadero.	
4.9.1	Efecto en trigo.	24
.	-	
4.9.2	Efecto en alfalfa.	25
.	-	
4.9.3	Análisis estadístico de bioensayo de nitrógeno.	25
.	-	
<b>5.-</b>	Resultados	27
5.1.-	Características fisicoquímicas de los suelos de chinampa colectados.	27
5.2.-	Reducción de acetileno en suelo total.	27

5.3.-	Cuantificación de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (NMP).	28
5.4.-	Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno	30
5.5.-	Identificación molecular de los aislados.	32
5.5.1	Amplificación del gen 16S rRNA	32
.	.	
5.5.2	Análisis de las secuencias obtenidas.	32
.	.	
5.5.3	Detección de genes <i>nifH</i> y <i>nifD</i>	35
.	.	
5.6.-	Evaluación de potencial PGPR de los aislados obtenidos.	36
5.6.1	Actividad de nitrogenasa de los aislados.	36
.	.	
5.6.2	Solubilización de fosfato inorgánico.	37
.	.	
5.6.3	Producción de índoles con actividad de fitohormona.	38
.	.	
5.7.-	Evaluación del efecto del inóculo productor de fitohormona en el desarrollo de plantas a nivel invernadero.	41
5.8.-	Evaluación del efecto del inóculo fijador de nitrógeno sobre el desarrollo vegetal a nivel de invernadero.	47
6.-	Discusión.	56
7.-	Conclusiones.	61

Apéndice I. Medios de cultivo

Apéndice II. Reactivos y Soluciones

Apéndice III. Resultados efecto del inóculo productor de  
fitohormona

Apéndice IV Resultados Efecto de la fijación biológica de nitrógeno

Apéndice V.-Análisis de varianza

## INDICE DE FIGURAS

<b>No.</b>		<b>Pag.</b>
<b>Fig. 1.1</b>	Chinampa como actualmente se encuentra en Xochimilco.	1
<b>Fig. 1.2</b>	Localización de la zona lacustre de México	2
<b>Fig. 1.3</b>	Ciclo del nitrógeno. En la parte izquierda se muestra los procesos ocurridos en anaerobiosis, en la parte superior se muestra la fijación de nitrógeno y en la parte izquierda se muestra la nitrificación.	7
<b>Fig. 1.4</b>	Estructura del complejo enzimático de la nitrogenasa. En esta figura se muestra el flujo de electrones hasta llegar a la dinitrogenasa permitiendo la fijación de nitrógeno así como el gasto ATP.	8
<b>Fig. 4.1</b>	Diseño experimental general de trabajo	12
<b>Fig. 5.1</b>	Morfología colonial de posibles diazotrofos aislados de suelo rizosféricos a) Morfotipo 1 aerobio b) Morfotipo 2 aerobio c) Morfotipo 3 aerobio d) Morfotipo 4 aerobio	30
<b>Fig. 5.2</b>	Morfología colonial de posibles diazotrofos Aislados de suelo no rizosférico a) Morfotipo 1 aerobio b) Morfotipo 2 aerobio c) Morfotipo 3 aerobio d) Morfotipo 1 anaerobio	31
<b>Fig. 5.3</b>	Electroforesis en gel de agarosa 1% 75 Volts durante 45 minutos, mostrando el amplificado del gen 16S de la talla esperada. 1.- MTM, Carril 2.- Amplificado de Alf I 1, 3.- Amplificado Alf I 2, 4.- Amplificado Alf I 3, 5.- Amplificado Alf I 4.6.- Amplificado Alf I 5, 7.- Amplificado Alf I 6 , 8.- Amplificado Alf I 7, 9.- Amplificado II Pr 2	32
<b>Fig. 5.4</b>	Filograma obtenido de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de las cepas aisladas en medio para fijadoras de nitrógeno. Análisis basado en los datos de las secuencias parciales del gen 16S rRNA con 10 000 aleoterizaciones tipo "Bootstrap" por el método de agrupamiento "Neighbor Joining" usando el índice de distancia Kimura 2 parámetros. La barra indica el número de cambios por secuencia.	34
<b>Fig. 5.5</b>	Amplificado de genes nifH a) Amplificado de genes de Rhizobium DNA molde de L2A b) Amplificación del gen nifH similar a Azotobacter DNA molde de IISA c) Amplificado del gen nifH Azospirillum DNA molde de Ac5	35
<b>Fig. 5.6</b>	Amplificado de gen nifD Carril1.-MTM,Carril2.- Amplificado de <i>Sinorhizobium meliloti</i> (N7, ) Carril3.- <i>Alcaligenes faecalis</i> (L4A)	36
<b>Fig. 5.7</b>	Prueba de solubilización de fosfato inorgánico (Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ), se observa claramente el halo de solubilización alrededor de la colonia.	37



<b>Fig. 5.8</b>	Curva tipo obtenida de IAA realizando análisis espectrofotométrico a 530nm	39
<b>Fig. 5.9</b>	Aislados rizosféricos productores de fitohormonas	39
<b>Fig. 5.10</b>	Aislados no rizosféricos productores de fitohormonas	40
<b>Fig. 5.11</b>	Grafica de co-plot. En esta gráfica se puede observar el efecto de los distintos tratamientos en cada variable analizada de las dos plantas estudiadas. a) Biomasa total en peso seco b) Biomasa aérea pesos seco c) Biomasa raíz peso seco d) longitud de raíz e) longitud de tallo f) Número de hojas. La línea roja indica la media, los puntos azules indican la dispersión de los datos, con letras mayúsculas se señala la diferencia significativa entre los tratamientos. **. T1=Tratamiento inoculado con <i>Azospirillum</i> sp.T2=Plantas sin inculo; T3 = plantas inoculadas con el aislado AI3, T4= Plantas inoculadas con el aislado AI9.	43
<b>Fig. 5.12</b>	PCA fitohormona	46
<b>Fig. 5.13</b>	Grafica de co-plot del bioensayo de efecto de inocular bacterias fijadoras de nitrógeno en el desarrollo de alfalfa y trigo. En esta gráfica se puede observar el efecto de los distintos tratamientos en cada variable de las dos plantas. a) Biomasa total en peso seco b) Biomasa aérea pesos seco c) Biomasa raíz peso seco d) longitud de raíz e) longitud de tallo f) Número de hojas. La línea roja indica la media, los puntos azules indican la dispersión de los datos. T1: Planta regadas con solución completa; T2Plantas regadas con solución nutritiva sin nitrógeno; T3 inoculada con IISA regada con solución completa; T4 Plantas inoculadas con IISA regadas con solución nutritiva sin nitrógeno; T5 Plantas inoculadas con Aca2 regada con solución completa; T6 inoculadas con Aca2 regadas con solución sin nitrógeno; T7 Plantas inoculadas con L2B regada con solución completa; T8Plantas inoculadas con L2Bregada con solución in nitrógeno;T9 Plantas inoculadas con AcJ regada con solución completa;T10 Plantas inoculadas con AcJ regada con solución completa	50
<b>Fig. 5.14</b>	PCA nitrógeno	54

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla no.</b>		<b>Pag.</b>
<b>Tabla 1.1</b>	Concentración de metales en suelos de chinampa de Xochimilco.	4
<b>Tabla 4.1</b>	Muestras de suelo colectas	13
<b>Tabla 4.2</b>	Condiciones de reacción para amplificar el gen 16S rRNA	17
<b>Tabla 4.3</b>	Oligonucleotidos usados para amplificar los genes <i>niH</i> y <i>nifD</i>	19
<b>Tabla 4.4</b>	Condiciones de reacción para amplificar genes <i>nif</i>	19
<b>Tabla 5.1</b>	Características fisicoquímico de suelo de dos chinampas a 0-30 cm y 30-60 cm de profundidad	27
<b>Tabla 5.2</b>	Actividad de nitrogenasa en suelo total	28
<b>Tabla 5.3</b>	Abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en suelos rizosféricos de chinampa.	29
<b>Tabla 5.4</b>	Abundancia de bacterias fijadoras de nitrógenode vida libre de suelos no rizosféricos de chinampa	29
<b>Tabla 5.5</b>	Descripción de morfología colonial aislada mas frecuentemente en suelo rizosférico.	30
<b>Tabla 5.6</b>	Descripción de Morfología colonial de aislados de suelo no rizosférico	31
<b>Tabla 5.7</b>	Identificación molecular de las diferentes aislados aislados.	33
<b>Tabla 5.8</b>	Reducción de Acetileno en Aislados.	36
<b>Tabla 5.9</b>	Aislados con la capacidad de solubilizar fosfato	37
<b>Tabla 5.10</b>	Curva tipo IAA	38
<b>Tabla 5.11</b>	Microorganismos aislados con capacidad de PGPR	40
<b>Tabla 5.12</b>	Resumen de los resultados de ANOVA y prueba de Tukey para el el bioensayo de fitohormona en alfalfa.	42
<b>Tabla 5.13</b>	Resumen de los resultados de ANOVA y prueba de Tukey del bioensayo de fitohormona en trigo.	42
<b>Tabla 5.14</b>	Componentes principales para el bioensayo de fitohormonas en alfalfa.	44
<b>Tabla 5.15</b>	Componentes principales para el bioensayo de fitohormonas en trigo.	45
<b>Tabla 5.16</b>	Resumen de los resultados de ANOVA y prueba de Tukey para evaluar el aporte de nitrógeno en plantas de alfalfa	48
<b>Tabla 5.17</b>	Resumen de los resultados de ANOVA y prueba de Tukey para evaluar el aporte de nitrógeno en plantas de trigo	48
<b>Tabla 5.18</b>	Componentes principales para el bioensayo de nitrógeno en alfalfa.	52
<b>Tabla 5.19</b>	Componentes principales para el bioensayo de nitrógeno en trigo.	53

## RESUMEN

Las chinampas son un sistema agrohidrológico que surge en la zona lacustre de Mesoamérica caracterizado por la explotación intensiva sin la adición de fertilizantes.

El nitrógeno es un elemento de alta demanda para los organismos por lo que la productividad primaria de cualquier ecosistema está limitado por la disponibilidad de este elemento. La fijación biológica de nitrógeno es el principal aporte de éste elemento a ecosistemas sin fertilización química, además es sabido que estas bacterias además de aportar nitrógeno al ambiente pueden participar promoviendo el crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos.

En el presente estudio dos chinampas fueron recolectadas, el análisis fisicoquímico de los suelos muestra que es un suelo rico en materia orgánica, nitrógeno y fósforo y un pH alcalino. La cuantificación de bacterias fijadoras de nitrógeno por NMP muestra mayor cantidad de éstas en el suelo rizosférico ( $10^6$ ) comparando con suelo no rizosférico ( $10^5$ ).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas fueron identificadas como *Sinorhizobium meliloti* y *S. medicae*, por otro lado las bacterias de vida libre fueron identificadas como pertenecientes a los géneros: *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Bacillus* y *Tetrathiobacter*, los cuales han sido reportados como diazotrofos en diferentes suelos agrícolas; sin embargo no se logró detectar actividad de nitrógenoasa bajo las condiciones de incubación establecidas. Por otro lado se encontró que los aislados obtenidos de suelo rizosférico solubilizan fósforo y producen mayor cantidad de AIA comparado con los aislados obtenidos de suelo no rizosférico.

Finalmente se evaluó el efecto de inocular aislados productores de fitohormona en el crecimiento de trigo y alfalfa a nivel invernadero, obteniendo un efecto positivo de los aislados AI3 y AI9 en el crecimiento de alfalfa; por otro lado se evaluó el efecto de inocular bacterias fijadoras de nitrógeno sin obtener efecto positivo con las bacterias inoculadas lo cual pudo deberse a la interacción específica planta microorganismo.

## ABSTRAC

Chinampas are an agronomical system that has been developed in Mesoamerican lake zones. It is characterized by the equilibrium among high productivity and ecosystem conservation.

Nitrogen is a high demand element for almost organisms, its availability may restrict the primary production in ecosystems; biological nitrogen fixing is an exclusive process for organisms of archea and bacteria domains. This process is the major contribution of this element untreated soil ecosystems.

In the present study, 2 chinampas were sampled for rhizospheric and bulk soils. Physicochemical analysis showed that these soils were rich in organic matter (4.6-7.5%) and total N (0.56-0.8%) and were alkaline (pH8.0-8.7). Quantification of bacterial fixing nitrogen was more abundant in the rhizospheric soils  $10^6$  to  $10^7$   $g^{-1}$  and  $10^5$   $g^{-1}$  for bulk soils. A total of 60 bacterial strains which were able to grow in nitrogen-free media, activity detected in an isolated by nitrogenase activity assay. After biochemical testing was performed to assess the potential PGPR, detecting capacity of phosphate solubilization and production of phytohormones (IAA) was detected in approximately 76% of rizospheric isolates some of them produce IAA in high concentration (4-11mg  $mL^{-1}$ ).

Se identificaron diferentes generos reportados como fijadores de nitrogeno

## 1. Introducción

### 1.- Las chinampas y su importancia en la agricultura.

La palabra chinampa deriva del náhuatl “Chinamitl” y de “pan” que textualmente significa cama rodeada de estacas (Alcántara, 1996). Las chinampas son un sistema agrohidrológico sustentable, que se caracteriza por la explotación agrícola intensiva en equilibrio con el ecosistema que lo soporta (Altieri, 2000).

Las chinampas se pueden describir brevemente como islotes artificiales formados por un cúmulo de plantas cubiertas por sedimento del fondo del lago, ancladas con estacas de ahuejote (*Salix bonplandiana*) y rodeadas al menos por tres lados de agua; en la (Figura 1.1) (Ramos *et al.* 2001).



**Figura 1.1** Chinampa como actualmente se encuentra en Xochimilco.  
Tomado de <http://www.sagan-gea.org/hojaredsuelo/paginas/5hoja.htm>

Esta técnica de cultivo aparece en la cuenca de México entre los años 1300-800 a. de C situándose a las orillas de los lagos ya que este sitio proporcionó suministro abundante y permanente de agua; en la figura 1.2 se muestra el área que ocuparon las chinampas en los años 1325-1521 denominada como zona lacustre abarcando los lagos de Texcoco, Chalco, Zumpango y Xochimilco (Figura 1.2) (Albores, 1998). De acuerdo con los reportes de Sanders (1957) esta zona fue altamente productiva debido a la precipitación pluvial y a la gran diversidad de recursos vegetales (Rojas, 1974).



**Figura 1.2** Zona lacustre ocupada por las chinampas en los años 1325-1521. Tomado de Albores (1998).

A lo largo de la historia las chinampas han existido de dos maneras, en el periodo anterior a la conquista éstas se encontraban ancladas a un sitio debido a las estacas de ahuejote, y el principal producto generado en este periodo fueron las hortalizas, importantes para la alimentación de la población (Crossley, 2004). La segunda manera de encontrar las chinampas se presenta en el periodo posterior a la conquista española en la cual las chinampas se podían desplazar a lo largo del lago y en éstas, el principal producto generado fueron plantas ornamentales traídas desde Asia y Europa. Actualmente las chinampas se encuentran ancladas a un solo sitio con las estacas de ahuejote y los productos generados en éstas varían desde plantas ornamentales, hortalizas y pasturas (Alcántara, 1993).

La construcción de las chinampas de manera general consiste en localizar suelo firme en una zona poco profunda del lago, esto permitirá tener una base para elevar el suelo, posteriormente se delimitan las dimensiones con estacas de ahuejote. Se recomienda que tenga forma rectangular y no mida mas de 20 m por lado, cuidando que esté rodeada por lo menos de tres lados por agua (Coe, 1964), lo cual permitirá una dispersión uniforme del agua, después se forma un entretejido de ramas de ahuejote o carrizo (chinamil), formando así la base de la chinampa, después se colocan restos vegetales hasta alcanzar aproximadamente 50 cm de altura el cual se deja secar, posteriormente se coloca una capa de sedimento del lago cubriendo toda la superficie, esta acción se repite alternando capas de tejido vegetal y sedimento los cuales son mezclados generando suelo orgánico de cultivo (Prutzman, 1998).

Actualmente esta forma de cultivo se conserva con buen rendimiento entre los grupos chinamperos de Xochimilco y Tláhuac en México, Distrito Federal (Altieri, 2000); con el fin de aumentar la producción algunos chinamperos utilizan semillas mejoradas debido a las facilidades actuales para la comercialización de los productos en la ciudad (Outerbridge, 1987). Sin embargo, la mayoría de los chinamperos no utilizan fertilizantes químicos ni plaguicidas. El control de plagas se realiza de forma manual lo cual permite el equilibrio con el ambiente, permitiendo la explotación del recurso de forma sustentable (Altieri, 2000).

La mano de obra requerida es mínima ya que comúnmente el trabajo se realiza por miembros de la familia, por lo que los costos de producción son menores. La comercialización de los productos se realiza en mercados locales (62.6%) o en el depósito central de alimentos de la Ciudad de México (9.5%) y el resto con intermediarios (Soriano *et al.* 2002).

Los principales cultivos que se producen en las chinampas son: verdolaga (*Portulaca oleracea*), epazote (*Chenopodium ambrosioides*), romero (*Suaeda torreyana*), apio (*Apium graveolens*), lechuga (*Lactuca sativa*), brócoli (*Brasita oleracea* var. *Auliflora*), calabaza (*Cucúrbita pepo* L.), perejil (*Petroselinum crispum* Haffm) de uso comestible, y también se producen algunos forrajes como lengua de vaca (*Rumex* spp.) (Altieri, 2000).

El valor histórico y ecológico de la zona chinampera de Xochimilco es reconocido por la UNESCO, quien la declaró patrimonio Mundial Cultural y Natural de la Humanidad, conjuntamente con el Centro Histórico de la Ciudad de México como una forma de reconocer la coexistencia de ambas desde la época de oro de Tenochtitlan (Alcántara 1993).

Por su forma de construcción y manejo, el suelo de las chinampas se clasifica como de origen antrópico, es decir que es modificado por actividades humanas, sin horizontes definidos debido a la remoción, y adición de mas materia orgánica (Ramos *et al.* 2001).

Estos suelos tienden a ser grisáceos cuando están secos y negro, cuando están húmedos, este color se debe a la presencia de materia orgánica, principalmente ácidos húmicos por su elevada melanización y alto peso molecular (Ramos *et al.* 2001). Presentan densidades menores a la unidad, son altamente porosos (61.6-90.95%) y dominan las texturas arcillosas lo cual permite el enraizamiento y difusión tanto de aire como de agua (Crossley 2004). En las capas superficiales el pH de este suelo es generalmente alcalino (pH 8.8) mientras que en las capas profundas puede presentar pH ácido (pH 5.2) (Ramos *et al.* 2001).

Estos pueden presentar contaminación por metales pesados debido a la contaminación del agua, sin embargo, la concentración de estos metales no rebasa los límites permisibles de contaminación (Tabla 1.1). Debido al pH alcalino de estos suelos la mayor proporción de los metales pesados se encuentra fijada ya que estos se precipitan como hidróxidos, carbonatos, sulfatos o fosfatos (Ramos *et al.* 2001).

**Tabla 1.1** Concentración de metales en suelos de chinampa de Xochimilco.

Profundidad (cm)	Cr	Pb	Cd	Ni	Cu	Zn
mgKg <sup>-1</sup>						
0-10	0.50	4.70	0.37	2.64	1.99	5.59
40-50	0.58	1.13	0.22	2.58	0.66	0.50
60-70	0.43	1.22	0.28	3.14	1.12	1.18
100-110	0.61	0.41	0.40	2.92	0.64	1.87
110-120	0.48	0.92	0.37	3.12	0.98	1.66

Tomado de Ramos *et al.* (2001).

## 1.2.-Diversidad microbiana en el suelo y la interacción planta-microorganismo

La diversidad de los microorganismos presentes en el suelo depende de diversos factores como la composición química, textura, disponibilidad de agua, entre otras características que intervienen en la disponibilidad de nutrientes, así como la tensión de oxígeno en las diferentes partículas que conforman el suelo (Mahmood, 2006).

Actualmente la diversidad microbiana se puede estudiar mediante dos estrategias: 1) Aislamiento y caracterización de las cepas en medios de cultivo, lo cual permite conocer la diversidad así como inferir algunas funciones de estos microorganismos (Li *et al.*, 2007), pero solo menos de 10% de los microorganismos de suelo podrían crecer en los medios de cultivo, entonces este método no puede evaluar la diversidad de toda la comunidad microbiana en suelo. 2) Métodos moleculares independientes de cultivo, que incluyen aislamiento de DNA metagenómico del suelo y clonación de algunos genes previamente amplificados por PCR (Zani *et al.*, 2000), permitiendo conocer a los microorganismos cultivables y no cultivables presentes en el suelo (Izquierdo y Nusslein, 2006), pero no se puede evaluar las características fenotípicas de los microorganismos. Con los métodos anteriores se ha encontrado cientos de especies por gramo de suelo en suelos agrícolas mientras que suelos de bosques o pastizales (suelos sin labranza) se ha



detectado que albergan comunidades con mayor complejidad, encontrando miles de especies por gramo de suelo (Widmer *et al.*, 1999).

En estudios de diversidad y taxonomía de los aislados microbianos, los métodos usados más comunes incluyen análisis de DNA, rRNA, proteínas (enzimas), composición celular (ácidos grasos, polisacáridos extracelulares etc.), y caracterización fenotípica (actividad de las enzimas, variedad de fuente de carbono y de nitrógeno, producción de algunos compuestos específicos, resistencia a antibióticos y agentes químicos, etc.). Cada uno de estos análisis se puede usar para evaluar la diversidad en una cierta nivel y un resumen de ellos se presentan en la tabla 1.2.

Tabla 1.2 Algunos análisis del DNA genómico usando en estudio de diversidad bacteriana

Método	Aplicación	Ventaja	Desventaja
PFGE (Electroforesis de campo pulsado)	Estimar el tamaño de cromosoma y diferenciar las especies y cepas	Se puede identificar las cepas clínicas en nivel de biovar	Necesita tiempo largo
RAPD (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados aleatoriamente)	Diversidad dentro especies y identificar las cepas	Simple, rápido y fácil a realizarse	Sensible a las condiciones, bandas falsas, y no es muy reproducible
TP-RAPD (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados aleatoriamente por dos primers)	Dividir especies	Rápido, exacto, confiable	
rep-PCR (PCR de secuencias de repetición)	Identificar las especie y cepas	Simple, no necesita muy DNA con alta calidad	Sensible a la condiciones, y no es muy reproducible
AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados)	Diferenciar las especies y identificar las cepas	Sensible, y reproducible	Mucho trabajo, difícil a manejar
Patrones de LMW RNA (RNA de bajo peso molecular)	Identificar géneros y especies	Estable y reproducible	Difícil a manejar
Hibridación DNA-DNA	Definir las especies	Se analiza todo cromosoma, reproducible	Mucho trabajo, difícil a manejar
Secuenciación del gen 16S rRNA y	Diferenciar los géneros y especies	Fácil, confiable, y se puede comparar datos de diferentes trabajos	No se puede diferenciar las especies muy relacionadas
Secuenciación de los genes esenciales	Diferenciar los géneros y especies	Fácil, confiable, y se puede comparar datos de diferentes trabajos	
RFLP de 16S-23S ITS	Diferenciar las especies	Fácil, confiable	

La principal importancia de conocer la diversidad microbiana en los suelos se debe a que los microorganismos están íntimamente relacionados con la productividad de los ecosistemas (Zvyagintsev *et al.*, 1991), ya que se sabe que los microorganismos participan en los diferentes ciclos biogeoquímicos en el suelo, o interactuando con las plantas promoviendo el crecimiento vegetal aumentando la productividad del ecosistema (Garbeva *et al.*, 2004).

Todas las plantas presentan un sistema microbiano asociado a sus raíces y éste es responsable del establecimiento, supervivencia y productividad de la planta (Minamisawa *et al.*, 2004). Se entiende como rizosfera a la porción de suelo que se encuentra en contacto directo con la raíz de la planta; la cual permite la interacción estrecha entre los microorganismos y la planta (Tsavkelova *et al.*, 2006). Las bacterias rizosféricas son esencialmente atraídas por los exudados radicales que contienen una amplia variedad de moléculas orgánicas específicas de cada planta, éstas son usadas como nutrientes por los microorganismos y en retribución, los microorganismos pueden estimular el crecimiento de la planta o dar protección contra agentes patógenos (Khan, 2005).

Las interacciones entre los microorganismos y las raíces de las plantas se basan en la modificación del ambiente del suelo por procesos como: captación de agua, liberación de compuestos orgánicos al suelo por las raíces, producción (por parte de los microorganismos) de factores de crecimiento y captación de minerales (Souchie *et al.*, 2006).

Una de las interacciones más ampliamente estudiadas es la interacción leguminosa-*rhizobium* esta asociación se basa en un reconocimiento mutuo de los dos organismos compatibles, basado en una respuesta quimiotáctica y una unión específica a las estructuras radicales. La asociación se caracteriza por el desarrollo de nódulos simbióticos fijadores de nitrógeno (Vinuesa y Silvia, 2004).

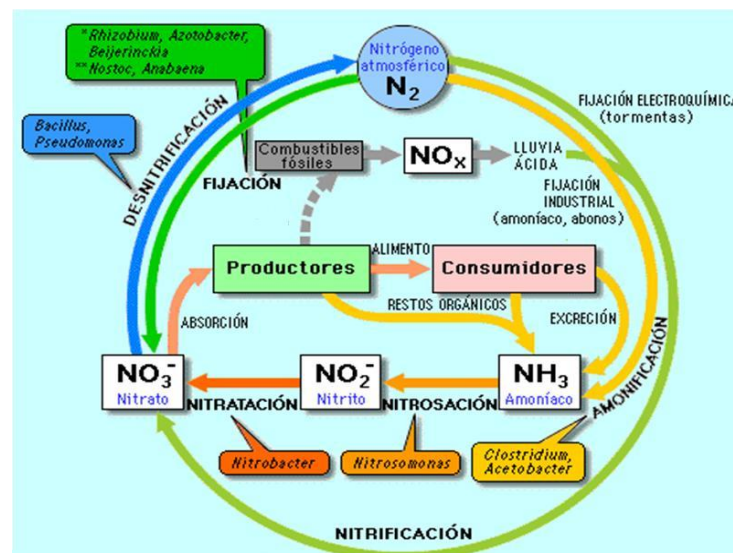
### **1.3.- Ciclo del nitrógeno**

El nitrógeno constituye aproximadamente el 78% de los gases atmosféricos siendo éste el principal reservorio del elemento (Behar *et al.* 2005), es un elemento fundamental para el desarrollo de la vida, ya que forma parte de las macromoléculas (Paerl, 1998), de forma tal que la productividad de cualquier ecosistema está relacionada con la disponibilidad de este elemento (Ferrera *et al.* 1995). Se presenta frecuentemente como limitante del crecimiento vegetal ya que es eliminado del suelo en cantidades superiores al resto de los nutrientes (Frioni, 1990), por lo que la productividad de los ecosistemas se

relaciona con la disponibilidad de este elemento (Zhang *et al.* 2007). Este elemento es de suma importancia en la agricultura, debido a que incrementa los rendimientos de la cosecha y modifica la composición química y calidad de los vegetales (Frioni, 1990)

De manera general los organismos requieren formas combinadas de nitrógeno para poder incorporarlo a su biomasa, el nitrógeno inorgánico como amonio, nitrato y nitrito en el se encuentran en forma de sales altamente solubles en agua lo cual facilita las pérdidas de nitrógeno por lixiviación (Chapin *et al.* 1992).

La conversión en los diferentes estados de oxidación del nitrógeno es principalmente por procesos biológicos (Deslippe y Egger 2006). Se puede describir brevemente el ciclo del nitrógeno de la siguiente manera: el nitrógeno atmosférico se fija por miembros del dominio *Archaea* y *Bacteriae* que lo reducen a formas asimilables ( $\text{NH}_3$ ); para el resto de los organismos este elemento se mantiene reducido dentro de la célula pero al morir los microorganismos este se libera y se oxida a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), que en condiciones anóxicas se desnitrifica y regresa a la forma elemental ( $\text{N}_2$ )(Fig 1.3). A través de este ciclo participan diversos grupos bacterianos. La nitrificación es un proceso aerobio estricto, quimiolitautótrofo y se encuentra restringido a un pequeño grupo de bacterias: Proteobacterias (Kowalchuck y Stephen 2001). Por otra parte, la desnitrificación es un proceso heterótrofo facultativo ocurre en bajas tensiones de oxígeno y es restringida a miembros de la familia *Bacteriae* y *Archaea* (Zhang *et al.* 2006).



**Figura 1.3** Ciclo del nitrógeno. En este se señala la participación de diferentes microorganismos en la conversión del nitrógeno en los diferentes estados de oxidación.

Tomado de [http://contenidos.educarex.es/cnice/biosfera/alumno/2bachillerato/Fisiologia\\_celular/contenidos11.htm](http://contenidos.educarex.es/cnice/biosfera/alumno/2bachillerato/Fisiologia_celular/contenidos11.htm)

Así misma se han descubierto nuevos procesos involucrados en el ciclo del nitrógeno como oxidación anaeróbica del amonio (Mulder *et al.* 1995) y la oxidación aeróbica del amonio realizadas principalmente por arqueas (Venter *et al.* 2005).

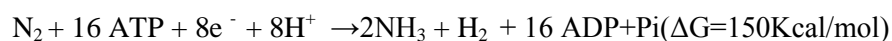
#### **1.4.- Fijación biológica del nitrógeno (FBN).**

La FBN o diazotrofia es un proceso importante en ecosistemas acuáticos y terrestres que no cuenten con fertilización química, siendo éste el principal aporte de nitrógeno para estos ambientes (Izquierdo *et al.* 2006). Es el proceso de reducción del  $N_2$  a  $NH_4^+$ , siendo éste una molécula asimilable para los organismos (Deslippe y Egger 2006) una pequeña parte del  $N_2$  puede ser fijada por procesos fisicoquímicos como en tormentas eléctricas pero la mayoría del nitrógeno se reduce de forma biológica (Postgate, 1982).

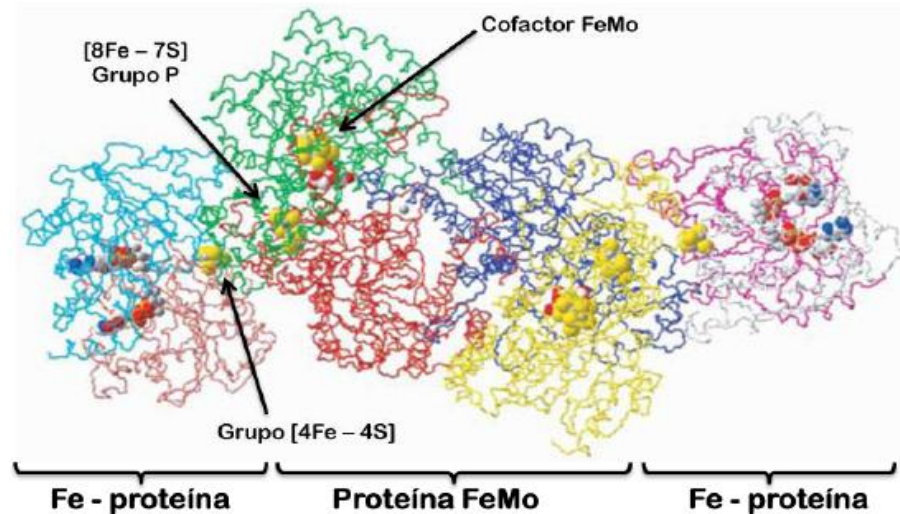
La FBN es un proceso ampliamente distribuido entre bacterias y arqueas (Zhang *et al.*, 2007). El complejo enzimático nitrogenasa es responsable de la FBN consta de dos componentes dinitrogenasa reductasa (con hierro como cofactor) y dinitrogenasa (con molibdeno y hierro como cofactores) (Henson *et al.*, 2004) la primera es una coproteína, homodimero  $\gamma_2$  codificado en el gen *nifH* (Zher *et al.*, 2003) con un solo grupo (4Fe-4S) unido entre las subunidades y es responsable de transferir los electrones a la dinitrogenasa. La segunda es un heterotetramero  $\alpha_2\beta_2$  contiene Fe y Mo que presenta el sitio activo para la reducción de nitrógeno; la cadena  $\alpha$  se encuentra codificada por el gen *nifD* y mientras que la cadena  $\beta$  se codifica en el gen *nifK*. La dinitrogenasa es responsable de la transferencia de electrones al  $N_2$  (Postgate, 1982).

La mayoría de los organismos diazotrofos presentan la nitrogenasa dependiente de molibdeno, sin embargo se ha encontrado que en condiciones de baja disponibilidad de este elemento se induce la síntesis de la nitrogenasa alternativa dependiente de Vanadio (Va) y hierro (Fe) como cofactor codificadas en los genes *vnf* y *anf* (Fallik *et al.*, 1991).

La FBN es un proceso energéticamente elevado por lo tanto la síntesis y actividad del complejo nitrogenasa se encuentra altamente regulado (Izquierdo *et al.*, 2006). A continuación se muestra la ecuación general de la fijación de nitrógeno.



Debido a lo cual la síntesis del complejo nitrogenasa se encuentra regulada a nivel transcripcional dependiendo el contenido de nitrógeno disponible en el ambiente.



**Figura 1.4** Estructura del complejo enzimático de la nitrogenasa. Las subunidades de los dímeros de las dos proteínas están en color azul, café, rosa y gris. Las subunidades  $\alpha$  de la proteína FeMo se muestran en color verde y amarillo y las subunidades  $\beta$  en rojo y azul intenso. Tomado de Dixon y Kahn, 2004.

Por otro lado, el complejo es sensible a oxígeno, por lo que los organismos diazotrofos presentan características particulares de crecimiento para proteger su nitrogenasa, sin embargo hasta el momento se ha descrito una nitrogenasa insensible al oxígeno la cual se encuentra en *Streptomyces thermoautotrophicus* y presenta la característica de requerir cuatro veces menos gasto energético que las nitrogenasas convencionales (Gadkari *et al.* 1992).

Este proceso en el suelo cercano a la raíz de las plantas es de gran importancia ecológica ya que parte del nitrógeno fijado queda disponible para la planta y la planta provee de exudados que pueden ser fuente de carbono para el microorganismo (Villadas *et al.* 2006).

## 1.5.-Gen *nifH*

El gen *nifH* como se había mencionado codifica para la nitrogenasa reductasa que es un homodímero que presenta un hierro como cofactor (Zehr *et al.* 2003).

La historia evolutiva del gen *nifH* es similar a la que presenta el gen 16S rRNA aunque debido a los sistemas de nitrogenasa alternativa (dependientes de vanadio etc.) y las múltiples copias de este gen dentro de un genoma indican que la identificación de la comunidad diazotrofa basado sólo en la secuencia del gen *nifH* debe tratarse con cautela (Burgmann 2003).

Este gen se ha usado como marcador para evaluar la diversidad de los organismo diazotrofos en diferentes ambientes, ya que es un gen altamente conservado entre los diferentes grupos de bacterias y también debido a que se cuenta con una gran base de datos de organismos diazotrofos descritos (Nusslein 1999). El análisis de este gen ha permitido conocer la distribución y complejidad de la comunidad diazotrofa en diferentes ambientes (Burckley *et al.* 2007).

## 1.5.-Bacterias fijadoras de nitrógeno como bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Por su capacidad de fijar nitrógeno, las bacterias fijadoras de nitrógeno se consideran como candidatos de biofertilizante, que se producen en varios países del mundo. Estos biofertilizantes se producen con diferentes bacterias, incluyendo: 1) Las simbióticas como inoculas para las leguminosas, por ejemplo: *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* para trébol (*Trifolium* spp.), *Bradyrhizobium japonicum* para soya (*Glycine max*), *Sinorhizobium meliloti* para alfalfa (*Medicago sativa*), *Mesorhizobium loti* para *Lotus* spp. 2) las bacterias fijadoras de vida libre, como rhizobacterias aisladas de suelo rizosferico (*Azospirillum*, *Klebsiella pneumoniae* etc.), o como endófitos aislados dentro tejido de las plantas (*Azoarcus*, *Gluconacetobacter*, *Phytobacter* etc.) (<http://sundaram.itrademarket.com/1176500/nitrogen-fixing-biofertilizer.htm>).

Por otro lado, también se usan las bacterias que producen fitohormonas o solubilizan fosfatos y potasio como biofertilizante (Koh Y Song, 2007; Vyas y Gulati, 2009). Ya se sabe que bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre además de aportar éste elemento al ecosistema pueden participar en otros procesos

contribuyendo así a la productividad del ecosistema, en general el beneficio de las bacterias de vida libre en el suelo esta usualmente referido como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR: “plant growth promotion rhizobacteria”), que pueden tener un efecto directo o indirecto sobre la planta (Leaungvutiviroj *et al.*, 2010). Un mecanismo indirecto de PGPR es prevenir o disminuir el efecto de uno o más organismos fitopatógenos (Glick, 1995). Los efectos directos pueden ser la fijación biológica de nitrógeno, movilización de nutrientes, producción de fitohormonas dentro de la que destaca el ácido indolacético (AIA), movilización de nutrientes, producción de sideróforos, reducción de niveles de etileno el cual es sintetizado por la planta en respuesta a 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 nitrógeno, por acción de la enzima ACC- desaminasa (Burd *et al.*, 1998).

En muchos casos, las bacterias tienen la capacidad a producir la AIA, un tipo de auxinas las cuales son responsables del crecimiento de la planta por división y alargamiento de sus células en todos los niveles este grupo estimula la germinación, incrementa el xilema y la formación de raíces. Controlan procesos vegetativos como crecimiento tropismo, floración fructificación en plantas. Su representante más abundante en la naturaleza es el AIA cuyo precursor es el aminoácido triptófano (Tsavkelova *et al.*, 2005). Con esta función, las cepas bacterianas capaces de producir AIA pueden ser candidatos de biofertilizante.

Fosforo es uno de los elementos esenciales más importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas en todas sus etapas fisiológicas pero también puede no estar disponible ya que es rápidamente inmovilizado al interactuar con el resto de los componentes del suelo (Dias *et al.*, 2007). Es posible que las rizobacterias incrementen la capacidad de las plantas de absorber éste elemento solubilizando el fosforo por la producción de ácidos orgánicos débiles (Li *et al.*, 2007). Por eso, la capacidad de solubilizar fosfato es una característica importante para seleccionar las bacterias potenciales de producir biofertilizante.

## **2. Justificación**

El nitrógeno es un elemento de alta demanda para los organismos ya que es el componente principal de la mayoría de las macromoléculas vitales debido a lo cual la productividad primaria de los ecosistemas está íntimamente relacionada con la disponibilidad de este elemento. La fijación biológica de nitrógeno es un proceso de gran importancia para los ecosistemas que no cuentan con fertilización química tal es el caso de las chinampas, siendo este proceso el principal aporte de este elemento para los ambientes.

La técnica de cultivo en chinampa se conserva exclusivamente en México y se caracteriza por una explotación agrícola intensiva sin la adición de fertilizantes químicos por lo que es importante conocer la diversidad de la comunidad microbiana en el sistema y en particular la diversidad de la comunidad diazotrofa y su participación en la productividad del mismo y su posible desempeño como rizobacteria promotora del crecimiento vegetal.



### **3. Objetivos.**

#### **3.1.- Objetivo general.**

- ❖ Aislar y caracterizar bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en el suelo de chinampa y evaluar su efecto sobre el crecimiento vegetal.

#### **3.2.- Objetivos particulares.**

- ❖ Determinar las características fisicoquímicas del suelo de chinampa.
- ❖ Cuantificar y aislar bacterias fijadoras de nitrógeno en suelo rizosférico y no rizosférico.
- ❖ Identificar las bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas con base en la secuencia del gen 16S rRNA.
- ❖ Evaluar la actividad enzimática de nitrogenasa, producción de ácido indol acético y solubilización fósforo inorgánico.
- ❖ Evaluar del efecto de los aislados seleccionados productores de fitohormona sobre el crecimiento de plantas de alfalfa y trigo a nivel de invernadero.
- ❖ Evaluar el efecto de los aislados fijadores de nitrógeno sobre el crecimiento de plantas alfalfa y trigo a nivel de invernadero.

## 4. Materiales y Métodos

En la figura 4.1 se observa el diseño general del trabajo experimental.

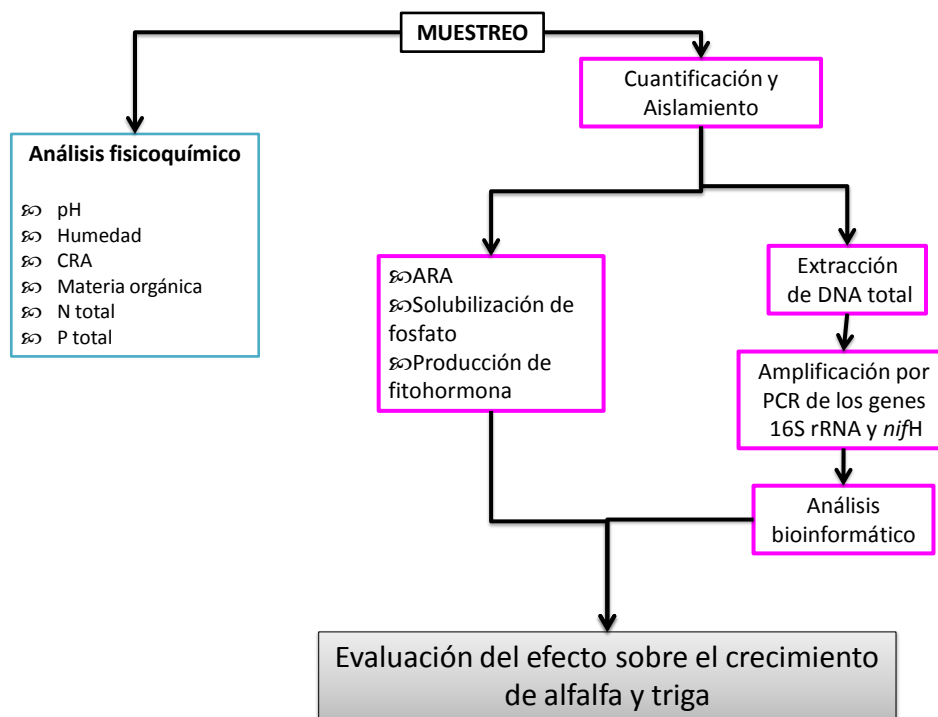


Figura 4.1 Diseño general de trabajo

### 4.1.-Muestreo

Se seleccionaron dos chinampas localizadas en la Delegación Xochimilco, Colonia San Juan Moyotepec, Canal Apatlaco Paraje Potrero. La colecta se realizó con la técnica de puntos en cruz, se retiró la hojarasca superficial del suelo, se tomaron muestras de suelo superficial (0-30 cm) y cinco muestras de suelo profundo (30-60 cm) en cinco puntos de la chinampa. Las muestras de cinco puntos posteriormente se mezclaron en una misma proporción obteniendo dos mezclas compuestas por chinampa. Por otro lado se obtuvo suelo rizosférico de las plantas que se encontraban cultivadas Acelga (*Beta vulgaris L*) y alfalfa (*Medicago sativa*), y silvestres, un pasto (*Aristida adscensionis*) y lengua de vaca (*Rumex crispus*). El suelo rizosférico se obtuvo de la siguiente manera: se extrajeron las plantas con raíz y posteriormente se cepillaron las raíces desprendiendo así el suelo adherido a ellas, también se incluyeron para aislamiento algunos nódulos encontrados en alfalfa de chinampa II ya que el resto de las plantas no presentaba nódulos

fijadores de nitrógeno. Las diez muestras (Tabla 4.1) se almacenaron en bolsas de polietileno negras y se conservaron a 4°C hasta el momento de procesarse (Burlage 1998).

**Tabla 4.1** Muestras de suelo colectas

<b>Sitio</b>	<b>Suelo rizosférico de</b>	<b>Suelo no rizosférico</b>	<b>Nódulo</b>
<b>Chinampa I</b>	Acelga ( <i>Beta vulgaris L</i> )	Suelo superficial I	
	Alfalfa( <i>Medicago sativa</i> )	Suelo profundo	
	Afalfa ( <i>Medicago sativa</i> )	Suelo superficial II	
<b>Chinampa II</b>	Pasto ( <i>Aristida adscensionis</i> )	Suelo profundo II	
	Lengua de vaca ( <i>Rumex crispus</i> )		Nódulos fijadores de nitrógeno

#### **4.2.- Análisis fisicoquímicos del suelo**

Se realizó la caracterización fisicoquímica del suelo de acuerdo a la norma NOM-021-SEMARNAT-2000 Determinando las características de: textura, pH, humedad, capacidad de retención de agua, contenido de materia orgánica, potasio fosforo y nitrógeno total en el suelo.

#### **4.3 .- Evaluación de la actividad enzimática de nitrogenasa en suelo por la técnica de reducción de acetileno (ARA)**

Se produjo acetileno mediante la disolución de carburo de calcio en agua empleando una trampa de agua permitiendo capturar el acetileno producido.

Los ensayos se realizaron en viales de 20 mL conteniendo 1 g de suelo húmedo con agua destilada estéril ajustado a un 70% de la capacidad de campo, posteriormente se inyectó acetileno a una concentración de 10% por reemplazo de volumen idéntico de aire se incubó a 28°C durante 48 horas y se determinó la reducción de acetileno por la producción de etileno por cromatografía de gases acoplado detector de ionización de flama (Bergue *et al.* 1991)..

#### **4.4 .-Cuantificación de BFN por el método del número más probable (NMP)**

Se realizaron diluciones decimales de 1 g de de las diferentes muestras de suelo de las chinampas en 9 mL de agua destilada hasta  $10^{-6}$  para el caso de suelos no rizosféricos, en el caso de suelos rizosféricos se realizaron diluciones hasta  $10^{-7}$ ; de las últimas tres diluciones de cada tipo de suelo se tomó 1 mL para inocular en tubos de  $18 \times 1.5$  cm con 10 mL de medio Bridges (Apéndice I) la siembra se realizó por triplicado de cada dilución. Se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 2 semanas; tomando como positivo el crecimiento (Bridges 1981).

#### **4.5 Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno**

##### **4.5.1.-Aislamiento de bacterias fijadoras de vida libre.**

Se realizó el aislamiento en medio Bridges (ver Apéndice I) (Bridges 1981).

Se pesó 1 g de suelo húmedo de las diferentes chinampas y se hicieron diluciones decimales en 9 mL de agua destilada hasta  $10^{-7}$  se sembraron por duplicado 100  $\mu\text{l}$  las diluciones de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  por extensión en placa en los medios antes mencionados. Se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  de 48 a 72 h en condiciones de aerobias y anaerobias utilizando GasPack.. Se realizó el aislamiento tomando en cuenta la morfología colonial de las bacterias agrupándolas en morfotipos, considerando las características de forma, color, tamaño, bordes, etc.. Se realizaron tres pases consecutivos con estría cruzada para verificar pureza y después se realizó una tinción de Gram para describir morfología microscópica (Vincent 1970)

Finalmente cada morfotipo diferente purificado, se sembró tres pases en tubos de  $18 \times 1.5$  cm con 10 mL de medio mineral y se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  por 2 semanas en cultivo estacionario (Alef y Nannipieri 1995). Se consideraron como fijadoras a aquellos aislados que presentaron crecimiento hasta el tercer pase en medio mineral.

##### **4.5.2.- Aislamiento de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno.**

El aislamiento de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno de los nódulos de alfalfa se realizó de la siguiente manera: Los nódulos se desinfestaron superficialmente lavando con detergente se colocaron en etanol al 70% por 30 segundos posteriormente se colocaron en hipoclorito al 1% durante 5 minutos

después de los cuales se realizaron 5 lavados con agua estéril y finalmente los nódulos fueron macerados y sembrados por estría cruzada en medio PY (Apéndice I) (Vincent 1970).

## **4.6.-Identificación molecular de los aislados.**

### **4.6.1- Obtención de DNA total de los aislados.**

Se realizó la extracción del DNA total de los aislados siguiendo el protocolo del CTAB propuesto por Allers y Lichten 2000 y modificado por Rodriguez Tovar 2004 (ver Apéndice III)

Para evaluar la calidad del DNA extraído se realizó una electroforesis colocando 2  $\mu\text{l}$  del DNA en un gel de agarosa al 1% (w/v) corrido a 70 volts durante 45 minutos utilizando un regulador de TBE 0.5X, después el gel se tiñió con 0.5  $\mu\text{ml}^{-1}$  de bromuro de etidio durante 5 min y se observó bajo luz UV (Sambroock *et al.* 2002).

El DNA se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **4.6.2- Amplificación del gen 16S rRNA**

Se amplificó el gen 16S ribosomal utilizando los iniciadores fD1 (5`-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3`) y rD1 (5`-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3`) descritos por Weisburg *et al.* (1990). Bajo las siguientes condiciones: un ciclo de  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 min, 35 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  por 2 min (desnaturalización),  $42^{\circ}\text{C}$  por 30 s (alineamiento), un ciclo de  $72^{\circ}\text{C}$  por 2 min (extensión) y un ciclo final de  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 min (extensión final). La mezcla de reacción de PCR contenía en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ , conteniendo 50 ng de DNA molde, 1X de regulador de PCR, 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 0.1  $\mu\text{M}$  de cada iniciador y 2.5 U de *Taq* polimerasa

Los productos de PCR se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

#### **4.6.3.- Secuenciación**

Los productos de PCR se purificaron utilizando el Kit PCR DNA purification de Qiagen siguiendo las especificaciones dadas por el proveedor y se enviaron a secuenciar a el Laboratorio de Bioquímica Molecular Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO) FES IZTACALA, UNAM, mediante el sistema ABI 3100 de 16 capilares que utiliza el MÉTODO BIG DYE Terminator fluorescence based sequencing para análisis de secuencia y utiliza la Matrix DS-30 para análisis de los fragmentos.

#### **4.6.4.- Análisis de las secuencias obtenidas.**

Las secuencias obtenidas se sometieron a una búsqueda de secuencias similares en el GenBank por medio del programa BLAST (Altschul *et al.* 1997) con los parámetros preestablecidos en la página de la NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>). Se realizó un alineamiento múltiple usando el programa CLUSTAL X versión 2.0 Multiple Alignment (Larkin *et al.* 2007) y se realizó la edición de las secuencias manualmente en el programa Seaview (Galtier *et al.* 1996). Los arboles de filogenia se construyeron con el programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.* 2007) usando el método de agrupamiento de Neighbor-Joining con un bootstrap 1000 aleatorizaciones.

#### **4.6.5.- Amplificación del gen *nifH* y *nifD*.**

Se amplificaron los genes *nifH* y *nifD* utilizando diferentes iniciadores (Tabla 4.2) bajo las siguientes condiciones :un ciclo de 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 2 min (desnaturalización), 58°C por 30 s (alineamiento), un ciclo de 72°C por 2 min (extensión) y uno final de 72°C por 10 min (extensión final). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL, conteniendo 50 ng de DNA molde, 1X de regulador de PCR, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0.1 µM de cada iniciador y 2.5 U de *Taq* polimerasa. Los productos de PCR se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Los productos de PCR se detectaron mediante corrimiento electroforético en agarosa al 1% en regulador de TBE 0.5X, tomando como positivo la detección del amplificado del tamaño esperado.

**Tabla 4.3** Oligonucleotidos usados para amplificar los genes *nifH* y *nifD*

Iniciador	Secuencia (5'→3')	Organismo (GenBank)	Referencia
nifHAzo-F	GACTCCACCCGCCTGATCCT	<i>Azotobacter vinelandi</i>	
nifHAzo-R	ATGACCGTGATCGAATACGATC	(M11579)	
nifHCló-F	GCTATTTAYGGAAARGTTG	<i>Clostridium</i>	Navarro Noya,
nifHCló-R	ATGATGGCAHTRTATGC	<i>pasteurianum</i>	2007
		(AY603957)	
nifH FRZ-F	TYGGCAAGTCCACCACC	<i>Azospirillum brasilense</i>	
nifH FRZ-R	TCCGGYGATATGATGGCGC	(M64344)	
nifHF	AACGGCTANGGSGGRAANGGCAT	<i>Rhizobium</i> sp	Laguerre <i>et al</i>
nifHI	ACCTNCTYGASTYCTGTACGA		2001
nifD-F	GARTGCATCTGRCGGAAMGG		Navarro Noya
			2007
nifD-R	CGCGGCTGCGCCTAYGCMGG		

#### 4.7.- Determinación de la actividad enzimática de la nitrogenasa

Se realizó la prueba de reducción del acetileno (descrita anteriormente) para evaluar bioquímicamente la actividad enzimática de la nitrogenasa en los aislados fijadores de nitrógeno de vida libre (Bergue *et al.* 1991).

Se utilizó como control negativo *Escherichia coli* DH5a y como control positivo *Klebsiella variicola* 801 (Bergue *et al* 1991).

#### 4.8.-Solubilización de fosfato tricalcico.

Los aislados se sembraron por picadura en medio NBRIP (Apéndice I) se incubaron a 28°C durante 7 días. Una prueba positiva se observó por la formación de un halo de solubilización del fosfato tricálcico (Nautiyal 1999). Después de la incubación se midió el tamaño de los halos y se calculó el índice de solubilización.

Se calculó el índice de solubilización mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Solubilización} = A/B$$

Donde: A= diámetro de la colonia + diámetro del halo  
B= diámetro de la colonia

Tomando como solubilizadoras importantes a aquellos aislados con índice mayor a 4 (Kumar y Narula 1999).

#### **4.7.3.- Producción de ácido índol acético (AIA)**

Se inoculó medio King B con triptófano a una concentración de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  (Apéndice I), se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  durante 48 h posteriormente se centrifugó 10000 rpm (indica x g) durante 5 min, a 1 mL de sobrenadante se le agregaron 2 mL del reactivo de Salkowsky en base de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y se determinó absorbancia a 540 nm (Glickmann y Dessaux 1994).

#### **4.8.- Evaluación del efecto del inóculo productor de AIA sobre el crecimiento de plantas de alfalfa y trigo a nivel de invernadero.**

Con base en la producción de AIAse seleccionaron dos aislados con capacidad de producir AIA en mayor concentración. Se evaluó el efecto de la inoculación de los aislados AI3 y AI9 identificados como pertenecientes al género *Rhizobium* sobre el crecimiento de trigo y alfalfa.



### Diseño experimental

Se estableció bajo un diseño lineal evaluando el efecto del inoculo sobre el desarrollo vegetal en condiciones de invernadero.

Los tratamientos para ambas plantas fueron los siguientes:

T1: Control positivo: Inoculado con *Azospirillum* sp.

T2: Control negativo: sin inóculo.

T3: Plantas inoculadas con el aislado AI3.

T4: Plantas inoculadas con el aislado AI9.

### Germinación de semillas

Las semillas de trigo se lavaron superficialmente con detergente, posteriormente se colocaron en etanol al 70% por 2 min y después en hipoclorito de sodio al 2% durante 10 min, finalmente se realizaron 10 lavados con agua estéril y se colocaron las semillas en placas de Petri con agar agua (agar 0.75%) las placas se incubaron durante 2 días a 28°C.

En el caso de las semillas de alfalfa se desinfectaron colocándolas en etanol al 70% por 30 s posteriormente en hipoclorito al 1.2% durante 2 min después se realizaron lavados con agua estéril y finalmente se transfirieron las semillas a agar agua y se incubaron a 28°C durante 24 h en oscuridad (Somasegaran y Hoben 1994).

### Preparación de maceteros.

En el caso del trigo como maceteros se usaron vasos de unicel de 1 L los cuales se desinfectaron superficialmente con hipoclorito al 2% y se dejó secar, se llenaron hasta 3/4 partes con una mezcla 1:1 de vermiculita y turba estéril (autoclave dos ciclos de 1 h) se hidrató inicialmente con agua destilada estéril y se colocaron 4 semillas por macetero. Se utilizaron 8 maceteros por tratamiento teniendo un total de 32 plantas por tratamiento (128 plantas totales). En el caso de alfalfa se usaron contenedores de polietileno con volumen 100 cm<sup>3</sup>, por cada contenedor se colocaron 3 plántulas y por cada serie de tratamiento se utilizaron 12 contenedores

### Preparación de inóculo

Se inocularon matraces con 25 mL de medio PY y se incubaron a 28°C durante 48 h en agitación (180 rpm), posteriormente se cosecharon las células y se lavaron dos veces con solución salina isotónica para eliminar el medio de cultivo, se ajustó el inóculo a  $10^7$  células mL<sup>-1</sup>. (Wang *et al.* 2006). En el caso del trigo se inocularon directamente sobre las plántulas con 100 µL en el caso de alfalfa se inoculó con 100 µL cada macetero en la parte central. Se cubrieron las plantas y se regaron hasta 24 h después de inocular.

### Incubación y riego

Las plantas se mantuvieron en el invernadero durante 50 días (Beneduzi *et al.* 2008) y se regaron cada 72 h con 200 y 20 mL de solución nutritiva completa para trigo y alfalfa, respectivamente (Apéndice II), al finalizar se evaluaron los siguientes parámetros ecofisiológicos: longitud de la parte aérea, longitud de la raíz, longitud total, peso seco total, peso seco de la parte aérea y de raíz (García 1992).

## **4.9.-Evaluación del efecto de inocular bacterias fijadoras de nitrógeno en el crecimiento de plantas de trigo y alfalfa a nivel de invernadero.**

Con base en la detección de actividad enzimática de la nitrogenasa y la identificación molecular de organismos reportados como fijadores de nitrógeno, se seleccionaron cuatro aislados: AcA2 (cepa no identificada), L2B (*Stenotrophomonas maltophilia*), IISA *Clostridium* sp. AvJ (cultivo mixto proveniente de suelo rizosférico de acelga).

### Diseño experimental.

El ensayo se estableció bajo un diseño bifactorial con los siguientes tratamientos:

- T1 Control positivo plantas sin inocular y regadas con solución nutritiva completa.
- T2 Control negativo plantas sin inocular y regadas con solución nutritiva sin nitrógeno.
- T3 Plantas inoculadas con IISA y regadas con solución nutritiva completa.
- T4 Plantas inoculadas con IISA y regadas con solución nutritiva sin nitrógeno.

- T5 Plantas inoculadas con AcA2 y regadas con solución nutritiva completa.
- T6 Plantas inoculadas con AcA2 y regadas con solución nutritiva sin nitrógeno.
- T7 Plantas inoculadas con L2B y regadas con solución nutritiva completa.
- T8 Plantas inoculadas con L2B y regadas con solución nutritiva sin nitrógeno.
- T9 Plantas inoculadas con AcJ y regadas con solución nutritiva completa.
- T10 Plantas inoculadas con AcJ y regadas con solución nutritiva sin nitrógeno.

#### Germinación de semillas, preparación de inóculo y preparación de macetero

La germinación de las semillas, preparación de inóculo y maceteros fue la misma mencionada en la evaluación de producción de fitohormona para cada una de las plantas estudiadas.

#### Incubación y riego

Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero durante 50 días y se regaron cada 72 h con solución nutritiva, completa y sin nitrógeno para trigo (García 1992) y alfalfa (Somasegaran y Hoben1994) dependiendo del tratamiento (Apéndice). Al finalizar los 50 días se determinaron las mismas variables ecofisiológicas que para evaluar el efecto de producción de AIA.

#### **4.10.-Análisis estadístico.**

Las variables ecofisiológicas evaluadas, longitud de la parte aérea, longitud de la raíz, longitud total, peso seco total, peso seco de la parte aérea y de raíz se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía usando PROC GLM (SAS 1989) para probar diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey  $P < 0.05$ ). Los datos mostrados son medias de veinte valores ( $N = 20$ ). Para observar gráficamente el efecto de los tratamientos en cada variable de las dos plantas se realizó un análisis descriptivo de cada bioensayo con una gráfica de coplot;. Se utilizó la función coplot del paquete graphics del ambiente R (R Development Core Team 2008).

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para determinar la relación entre las variables ecofisiológicas evaluadas, longitud de la parte aérea, longitud de la raíz, longitud total, peso seco total, peso seco de la parte aérea y de raíz y los tratamientos usando una rotación ortogonal/VARIMAX Las variables se auto escalaron antes del ACP [29]. El número de componentes se determinó por el criterio del

valor propio [21]. Por otra parte, se realizó una prueba [8] para corroborar los resultados, se observaron componentes principales con valores propios  $>1$  y que explicaron  $> 10\%$  de la variación total. Se realizó una rotación VARIMAX para realzar la interpretación de los componentes sin correlación [13]. El ACP revela a menudo asociaciones no previstas entre variables y de tal modo permite una interpretación que no sería posible de otra manera [19]. Para el efecto de la fijación biológica de nitrógeno, con una matriz de 200 filas (10 tratamientos, 20 repeticiones) y 5 columnas (variables numéricas).

Se utilizó el paquete Ade4 ACP (Chessel *et al.* 2004) con la función `dudi.pca`, se utilizó el ambiente R 2.9 (R Development Core Team, 2008) (Apéndice )

## 5.--Resultados.

### 5.2.- Características fisicoquímicas del suelo de chinampa.

De acuerdo a las características fisicoquímicas del suelo de chinampa, de manera general se puede ver que el suelo de chinampa es un suelo rico en materia orgánica, nitrógeno, fósforo además que presenta concentraciones elevadas de potasio y un pH alcalino (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1.** Características fisicoquímicas del suelo de chinampas a dos diferentes profundidades

Características	Muestras de suelo				Valor recomendado en la norma
	ChI S*	ChI Pr	ChII S	ChII Pr	
Textura	Franco arcilloso				
pH	8.6	8.8	8.7	8-0	
Humedad (H)	24	44	38	48	
CRA (%)	120.2	116.7	148	112.1	
Materia orgánica (%)	7.5	4.6	7.5	6.4	
K (mg kg <sup>-1</sup> )	4468	3539	3727.5	2054.2	
P (mg kg <sup>-1</sup> )	22.4	17.4	3.7	19.6	
N %	0.8	0.56	0.75	0.58	

\*:ChI S = suelo superficial de chinampa I, ChI Pr = suelo profundo chinampa I; ChII S = suelo superficial de chinampa II, ChII Pr = suelo profundo chinampa II

### 5.2. Evaluación de la actividad enzimática de la nitrogenasa en suelo.

Se observó una mayor actividad de nitrogenasa en el suelo rizosférico de acelga y lengua de vaca comparado con el resto de los suelos rizosféricos. Por otro lado, en suelo no rizosférico se detectó mayor actividad en suelo profundo de la chinampa II (ChII Pr) que en el suelo superficial, sin embargo, esta relación no se mantiene en la chinampa I (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2** Actividad de enzimática nitrogenasa en suelo total

Suelo	nmoles de etileno h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> de suelo
Alfalfa I	0.054±0.006
<b>Acelga I</b>	<b>67±2.04</b>
Alfalfa II	0.20±0.003
Pasto	19.03±0.01
Lengua de Vaca	22.18±1.23
ChI S	25±0-98
ChI Pr	1.29±0.53
ChII S	<b>2.73±0.43</b>
<b>ChII Pr</b>	<b>39.54±2.56</b>
<i>Klebsiella variicola</i> 801*	170.54±0.052

\* Cepa usada como control positivo de fijación biológica de nitrógeno.

### 5.3.- Cuantificación de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (NMP)

De acuerdo a los resultados obtenidos de abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en suelos rizosféricos de chinampa se observa un mayor número de diazótrofos en la rizosfera de acelga comparada con las otras muestras (Tabla 5.3).

**Tabla 5.3.** Abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en suelos rizosféricos de chinampa.

Muestra	NMP g <sup>-1</sup> de suelo seco
Alfalfa I	1.4x 10 <sup>6</sup>
Acelga	>1.4x 10 <sup>6</sup>
Alfalfa II	1.7x 10 <sup>5</sup>
Pasto	1.7x 10 <sup>6</sup>
Lengua de vaca	3.31x 10 <sup>5</sup>

El NMP de diazótrofos presentes en suelos no rizosféricos, demuestra que existe un mayor número en suelos profundos comparados con los suelos superficiales (Tabla 5.4).

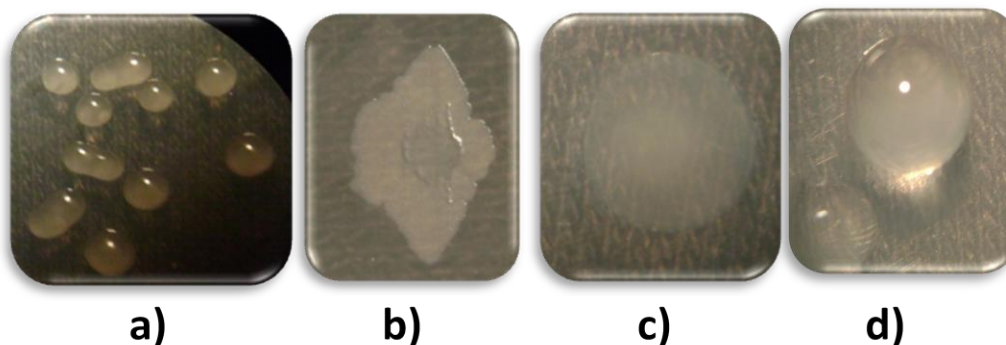
**Tabla 5.4** Abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre de suelos no rizosféricos de chinampa

Suelo	NMP g <sup>-1</sup> de suelo seco
Ch I S	1.4x 10 <sup>5</sup>
Ch I Pr	>1.9x 10 <sup>5</sup>
Ch II S	1.7x 10 <sup>5</sup>
Ch II Pr	>2.1x 10 <sup>5</sup>

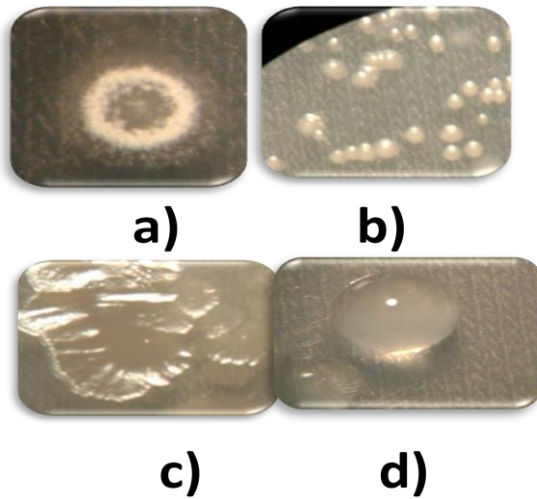
En las tablas anteriores se puede observar que el número de bacterias fijadoras de nitrógeno es mayor en los suelos rizosféricos, presentando órdenes de 10<sup>6</sup>, mientras que en los suelos no rizosféricos se encontraron valores en el orden de 10<sup>5</sup>.

#### 5.4.- Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno

Se obtuvieron un total de 63 aislados, 10 provenientes de nódulo de alfalfasin fuente de nitrógeno, 33 aislados de suelos rizosféricos y 20 de suelos no rizosféricos. Los cuales se seleccionaron con base en las características morfológicas (Figuras 5.1 y 5.2).



**Figura 5.1** Morfología colonial de posibles diazotrofos aislados de suelo rizosféricos  
 e) Morfotipo 1 aerobio  
 f) Morfotipo 2 aerobio  
 g) Morfotipo 3 aerobio  
 h) Morfotipo 4 aerobio



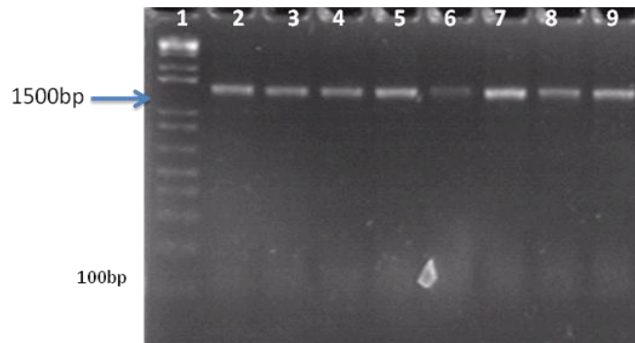
**Figura 5.2** Morfología colonial de posibles diazotrofos Aislados de suelo no rizosférico

- e) Morfotipo 1 aerobio
- f) Morfotipo 2 aerobio
- g) Morfotipo 3 aerobio
- h) Morfotipo 1 anaerobio

## 5.5.- Identificación molecular de los aislados.

### 5.5.1.- Amplificación del gen 16S rRNA.

La amplificación del gen 16S rRNA de los aislados obtenidos, con un tamaño aproximado de 1500 pb, se realizó por medio de un gel de agarosa al 1% (Figura 5.3).



**Figura 5.3.** Amplificado del gen 16S rRNA de los aislados obtenidos..1.- MTM, Carril 2.- Amplificado de AI1, 3.- Amplificado AI2A, 4.- Amplificado AI3, 5.- Amplificado AI4, .6.- Amplificado N5, 7.- Amplificado N6 , 8.- Amplificado N 7, 9.- Amplificado N8



### 5.5.2.-Análisis de las secuencias obtenidas.

La identificación molecular se realizó con base al análisis del gen 16S rRNA de los aislados; este análisis nos permite ubicarlos dentro de diferentes géneros (Tabla 5.7 y eFigura 5.4) .

**Tabla 5.5** Identificación molecular de las diferentes aislados

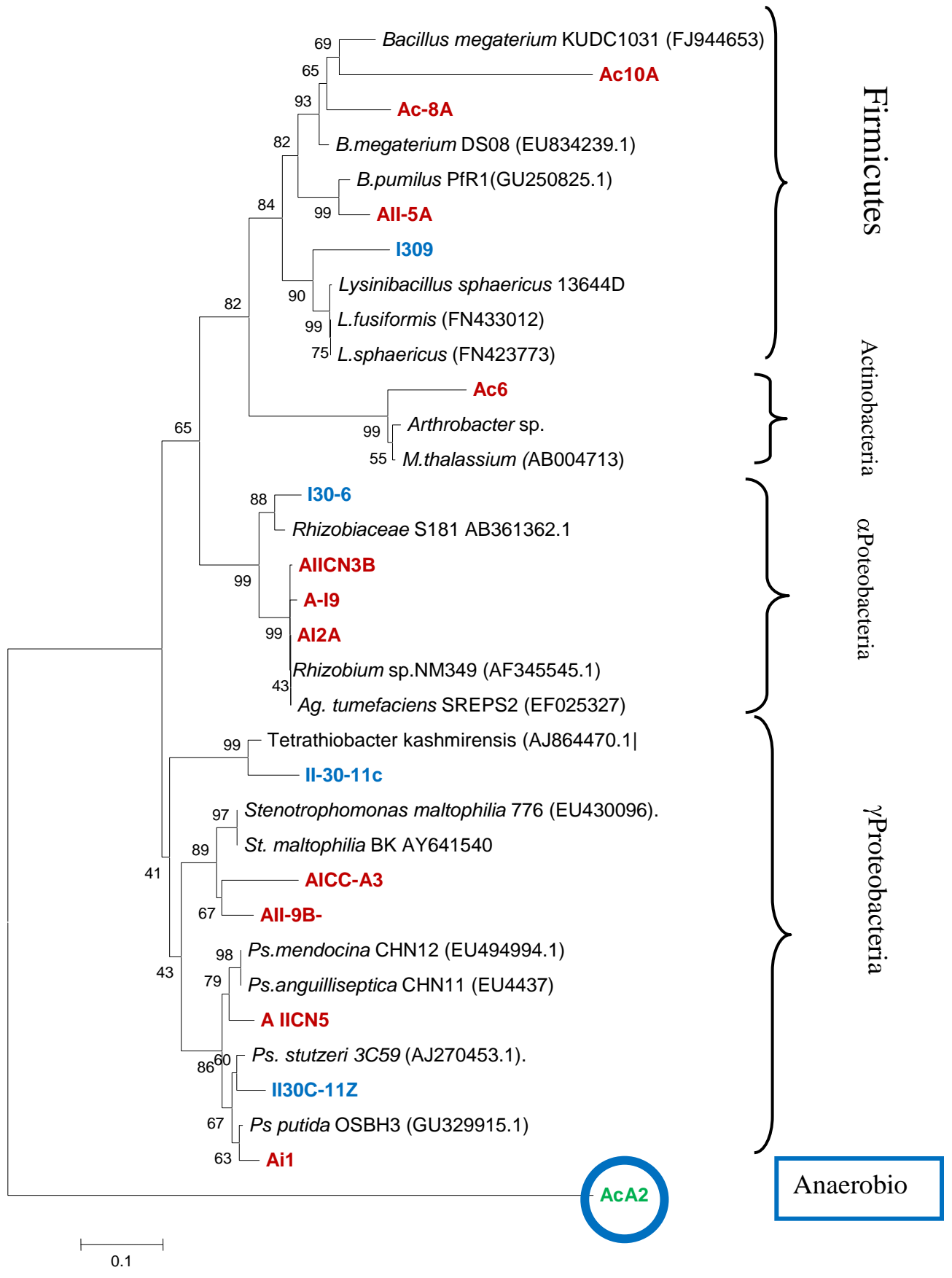
Procedencia	aislado	Grupo filogenético	Relación filogenética	Detección de gen <i>nifH</i>	Detección de gen <i>nifD</i>
<b>Nódulos</b>	N1,N2,N3 N5,N6, N11	$\alpha$ Proteobacteria	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	+	+
	N4,N7, N8,N9	$\alpha$ Proteobacteria	<i>S. medicae</i>	+	+
<b>Rizosfera de alfalfa</b>	AI-1	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Pseudomonas putida</i>	-	-
	AIB	$\beta$ proteobacteria	<i>Achromobacter xyloxidans</i>	-	-
	AI3, AI9	$\alpha$ Proteobacteria	<i>Rhizobium</i> sp.	-	-
	AI2A	$\alpha$ Proteobacteria	<i>Agrobacterium tunefaciens</i>	-	-
	AICCA3	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Stenotrophomona maltophilia</i>		
<b>Rizosfera Acelga</b>	Ac2,	$\beta$ proteobacteria	<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	+
	Ac6	$\beta$ proteobacteria	<i>A. faecalis</i>	+	+

	Ac8A Ac10A	Firmicutes	<i>Bacillus megatherium</i>		
	AcA2	-	<b>no identificada</b>	-	-
	AII1	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Ps. rhizophaerae</i>	-	-
	AIICN5	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Ps. pseudoalcaligenes</i>	-	-
<b>Rizosfera Alfalfa II</b>	AIICN3B	$\alpha$ Proteobacteria	<i>Ag. tumefaciens</i>		
	AII5A	Firmicutes	<i>B.pumilus</i>		
	AII9B	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Ste.maltophilia</i>	+	-
	P1	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Ps putida</i>	-	-
	P7	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>		
<b>Rizosfera Pasto</b>	P8,P6	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Ps. brassicacearum</i>		
	P9	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Ste. maltophilia</i>		
	P10A	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Ps.hibiscicola</i>	+	-

	P10B	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Ste. maltophilia</i>		
	P11	Firmicutes	<i>Paenibacillus pabuli</i>		
<b>Rizosfera Lengua de vaca</b>	L2A, L3, L6	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Serratia plymuthica</i>	+	-
	L2B, L, L10	$\gamma$ Proteobacteria	<i>St. Maltophilia</i>	+	-
	L4A	$\beta$ proteobacteria	<i>A.faaecalis</i>	+	+
	L7	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Azoarcus</i> sp.		
	L9A	Actinobacteria	<i>Rhodococcus bakonurensis</i>		
<b>No rizosférico superficial I</b>	IS2, IS8 IS10	Actinobacteria	<i>Streptomyces alvidoflavus</i>		
	IS4B		<i>Microbacterium profundi</i>		
	IS9	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Ps. stutzeri</i>		
<b>No rizosférico profundo I</b>	IPr-3	$\alpha$ Proteobacteria	<i>Rhizobium</i> sp.		
	IPr-6	$\alpha$ Proteobacteria	<i>Aminobacter</i> sp.	-	-

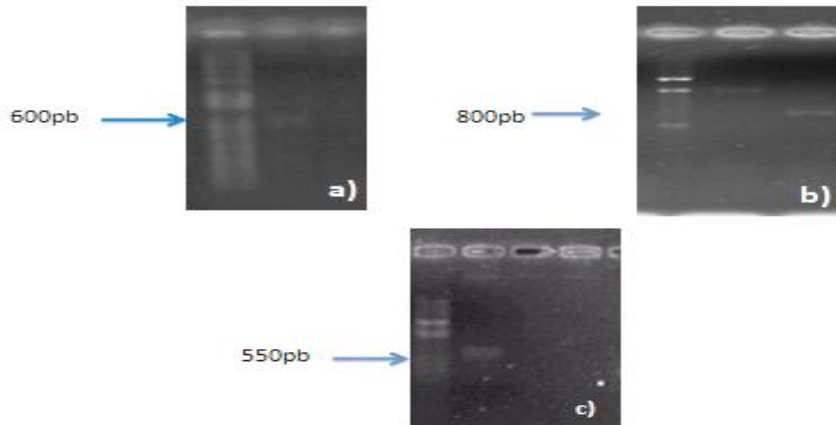
Procedencia	Aislado	Grupo filogenético	Relación filogenética	Detección de gen <i>nifH</i>	Detección de gen <i>nifD</i>
No rizosférico Superficial II	IPr-9	Firmicutes	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>		
	IISA		<i>No identificado</i>	-	-
	IIS12	Firmicutes	<i>Paenibacillus pabuli</i>	-	-
No rizosférico Profundo II	IIPr-11C	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Tetrathlobacter kashmirensis</i>	-	-
	IIPr11Z	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Ps. stutzeri</i>	+	-
	IIPrCC	$\gamma$ Proteobacteria	<i>Ste. maltophilia</i>	+	-

**Fig 5.4.** Filograma obtenido de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de las cepas aisladas en medio para fijadoras de nitrógeno. Análisis basado en los datos de las secuencias parciales del gen 16S rRNA con 10 000 aleoterizaciones tipo "Bootstrap" por el método de agrupamiento "Neighbor Joining" usando el índice de distancia Kimura 2 parámetros. La barra indica el número de cambios por secuencia.



### 5.5.3.- Detección del gen *nifH* y *nifD*

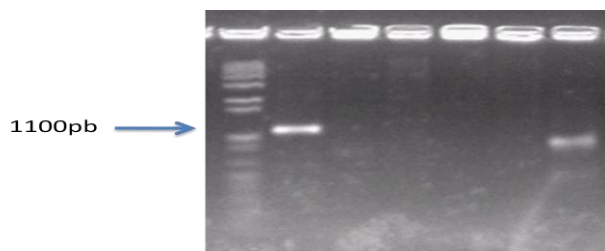
Se lograron detectar los genes *nifH* de los aislados obtenidos, usando diferentes juegos de iniciadores (Figura 5.5).



**Figura 5.5.** Amplificado de genes *nifH*

- a) Amplificado de genes de *Rhizobium* DNA molde de L2A
- b) Amplificación del gen *nifH* similar a *Azotobacter* DNA molde de IISA
- c) Amplificado del gen *nifH* *Azospirillum* DNA molde de Ac5

En la figura 5.6 se muestra el amplificado obtenido del gen *nifD* de aproximadamente 1100pb obtenido en los aislados obtenidos de nódulo (N7) y de un aislado proveniente de la rizosfera de *Rumex* sp. (L4A) identificado como *Alcaligenes faecalis*. En la tabla 5.5 se muestra un resumen de los aislados obtenidos así como la detección de los genes *nifH* y *nifD*.



**Figura 5.6** Amplificado de gen *nifD*

- 1.-MTM, 2.- Amplificado de *Sinorhizobium meliloti* (N7), 3.- *Alcaligenes faecalis* (L4A)

## 5.6.- Evaluación de potencial PGPR de los aislados obtenidos.

### 5.6.1. Reducción del acetileno (ARA) en aislados

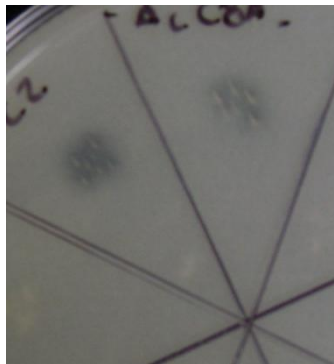
Esta prueba se realizó para la totalidad de los aislados, en el caso de los aislados obtenidos en condiciones aerobias se detectó actividad de nitrogenasa muy baja y en el caso de un aislado obtenido en condiciones anaerobias (IISA) se logró detectar actividad de nitrogenasa (Tabla 5.6)

**Tabla 5.6** Reducción de Acetileno en Aislados.

	nMoles etileno h <sup>-1</sup>
IISA( no identificada)	19.81 ± 0.14
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (L2B)	0.06 ± 0.14
<i>K. varicola</i> 801	177.64 ± 0.85

### 5.6.2.- Solubilización de fosfato tricálcico

En la figura 5.7 se muestra la prueba de solubilización de fosfato tricalcico, mostrando los halos de solubilización alrededor de la colonia.

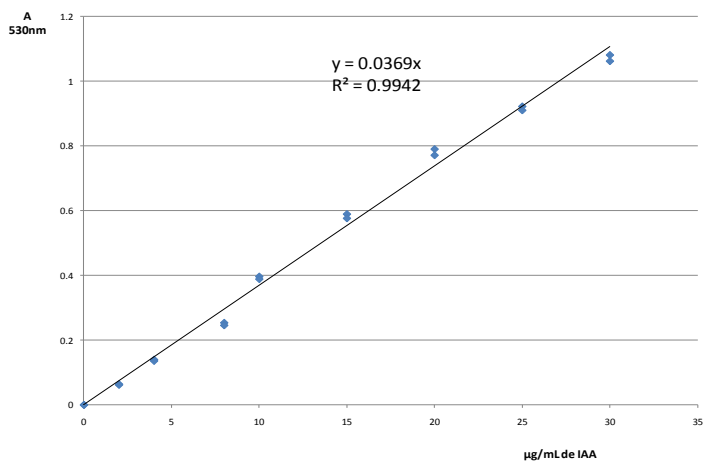


**Figura 5.7** Solubilización de fosfato inorgánico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), se observa el halo de solubilización alrededor de la colonia.

En la Figura 5.7 se muestra un ejemplo representativo de la prueba de solubilización de fosfato, observándose el halo de solubilización, sin embargo cabe mencionar que no todos los aislados produjeron halos completamente translucidos, y que la mayoría de los aislados rizosféricos presentan la capacidad de solubilizar el fosfato tricalcico.

### 5.6.3.- Producción índoles con actividad de fitohormonas (AIA)

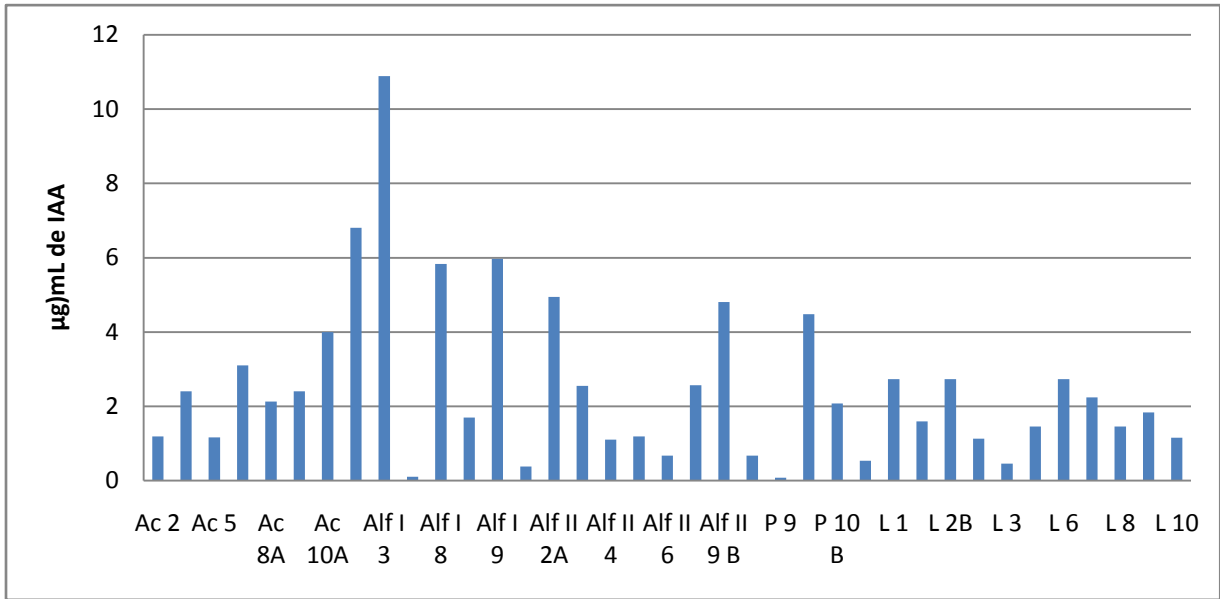
En la figura 5.8 se observa la grafica obtenida de la curva de calibración de AIA.



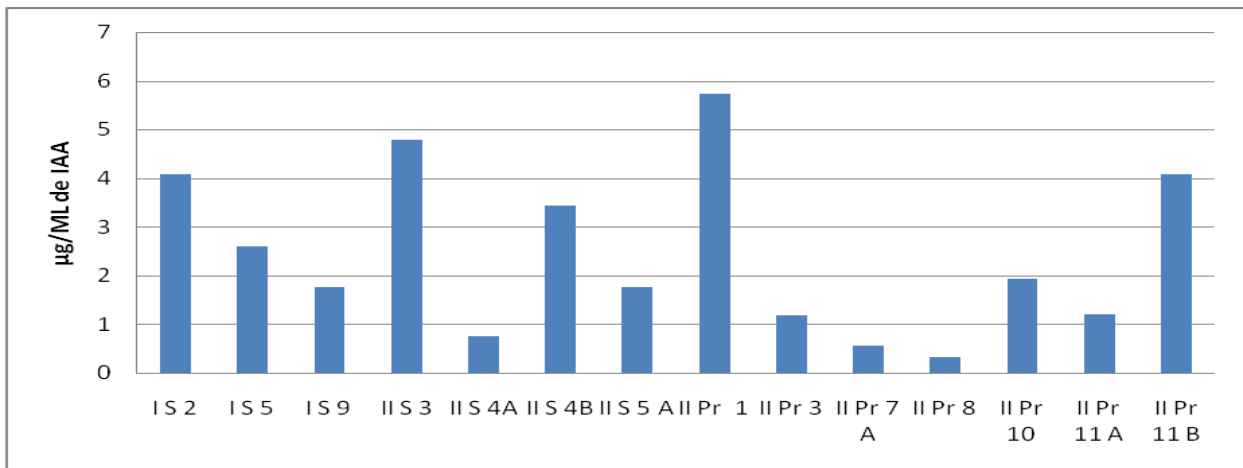
**Figura 5.8** Curva tipo obtenida de IAA realizando análisis espectrofotométrico a 530nm

En la Fig 5.9 y 5.10 se muestran los aislados obtenidos con la capacidad de producir índoles con actividad de fitohormona (IAA).





**Figura 5.9** Aislados rizosféricos productores de fitohormonas



**Figura 5.10** Aislados no rizosféricos productores de fitohormonas

Finalmente en la tabla 5.7 se muestran los aislados obtenidos con capacidad de PGPR, indicando la cantidad de IAA producido así como el índice de solubilización de fosfato.

**Tabla 5.7** Microorganismos aislados con capacidad de PGPR

Tipo de suelo	Aislado	Microorganismo identificado	Producción de AIA ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Índice de solubilización de $\text{PO}_4$
No rizosférico superficial	IS9	<i>Ps. stutzeri</i>	2	1
No rizosférico profundo	IIPr11Z	<i>Ps stutzeri</i>	4	1.5
	AI3	<i>Rhizobium sp.</i>	<b>11.5</b>	<b>1</b>
Rizosférico de Alfalfa	AI9	<i>Rhizobium sp.</i>	<b>6</b>	1
	AIICN3B	<i>Ag. tumefaciens</i>	3	negativo
Rizosférico de Acelga	Ac8A	<i>B. megatherium</i>	2	2
	Ac10A	<i>B. megatherium</i>	4	2.5
Rizosférico de pasto	P10B	<i>ste. maltophilia</i>	4	1.5
Rizosférico de Lengua de Vaca	L2A	<i>Serratia plymuthica</i>	2	1.5

## 5.7. Evaluación del efecto de las bacterias productoras de AIA en el crecimiento de alfalfa y trigo

### 5.7.1. Alfalfa

Con base en la prueba de producción de AIA previamente realizada se diseñaron dos bioensayos, uno para evaluar la producción de AIA y otro para evaluar el aporte de nitrógeno en plantas de interés agrícola.

De acuerdo a los resultados podemos ver de manera general que no existe diferencia significativa entre los tratamientos evaluando el número de hojas; sin embargo, se puede ver que si existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) comparando las demás variables como biomasa y las diferentes longitudes evaluadas. Esto nos indica que el efecto de los aislados sobre el crecimiento vegetal es similar y en algunos casos mejor al compararlo con la cepa de referencia (Tabla 5.8, Figura 5.11).

**Tabla 5.8.** Efecto de los aislados con capacidad de producción de AIA sobre el crecimiento de la alfalfa.

Tratamiento**	Biomasa total	Longitud raíz	Longitud parte	Longitud	Número
	seco (mg)	(cm)	aérea (cm)	total (cm)	de hojas
T1	8.97 <sup>B</sup>	11.07 <sup>A</sup>	9.34 <sup>AB</sup>	20.68 <sup>A</sup>	13.90 <sup>A</sup>
T2	7.75 <sup>B</sup>	8.22 <sup>B</sup>	7.25 <sup>C</sup>	15.46 <sup>B</sup>	13.75 <sup>A</sup>
T3	12.07 <sup>AB</sup>	11.95 <sup>A</sup>	10.82 <sup>A</sup>	22.02 <sup>A</sup>	15.85 <sup>A</sup>
T4	15.92 <sup>A</sup>	9.05 <sup>B</sup>	8.94 <sup>BC</sup>	17.70 <sup>B</sup>	15.30 <sup>A</sup>

\* Medias con letras diferentes señalan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ,  $n=20$ )

\*\*Tratamientos: T1=Tratamiento inoculado con *Azospirillum* sp. T2=Plantas sin inóculo; T3 = plantas inoculadas con el aislado AI3, T4= Plantas inoculadas con el aislado AI9.

### 5.7. 2.- Trigo.

De acuerdo a los resultados de los análisis de ANOVA, en esta se puede ver que no existe diferencia significativa entre los tratamientos y las diferentes biomásas evaluadas, sin embargo si se observa una diferencia en los resultados obtenidos para longitud, se puede ver que para el caso de longitud de raíz el tratamiento más efectivo fue el inoculado con AI9 (Tabla 5.9).

**Tabla 5.9** Efecto de los aislados con capacidad de producción de AIA sobre el crecimiento de trigo.

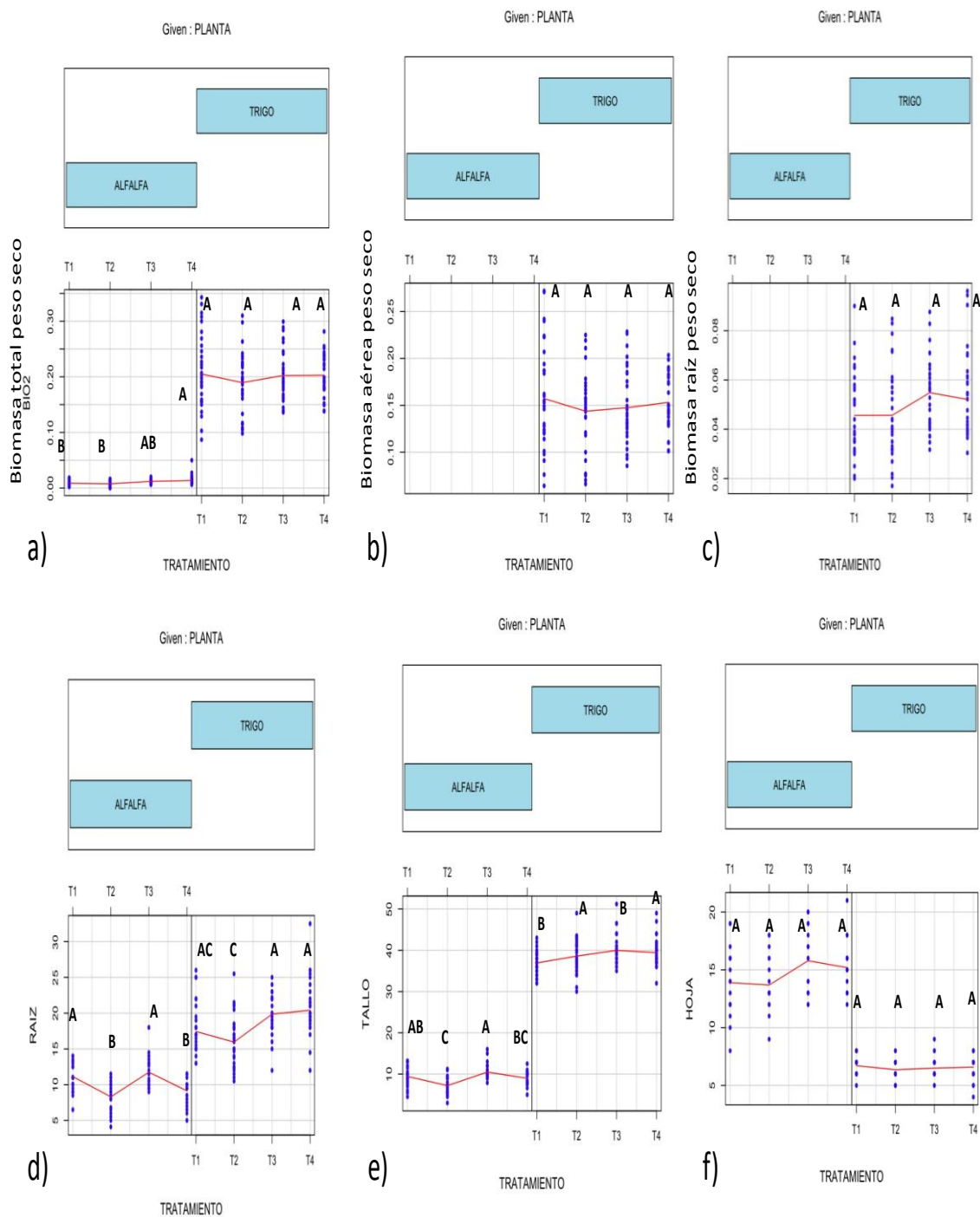
Tratamiento*	Biomasa total seca (g)	biomasa aérea seca (g)	biomasa radical seca (g)	Longitud raíz (cm)	Longitud parte aérea (cm)	Longitud total (cm)	Número de Hojas
T1	0.2103 <sup>A</sup>	0.1623 <sup>A</sup>	0.0466 <sup>A</sup>	18.0 <sup>BC</sup>	36.9 <sup>B</sup>	53.6 <sup>B</sup>	6.7333 <sup>A</sup>
T2	0.1899 <sup>A</sup>	0.1427 <sup>A</sup>	0.0469 <sup>A</sup>	16.2 <sup>C</sup>	38.6 <sup>B<sup>A</sup></sup>	54.7 <sup>B</sup>	6.3667 <sup>A</sup>
T3	0.2063 <sup>A</sup>	0.1502 <sup>A</sup>	0.0560 <sup>A</sup>	19.6 <sup>B<sup>A</sup></sup>	40.5 <sup>A</sup>	59.5 <sup>A</sup>	6.5926 <sup>A</sup>
T4	0.2024 <sup>A</sup>	0.1520 <sup>A</sup>	0.0548 <sup>A</sup>	20.8 <sup>A</sup>	39.7 <sup>A</sup>	58.5 <sup>A</sup>	6.4828 <sup>A</sup>

\*. Medias con letras diferentes señalan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ,  $n=20$ ).

\*\* Tratamientos: T1=Tratamiento inoculado con *Azospirillum* sp. T2=Plantas sin inóculo; T3 = plantas inoculadas con el aislado AI3, T4= Plantas inoculadas con el aislado AI9.

En la figura 5.11 se puede observar la dispersión de los datos obtenidos en los diferentes tratamientos para cada variable analizada. De manera general se puede observar las variables significativa permitiendo distinguir entre cada tratamiento. Se puede ver que para ambas plantas el número de hojas no varía en ninguno de los tratamientos, siendo esta una variable poco informativa. Sin embargo, en alfalfa se observa diferencia significativa en biomasa total seca usando el tratamiento T4 (inóculo AI9) obteniendo un efecto mayor incluso que el control positivo; sin embargo, en el caso de trigo la variable de biomasa no fue informativa.

Por otro lado, en la gráfica correspondiente a longitud tanto de raíz como de tallo en ambas plantas se puede ver que el inóculo AI3 (nombre) presenta mayor efecto que el resto de los tratamientos.



**Figura 5.11** Gráfica de co-plot. a) Biomasa total en peso seco b) Biomasa aérea pesos seco c) Biomasa raíz peso seco d) longitud de raíz e) longitud de tallo f) Número de hojas .La línea roja indica la media, los puntos azules indican la dispersión de los datos, con letras mayúsculas se señala la diferencia significativa entre los tratamientos.

\*\* T1=Tratamiento inoculado con *Azospirillum* sp.T2=Plantas sin inóculo; T3 = plantas inoculadas con el aislado AI3, T4= Plantas inoculadas con el aislado AI9.

En la figura 5.11 se puede observar la dispersión de los datos obtenidos en los diferentes tratamientos para cada variable analizada. De manera general se puede observar las variables con diferencia significativa permitiendo distinguir entre cada tratamiento. Se puede ver que para ambas plantas el número de hojas no varía en ninguno de los tratamientos, siendo esta una variable poco informativa para este bioensayo. Sin embargo, en alfalfa se observa diferencia significativa en biomasa total seca usando el tratamiento T4 (inóculo AI9) obteniendo un efecto mayor incluso que el control positivo; sin embargo en el caso de trigo la variable de biomasa no fue informativa.

Por otro lado en la gráfica correspondiente a longitud tanto de raíz como de tallo en ambas plantas se puede ver que el inóculo AI3 (nombre) presenta mayor efecto que el resto de los tratamientos.

En la Tabla 5.14 se muestran los componentes principales delACP; y en la figura 5.12 se muestra la grafica del ACPobtenida al analizar las variables del bioensayo de fitohormona sobre el crecimiento de alfalfa.

**Tabla 5.10.-** Componentes principales para el bioensayo de fitohormonas en alfalfa.

Parámetros	Componentes Principales	
	PC1	PC2
Valores propios	1.8	1
Proporciones	0.45	0.25
Carga de los dos componentes principales retenidos <sup>a</sup>		
Biomasa seca (BIO2)	64* <sup>b</sup>	-57*
Biomasa raíz seca (BIO8)	55*	70*
Longitud total (BIO9)	73*	30
Número de hojas (BIO10)	73*	-32*

<sup>a</sup> Se retuvieron componentes principales con Eigenvalues > 1 y que explican > 10% de la varianza total.

<sup>b</sup> Parámetros con carga significativa > 0.40.

En la tabla 5.15 se muestran los datos del análisis de PCA para el efecto de inóculo productor de AIA sobre el desarrollo de trigo.

**Tabla 5.11** Componentes principales para el bioensayo de fitohormonas en trigo.

Parámetros	Componentes Principales	
	PC1	PC2
Eigenvalues	2.2	1
Proporciones	0.43	0.2
Rotated loading on three retained components <sup>a</sup>		
Biomasa tallo seca. (BIO4)	-81* <sup>b</sup>	34
Biomasa raíz seca (BIO6).	-70*	-18
longitud raíz (BIO8)	-44*	-65*
Longitud de Tallo (BIO9).	-64*	33
Número de hojas.(BIO10)	-63*	56*

<sup>a</sup> Se retuvieron Componentes principales con Eigenvalues > 1 y que explican > 10% de la varianza total.

<sup>b</sup> Parámetros con carga significativa > 0.40.

Figura 5.12. Grafica de PCA para el tratamiento de efecto de inóculo productor de fitohormona sobre el crecimiento de alfalfa. a) Muestran las variables que se utilizaron para hacer el análisis de PCA; b) Esquematiza las mismas variables con todas las repeticiones de todos los tratamientos c) las elipses representan la influencia del tratamiento sobre las variables, una elipse mas separa indica un impacto mas significativo.

En la figura 5.12 se muestra en la parte inferior semuestra las variables independientes que se utilizaron para realizar el ACP, en el caso de alfalfa encuentran relacionadas entre sí la longitud de raíz y longitud de tallo y por otro lado se relacionan el número de hojas y la biomasa total seca. En el caso particular de alfalfa todos los tratamientos se encuentran claramente distribuidos en los ejes, se puede ver que el tratamiento T1 (*Azospirillum* sp.) tiene efecto sobre raíz y tallo, el tratamiento T2 que es control sin inóculo observa que no tiene efecto sobre las variables analizadas, el tratamiento T4 tiene mayor efecto sobre el número de hojas y sobre biomasa total; T3 es el tratamiento con mayor efecto sobre la longitud de tallo y raíz.

se



Variables

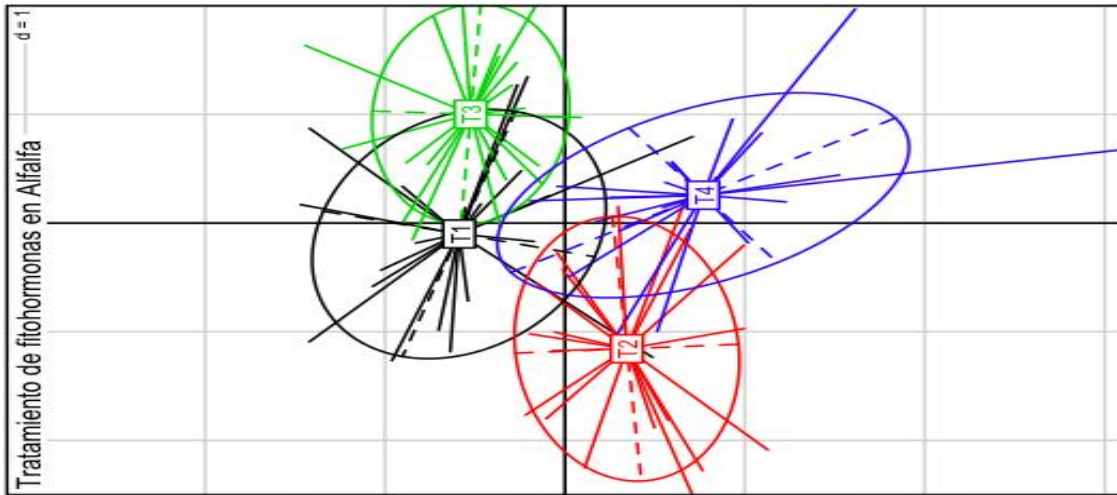
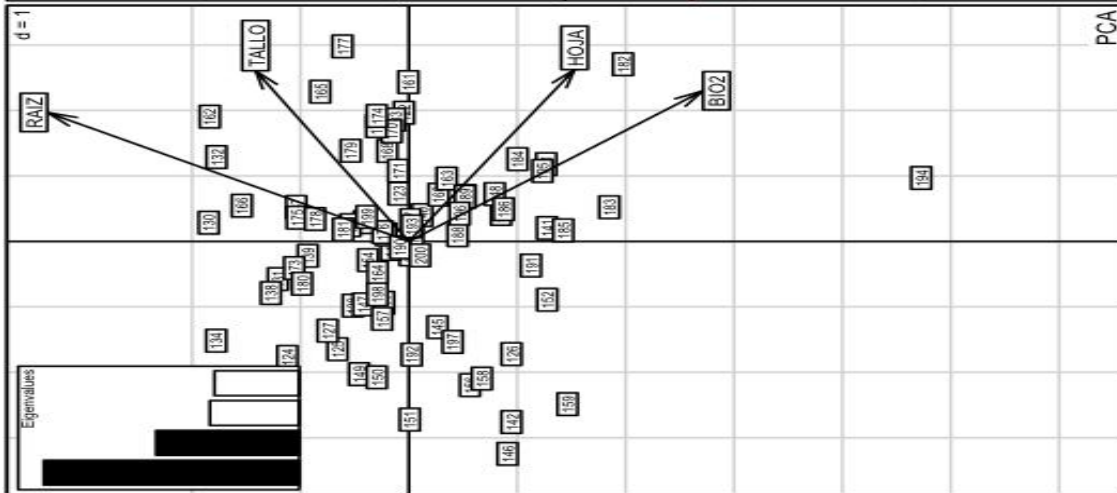
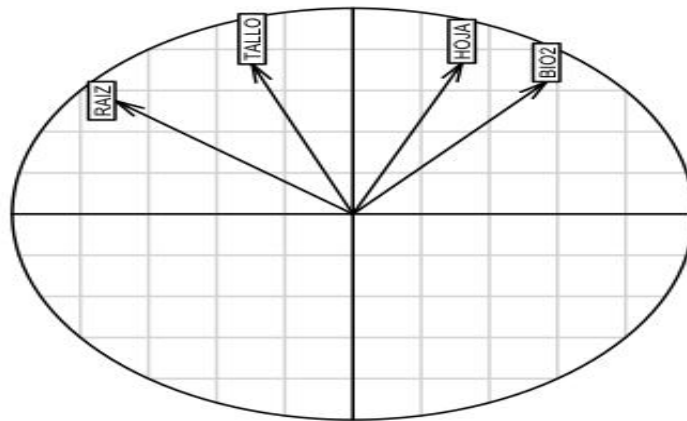


Figura 5.12. Grafica de PCA para el tratamiento de efecto de inoculo productor de fitohormona sobre el crecimiento de alfalfa. a) Muestran las variables que se utilizaron para hacer el análisis de PCA; b) Esquematiza las mismas variables con todas las repeticiones de todos los tratamientos c) las elipses representan la influencia del tratamiento sobre las variables, una elipse mas separa indica un impacto mas significativo.

En la figura 5.12 se muestra en la parte inferior semuestra las variables independientes que se utilizaron para realizar el ACP, en el caso de alfalfa encuentran relacionadas entre sí la longitud de raíz y longitud de tallo y por otro lado se relacionan el número de hojas y la biomasa total seca. En el caso particular de alfalfa todos los tratamientos se encuentran claramente distribuidos en los ejes, se puede ver que el tratamiento T1 (*Azospirillum* sp.) tiene efecto sobre raíz y tallo, el tratamiento T2 que es control sin inoculo se observa que no tiene efecto sobre las variables analizadas, el tratamiento T4 tiene mayor efecto sobre el número de hojas y sobre biomasa total; T3 es el tratamiento con mayor efecto sobre la longitud de tallo y raíz.

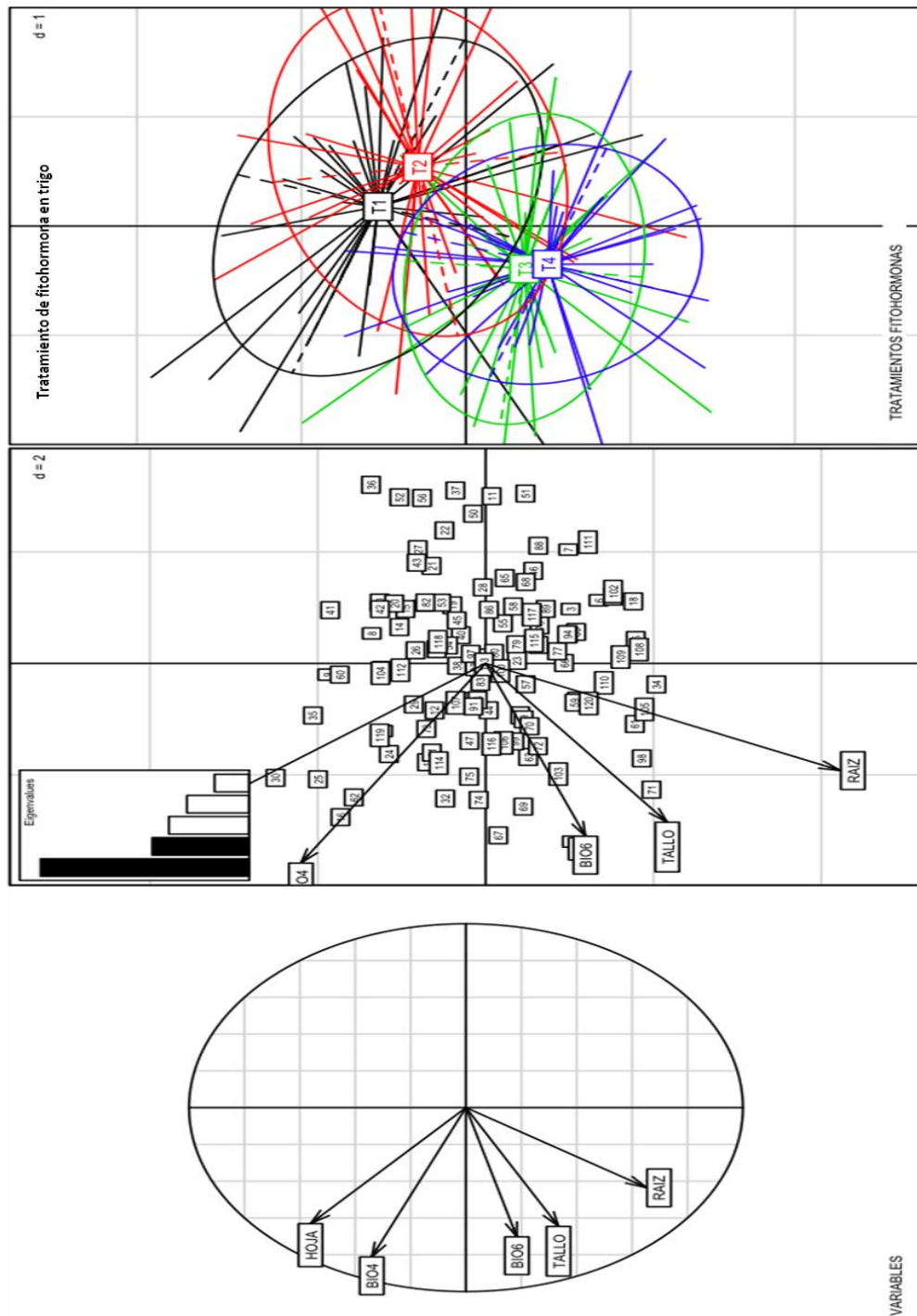


Figura 5.13. Grafica de PCA para el tratamiento de efecto de inóculo productor de fitohormona sobre el crecimiento de trigo .a) Muestran las variables que se utilizaron para hacer el análisis de PCA; b) Esquematiza las mismas variables con todas las repeticiones de todos los tratamientos c) las elipses representan la influencia del tratamiento sobre las variables, una elipse mas separa indica un impacto mas significativo.

En el caso de trigo las variables altamente relacionadas son número de hoja con biomasa aérea y raíz, tallo con biomasa de raíz, en este caso los tratamientos T1 Y T2 no tienen un mayor efecto, los tratamientos T3 y T4 presentan mayor efecto sobre biomasa de raíz, la longitud de tallo y raíz.

## 5.8. Evaluación del efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el crecimiento de plantas de trigo y alfalfa

### 5.8.1. Alfalfa

En la tabla 5.12 se muestra el resumen de los resultados de ANOVA y los grupos formados por la prueba de Tukey, mostrando la diferencia significativa entre cada uno de los tratamientos para evaluar el aporte de nitrógeno de las bacterias aisladas de suelo de chinampa.

**Tabla 5.12** .Resumen de los resultados de ANOVA y prueba de Tukey para evaluar el aporte de nitrógeno en plantas de alfalfa

Tratamiento	Biomasa Total peso seco (g)	longitud raíz (cm)	Longitud tallo (cm)	Longitud total (cm)	Número de Hojas
T1	0.03071 <sup>A</sup>	13.6 <sup>A</sup>	13.505 <sup>A</sup>	26.965 <sup>A</sup>	14.85 <sup>BC</sup>
T2	0.01981 <sup>BCDE</sup>	10.55 <sup>BA</sup>	11.15 <sup>BDAC</sup>	21.45 <sup>BDC</sup>	14.95 <sup>BC</sup>
T3	0.01842 <sup>DEC</sup>	12 <sup>BA</sup>	12.35 <sup>BAC</sup>	23.35 <sup>BAC</sup>	16.65 <sup>ABC</sup>
T4	0.01356 <sup>E</sup>	9.8 <sup>B</sup>	8.65 <sup>D</sup>	18.45 <sup>D</sup>	13.75 <sup>C</sup>
T5	0.02941 <sup>BA</sup>	13.15 <sup>BA</sup>	12.95 <sup>BA</sup>	25.6 <sup>BA</sup>	19.3 <sup>A</sup>
T6	0.01448 <sup>DE</sup>	11.575 <sup>BA</sup>	9.95 <sup>DC</sup>	19.925 <sup>DC</sup>	15.75 <sup>BC</sup>
T7	0.01878 <sup>BDEC</sup>	11.2 <sup>BA</sup>	10.85 <sup>BDC</sup>	21.45 <sup>BDC</sup>	15.55 <sup>BC</sup>
T8	0.02689 <sup>BAC</sup>	11.4 <sup>BA</sup>	13.1 <sup>BA</sup>	24.6 <sup>BA</sup>	16.1 <sup>ABC</sup>
T9	0.02469 <sup>BDAC</sup>	10.85 <sup>BA</sup>	11.7 <sup>BAC</sup>	22.25 <sup>BDC</sup>	15.65 <sup>BC</sup>
T10	0.02601 <sup>BAC</sup>	11.1 <sup>BA</sup>	13.45 <sup>A</sup>	24.55 <sup>BA</sup>	17.1 <sup>AB</sup>

\* Medias con letras diferentes señalan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ,  $n=20$ )

\*\* Tratamientos: T1: Planta regada con solución completa; T2 Plantas regadas con solución nutritiva sin nitrógeno; T3 inoculada con IISA regada con solución completa; T4 Plantas inoculadas con IISA regadas con solución nutritiva sin nitrógeno; T5 Plantas inoculadas con AcA2 regada con solución completa; T6 inoculadas con AcA2 regadas con solución sin nitrógeno; T7 Plantas inoculadas con L2B regada con solución completa; T8 Plantas inoculadas con L2B regada con solución in nitrógeno; T9 Plantas inoculadas con AcJ regada con solución completa; T10 Plantas inoculadas con AcJ regada con solución completa

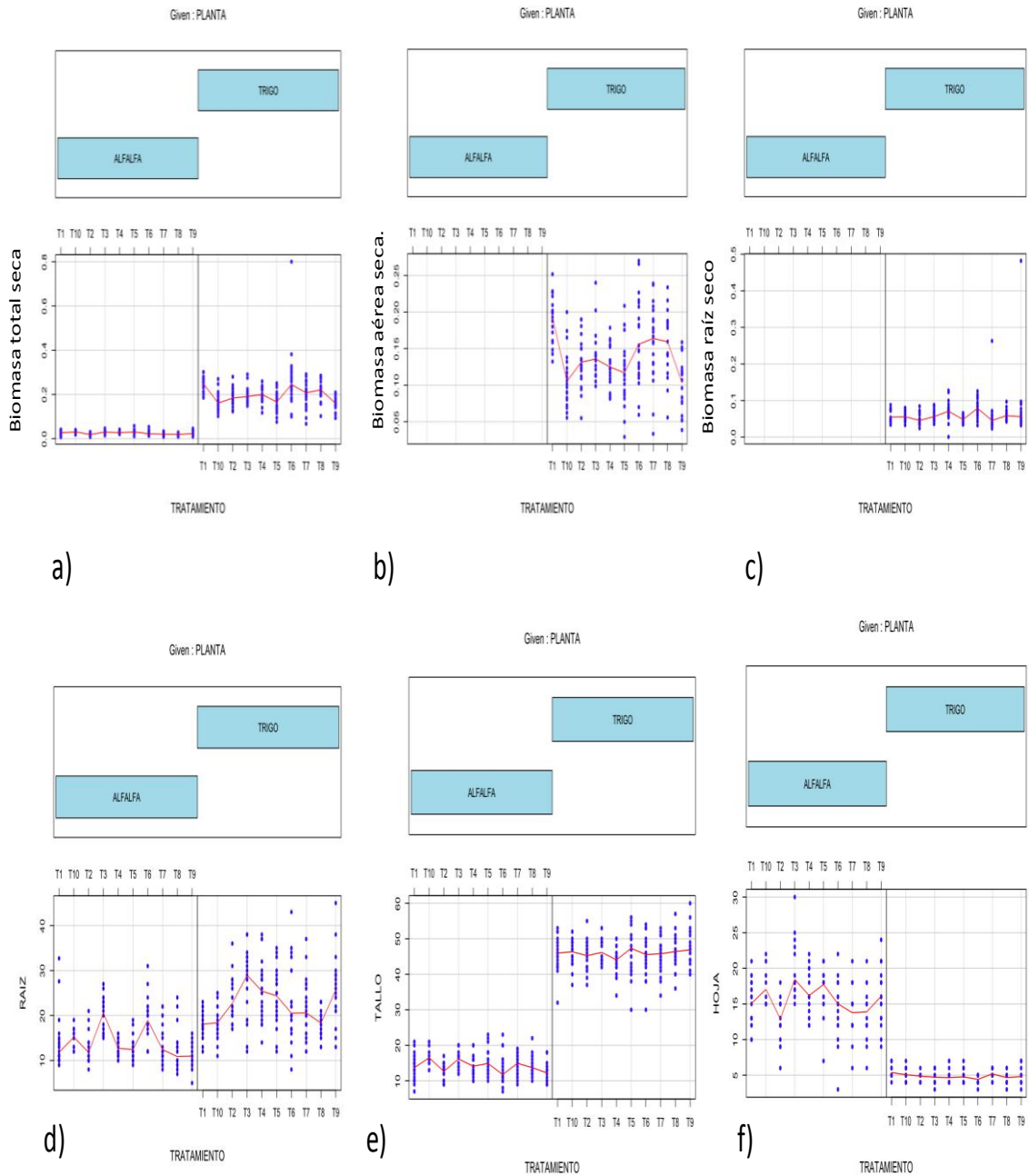
**Tabla 5.13** Resumen de los resultados de ANOVA y prueba de Tukey para evaluar el aporte de nitrógeno en plantas de trigo

Tratamiento	Biomasa total peso seco (g)	Biomasa aérea peso seco (g)	Biomasa raíz peso seco (g)	Longitud raíz (cm)	Longitud tallo (cm)	Longitud total (cm)	Número de hojas
T1	0.24717 <sup>A</sup>	0.19207 <sup>A</sup>	0.05612 <sup>BA</sup>	18.025 <sup>A</sup>	45.525 <sup>BA</sup>	63.95 <sup>A</sup>	5.45 <sup>A</sup>
T2	0.17061 <sup>CD</sup>	0.12213 <sup>BC</sup>	0.046665 <sup>AB</sup>	17.25 <sup>A</sup>	44.85 <sup>BA</sup>	61.25 <sup>A</sup>	5.1 <sup>A</sup>
T3	0.15986 <sup>CD</sup>	0.12313 <sup>BC</sup>	0.04052 <sup>B</sup>	17.2 <sup>A</sup>	43.55 <sup>B</sup>	61.35 <sup>A</sup>	5.25 <sup>A</sup>
T4	0.1812 <sup>CBD</sup>	0.17611 <sup>BA</sup>	0.0429	18.5 <sup>A</sup>	44.125 <sup>BA</sup>	62.9 <sup>A</sup>	5.5 <sup>A</sup>
T5	0.19819 <sup>CB</sup>	0.15384 <sup>BAC</sup>	0.041785	15.55 <sup>A</sup>	47.95 <sup>BA</sup>	62.9 <sup>A</sup>	5.7 <sup>A</sup>
T6	0.20104 <sup>CB</sup>	0.16057 <sup>BAC</sup>	0.045515 <sup>BA</sup>	16.65 <sup>A</sup>	44.95 <sup>BA</sup>	61.325 <sup>A</sup>	5.45
T7	0.20104 <sup>CB</sup>	0.16057 <sup>BAC</sup>	0.045515 <sup>BA</sup>	16.65 <sup>A</sup>	44.95 <sup>BA</sup>	61.325 <sup>A</sup>	5.45 <sup>A</sup>
T8	0.21852 <sup>BA</sup>	0.15921 <sup>BAC</sup>	0.058558 <sup>A</sup>	15.6 <sup>A</sup>	48.15 <sup>A</sup>	63.85 <sup>A</sup>	5.4 <sup>A</sup>
T9	0.15228 <sup>D</sup>	0.11209 <sup>C</sup>	0.04139 <sup>BA</sup>	17.75 <sup>A</sup>	46.2 <sup>BA</sup>	63.6 <sup>A</sup>	5.4 <sup>A</sup>
T10	0.17005 <sup>CD</sup>	0.11501 <sup>C</sup>	0.05562 <sup>BA</sup>	16.15 <sup>A</sup>	44.75 <sup>BA</sup>	61.5 <sup>A</sup>	5.15 <sup>A</sup>

\* Medias con letras diferentes señalan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ,  $n=20$ )

\*\* Tratamientos: T1: Planta regada con solución completa; T2 Plantas regadas con solución nutritiva sin nitrógeno; T3 inoculada con IISA regada con solución completa; T4 Plantas inoculadas con IISA regadas con solución nutritiva sin nitrógeno; T5 Plantas inoculadas con AcA2 regada con solución completa; T6 inoculadas con AcA2 regadas con solución sin nitrógeno; T7 Plantas inoculadas con L2B regada con solución completa; T8 Plantas inoculadas con L2B regada con solución in nitrógeno; T9 Plantas inoculadas con AcJ regada con solución completa; T10 Plantas inoculadas con AcJ regada con solución completa

En la Figura 5.14 se muestra la gráfica de co-plot obtenida para evaluar el efecto de inocular bacterias fijadoras de nitrógeno en el crecimiento de alfalfa y trigo.



**Figura 5.14.** Gráfica de co-plot del bioensayo de efecto de inocular bacterias fijadoras de nitrógeno en el desarrollo de alfalfa y trigo. En esta gráfica se puede observar el efecto de los distintos tratamientos en cada variable de las dos plantas. a) Biomasa total en peso seco b) Biomasa aérea pesos seco c) Biomasa raíz peso seco d) longitud de raíz e) longitud de tallo f) Número de hojas. La línea roja indica la media, los puntos azules indican la dispersión de los datos.

T1: Planta regadas con solución completa; T2Plantas regadas con solución nutritiva sin nitrógeno; T3 inoculada con IISA regada con solución completa; T4 Plantas inoculadas con IISA regadas con solución nutritiva sin nitrógeno; T5 Plantas inoculadas con AcA2 regada con solución completa; T6 inoculadas con AcA2 regadas con solución sin nitrógeno; T7 Plantas inoculadas con L2B regada con solución completa; T8Plantas inoculadas con L2Bregada con solución in nitrógeno;T9 Plantas inoculadas con AcJ regada con solución completa;T10 Plantas inoculadas con AcJ regada con solución completa

En la figura 5.13 se puede observar la dispersión de los datos obtenidos en los diferentes tratamientos para cada variable analizada en el bioensayo para evaluar el aporte de diferentes organismos diazotrofos a las plantas de trigo y alfalfa. En el caso de alfalfa y tomando en cuenta estas variables se puede ver que en los tratamientos problemas no hay diferencia significativa con el control negativo al evaluar la biomasa total seca. Analizando las variaciones de longitud de raíz fig (5.13d) se observa que el tratamiento T4 (IISA sin nitrógeno, nombre ) tiene un crecimiento mayor que el resto de los tratamientos, por otro lado T5 (AcA2 con nitrógeno) presenta un efecto significativo en el número de hojas.

En el caso del trigo las variables de longitud de tallo y biomasa seca no permiten diferenciar a ninguno de los tratamientos, en el caso de longitud de raíz el mejor tratamiento resulto ser T3 (IISA completa) y T9 (AcJ completa)

En tabla 5.18 se muestran los datos del análisis de ACP para el efecto de inóculo fijador de nitrógeno sobre el desarrollo de alfalfa

**Tabla 5.14.** Componentes principales para el bioensayo de nitrógeno en alfalfa.

Parámetros	Componentes Principales	
	PC1	PC2
Eigenvalues	2.1	0.8
Proporción	0.51	0.21
Carga sobre los componentes retenidos <sup>a</sup>		
Biomasa total seca (Bio 04)	-85* <sup>b</sup>	-13
Longitud Tallo (Bio 08)	-55*	83
longitud Total (Bio 09)	-74*	-27
Numero de hojas (Bio 10)	-68*	-21*

<sup>a</sup> Se retuvieron componentes principales con Eigenvalues > 1 y que explican > 10% de la varianza total.

<sup>b</sup> Parámetros con carga significativa > 0.40.



En tabla 5.19 se muestran los datos del análisis de PCA para el efecto de inóculo fijador de nitrógeno sobre el desarrollo de trigo.

**Tabla 5.15** Componentes principales para el bioensayo de nitrógeno en trigo.

Parámetros	Componentes Principales	
	PC1	PC2
Eigenvalues	1.6	1.2
Proporciones	0.31	0.25
Rotated loading on three retained components <sup>a</sup>		
BIO4	-88 <sup>*b</sup>	11
BIO6	-24	-72 <sup>*</sup>
BIO8	14	-50 <sup>*</sup>
BIO9	-73 <sup>*</sup>	34
BIO10	-41 <sup>*</sup>	-58 <sup>*</sup>

<sup>a</sup> Se retuvieron componentes principales con Eigenvalues > 1 y que explican > 10% de la varianza total.

<sup>b</sup> Parámetros con carga significativa > 0.40.

En la figura 5.15 y 5.16 se muestra la grafica de PCA del bioensayo de efecto del inóculo de bacterias fijadoras de nitrógeno en el desarrollo de alfalfa y trigo respectivamente.

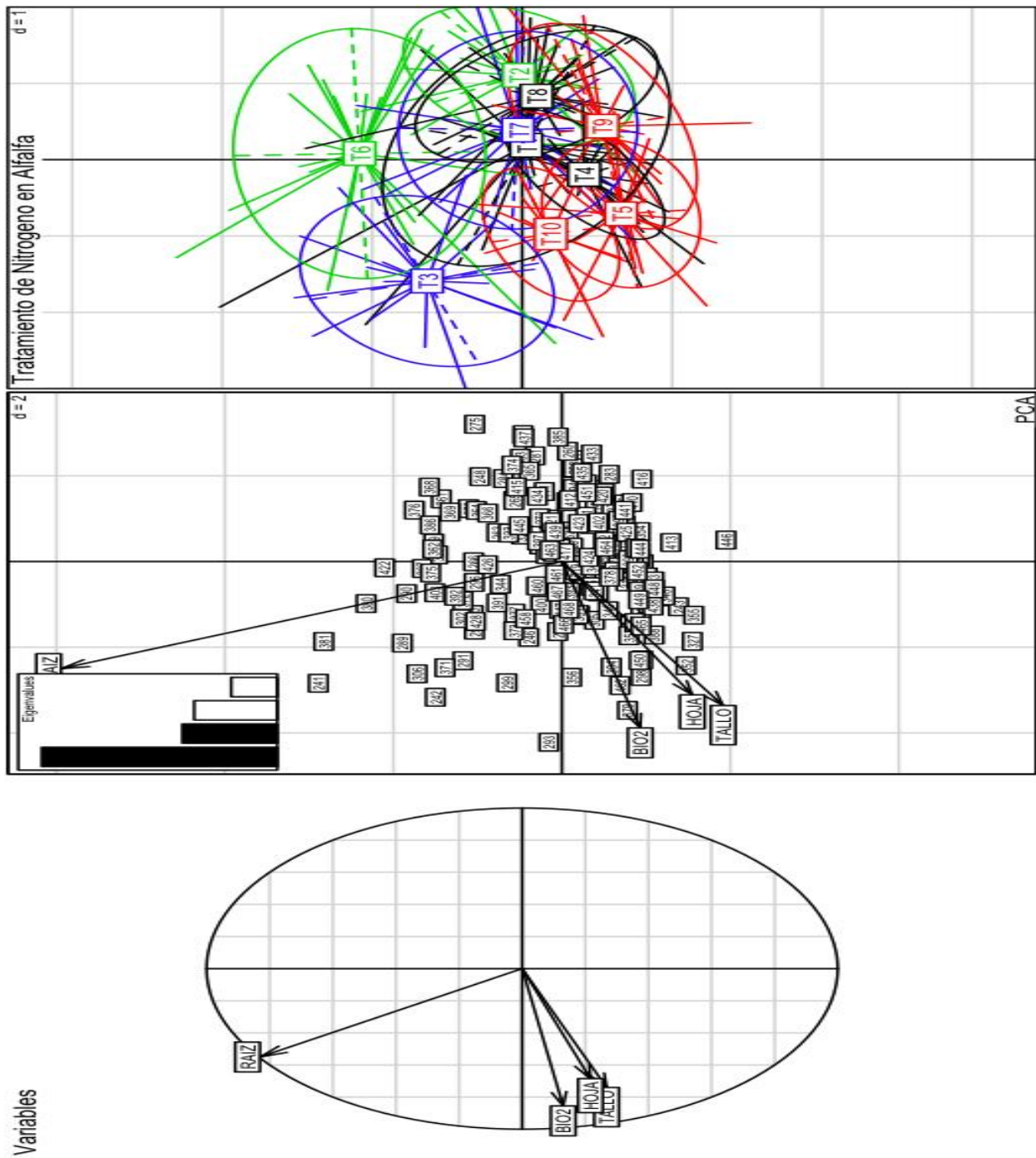


Figura 5.15. Grafica de PCA para el tratamiento de efecto inocular bacterias fijadoras de nitrógeno en el crecimiento de alfalfa. a) Muestran las variables que se utilizaron para hacer el análisis de PCA; b) Esquematiza las mismas variables con todas las repeticiones de todos los tratamientos c) las elipses representan la influencia del tratamiento sobre las variables, una elipse mas separa indica un impacto mas significativo.

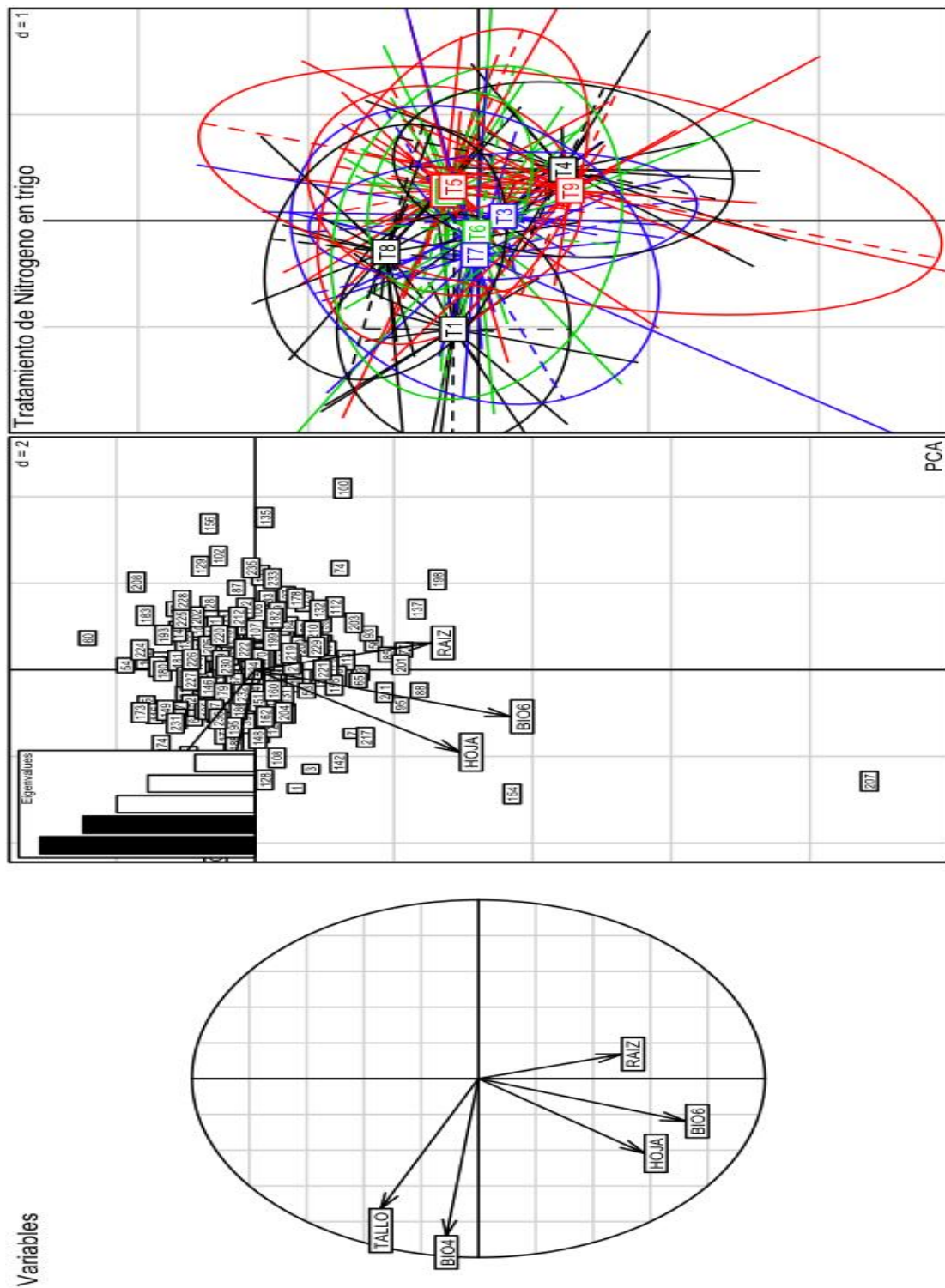


Figura 5.13. Grafica de PCA para el tratamiento de efecto de inocular bacterias fijadoras de nitrógeno en el crecimiento de de trigo .a) Muestran las variables que se utilizaron para hacer el análisis de PCA; b) Esquematiza las mismas variables con todas las repeticiones de todos los tratamientos c) las elipses representan la influencia del tratamiento sobre las variables, una elipse mas separa indica un impacto mas significativo.

En la figura 5.14 se muestran los PCA del bioensayo para evaluar el aporte de nitrógeno. En el caso de alfalfa se observa en la grafica de la izquierda las variables mas relacionadas, en este caso número de hojas y longitud de tallo se relacionan con biomasa seca total mientras que longitud de raíz se separa en otro cuadrante, en la gráfica de la derecha se puede ver que el T3 tiene mayor efecto en la elongación de raíz, T10 y T5 presentan mayor efecto en la generación de hojas y elongación de tallo.

En el caso del trigo las variables relacionadas entre si son tallo con biomasa seca de tallo, numero de hoja con biomasa de raíz y por otro lado longitud de raíz. Se puede ver que los tratamientos T4 y T9 presentan mayor efecto en la elongación de la raíz, T1 y T8 presentan mayor efecto con la elongación de raíz y obtención de biomasa de raíz

## 6.- DISCUSIÓN.

La norma NOM-021-SEMARNAT-2000 define como suelo fértil aquel que presenta las características físicas y químicas en las proporciones óptimas para favorecer la producción de un cultivo propio de la región. Con base en los resultados presentados en la Tabla 5.1 se muestran las características fisicoquímicas de los suelos de chinampa analizados, con respecto a esto y en base a la norma se puede decir que estos son suelos fértiles, ya que de acuerdo a sus características en ellos se pueden mantener cultivos de temporal sin necesidad de adicionar fertilizante químico.

El pH de los suelos recolectados es alcalino comparado con otros suelos de cultivo que normalmente presentan pH ácido de 6.3 a 8. Este valor elevado pH puede deberse a la elevada cantidad de sales que este suelo es capaz de retener debido a su textura (Hsu y Buckley, 2009) y la alta cantidad de materia orgánica (Tabla 5.1). A pesar de que sea ligeramente elevado respecto a lo recomendado en este intervalo de pH aun es posible el desarrollo óptimo de diversos cultivos de interés comercial (Gliessman, 2002). Los parámetros de humedad y capacidad de retención de agua nos indican la cantidad de agua disponible tanto para el cultivo así como para la comunidad microbiana. Los valores de capacidad de retención de agua son superiores al 100% debido a la textura arcillosa y el elevado contenido de materia orgánica ya que estas permiten retener alta cantidad de agua (Porta, 2005), lo cual es conveniente para la productividad agrícola debido al sistema de riego ascendente. En cuanto a los valores presentados de nitrógeno, fósforo y potasio se encuentran elevados a excepción de la muestra de la chinampa II de suelo superficial que presenta un contenido bajo de fosforo de  $3.7 \text{ mg Kg}^{-1}$  lo cual puede deberse a que en el momento del muestreo esta chinampa contenía tres tipos de cultivos y por lo tanto este elemento podría estar siendo utilizado por las plantas en el momento de la colecta.

Las características fisicoquímicas del suelo están íntimamente relacionadas con la diversidad y actividad de la comunidad diazotrofa del suelo. En este caso la cantidad de nitrógeno y materia orgánica nos revelan que probablemente el principal aporte de nitrógeno no sea la fijación biológica en este suelo, ya que este es un proceso que requiere un gasto energético elevado por lo que se encuentra altamente regulado por la disponibilidad de nitrógeno en el ambiente y solo se lleva a cabo en condiciones limitadas de este elemento (Schlegel, 1991). Como se puede ver en la tabla 5.1 la cantidad de nitrógeno y materia orgánica se encuentran elevadas por lo que podemos inferir que el complejo enzimático nitrogenasa se encuentra inhibido dadas las condiciones. También es importante mencionar que debido a la elevada concentración de materia orgánica estos suelos pueden estar reteniendo sales y por lo tanto los valores de potasio se

encuentren elevados. En el caso particular del potasio se ha reportado que presenta un efecto antagónico para la fijación biológica de nitrógeno (Hsu y Buckley, 2009). Así mismo el pH juega un papel importante en la disponibilidad de nutrientes y actividades enzimáticas y es importante recordar que a pH alcalinos la nitrogenasa presenta menor actividad (Nelson y Mele, 2006; Kuhner *et al.*, 2000; Baldani *et al.*, 1986), razones por las cuales asumimos que la comunidad diazotrofa en las muestras de suelo presente actividades enzimáticas bajas y por tanto su aporte de nitrógeno no sea tan importante.

Es sabido que la técnica de labranza y la adición de fertilizantes afectan la diversidad y actividad de la comunidad diazotrofa en los suelos, por lo que evaluamos el efecto de la técnica de labranza en la actividad de la comunidad diazotrofa en estos suelos, para lo cual se determinó actividad de nitrogenasa en suelo total. De manera general se observó en la tabla 5.2 que la actividad de nitrogenasa fue seriamente afectada, ya que el valor más alto de etileno ( $39.54 \text{ nmoles de etileno h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) se generó en suelo profundo no rizosférico, mientras que en los trabajos de Hsu y Buckley (2009) se reportó actividad de nitrogenasa de aproximadamente  $300 \text{ nmoles de etileno h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  en suelos agrícolas con técnicas de labranza convencionales.

Posteriormente se realizó la cuantificación de bacterias fijadoras de nitrógeno mediante la técnica de NMP, encontrando que la abundancia de los diazotrofos se encuentra principalmente en rizosfera puesto que al comparar con los suelos no rizosféricos se observa una diferencia de aproximadamente un orden, esta diferencia de la distribución puede atribuirse principalmente a que los microorganismos encuentran en rizosfera un ambiente más propicio para su desarrollo (Ferrera y Pérez 1995); existen diferencias entre el NMP de las diferentes plantas debido a las características de los exudados radicales los cuales son los responsables de la asociación con las bacterias fijadoras de nitrógeno y la planta (Knowless 1977 Kuhner *et al.* 2000), estos resultados coinciden con los reportes previos de Berkum (1980) que reporta valores de  $8.3 \times 10^5$  y  $1.6 \times 10^4$  por gramo de suelo en la rizosfera de *Sorghum vulgare* y *Branchia mutica*. En el caso de los suelos no rizosféricos se encontró mayor cantidad de diazotrofos en los suelos profundos ya que a ese nivel de suelo se puede presentar menor tensión de oxígeno y por lo tanto el complejo nitrogenasa puede encontrarse más estable (Brill 1980) por lo que esta comunidad puede desarrollarse mejor en este nivel lo cual coincide también con los reportes de Izquierdo y Nusslein (2006), que dice que esta comunidad se distribuye a través del suelo de acuerdo con los requerimientos nutricionales y ambientales (oxígeno humedad etc.).

Los resultados de reducción de acetileno y NMP concuerdan ya que en los suelos donde se determinó una mayor abundancia de diazotrofos también fue el suelo que presentó mayor actividad de nitrogenasa tal es

el caso de el suelo rizosférico de Acelga, lengua de vaca y suelo no rizosféricos profundos; relacionando ambos resultados nos muestra que la abundancia de microorganismos diazotrofos en el suelo no es diferente a la reportada en otros suelos agrícolas, lo cual nos indica que la abundancia de microorganismos diazotrofos no se encuentra alterada, sin embargo no sabemos si la diversidad se vea afectada debido a las características del suelo y el tipo de labranza.

Los resultados de reducción de acetileno y NMP de bacterias fijadoras concuerdan ya que en los suelos donde se determinó una mayor abundancia de diazotrofos también fue el suelo que presentó mayor actividad de nitrogenasa, tal es el caso de el suelo rizosférico de Acelga, lengua de vaca y suelo no rizosféricos profundos. Relacionando ambos resultados nos muestra que la abundancia de microorganismos diazotrofos en el suelo no es diferente a la reportada en otros suelos agrícolas, lo cual nos indica que la abundancia de microorganismos diazotrofos no se encuentra alterada, sin embargo no sabemos si la diversidad se vea afectada debido a las características del suelo y el tipo de labranza.

Se realizó el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas a partir de nódulos de alfalfa, fue interesante encontrar nódulos fijadores de nitrógeno debido a que en general, la alta concentración de nitrógeno total inhibe la formación de nódulos entre los rizobios y las leguminosas. Razón por la cual el resto de las plantas de alfalfa no presentó nódulos lo cual pudo deberse a que algunas cepas de *Sinorhizobium meliloti* tienen la capacidad de nodular con la leguminosa incluso en presencia de altas cantidades de nitrógeno.

Ambos los datos sobre las bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre y en simbiosis, podemos concluir que existe la posibilidad de estimular el crecimiento de planta por inoculación de eficientes bacterias fijadoras de nitrógeno en las chinampas.

En el aislamiento de las bacterias en medio de cultivo mineral sin nitrógeno, la mayoría de los aislados rizosféricos presentan colonias grandes y mucoides, mientras que en suelo no rizosférico el principal morfotipo corresponde a actinomicetos. La abundancia de cierto grupo microbiano es debida a las características del microambiente que proporciona cada nivel o tipo de suelo (Brill, 1980). La predominancia de actinomicetos se puede relacionar con las características fisicoquímicas del suelo ya que cuenta con alto contenido de materia orgánica, sales y pH alcalino, condiciones que permiten el óptimo desarrollo de los actinomicetos (Ferrera, 1995).

Posteriormente se realizó la identificación molecular de los aislados con base en la secuencia parcial del gen 16S rRNA, cabe mencionar que los géneros aislados son organismos reportados en suelo contaminados o que se encuentran en ambientes hipersalinos lo cual nos pudiera dar un indicio de que estos suelo no presentan la características idóneas para el desarrollo de los microorganismos. En la figura 5.4 el principal genero aislado tanto en suelo rizosférico como no rizosférico fue *Stenotrophomonas* el cual ha sido reportado por Reinhardt *et al.* (2008) en suelos agrícolas de Brasil, en suelo forestal (Liba *et al.*, 2006), y como endófito de camote (Kahn y Doty, 2009). Estos autores coinciden en que el género *Stenotrophomonas* tiene la capacidad de fijar nitrógeno. Sin embargo, ésta no es su principal aporte al ambiente sino mas bien la producción de factores de crecimiento vegetal (fitohormonas), movilización de nutrientes, y producción de sideroforos, los cuales también son importantes para el desarrollo vegetal. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio presente ya que la mayoría de los aislados son productores de AIA y tiene la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico aunque no presentaron un alto índice de solubilización, lo cual pudiera sugerir que las bacterias aisladas en esto estudio también pueden apoyar la producción vegetal por su producción de fitohormonas y su solubilización de nutrientes minerales.

El segundo grupo bacteriano más importante en abundancia fue el *Pseudomonas*, similar el reporte de Kahn y Doty (2009), de igual manera su principal aporte es la producción de fitohormonas. Por otro lado en igual importancia encontramos bacterias pertenecientes al grupo de los rizobiales en el suelo rizosférico de alfalfa. En general, las bacterias del rizobios forman nódulos radicales con las leguminosas, como ejemplo, alfalfa forma nódulos con *Sinorhizobium meliloti*. Pero algunas de ellas también pueden ser bacterias endofíticas y comunes en rizosfera de algunas leguminosas. Entonces, el aislamiento de estas bacterias en suelo rizosférico en este estudio no fue raro y su interacción con la planta e impacto en suelo se necesitan más estudio.

La mayoría de las secuencias obtenidas en este trabajo muestran mayor similitud a bacterias no cultivadas de muestras de suelo o endófitas de otras plantas, mientras que el género *Serratia* se encontró solamente asociado a la rizosfera de Lengua de vaca (*Rumex* sp.) el cual ha sido reportado por Bai *et al.* (2002) como bacteria fijadora de nitrógeno y solubilizadora de fósforo en rizosfera de soya. También en la rizosféra de lengua de vaca, pasto y en suelo no rizosférico se ha detectado *Alcaligenes faecalis* que ha sido reportado como fijador de nitrógeno (Henson *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2007). por otra parte en suelo rizosférico de acelga y en suelo no rizosférico se encontró *Achromobacter xylosoxidans* el cual también ha sido reportado como fijador de nitrógeno, aislado como endófito de trigo y además este microorganismo tiene la capacidad de funcionar como PGPR.



Por su parte los géneros de los Firmicutes fueron aislados de suelos rizosféricos tanto de acelga como de alfalfa. Estos están principalmente asociados a *Bacillus megaterium* y clonas de análisis suelos agrícolas de acuerdo con los reporte de Ding *et al.* (2004). Algunos miembros de este grupo presentan la capacidad de fijar nitrógeno.

El grupo de los actinomicetos de *Streptomyces* en trabajos previos de Ribbe *et al.* (1997) y Gadkari *et al.* (1992) se reportan que contuvieron cepas capaces de fijar nitrógeno ya que cuenta con el complejo enzimático de nitrogenasa alternativo dependiente de vanadio. Estos resultados pueden ser la explicación porque no se detectaron la actividad de reducción de acetileno y el gen *nifH* en los aislados de *Streptomyces* en el estudio actual.

Y finalmente se obtuvo un aislado identificado como *Tetrathiobacter kashmirensis* el cual fue descrito recientemente aislado de suelos de hortalizas en India como parte de la familia Burkholderiaceae (Ghosh *et al.*, 2005) y no ha sido reportado como diazotrofo, sino que tiene importancia como reductor de compuestos azufrados y es tolerante a metales pesados.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de nódulo de alfalfa han sido identificadas como *Sinorhizobium meliloti*, el cual está ampliamente reportado la asociación entre esta especie con plantas de alfalfa (Rome *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 2000). Considerando la alta concentración de nitrógeno total en el suelo de chinampa, la nodulación de estas cepas fue muy interesante para más investigaciones sobre su regulación de nodulation y de fijación de nitrógeno en medio con alta cantidad de nitrógeno.

Por otro lado se ha logrado amplificar el gen *nifH* utilizando diferentes iniciadores, obteniendo diferentes tamaños de fragmento dependiendo de la cepa y del iniciador usado (figura 5.5). Sin embargo no se podría asegurar la capacidad de fijación de nitrógeno con base en las pruebas de reducción de acetileno y detección los genes *nif* mediante PCR fue de acuerdo con los trabajos de Izquierdo y Nüsslein (2006), Gadkari *et al.* (1992), Ding *et al.* (2004), Khan y Doty (2009). No se debe asegurar la diazotrofia de un organismo sin realizar diferentes pruebas que permitan confirmarlo tales como hibridaciones, detección de la enzima con anticuerpos marcados utilizar nitrógeno marcado en lugar de la prueba de reducción de acetileno entre otras.

La caracterización fenotípica de los aislados revela bajas actividades de nitrogenasa por la técnica de reducción de acetileno (ARA) (tabla 5.8) bajo las condiciones establecidas para esta determinación. Se

detectó actividad de nitrogenasa en dos aislados correspondientes al género *Stenotrophomonas* y el aislado AcA2 no identificado, sin embargo a la mayoría de los organismos aislados no mostraron actividad de nitrogenasa debido a que esta es una prueba con muchas variables propias de la prueba como son presión atmosférica, tensión de oxígeno, concentración de acetileno entre otras condiciones. Ya que algunos microorganismos requieren condiciones nutricionales específicas para mostrar actividad con este método (Watanabe *et al.*, 1979; Oda *et al.*, 2005), cabe mencionar que a estos no se les logro amplificar mediante PCR los genes *nifH* o *nifD*.

Además de fijar nitrógeno muchos organismos diazotrofos pueden interactuar con las plantas promoviendo el crecimiento generando factores de crecimiento (fitohormonas) o movilizandoo nutrientes (Steenhoudt y Venderlerden, 2000); debido a lo anterior se realizaron pruebas fenotípicas para evaluar la participación de los organismos aislados en la movilización de nutrientes o en la producción de fitohormonas.

Con respecto a la solubilización de fosfato inorgánico y de acuerdo al criterio establecido por Kumar y Narula (1999), los resultados nos indican que los aislados obtenidos no son importantes solubilizadores de fosfato de manera aislada ya que para ser considerado como un movilizador de fósforo importante tener un índice de solubilización mayor o igual a 4.

En evaluación de la capacidad de producir AIA *in vitro*, se puede ver que las bacterias rizosféricas producen una mayor cantidad de esta fitohormona que los aislados no rizosféricos, lo cual se puede relacionar con la asociación planta-microorganismo ya que se ha reportado por diversos autores que los principales microorganismos productores de fitohormonas se encurtan en rizosféra, porque este ambiente les permite tener un intercambio de nutrientes con la planta ( Tsavkelova *et al.*, 2005; Asghar *et al.*, 2002; Sheng *et al.*, 2008).

Con base en las pruebas de reducción de acetileno, solubilización de fosfato, producción de fitohormona y la identificación molecular, se decidió realizar bioensayos para evaluar 1) el impacto de inoculo productor de fitohormona en el crecimiento de alfalfa y trigo y 2) evaluar el aporte de nitrógeno de bacterias fijadoras de nitrógeno en plantas a nivel invernadero. No se realizó un bioensayo para evaluar la capacidad de movilizar el fosfato inorgánico debido a que los aislados obtenidos presentaron índices de solubilización aproximados a 1 los cuales de acuerdo con los reportes de Kumar y Narula (1999) no presentaría un efecto significativo al llevar el inoculo a nivel de invernadero.

Finalmente el bioensayo de fitohormona en alfalfa y trigo se monto usando como cepas problema a los aislados AI3 Y AI9 ambos aislados provenientes de la rizosféra de alfalfa. Se seleccionaron estas cepas debido a que producen altas cantidades de fitohormona y no fueron identificadas como pertenecientes al género *Rhizobium* sp. Reportes anteriores demuestran que este género puede comportarse como PGPR ya que produce importantes cantidades de fitohormona (Khan *et al.*, 2009). De acuerdo con los resultados de bioensayo de producción de fitohormona se observa que ambos aislados tienen efecto significativo en la mayoría de las variables analizadas, sin embargo en el caso de trigo no hubo diferencias significativas con ninguno de los tratamientos empleados. Este efecto puede ser explicado por la diferencia entre los exudados radicales de cada planta, los cuales son en gran medida responsables del establecimiento de la interacción planta microorganismo, que en este caso pudiera ser que las bacterias inoculadas presentan una especificidad por la rizosféra de alfalfa.

En la evaluación del efecto del inoculo fijador de nitrógeno sobre el crecimiento vegetal de trigo y alfalfa no se observa diferencia significativa entre cada uno de los tratamientos, quizá debido nuevamente a las características de los exudados radicales y la interacción planta- microorganismo que no pudo establecerse apropiadamente.

## 7. CONCLUSIONES PRELIMINARES.

- El suelo de chinampa es un suelo fértil de acuerdo con la norma 021.
- En general se detectó baja actividad enzimática de nitrogenasa en suelo total de ambas chinampas.
- Hay mayor proporción de microorganismos fijadores de nitrógeno en el suelo rizosferico que en suelo no rizosferico y en los suelos no rizosfericos la proporción es mayor en los suelos profundos que en los superficiales.
- En los suelos de las chinampas, hay diversas bacterias fijadoras de nitrógeno, relacionadas a los géneros *Rhizobium*, *Serratia plymuthica*, *Stenotrophomona maltophilia*, *Pseudomona stutzeris*, *Streptomyces alvidoflavus* y *Bacillu megatheriums*. Mientras, también existen algunos aislados candidatos a género o especie nueva
- El aislado AI3 y AI9 (*Rhizobium* sp. ) presentan positivo sobre el crecimiento de trigo y alfalfa debido a la producción de AIA.

## 8.- BIBLIOGRAFÍA

- Albores Zarat B. 1998. Origen pre-mexica de las chinampas de la zona lacustre del Alto Lerma mexiquense. México. El colegio Mexiquense A.C. pp. 1-12
- Alcántara OS. 1996. The floating Gardens of Mexico. *En World Heritage in Risk 33<sup>rd</sup> IFLA World Congress, Paradise on Earth the Gardens of the XXI Century*, International Federation of Landscape Architects, Italian Association of Landscape Architecture, Florencia.
- Alef K, Nannieperi P. 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Ed Academic press pp. 120-124.
- Altieri Miguel A. 2000. Applying agroecology to enhance the productivity of peasant farming systems in Latin America. *Environ Develop Sustainabil* 1:197-217.
- Asghar HN, Zahir ZA, Arshad M, Khaliq A. 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biol Fertil Soils* 35:231-237.
- Bai Y, Souleimanov A, Smith LD. 2002. An inducible activator produced by a *Serratia proteamaculans* strain and its soybean growth-promoting activity under greenhouse conditions. *J Exp Bot* 53:1495-1502.
- Bazin MJ, Markham P, Scott EM, Lynch JM. 1990. Populations dynamics and rhizosphere interactions. *En: Lynch JM (Ed) The rhizosphere*, John Wily and Sons, Londres U.K, pp. 99-127.
- Behar A, Yuval B, Jurkevitch E. 2005. Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitidis Capitata*. *Mol Ecol* 14:2637-2643.
- Beneduzi A., Peres D., Beschoren de Costa P., Bodanese Sanitti M. H., Pereyra Passaglia L.M. 2008. Genetic and phenotypic diversity of plant-growth-promotion bacilli isolated from wheat fields in southern Brasil. *Res Microbiol* 159:244-250.
- Berge O, Heulin T, Achouak W, Richard C, Bally R, Balandreau J. 1990. *Rhanella aquatilis*, a nitrogen fixing enteric bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize. *Can J Microbiol* 37:195-203.

- Biswas JC, Ledha JK, Dazzo FB. 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of Lowland rice. *Soil Sci Soc Am* 64:1644-1650.
- Bridges JR. 1981. Nitrogen-Fixing Bacteria associated with bark beetles. *Microbial Ecol* 7:131-137.
- Chanway CP, Nelson LM. 1990. Tissue Culture bioassay for plant growth promoting rhizobacteria. *Soil Biol Biochem* 23:331-333.
- Chapin FS, Jefferies RL, Reynolds JF, Shaver GR, Svoboda J. 1992. Arctic plant physiological ecology: a challenge for the future. In: Chapin FS, Jefferies RL, Reynolds JF, Shaver GR. (Eds.) *Arctic Ecosystems in a Changing Climate: An Ecophysiological Perspective*. Academic Press, San Diego pp 3-8.
- Chessel D, Dufour A, Thioulouse J. 2004. The ade4 package-I: One-table methods. *R News* 4, 5-10.
- Coe M. 1964. The Chinampas of Mexico. *Scientific American*. 211:90-98.
- Copyright © 1996, International Union of Microbiological Societies
- Crossley Phil L. 2004. Sub-irrigation in Wetland agriculture. *Agriculture and Human Values* 21:191-205.
- Deslippe RJ, Egger NK. 2006. Molecular diversity of *nifH* genes from bacteria associated with high arctic Dwarf Shrubs. *Microbial Ecol* 51:516-525.
- Ding Y, Wang J, Liu Y, Chen S. 2005. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *J Appl Microbiol* 99:1271-2181.
- Ferrera CR, Pérez MJ. 1995. *Agromicrobiología útil en la agricultura sustentable*. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Estado de México.
- Gadkari D, Morsdorf G, Meyer O. 1992. Chemolithoautotrophic assimilation of dinitrogen by *Streptomyces thermoautotrophicus* UBT1: identification of an unusual N<sub>2</sub>-fixing system. *J Bacteriol* 92:6840-6843.
- Galtier N, Gouy M, Gautier ?. 1996. Seaview and Following phylo\_win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl Biosci* 12:543 -548.

- Garbeda P, van Veen JA, van Elsas JD. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Ann Rev Phytopathol* 42:243-70.
- Ghosh A, Maity B, Cakrabari K, Chattopadhyaya Y. 2007. Bacterial diversity of east Calcutta wet land area: Possible identification of potential bacterial population for different biotechnological uses. *Microbial ?* 54:452-459.
- Glick BR. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109-117.
- Glickmann E, Dessaux Y. 1994. A Critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 61: 793-796.
- Hsu FS, Buckley HD. 2009. Evidence for the functional significance of diazotroph community in soil. *ISME J* 3:124-136.
- Izquierdo JA, Nusslein K. 2006. Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments. *Microb Ecol* 51:441-452.
- Jackson ML. 1970. *Análisis químico de los suelos 2ª edición*, editorial Omega. Barcelona.
- Khan Z, Doty SI, 2008. Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. *Plant Soil* 322:197-207
- Knowless R. 1997. The significance of a symbiotic dinitrogen fixation by bacteria. In: R. Hardy y A Gibson (eds). *A treatise on dinitrogen fixation, Section IV*, Jhon Wiley and Sons. New York.EUA. pp.33-83.
- Koh RH, Song HG. 2007. Effects of application of *Rhodopseudomonas* sp. on seed germination and growth of tomato under axenic conditions. *J Microbiol Biotechnol* 17:1805-1810.
- Kowalchuck GA. Stephen JR. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria; a model form molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol* 55:485-529.
- Kuykendall LD, Hashem SM, Wang ET. 2005. Genus VII. *Sinorhizobium* de Lajudie et al. 1994, 715<sup>AL</sup>. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> edition, Vol. 2*. Ed. Por DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley. Editorial Burgey's Manual Trust. USA. pp. 358-361.

- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Leungvutiviroj C, Ruangphisarn P, Hansanimitkul P, Shinkawa H, Sasaki K. 2010. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N<sub>2</sub> fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:1098-1101.
- Li JH, Wang ET, Chen WF, Chen WX. 2007. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biol Biochem* 40:238-246.
- Liba CM, Ferrara FIS, Manfio GP, Fantinatti-Garboggini F, Albuquerque RC, Pavan C, Ramos PL, Moreira-Filho CA, BarbosaHR. 2006. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *J Appl Microbiol* 101:1076-1086.
- Lin M, Smalla K, Heuer H, van Elsas JD. 2000. Effect of an *Alcaligenes faecalis* inoculant strain on bacterial communities in flooded soil microcosms planted with rice seedlings. *Appl Soil Ecol* 15:2:211-225.
- Mahmood KW, Yang N, Kidhwar Z, Rajputy A, Arijio A. 2006. Study of cellulolytic soil fungi and two nova species and new medium. *J Shejiang Uni Sci* 7:459-466.
- Minamisawa K, Nishioka K, Miyaki T, Ye B, Miyamoto T, You M, Saito A, Saito M, Barraquio W, Teaumroog N, Sein T, Sato T. 2004. Anaerobic nitrogen fixing consortia consisting of Clostridia isolated from gramineous plants. *Appl Environ Microbiol* 20:3096-3102.
- Mulder A, Graaf AA, Robertson LA, Kuenn JG. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluized deb reactor. *FEMS Microbiol Ecol* 16:177-184.
- Nautiyal CS. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol let* 170: 265-270



- Nelson DR, Mele PM. 2006. The impact of crop residue amendments and lime on microbial community structure and nitrogen-fixing bacteria in the wheat rhizosphere. *Aus J Soil Res* 44:319-329.
- Nusslein K, Tiedje JM. 1999. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl Environ Microbiol* 65: 3622-3626.
- Outerbridge T. 1987. The disappearing chinampas of Xochimilco. *Ecologist* 17:76-83.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.
- Ramos BR, Cajuste JL, Flores RD, García NE. 2001. Metales Pesados, sales y sodio en suelos de Chinampa en México. *Agrociencia* 35:385-395.
- Rasolomanmpianina R, Bailly X, Fetiarison R., Rabevohitra R, Bena G., Romaroson L., Raherimandimby M., Moulin L., De lajudie P., Dreyfus B., Avarre J.C. 2005. Nitrogen fixing nodules from rose wood trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to  $\alpha$  y  $\beta$ - *proteobacteria*. *Mol Ecol* 14:4135-4146.
- Reinhart EL, Ramos PL, Manfio FP, Barbosa HR, Pavan C, Moreira-Filho CA. 2008. Molecular characterization of nitrogen fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at Sao Paulo State. *Braz J Microbiol* 39:414-422.
- Ribbe M, Gadkari D, Meyer O. 1997. N<sub>2</sub> Fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a Molybdenum-Dinitrogenase and a Manganese-Superoxide Oxidoreductase that couple N<sub>2</sub> reduction to the oxidation of superoxide produced from O<sub>2</sub> by a Molybdenum-Co dehydrogenase. *J Biol Chem* 272: 26627–26633.
- Rome S, Fernandez Mp, Brunel B, Normand P, Cleyet-Marel J-C. 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int J Syst Bacteriol* 46:972-980.
- Sambrook J, De Souza FA, Van Elsas JD. 2002. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 68:595-603.
- SAS Institute. Statistics Guide for personal computers, version 6.04, in: SAS Institute Cary, 1989.

- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2000. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Diario Oficial de la Federación.
- Soriano A, Leaver JD, Losada H. 2002. Impacto económico del sistema agrícola periurbano de las chinampas. Revista AU pp. 16-18.
- Souchie JE, Saggin- Junior OJ, Silva MR, Campello EC, Azcon R, Barea JM. 2006. Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular micorhizal fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty. R J-Brazil 78:183-193.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software versión 4.0. Mol Biol Evol 24: 1596-1599.
- Tsavkelova EA, Klimova SY, Cherdyntseva TA, Netrusov AJ. 2006. Microbial producer of plant growth stimulators and their practical use: A review. Appl Biochem Microbiol 42:133-143.
- Van Berkum P. 1980. Evaluation of acetylene reduction by excised roots for the determination of nitrogen fixation in grasses. Soil Biol Biochem 12:141-145.
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA. 2005. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science 304:66-74.
- Villadas PJ, López FM, Saad RH, Toro N. 2006. Rhizosphere-bacterial community in *Eperua falcata* (*Caesalpinaceae*) a putative nitrogen-fixing tree from French Guiana Rainforest. Microbial Ecol 53:317-327.
- Vyas P, Gulati A. 2009. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. BMC Microbiol 9:174.
- Weisburg WG, Bams SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 173:697-703.
- Widmer F, Shaffer BT, Porteus LA, Seidler RJ. 1999. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas Fir forest site in the Oregon cascade mountain range. Appl Environ Microbiol 65:374-380.
- Wriddhiman G, Angshuman B, Sukhendu M, Bomba D y Pradosh R. 2005. *Tetrathio bacter kashmirensis* gen. nov., sp. nov., a novel mesophilic, neutrophilic, tetrathionate-oxidizing,

facultatively chemolithotrophic betaproteobacterium isolated from soil from a temperate orchard in Jammu and Kashmir, India. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1779-1787.

- Yan AM, Wang ET, Kan FL, Tan ZY, Sui XH, Reinhold-Hurek B, Chen WX. 2000. *Sinorhizobium meliloti* associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. in arid saline soils in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1887-1891.
- Zani S, Mellon MT, Collier JL, Zher JP. 2000. Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol* 66:3119-3124.
- Zehr J, Jenkins BD, Short, SM, Steward, GF. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol* 5:539-554.
- Zhang L, Hurek T., Reinhold H. 2007. A *nifH*-based oligonucleotide microarray for functional diagnostics of nitrogen-Fixing microorganisms. *Microbiol ecol* 53: 456-470.
- Zhou J, Brums MA, Tuedje J. 1995. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62:316-322.
- Zvyagintsev D, Kurakov A, Filip Z. 1991. Microbial diversity of forest, field and polluted by lead soddy-podzolic soils. *Symposium 11 in: Moscow Univ. Press.*