Diversidad bacteriana en suelos de las chinampas en Xochimilco y su importancia agrícola y ecológica

(Proyecto No. PICS08-3)

Dr. En Tao Wang Hu

Departamento de Microbiología

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

Instituto Politécnico Nacional

20 de enero del 2011

RESUMEN

Para evaluar la diversidad e impacto de las bacterias en los suelos de las chinampas, un sistema agricultura sostenible, las bacterias relacionadas a los procesos más importantes para mantener la productividad de suelo se cuantificaron, aislaron y caracterizaron. Además de esos, algunas cepas y consorcios se seleccionaron para prueba de sus potenciales como promotor de crecimiento de las plantas o como inoculantes para biorremediación de contaminación por petróleo o biotransformación de bagazo. Mediante de los métodos microbiológicos y moleculares, se identificaron las bacterias aisladas en los géneros *Agrobacterium, Bacillus, Pseudomonas, Pseudostenotrophomonas, Stenotrophomonas, Rhizobium, Serratia, Sinorhizobium, Streptomyces* y una bacteria anaerobia no identificada como potenciales **fijadoras de nitrógeno**; *Acinetobacter*, *Bacillus, Pseudomonas, Ralstonia, Rhodococcus, Serratia, Sphingomonas, Staphylococcus* y *Stenotrophomonas* como **solubilizadoras de fosfato**; *Acinetobacter*, *Agromyces, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacillus, Cellulomonas, Corynobacterium, Delftia, Hyphomicrobacterium, Knoellia, Leucobacter, Microbacterium, Nocardioides, Promicromonospora, Pseudoxanthomonas*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas, Staphylococcus*, *Stenotrophomona*s, *Streptomyces* y *Xanthomonas* como **degradadoras de celulosa**. En general, la actividad de nitrogenas es baja en los suelos de las chinampas porque estos suelos tienen características, como alcalinos, salinos, ricos en nitrógeno combinado y materia orgánica, que inhiben la fijación biológica de nitrógeno. La abundancia de las bacterias solubilizadoras y celulolíticas fueron mayores o iguales que los valores reportados en otros suelos, y varias de ellas son bacterias no identificadas, demostrando que son recursos para buscar las bacterias nuevas. Por las caracterizaciones fenotípicas, algunas bacterias aisladas fueron adaptadas a las condiciones de las chinampas, por ejemplo, se puede degradar los sustratos de celulosa, xilana y avicel en un amplio intervalo de pH y salinidad *etc.*. Algunas bacterias también pueden producir fitohormonas (IAA). Con base en estos resultados, se seleccionaron algunas cepas para usar en bioensayo y varias cepas podrían mejorar el crecimiento de las plantas, indicando que tienen potencial para ser biofertilizantes.

Se seleccionaron consorcios bacterianos capaces de degradar petróleo y gabazo de caña, los cuales tienen potencial a la aplicación en biorremedición de suelos contaminantes por petróleo o biotransformación de celulosa. Estos resultados demostraron que el suelo de las chinampas contiene diversas bacterias con potencial de

biotecnología. Por resultados de bioensayo, el consorcio capaz de degradar petróleo no hubo efecto negativo a todas las plantas usadas (*Leucaena, Acacia*, trigo y frijol), y podría mejorar el crecimiento (peso seco) de los árboles. Más investigación sobre la remoción de hidrocarburo en suelo por este consorcio está en proceso. Adicionalmente, aislamiento y caracterización de las bacterias en los consorcios capaces de degradar bagazo están en proceso.

Los resultados del presente proyecto demostraron 1) por primera vez la abundancia, diversidad y algunas características de las bacterias en los suelos de las chinampas; 2) la presencia de varias las especies nuevas en diferentes grupos; 3) potenciales de los aislados y consorcios bacterianos como biofertilizantes, inoculantes para biorremediación de contaminación por petróleo, y biorecursos para transformar los bagazos a alimento (proteínas) de los animales. Con este proyecto, se realizaron tres tesis de posgrado y cinco tesis de licenciatura. Este trabajo también amplia el conocimiento de las chinampas por las publicaciones, las cuales pueden generar más atenciones de las personas y organizaciones para desarrollar y proteger este sistema valioso.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Chinampa

Las chinampas son un sistema agrohidrológico sustentable que se desarrolló en la zona lacustre de Mesoamérica (Alcántara, 1996) y se caracteriza por su explotación intensiva que mantiene el equilibrio con el ecosistema que la soporta (Altieri, 2000). Derivando del náhuatl, chinampa significa "cama rodeada de estacas" (Alcántara, 1996), y se puede describir como islote artificial formados por desechos vegetales cubiertos por sedimento lacustre, anclados con estacas de ahuejote (*Salix bonplandiana*) rodeados por agua en al menos tres de sus aristas y se emplean como suelo de cultivo (Ramos *et al*. 2001).

Para su construcción se requiere la localización de una porción de suelo firme en una zona poco profunda del lago, se delimita la zona, generalmente de forma rectangular y de no más de 20m por lado (Coe, 1964). Posteriormente, se forma un entretejido de ahuejote o carrizo, formando así la base sobre la cual se colocan los restos vegetales hasta alcanzar una altura de unos 50cm, se deja secar y se cubre con una capa de sedimento del lago. Esta acción se repite alternadamente para dar origen al suelo de cultivo (Prutzman, 1998). Se considera de origen antrópico por su construcción y manejo, sin horizontes definidos debido a la remoción y adición de materia orgánica (Ramos *et al*. 2001).

Las chinampas aparecieron en la cuenca de México entre los años 1300-800 a.C. en las orillas de los lagos, que proporcionaban agua de manera abundante y permanente; para los años 1325-1521 d.C. ocupaban grandes extensiones en las cuencas y pantanos de la zona. Esto se relacionó con el crecimiento demográfico y la expansión de la Triple Alianza (Albores, 1998). En la época prehispánica se encontraban ancladas a un sitio del lago y los principales productos eran las hortalizas y algunas flores de importancia ceremonial (Crossley 2004). Después de la conquista las chinampas dejan de estar fijas para desplazarse a lo largo del lago, y fungen como invernadero para plantas ornamentales introducidas de Asia y Europa (Alcántara 1993; Altieri 2000). Actualmente, la zona chinampera de Xochimilco es reconocida como patrimonio cultural mundial por la UNESCO (Alcántara 1993).

Debido a la presencia de materia orgánica, principalmente ácidos húmicos, su color va de grisáceo a negro (Ramos *et al*. 2001), presenta densidades menores a la unidad, son muy porosos y dominan las texturas arcillosas, permitiendo el enraizamiento y difusión ascendente del agua, así como la aireación (Crossley, 2004). El pH es generalmente alcalino (pH 8.8) en la superficie y ligeramente más ácido en las capas profundas (hasta 5.2 pH) (Outbridge 1989;). Se pueden encontrar también algunos metales pesados debido a la contaminación del agua, los cuales se encuentran precipitados como hidróxidos, carbonatos, sulfatos o fosfatos (Ramos *et al*. 2001).

I.2 Microorganismos y los ciclos bioquímicos en suelo

Los microorganismos son compuestos biológicos de la biosfera y su gran diversidad los permite distribuir en distintos ecosistemas con amplias funciones. Por sus diversas capacidades metabólicas, los microorganismos son biorecursos importantes para biotecnología y componentes básicos para mantener el desarrollo sostenible de los ecosistemas. Un papel muy importante y único de los microorganismos es su participación de los ciclos bioquímicos, como los del carbono, del nitrógeno y del fosforo. Por eso, el estudio de la diversidad de los microorganismos se ha realizado extensivamente en el mundo. Generalmente, la diversidad y distribución de los microorganismos se determinan por los factores ambientales, es decir, distintas poblaciones microbianas están asociadas al diferente hábitat o ecosistemas.

Para sobrevivir y crecimiento, los organismos necesitan una seria de los elemento químico, llamando nutrientes o nutrimentos, por ejemplo, carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, calcio, magnesio y potasio etc. En la tierra, solo una proporción de estos elementos están en formas útiles para los organismos y los nutrientes útiles son reciclados continuamente en formas complejas a través de las partes vivas y no vivas de la biosfera, y convertidos en formas útiles por una combinación de procesos biológicos, geológicos y químicos. En suelo, la cantidad de estos elementos o capacidad de ofrecer estos nutrientes a las plantas se construye una parte de la fertilidad del suelo. Entre los nutrientes, las plantas toman el carbono a partir del aire en la forma de CO_2; y absorban los de nitrógeno, fosforo, potasio etc. a partir de suelo. En muchos casos, nitrógeno y fosforo en suelo son factores limitantes de la producción de las plantas.

Para aumentar la producción de plantas, se producen y se usan los fertilizantes químicos en el mundo. Por el informe de la FAO, el total de la producción mundial de fertilizantes (nitrógeno, fosfato y potasio) se pasó de 206.5 millones de toneladas en 2007/2008, y todavía está incrementando 3% anualmente (http://www.fao.org/newsroom/es/news/2008/1000792/index.html). Mientras la aumentación de la producción y el uso de los fertilizantes causan contaminación de suelo, agua, y aire (Criss y Davisson 2004; Mirlean y Roisenberg 2006; Nolan *et al.* 1988; Vargas *et al*. 1999). Para reducir el consume de fertilizantes químicos, los procesos microbianos juegan un papel importante. Actualmente el uso de bacterias movilizadoras de minerales (fósforo, potasio, magnesio, etc.) como posibles biofertilizantes ha sido ampliamente estudiado en diferentes tipos de suelos (Chang y Yang 2009; de Bashan y Bashan 2004; Goldstein y Krishnaraj 2007; Hernández-Rodríguez *et al*. 2005; Rodriguez *et al*. 2006; Yadav *et al*. 2001). Las bacterias fijadoras de nitrógeno también se usan como biofertilizantes (http://www.scribd.com/doc/19017675/review-article-on-biofertilizers).

El ciclo de carbono es un ciclo biogeoquímico de gran importancia para la regulación del clima de la Tierra, y la transformación de carbono es una actividad básica para el sostenimiento de la vida (http://es.wikipedia.org/wiki/Ciclo_del_carbono). En suelo, el principal proceso del ciclo de carbono es la degradación de los polimeros de carbono (http://es.wikipedia.org/wiki/Pol%C3%ADmero), los cuales son muy abundantes en el planeta y pueden ser recursos útiles (celulosa) o contaminantes (petróleo) del ambiente.

La celulosa es un polisacárido compuesto exclusivamente de moléculas de glucosa; es pues un homopolisacárido (compuesto por un solo tipo de monosacárido); es rígido, insoluble en agua, y contiene desde varios cientos hasta varios miles de unidades de β-glucosa. La celulosa es la biomolécula orgánica más abundante ya que forma la mayor parte de la biomasa terrestre (http://es.wikipedia.org/wiki/Celulosa). Una forma de biotransformación de las celulosas es usarlas para producir biocombustible como metanol o etanol (Yanase *et al*. 2009) (ver las reversiones de Chen y Liu 2010; Liu *et al*. 2010; Weber *et al.* 2010). Han sido reportadas diversas bacterias celulolíticas, como *Bacillus*, *Clostridium, Celulomonas* etc.

Aunque las plantas no toman su nutriente del carbono en suelo, la biodegradación de los polímeros carbonados también es factor importante para la fertilidad de suelo, porque esta degradación ajusta la relación entre C, N y P en suelo. En general, la relación C:N cerca

de 25-30 es adecuada para crecer las plantas. Por eso, las bacterias degradadoras en suelo pueden baja la relación de C:N, mientras los productos de la degradación (glucosa, bicelulosa, ácidos orgánicos, CO_2 etc.) también se usan como fuente de carbono y energía por otros microorganismos.

La explotación de combustibles fósiles para sustentar las actividades industriales y de transporte es hoy día una de las mayores agresiones que sufre el planeta. Una de los problemas causados por petróleo es la contaminación de suelo y de agua por derrame de petróleo o marea negra es un vertido que se produce debido a un accidente o práctica inadecuada. Para eliminar la contaminación de petróleo, se puede usar los procesos de biorremediación, la cual se define como cualquier proceso que utilice microorganismos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural, por ejemplo, la limpieza de derrames de petróleo se puede facilitar por medio de la adición de fertilizantes con nitratos o sulfatos para estimular la reproducción de bacterias nativas (bioaumentacion) o exógenas (introducidas) (http://es.wikipedia.org/wiki/Biorremediaci%C3%B3n). Diversas bacterias, incluyendo *Alcaligenes, Bacillus, Pseudomonas* etc., se reportaron como degradadoras de hidrocarburo (Seo et al. 2009).

Además del uso de las cepas bacterianas puras en la biorremediación y biotransformación, un método alternativo es el uso de consorcios bacterianos, o cultivos mixtos. La ventaja del uso de los consorcios es que se puede degradar diferentes compuestos o degradar algunos compuestos más eficientes que una cepa sola, debido la cooperación metabólica entre distintas capas en el consorcio. Algunos ejemplos son la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Mittal y Singh 2009), degradación de Degradation of Linuron (Dejonghe *et al.* 2003), y degradación de petróleo (Sanchez *et al.* 2005).

II. JUSTIFICACIÓN

Los microorganismos son compuestos biológicos de la biosfera y su gran diversidad los permite distribuir en distintos ecosistemas con amplias funciones. En suelo, los microorganismos son un factor más activo para mantener la fertilidad o productividad de suelo y participan los ciclos bioquímicos para librar u ofrecer los nutrimentos a las plantas. Por esta razón, la diversidad bacteriana y su función en suelos ya se investigaron ampliamente. Únicamente en México, las chinampas son un sistema agrícola sostenible, con suelos caracterizados por su alta pH, alta salinidad, alta contenido de materia orgánica etc., las cuales diferenciarse de otros tipos de suelo. Hasta la realización del presente estudio, no hubo ningún reporte sobre los microorganismos en los suelos de las chinampas. Considerando que los factores de suelo son determinantes de la distribución de las bacterias (Ferrier, 2006) y la importancia de las bacterias en la fertilidad de suelo, se realizó este proyecto para determinar la abundancia y la diversidad de las bacterias en los suelos de las chinampas, y para evaluar sus potenciales de usar como biorecurso en biotecnología.

III. OBJETIVOS

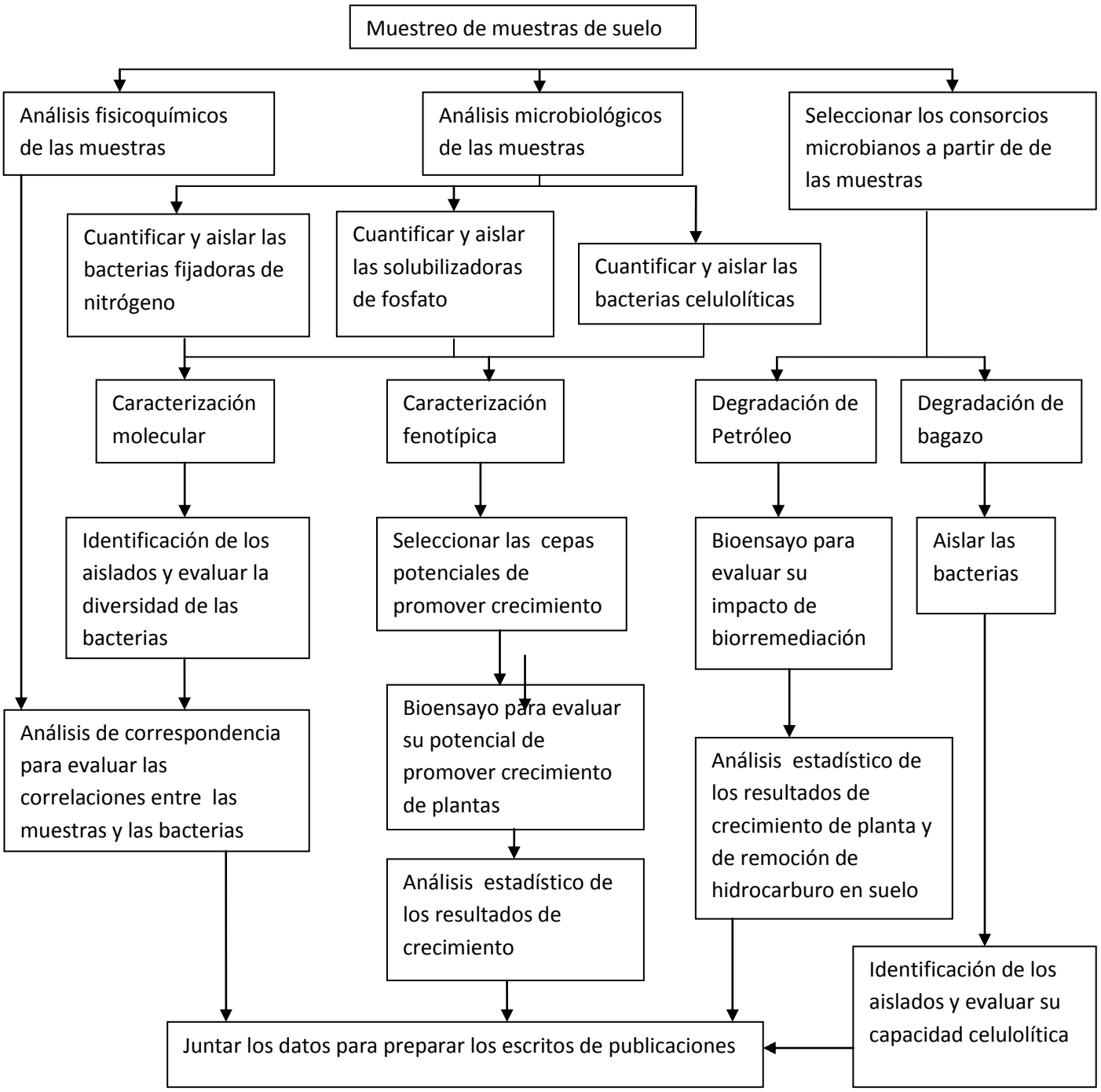
III.1 Objetivos Generales

Conocer la diversidad de las bacterias con funciones diferentes en suelo de las chinampas y evaluar sus potenciales en biotecnología.

III. Objetivos particulares

- Analizar las características fisicoquímicas del suelo de las chinampas.
- Cuantificar, aislar y caracterizar las bacterias fijadoras del nitrógeno en suelo de las chinampas, y evaluar sus impactos sobre crecimiento de plantas.
- Cuantificar, aislar y caracterizar las bacterias solubilizadoras de fosfato en suelo de las chinampas, y evaluar sus impactos sobre crecimiento de plantas.
- Cuantificar, aislar y caracterizar las bacterias degradadoras de celulosa en suelo de las chinampas.
- Seleccionar consorcio bacteriano capaz de degradar gabazo de caña a partir suelo de las chinampas.
- Seleccionar consorcio bacteriano capaz de degradar petróleo a partir suelo de las chinampas.
- Evaluar la diversidad global de las bacterias en suelo de las chinampas por análisis de DNA metagenómico.

IV. ESTRATEGIA DEL TRABAJO



V. CARACTERÍSTICAS FISICO-QUÍMICAS DE LOS SUELOS DE LAS CHINAMPAS Y EXTRACCIÓN DE DNA METAGENOMICO

(Jazmín Raquel Freyre Hernández y Yanelly Trujillo Cabrera)

V.1 Materiales y Métodos

Muestreo de los suelos. Principalmente, se seleccionaron 2 chinampas representativas para este estudio en el Enero del 2009. Se escogieron que fueran chinampas maduras, es decir que no hayan sido adicionadas con material de desecho vegetal recientemente para impedir el efecto de cambios sus características y fueran lo más homogéneas posibles. Las chinampas están localizadas en el Canal Apatlaco Paraje Potrero (19˚15'N, 99˚08'W), Colonia San Juan Moyotepec, Xochimilco, en la Ciudad de México. El sitio está a 2500 m de altitud, cuenta con una temperatura promedio anual de 15˚C y 709 mm de precipitación anual. Este lugar está alojado fuera de la zona turística, para impedir disturbios por tránsito humano.

Se realizó la técnica de muestreo por cinco puntos en cruz a profundidades 0-30cm y 30-50cm). Estas muestras fueron colectadas en bolsas plásticas negras y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su análisis (Vincent 1970). Las muestras de cada una de las diferentes profundidades de cada chinampa se mezclaron para finalmente obtener tres muestras de cada chinampa excepto de la chinampa 3 de la cual no se obtuvo suelo rizosférico.

Análisis fisicoquímico del suelo. Se obtuvieron en total 9 muestras de suelo a las que se les hizo los siguientes análisis: Nitrógeno Total por el método (Bremner, 1996), contenido de Potasio por espectrometria de emisión de flama atómica (Rhoades, 1982), contenido de Fósforo por el método de Olsen (Olsen y Sommers, 1986), humedad por gravimetría (105˚C, 24h) (Topp, 1993), pH en 10 mM $CaCl_2$ (Thomas, 1996), textura por método de hidrómetro (Gee y Bauder, 1996), contenido de materia orgánica por el método de Walkey y Black (1934), capacidad de retención de agua por el método de Topp (1993) y conductividad eléctrica se hizo con el conductimetro portable (water conductivity and soil activity meter, HI 993310, Hanna instruments).

Cuantificación de las bacterias. Una serie de diluciones dicimales se preparó para cada muestra con una solución de NaCl (0.89%) hasta 10^{-6}. Una alícuota de 0.1 mL de las

últimas tres diluciones se sembraron (en duplicado) en superficie de las placas del medio de cultivo PY (20 ml por cada caja de Petri) (peptona, 5g; extracto de levadura, 3g; $CaCl_2$, 0.6g; agar, 18g; agua destilada, 1 L; pH8.0). Las placas inoculadas se incubaron a 28˚C por 48 h. Las colonias bacterianas se cuentaron y la abundancia de las bacterias mesofilicas aerobicas se calculó como Unidad Formativa de Colonia (UFC) por gramo de suelo base seca.

Extracción de DNA metagenómico. La obtención de DNA metagenómico con alta calidad es la base para hacer análisis metagénicos y varios métodos se desarrollaron para extraer los DNAs metagenómicos a partir de distintos suelos (Cullen and Hirsh 1998; Dong et al. 2005; Griffiths et al. 2000; Knabel and Crawford 1995; Sebastianelli et al. 2008; Satyanarayana 2011; Zhou et al. 1996) y algunos de estos métodos se compararon experimentalmente (Lloyd-Jones and Hunter 2001) o revisaron (Fredricks et al. 2005; Robe et al. 20003; Schneegurt et al. 2004) para conocer sus ventajas y limites.

En este estudio, siete diferentes protocolos se aprobaron para extraer los DNAs metagenómicos de los suelos de las chinampas: 1) método de Cullen y Hirsh (1998); 2) método de Knabel y Crawford (1995); 3) un método combinado del proceso de Cullen y Hirsh (1998) para romper las bacterias y el proceso de Knabel y Crawford (1995) para extraer los DNAs; 4) método de Zhou *et al.* (1996); 5) método de Dong *et al.* (2005); 6) método de Deng et al. (2005) modificado por adicionar el pre-labado de la muestra con base en la sugerencias de diferentes autores (Dong *et al.* 2005; Rajendhran y Gunasekaran 2008; Persoh *et al*. 2008); 7) método de Ceja *et al.* (2009) modificado por adicionar el pre lavado.

In protocol 7, el cual generó DNAs con Buena calidad como mostró en los siguientes experimentos, 5.0 g de suelo se suspendieron con 25 ml de la solución de pirofosfato de sodios ($Na_4P_2O_7$, 0.15 M) en un tubo Oak Ridge de 50 ml (Nalgene™, Sigma-Aldrich®). La suspension se mezcló 1 min con Vortex. Después de 10 min de precipitación, se sedimentó el suelo por centrifugar 10 min a 7,700 × g bajo la temperatura ambiental. La supernatante se desechó y el suelo se lavó 5 veces más. El suelo lavado se resuspendió en 5 ml del buffer fosfato (0.15M NaH_2PO_4; pH8.0), se precipitó 10min, se mezcló con Vortex por 1 min y se centrifugó 10 min a 7,700 × g bajo 25 °C. El precipitado de suelo se lavó 4 veces más con mismo buffer y la supernatante se desechó después de cada centrifugación. El sedimento se suspendió en 5 ml de la solución 1 de lisis (NaCl 0.15M; EDTA 0.1M; pH =8.0; 10 mg ml^{-1} de lisozima), se mezcló con Vortex y se incubó a 37°C

por 1 h, mezclado con Vortex cada 20 min. Se adicionaron 5 ml de la solución 2 de lisis (NaCl 0.1M; Tris-HCl 0.5M; 12% SDS; pH=8.0) y se incubó la mezcla a -20 °C por 20 min, a 65°C por otro 20 min. El ciclo de congelar-fundir se repitió dos veces y se adicionaron 8 ml de $Al_2(SO_4)_3$ (0.15M) para eliminar los materiales húmicos (Braid et al., 2003). La mezcla se homogeinezada con Vortex y se realize otra vaz el ciclo de congelar-fundir. La mezcla se centrifuge 10 min a 7,700 × g. La supernatante se transferó en un tubo (Oak Ridge) nuevo estéril y se mescló con 2.7 ml de NaCl (5M) y 2.1 ml de Triton X-100 (10% en 0.7M NaCl solución). Después de incubar 10 min a 65 °C, 12 ml de la mezcla cloroformo: alcohol isoamilico (24:1, v/v) se colocaron y mezclaron suavemente por inversión y se centrifugó 30 min a 3000 × g. La fase acuática se transfirió a un tubo limpio y se mezclo con 12 ml de Polietylenglícol (PEG 13%; NaCl 1.6M) y se incubó 1 h en hielo. El DNA metagenómico se precipitó por centrifugar 30 min a 12,000 × g bajo 4°C, se lavó con 5 ml de etanol frio (-20 °C, 70%, v/v), se resuspendió en 500µl de agua deionizada estéril, se transfieró en un micro tubo estéril, y se mezcló con 1 ml de etanol absoluto con Vortex. Después de incubar 30 min a 4°C, la fase liquida se desechó con una micropipeta de 1000 µl, y el precipitado de DNA se lavó con 500 µl de etanol frio (70%, v/v). el precipitado de DNA se secó por incubarlo 10 min a 65°C. Por fin se solubilizó el extracto en 500 µl de agua deionizada estéril y se conservó a -20°C.

Evaluación de concentración y calidad de extracto de DNA metagenómico. Estas determinaciones se realizaron por espectrofotometro con microcelda (100 µl) de cuarzo. La absorbencia del extracto de DNA (dilución 1:20) se medió a 260, 280 y 230nm (Sambroock *et al.* 2002). La concentración de DNA se estimó por la formula: 1 unidad de A_{260} = 50 µg ml^{-1} DNA con doble cadenas. La puridad de DNA se presentó por la relación entre la absorción a 260nm y 230nm ($A_{260/230}$) y la relación entre la absorción a 260nm y 280nm ($A_{260/280}$). Como reportado anteriormente, La muestra de DNA con $A_{260/230}$>2.0 y $A_{260/280}$>1.7 se consideró como muestra pura para los análisis molecular (Sambroock *et al.* 2002).

La integridad de la muestra de DNA se estimó por electroforesis en gel de agarosa (1%) usando TBE (0.5 ×) como buffer de electrodo (Sambroock *et al.* 2002). El extracto de DNA (1-2 µl) y 0.5 µl del marcador de peso molecular (1 kb ladder, invitrogen™) se colocaron separativamente en el gel. Después del electroforesis, el gel se tiñó con bromuro etidio (0.5 µg ml^{-1}), se observó bajo la luz UV y se tomó la foto con Multimage™ Light Cabinet

(Alpha Innotech Corporation). Una banda clara de DNA con alto peso molecular indicó que la muestra no fue degradada.

Amplificación del gen 16S rRNA a partir de DNA metagenomico. Porque el objetivo de la extracción de DNA metagenomico fue para usarlo como blanco para ampliar algunos genes por PCR, la calidad de extractos de DNAs se determinó para amplificar el gen 16S rRNA, el cual sirve como una indicador. Los primers universales para las eubacterias, 46F (5'GCC TAA CACATG CAA GTC 3') y 1540R (5' GGT TAC CTTGTT ACG ACT T 3') (Edwards et al., 1989; Yu y Morrison, 2004) or fD1 (5`-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3`) and rD1 (5`-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3`) se usaron para la PCR con el protocol de PCR reportado por Weisburg *et al*. (1991). La mezcla de PCR fue de 25 µl con DNA metagenómico, 50ng; 10×PCR buffer, 2.5 µl; $MgCl_2$, 2.0mM; cada uno de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 200µM; *Taq* DNA polymerasa (invitrogen™), 1.2U; cada uno de los primers, 10 pM; bovina sérica de albúmina, 160µg; Agua deionizada para cumplir el volumen a 25µl. Los productos de PCR se verificaron por electrophoresis en gel de agarosa (1%, w/v) y las bandas se observaron igual que el protocolo de estimación de la integridad.

V.2 Resultados y discusión

Características fisicoquímicos de los suelos y la abundancia bacteriana

Las características de las muestras de suelos se presentan en la Tabla 5.1. En este análisis, solo las muestras no rizosfericos se usaron porque las rizosfericas no tuvieron suficientes cantidad. En general, las muestras de las dos chinampas tuvieron características similares: todos con textura arcilla arenosa, con pH 8.0-8.8, rico en materiales orgánicos, con gran capacidad de retención de agua (112.09-135.65%), y humedad variando entre 29.20% y 54.96%. La abundancia de las bacterias mesofilicas aeróbicas fue muy similar, desde 3.45×10^7 hasta 5.07×10^7 ufc g^{-1} de suelo base seca.

Comparando con la NOM-021-SEMARNAT-2000, el suelo de chinampa reúne las condiciones de lo que se denomina "suelo fértil", variando ligeramente algunos parámetros (Tabla 5.1) ubicando la cantidad de materia orgánica en el rango de media-alta y el pH como ligeramente alcalino respecto a los suelos agrícolas (Hu y Buckley 2009). Sin embargo en este rango de pH alcalino es posible el desarrollo óptimo de

diversos cultivos de interés comercial (Gliessman 2002). Se ha documentado también que en estos suelos existe un alto contenido de fósforo y nitrógeno total, además de presentar un contenido moderado de metales pesados (Ramos *et al*. 2001) y debido a la naturaleza arcillosa de su composición limita la disponibilidad de la fracción asimilable del fósforo total (Crossley 2004; Felipelli 2008). Nuestros datos confirmaron las observaciones anteriores. Los valores de capacidad de retención de agua son superiores al 100% debido a la textura arcillosa y el elevado contenido de materia orgánica (Porta 2005).

Tabla 5.1. Características fisicoquímica y abundancia de bacterias (BMA) en las muestras de suelo en dos chinampas (ch I y ch II) de Xochimilco

Característica	Muestra de suelo*			
	Ch Is	Ch Id	Ch IIs	Ch IId
Materia orgánica (%)	7.5	4.6	7.5	6.4
N total (%)	0.80	0.56	0.75	0.58
P total (mg kg^{-1})	22.4	17.4	3.7	19.6
K total (mg kg^{-1})	4468	3539	3728	2054
Conductividad eléctrica (ms m^{-1})	4.66	4.66	4.44	4.44
pH	8.6	8.8	8.7	8.0
Capacidad de retención de agua (%)	120.2	116.7	148.0	112.1
Humedad (%)	24	44	38	48
Humedad/ CRA (%)	19.97	37.70	25.68	42.82
BMA (cfu g^{-1} suelo base seca)	5.07×10^{7}	3.45×10^{7}	3.45×10^{7}	4.04×10^{7}

*. *s,* Suelo superficie de 0-30 cm de profundidad; *d,* suelo de profundo de 30-60 cm de profundidad.

Estas características demostraron que los suelos de las chinampas en Xochimilco son diferentes que otros por su alta concentración de materia orgánica, alta salinidad y alcalino (Tabla 5.1). Por otro lado, la alta concentración de materia orgánica se compaña generalmente por alta abundancia de las bacterias (hasta 10^{9} ufc g^{-1} de suelo base seca), pero en nuestro caso la BMA no fue tan abundante (10^{7} ufc g^{-1} de suelo base seca). Este resultado podría relacionar que la mayor proporción de la materia orgánica fue materiales húmicos, los cuales no se puede usar por los microorganismos como fuente de carbono o de energía. La alta concentración de los materiales húmicos se presentó por el color negro de suelo generando porque los humus contienen moléculas con alta peso molecular y alta melanización (Ramos Bello et al*.* 2001).

Extraccción de DNA metagenómico

Anteriormente, los métodos de Cullen y Hirsh (1998) se usó en nuestro laboratorio para aislar DNA metagenómico a partir de biopelícula (Neria-Gonzalez et al. 2006). Otros métodos (Knabel y Crawford 1995; Dong *et al.* 2005; Zhou *et al.* 1996) también son buenos para distintas muestras ambientales. Pero ninguno de estos métodos, incluyendo los modificados, podría generar muestras de DNA Buena para amplificar los genes de 16S rRNA (datos no presentados). El problema principal fue la contaminación de los ácidos húmicos y también baja producto de DNA con degradación. Sin embarco, la floculación de suelo con solución de $Al_2(SO_4)_3$ podería eliminar la contaminación de ácidos húmicos.

Con el método 6, el lavado de suelo con la solución de NaCl (0.85 %) y 0.1×TE podría eliminar la contaminación de los ácidos húmicos en el extracto de DNA. El producto fue limpio sin degradación, y producto de PCR fue obtenido ocasionalmente (resultado no presentado).

Solo el método 7, el de Ceja *et al.* (2009) modificado por adición de pre-lavación, generó el DNA metagenomico adecuado para PCR. Con ests método, el extracto de DNA tiene tamaño molecular >12 kb (sin degradación) (Fig. 1A) y la amplificación del gen 16S rRNA fue reproducible (Fig. 1B).

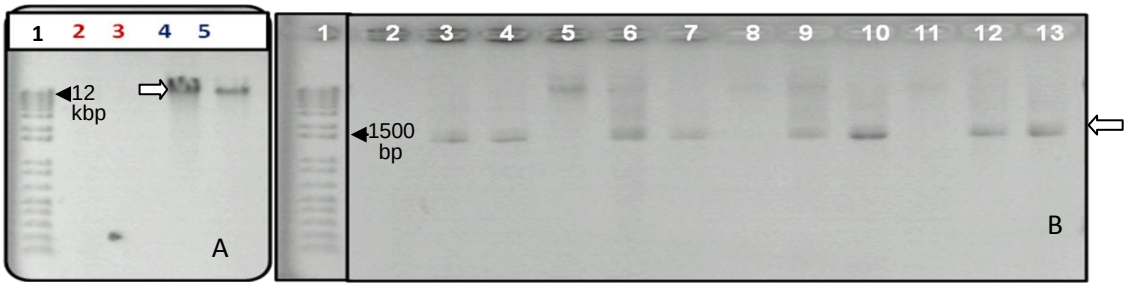


Fig. 1. Extracción de DNA metagenómico por método de Ceja *et al.* (2009) medificado (A) y amplificacón del gen 16s rRNA a partir de este extracto de DNA (B). ◄. Peso molecular; ⇦. DNA generado por extracción o PCR.

A) 1. Marcador de Peso Molecular (1 kb Ladder); 2. Extracto S4 (con 4 mL de solución lavado+purificación con Kit Power siol); 3. Extracto S6 (con 6 mL de solución lavado+purificación con Kit Power siol); 4. Extracto S8 (con 8 mL de solución lavado); 5. Extracto S10 (con 10 mL de solución lavado).

B) 1. Marcador de Peso molecular (100 bp Ladder); 2. Control blanco; 3, 7 y 11. S4, S4 (2µl DNA), S4 con ASB; 4 y 10. S6 y S6 con ASB; 5, 8, 9 y 12. S8, S8, S8 y S8 con ASB; 6 y 13. S10 y S10 con ASB.

Con base en los resultados de Fig. 1, podemos ver que la purificación con el Kit Power Soil podría bajar mucha la concentración de DNA en el extracto y no fue necesario. Con el volumen de solución de lavado entre 4 ml a 10 ml, se podría obtener las muestras puras de DNA adecuada para PCR. El efecto de ASB en la mezcla de reacción no fue necesario.

V.3 Conclusiones

Como conclusiones de esta parte, podemos decir que: 1) las chinampas muestreas fueron representativas y maduras, con suelos caracterizados por pH alcalino, alta salinidad, alta materiales húmicos, y ricos en nutrientes, las cuales son distintos que otros tipos de suelos; 2) el protocolo de Ceja *et al.* (2009) modificado por adición de pre-lavación fue buena para extraer DNA metagenómico adecuado para PCR, a partir de los suelos de las chinampas. Estos resultados ofrecen una base buena para estudios metagenómicos en futuro.

VI. ANÁLISIS DE DIAZOTROFOS

(Claudia Leonor Ibarra Sánchez, Tesis de maestría)

VI.1 Materiales y Métodos

Muestreo de suelo y caracterización de las muestras. Las mismas en el Enero del 2009 dos chinampas mencionadas arriba en la parte V (análisis metagenómico) se muestrearon. Además de las muestras de superficie (0-30 cm) y de profundo (30-60 cm), también se muestrearon los suelos rizosfericos de las plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) y acelga (*Beta vulgaris* L.) en la chinampa I; y de alfalfa (*Medicago sativa*), pasto (*Arrhenatherum elatius* (Linn.) Pressl) y lengua de vaca (*Rumex* sp.) en la chinampa II. Entonces se obtuvieron en total 9 muestras de suelo para este estudio. La caracterización fisicoquímica de suelo solo se realizaron para las muestras no rizosfericas (misma de parte V), porque la cantidad de suelo rizosférico no fue suficiente para eso.

Medición de actividad enzimática de nitrogenasa en suelo. Para evidenciar la presencia de los diazotrofos, se evaluó esa actividad por la técnica de reducción de acetileno (ARA). 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 detección de etileno por cromatografía de gases acoplado detector de ionización de flama.

Cuantificación de las bacterias fijadoras de nitrógeno (diazotrofos). Para cuantificar las BFN por el método del número más probable (NMP), **s**e realizaron diluciones decimales de las diferentes muestras de suelo 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 × 1.5 cm con 10 mL de medio Bridges. La siembra se realizó por triplicado de cada dilución. Se incubaron a 28°C durante 2 semanas; tomando como positivo el crecimiento (Bridges 1981). Mismas diluciones también se sembraron con alícuotas de 0.1 mL en las cajas de Petri con medio de CPS-EL (Caseina-Peptona-Sacarosa con extracto de levadura) en duplicado para cuantificar las bacetrias mesofilicas aerobias.

Aislamiento de los diazotrofos. Para aislar los diazotrofos de vida libre, se ocupó los medios Bridges, que no cuenta con fuente de nitrógeno (Bridges 1981), para sembrar por duplicado 100 μl de las diluciones de 10^{-3} a 10^{-5} por extensión en placa de los medios. Se incubaron a 28°C de 48 a 72 h en condiciones de aerobias y anaerobias utilizando GasPack. Se realizo el aislamiento tomando en cuenta la morfología colonial de las bacterias agrupándolas en morfotipos, tomando en cuenta las características de forma, color, tamaño, bordes, etc., se realizaron tres pases consecutivos con estría cruzada para verificar pureza y después se realizo una tinción de Gram para describir morfología microscópica (Vincent 1970). Finalmente cada morfotipo diferente purificado, se sembró con tres pases en tubos de 18×1.5 cm con 10 mL de caldo mineral y se incubaron a 28°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.

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 después 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 (Vincent 1970).

De las colonias obtenidas en el punto anterior se seleccionaron las morfologías coloniales predominantes, y se aislaron por estría cruzada en el mismo medio realizando 3 pases seriados para corroborar morfología colonial y pureza de cada aislado obtenido, posteriormente se realizó la conservación de las cepas en medio con 20% (w/v) de glicerol a -70°C para estudios posteriores.

Análisis de los genes 16S rRNA para identificar de los aislados. La identificación de los aislados se realizaron por análisis de secuenciación de los genes 16S rRNA generando por PCR (Wang *et al*. 2006). Se realizó la extracción del DNA total de los aislados siguiendo el protocolo del CTAB propuesto por Allers y Lichten (2000). Para evaluar la calidad del DNA extraído se realizó una electroforesis colocando 2 µl del DNA en un gel de agarosa al 1% (w/v) corrido a 70 volts durante 45 minutos utilizando un regulador de TBE 0.5×, después el gel fue teñido con 0.5 $\mu l ml^{-1}$ de bromuro de etidio

durante 5 min y se observó bajo luz UV (Sambroock *et al.* 2002). Los DNA se conservaron a -20°C.

Se amplificó el gen 16S rRNA de todos los aislados a partir de los DNAs 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) y su protocolo de PCR. 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 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.

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 árboles 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.

Amplificación de los genes *nif*H y *nif*D. Estos dos genes corresponden nitrogenase reductase y la subunidad α de dinitrogenasa, respectivamente. El extracto de DNA de cada aislado se usó como planco para amplificar estos dos genes con los iniciadores y condiciones-protocolos de reacción descritos en la Tabla 6.1. Los productos de PCR se detectaron mediante corrimiento electroforético en agarosa al 1% en regulador de TBE 0.5×, tomando como positivo la detección del amplificado del tamaño esperado.

Actividad de la nitrogenasa. Se realizó la prueba de reducción del acetileno (descrita anteriormente) para evaluar bioquímicamente actividad de nitrogenasa en los aislados fijadores de nitrógeno de vida libre (Bergue *et al.* 1991). Se utilizó como control negativo viales inoculados con *Escherichia coli* DH5α y como control positivo de utilizó la cepa de *Klebsiella variicola* 801.

Solubilización de fosfato inorgánico. Los aislados se sembraron por picadura en medio NBRIP el cual es un medio mineral que cuenta con fosfato tricálcico como fuente de fosforo, se incubaron a 28°C 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: 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).

Tabla 6.1 Oligonucleotidos usados para amplificar los genes *ni*H y *nifD*

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

Producción de ácido índol acético (AIA). Se inoculó medio King B con triptófano con los aislados a una concentración de 0.5 g L^{-1} y se incubaron a 28°C durante 48 h. Posteriormente se centrifugó el cultivo 5 min a 10000 rpm y 1 mL de la sobrenadante se le agregaron en 2 mL del reactivo de Salkowsky en base de H_2SO_4. Se determinó la absorbencia a 540 nm, y se estimó la concentración de indol en el cultivo con la curva de

calibración cuyas concentraciones de IAA fueron: 0, 2,4,8,10,15,20,30 µg mL^{-1} (Glickmann y Dessaux 1994).

Bioensayo de impacto en plantas. Para este análisis, se seleccionaron los aislados con mejor eficiencia de producción de IAA, fijación de nitrógeno y solubilización de fosfato. Las bacterias se incubaron en caldo PY a 28ºC con agitación durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó el cultivo y se lavó las células con solución salina isotónica. Las células lavadas se ajustó con la misma solución de lavado a una densidad óptica de 0.8 a 600nm (Biswas *et al.* 2000) para usar como inoculante.

Las semillas desinfectadas y germinadas de alfalfa y trigo con métodos reportados (Wang et al. 2006) se sembraron en macetas con vermiculita (Wang *et al*. 2006) y se inocularon con 500µL del inoculante previamente preparado. La vermiculita colocada en la maceta fue lavada, ajustada a un pH cercano a 7, esterilizada 3 veces en autoclave a 121ºC durante 1 hora, y humeada con solución nutriente sin nitrógeno (Vincent 1970) hasta su capacidad de retención (Vincent 1970). Las plántulas se incubaron en condiciones de invernadero con temperatura y luz solar natural. Como control positivo se usaran plántulas regadas con solución nutritiva completa, el control negativo fueron plántulas sin inocular.

Se mantuvieron las plantas en condiciones de invernadero durante 1 mes después del cual se estimó el impacto de las bacterias sobre el crecimiento de las plantas (Asghar *et al.* 2002). Para observación de las plantas y análisis estadístico, las variables a evaluar serán: longitud de las raíces, longitud de la parte aérea y peso seco. Los datos obtenidos serán analizados con ANOVA (Chanway y Nelson 1990).

VI.2 Resultado y Discusión

Actividad de nitrogenasa y cuantificación de los diazotrofos en suelo

La ARA y la abundancia de las bacterias fijadoras de nitrógeno en las muestras de suelo se presentan en la Tabla 6.2. En esta tabla se puede observar que existen diazotrofos con la actividad de nitrogenasa en totas muestras. La ARA se varía entre 0.054 y 67 nmoles de etileno h^{-1} g^{-1} de suelo y el NMP de diazotrofos se varían entre 1.4×10^5 y 1.7×10^6 ($>1.4\times10^6$). Parece que las plantas afectan la actividad de nitrógenasa y abundancia de diazotrofos en suelo, porque dos muestras de rizosfera de alfalfa tienen muy baja

actividad (0.054 y 0.20 nmoles de etileno h^{-1} g^{-1} de suelo); la más alta actividad (67 nmoles de etileno h^{-1} g^{-1} de suelo) y alta abundancia de diazotrofos fueron encontrado en rizosfera de acelga, lo cual demuestra que hay un efecto diferencial debido a los exudados radicales de cada planta. Por otro lado en suelo no rizosferico se detecto mayor actividad en suelo profundo de la chinampa II (chII Pr), pero esa fue reversa en chinampa I. La abundancia de diazotrofos (10^5) fueron menor en suelo no rizosferico que en rizosfera, existe un mayor número de diazotrofos en suelos profundos comparados con suelos superficiales. Estos resultados demostraron la posibilidad del uso las fijadoras de nitrógeno para mejorar el crecimiento de las plantas, aunque en suelos ricos de nutrientes.

Tabla 6.2 Actividad de nitrogenasa en suelo total

No. de muestra	Muestra de suelo	Actividad de nitrogenasa*	Abundancia de diazotrofos#
Chinampa 1			
I	Superficie (0-30cm)	25	$1.4x\ 10^5$
II	Profundo (30-60cm)	1.29	$>1.9x\ 10^5$
III	Rizosfera-Alfalfa	0.054	$1.4x\ 10^6$
IV	Rizosfera-Acelga	67	$>1.4x\ 10^6$
Chinampa 2			
V	Superficie (0-30cm)	2.73	$1.7x\ 10^5$
VI	Profundo (30-60cm)	39.54	$>2.1x\ 10^5$
VII	Rizosfera-Alfalfa	0.20	$1.7x\ 10^5$
VIII	Rizosfera-Lengua de Vaca	22.18	$3.31x\ 10^5$
IX	Rizosfera-Pasto	19.03	$1.7x\ 10^6$
Testigo positivo	*Klebsiella variicola* 801§	170.54	

*. nmoles de etileno h^{-1} g^{-1} de suelo; #. NMP g^{-1} de suelo base seca; §. Cepa de referencia que sirve como testigo positivo

La diferencia de la abundancia de diazotrofos en diferentes muestras es debida 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). Nuestros resultados coinciden con los reportes previos de van Berkum (1980) que reporta valores de 8.3×10^5 y 1.6×10^4 por gramo de suelo en la rizosfera de *Sorghum vulgare* y *Branchia mutica.* En el caso de los suelos no rizosfericos se encontró mayor cantidad de diazotrofos en los suelos profundo 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 está comunidad puede desarrollarse mejor en esté nivel lo cual coincide también con los reportes de Izquierdo y Nusslein (2006), que esta comunidad se distribuye a través del suelo de acuerdo con los requerimientos nutricionales y ambientales (oxigeno y humedad etc.).

Anteriormente, Hsu y Buckley (2009) reportaron actividad de nitrogenasa de aprox. 300 nmol de etileno h^{-1} g^{-1} de suelo en sistemas agrícolas con técnicas de labranza convencionales, pero en nuestro caso el valor fue muy bajo, aunque la abundancia de los diazotrofos fue similar que en otros suelos (van Berkum 1980). Estos resultados demostraron que existen diazotrofos en el suelo las chinampas, pero no son activas de fijar nitrógeno, debido la inhibición de la nitrogenasa por pH alcalinos (Baldani *et al*. 1986; Kuhner *et al.* 2000; Nelson y Mele 2006) y alta concentración de nitrógeno total (Tabla 5.1) del suelo. Relacionado a estas características de suelo la mayoría de alfalfa no forma nódulos.

Aislamiento y caracterización de los diazotrofos

Totalmente, se obtuvieron 55 aislados, incluyendo 37 aislados aerobios y 8 anaerobios a partir de muestras de suelo en medio de cultivo sin nitrógeno, y 10 aerobios a partir de los nódulos de alfalfa en medio de PY. De manera general la mayoría de los aislados rizosfericos presentan morfologías grandes y mucoides mientras que en suelo no rizosferico 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 en suelo no rizosferico se puede relacionar con alto contenido de materia orgánica, sales, y pH alcalino que permiten el óptimo desarrollo de los actinomicetos (Ferrera 1995). En rizosfera, estas características se modifican, que permite el desarrollo de otras bacterias.

Con base en el análisis del gen 16S rRNA (Tabla 6.3 y Figura 6.1), 17 géneros en las divisiones de Proteobacteria (10 géneros), Firmicutes (3 géneros) y Actinobacteria (4 géneros) se identificaron dentro los aislados. Además las bacteria anaeróbica aisladas no tienen alta similitud con ninguna bacteria conocida y se denominó como no identificada. Entre estas bacterias, los 10 aislados de los nódulos se identificaron como *Sinorhizobium meliloti*, una bacteria conocida como simbionte de esa planta. Entre los aislados de suelos, *Pseudomonas* y *Stenotrotrophomonas* fueron más abundantes con 8 y 7 aislados, respectivamente; mientras, otros géneros se presentaron con 5 aislados (*Rhizobium*), 3 (*Alcaligenes, Serratia, Bacillus, Streptomyces*) 2 (*Paenibacillus*) o uno solo (*Aminobacter, Achromobacter, Azoarcus, Tetrathiobacter, Lysinibacillus, Rhodococcus, Arthrobacter*, *Microbacterium*).

El género principal aislado tanto en suelo rizosferico como no rizosferico fue *Stenotrophomonas,* el cual ha sido reportado en suelos agrícolas de Brasil (Reinhardt *et al.* 2008), en suelo forestal (Liba *et al.* 2006), y como endófito de camote (Kahn y Doty 2009). Estos autores coinciden en que el género *Stenotrophomona* tiene la capacidad de fijar nitrógeno.

Tabla 6.3 Identificación molecular de algunas cepas aisladas

Aislado	Relación filogenética	Detección de		Chinampa	Muestra de suelo
		***nif*H**	***nif*D**		
α-Proteobacteria					
N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, N9, N11	*Sinorhizobium melilotli* o *S. medicae*	+	+	1	Nódulos
AI3, AI9, IPr-3	*Rhizobium* sp.			1	II, III
AI2A, AIICN3B	*Rhizobium radiobacter*	-	-	1 y 2	III, VII
IPr-6	*Aminobacter* sp.	-	-	1	II
β-proteobacteria					
AIB	*Achromobacter xyloxidans*	-	-	1	III
Ac2, Ac6, L4A	*Alcaligenes faecalis*	+	+	1 y 2	IV, VIII
γ-Proteobacteria					
L7	*Azoarcus* sp.				VIII

AII1	*Ps. rhizophaerae*	-	-	2	VII
AIICN5	*Ps. pseudoalcaligenes*	-	-	2	VII
P1	*Ps putida*	-	-	2	**IX**
P8, P6	*Ps. brasicacearum*			2	**IX**
P10A	*Ps. hibiscicola*	+	-	2	IX
IS9	*Ps. stutzeri*			1	I
IIPr11Z	*Ps. stutzeri*	+	-	2	VI
L2A, L3, L6	*Serratia plymuthica*	+	-	2	VIII
P9, P10B, AICCA3	*Stenotrophomonas maltophilia*			1 y 2	III, IX
AII9B, L2B, L10, IIPrCC	*Ste. maltophilia*	+	-	2	VI, VII, VIII
IIPr-11C	*Tetrathiobacter kashmirensis*	-	-	2	VI
Firmicutes					
Ac8A, Ac10A	*Bacillus megatherium*			1	IV
AII5A	*B. pumilus*			2	VII
P11, IIS12	*Paenibacillus pabuli*			2	V, IX
IPr-9	*Lysinibacillus sphaericus*			1	II
Actinobacteria					
L9A	*Rhodococcus bakonurensis*			2	VIII
P7	*Arthrobacter*			2	IX
IS2, IS8, IS10	*Streptomyces alvidoflavus*			1	I
IS4B	*Microbacterium profundi*			1	I
No identificada					
AcA2*		-	-	1	IV
IISA*		-	-	2	VI

*. Bacterias anaerobias.

#. I a IV fueron de chinampa 1: I, suelo superficial (0-30 cm); II, suelo profundo (30-60 cm); III, suelo rizosferico de alfalfa; IV, suelo rizosferico de acelga. V a IX fueron de chinampa II: V, suelo superficial (0-30 cm); VI, suelo profundo (30-60 cm); VII, suelo rizosferico de alfalfa; VIII, suelo rizosferico de lengua de vaca; IX. Suelo rizosferico de pasto.

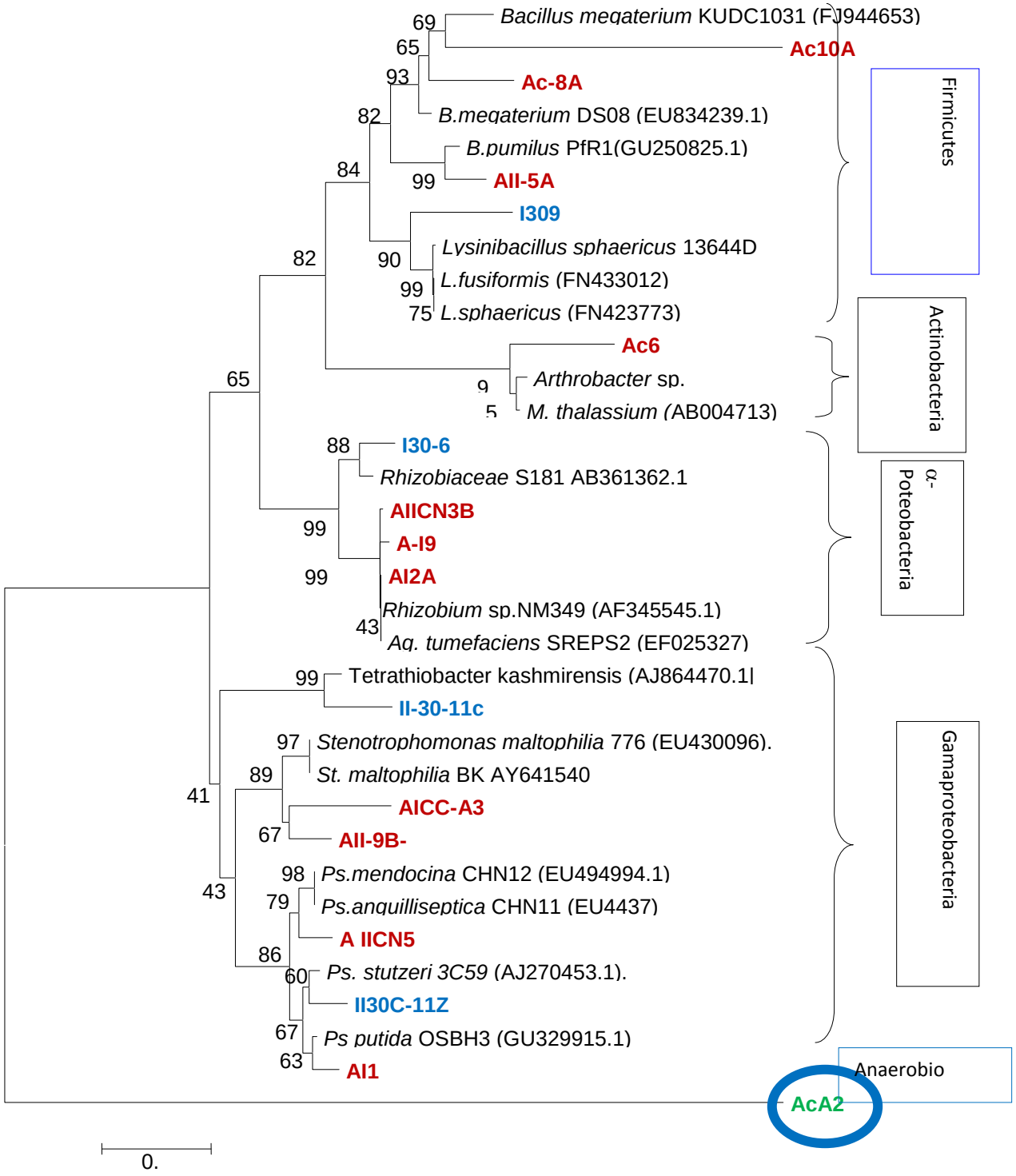


Figura 5.1. Filograma obtenido de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de las cepas aisladas en medio para fijadoras de nitrógeno. Análisis basado en los datos de las secuencias parciales del gen 16S rRNA con 1000 aleoterizaciones tipo "Bootstrap" por el método de agrupamiento "Neighbor Joining" usando el índice de distancia Kimura 2 parámetros. La barra indica el número de cambios por secuencia.

El segundo género más importante fue el *Pseudomonas* el cual también fue reportado por Kahn y Doty (2009) de igual manera, y su principal aporte es la producción de fitohormonas. Por otro lado en igual importancia encontramos bacterias pertenecientes al grupo de los rhizobiales los cuales estuvieron asociados al suelo rizosferico de alfalfa. Las secuencias obtenidas 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 fosfosoen rizosfera de soya.

Los géneros de Firmicutes fueron aislados de suelo rizosférico tanto de acelga como de la alfalfa, estos están principalmente asociados a *Bacillus megaterium* y clonas no cultivadas de análisis suelos agrícolas de acuerdo con el reporte de Ding *et al.* (2004). Algunos miembros de este grupo presentan la capacidad de fijar nitrógeno.

El grupo del actinomiceto fue asociado a *Streptomyces.* Trabajos previos de Ribbe *et al*. (1997) y Gadkari *et al.* (1992) reportaron que este género tiene la capacidad de fijar nitrógeno ya que cuenta con el complejo enzimático de nitrogenasa alternativo dependiente de vanadio.

Finalmente, el aislamiento de *S. meliloti* a partir de los nódulos de alfalfa fue interesante. En general, la alta concentración de nitrógeno total inhibe la nodulación de las leguminosas. Por ese, la mayoría de las alfalfas creciendo en las chinampas no tenían los nódulos. La presencia de nódulos en la única planta de alfalfa en este estudio podría explicar por razones: 1) en algunas zonas de la chinampa, tiene baja concentración de nitrógeno total y la planta que creció allá necesita formar nódulos para fijar nitrógeno; y 2) algunas cepas de *S. meliloti* tiene la capacidad a nodular y fijar nitrógeno en suelo con alta contenido de nitrógeno total. Si es la secundo caso, estas cepas pueden ser candidatos para ser inoculo, por eso es necesario hacer más estudio sobre estas cepas de rizobios.

Determinación de actividad de nitrogenasa y detección de los genes *nifD* y *nifH*. Aunque todos aislados se obtuvieron en el medio sin nitrógeno, la actividad de nitrogenasa solamente se detectó en dos aislados anaerobios no identificados, y no podría detectar la actividad de nitrógenasa en otros aislados por este método. La actividad de testigo positivo *Klebsiella varicola* 801 fue 177.64±0.85 nMoles etileno h^{-1} $tubo^{-1}$. El

aislado AcA2 presentó la actividad muy baja (0.06 ±0.14 nMoles etileno h^{-1} $tubo^{-1}$) y el aislado IISA presentó la actividad 19.81±0.14 nMoles etileno h^{-1} $tubo^{-1}$; sin embargo a estos no se les logro amplificar mediante PCR los genes *nif*H o *nif*D.

En amplificación de los genes *nifH* y *nifD*, se amplificaron ambos genes en los aislados de *Sinorhizobium meliloti* de los nódulos y de tres aislados de *Alcaligenes faecalis* L4A, Ac2 y Ac6 provenientes de la rizosféra de *Rumex* sp. y de acelga (Tabla 6.3), mientras solo *nifH* se detectó en los aislados *Ps. hibiscicola* P10A, *Ps. stutzeri* IS9, *Serratia plymuthica* L2A, L3, L6, y *Ste. maltophilia* AII9B, L2B, L10, IIPrCC.

Considerando que estos resultados no fueron insistentes en varios casos, los aislados que no prestaron los genes de *nif* o no prestaron actividad de nitrogenasa se podrían referir la presencia otro tipo de los genes o requiere otras condiciones para expresar su actividad. En los trabajos de Izquierdo & Nüsslein (2006), Gadkari *et al.* (1992), Ding *et al.* (2004), y Khan & Doty (2009), resultados similares se obtuvieron y para asegurar la capacidad de fijar nitrógeno de los microorganismo se realizaron hibridaciones DNA-DNA que permitan detectar alguna parte del complejo nitrogenasa de manera exacta.

Prueba de solubilización de fosfato y producción de AIA

En esta análisis, se observaron que una mayor cantidad de aislados rizosfericos tienen la capacidad de solubilizar fosfato comparado con los aislados de suelo no rizosferico, mostrándose el valor más alto en microorganismos aislados de la rizosfera de Pasto de Chinampa II; sin embargo a pesar de que diversos microorganismos presentaban esta capacidad, pocos obtenían índices de solubilización mayores a 1 (Tabla 6.4). También, la producción de índoles con actividad de fitohormona (IAA) se detectó en algunos aislados (Tabla 6.4).

Con base en el criterio de Kumar y Narula (1999), los resultados nos indican que los aislados obtenidos no son importantes solubilizadores de fosfato de manera aislada, sin embargo pudiera ser que en conjunto toda la comunidad microbiana pudiera participar aportando pequeñas cantidades de fósforo al suelo. También se evaluó *in vitro* la capacidad de producir índoles con actividad de fitohormona de acuerdo al protocolo propuesto por Glickmann & Dessaux (1994). Se puede ver que los aislados rizosfericos producen mayor cantidad de fitohormona que los aislados no rizosfericos.

Evaluación del efecto de diazotrofos en plantas de alfalfa y trigo

Con base a la caracterización fenotípica previamente realizada se realizaron 2 bioensayos, uno para evaluar el efecto de los aislados productores de fitohormonas sobre el crecimiento de las plantas de interés agrícola y otro para evaluar el efecto de los aislados fijadores de nitrógeno. En la Tabla 6.5 se muestra el resumen de los análisis de ANOVA y prueba de Tukey con base en los datos de plantas de alfalfa inoculadas con bacteria productora de IAA. En esta tabla se señalan con letras mayúsculas diferentes los tratamientos q presentan diferencia significativa entre sí.

Tabla 6.4 Bacterias aislados con capacidad de PGPR

Muestra de suelo	**No. del aislado**	**Identificación del aislado**	**Producción de IAA** (µg ml^{-1})	**Ínsice de solubilización de PO_4^{3-}**
No rizosferico superficial	IS2, IS5, IIS-9, IIS-10	*Streptomyces* spp.	Negativo	Negativo
No rizosferico profundo	IIPr-11A,	*Stenotrophomonas* no cultivada	4	Negativo
	A I1, AI4, AI9,	*Pseudomonas*	11	1
Rizosferico de Alfalfa	AI 3,	*Rhizobium* sp.	1.18	Negativo
	AIICN3	*Agrobacterium larrymoorei*	3	Negativo
Rizosferico de Acelga	Ac8A	*Pseudomonas hibiscicula*	1.89	3
	Ac2	*Bacillus flexus*	2.4	4
Rizosferico de pasto	P10b	*Stenotrophomonas acidaminiphila*	2	1.4
Rizosferico de	L2A	*Serratia proteomaculans*	2.5	1.5
Lengua de Vaca	L7, L6, L10	*Stenotrophomonas*	3	1

En la Tabla 6.6 se puede ver el resumen de los resultados de los análisis de ANOVA, en esta se puede ver que no existe diferencia significativa entre los tratamientos y las diferentes biomasas evaluadas de trigo, sin embargo se observa una diferencia en los

resultados obtenidos para longitud, y para la longitud de raíz el tratamiento más efectivo fue el inoculado con AI9 (T4).

Tabla 6.5 Resultados de ANOVA y prueba de Tukey* con base en datos de inoculación de alfalfa con bacteria productora de IAA

Tratamiento**	Biomasa total seco (mg)	Longitud raíz (cm)	Longitud parte aérea (cm)	Longitud total (cm)	Número de hojas
T1 (control positivo)	8.97^{B}	11.07^{A}	9.34^{AB}	20.68^{A}	13.90^{A}
T2 (control blanco)	7.75^{B}	8.22^{B}	7.25^{C}	15.46^{B}	13.75^{A}
T3 (inoculo AI 3)	12.07^{AB}	11.95^{A}	10.82^{A}	22.02^{A}	15.85^{A}
T4 (inoculo AI 9)	15.92^{A}	9.05^{B}	8.94^{BC}	17.70^{B}	15.30^{A}

*. Diferentes letras mayúsculas se señalan las diferencias significativas entre los tratamientos.

**. T1=Tratamiento inoculado con *Azospirillum;* T2=Plantas sin inoculo; T3 = plantas inoculadas con el aislado AI3 proveniente de la rizosfera de alfalfa; T4= Plantas inoculadas con el aislado AI9.

En la Tabla 6.6 se puede ver el resumen de los resultados de los análisis de ANOVA, en esta se puede ver que no existe diferencia significativa entre los tratamientos y las diferentes biomasas evaluadas de trigo, sin embargo se observa una diferencia en los resultados obtenidos para longitud, y para la longitud de raíz el tratamiento más efectivo fue el inoculado con AI9 (T4).

Tabla 6.6 Resumen de los resultados de ANOVA y prueba de Tukey la evaluación de fitohormonas en 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^{A}	0.1623^{A}	0.0466^{A}	18.0^{BC}	36.9^{B}	53.6^{B}	6.7333^{A}
T2	0.1899^{A}	0.1427^{A}	0.0469^{A}	16.2^{C}	$38.6B^{A}$	54.7^{B}	6.3667^{A}
T3	0.2063^{A}	0.1502^{A}	0.0560^{A}	19.6^{BA}	40.5^{A}	59.5^{A}	6.5926^{A}
T4	0.2024^{A}	0.1520^{A}	0.0548^{A}	20.8^{A}	39.7^{A}	58.5^{A}	6.4828^{A}

*. En letras mayúsculas se señalan las diferencias significativas entre los tratamientos

**. T1=Tratamiento inoculado con *Azospirillum;* T2=Plantas sin inoculo; T3 = plantas inoculadas con el aislado AI3 proveniente de la rizosfera de alfalfa; T4= Plantas inoculadas con el aislado AI9.

En la Tabla 6.7 se muestra el resumen de los resultados de ANOVA y los grupos formados por la prueba de Tukey, mostrando la diferencia significativa entre los

tratamientos para evaluar el aporte de los diazotrofos sobre crecimiento de alfalfa. Se puede ver que los problemas no hay diferencia significativa con el control negativo al evaluar la biomasa total seca. Analizando las variaciones de longitud de raíz se observa que el tratamiento T4 (IISA sin nitrógeno) 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 (Tabla 6.8) las variables de longitud de tallo y biomasa seca no permiten diferenciar a ninguno de los tratamientos, y los mejores tratamientos resultados en longitud de raíz fueron T3 (IISA completa) y T9 (AcJ completa).

Tabla 6.7 Resumen de los resultados de ANOVA y prueba de Tukey para evaluar el aporte de fijación de nitrógeno en plantas de alfalfa

Tratamiento	Biomasa total seca (g)	Longitud raíz (cm)	Longitud parte aérea (cm)	Longitud total (cm)	Número de Hojas
T1	0.0307^{A}	13.6^{A}	13.5^{A}	26.9^{A}	14.8^{BC}
T2	0.0198^{BCDE}	10.5^{AB}	11.1^{BDAC}	21.4^{BDC}	14.9^{BC}
T3	0.0184^{DEC}	12.0^{AB}	12.3^{BAC}	23.3^{BAC}	16.6^{ABC}
T4	0.0136^{E}	9.8^{B}	8.6^{D}	18.4^{D}	13.7^{C}
T5	0.0294^{BA}	13.1^{BA}	12.9^{BA}	25.6^{BA}	19.3^{A}
T6	0.0145^{DE}	11.5^{BA}	9.9^{DC}	19.9^{DC}	15.7^{BC}
T7	0.0188^{BDEC}	11.2^{BA}	10.8^{BDC}	21.4^{BDC}	15.5^{BC}
T8	0.0269^{BAC}	11.4^{BA}	13.1^{BA}	24.6^{BA}	16.1^{ABC}
T9	0.0247^{BDAC}	10.8^{BA}	11.7^{BAC}	22.2^{BDC}	15.6^{BC}
T10	0.0260^{BAC}	11.1^{BA}	13.4^{A}	24.5^{BA}	17.1^{AB}

*. En letras mayúsculas se señalan las diferencias significativas entre los tratamientos.

**. T1: Planta regadas 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.

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.

Tabla 6.8. Resultados de ANOVA y prueba de Tukey para evaluar el efecto de diazotrofo en trigo*

Tratamiento	BTS[a] (g)	BAS[b] (g)	BRS[c] (g)	LR[d] (cm)	LA[e] (cm)	LT[f] (cm)	Hojas
T1	0.2471^{A}	0.1921^{A}	0.0561^{BA}	18.02	45.52^{BA}	63.95	5.45
T2	0.1706^{CD}	0.1223^{BC}	0.0466^{AB}	17.25	44.85^{BA}	61.25	5.10
T3	0.1598^{CD}	0.1233^{BC}	0.0405^{B}	17.2	43.55^{B}	61.35	5.25
T4	0.1812^{CBD}	0.1761^{BA}	0.0429^{BA}	18.5	44.12^{BA}	62.9	5.50
T5	0.1982^{CB}	0.1538^{BAC}	0.0417^{BA}	15.55	47.95^{BA}	62.9	5.70
T6	0.2010^{CB}	0.1605^{BAC}	0.0455^{BA}	16.65	44.95^{BA}	61.325	5.45
T7	0.2010^{CB}	0.1605^{BAC}	0.0455^{BA}	16.65	44.95^{BA}	61.325	5.45
T8	0.2185^{BA}	0.1592^{BAC}	0.0585^{A}	15.6	48.15^{A}	63.85	5.4
T9	0.1523^{D}	0.1121^{C}	0.0413^{BA}	17.75	46.20^{BA}	63.6	5.4
T10	0.1700^{CD}	0.1150^{C}	0.0556^{BA}	16.15	44.75^{BA}	61.5	5.15

T1: Planta regadas 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 evaluación del efecto del inoculo fijador de nitrógeno sobre el crecimiento vegetal de trigo y alfalfa no se observa diferencia significativa entre los tratamientos, quizá debido nuevamente a las características de los exudados radicales y la interacción planta-microorganismo que no pudo establecerse apropiadamente.

Con base a esta prueba se montó un bioensayo para evaluar el impacto del inoculo productor de fitohormona en el desarrollo de dos tipo de planta (trigo y alfalfa). Se seleccionaron 2 cepas AI3 y AI9 ambas aisladas de rizosfera de alfalfa, debido a que además de producir fitohormona no fueron identificados como agentes patógenos para estas plantas tal es el caso del aislado AIICN3 el cual produce mayo cantidad de fitohormona pero es identificado como *Agrobacterium* la cual podría ser fitopatógena.

VI.3 Conclusiones

- En general se detecto baja actividad de nitrogenasa en suelo 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 en vida libre y simbiosis. Mientras, existen algunos aislados candidatos a género o especie nueva.
- Debido a las características de fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas en algunos aislados pueden ser usados como PGPR.

VII. ANÁLISIS DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO

(Edson Augusto Romero Salas, Tesis de maestría**)**

VII. 1 Materiales y Métodos

Muestreo de suelo. Las muestras de suelo se tomaron en agosto de 2009 en las dos chinampas mencionadas en la parte V y en otra más sin cultivos. La estrategia de muestreo y la caracterización de las muestras fueron igual que se mencionó anteriormente el análisis de DNA metagenómico (parte V). Totalmente, se obtuvieron 6 muestras de suelo no rizosferico (2 profundidades $\times$ 3 chinampas) y 2 rizosfericas de Alfalfa en chinampa 1 y de Cebada en chinampa 2.

Cuantificación y aislamiento de las bacterias solubilizadoras de fosfato. Las diluciones decimal hasta 10^{-6} de suelo se prepararon igual que en análisis de diazotrofos. Se sembraron alícuotas de 0.1mL por duplicado de las 3 últimas diluciones por dispersión con varilla acodada en placas Petri con medio de cultivo Pikovskaya con fosfato tricalcico para solubilizadoras de fosfato inorgánico (Ponmuragan y Gopi 2006; Suliasih, 2005). Se incubaron a 28°C durante 7 días. Se consideraron como solubilizadoras de fosfato aquellas colonias que presentaron halo de solubilización alrededor de la colonia. Se contaron las UFC con un contador de colonias y se calculó el promedio de las UFC a gramos de suelo seco. La purificación y reservación de los aislados fueron igual que los diazotrofos. Las bacterias mesofilicas aerobias también se cuentearon en medio PY.

Identificación de los aislados por sequenciación del gen 16S rRNA. La extracción de DNA de los aislados, amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA, análisis filogenético e identificación de las bacterias por las secuencias fueron igual que la identificación de las fijadoras de nitrógeno.

Eficiencia de solubilización y producción de AIA. La eficiencia de solubilizar fosfato y la producción de AIA se determinaron igual que la caracterización de las fijadoras de nitrógeno. También se determinó la eficiencia para solubilizar fosfato orgánico, fitato de sodio, (NaPhy) con método de Reale et al. (2007).

Detección de producción de ácidos orgánicos. Esto análisis se realizó a las bacterias solubilizadoras, debido que la producción de ácidos orgánicos es uno de los mecanismos de la solubilización de fosfato. Se inocularon 10mL de caldo Pikovskaya y se incubaron en

agitación por 48h a 28°C. Posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm se elimino el paquete celular y se tomó el sobrenadante para determinar pH realizando la medición con un potenciómetro (Irnayuli *et al*. 2007; Ponmuragan y Gopi 2006).

Detección de producción de sideróforos. Como otro mecanismo de solubilización de fosfato, **s**e realizó inoculando 10mL de medio Grima-Allen, que se incubó en agitación por 48h a 28°C, posteriormente se eliminó el paquete celular por filtración y se adicionaron 1-5mL de $FeCl_3$ al 2% por 1mL de filtrado. Se formó un complejo rojizo que se lee de 420 a 450nm como control negativo se utilizará medio sin inocular (Baakza *et al*. 2004; Popavath *et al*. 2007).

Bioensayo para determinar el impacto de las solubilizadoras de fosfato en plantas. Similar el bioensayo para las fijadoras de nitrógeno, pero se usó la solución nutritiva con nitrógeno y se cambió la forma de fosfato. Se inocularon los aislados con mejor eficiencia de solubilización de fosfato en plántulas de trigo y alfalfa (tres repeticiones por tratamiento); como control positivo se usaran plántulas regadas con solución nutritiva completa, el control negativo fueron plántulas sin inocular y con fuente de fosforo no asimilable (fosfato tricalcico adicionado en el soporte); los problemas fueron plántulas inoculadas con los aislados previamente seleccionados y regados con solución nutritiva en soporte conteniendo fosfato insoluble. El diseño experimenta de este bioensayo se presenta en la Figura 7.1.

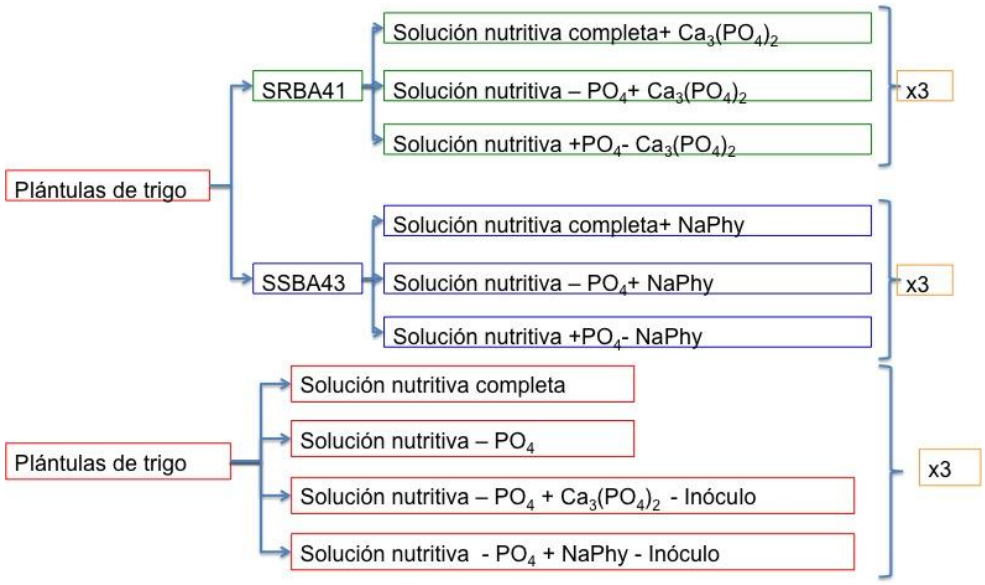


Figura. 7.1 Diseño experimental de bioensayo para aprobar el impacto de las bacterias sobre el crecimiento de plantas.

VII. 2 Resultados y Discusión

Características fisicoquímicas de los suelos

Este análisis demostró que los suelos cumplen con las características establecidas para el suelo fértil (Tabla 7.1), observándose una ligera variación en los parámetros fisicoquímicos evaluados.

Tabla 7.1. Características fisicoquímico del suelo de tres chinampas.

Determinación	Muestra de suelo*					
	Ch1 S	Ch1 Pr	Ch2 S	Ch2 Pr	Ch3 S	Ch3 Pr
Textura	Franco arcilloso arenoso					
pH	8.6	8.8	8.7	8.5	8.7	8.5
Humedad (H%)	48	46	50	48	42	40
Materia orgánica (%)	7.5	4.6	7.5	6.4	6.5	6.4

*Ch1, Ch2 y Ch3 representan las tres chinampas; S = suelo superficial, Pr = suelo profundo.

Las características fisicoquímicas del suelo están íntimamente relacionadas con la diversidad y la actividad microbiana; en este caso el conjunto de parámetros como pH, materia orgánica y la textura, tienen un efecto importante sobre la disponbilidad del fósforo, tanto para los microorganismos como para las plantas (Afzal y Asghari, 2008). Debido a la naturaleza de este suelo, el fósforo puede encontrarse en su forma orgánica no asimilable (Reddy *et al.,* 1998) ya que en ambientes acuaticos en vía de eutroficación existe una mayor proporción de fosfatos orgánicos según los reportes de Wu y Zhou (2005). Además, el tipo de cultivo, las rotaciones y las condiciones ambientales tienen un efecto sobre las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera (Suliasih, 2005).

Cuantificación y aislamiento de las bacterias solubilizadoras de fosfato

Los resultados de cuantificación se muestran en la Tabla 7.2. En la actualidad la caracterización fenotípica y genotípica de las comunidades microbianas rizosféricas muestra que la rizosfera de diferentes cultivos ejerce presión de selección sobre dichas comunidades ocasionando variaciones en el grado de biofertilizacion (Ponmuragan y Gopi, 2006; Povavath *et al*., 2008). En el caso particular del suelo de chinampa la cuenta directa de bacterias solubilizadoras de fosfato se encuentra en el orden de 10^9 en suelo

rizosférico y de 10^8 en suelo no rizosférico (Tabla 7.2). Misma tendencia también se encontraron en proporción de las bacterias solubilizadoras comparando con bacterias totales (Figura 7.1), porque 40% a 42% de las bacterias en rizosfera fueron solubilizadoras de fosfato, pero este valor fue solo 14% en suelo no rizosferico. Nuestros valores de las abundancias de estas bacterias fueron más altos que los reportados, que en suelos forestales y agrícolas se reportan órdenes de 10^6 a 10^8 en suelos rizosféricos y de 10^3 a 10^6 para suelos no rizosféricos (Ponmuragan y Gopi, 2006; Gulati *et al*., 2008). La alta abundancia de bacterias solubilizadoras de fosfato en el suelo de la chinampa mostró el alto potencial de transformar los fosfatos a la forma asimilable para ayudar al crecimiento de las plantas cultivadas en estos suelos

Tabla 7.2 Cuenta directa de microorganismos viables en medio Pikovskaya en UFC solubilizadoras de fosfato por gramo de suelo seco.

Chinampa	Suelo Rizosférico*	Suelo Superficial	Suelo Profundo
Ch1	$2.6x10^9$	$6x10^8$	$1.5x10^8$
Ch2	$1x10^9$	$5x10^8$	$1.4x10^8$
Ch3		$3x10^8$	$1x10^8$

*. de Alfalfa en chinampa 1 y de Cebada en chinampa 2.

Anteriormente, se observa una disminución en la densidad poblacional a medida que se aumenta la distancia de la zona de influencia radical lo que coincide con el trabajo de Poonguzali *et al*. (2006). Nuestros resultados de abundancia evidenciaron que el crecimiento de plantas puede aumentar la abundancia y diversidad de las bacterias solubilizadoras de fosfato en el suelo, aunque éste sea rico en fosfato total, de acuerdo con Suliasih (2005).

Finalmente se obtuvieron 42 diferentes aislados capaces de utilizar el fosfato tricalcico como única fuente de fósforo (Tabla 7.3). Entre estos aislados, 24% fueron de cada muestra rizosferica, y 16%, 17% y 19% fueron de cada muestra de suelo no rizosferico en 0-30 cm. En el caso de suelos profundos (30 a 60 cm), se obtuvieron algunos aislados, pero después de tres veces de sembrar en el mismo medio para purificarse, todos no podrían crecer por alguno razón no conocido. Estos datos se indicaron que en suelo rizosferico las bacterias solubilizadoras fueron más diversas que en no rizosferico, porque estos aislados fueron seleccionados con base en su morfología colonial.

Tabla 7.3 Aislados bacterianos, sus eficiencias de solubilizacion de fosfatos y variación de pH en su cultivo

Cepa	Eficiencia (%)		pH#	Cepa	Eficiencia (%)		pH#
	$Ca_3(PO_4)_2$	NaPhy*			$Ca_3(PO_4)_2$	NaPhy	
SRAL42.1	150.00	NC§	4.27	**SRBA42.2**	0.00	NC	4.05
SRAL42.2	65.00	NC	4.51	**SRBA44**	130.56	NC	3.79
SRAL42.3	0.00	0.00	3.80	**SRBA45**	100.00	NC	3.69
SRAL43.2	114.00	55.56	4.27	**SRBA52**	146.51	NC	3.47
SRAL43.1	60.61	NC	4.30	**SRBA53**	69.7	75.00	4.44
SRAL51	44.58	283.33	3.87	**SRBA61**	10.00	40.00	3.41
SRAL51.1	58.90	66.67	3.81	**SRBA61.2**	0.00	50.00	2.86
SRAL61.1	69.77	130.43	4.07	**SSBA41**	129.00	NC	3.87
SRAL61.2	100.00	43.48	42.5	**SSBA41.1**	90.00	230.77	3.40
SRAL62	90.00	260.00	4.26	**SSBA43**	132.56	769.57	4.33
SSAL44.1	52.17	0.00	6.55	**SSBA43.1**	39.78	182.50	3.76
SSAL44.1B	0.00	NC	5.77	**SSBA46.1**	146.51	NC	4.69
SSAL44.2	86.00	0.00	4.13	**SSBA46.2**	60.61	82.50	4.01
SSAL45.1	36.96	430.00	6.18	**SSBA63.1**	75.00	115.38	5.75
SSAL46	117.00	NC	4.00	**SST42**	0.00	NC	4.83
SSAL47	36.36	NC	4.03	**DST41**	0.00	NC	5.77
SSAL49.1	33.33	NC	4.89	**DST43**	0.00	NC	4.29
SRBA41	162.79	NC	3.40	**DST51**	0.00	NC	4.20
SRBA41.1	0.00	NC	5.77	**DST52**	0.00	NC	4.83
SRBA41.2	0.00			**DST56**	0.00	NC	3.85
SRBA42	0.00	165.00	4.55	**DST58**	0.00		

***.** NaPhy= Fitato de Sodio.

#. El pH de medio blanco se cambió de 7.0 a 6.4 después de incubación.

§. NC denota ausencia de crecimiento.

Identificación y diversidad de las bacterias aisladas

El análisis molecular del gen 16S rRNA, ubicó los aislados obtenidos dentro de cinco diferentes grupos microbianos: firmicutes, actinomicetales, α-, β- y δ-Proteobacterias (Figura 7.2). Con base en sus relaciones en el árbol filogenético (Figura 7.2), las bacterias aisladas en este estudio se identificaron en 9 géneros: *Acinetobacter, Pseudomonas, Serratia, Stenotrophomona, Ralstonia, Sphingomonas, Rhodococcus, Staphylococcus* y *Bacillus.* Dentro los cuales hubo un alto predominio del grupo de los Firmicutes y en particular el género *Bacillus*, destacando por sobre los Actinomicetos, α-, β-, y γ-proteobacterias. El género *Bacillus*, relacionado con 16 de los 42 aislados obtenidos, se ha descrito como un importante solubilizador de fosfato inorgánico aislado de suelos agrícolas, forestales, sedimento lacustre, ambientes acuáticos eutróficos; y en una menor medida como solubilizador de fosfato orgánico por varios autores y en diferentes trabajos (Mukesh *et al.*, 2004; Wu y Zhou, 2005; Suliasih, 2005; Souchie *et al*., 2006; Hill *et al*., 2007). Otros Firmicutes como *Staphylococcus saprophytus* cercanamente relacionado a los aislados DST58, DST56 y SSAL47, se han reportado también como importantes solubilizadores de fosfato orgánico, proveniente principalmente de suelos con una alta carga de materia orgánica (Wu y Zhou, 2005; Hill *et al*., 2007).

En el grupo de los actinomicetos, dentro de los cuales se han descrito algunos microorganismos con un elevado potencial de PGPB (Plant Growth Promoter Bacteria) se encuentra *Rhodococcus erithropolis* (aislado SRAL62) que además poseen actividad como biocontrol para algunos fitopatógenos, y se han aislado principalmente de suelos agrícolas no fertilizados, así como de sedimento de lagos eutróficos (Hamdali *et al*., 2008; Chen *et al*., 2005; Wu *et al*., 2006).

Los géneros *Sphingomonas* y *Pseudomonas* se han propuesto como bioinoculantes potenciales debido a la alta producción de factores de crecimiento que pueden producir, y al hecho de que son aislados del suelo rizosférico con alta frecuencia, aunque también se ha observado que su densidad poblacional disminuye en presencia de altas concentraciones de celobiosa, según los trabajos de diferentes autores (Donate-Correa *et al*., 2004; Mukesh *et al.*, 2004; Suliasih, 2005; Ponmurogan y Gopi (2006); Souchie *et al*., 2006; Hill *et al*., 2007; Megha *et al*., 2007;Popavath *et al*., 2008).

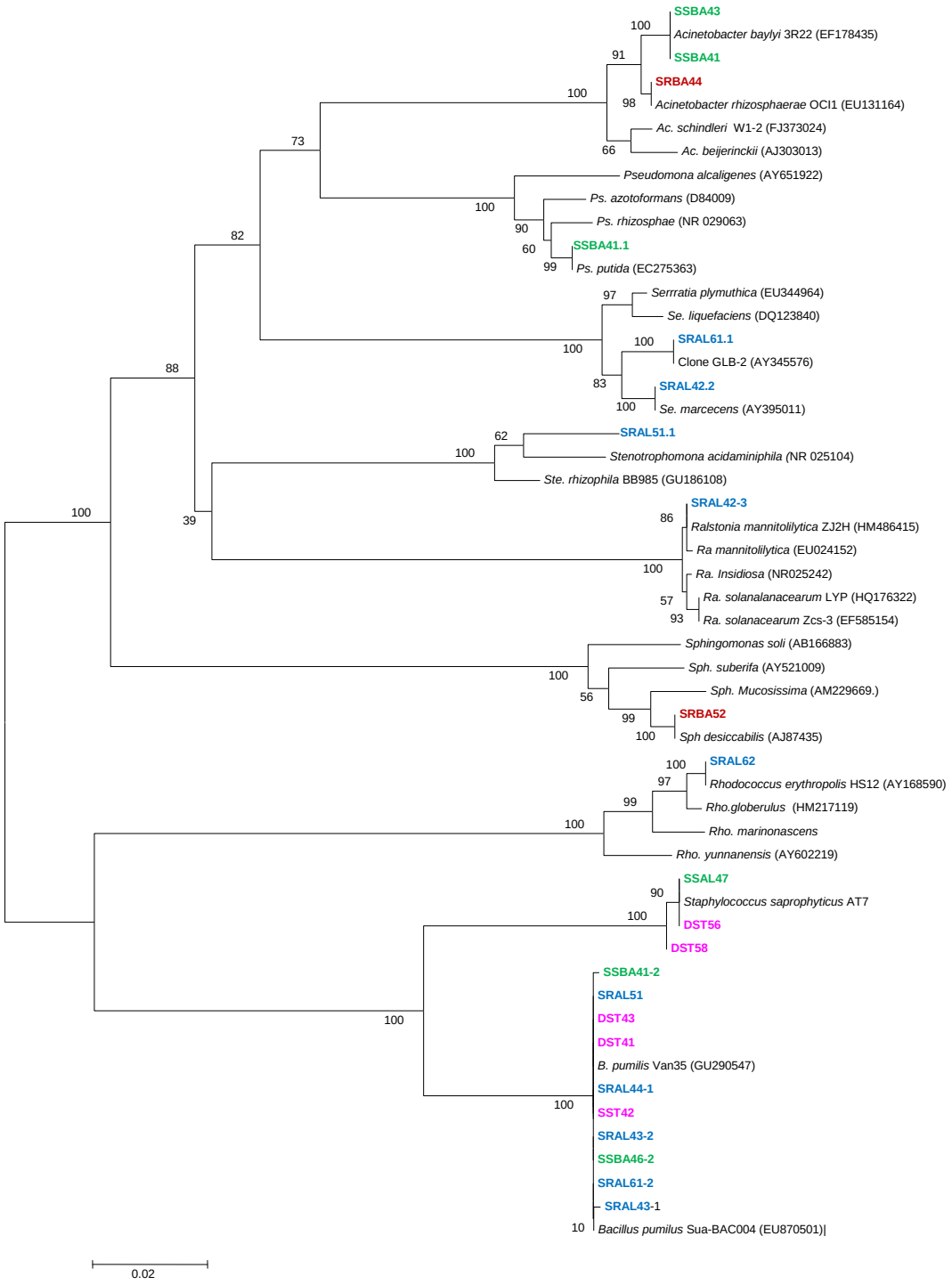


Figura 7.2 Filograma Consenso obtenido de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de las cepas aisladas. Análisis realizado con el método de agrupamiento Neighbor-Joining utilizando el algoritmo 2-Parameto de Kimura, soportado con 1000 aleatorizaciones tipo bootstrap. La barra indica 2% de diferencia en las secuencias.

El resto de los géneros identificados pertenecientes a las β- y γ-Proteobacterias se han descrito como importantes candidatos a PGPB aislados de diferentes ambientes tanto terrestres, acuáticos y con actividad como endófitos. Además pueden funcionar como biocontrol contra diferentes fitopatógenos como nemátodos, bacterias y hongos, con un alto potencial en biotecnología, de acuerdo con diferentes autores (Wu y Zhou, 2005; Suliasih, 2005; Souchie *et al*., 2006; Hill *et al*., 2007) excepto por la especie *Ralstonia solani* que se ha descrito como fitopatógena para algunas hortalizas.

Se correlacionó el número de los aislados obtenidos asociados a cada género, así como su sitio de origen para crear un patrón de distribución de los diferentes géneros encontrados (Tabla 7.4), como se describe en el trabajo de Ponmuragan y Gopi (2006); donde observamos que el género con mayor proporción y mayor frecuencia de aislamiento en todas las muestras observadas corresponde a *Bacillus pumilus* (38%), seguido de las especies no identificadas con base en el marcador 16S rDNA (11.9%) y de *Staphylococcus saprophytus* (7.14%); en cuanto al resto de los géneros identificados, se observa que presentan una frecuencia de aislamiento menor al 5%. Si bien el suelo rizosférico es el que presenta una mayor densidad poblacional, no es el que presenta una mayor diversidad; los suelos no rizosféricos aun cuando muestran un descenso de la densidad poblacional bacteriana, muestran una importante diversidad de géneros y grupos bacterianos. La influencia de los cultivos utilizados también debe tenerse en cuenta para explicar la diversidad de géneros identificados, como lo reporta Papovath *et al.* (2008).

Eficiencia de solubilización de fosfato

La eficiencia para solubilizar $Ca_3(PO_4)_2$ variaron entre 0 (para 12 aislados como SRAL42.3 y DST56 etc.) a 162.79 (para SRBA41) (Tabla 7.3). La eficiencia para solubilizar fosfato orgánico (NaPhy) variaron entre 0 (para 3 aislados como SRAL42.3, SSAL41 y SSAL42.2) a 769.57 (para SSBA43) (Tabla 7.3), y 21 aislados no pudieron crecer (no tienen la actividad). La mayoría de los aislados presentaron una buena eficiencia de solubilización al ser enfrentados con el fosfato tricalcico, sin embargo, pocos de ellos fueron capaces de mineralizar el fosfato orgánico (Irnayuli *et al*. 2007) aunque aquellos pocos capaces presentaron una eficiencia mucho mayor ante el fitato de sodio como única fuente de fósforo (Mukesh *et al*. 2004). Siendo los aislados SRBA 41 y SSBA 43 los que presentaron una mayor eficiencia de solubilización para fosfatos inorgánicos y orgánicos, respectivamente.

La mayoría de los aislados presentaron una buena eficiencia de solubilización al crecer en medio con fosfato tricálcico; sin embargo, pocos de ellos fueron capaces de mineralizar el fosfato orgánico (Tabla 7.3), concordando con los resultados reportados por Irnayuli *et al*. (2007). Algunos de los aislados capaces de solubilizar fitato en medio sólido no fueron capaces de hacerlo en medio líquido o viceversa, ya que la fitasa puede encontrarse asociada a la célula o bien excretada al medio como lo reportan Mukesh *et al.* (2004). Pocos aislados presentaron eficiencia de solubilización mayor ante el fitato de sodio como única fuente de fósforo (Tabla 7.3), esto concuerda con lo reportado por Mukesh *et al*. (2004). Siendo los aislados SRBA 41 y SSBA 43 que estan estrechamente relacionados con *Bacillus pumilus* y *Acinetobacter* sp. respectivamente, los que presentaron una mayor eficiencia de solubilización para fosfatos inorgánicos y orgánicos, respectivamente.

Tabla 7.4 Distribución de los diferentes géneros de bacterias identificados según su procedencia y frecuencia de aislamiento.

Género	Total de aislados	Distribución de aislados en suelo		
		Rizosférico	Superficial	Profundo
B. pumilus	16	7	6	3
Ralstonia solanacearum	2	2	0	0
Serratia marscences	1	1	0	0
Stenotrophomonas maltophyla	2	1	1	0
Rhodococcus erythropolis	2	1	1	0
Kribella sandramicinni	1	1	0	0
Kocuria rhizophila	2	1	1	0
Acinetobacter rhizospherae	1	1	0	0
Sphingomonas sp	1	1	0	0
Sphingomonas koreensis	1	1	0	0
uncultured unidentified	5	3	1	1
Acinetobacter baylyi	1	0	1	0
Acinetobacter calcoaceticus	1	0	1	0
Acinetobacter sp.	1	0	1	0
Pseudomonas putida	1	0	1	0
Pseudomonas sp.	1	0	1	0
Staphylococcus saprophytus	3	0	1	2

Detección de producción de ácidos orgánicos

Se determino midiendo la variación en el pH antes de la inoculación y 96h después de la inoculación para cada uno de los aislados (Tabla 7.5). En inicio, el pH de medio de cultivo, Pikovskaya líquido, fue 7.0, y después de incubación el blanco de medio de cultivo (sin bacteria) se bajo su pH a 6.4. Comparado con el blanco, casi todos aislados podrían bajar

el pH a 6.18 (SSAL45.1) hasta 2.86 (SRBA61.2). Solo el aislado SSAL44.1 no bajó el pH del medio de cultivo. Se observa que el aislado SRBA41 fue el más eficiente en la solubilización de fosfato inorgánico, mientras q el aislado SSBA43 lo fue para fosfato orgánico.

Tabla 7.5 Variación del pH a las 96 horas de incubación en medio Pikovskaya líquido y producción de ácidos orgánicos por los aislados seleccionados*

	Producción de ácidos (μg/mL) por aislado a las 96h							
Ácidos Orgánicos	SRBA 41	SSAL44.1	DST52	SSAL45.1	DST56	SRBA45	SSBA41	SRBA61.2
GLUCONATO	22.35	ND	ND	2.58	13.47	47.4	11.96	42.59
OAXALATO	ND	ND	0.05	0.05	ND	0.58	0.142	ND
CITRATO	3.15	0.112	0.16	0.08	0.34	0.82	0.12	4.59
MALATO	ND	0.24	0.06	0.071	0.54	0.6	0.51	4.17
pH	3.4	6.55	4.2	6.18	4.83	3.69	3.97	2.86
Índice (%)	162.19	52.17	1	36.96	1	100	129	1

*. El análisis de HPLC fue correlacionado con la prueba de eficiencia de solubilización para poder observar con mayor claridad el impacto de esta prueba.

El aislado con un mayor efecto acidificante fue el aislado SRBA 61.2 estrechamente relacionado con *B. pumilus*, aunque no presentó una alta eficiencia de solubilización, en el caso del fosfato inorgánico ni orgánico; de manera general podemos observar que la eficiencia de solubilización no está necesariamente correlacionada con la acidificación del medio o viceversa acorde con lo reportado por Gulati *et al*. (2008). Mediante HPLC, encontramos que los aislados con una mayor acidificación del medio y mayor eficiencia de solubilización de fosfato tricálcico producen una alta cantidad de ácido glucónico y ácido cítrico (Tabla 7.5), lo que concuerda con diversos reportes de este tipo de análisis (Reddy *et al.,* 1998; Kortstee *et al*., 2000; Vatamaniuk *et al*., 2001; Litaor *et al*., 2004). Algunos otros ácidos producidos por estas bacterias no se pudieron identificar en este estudio.

Producción de indoles con actividad de fitohormona (IAA)

Se encontró que solamente algunos de los aislados (16.6% del total de los aislados) son capaces de producir dichos compuestos (Figura 7.3). El rango de producción de AIA variaron entre 0 a 43 μg mL^{-1}. Los aislados SRBA42.2, y SRAL61.1 estrechamente relacionados con *Kocuria rhizophila* y con una Gammaproteobacteria no identificada

fueron dos aislados que produjeron mayores AIA, pero no presentan una eficiencia aceptable para solubilizar fosfato.

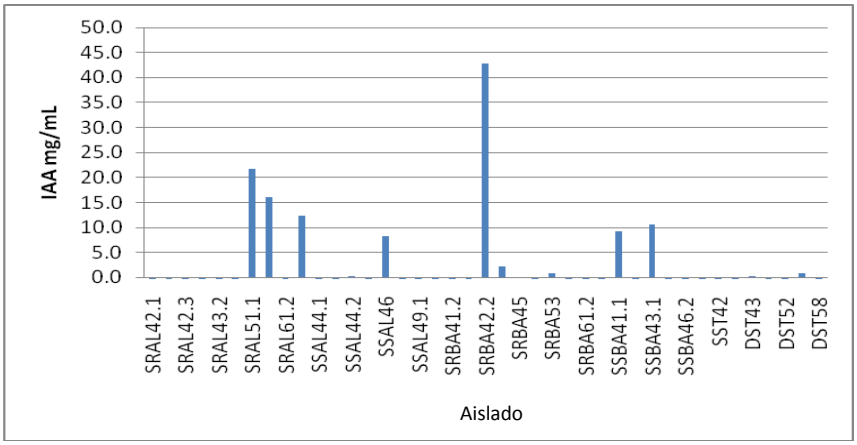


Figura 7.3 Producción de Indoles con capacidad de fitohormonas producida a partir de la ecuación de la Curva tipo de IAA, se observa q solo los aislado SRAL51.1 Y SRBA42.2 son los q presentan una mayor producción de índoles con actividad de fitohormona.

Selección de inoculantes bacterianos y bioensayo

En la prueba de producción de ácidos orgánicos se observó que el aislado con un mayor efecto acidificante fue el aislado SRBA 61.2, aunque no presento una alta eficiencia de solubilización en el caso del fosfato inorgánico ni orgánico, además no produjo de índoles. Varios de los aislados obtenidos son capaces de producir índoles, destacando los aislados SRBA 42.2 y SRAL 61.1. El SRBA 42.2 no presenta alta eficiencia de solubilizar fosfato inorgánico u orgánico, pero SRAL61.1 tiene una eficiencia bastante aceptable para la solubilización de las dos fuentes de fósforo utilizadas, así como un resultado aceptable producción de ácidos orgánicos. Como no todos los aislados cumplan con los mecanismos de promoción de crecimiento probados, podría establecerse un ensayo que ponga de manifiesto su efecto sinérgico (Ponmurugan y Gopi 2006; Hamdali *et al*. 2008).

Los resultados se presentan en la Tabla 7.6. El análisis estadístico ANOVA muestra que no existió diferencia significativa para la longitud total en ninguno de los casos. La longitud de la raíz tampoco muestra diferencia significativa, así como tampoco se observa diferencia significativa en el número de hojas. En el caso de la biomasa seca, el aislado SRBA41 (*Bacillus pumilus*) muestra diferencia significativa para la biomasa seca en la parte aérea a los sesenta días en el tratamiento que contiene fosfato tricálcico en el soporte y es regado con solución nutritiva sin ortofosfatos; así como con la biomasa seca

total en el tratamiento que no fue suplementado con una fuente de fósforo en el soporte y que fue regado con solución nutritiva completa. El aislado SSBA43 (*Acinetobacter* sp.) muestra diferencia significativa a los sesenta días únicamente en la biomasa seca de la parte aérea para el tratamiento que fue suplementado con fitato de sodio como fuente de fósforo en el soporte y que fue regado con solución nutritiva sin ortofosfatos.

Tabla 7.6 Impacto del inoculación de las bacterias solubilizadoras de fosfato en crecimiento de las plantas*

Tratamiento	Longitud (cm) de			Biomasa seca (mg) de		
	Raíz	Parte aérea	Total	Raíz	Parte aérea	Total
SRBA41 inoculación						
Sin P	79.5	27.2	54.5	98.2	322.4^{b}	420.7^{b}
Con TriCaP	81.0	33.8	47.2	93.9	180.8^{a}	274.7^{b}
Con PO_4^{3-} y TriCaP	89.5	31.2	58.2	**114.5**	**509.4^{c}**	**623.9^{c}**
SSBA43 inoculación						
Sin P	71.0	25.0	48.5	84.6	276.9^{b}	361.4^{b}
Con Phy-P	67.8	16.2	51.5	106.3	240.9^{a}	347.2^{b}
Con PO_4^{3-} y PhyP	80.8	25.8	55.0	**124.1**	**514.5^{c}**	**638.6^{c}**
Testigo negativo sin inoculo						
Con PhyP	72.8	23.2	49.5	69.2	239.8^{a}	309.0^{a}
Con TriCaP	63.5	19.2	44.2	33.8	152.9^{a}	186.7^{a}
Sin P	77.5	29.0	48.5	45.6	203.2^{a}	248.8^{a}

*. Números marcados con diferentes letras tienen diferencia significativa (Tukey P< 0.05, N=4)

ǂ. Tiempo de cosecha fue 60 dias.

Con base en los resultados de este estudio, se puede observar que 1) no hubo diferencia entre los tres testigos sin inoculo [sin fosfato, con $Ca_3(PO_4)_2$, y con ácido fítico] en mediciones de longitud o peso de las plantas de trigo; 2) no hubo diferencia entre los tratamientos con inóculos y los testigos sin inoculo en mediciones de longitud de las plantas de trigo; 3) la inoculación con cepas *Bacillus pumilus* SRBA41 y *Acinetobacter* sp. SRBA43 podría aumentar la biomasa total del trigo; 4) la combinación de inoculo, poco fosfato y fosfato insoluble dieron mejores resultados en biomasa de trigo. Estos resultados indican que 1) las dos cepas fueron posibles bioinoculantes; 2) este efecto positivo fue por solubilización de fosfato, no por producción de fitohormonas, porque no hubo diferencia en longitud de planta; 3) la aplicación de una mezcla de estas bacterias y fosfato insoluble puede dar mejor impacto sobre crecimiento de plantas; 4) la cepa que presentó una mejor actividad como posible promotora del crecimiento vegetal fue la *B. pumilus* SRBA41.

VII.3 Conclusiones

- En el suelo de las chinampas, existen una alta cantidad de las bacterias solubilizadoras.

- En suelo rhizosferico existen mayor cantidad de dichas bacterias que en suelo no rizosferis, demonstrando la posibilidad que dichas bacterias juegan un papel de mejorar el nutriente vegetal de fosforo en las chinampas.

- Algunas bacterias aisladas tienen otras características, como producción de IAA, evidebciar la potencial de ser PGPB.

- La eficiencia de solubilización de fosfato no tiene relación directa con producción de ácidos, demonstrando la existencia de otros mecanismos de la solubilización.

- Dichas bacterias se identificaron en 9 géneros, y varias como SRAL61.1 y SRAL51.1 representen posiblemente especies nuevas.

VIII. DIVERSIDAD DE LAS BACTERIAS CELULOLÍTICAS EN SUELOS DE LAS CHINAMPAS

(Yanelly Trujillo Cabrera, tesis de doctorado)

VIII.1 Materiales y Métodos

Muestreo y caracterización de los suelos de chinampas. Igual que análisis de bacterias fijadoras de nitrógeno, es decir 4 muestras de suelo no rizosferico y 3 muestras de rizosfera se muestrearon.

Cuantificación y aislamiento de las bacterias degradadoras de celulosa. La preparación de diluciones de suelo y técnica de cuantificación, aislamiento y purificación fueron igual que en los diazotrofos, pero el medio de cultivo ocupado fue la gelosa Congo rojo con la carboximetilcelulosa sódica (CMC) como solo fuente de carbono. Las diluciones de 10^{-3} a 10^{-5} se usaron para sembrar. Las colonias con halo transparente alrededor se consideraron como degradadoras de celulosa y la UFCs por gramo de suelo base seca en las muestras se calcularon para estimar la abundancia. Las colonias observadas en las placas con medio Rojo Congo-agar que presentaban un halo semitransparente alrededor, fueron seleccionadas de acuerdo a su morfología y se sembraron de por estría en placas con el mismo medio (Ulrich y Wirth, 1999). Se les hizo tinción de Gram para observar su morfología celular y una vez que se comprobó la pureza de los aislados, se conservaron a -70˚C en tubos Eppendorf de 1.5 mL con caldo PY y 20% (p/v) de glicerol.

Determinación de eficiencia de degradación. La capacidad de degradación de los aislados fue evaluada sobre placas con medio mineral, suplementado con carboximetil celulosa (CMC, celulosa amorfa), xilana (hemicelulosa) y Avicel (celulosa microcristalina) (ver anexo); se utilizó Rojo Congo como indicador con cada uno de los sustratos (Ghosh et al., 2007). Además la degradación fue también determinada en los mismos medios pero a diferentes valores de pH (4.5, 5.0, 6.0, 9.0, 10.0 y 11.0) los cuales fueron ajustados con solución de NaOH 0.1 N o HCl 0.1N; y a diferentes concentraciones de NaCl (1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 y 12.0%) (p/v). Cada aislado fue inoculado por picadura, en cada uno de los medios por triplicado; se incubaron durante 24-120h a 28ºC, se observaron cada 24 h hasta que se observaba el halo de hidrólisis alrededor de la colonia, lo cual indica la degradación de CMC, Xilana o Avicel. Entonces se tomaron las medidas de los halos y de

las colonias para calcular el Índice de Degradación (ID) que se define como diámetro de la colonia/diámetro del halo (D/d) (Lu et al., 2005).

Análisis RFLP de la región del ITS 16S-23S. Considerando su función para agrupar los aislados al nivel especie (García-Martínez et al. 1999; Gürtler y Stanisich 1996; Rasolomampianina et al., 2005), análisis de RFLP del ITS 16S-23S (internal transcribed spacers region) se realizó en dichos aislados. Para esto, fue extraído el DNA genómico de los cultivos puros bacterianos obtenidos en caldo PY, incubado a 28ºC en agitación durante 12 h para bacterias y 48h para actinomicetos con el método de Zhou et al. (1995). Este DNA se utilizó como molde para amplificar la region 16S-23S rRNA, con los iniciadores FGPS6 (5´-GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA-3´) y 23S-38 (5´-CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3´) con las condiciones descritas por Rasolomampianina et al. (2005). El producto esperado es de.

Los productos (aprox. 2500 pb) fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) y teñido con bromuro de etidio. Los productos obtenidos se sometieron a restricción con las enzimas *Msp*I, *Hinf*I, y *Hae*III. Se tomaron 10 µl del producto amplificado y 5U de cada endonucleasa en un volumen final de 20 µl por 6h. Los fragmentos fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 3%, luego fueron clasificados según su patrón de restricción, es decir los aislados comparten los mismos patrones se definieron como un grupo de PCR-RFLP.

Secuenciación del gen 16S rRNA y análisis filogenético. Este análisis fue para identificar los aislados a nivel género o especie. La extracción del DNA total de los aislados siguiendo el protocolo del CTAB (Allers y Lichten 2000), amplificación del gen 16S rRNA utilizando los iniciadores fD1 y rD1 (Weisburg *et al*. 1990), secuenciación del los genes amplificados utiliza el Método Big Dye Terminator fluorescence, y análisis filogenético fueron igual que en análisis de los diazotrofos.

Análisis estadístico. El dendograma de similitud entre los patrones de los aislados en las diferentes muestras de suelo, se realizaron con R 2.13 (R Equipo Núcleo de Desarrollo 2011) con el paquete ade4 (Dray y Dufour, 2007). La correlación entre los patrones de las especies en las muestras de suelo diferentes graficaron con un análisis de conglomerados disimilitud utilizando el método de Ward. Los patrones de muestras de suelo de las dos chinampas fueron sometidos a análisis de varianza utilizando AOV (R Equipo Núcleo de Desarrollo, 2011) para analizar las diferencias significativas entre los tratamientos con

prueba post-hoc de Tukey. Diferencias significativas entre los tratamientos se determinaron utilizando la función Tukey HSD en R 2,13 (R Equipo Núcleo de Desarrollo, 2011).

Análisis de diversidad funcional. La diversidad funcional se dividió en tres mediciones independientes: Riqueza funcional (*FRich*), Equidad funcional (*FEve*) y Divergencia Funcional (*FDiv*). Se tomaron como caracaterísticas funcionales la degradación de tres sustratos (CMC, xilana y avicel) a diferentes valores de pH y diferentes concentraciones de NaCl. Riqueza Funcional (FRich) representa la cantidad del espacio funcional ocupado por la comunidad. Un valor bajo de FRich indica que algunos de los recursos potencialmente disponibles para la comunidad estan sin usar (Mason et al., 2005). Por lo tanto hay una disminución en la productividad (Petchey, 2003). El cálculo de FRich es:

$$FRichci = SFci / Rc$$

donde FRichci es la riqueza funcional de característica funcional "c" en la comunidad "i"; SFci es el espacio del nicho abarcado por las especies dentro de la comunidad y Rc es el rango absoluto de la característica.

Equidad Funcional (FEve) describe la equidad con que se distribuye la abundancia en el espacio de las características funcionales (Mason et al., 2005). Éste índice tiene la ventaja de ser independiente de la riqueza y divergencia funcional. FEve disminuye si la abundancia está menos distribuida equitativamente o cuando la distancia entre las especies es menos regular (Liberté and Legendre, 2010). Divergencia Funcional (FDiv) representa como la abundancia está extendida a lo largo de las características funcionales, dentro del rango ocupado por la comunidad (Masson et al., 2005).

La diversidad funcional fue realizada con la función dbFD (opciones: corr="none", stand.FRic=TRUE, calc.FDiv=TRUE) del paquete FD (Laliberté y Legendre, 2010) en R (http://cran.r-project.org/).

Análisis de componentes principales. Componentes principales (PCA) fueron realizados para los datos de diversidad funcional. La agrupación de los géneros en la diversidad funcional se evaluó con un anova con la función aov y con la prueba post-hoc tukey con la función TukeyHSD en R (http://cran.r-project.org/). PCA's fue realizado con el funcion dudi.pca del paquete ade4 (Dray et al., 2007) en R (http://cran.r-project.org/).

VIII.2 Resultados y Discusión

Características de los suelos

Las características de las muestras se reportaron en análisis de DNA metagenómico (parte V).

Cuantificación de las bacterias celulolíticas

La abundancia de las bacterias celulolíticas se presentan en la Tabla 8.1, in comparación con las bacterias mesofílicas aerobias (BMA). En los suelos no rizosféricos, la abundancia de bacterias total (10^7 CFU g^{-1}) y de bacterias celulolíticas (10^6 CFU g^{-1}) fue similar en las dos chinampas, para ambas profundidades. La abundancia de las celulolíticas en suelos de chinampas fue similar que los reportados para suelos no rizosféricos agrícolas tratados con abono natural (Ulrich et al., 2008)**.** Sin embargo los reportes de bacterias celulolíticas para cultivos de trigo fueron de 10^3 fuera de la rizósfera y de 10^5 para suelos rizosféricos (Dommergues, 1970), ambos valores fueron mucho menor que los en suelos de chinamps (10^8 hasta 10^6, Tabla 8.1). Estas diferencias pueden ser debidas a las características del suelo y a la influencia de plantas sobre la población microbiana (Rabinovich et al., 2002).

El suelo rizosférico tuvo una mayor abundancia en las BMAs (R/S entre 74.18 y 7.42) y celulolíticas (R/S entre 20.35 y 2.18), con excepción de las celulolíticas en rizosfera de la alfalfa en chinampa 2 (RS=0.79). Por otro lado, la proporción de bacterias celulolíticas sobre el total BMA (C/T) fue mucho más grande para suelos no rizosféricos (0.13-0.19 con promedio 0.15) que en los rizosféricos (0.03-0.08 con promedio 0.04) (Tabla 8.1). Estos datos nos indican que la planta ejerce sobre la población bacteriana pero las bacterias celulolíticas no fueron estimular específicamente en rizosfera. Comparar los reportados por Ulrich y Wirth (1999), los valores de C/T fue más bajo, lo cual nos demostraron que la degradación de celulosa no se esté llevando a cabo en el ambiente rizosférico de manera importante como en el resto de la chinampa. Esta característica podría ser evidencia que las chinampas fueron maduras y no contienen muchas materias orgánicas frescas.

Amplificación y análisis RFLP del ITS 16S-23S

Totalmente, se seleccionaron 100 aislados de las bacterias celulolíticas en las 9 muestras de suelo. Se escogieron tratando de identificar alguna mínima diferencia como el tamaño de la colonia. En amplificación de ITS 16S-23S, se obtuvieron un solo producto esperado

de aprox. 2500 pb. Por análisis de RFLP se formaron 48 ITS grupos (Tabla 8.2) los cuales pueden sugerirnos que pertenecen a distintas especies.

Tabla 8.1. Abundancia de bacterias mesofílicas aerobias y de bacterias celulolíticas en las muestras de suelo de chinampa.

Chinampa	Muestras de suelo	UFC g^{-1} de suelo seco		C/T
		BMA (T)	celulolíticas (C)	
I	I (0-30 cm)	5.07×10^{7}	6.43×10^{6}	0.13
	II (30-60 cm)	3.45×10^{7}	5.07×10^{6}	0.15
	III (Alfalfa)	3.16×10^{9}	1.17×10^{8}	0.04
	R/S**	74.18	20.35	
	IV (Acelga)	3.16×10^{8}	2.70×10^{7}	0.08
	R/S	7.42	4.70	
II	V (0-30 cm)	3.45×10^{7}	6.61×10^{6}	0.19
	VI (30-60 cm)	4.04×10^{7}	5.25×10^{6}	0.13
	VII (Alfalfa)	4.52×10^{8}	4.68×10^{6}	0.01
	R/S	12.08	0.79	
	VIII (Lengua de vaca)	6.61×10^{8}	2.31×10^{7}	0.03
	R/S	17.67	3.90	
	IX (Pasto)	3.87×10^{8}	1.29×10^{7}	0.03
	R/S	10.35	2.18	

R/S: Densidad de bacterias rizosféricas/Densidad de bacterias no rizosféricas. La densidad de bacterias no rizosféricas se tomó como el promedio de las dos muestras de suelo (0-30 cm y de 30-60 cm).

El análisis de rarefacción estimó los 48 genotipos con unos intervalos de confianza del 95%. Los genotipos encontrados representaron el 80.8% del total de la riqueza esperada (Figura 8.1), indicando que la mayor de las especies de las bacterias celulolíticas se aislaron, pero la diversidad de estas bacterias en los suelos de las chinampas fue grande y más otras especies existen en estas muestra. Esta gran diversidad también se demostró por la alta índice de Shannon (3.48).

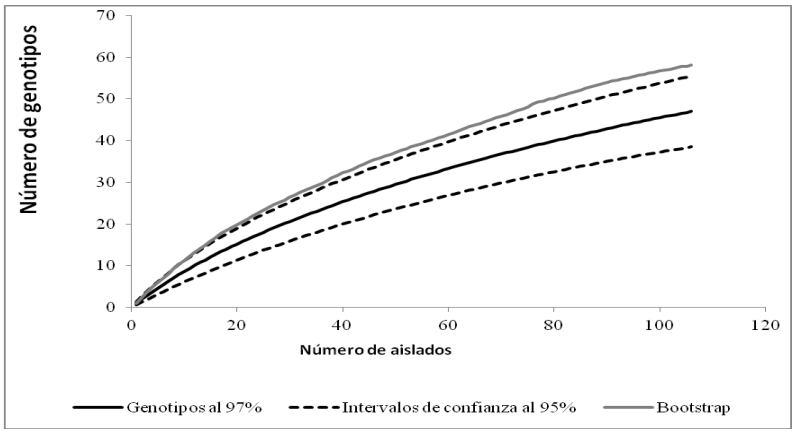


Figura 8.1 Curva de rarefacción de los genotipos encontrados para los aislados de bacterias celulolíticas**.**

Tabla 8.2. Aislados de las bacterias celulolíticas aisladas a partir de los suelos de chinampa y sus clasificaciones

Aislados[a]	IGS Grupo[b]	Muestra de suelo	Especie relacionada[c]	Similitud (%)[d]
Bacilli				
A1, A3, A13, P3, **P18**, CH12, H8	BI	IV, V, VI, IX	*Bacillus cereus* (EU794727)	87.9
C11, L5	B II	I, VIII	*Bacillus cereus* (EU794727)	98.2
C1, C10, CH5	B III	I, V	*Bacillus cereus* (AB535529)	96.6
H9	B IV	VI	*Bacillusthioparans* (FR695446)	83.8
F6	Br I	III	*Brevibacillus borstelensis* (GU201855)	88.7
H17	Sy I	VI	*Staphylococcus epidermidis* (AY741152)	90.4
Actinomyces				
A2, **A4,** A6, A11, AF12, AF10,L10, P1, P5, P14, CH6	Ar I	IV, V, VII, VIII, IX	*Arthrobacter arilaitensis* (AJG09627)	98.5
P6	Ar II	IX	*Arthrobacter oxydans* (HQ331125)	91.5
AF6	Ar III	VII	*Arthrobacter arilaitensis* (AJG09627)	92.2
CH19b	Ar IV	V	*Arthrobacter oxydans* (HQ331125)	92.4
P2, P10	Ar V	IX	*Arthrobacter arilaitensis* (AJG09627)	92.4

A5	M I	III	*Microbacterium oxydans* (HQ202812)	99.6
AF7	M II	VII	*Microbacterium resistens* (AY277553)	93.4
CH2	M III	V	*Microbacterium natoriense* (AY566291)	97.7
CH4	M IV	V	*Microbacterium phyllosphaerae* (DQ328319)	96.0
CH16	K I	V	*Knoellia subterranea* (EU867301)	98.9
A8, **A9**	L I	IV	*Leucobacter komagatae* (AU746337)	97.7
L1	L II	VIII	*Leucobacter luti* (AM072819)	97.1
F2, F5, SN, **AF14,** P15, P16, CH17, H1	Sm I	III, V, VI, VII, IX	*Streptomyces griseus* (HQ597007)	92.8
C12, S2, **S3**	Sm II	I, II	*Streptomyces scabei* (GU479446)	97.6
C2	Sm III	I	*Streptomyces flavoridis* (GQ985452)	91.6
C4B	Sm IV	I	*Streptomyces anulatus* (EU593677)	98.8
L2	C I	VIII	*Corynebacterium callunae* (NR_037036)	76.0
L9	C II	VIII	*Corynebacterium amycolatum* (X84244)	97.9
L6b	Am I	VIII	*Agromyces cerinus* (AM410681)	94.1
F11, **AF13**	Pm I	III, VII	*Promicromonospora sukumoe* (FJ486347)	87.0
P9	N I	IX	*Nocardioides kongjuensis* (AQ218275)	87.9
S4	Cel I	II	*Cellulosimicrobium cellulans* (GU012422)	91.1
Alphaproteobacteria				
L11	Ab I	VIII	*Agrobacterium tumefaciens* (GGY479944)	97.2
H13	Hp I	VI	*Hyphomicrobium vulgare* (AB543807)	92.5
L13	SI	VIII	*Sphingobium xenophagum* (AY611716)	90.5
F 10	S II	III	*Sphingopyxis chilensis*	95.7

			(NR_024631)	
Betaproteobacteria				
AF15a, CH11, **CH 14**	Ag I	V, VII	*Alcaligenes faecalis* (HQ317192)	96.7
A7	D	IV	*Delftia acidovorans* (AF149849)	89.8
Gamaproteobacteria				
H7D	Aer I	VI	*Aeromonas media* (EU488684)	86.9
C3, C5, C7, C13, C8, **C9**, CH3, CH19r	St I	I,V	*Stenotrophomonas maltophilia* (GU385870)	98.6
CH1, CH13, **CH 22**	A I	V, IX	*Acinetobacter psychrotolerans* (AB207814)	92.1
CH7, CH20, **CH21**, H10, H15	Px I	V, VI	*Pseudoxanthomonas mexicana* (AB375392)	97.9
H3 , H2	Px II	VI	*Pseudoxanthomonas ginsengisoli (*AB245361)	93.8
A12, **CH8**	Ps I	IV, V	*Pseudomonas libanensis* (DQ073449)	89.0
S5A, S5B	Ps II	II	*Pseudomonas pseudoalcaligenes* (JF439303)	91.4
H3b	Ps III	VI	*Pseudomonas mendocina* (FJ486347)	80.8
H7C, H7	Ps IV	VI	*P. pseudoalcaligenes* (JF439303)	97.9
H14, **H16**	Ps V	VI	*P. pseudoalcaligenes* (JF439303)	85.2
AF3	Ps VI	VII	*P. pseudoalcaligenes* (JF439303)	98.6
F4, **F7A**	Ps VII	III	*P. pseudoalcaligenes* (JF439303)	89.8
AF4	X I	VII	*Xanthomonas anoxopodis* (GU969138)	96.9
AF11	X II	VII	*Xanthomonas* euvesicatoria (FR733718)	93.4

[a] Un aislado (en letras negritas) por cada tipo de RFLP se seleccionó como represente en análisis de secuenciación para construir el árbol filogenético.

[b] Grupos de RFLP de definieron con base en los patrones de restricción por *Hae* III, *Hinf I* y *Msp I* de IGS amplificado.

[c] Números de accesión en GenBank de las secuencias más relativas se presentan en paréntesis.

[d] La especie putativa se definió para los aislados con base en su similitudes con las secuencias más relacionadas

Análisis filogenético de las secuencias del gen 16S rRNA

En este análisis, las secuencias del gen 16S rRNA obtenidas se depositó en la base de dato de NCBI (GenBank) con los números de acceso del JN571036 al JN571083. Con base en las relaciones filogenéticas (Figura 8.2), los 48 aislados representativos se identificaron como miembros de tres géneros de la división Bacilli (*Bacillus, Brevibacillus* and *Staphylococcus*); diez géneros de la division Actinomyces (*Promicromonospora, Streptomyces, Leucobacter, Microbacterium*, *Corynebacterium, Arthrobacter, Agromyces, Knoellia, Nocardioides, Cellulomonas*); tres géneros de la clase Alphaproteobacteria (*Agrobacterium, Sphingomonas* and *Hyphomicrobacterium*); dos géneros de la clase Betaproteobacteria (*Delftia* and *Alcaligenes*); y sies géneros de la división Gammaproteobacteria (*Aeromonas, Stenotrophomonas, Xanthomonas, Acinetobacter, Pseudomonas* and *Pseudoxanthomonas*).

En esta investigación también se analizaron las relaciones entre los tipos de IGS y los grupos filogéneticos (Tabla 8.2). Los géneros *Pseudomonas, Arthrobacter, Bacillus* y *Microbacterium* fueron dominantes y diversos grupos conteniendo siete, cuadro, cinco y cuadro tipos de IGS respectivamente; se encontraron dos IGS tipos en *Corynebacterium, Xanthomonas,* y *Pseudoxanthomonas*; solo un IGS tipo se definió en cada uno de los géneros *Stenotrophomonas, Sphingomonas, Sphingopyxis, Acinetobacter, Delftia, Agromyces, Agrobacterium*, *Knoellia, Promicromonospora, Alcaligenes, Nocardioides, Cellulomonas, Aeromonas, Hiphomicrobium*, *Staphylococcus* y *Brevibacillus* (Table 8.2). Estos datos indicaron que el grupo filogenético más abundante fue *Arthrobacter* (16 aislados), siguiendo por *Bacillus*, *Streptomyces* (13 aislados en cada género), *Pseudomonas* (12 aislados) y *Stenotrophomonas* (8 aislados). *Streptomyces* y *Bacillus* tienen la distribución más amplia: *Streptomyces* en muestras I, II, III, V, VI, VII, VIII y IX; *Bacillus* en musteras I, II, IV, V, VI, VIII y IX.

En nuestro análisis, se encontraron algunas diferencias en la composición de las bacterias celulolíticas en los suelos de chinampas. Anteriormente, Ghosh et al*.* (2007) reportaron que una proporción importante correspondía al género *Bacillus* (50%) y un menor número correspondía a *Pseudomonas* entre otros en suelos de campo húmedo (wet land area) en este de Calcutta. Ulrich et al*.* (2008) reportaron que la mayor proporción de bacterias celulolíticas en unos suelos agrícolas de Alemania que utilizaban abono natural, se debía al género *Streptomyces* (67%) y que del total el 80% eran del orden *Actinomycetales.* También reportó la presencia de aislados que pertenecían al género *Bacillus*,

Methylobacterium, *Burkholderia* y *Fulvimonas*. Yang y Zhang (2007) en su estudio de bacterias que participan en la degradación de tallos del maíz reportó la presencia bacterias de los géneros *Bordetella* y *Comamonas* (Betaproteobacteria), *Stenotrophomonas, Pseudomonas, Pantoaea* y *Acinetobacter* (Gamaproteobacteria) y *Microbacterium* (Actinobacteria).

En nuestro análisis, se encontraron los aislados en las divisiones reportados anteriormente, pero de diferentes géneros que los reportados por Ulrich *et al*. (2008). En los suelos de chinampas, se comparten los géneros de *Stenotrophomonas, Pseudomonas, Acinetobacter* y *Microbacterium* con los de Yang y Zhang (2007). Sin embargo no se han encontrado reportes que indiquen algo acerca de los géneros de *Delftia*, *Agromyces* o *Promicromonospora* encontrados en los suelos de chinampas. El índices de diversidad de bacterias celulolíticas calculados para las muestras de suelo de las chinampas indicó un valor de H'=3.48, que es un valor alto en comparación con los encontrados por Ulrich et al. (2008) H'= 1.38 a 1.84 en suelos tratados con abono natural y los reportados por Yang y Zhang (2007) H'=2.28 en la descomposición de los tallos del maíz después de la cosecha.

Estas diferencias pueden atribuirse a las características tan particulares que tiene el suelo de la chinampa, ya que los suelos reportados por Ulrich et al. (2008) fueron ligeramente ácidos (pH 5.6-6.75), pobre en materia orgánica (0.62-2.27%) y nitrógeno total (0.05-0.19%). Fierer y Jackson (2006) encontraron que el pH y la salinidad son determinantes para la biogeografía de las bacterias en el suelo. En el presente estudio, se encontraron algunos aislados que no pudieron ser definidos en especies por la baja similitud del gen 16S rRNA con las especies depositadas en el GenBank. Como es el caso de las cepas H9 (83.8%) y F6 (88.7%) Bacilli, *Arthrobacter* sp. P6 (91.5%), *Agromyces cerinus* (94.1%) y *Pseudomonas* H16 (85.2%), F7A (89.8%) (Table 8.2). Ya que las especies, géneros, familia y orden se definen por los valores de similitud de 97%, 95%, 90% y 80%, respectivamente, con base en la secuencia del gen 16S rRNA (Schloss y Handelsman, 2004), nuestros resultados indicarían la existencia de nuevas especies o géneros en el suelo de las chinampas. Para aclarar la asignación taxonómica de dichos aislados se necesitan más análisis, así como pruebas bioquímicas, micrografías en microscopía de y secuenciación de los genes houskeeping *Rec*A, *atp*D y *gln*II. Sin embargo este trabajo no pudo ser totalmente concluido, pero abre la pauta para otro estudio y describir una especie o género nuevo de estos aislados.

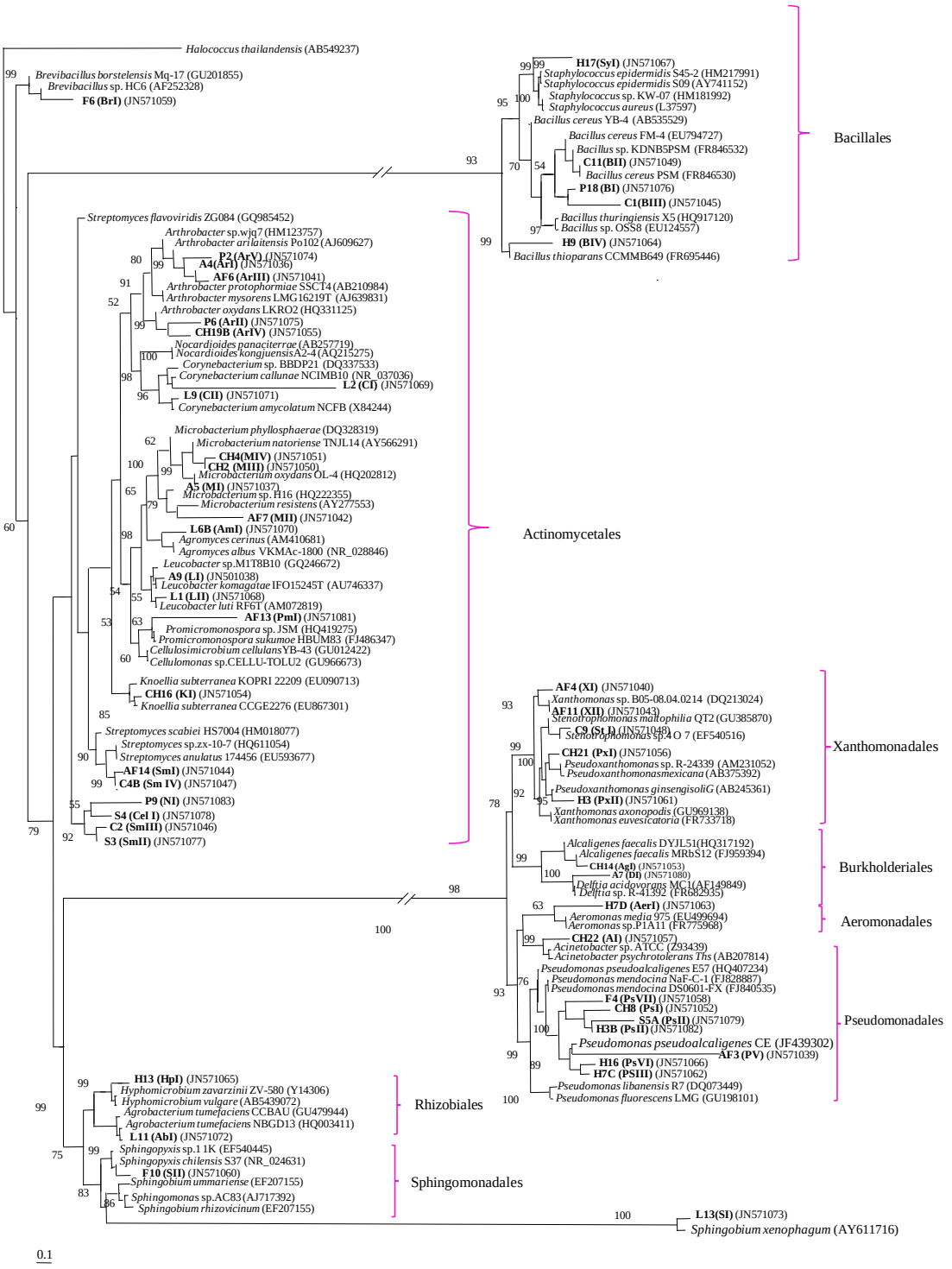


Fig. 8.1 Árbol filogenético del gen 16S rRNA demostrando la diversidad de las bacterias celulolíticas aisladas a partir del suelo de las chinampas. El árbol se construyó por método de Maximum Likelihood y modelo Hasegawa-Kishino-Yano. Valores de Bootstrap mayor que 50% se indicaron en las ramas. La regla presentó 10% de substituciones de los nucleótidos.

Por otro lado se han reportado como bacterias celulolíticas a *Bacillus cereus* (Ramin et al., 2008), algunas especies dentro del género *Brevibacillus* (Hadad et al., 2005), *Xanthomonas* (Patel y Vaughn, 1973) y *Pseudoxanthomonas* (Okeke y Lu, 2010), pero que no precisamente corresponden a las especies encontradas en nuestro estudio, por lo que los resultados aquí obtenidos son de gran importancia aportando información acerca de la abundancia y diversidad de la comunidad de bacterias celulolíticas y que el suelo de chinampas puede ser utilizado como recurso para aislar bacterias celulolíticas adaptadas a condiciones de alcalinidad, alta salinidad y alto contenido de materia orgánica.

Capacidad de degradación de los aislados

Anteriormente, Lu et al. (2005) reportó que valores de ID desde 4.2 hasta 10.4 para aislados de bacterias celulolíticas aerobias de compostas hechas con desechos vegetales, incluyendo géneros como *Bacillus*, *Halobacillus*, *Aeromicrobium* y *Brevibacterium*, siendo este último el que tenía mayor valor ID. Diferente que el estudio de Lu et al. (2005), las capacidades de degradar 3 sustratos en diferentes valores de pH y diferentes concentraciones de NaCl se evaluaron. Aunque todos nuestros aislados son capaces de degradar celulosa, sus capacidades varían entre ellos, así como su capacidad de utilizar diferentes sustratos. En nuestro análisis, todos aislados presentaron actividades sobre CMC, 84.8% tenían actividades sobre xylan y 71.7% a Avicel (Figura 8.2). Los mayores de los aislados fueron capaces de degradar el sustrato en 24 h y la índice de degradación (ID) se varió entre 1 y 6 (Tabla 8.3). En el análisis de degradación, no aislado podría crecer en medio con pH 11 o con 12% de NaCl. El rango para crecer y degradar fue pH 4.5-10.0 y 1-9% de NaCl. A pH6.0 y 9.0, la proporción de los aislados creciendo y la ID fueron más altas (96.97% con ID=1.6-7.4 a pH6.0; 90.91% con ID=1.3-7.8 a pH9.0).

Además de los géneros ya reportados que degradan celulosa, mencionados anteriormente, Cruz et al. (2009) encontró que *Penicillum* y *Streptomyces* fueron capaces de degradar xilana, mientras que *Aspergillus* y *Streptomyces* mostraron tener alta capacidad de degradación de celulosa en desechos agrícolas de la meseta de Bogotá. Celulosa y xilana son componentes de tejido vegetal, por lo que era de esperarse que estos sustratos fueran utilizados por la mayoría bacterias celulolíticas del suelo (100 % para celulosa y 84.8% para xilana), pero el avicel no es común en los materiales encontrados en la chinampa, es por eso que es menor el porcentaje que puede degradar este último sustrato (71.7%). Sin embargo a nivel biotecnológico tienen mayor interés los

microorganismos que sean más versátiles en la utilización de distintos compuestos celulósicos y al ser el avicel celulosa cristalina, las bacterias que tienen la capacidad de degradar este sustrato, se atribuye a que tienen un sistema muy eficiente de celulasas y por lo tanto aumentan su valor comercial.

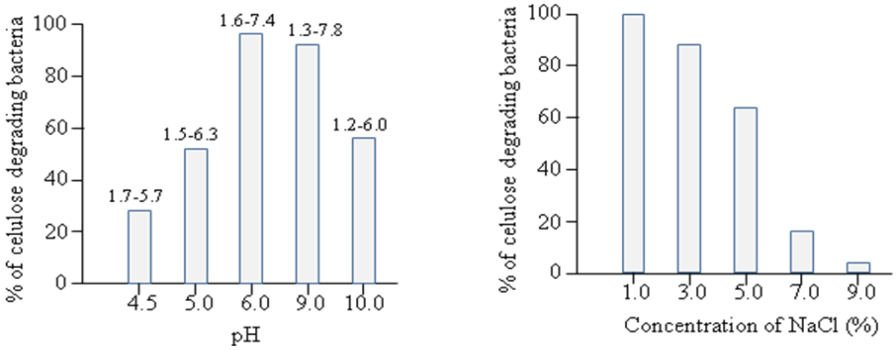


Figura 8.2 Proporción de los aislados capaces de degradar CMC en medio con diferentes pH y concentración de NaCl. La degradación de CMC en medio a pH7.6 fue control positive y la proporción de aislados capaces de degradación fue 100%.

Cuadro aislados en cada grupo de Alphaproteobacteria y Betaprobactereia demostraron degradación a pH6.0; y eran 6, 5, 4 y 4 aislados a pH9.0, 5.0, 10.0 and 4.5, respectivamente. La más alta eficiencia de degradación (ID=5.0) se presentó en aislado L11 a pH4.5; y los aislados L13 y AF15a fueron capaces degradar a pH 4.5 a 10.0. Cuadro aislados en cada grupo de Alphaproteobacteria y Betaprobactereia demostraron degradación a pH6.0; y eran 6, 5, 4 y 4 aislados a pH9.0, 5.0, 10.0 and 4.5, respectivamente. La más alta eficiencia de degradación (DI=5.0) se presentó en aislado L11 a pH4.5; y los aislados L13 y AF15a fueron capaces degradar a pH 4.5 a 10.0.

Los 33 aislados en Gamaproteobacteria fueron capaces degrader celulosa a pH9.0 (DI=1.3-6.1, con promedio de 3.14); 32 a pH6.0 (DI=1.8-6.2, con promedio de 3.16); 15 a pH10 (DI=1.5-5.4, con promedio de 2.71); 17 a pH5.0 (DI=1.8-6.3, con promedio de 3.62); 11 a pH4.5 (DI=2.3-5-1, con promedio de 3.91). La mayor eficiencia se presentó en el aislado H14 (DI=6.3) a pH5.0, en C3 (DI=6.2) a pH6.0 y en S5A (DI=6.1) a pH9.0. Ocho aislados de Gamaproteobacteria podrian degradar celulosa a todos niveles de pH4.5-10.0.

Varios aislados como CH12, L13, H14 y AF4 podrían degradar celulosa a pH 4.5-10.0 y concentración 1-9% de NaCl.

Tabla 8.3 Capacidad de degradación de los aislados en diferentes condiciones

Aislado	Tipo IGS*	Muestra de suelo#	ID§ a pH7.6 para			ID en medio a pH					ID en medio con NaCl (%)				
			CMC	Xylan	Avicel	4.5	5	6	9	10	1	3	5	7	9
Bacilli															
A1	BI	IV, V, VI, IX	3.2	2.1	3.2	-¶	-	2.1	1.5	-	2.0	-	-	-	-
A3			2.0	2.0	2.2	-	-	3.7	1.9	-	3.2	3.3	-	-	-
A13			3.5	2.5	2.0	-	-	2.7	1.4	-	3.7	-	-	-	-
P3			6.5	-	-	-	6.4	5.0	2.7	-	2.9	-	-	-	-
P18			2.9	3.3	3.4	-	1.5	3.8	2.4	1.5	2.9	4.8	-	-	-
CH12			5.8	2.5	-	3.2	4.7	7.4	4.4	4.1	2.8	2.7	4.6	5.8	-
H8			3.5	1.8	4.9	5.7	4.8	3.1	-	-	2.0	-	-	-	-
C11	BII	I, VIII	2.1	1.9	2.3	5.3	3.4	3.9	2.9	3.0	2.5	3.0	3.1	3.4	-
L5			2.5	2.3	5.6	-	-	3.0	1.6	1.9	5.3	4.3	4.3	-	-
C1	BIII	I, V	3.8	3.1	2.7	-	2.0	3.5	3.2	2.7	3.9	5.7	-	-	-
C10			2.4	1.6	3.2	-	2.8	2.7	4.1	2.2	3.3	2.0	-	-	-
CH5			2.5	-	-	-	-	2.0	2.8	-	2.4	2.8	4.2	4.5	-
H9	BIV	VI	2.3	1.8	2.4	-	-	5.6	3.9	3.7	3.9	2.5	-	-	-
F6	BrI	III	4.6	3.0	3.6	3.8	3.6	3.7	2.0	2.6	2.9	2.9	3.9	5.7	-
H17	SyI	VI	3.6	2.6	2.6	2.0	3.8	4.4	4.3	-	2.4	3.1	3.2	3.0	-
Actinomyces															
A2	Ar I	IV, V, VII, VIII, IX	3.4	2.3	4.6	-	-	2.8	2.5	2.2	2.3	1.5	-	-	-
A4			2.5	2.7	2.5	4.8	4.2	2.2	2.4	1.9	2.2	4.4	-	-	-
A6			1.9	1.8	-	1.7	1.6	2.5	1.9	-	2.1	2.0	2.2	2.5	-
A11			2.8	-	-	4.9	2.4	3.4	2.6	3.5	3.5	6.2	5.2	3.3	-
AF12			2.2	2.7	2.8	-	3.9	2.1	2.2	1.9	1.9	-	-	-	-
AF10			2.4	2.3	2.1	-	-	2.2	2.3	-	2.0	-	-	-	-
L10			2.5	-	-	-	-	2.4	2.3	-	3.0	2.3	2.7	-	-
P1			2.1	2.0	-	-	-	2.8	2.8	2.0	1.9	2.0	2.2	-	-
P5			2.6	2.2	2.8	-	-	3.3	3.0	2.2	2.7	-	-	-	-
P14			2.6	2.0	2.6	-	-	2.6	2.6	1.5	2.3	2.0	2.0	-	-
CH6			3.6	-	-	-	-	2.2	2.1	-	2.1	2.7	2.8	-	-
P6	Ar II	IX	4.7	2.9	3.1	-	-	3.3	2.6	1.7	2.5	-	-	-	-
AF6	Ar III	VII	2.5	1.7	3.3	-	5	2.6	2.9	3.2	2.1	5.1	-	-	-
CH19b	Ar IV	V	2.2	-	-	-	2.7	2.5	2.9	2.7	3.2	2.6	5.3	-	-
P2	Ar V	IX	3.7	2.8	3.2	-	3.3	3.3	2.6	2.0	3.1	5.0	3.6	3.0	-
P10			3.2	3.2	3.1	-	3.1	2.7	2.2	1.6	3.3	2.1	-	-	-
A5	M I	III	5.5	2.5	-	-	-	5.8	5.9	5.3	3.4	3.8	-	-	-
AF7	M II	VII	3.0	-	-	-	2.4	2.8	3.1	-	2.7	-	-	-	-
CH2	M III	V	3.3	4.0	-	-	-	4.2	2.6	2.7	3.3	3.0	-	-	-
CH4	M IV	V	3.9	-	-	3.0	3.7	4.3	-	-	2.8	2.9	4.5	5.0	-
CH16	K I	V	2.3	2.3	2.2	-	-	-	-	2.5	2.5	-	-	-	-
A8	L I	IV	1.9	2.7	3.5	3.6	3.5	1.7	-	-	2.5	5.3	.	-	-
A9			3.5	4.5	-	-	-	2.8	1.7	2.0	4.3	5,8	-	-	-
L1	L II	VIII	5.5	3.0	4.7	3.8	5.6	5.8	5.2	3.1	4.4	-	-	-	-
F2	Sm I	III, V, VI, VII, IX	2.7	2.6	3.2	4.9	3.2	1.8	1.8	1.2	2.8	3.2	2.8	3.3	-
F5			2.3	2.7	-	-	2.4	1.4	2.1	-	2.3	4.5	-	-	-

SN			1.8	4.6	3.6	-	-	2.7	2.9	-	2.5	-	-	-	-
AF14			2.6	2.2	3.0	-	2.0	7.0	7.8	4.1	2.7	4.3	-	-	-
P15			2.6	3.6	2.5	-	-	3.1	3.2	-	2.0	2.0	-	-	-
P16			3.2	3.8	2.4	-	-	1.8	2.3	-	2.1	2.2	-	-	-
CH17			2.7	3.5	4.0	-	5.9	5.8	3.2	2.4	5.2	-	-	-	-
H1			3.5	1.9	2.4	2.8	3.3	4.5	3.4	1	1.4	2-3	-	-	-
C12			1.9	3.0	2.0	-	-	2.5	1.8	1.9	4.3	-	-	-	-
S2	Sm II	I, II	3.3	1.7	2.6	-	-	3.0	-	-	3.7	3.3	1.7	-	-
S3			3.2	5.6	4.1	-	-	3.0	-	-	3.3	3.0	1.7	-	-
C2	Sm III	I	3.4	3.1	2.7	-	-	-	2.8	-	-	2.0	3.5	-	-
C4	Sm IV	I	2.8	-	-	4.0	3.2	7.1	2.2	1.5	4.4	4.3	4.3	4.2	-
L2	C I	VIII	2.7	-	-	-	2.0	1.6	3.4	6.0	2.6	3.0	-	-	-
L9	C II	VIII	2.8	-	-	-	-	2.9	2.7	1.8	3.0	-	-	-	-
L6b	Am I	VIII	2.2	2.3	-	-	3.6	3.8	1.7	3.0	2.7	2.1	4.1	2.9	-
F11	Pm I	III, VII	1.8	-	-	-	1.7	1.8	1.8	2.0	3.9	4.8	-	-	-
AF13			2.6	4.8	-	-	-	2.0	2.0	-	3.0	2.7	2.5	-	-
P9	N I	IX	1.9	1.9	1.8	-	-	2.0	-	-	2.7	-	-	-	-
S4	Cel I	II	1.6	-	-	-	2.6	2.1	6.5	4.9	3.2	2.7	-	-	-
Alphaproteobacteria															
L11	Ab I	VIII	4.5	2.2	2.2	5.0	2.2	2.6	2.3	-	2.5	2.3	1.5	2.7	-
H13	Hp I	VI	2.5	1.8	2.9	2.9	3.4	3.7	4.9	-	2.1	-	-	-	-
L13	SI	VIII	2.7	5.7	5.5	3.0	2.7	2.2	2.7	2.4	4.1	6.4	6.3	-	-
F10	S II	III	3.8	4.8	2.8	-	-	2.2	1.7	3.1	3.3	3.0	-	-	-
Betaproteobacteria															
AF15a			2.6	-	-	3.3	2.5	2.3	2.1	1.8	2.3	4.3	2.8	-	-
CH11	Ag I	V, VII	2.9	-	-	-	-	3.8	2.4	1.7	4.6	3.2	-	-	-
CH14			3.9	-	-	-	3.8	4.2	-	-	4.8	3.6	-	-	-
A7	D	IV	3.9	-	-	-	-	4.0	-	-	2.1	-	-	-	-
Gamaproteobacteria															
H7D	Aer I	VI	3.1	3.1	2.8	-	-	2.7	2.8	-	-	-	-	-	-
C3			5.4	2.5	2.6	-	3.7	6.2	5.0	2.2	3.3	-	-	-	-
C5			2.8	-	-	-	3.9	3.1	4.5	2.3	3.0	-	-	-	-
C7			3.7	-	-	4.9	4.6	3.2	4.2	3.4	4.4	-	-	-	-
C13	St I	I,V	3.4	2.0	1.6	4.5	5.1	4.4	4.8	5.4	4.6	5.5	-	-	-
C8			1.7	3.3	4.7	-	-	2.8	3.4	-	2.5	5.7	-	-	-
C9			2.9	3.4	3.3	-	-	-	3.4	-	3.7	-	-	-	-
CH3			2.7	3.4	-	-	-	3.1	2.1	-	3.6	-	-	-	-
CH19r			3.8	-	4.2	-	-	5.6	2,2	-	4.9	4.3	-	-	-
CH1			2.3	-	-	-	2.0	2.6	2.8	1.8	1.3	1.7	-	-	-
CH13	A I	V, IX	2.2	-	-	-	-	2.0	2.1	-	1.7	1.9	-	-	-
CH 22			2.3	3.8	4.0	-	-	3.2	2.6	1.6	3.6	2.7	2.1	-	-
CH7	Px I	V, VI	3.4	2.6	3.2	-	3.3	2.3	1.3	2.0	3.4	2.8	-	-	-
CH20			3.0	3.1	-	4.2	2.9	3.3	1.6	-	2.3	3.0	4.8	2.0	-

CH21			4.1	2.7	-	3.2	3.8	3.1	4.0	-	2.6	2.6	6.5	5.8	5.2
H10			4.8	3.5	2.3	4.2	5.2	4.6	4.6	3.3	2.9	1.7	2.1	-	-
H15			1.8	-	-	-	-	2.3	3.2	-	2.6	2.2	-	-	-
H3	Px II	VI	1.9	2.9	2.5	-	-	2.5	3.2	-	2.6	-	-	-	-
H2			2.8	-	-	-	-	2.2	2.8	-	2.4	1.8	-	-	-
A12	Ps I	IV, V	2.8	-	-	2.3	2.7	1.8	1.3	-	2.1	2.3	2.0	-	-
CH8			4.3	5.3	5.4	-	-	2.9	4.2	-	2.8	1.8	-	-	-
S5A	Ps II	II	5.1	2.4	1.7	-	-	4.8	6.1	1.5	3.3	4.6	4.2	-	-
S5B			2.5	1.7	6.5	4.4	3.1	2.5	2.0	3.0	3.0	2.6	2.2	3.3	-
H3b	Ps III	VI	4.8	-	-	5.1	4.9	4.0	3.9	3.2	2.9	2.9	2.6	3.6	-
H7C	Ps	VI	4.9	3.8	4.5	-	-	3.8	2.7	-	2.4	2.1	-	-	-
H7	IV		2.8	3.4	-	-	2.5	2.7	2.3	-	4.6	3.1	3.0	-	-
H14	Ps V	VI	5.8	-	-	4.6	6.3	2.1	2.5	1.5	3.2	3.0	1.8	-	-
H16			2.3	-	-	-	1.8	2.9	2.1	2.3	2.9	2.1	-	-	-
AF3	Ps VI	VII	4.2	4.0	4.0	-	-	1.8	3.4	-	3.1	2.4	-	-	-
F4	Ps	III	3.2	2.8	4.1	-	-	2.1	3.8	-	2.3	1.7	-	-	-
F7A	VII		3.4	7.5	-	-	2.6	3.0	2.8	-	2.6	1.8	-	-	-
AF4	X I	VII	3.5	-	-	2.3	3.1	3.6	3.3	4.9	3.4	4.3	5.5	5.2	3.8
AF11	X II	VII	3.7	2.2	-	3.3	2.5	3.8	2.6	2.4	3.3	5.5	5.7	-	-

*. Grupos de RFLP de definieron con base en los patrones de restricción por *Hae* III, *Hinf I* y *Msp I* de IGS amplificado.

#. Muestras de suelo I a IV fueron de chinampa I: I, suelo de 0-30 cm; II, suelo de 30-60 cm; III, suelo rizosferico de alfalfa; IV, suelo rizosferico de chard. V a IX fueron de chinampa II: V, suelo de 0-30 cm; VI, suelo de 30-60 cm; VII, suelo rizosferico de alfalfa; VIII, suelo rizosferico de sorrel; IX. Suelo rizosferico de pasto.

§. DI: indice de degradación = diametro de halo trasparente (degradación)/diámetro de colonia.

¶. "-" no degradación.

Similitud entre las comunidades de bacterias celulolíticas de las muestras

En la Figura 8.3, la cual se generó por análisis de agrupación con base en la similitud de las comunidades bacterianas aisladas de las muestras de suelo las 9 muestras forman tres clústeres: 1) dos muestras rizosfericas de alfalfa; 2) tres muestras rizosfericas de otras plantas y suelo superficie de chinampa 1; y 3) tres muestras de suelo no rizosferico. Estas relaciones demostraron que las raíces de plantas tienen un gran efecto sobre la comunidad bacterianas, especialmente la alfalfa.

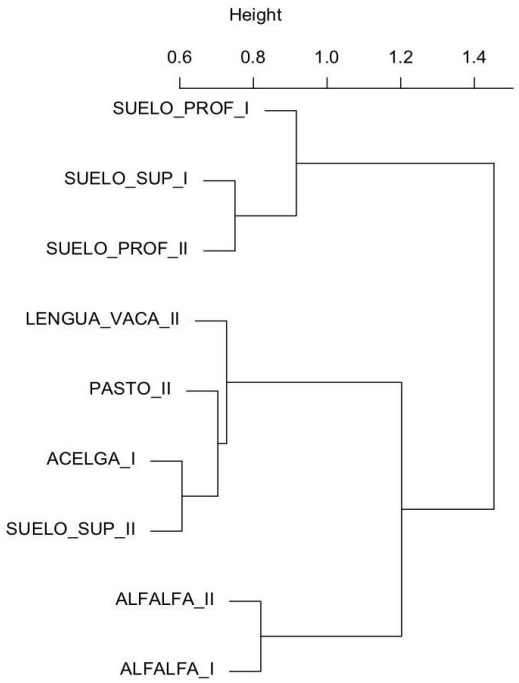


Figura 8.3. Dendrograma del agrupamiento de las muestras de suelo con base en el tipo bacterias celulolíticas identificadas. Los números romanos indican la chinampa de origen de la muestra.

Correlación entre eficiencia de degradación, los géneros bacterianos, pH inicial de medio y concentración de NaCl

Con los datos de ID de cada uno de los 100 aislados hechos por triplicado se construyó una base de datos que sirvió para el análisis de componentes principales (PCA). Se analizaron los tres sustratos en diferentes concentraciones de NaCl y diferentes valores de pH. En la Figura 8.4, se muestra el comportamiento de los géneros a diferentes valores de pH en cada uno de los sustratos. Los vectores indican cada uno de los tres sustratos utilizados: celulosa, xilana y avicel y los géneros se agrupan de acuerdo a la afinidad que muestra por cada uno de ellos, es decir los géneros que más se acerquen a estos vectores, tendrán una mejor actividad de degradación del sustrato. Es así como podemos observar tres grupos: 1) los géneros *Agromyces, Corynebacterium Xanthomonas, Cellulomonas, Stenotrophomonas, Leucobacter, Brevibacillus, Hyphomicrobium, Agrobacterium* y *Staphylococcus* tienen mejor degradación en celulosa, xilana y avicel en pH cerca a neutral (6, 6.7 y 9); 2) *Alcaligenes, Microbacterium, Pseudomonas, Promicromonospora, Pseudoxanthomonas, Streptomyces, Sphingobium* y *Bacillus* tienen una mediana actividad para los tres sustratos pero adaptados a pH 4.5, 5.0 y 10; por último 3) *Acinetobacter, Delftia, Aeromonas, Nocardioides* y *Knoellia* presentan baja degradación por estos sustratos en pH 11.

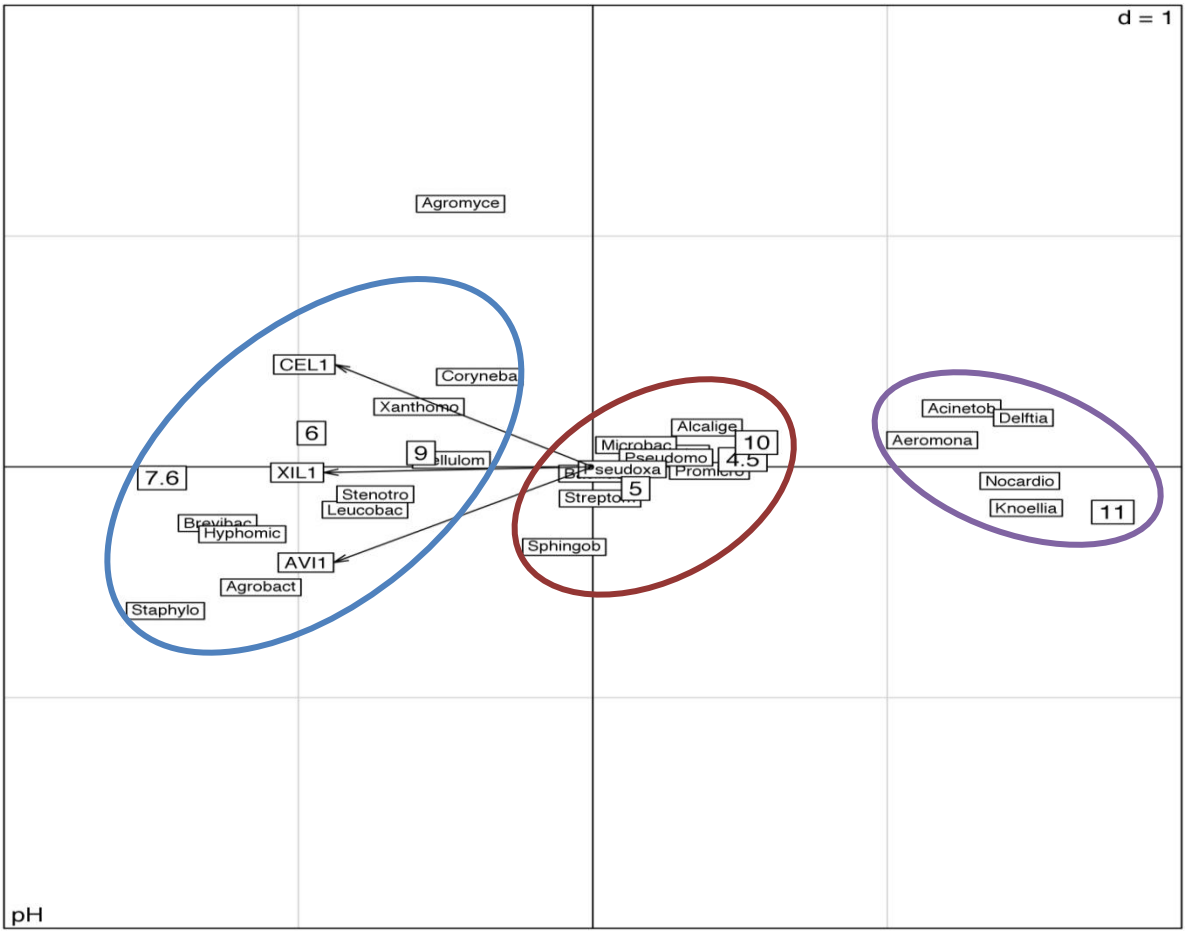


Figura 8.4 Gráfica de PCA de la degradación de celulosa, xilana y avicel a diferentes valores de pH.

En cuanto a la degradación de celulosa, xilana y avicel señaladas como vectores igual que en la figura anterior, observamos que la degradación se logra mejor en concentraciones de 0-3%; para concentraciones de 5-7% la degradación ocurre de forma disminuida y a concentraciones de 9-12% es baja o nula (Figura 8.5). Los géneros con mayor capacidad de degradación fueron *Agromyces, Xanthomonas, Agrobacterium, Stenotrophomonas, Sphingobium Brevibacillus* e *Hyphomicrobium*; los de mediana actividad fueron *Promicromonospora, Alcaligenes, Microbacterium, Corynebacterium, Pseudoxanthomonas, Streptomyces, Arthrobacter, Leucobacter* y *Bacillus*; los de más baja degradación fueron *Acinetobacter, Delftia, Nocardioides, Knoellia* y *Aeromonas.*

En este estudio, los géneros *Hyphomicrobium, Agrobacterium, Stenotrophomonas, Xanthomonas, Agromyces* y *Brevibacillus* mostraron buena capacidad de degradación de los tres sustratos, tanto a diferentes valores de pH como de concentraciones de NaCl (Figuras 8.4 y 8.5).

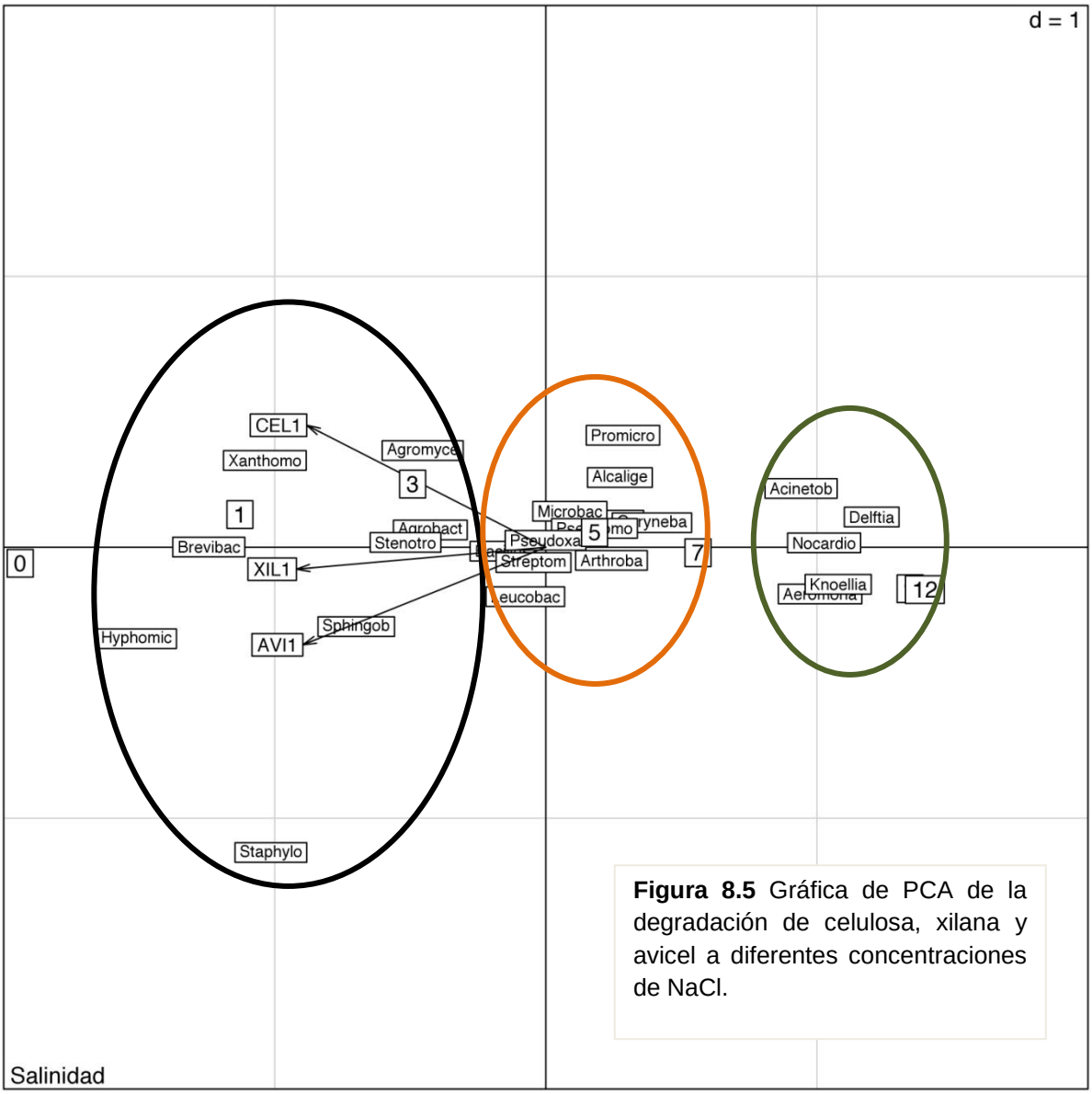


Figura 8.5 Gráfica de PCA de la degradación de celulosa, xilana y avicel a diferentes concentraciones de NaCl.

Ahora con respecto a la diversidad funcional, esta se evaluó comparando la comunidad de cada una de las muestras de suelo. Se calcularon los 3 índices de diversidad funcional (Riqueza funcional, Divergencia funcional y Equidad funcional) para explicar cómo se distribuyen los aislados presentes en cada muestra, y cuáles son los suelos que representan mejor la degradación de la celulosa.

En la Figura 8.6, están graficados los índices de diversidad funcional como vectores y las muestras de suelo se ubican de acuerdo a la distribución de la comunidad y la utilización del sustrato. De acuerdo a la gráfica podemos observar que los suelos de la chinampa II

superficial y profundo, se encuentran más cerca de los vectores de los índices de diversidad funcional, por lo que esto nos indicaría que las especies que están en estos suelos, están aprovechando mejor el sustrato y se encuentra distribuidas más uniformemente. A medida de que las muestras de suelo se alejan de éstos vectores, indicaría que las comunidades de estos suelos no aprovechan totalmente el sustrato y que no están distribuidas homogéneamente en el suelo, como sucede con las muestras de pasto y del suelo profundo de la chinampa I que son las más alejadas de estos vectores.

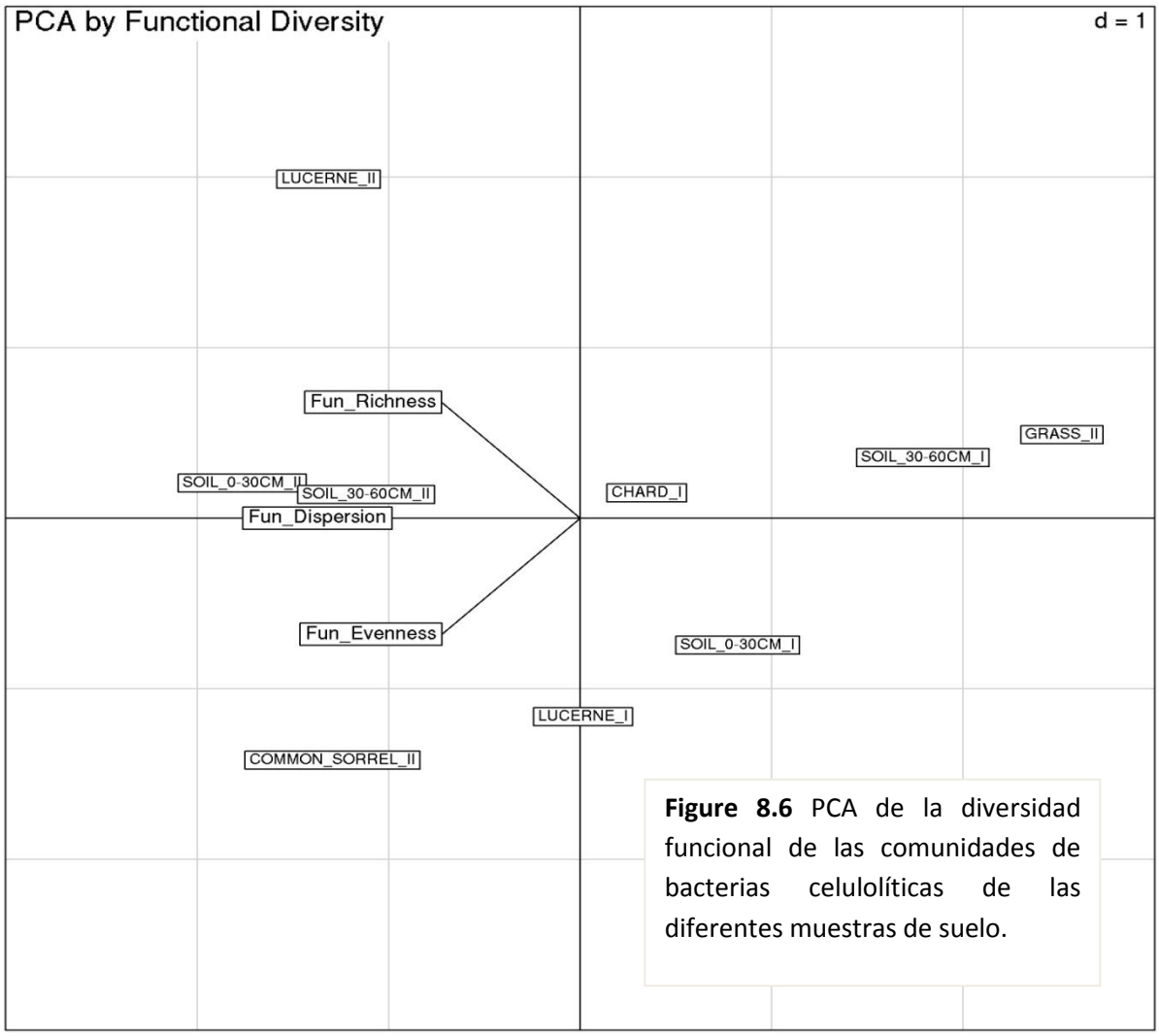


Figure 8.6 PCA de la diversidad funcional de las comunidades de bacterias celulolíticas de las diferentes muestras de suelo.

En este trabajo se analizó el comportamiento de los distintos géneros en cuanto a sus capacidades de degradación bajo condiciones de pH y salinidad, ya que además de sustentar que la comunidad de bacterias celulolíticas está adaptada a las condiciones de

la chinampa, también biotecnológicamente esta información es de gran ayuda para tenerlo en cuenta a la hora de emplear algún microorganismo dependiendo el proceso.

Es claro que a concentraciones elevadas de sal, la degradación iba disminuyendo esto podrá explicarse, porque la disponibilidad de agua disminuye y por lo tanto el sustrato no se solubiliza completamente. Zhang et al. (2006) determinó que es crucial la solubilidad y la naturaleza del sustrato al momento de evaluar la actividad celulolítica cuantitativa y cualitativamente. Sin embargo debido a las características de las chinampas vemos que hubo aislados con capacidad de degradación hasta en 9% de NaCl como lo hizo el género *Bacillus* (Tabla B, apéndice).

Las celulasa tienen un amplio rango en el cual pueden actuar, por mencionar algunas esta las que produce *Bacillus subtilis* que tiene su pH óptimo entre 5-7, *Streptomyces murinos* pH6, y *Bacillus* sp. pH de 9 (Howard et al., 2003). Pero hay que tener en cuenta que los resultados varían de un estudio a otro dependiendo las condiciones del ensayo, (tipo de sustrato, medio líquido o agar, etc.). Se han reportado que las actividades de las celulasas es favorable a pH entre 6 y 7 (Krishna, 1999) y que el pH es crucial para la hidólisis de la celulosa. En nuestro caso encontramos aislados que mostraron actividad de degradación en un amplio rango de valores de pH (Tabla A. apéndice) esto es también porque en el suelo de las chinampas pueden formarse pequeños microhabitats ácidos debido a la interacción de las bacterias celulolíticas con otros microorganismos presentes, aunque se ha visto que en condiciones naturales la actividad celulolítica se ve afectada a pH ácido, como reportó Lynd et al. (2002) para el caso de *Cellulomonas*.

La relación entre la estructura y la función de las comunidades celulolíticas no ha sido estudiada a profundidad. El presente trabajo puede dar información acerca de la composición y potencial que tiene la comunidad de bacterias celulolíticas presentes en el suelo de chinampa, sin embargo vemos que sus capacidades son muy variables y no tiene relación entre la capacidad de degradación y su taxa. Ulrich et al. (2008) ya había demostrado no existe relación entre función metabólica y la estructura de la comunidad.

VIII.3 Conclusiones

La abundancia de bacterias celulolíticas aerobias es más alta, pero la proporción de ellas con respecto de las bacterias totales fue menor en los suelos rizosféricos que en los no rizosférico.- Existen diversas bacterias celulolíticas en los suelos de las chinampas maduras, incluyendo 16 familias de 12 ordenes.

Existen muchas bacterias nuevas en los suelos de las chinampas. Solamente 41 aislados se identificaron a 16 especies definidas, y los además serían especies, géneros o familias nuevas.

Las bacterias celulolíticas dominantes fueron de *Streptonomyces, Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas.*

Estas bacterias tienen un amplio espectro de biodegradación. El 100 % de los aislados degradó celulosa, el 84.8%, xilana y el 71.7% fue capaz de degradar el avicel.

Estas bacterias son adaptadas a su ambiente, con mejor degradación a pH de 6-9 y concentraciones de NaCl de 0-3%. Algunos aislados mostraron capacidad de degradación hasta concentraciones de 9% de NaCl y hasta pH 11.

Las especies de las plantas tienen efectos sobre la diversidad a y la abundancia de las bacterias celulolíticas, pero la profundidad no.

IX. AISLAR Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS A PARTIR DE CONSORCIOS CAPACES DE DEGRADAR GABAZO

Enith Aline Gómez Sandoval, Tesis de licenciatura

Rucio Beatriz Gil López, Tesis de licenciatura

Yanelly Trujillo Cabrera, Tesis de doctorado

IX.1 Materiales y Métodos

Obtención y conservación de consorcios microbianos. Para selección del consorcio bacteriano, se colocó 1 g de cada muestra por triplicado en un matraz Erlenmeyer que contenga 100 ml de medio basal para biodegradadoras de petróleo, pero se adicionó 1 g de bagazo como el único fuente de carbono, con extracto de levadura al 0.2%. Se incubó en agitación a temperatura ambiente por 48 h. De los matraces que tengan crecimiento, se transfiere 1 ml del cultivo anterior a otro matraz con mismo medio de cultivo sin extracto de levadura, y remetieron este protocolo hasta que tengan un crecimiento estable.

Para conservar los consorcios microbianos, se preparó una solución de medio líquido más glicerol al 40% (1 L de H_2O destilada, 5 g de peptona de caseína, 3 g de extracto de levadura, 0.6 g de cloruro de calcio, Glicerol al 40%). Se mezcló esta solución con cultivo de consorcio en una relación 1:1 (v/v), y se conservó la mezcla a -80°C.

Sinética de los consorcios microbianos. En matraces Erlenmeyer con 100 mL de medio basal para biodegradación y 1 g de bagazo, se esteriliza en autoclave a 15 lb por 15 min, se deja enfriar y colocamos 0.5 mL del consorcio obtenido. Se coloca en agitación durante 16 días a 28°C. Durante este tiempo se toman muestras cada 48 horas para determinar la biodegradación por peso seco, de estas mismas muestras tomamos 10 mL para determinar azucares reductores y azucares totales con método químico.

Efecto del pH y salinidad sobre la biodegradación. Con base a los pH´s medidos en el suelo de las chinampas, se proponen probar los siguientes pH´s: 5, 6, 7, 8 y 9 con HCl 0.1N o KOH 0.1N. Una vez ajustado el pH, se distribuyó el medio de cultivo en matraces Erlenmeyer, cada uno con 100 mL, se adicionó 1g de bagazo de caña a cada matraz y se esterilizó los matraces a 15 lb de presión durante 15min.

Para la salinidad se usó mismo medio de pH 7.0, se agregó NaCl preparando concentraciones de 1.0%, 1.5%, 2.0% y 2.5% (w/v). De igual manera una vez ajustada la salinidad se distribuyen 100 mL en cada uno de los matraces, 1 g de bagazo de caña y se esteriliza e autoclave a 15 lb durante 15 min.

Posteriormente se adicionó 0.5 mL del consorcio y se puso en agitación durante 16 días a 28°C tomando muestras cada 48 horas para determinar la degradación por el método de filtración.

Determinación de la eficiencia de biodegradación. A las muestras tomadas cada 48 horas se les somete a choque térmico, se dejan durante un día en el congelador y después se da baño maría una temperatura alrededor de 60°C que es la temperatura de pasteurización esto se realiza tres veces para asegurarnos del rompimiento de los microorganismos y no pesar biomasa. Se pusieron a peso constante los papeles filtro en horno a 60°C y se filtraron los cultivos tratados con choque térmico en embudos Buchner, se les dio un enjuague con agua destilada tibia y después alcohol para arrastrar los lípidos, y se vuelve a enjuagar con agua destilada tibia.

El filtro con el bagazo es puesto a peso constante nuevamente y después se registra la cantidad. Por diferencias de pesos se encuentra cuanto se ha degradado del bagazo de caña, se calculó la eficiencia de biodegradación (%).

Aislar y caracterización de bacterias a partir de consorcios capaces celulolíticas. Después de purificar, los aislados se inocularon en medio de cultivo con CMC como único fuente de carbono para detectar su capacidad celulolítica y analizar las actividades bioquímicas con las pruebas API 20E.

Identificación de los aislados. Para identificar los aislados, ya se mandaron los genes de rRNA amplificados para secuenciarlos.

IX.2 Resultados

Selección del consorcio microbiano. Con base en los resultados, encontramos 4 consorcios microbianos estables a partir de las chinampas 4, 6, 7 y 9, los cuales fueron capaces crecer en medio basal con bagazo de caña como fuente único de carbono. Dentro de ellos, el consorcio de chinampa 4 fue mejor que otros, debido su degradación de casi el 50% (Figura 9.1), mientras poca alta producción de azucares reductores que otros, máximo a los 8 días de darse la degradación (Figura 9.1).

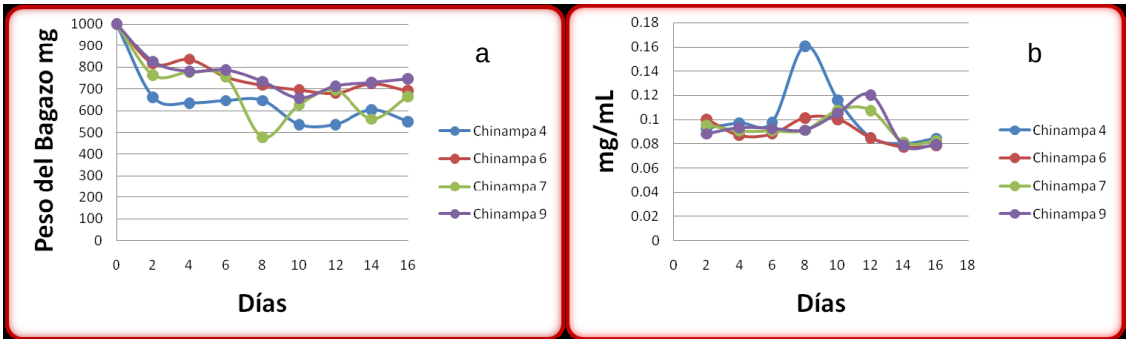


Figura 9.1 Degradación del substrato (a) y producción de azúcar reducido (b) por consorcios microbianos obtenido de las Chinampas, a partir de bagazo de caña.

Efecto del pH sobre la biodegradación. Durante la medición de la variable del pH del consorcio 4 observamos una degradación evidente del bagazo de caña durante primeros 2 días (65-75%) y se ve una degradación máxima (75-90%) al día 8 a pH 6-8. La velocidad de degradación de bagazo de caña fue más lenta a pH9, y la degradación máxima se ve hasta 12 días de incubación (Figura 9.2). Otros tres consorcios presentaron efectos similares (Figura 9.2).

Efecto de la salinidad sobre la degradación. La degradación a partir de medir el parámetro de salinidad al 1.0% utilizando el consorcio de la chinampa 4 se observa que existe una degradación durante los primeros días pero posteriores a este se incrementa hasta el día 8 donde se vuelve a dar el decremento del bagazo de caña (Figura 9.3).

El consorcio de la chinampa 4 degrada mejor a un porcentaje de salinidad del 2.0% durante los primeros 4 días, el consorcio de la chinampa 6 con un porcentaje de 1.0%, el consorcio de la chinampa 7 a 1.5% de salinidad igual que el consorcio de la chinampa 9 (Figura 9.3).

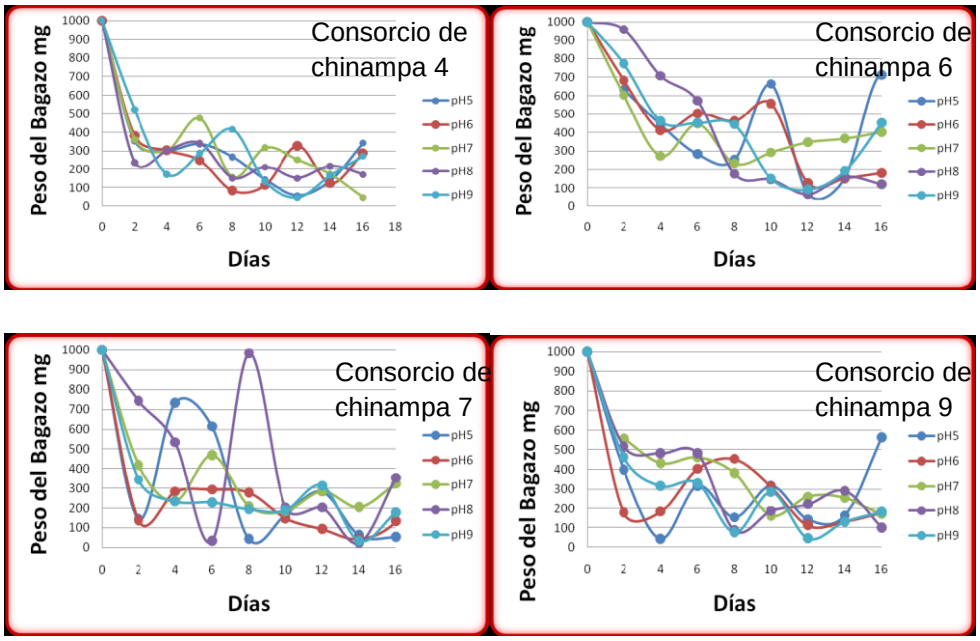


Figura 9.2 Degradación del bagazo de caña por los consorcios microbianos de las Chinampas a diferentes pH.

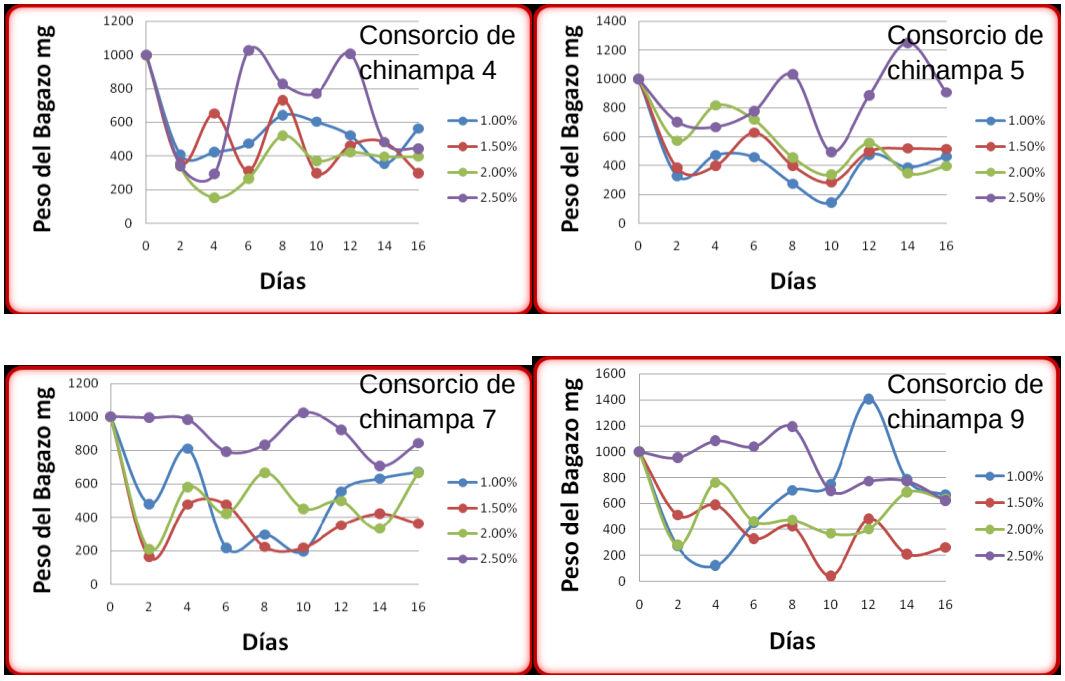


Figura 9.3 Degradación del bagazo de caña por los consocios microbianos de las chinampas a diferentes salinidades.

Aislamiento e identificación de las bacterias a partir de los consocios. En este análisis, se aislaron 36 bacterias a partir de 8 consorcios. Las características fenotípicas de estas bacterias se presentaron en la Tabla 9.1 Entre ellas, 8 son Gram-positiva, incluyendo 3 cocos y 5 de bacilos; 28 son Gram-negativas, bacilos. Todas estas bacterias son dominantes en los consorcios porque se aislaron en las diluciones de 10^{-5} o 10^{-6}, es decir que ellas tienen una abundancia mayor que 10^6 or 10^7 UFC ml^{-1} del cultivo de consorcio. De cada consorcio, se aislaron 2 cepas (consorcios V y VII) a 8 cepas (consorcios II y III).

Por las secuencias del gen 16S rRNA obtenidas hasta la fecha, ya se puede identificar algunas de estas bacterias como *Pseudomonas*. Análisis de la capacidad celulolítica de los aislados está en proceso.

Tabla 9.1 Características de las bacterias aisladas de los consorcios capaces de degradar bagazo

Cepa	Gram	Morfología	Agrupación	No. de Pase	No. de Chinampa	Dilución usada
A1	-	Bacilos muy cortos	Aislados	6°	I	10^{-6}
A 2	-	Bacilos muy cortos	Pares	6°	I	10^{-6}
A 3	+	Cocos	Racimos	6°	II	10^{-6}
A 5	+	Bacilos cortos	Pares	6°	VI	10^{-6}
A 6	+	Bacilos cortos grandes	Cadena	6°	VI	10^{-6}
A 7	+	Bacilos cortos	Pares	7°	I	10^{-6}
A 8	-	Bacilos muy cortos	Pares	7°	I	10^{-5}
A 9	-	Bacilos muy cortos	Pares	7°	I	10^{-6}
A 10	-	Bacilos cortos	Pares	7°	I	10^{-6}
A 12	-	Bacilos cortos	Aislados	7°	I	10^{-6}
A13	-	Bacilos cortos	Cadena	7°	I	10^{-6}
A14	-	Bacilos cortos delgados	Pares	7°	II	10^{-5}
A15	+	Cocos	Racimos	7°	II	10^{-5}
A17	-	Bacilos cortos gordos	Agrupados	7°	II	10^{-6}
A19a	-	Bacilos cortos delgados	Aislados	7°	III	10^{-5}
A19b	-	Bacilos muy cortos	Pares	7°	III	10^{-5}
A20a	-	Bacilos cortos	Aislados	7°	III	10^{-6}
A20b	-	Bacilos cortos gordos	Pares	7°	III	10^{-6}
A21a	+	Bacilos cortos gordos	Cadena	7°	III	10^{-6}
A21b	-	Bacilos muy cortos	Aislados	7°	III	10^{-6}

A21c	-	Bacilos muy cortos	Pares	7°	III	10^{-6}
A22	-	Bacilos muy cortos	Aislados	7°	III	10^{-6}
A26	-	Bacilos muy cortos gordos	Pares	7°	IV	10^{-6}
A27a	-	Bacilos muy cortos	Pares	7°	IV	10^{-6}
A27b	-	Bacilos muy cortos	Aislados	7°	IV	10^{-6}
A28	-	Bacilos cortos	Pares	7°	V	10^{-6}
A29	-	Bacilos muy cortos	Pares	7°	V	10^{-6}
A30	-	Bacilos muy cortos	Pares	7°	VI	10^{-6}
A31	-	Bacilos cortos delgados	Pares	7°	VI	10^{-6}
A32	+	Bacilos cortos tipo	Cadena	7°	VII	10^{-5}
A33	-	Bacilos muy cortos	Pares	7°	VII	10^{-5}
A34	-	Bacilos muy cortos	Aislados	7°	VIII	10^{-5}
A35	+	Cocos	Racimos	7°	VIII	10^{-6}
A36	-	Bacilos muy cortos	Racimos	7°	VIII	10^{-6}

Caracterización por API 20E. Estas bacterias presentan un gran diversidad en las pruebas API 20E (Tabla 9.2). Los resultados de la cepa referencia de *E. coli* fueron similares con los reportados, demostrando que los resultados de esta prueba fueron confiables.

IX. 3 Discusión

Los consorcios fueron inoculados en el medio mineral y en todos los estudios se sometieron a aireación constante ya que las bacterias anaerobias carecen de la capacidad efectiva penetrar materiales celulósicos y quizás tenía que encontrar mecanismos alternativos para degradar la celulosa y la obtención de el acceso a los productos de hidrólisis de la celulosa en la presencia de la competencia de otros microorganismos y con el ATP es limitada (Lynd et al. 2002).

El primer ensayo se encargo de medir la degradación de de los consorcios sobre el bagazo de caña sin mediar ningún parámetro se puede comprobar que los 4 consorcios presentan una eficiente degradación entre un 20 y 40% aproximadamente. A esta prueba se le sometió a azucares reductores y totales , la primera se realizó para confirmar la degradación de celulosa a glucosa y los resultados obtenidos fueron buenos ya que la cantidad de enzima presente en el sobrenadante fue suficiente para hidrolizar la celulosa y obtuvimos cantidades de azúcares reductores que fueron detectados por esta prueba.

Tabla 9.2 Resultado de las pruebas API 20E

Cepa	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2 S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU
E. coli ATCC 25922	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
A 1	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
A 2	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
A 3	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
A 5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
A 6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
A 7	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
A 8	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
A 9	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
A 10	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
A 12	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
A13	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
A14	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
A15	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
A17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A19a	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
A19b	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
A20a	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
A20b	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
A21a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
A21b	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-
A21c	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
A22	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
A26	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
A27a	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
A27b	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
A28	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
A29	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
A30	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
A31	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+

A32	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
A33	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
A34	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
A35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
A36	+	-	-	-	+	-	-		-	-	+	-

Cepa	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO_2	N_2	MOB
E. coli ATCC 25922	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	
A 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A 2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
A 3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A 5	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
A 6	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
A 7	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-
A 8	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
A 9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
A 10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
A 12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
A13	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
A14	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+
A15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A19a	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
A19b	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
A20a	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
A20b	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
A21a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
A21b	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-

A21c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A22	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
A26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A27a	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
A27b	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-
A28	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
A29	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
A30	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
A31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
A32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A33	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
A34	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
A35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Cuando los consorcios fueron encontrados se sometieron a pH 5,6,7,8 y 9 con agitación constante y temperatura de 28ºC . Recordamos que el pH encontrado en el suelo de las chinampas de Xochimilco oscila entre 7.75 y 8.6, en las figuras 53, 54, 55 y 56 podemos observar que el pH no resulta ser una factor limitante para que los consorcios degraden el bagazo de caña sin embargo existe mayor porcentaje de degradación que cuando los consorcios no fueron sometidos a ningún parámetro.

Krishna (1999), ha reportado que el pH y la temperatura de fermentación tiene una gran influencian en la producción de enzimas celulolíticas, en su investigación la mayor producción se alcanzo a pH7 manteniendo una temperatura constante de 35ºC, sin embargo el autor reporta otros estudios donde a pH6 se da mayor liberación enzimática, lo que permite afirmar que tanto el pH como la temperatura de operación en esa investigación favorecieron la hidrólisis del residuo vegetal Gaitan Bohorquez et al., 2007), sin embargo en esté trabajo encontramos que en los 4 consorcios aislados de suelos de chinampas de Xochimilco no influencio el pH ya que la degradación fue prácticamente la misma a los pH de 5, 6, 7, 8 y 9.

El pH óptimo para la actividad de las celulasas producidas por bacterias abarca un amplio rango, el cual incluye condiciones ácidas alcalinas tabla 14 por otro lado las celulasas producidas por hongos requieren generalmente un pH ácido (Gaitan Bohorquez et al. 2007).

Existe una diferencia fundamental en el mecanismo de hidrólisis de la celulosa entre bacterias y hongos aerobios y anaerobios. Los hongos y bacterias aeróbicos característicamente cuentan con un sistema de celulasas no complejo lo cual, conlleva a la secreción de enzimas hidrolíticas de celulosaen el medio de cultivo. Sin embargo, bacterias anaeróbicas especialmente *Clostridium spp.* y hongos del *género Neocallimastix*, *Piromonas y Sphaeromonas* contienen un sistema de celulasas que forman un complejo donde las enzimas que degradan la celulosa están contenidas en una membrana llamada celulosoma. Esta fundamental diferencia tiene implicaciones en el uso biotecnológi*co* de estos microorganismo, pues las basadas en bacterias y hongos anaerobios pueden tener ventajas sobre los sistemas aeróbicos en términos de eficiencia hidrolítica (Gaitan Bohorquez et al. 2007).

Las características del material celulósico en este caso el bagazo de caña difiere enormemente con respecto al tamaño y organización (Lynd et al. 2002). Dichos parámetros condicionan drásticamente la habilidad de los microorganismos celulolíticos para degradar este tipo de sustrato (Gaitan Bohorquez et al. 2007), resultaría importante someter al los consorcios a diferentes sustratos para comparar la eficiencia entre un substrato y otro.

Los consorcios también fueron sometidos a diferentes salinidades: 1.0%, 1.5%, 2.0% y 2.5% a 28ºC y aireación constante. En las figuras 78, 79, 80 y 81 vemos que la degradación es menor que cuando se someten a la variable de pH, sin embargo la degradación sigue siendo mayor que cuando no se somete a ninguna variable.

Se puede observar que no el pH no es una variable importante ya que no afecta durante la degradación del consorcio, sin embargo en cuanto a la variación de la salinidad esta si es afectada a altas concentraciones (2.5 %).

Uno de los factores que pudo haber influido en la variación de datos es la técnica utilizada para el choque térmico ya que al final de la mayoría de las figuras de pH se presenta un decaimiento y posterior a este un incremento, esto pudiera ser a la esterilización por

choque térmico que probablemente al aumentar la biomasa a lo largo de los días esta no es eliminada en su totalidad lo que trae errores en la medición al cuantificar la degradación total. Además de algunos errores en la medición.

Algunas de las recomendaciones que se podrían hacer para posteriores trabajos a este, serían: 1) Identificar los consorcios microbianos aislados; 2) Determinar el tipo de enzimas que libera cada microorganismo, evaluando la actividad de cada una de estas en sustratos específicos; 3) Buscar otro método de esterilización para la total eliminación de biomasa si se desea medir solamente la degradación; 4) Someter los consorcios a diferentes condiciones de temperatura y substratos.

Con la caracterización de los aislados, ya se puede decir que en los consorcios existen bacterias de *Pseudomonas*, y las bacterias en los consorcios presentan diversas características fenotípicas. Todavía está en proceso de esta parte.

IX.4 Conclusiones

Se obtuvieron 4 consorcios que capaces de degradar el bagazo de caña a partir de los suelos de chinampas de Xochimilco.

El pH no resultó ser un factor limitante para la actividad microbiana de los cuatro consorcios presentados. La salinidad resulto limitar su degradación un poco.

La salinidad si parece ser limitante en cuanto a la degradación que presentan sobre el bagazo de caña.

Se puede comprobar que la hipótesis planteada es cierta y dentro de las chinampas de Xochimilco se pueden encontrar consorcios capaces de degradar celulosa.

Existen diversas bacterias en los consorcios, incluyendo las de *Pseudomonas*.

X. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CONSORCIO BACTERIANO CAPAZ DE DEGRADAR PETRÓLEO

Rucio Lorenzo Martínez, tesis de licenciatura

Isaac Isidro Isidro, tesis de licenciatura

Daniel Hiram Díaz Martínez, tesis de licenciatura

Nidia Thelma Sanchez Sanchez, tesis de maestría

X.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de consorcios bacterianos mejores

En este análisis, se tomaron muestras de suelo de 10 chinampas. El muestreo se realizo en el Canal de Apatlaco, que es una zona de bajo impacto turístico, poca producción agrícola, además de que cuenta con chinampas no cultivadas. El muestreo se realizo escogiendo las chinampas aleatoriamente, delimitando el área de los primeros 20 cm, ya que de esta parte superior se encuentra la mayor cantidad de materia orgánica, existe la mayor diversidad de microorganismos, cuenta con la mayor cantidad de oxigeno, el presente trabajo se realizó con agitación para proporcionar dicho oxígeno.

Para selección del consorcio bacteriano, se colocó 1 g de cada muestra por triplicado en un matraz Erlenmeyer que contenga 100 ml de medio basal para biodegradadoras de petróleo con extracto de levadura al 0.2%. Posteriormente se le adiciona a este matraz 1 ml de petróleo y se pone a incubar en agitación a temperatura ambiente por 48 h. De los matraces que tengan crecimiento, se transfiere 1 ml del cultivo anterior a otro matraz con mismo medio de cultivo sin extracto de levadura, y remetieron este protocolo hasta que tengan un crecimiento estable.

Para medir la estabilidad del consorcio bacteriano, se tomó 1 ml del cultivo de 7 días para hacer las diluciones decimales hasta 10^{-7}, y se sembró una alícuota de 0.1 ml in duplicado en caja de Petri con medio de cultivo de PY. Después de incubar a 28°C por 2 días, se cuentearon las colonias para calcular la UFC por ml. Si la UFC por ml llegó estable y las colonias tuvieron similares en los dos subcultivos siguientes, se definió que el consorcio fue estable. Se consideraron los cultivos que tengan la UFC ml^{-1} más altas como los mejor consorcios capaces de degradar el petróleo.

Evaluación del consorcio mediante cinética de crecimiento

Esta evaluación se realizó por cuenta viable (UFC ml^{-1}) igual que en selección de consorcio bacteriano. El mismo medio de cultivo y condiciones del selección se usaron. El medio se inoculó con 1 ml de cada consorcio y se sacó 1 ml cada día para preparar diluciones decimales. En los primeros tres días se hicieron diluciones hasta 10^{-3}, y a partir de ahí cada día se aumentaron 2 adiciones, hasta que se quede en 10^{-7}, se sembraron las últimas 3 diluciones en agar nutritivo y en cajas con medio para hidrocarbonoclastas, las cuales se prepararon con el medio basal de degradadoras de petróleo por adicionar agar (18 g L^{-1}) y el hidrocarburo se puso 1 ml de petróleo en un papel filtro colocado en la tapa.

Efecto de las variables fisicoquímicas sobre la eficiencia de degradación de los hidrocarburos

Con base en los resultados de cinética, se seleccionó un consorcio bacteriano como represente de todos porque se presentaron un crecimiento similar. Con el consorcio representativo, se analizaron los efectos de temperatura, pH, cantidad de inoculo del consorcio y cantidad de hidrocarburo, estas últimas en porcentaje. El análisis se realizó por el diseño de varias interacciones.

Medición de la degradación del hidrocarburo mediación cromatografía de masa

Con el diseño realizado se analizaron las muestras, para poder analizarse primero se analizó el hidrocarburo trabajado y después de incubación de una semana se analizó la fase disuelta del cultivo de cada tratamiento con método de Salgado-Brito *et al*. (2007).

Bioensayo de biorremediación con consorcios capaces de degradar petróleo

A parte of los datos de este análisis se presentaron en las tablas 6, 7 y 8. Aunque análisis estadístico está en realizando, los datos primitivos demostraron que 1) los consorcios no hubo efecto negativo sobre el crecimiento de las plantas pruebas (trigo, frijol, *Leucaena leucocephala* y *Acacia farneciana*) porque los tratamientos con inoculo prestaron alturas o pesos de las plantas similares o mejores a los de no inoculados; 2) el efecto de la inoculación varia dependiente a tipo de plantas y tipo de suelo, porque el crecimiento en suelo de Chapingo fue mejor que el en suelo de Xochimilco, y positivo efectos se encontraron para *L. leucocephala* en ambos suelos pero solo en suelo de Chinampa para *Acacia farneciana*; 3) en suelo contaminado, inoculo hubo efectos positivos en los mayores casos (Tablas 6, 7 y 8).

X.2 RESULTADOS

Selección de consorcios microbianos

Por cuantificación del crecimiento en medio basal con petróleo como fuente único, se seleccionaron los mejores consorcios microbianos de las chinampas 2, 4, 6 y 7. Las cuales presentaron crecimiento hasta 10^8 a 10^{10} UFC ml^{-1} después de 3 días de incubación (Figura 10.1).

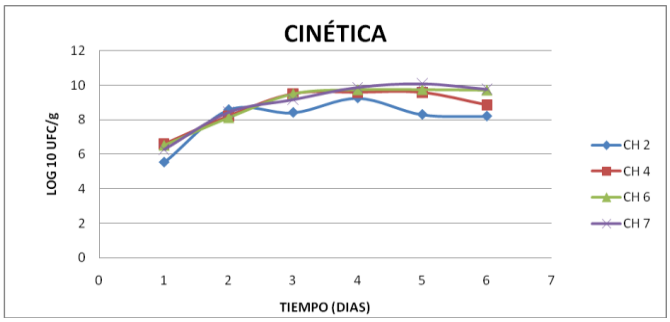


Figura 10.1 Cinética de crecimiento de los 4 mejores consorcios capaces de degradar petróleo.

Con estos resultados el consorcio para aplicar a la estimación de las condiciones óptimas de degradación fue el de la chinampa 4. Por determinación de crecimiento y de cambio de composición de petróleo, se concluyó que el diseño numero 2 representó las condiciones óptimas, correspondiente al pH7, temperatura de 28ºC, con 1% de concentración de petróleo y 2% (v/v) de inoculo de consorcio bacteriano. La modificación química del petróleo se puede ver por comparación de las cromatógramas en tiempo cero, día 7 y día 15 de incubación (Figura 10.2).

En la Figura 10.2 se encontró que el peso molecular del pico principal disminuye a 197, y que corresponde a un nonacosano con un tiempo de retención de 10.05 min. Se observa que cambio el alcano a alqueno, la degradación se va oxigenando y el número de carbonos disminuye.

Una vez analizados los cromatógramas se realiza una comparación de los compuestos para una mejor visualización de la concentración del Hidrocarburo, tomando en cuenta el tiempo de retención y el área para después calcular la remoción (%), que está presentando en la Tabla 10.1.

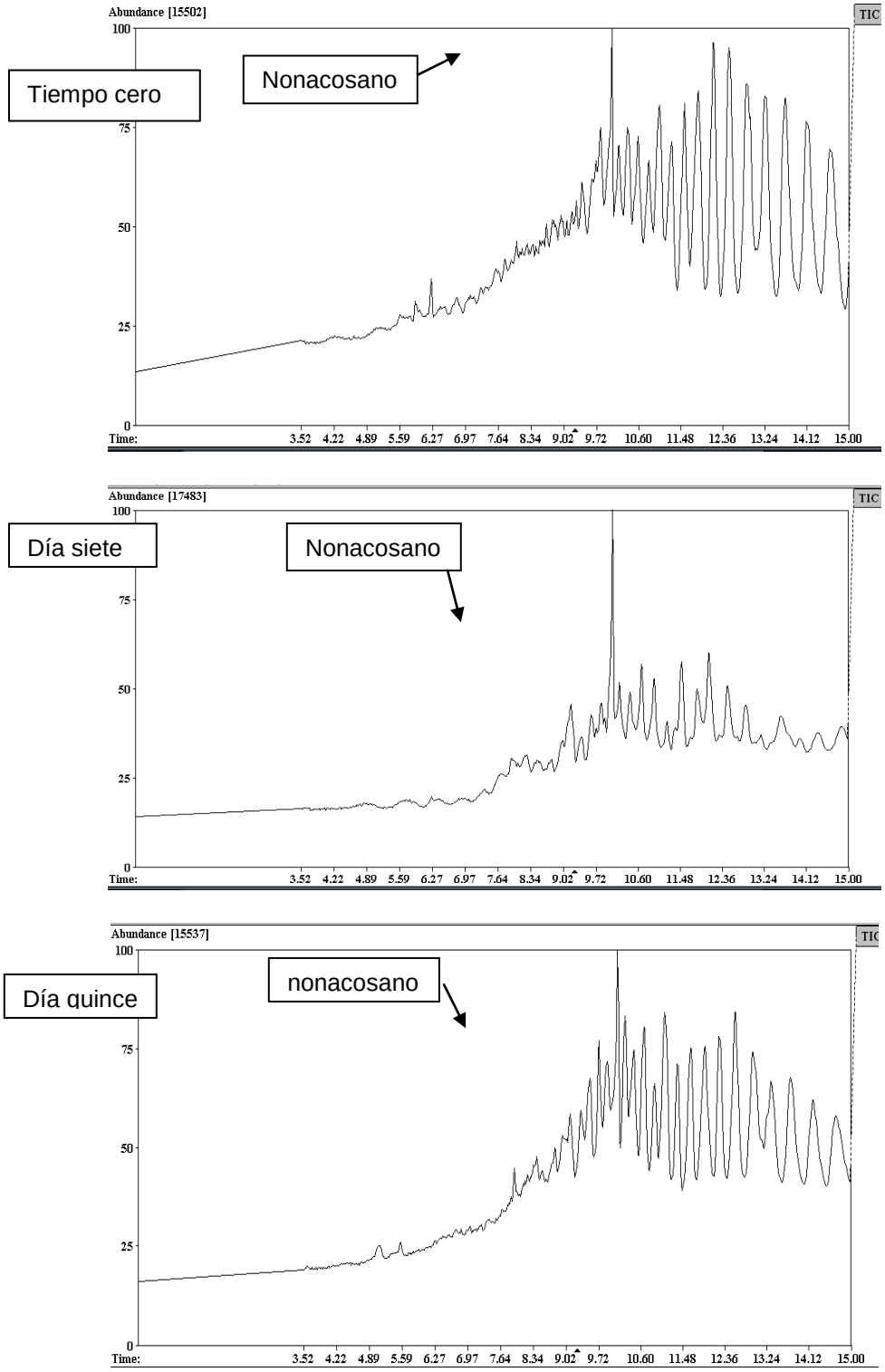


Figura 10.2 Cromatógrama de día quince, a un pH7, a una temperatura de 28ºC, con 1% de concentración de petróleo y 2% en cantidad de inoculo de consorcio. Se marca nonacosano con flecha como ejemplo para mostrar el cambio de hidrocarburos en la degradación.

Tabla 10.1 Eficiencia de remoción de hidrocarburos por el consorcio bacteriano de la chinampa 4 bajo diferentes tratamientos

Tratamiento	Concentración (%) de hidrocarburos			Remoción (%) al fin
	Tiempo 0	Día 7	Día 15	
Testigo	38.343	38.343	38.343	0
1	13.921	7.620	13.253	4.7
2	**46.186**	30.734	**27.148**	**41.2**
3	32.991	22.885	38.666	0
4	47.797	43.177	37.961	20.5
5	30.868	14.618	27.922	9.5
6	35.557	68.905	28.122	20.9
7	33.869	41.759	47.907	0
8	60.543	62.934	50.088	17.3
9	30.860	31.472	28.070	9.0

Con base en crecimiento y remoción de petróleo se definió el consorcio de la chinampa 4 como el mejor degradador de petróleo y se definieron las mejores condiciones de la degradación como un pH7, a 28ºC, con 1% en cantidad de hidrocarburo y 2% de cantidad de inoculo del consorcio. Y el tiempo de siete días, en el cuál se tuvieron de hasta 10^8 UFC ml^{-1}, fue suficiente para el enriquecimiento del consorcio.

Generalmente, la selección de bacterias degradadotas de petróleo usando los suelos contaminados por hidrocarburos o petróleo como recurso (Haritash y Kaushik 2009; Hazen et al. 2010; Soleimani et al. 2010; Táncsics et al. 2010; Wyszkowska y Wyszkowski 2010; Yousaf et al. 2010). El presente estudio demostró que los suelos ricos en materia orgánica como las chinampas también sirven para buscar las degradadotas de petróleo.

Con el consorcio bacteriano seleccionado, se puede eliminar más que 46% de petróleo en el medio de cultivo, mientras se puede cambiar el petróleo de color negro al color café claro, como suelo y formó una emulsión. Estos resultados indicaron que el consorcio tiene potencial a usar en biorremediación.

La composición química de petróleo es muy compleja, contiene hidrocarburos lineares y aromáticos. Con base en su origen de las materiales vegetales, los compuestos de petróleo tienen algunas similitudes en estructuras moleculares. Por eso, es posible que algunos de los microorganismos degradadores de compuestos vegetales en suelos ricos de materia orgánica, como los de las chinampas, también pudieran degradar el petróleo. Los resultados de este estudio confirmaron esta hipótesis y varios consorcios microbianos capaces de degradar petróleo se obtuvieron a partir de los suelos de distintas chinampas. Pero las diferencias en la cinética de crecimiento indicaron que la microbiota de diferentes chinampas varía.

Con base en crecimiento y remoción de petróleo se definió el consorcio de la chinampa 4 como el mejor degradador de petróleo y se definieron las mejores condiciones de la degradación como un pH7, a 28ºC, con 1% en cantidad de hidrocarburo y 2% de cantidad de inoculo del consorcio. Y el tiempo de siete días, en el cuál se tuvieron de hasta 10^8 UFC ml^{-1}, fue suficiente para el enriquecimiento del consorcio.

Generalmente, la selección de bacterias degradadotas de petróleo usando los suelos contaminados por hidrocarburos o petróleo como recurso (Haritash y Kaushik 2009; Hazen et al. 2010; Soleimani et al. 2010; Táncsics et al. 2010; Wyszkowska y Wyszkowski 2010; Yousaf et al. 2010). El presente estudio demostró que los suelos ricos en materia orgánica como las chinampas también sirven para buscar las degradadotas de petróleo.

Con el consorcio bacteriano seleccionado, se puede eliminar más que 46% de petróleo en el medio de cultivo, mientras se puede cambiar el petróleo de color negro al color café claro, como suelo y formó una emulsión. Estos resultados indicaron que el consorcio tiene potencial a usar en biorremediación.

Bioensayo de biorremediación con consorcios capaces de degradar petróleo

A parte of los datos de este análisis se presentaron en las tablas 6, 7 y 8. Aunque análisis estadístico está en realizando, los datos primitivos demostraron que 1) los consorcios no hubo efecto negativo sobre el crecimiento de las plantas pruebas (trigo, frijol, *Leucaena leucocephala* y *Acacia farneciana*) porque los tratamientos con inoculo prestaron alturas o pesos de las plantas similares o mejores a los de no inoculados; 2) el efecto de la inoculación varia dependiente a tipo de plantas y tipo de suelo, porque el crecimiento en suelo de Chapingo fue mejor que el en suelo de Xochimilco, y positivo efectos se

encontraron para *L. leucocephala* en ambos suelos pero solo en suelo de Chinampa para *Acacia farneciana*; 3) en suelo contaminado, inoculo hubo efectos positivos en los mayores casos (Tablas 10.2, 10.3 y 10.4).

Tabla 10.2. Efectos de consorcio capaz de degradar petróleo sobre crecimiento de frijol en diferentes suelos

Tratamiento	Tamaño de planta	Tamaño de hoja	Tamaño de raiz	# de hojas	Peso húmedo
Xochimilco-con Inoculo	109.7	5.0	9.2	9.6	**3.2**
Xochimilco-sin inoculo	115.2	5.4	10.0	9.0	**3.7**
Xochimilco-cont.-con Inoculo	99.7	4.6	10.1	8.6	**2.9**
Xochimilco-cont.-sin inoculo	103.2	5.0	11.6	7.0	**2.5**
Chapingo-con inoculo	116.7	5.6	18.5	9.5	**3.4**
Chapingo-sin inoculo	98.8	5.8	8.4	14.7	**4.2**
Chapingo-cont. con inoculo	99.8	5.0	14.2	7.9	**2.6**
Chapingo-cont. sin inoculo	110.0	5.5	8.8	7.8	**3.2**

Tabala 10.3. Efectos de consorcio capaz de degradar petróleo sobre crecimiento de *Leucaena* en diferentes suelos

Tratamiento	Raíz (cm)	Tamaño de Planta (cm)	Numero de hojas	Tamaño de hojas (cm)	Numero de Nódulos	Peso húmedo
Suelo de Chiapingo						
Contaminado con inoculo	9.0	37.7	6.7	8.2	-	**1.37**
Contaminado sin inoculo	4.6	22.9	5.7	3.9	0	**0.73**
No contaminado con inoculo	7.3	33.9	6.0	6.0	0	0.94
No contaminado sin inoculo	10.1	39.4	6.7	7.8	0	1.44
Suelo de Xochimilco						
Contaminado con inoculo	7.5	25.0	5.7	4.7	-	**0.62**
Contaminado sin inoculo	5.5	16.8	1.7	2.3	0	**0.36**
No contaminado con inoculo	8.8	25.6	6.3	4.6	0	0.80
No contaminado sin inoculo	11.2	30.4	5.5	5.6	0	0.81

Tabala 10.4 Efectos de consorcio capaz de degradar petróleo sobre crecimiento de *Acacia farneciana* en diferentes suelos

Muestra	Raíz (cm)	Tamaño de Planta (cm)	Numero de hojas	Tamaño de hojas (cm)	Numero de Nódulos	Peso húmedo
Suelo de Chiapingo						
Contaminado sin inoculo	10.2	26.4	11.4	3.4	0	**0.74**
Contaminado con inoculo	9.5	21.4	10.0	2.8	0.43	**0.41**
No contaminado sin inoculo	6.7	20.5	10.6	3.1	0	0.52
No contaminado con inoculo	11.7	29.3	13.8	3.3	0.29	0.86
Suelo de Xochimilco						
Contaminado sin inoculo	5.1	14.8	7.5	2.4	0	**0.30**
Contaminado con inoculo	6.0	17.0	9.2	2.3	0	**0.46**
No contaminado sin inoculo	7.0	19.1	9.7	2.6	0	0.41
No contaminado con inoculo	10.5	25.5	10	2.7	0	0.53

X.3 Conclusiones

El crecimiento de bacterias en el consorcio trabajado fue optimo a pH7, con una temperatura de 28ºC, cantidad de inoculo de consorcio de 2 % y 1 % de concentración de hidrocarburo, ya que en el cromatógrama se vio una mejor disminución de picos, y de peso molecular, además del rompimiento de carbonos, con lo que se observa un aumento de carbonos, esto se vio favorecido por la oxigenación que se tuvo en toda la experimentación.

Además de que a esa temperatura les favoreció, y se confirmo que el tiempo de mejor degradación fue de siete días, ya que fue lo que se encontró en el momento de realizar la Cinética de Crecimiento, y al observar el cambio de color, también se veía la degradación al presentar una disminución de aceite, y un cambio de color.

Por lo que se concluye que en Xochimilco hay la materia orgánica necesaria, con microbiota capaz de degradar los Hidrocarburos, de fracciones pesadas a más ligeras y menos toxicas al ambiente.

XI. **CONCLUSIÓN GENERAL**

Este trabajo fue el primero estudio sobre la microbiota en suelo de las chinampas.

Existen en este suelo diversas bacterias, incluyendo algunas nuevas, las cuales juegan papeles importantes en los ciclos principales para mantener la fertilidad y tienen potencial en suo como recurso de biotecnología.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas fueron diversas en este suelo y se identificaron en los géneros *Agrobacterium, Bacillus, Pseudomonas, Pseudostenotrophomonas, Stenotrophomonas, Rhizobium, Serratia, Sinorhizobium, Streptomyces* y una bacteria anaerobia no identificada. Pero la actividad de nitrogenas es baja en los suelos de las chinampas.

Las bacterias solubilizadoras de fosfato en estos suelos son *Acinetobacter*, *Bacillus, Pseudomonas, Ralstonia, Rhodococcus, Serratia, Sphingomonas, Staphylococcus* y *Stenotrophomonas,* las cuales tienen potenciales para promover el crecimiento de las plantas.

Las baterías degradadoras de celulosa en estos suelos son *Acinetobacter*, *Agromyces, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacillus, Cellulomonas, Corynobacterium, Delftia, Hyphomicrobacterium, Knoellia, Leucobacter, Microbacterium, Nocardioides, Promicromonospora, Pseudoxanthomonas*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas, Staphylococcus*, *Stenotrophomona*s, *Streptomyces* y *Xanthomonas.* Estas bacterias son recursos para buscar las cepas o enzimas adadtadas a ambiente alcalino y salino, y también son capaces de degradar hemecelulosa etc.

Se seleccionaron consorcios bacterianos capaces de degradar petróleo y gabazo de caña, los cuales tienen potencial a la aplicación en biorremedición de suelos contaminantes por petróleo o biotransformación de celulosa.

Con este proyecto, se realizaron tres tesis de posgrado y cinco tesis de licenciatura. Este trabajo también amplia el conocimiento de las chinampas por las publicaciones, las cuales pueden generar más atenciones de las personas y organizaciones para desarrollar y proteger este sistema valioso.

XII. BIBLIOGRAFÍA SELECTIVA

Afzal A, Asghari B. 2008. *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). Int J Agri Biol 10:85-88.

Agüero CJ, Pisa JR, Andina RL. 2006. Consideraciones Sobre el Aprovechamiento Racional del Bagazo de Caña como Combustible. Investigación y Desarrollo 27:

Albores ZB. 1998. Origen pre-mexica de las chinampas en 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 33rd IFLA World Congress. Paradise on Earth: The Gardens of the XXI Century, International Federation of Landscape Architects. Italian Association of Landscape Architecture. Florencia.

Alcántara-Hernández RJ, Rodríguez-Álvarez JA, Valenzuela-Encinas C, Gutiérrez-Miceli FA, Castañón-González H, Marsch R, Ayora-Talavera T, Dendooven L. 2010. The bacterial community in 'taberna' a traditional beverage of Southern Mexico. Lett Appl Microbiol. 51:558-563.

Alef K, Nanniepieri P. 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Ed Academic Press pp. 120-124.

Altieri MA. 2000. Applying agroecology to enhance the productivity of peasant farmins systems in Latin America. Environ Develop Sustain. 1:197-212.

Apel AK, Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Martín JF. 2007. Phosphate control on phoA, phoC y phoD gene expression in *Streptomyces coelicolor* reveal significant difference in binding of PhoP to their promoting regions. Microbiology 153:3527-3537.

Asghar HN, Zahir ZA, Arshad M, Khaliq A. 2002. Relationship between invitro production of auxins by rhizobacteria and their grown-promouting activities in *Brassica juncea* L. Biol Fert Soil. 35:231-237.

Baakza A., Vala A.K., Dave B.P., Dube H.C. 2004. A comparative study of siderophore production by fungy from marine and terrestrial habitats. J Experim Marine Biol Ecol. 311:1-9.

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.

Barik S.K., Purushothaman C.S., Mohanty A.N. 2001. Phosphatase activity with reference to bacteria and phosphorus in tropical freshwater aquaculture ponds systems. Acuacul Res. 32:819-832.

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 *Ceratitis Capitata*. Mol Ecol. 14:2637-2643.

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.

Bey BS, Fichot EB, Dayama G, Decho AW, Norman RS. 2010. Extraction of high molecular weight DNA from microbial mats. Biotechniques. 49:631-640.

Biswas JC, Ledha JK, Dazzo FB. 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of Lowland rice. Soil Sci Soc Am Proc. 64:1644-1650.

Boavida MJ, Wetzel RG. 1998. Inhibition of phosphatase activity by disolved humic substances and hidrolitic reactivation by natural ultraviolet light. Fresh Water Biol. 40:285-293.

Boll-Argüello G, Féliz-Soto NJ, Lemos-Pastrana A, TMejía-Coahuila, Pescador-Elizondo N, Varela-Fregoso L. 2006. Manual del curso Práctico de Ecología Microbiana

Cardon CA, Julián-Sánchez O, Montoya MI, Quintero JA. 2005. Simulación de los procesos de obtención de etanol a partir de caña de azúcar y maíz. Scientia et Technica Año XI No 28 Octubre UTP. ISSN 0122-1701

Bridges JR. 1981. Nitrogen-Fixing Bacteria associated with bark beteles. Microb Ecol 7:131-137.

Chang C-H, Yang S-S. 2009. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparation. Biores Techno. 100:1648-1658.

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. Artic plant physiological ecology: a challenge for the future. In: Chapin FS, Jeffereries RL, Reynolds JF, Shaver GR. (Eds.) Artic Ecosystems in a Chaging Climate: An Ecophysiological Perséctive. Academic Press, San Diego pp 3-8.

Chen H, Qiu W. 2010. Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. Biotechnol Adv. 28:556-562.

Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. 2005. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl Soil Ecol. 34:33-41.

Coe M. 1964. The Chinampas of Mexico. Sci American 211:90-98.

Criss RE, Davisson ML. 2004. Guest Editorial: Fertilizers, Water Quality, and Human Health. Environmental Health Perspectives, 112: A536.

Croosley PL. 2004. Sub-irrigation in Wetland agriculture. Agri Human Val. 21:191-205.

De Bashan LE, Bashan Y. 2004. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). Water Res. 38: 4222-4246.

Dejonghe W, Berteloot E, Goris J, Boon N, Crul K, Maertens S, Höfte M, De Vos P, Verstraete W, Top EM. 2003. Synergistic Degradation of Linuron by a Bacterial Consortium and Isolation of a Single Linuron-Degrading *Variovorax* Strain. Appl Environ Microbiol. 69:1532-1541.

Deslippe RJ, Egger NK. 2006. Molecular diversity of *nif*H genes from bacteria associated with high arctic Dwart Shrubs. Microb 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.

Donate-Correa J., Leon-Barrios M., Pérez-Galdona R. 2004. Sreening of plant growth promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic on the Canary Islands. Plant Soil. 266:261-272.

Eid AR, Awad MN, Hamouda HA. 2009. Evaluate effectiveness bio and mineral fertilization on the growth parameters and marketable cut flowers of *Matthiola incana* L. Ame-Eur J Agri Environ Sci. 4:509-518.

Enríquez-Poy M. 1998. ¿Representa el etanol una alternativa viable para la agroindustria de la caña de azúcar? (C.N.I.A.A Revista Ingenio octubre 1998) Caso de México.

Enríquez-Poy M. 2005. Producción de etanol anhidro en ingenios azucareros. TECNOVIDA. Revista: ENERGÍA RACIONAL, pág. 18/24. No. 60 http://www.fide.org.mx/difusion/Revista_Files/ER-63/produccion_etanol.pdf

Ezcurra E. 1995. De las Chinampas a la Megalópolis. La Ciencia Desde México. 91. SEP. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Fernández LA, Zalba P, Gómez MA. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfatos inorgánicos aisladas de suelos de la Región de Sojera. Suelo (Argentina). 1:31-37.

Fernandez-Muerza A. 2008. Biocombustible con celulosa. Revista: Consumer Eroski. Enero 2008 - Nº 117. www.consumer.es

Fernandez-Muerza A. 2009. Biocombustibles de 2da generación. Revista: Consumer Eroski Agosto 2009- Nº135. www.consumer.es

Ferrera CR, Pérez MJ. 1995. Agromicrobiología útil en la agrcultura sustentable. Colegio de Postgraduados en Cienecias Agricolas. Montecillo, Estado de México.

Fierer N, Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proc Natl Acad Sci USA. 103:626–631.

Filippelli G. 2008. The global phosphorus cycle: past, present and future. Geochem Soil Element. 4:89-95.

Gadkari D, Morsdorf G, Meyer O. 1992. Chemolithoautotrophic assimilation of dinitrogen by Streptomyces thermoautotrophicus UBT1: identification of an unusual N_2-fixing system. J Bacteriol.. 92:6840-6843.

Gaitan-Bohorquez DM, Pérez-Pérez LI. 2007. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis, Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencia Bogotá, D.C.

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. 42:243-270.

García-Martínez, J., Acinas, S.G., Antón, A.I., Rodríguez-Valera, F. (1999) Use of the 16S–23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. J Microbiol Meth. 36:55–64.

Gen-Fu W, Xue-Ping Z. 2005. Characterization of phosphorus-releasing bacteria in a small eutrophic shallow lake, Eastern China. Water Res. 39:4623-4632.

Ghosh A, Maity B, Cakrabari K, Chattopadhya Y. 2007. Bacterial diversity of east Calcutta wet land area: Possible identification of potential bacterial population for diferent biotechnological uses. Microb Ecol. 54:452-459.

Glickmann E, Dessaux Y. 1994. A Critical examination of the specifity of the Salkowski reagent for indlic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Appl Envirn Microbiol. 61:793-796.

Goldstein AH, Krishnaraj PU. 2007. Phosphate solubilizing microorganisms vs. phosphate mobilizing microorganisms: What separates a phenotype from a trait? En Velázquez E., Rodríguez-Barrueco C. (eds.) Develop Plant Soil Sci. 102: 203-213.

Guillén-Solís O. 2005. El uso de cultivos energéticos en México. Revista: Energía a debate. Junio 2005. http://www.energiaadebate.com/Articulos/junio-julio2005/junio_2005.htm

Gurgui C, Piel J. 2010. Metagenomic approaches to identify and isolate bioactive natural products from microbiota of marine sponges. Methods Mol Biol. 668:247-264.

Gürtler, V., Stanisich, V.A. (1996) New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. Microbiology. 142:3–16.

Hamdali H, Hafidi M, Virolle MJ, Ouhdouch Y. 2008. Rock phosphate-solubilizing actinomicetes: screening of plant growth activities. World J Microbiol Biotech. 24:2565-2575.

Haritash AK, Kaushik CP. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. J Hazard Mater. 169:1-15.

Hazen TC, Dubinsky EA, DeSantis TZ, Andersen GL, Piceno YM, Singh N, Jansson JK, Probst A, Borglin SE, Fortney JL, Stringfellow WT, Bill M, Conrad ME, Tom LM, Chavarria KL, Alusi TR, Lamendella R, Joyner DC, Spier C, Baelum J, Auer M, Zemla ML, Chakraborty R, Sonnenthal EL, D'haeseleer P, Holman HY, Osman S, Lu Z, Van Nostrand JD, Deng Y, Zhou J, Mason OU. 2010. Deep-sea oil plume enriches indigenous oil-degrading bacteria. Science. 330:204-208.

Hernández-Nodarse MT. 2007. Tendencias actuales en la Producción de Bioetanol. Facultad de Ingeniería - Universidad Rafael Landívar Boletín Electrónico No. 08. URL_08_ING01.pdf 1 de 17. http://www.tec.url.edu.gt/boletin/URL_08_ING01.pdf

Hsu FS, Buckley HD. 2009. Evidence for the functional significance of diazotroph community in soil. ISME J. 3:124-136.

Irnayuli RS, Yasuyuki H, Santoso E, Tahara S. 2007. Potent phosphate solubilizing bacteria isolated from *Dipterocarps* grown in peat swamp fores in Central Kalimantan and their possible utilization for biorehabilitation of degraded peatland. *In* Proceedings of the International Symposium on Tropical Peatlands: Vulnerabilities, Risks and Mitigation Measures.

Izquierdo JA, Nusslein K. 2006. Distribution of extensive *nif*H gene diversity across physical soil microenvironments. Microb Ecol. 51:441-452.

Jackson ML. 1970. Análisis químico de los suelos 2ª edición, editorial Omega. Barcelona.

Jaime-Acosta WE, Borja-Gutiérrez MA. 2010. Microbiología aplicada a la generación de energías alternativas. http://www.engormix.com/microbiologia_aplicada_generacion_energias_s_articulos_2795_AGR.htm

Julián-Sánchez O, Ariel-Cardona C, Sánchez DL. 2007. Análisis del ciclo de vida y su aplicación a la producción de bioetanol: una aproximación cualitativa. Universidad EAFIT 43:59-79.

Lázaro-Belanche L, Arauzo-Pérez J. 1994. Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. Hidrólisis enzimática. Departamento de Ingeniería Química y T.M.A. Centro Politécnico de Ingeniería. Universidad de Zaragoza.

López-Pérez T, Domínguez-Malfavón L, García-Mena J. ¿año? Arreglo estructural de un consorcio microbiano de interés alimentario, en la producción de vinagre. Cartel. Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV Unidad Zacatenco.

Kapanen G. 2008. Phosphorus fraction in lake sediments. Eston J Ecol. 57:244-255.

Khan Z, Doty Sl, 2009. Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. Plant Soil. 322:197-207

Knowless R. 1997.The significanceof asymbiotic dinitrogen fixacion by bacteria. In: R. Hardy y A Gibson (eds). A treatise on dinitrogen fixacion, Sction IV, Jhon Wiley and Sons. New York. EUA. pp.33-83.

Kortstee GJJ, Appeldoorn KJ, Bonting CFC, Van Neil EWJ, Van Veen HW. 2000. Recent developments in the biochemestry and ecology of enhanced biological phosphorus removal. Biochemestry (Moscow). 3:394-404.

Kowalchuck GA. Stephen JR. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria; a model form molecular microbial ecology. Ann Rev Microbiol. 55:485-529.

Kuykendall LD, Hashem SM, Wang ET. 2005. Genus VII. *Sinorhizobium* de Lajudie et al. 1994, 715^{AL}. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition, *Vol. 2*. Ed. Por DJ Brenner, NR Krieg, JT Staley. Editorial Burgey´s Manual Trust. USA. pp. 358-361.

Lakhdari O, Cultrone A, Tap J, Gloux K, Bernard F, Ehrlich SD, Lefèvre F, Doré J, Blottière HM. 2010. Functional metagenomics: a high throughput screening method to decipher microbiota-driven NF-κB modulation in the human gut. PLoS One. 5(9). pii: e13092

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, Barbosa HR. 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.

Litaor MI, Reichmann KA, Heim A, Shenker M. 2004. The geochemistry of phosphorus in peat soils of a semiarid altered wetland. Soil Sci. Soc. Am Proc. 68: 2078-2085.

Liu S. 2010. Woody biomass: Niche position as a source of sustainable renewable chemicals and energy and kinetics of hot-water extraction/hydrolysis. Biotechnol Adv. 28:563-582.

Mahmood KW, Yang N, Kidhwar Z, Rajputy A, Arijo A. 2006. Study of cellulolytic soil fungi and two nova species and new medium. J Shejiang Uni Sci 7:459-466.

Marschner H. 1990. Mineral nutrition on higer plants. Academic press, The University Press North Ireland, pp. 226-242.

Megha JY, Alagawadiand AR, Krishnaraj PU. 2007. Multiple beneficial functions of fluorescent pseudomonads of Western Gaths of Uttara Kannada District. Karnataka J Agri Sci. 20:305-309.

Mittal A, Singh P. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by developed consortium in microcosms study. The Internet J Microbiol. 7 (1)

Moore PA, Reddy KR, Graetz DA. 1991. Phosphorus geochemistry in the sediment-water column of a hypereutrophic lake. Journal of Environmental Quality, 20:869-875.

Mukesh P, Suma ?, Lakshmipathi V. 2004. Isolation of phytate hydrolising microbial starins from traditional waste water of rice fermentation and liquid cattle feeds. World J Microbiol Biotech. 20:531-534.

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 Microbial 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.

Nolan BT, Ruddy BC, Hitt KJ, Helsel DR. 1988. A National Look at Nitrate Contamination of Ground Water. Water Cond Puri. 39:76-79.

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.

Ok-Ryul S, Seung-Jin L, Yong-Seok L, Sang-Cheol L, Keun-Ki K, Yong-Lark C. 2008. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* DA23 isolated from cultivated soil. Braz J Microbiol. 39:151-156.

Outerbridge T. 1987. The disappearing chinampas of Xochimilco. Ecologist 17:76-83.

Pasek MA. 2008. Rethinking early Earth phosphorus geochemistry. Proc Natl Acad Sci USA. 105:853-858.

Paul EA. 2007. Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry, 3rd ed. Elsevier Academic Press. Burlington MA USA, pp. 391-400.

Ponmurungan P, Gopi C. 2006. Distribution pattern and screening of phosphate solubilizing bacteria isolated from different food and forage crops. J Agron. 4:600-604.

Poonguzhali S, Madaiyan M, Sa T. 2006. Cultivation-dependent characterization of rhizobacterial comunities from field grown Chinese cabagge *Brassica campestris* ssp. Pekinensis and screening of traits for potential plant growth promotion. Plant Soil. 286:167-180.

Popavath RN, Nirakar S, Devrishi G, Niraikulam A, Natarajan S. 2008. Genetic and functional diversity among fluorescent pseudomonads isolated from the rizosphere of banana. Microb Ecol. 56:492-504.

Quintero-Ramírez R. 2008. El papel de la bioenergía en México. Universidad Iberoamericana

Rabie GH, Al-Humiany A. 2004. Role of AV mycorrhiza on the growth of cowpea plant and their associative effect with N_2-fixing and P-solubilizing bacteria as biofertilizer in Calcareous soil. J Food Agr Environ. 3:186-192.

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 JC. 2005. Nitrogen fixing nodules from rose Word trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belong*ing* to α y β- *proteobacteria.* Mol Ecol 14:4135-4146.

Reale A, Konietzny U, Coppola R, Sorrentino E, Greiner R. 2007. The importance of lactic acid bacteria for phytate degradation during cereal dough fermentation. J Agric Food Chem. 55:2993-2997.

Reddy KR, Wang Y, DeBusk WF, Fisher MM, Newman S. 1998. Forms of soil Phosphorus in Selected Hydrologic Units of Florida Everglades. Soil Sci Soc Am J. 62:1134-1147.

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. Brazil J Microbiol 39:414-422.

Ribbe M, Gadkari D, Meyer O. 1997. N_2 fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N_2 reduction to the oxidation of superoxide produced from O_2 by a molybdenum-CO dehydrogenase. J Biol Chem 272: 26627–26633.

Rodriguez H, Fraga T, Bashan Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and potential. Syst Appl Microbiol. [Epub ahead of print]

Rosewarne CP, Pope PB, Denman SE, McSweeney CS, O'Cuiv P, Morrison M. 2010. High-Yield and Phylogenetically Robust Methods of DNA Recovery for Analysis of

Microbial Biofilms Adherent to Plant Biomass in the Herbivore Gut. Microb Ecol. 2010 Sep 14. [Epub ahead of print]

Salaque MA, Naher UA, Islam A, Phatan ABMBU, Hossain ATMS, Meisner CA. 2004. Inorganic and Organic Phosphorus Fertilizer Effects on the Phosphorus Fraction in Wetland Rice Soils. Soil Science Society of America Journal, 68:1635-1644.

Sambrook J, De Sauza FA, Van Elsas JD. 2002. Molecular method to asses the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. Appl Environ Microbiol 68:595-603.

Sanchez O, Diestra E, Esteve I, Mas J. 2005. Molecular Characterization of an Oil-Degrading Cyanobacterial Consortium. Microbial Ecology. 50: 580-588.

Sebastian M, Ammerman JW. 2009. The Alkaline Phosphatase PhoX is More Widely Distributed in Marine Bacteria Than the Classical PhoA. The ISME Journal, 3:563-572.

Secretaria de Medio Aambiente y Recuesos Naturales. 2000. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Diario Oficial de la Federación.

Seo JS, Keum YS, Li QX. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. Int J Environ Res Public Health. 6:278-309.

Shaomei H, Gu AZ, McMahon KD. 2007. Progress Toward Understanding the Distribution of *Accumulibacter* Among Full-Scale Enhanced Biological Phosphorus Removal Systems. Microbial Ecology, 55:229-236.

Siddhapura PK, Vanparia S, Purohit MK, Singh SP. 2010. Comparative studies on the extraction of metagenomic DNA from the saline habitats of Coastal Gujarat and Sambhar Lake, Rajasthan (India) in prospect of molecular diversity and search for novel biocatalysts. Int J Biol Macromol. 47:375-379.

So A, Pel J, Rajan S, Marziali A. 2010. Efficient genomic DNA extraction from low target concentration bacterial cultures using SCODA DNA extraction technology. Cold Spring Harb Protoc. doi: 10.1101/pdb.prot5506.

Soleimani M, Afyuni M, Hajabbasi MA, Nourbakhsh F, Sabzalian MR, Christensen JH. 2010. Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. Chemosphere. 81:1084-1090.

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.

Suliasih SW. 2005. Isolation and Identification of Phosphate Solubilizing and Nitrogen Fixing Bacteria from Soil in Wamena Biological Garden, Jayawijaya, Papua. Biodiversitas, 5:175-177.

Táncsics A, Szabó I, Baka E, Szoboszlay S, Kukolya J, Kriszt B, Márialigeti K. 2010. Investigation of catechol 2,3-dioxygenase and 16S rRNA gene diversity in hypoxic, petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. Syst Appl Microbiol. 33:398-406.

Thompson LM, Troe FR. 2002. Los suelos y su fertilidad. Editorial Reverte S.A. España. Pp 331-360.

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.

Vatamaniuk OK, Bucher EA, Ward JT, Rea PA. 2001. A new Pathway For Heavy Metal Detoxification in animals. Journal of Biological Chemestry, 24:20817-20820.

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.

Vieites JM, Guazzaroni ME, Beloqui A, Golyshin PN, Ferrer M. 2010. Molecular methods to study complex microbial communities. Methods Mol Biol. 668:1-37.

Villadas PJ, López FM, Saad RH, Toro N. 2006. Rhizosphere-Bacterial Community in *Eperua falcata (Caesalpiniaceae)* a putative nitrogen-fixing tree from French Guiana Rainforest. Microb Ecol 53:317-327.

Vincent JM.1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In IBP-Handbook, vol 15. Blackwell Oxford.

Wang ET, Tan YZ, Guo WX, Duran RR, Boll G. Romero ME. 2006. Diverse endophytic bacteria isolated from a leguminous tree *Conzattia multiflora* grown in Mexico. Archives of Microbiology 186:251-259.

Weber C, Farwick A, Benisch F, Brat D, Dietz H, Subtil T, Boles E. 2010. Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. Appl Microbiol Biotechnol. 87:1303-1315.

Weisburg WG, Bams SM, Pelletior 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 *nif*H 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.

Wu G, Liu J, Ye Z. 2009. Characterization of Phosphobacteria Isolated From Eutrophic Acuatic Ecosystems. Microbiology, 78, 6:769-775.

Wu JR, Shein JH, Shieh HK, Hu CC, Gong SR, Chen LY, Chang PC. 2006. Clonning of the gene and characterization of the enzymatic properties of the monomeric alkaline phosphatase (PhoX) from *Pasteurella multocida* strain X-73. FEMS Microbiology Letters, 267:113-120.

Wyszkowska J, Wyszkowski M. 2010. Activity of soil dehydrogenases, urease, and acid and alkaline phosphatases in soil polluted with petroleum. J Toxicol Environ Health A. 73:1202-1210.

Yadav AK, Ray Chaudhuri S, Motsara MR. 2001. Recent Advances in Biofertilizer Technology. Society for Promotion and Utilisation of Resources and Technology.

Yanase S, Yamada R, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. 2009. Direct fermentation of cellulosic materials to ethanol using yeast strains codisplaying three types of cellulolytic enzyme. J Biosc Bioengin. 108(Supplement 1): S52.

Yousaf S, Andria V, Reichenauer TG, Smalla K, Sessitsch A. 2010. Phylogenetic and functional diversity of alkane degrading bacteria associated with Italian ryegrass (Lolium multiflorum) and Birdsfoot trefoil (Lotus corniculatus) in a petroleum oil-contaminated environment. J Hazard Mater. 184:523-532.

Zani S, Mellon MT, Collier JL, Zher JP. 2000. Expresion of *nif*H Genes in Natural Microbial Assemblages in Lake George, New York, Detected by Reverse Transcriptase PCR. Appl Enciron Microbiol 66:3119-3124.

Zehr J, Jenkins BD, Short SM, Steward GF. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cros-system comparison. Environ Microbiol 5:539-554.

Zhang L, Hurek T, Reinohold H. 2007. A *nif*H-based oligonucleotide microarray for functional diagnostics of nitrogen-Fixing microorganisms. Microb Ecol 53: 456-470.

Zhou J, Brums MA, Tuedje J. 1995. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl Environ Microbiol 62:316-322.