



Benemérita **Universidad Autónoma de Puebla**

Facultad de Ciencias Químicas
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
Laboratorio de Microbiología de Suelos
ICUAP

Tesis
**Caracterización de *Pseudomonas* sp. asociadas a
diferentes variedades de maíz**

PRESENTA:
Germán Sil Palacios

Directora de Tesis
Dra. Lucia López Reyes

Asesora interna:
M. en C. Reina del Consuelo Almiray Pinzón

Febrero 2015

PUEBLA, PUE.

A mi madre
porque fue, es y será
mi fortaleza e inspiración.

A mi abuelo †

*¡No, no! - Orfeo levantó las manos en gesto de rechazo -.
¡Tú no lo entiendes! Haré algo grande con esta historia.
Todavía trabajo en ello, pero créeme,
será una maravilla.*

*Cornelia Funke
«Muerte de Tinta»*



Agradecimientos institucionales:

El presente trabajo ha sido soportado por:

El proyecto de investigación “**Caracterización de *Pseudomonas* fluorescentes asociadas a diferentes variedades de maíz** del programa Institucional de Fomento a la Investigación y a la Consolidación de Cuerpos Académicos con financiamiento VIEP-BUAP 2014-2014. Recursos del programa de mejoramiento al profesorado (SEP-PROMEP) para el fortalecimiento del Cuerpo Académico de Microbiología de Suelos BUAP-CA-99. Por el proyecto Institucional de desarrollo de biofertilizantes BIOfosfoBUAP.

Agradecimientos personales:

A mi madre, Reyna Guadalupe Palacios Guzmán, por ser ese dolor de cabeza constante sin el cual no habría podido llegar donde estoy ahora. Gracias por los chanclos y los pellizcos para corregirme, pero también, por las horas de desvelo que pasaste cuidándome cuándo estaba enfermo, por aplazar los quehaceres del hogar por ayudarme con la tarea y sobre todo por ser el mejor ejemplo de fortaleza y amor incondicional que pueda existir. Te amo mucho mami.

A mi padre, Germán Sil Acosta, por enseñarme que caer no es malo y que el carácter se forja cuando demostramos la fortaleza de levantarnos siempre una vez más de las que se tropieza.

A mi familia, en especial a mis tíos y padrinos; Dra. Jeny Sil Acosta y Dr. Carlos Meneses Campos, por ser mis segundos padres, por apoyarme siempre de manera incondicional, por el cariño que me dan y por ser un ejemplo de vida.

A mis mejores amigos, Enrique González, Pedro Reyes, Elsa Sosa y Domingo Rosas, por la magia, las hadas y los dragones, por ser la dosis (y a veces sobredosis) de locura que necesito para soportar este mundo. Pero especialmente por ser el faro en mis horas más oscuras, por eso y mucho más, cada uno tiene un lugar muy especial en mi corazón.

A Víctor M. Juárez, por ser mi amigo y confidente, por ser el ancla que impide que vague a la deriva, por aguantar mis locuras y darme un jalón de orejas cuando lo necesito. Por motivarme a construir el camino cada día.

A Antonio Anaya, porque lo eterno es aquello que dura solo el tiempo suficiente para volverse inolvidable. †

Agradecimientos profesionales:

A la D. en C. Lucía López Reyes, no solo por el tiempo y la paciencia que invirtió en enseñarme y llevar a cabo este proyecto, también por los consejos personales y los jalones de orejas para infundirme ánimo durante la travesía. Quizá yo no soy el alumno que se merece, pero sin lugar a duda usted es la maestra que necesitaba.

Al M. en C. Moisés G. Carcaño Montiel, por ser como mi segundo asesor y contestar todas mis dudas con amabilidad y paciencia; pero le agradezco más por haberme dejado formar parte del proyecto BIOFERTIBUAP.

A mis sinodales, MSP. Claudy L. Villagrán Padilla, MC. Patricia G. Suárez Albores y a mi asesora interna, MC. Reina del C. Almiray Pinzón, por todas las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto, por su entrega y compromiso.

A Liliana Chena (Liliana Teresa patitas suaves salvaje alias Ramona), porque cuando estoy contigo siempre logras arrancarme mil sonrisas, por dejarte contagiar de mi locura y permitirme ser ese caos en tu vida.

A Guadalupe Medina, Martha Orea, Elizabeth Portillo, Eduardo de la Merced y Edgar A. Vázquez, por dejarme poner el desorden cada vez que pongo un pie en el laboratorio, por las risas y consejos en esas horas eternas en las que se esteriliza el material.

1. RESUMEN	12
1.1 ABSTRACT	14
2. INTRODUCCIÓN	16
3. MARCO TEÓRICO	17
3.1.La importancia del maíz	17
3.2. El suelo y su relación con el ambiente	18
3.3. Relación bacteria- agoecosistema	20
3.4. Interacción bacteria- planta	20
3.5. Efecto de las raíces en los microorganismos de la rizósfera	21
3.6. Efecto de los microorganismos de la rizósfera en las raíces.	21
3.7. Importancia de la caracterización bacteriana en la agroindustria	22
3.8. Género <i>Pseudomonas</i>	23
3.8.1. Subgrupo fluorescente	24
4. MARCO DE REFERENCIA	26
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
6. JUSTIFICACIÓN	30
7. HIPÓTESIS	31
7.1. Hipótesis nula	31
7.2. Hipótesis alternativa	31
8. OBJETIVOS	32
8.1.Objetivo general	32
8.2 Objetivos particulares	32

9. MATERIAL Y MÉTODOS	33
9.1 Materiales	33
9.2 Muestreo	33
9.3 Aislamiento de bacterias	33
9.4 Caracterización bacteriana por medio del sistema api de Biomerieux	33
9.4.1 Sistemas de identificación multipuebas galería API 20NE	34
9.4.2 Sistemas de identificación bioquímico galería API 50CH	35
9.5 Detección de la actividad solubilizadora de fosfatos	35
9.6 Detección de la fluorescencia	36
10. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	37
11. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	38
12. DISCUSIÓN Y RESULTADOS	40
12.1. Caracterización de bacterias aisladas de diferentes variedades	40
de maíz	
12.2. Caracterización fisiológica bacteriana	42
12.3. Caracterización metabólica de las bacterias	44
12.4. Detección de la actividad solubilizadora de fosfatos	53
12.5. Producción de sideróforos	55
13. CONCLUSIONES	57
14. BIBLIOGRAFÍA	58
15. ANEXOS	65

INDICE DE CUADROS

- Cuadro 1.** Características del subgrupo de *Pseudomonas* fluorescentes.
- Cuadro 2.** Géneros bacterianos asociados a la rizósfera de diferentes variedades de maíz (2×10^6)
- Cuadro 3.** Substratos incluidos en cada uno de los 20 recipientes de la galería API 20 NE.
- Cuadro 4.** Substratos incluidos en cada uno de los 50 recipientes de la galería enzimática para bacterias ácido-lácticas API 50 CH.
- Cuadro 5.** Total de bacterias *Pseudomonas* encontradas para cada una de las variedades de maíz analizadas.
- Cuadro 6.** Diversidad bioquímica de aislados bacterianos asociados a seis variedades de maíz determinada mediante el Sistema API20NE.
- Cuadro 7.** Diversidad metabólica presente en los aislados bacterianos asociados a 6 variedades de maíz determinada mediante API 50 CH.
- Cuadro 8.** Porcentaje de especies de *Pseudomonas* y solubilización de fosfatos en diferentes variedades de maíz.
- Cuadro 9.** Porcentaje de las especies de *Pseudomonas* que producen pigmentos fluorescentes en las diferentes variedades de maíz.
-

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1** Semillas de maíz de diferentes variedades. Se presenta de izquierda a derecha. Maíz silvestre teocintle, maíz rojo, maíz amarillo, maíz azul y maíz híbrido QPM de alta calidad proteica. Obtenido de López-Reyes, 2013.
- Figura 2** Principales países productores de maíz (1998-2008)
- Figura 3** Bacterias solubilizadoras de fosfatos presentes en la región de San Juan Atenco Puebla. México.
- Figura 4** Porcentaje de bacterias del género *Pseudomonas* identificadas en las variedades de maíz analizadas.
- Figura 5** Galería multipuebas API20NE transcurridas 24 horas de incubación a 37°C.
- Figura 6** Galería multipuebas API 50CH transcurridas 24 horas de incubación a 37°C.
- Figura 7** Utilización porcentual de diferentes fuentes de carbono por la población de *Pseudomonas* asociadas a suelo contrastando con maíz amarillo.
- Figura 8** Utilización porcentual de diferentes fuentes de carbono por la población de *Pseudomonas* asociadas a suelo contrastando con maíz azul.
- Figura 9** Utilización porcentual de diferentes fuentes de carbono por la población de *Pseudomonas* asociadas a suelo contrastando con maíz rojo.
- Figura 10** Utilización porcentual de diferentes fuentes de carbono por la población de *Pseudomonas* asociadas a suelo contrastando con maíz QPM.
- Figura 11** Utilización porcentual de diferentes fuentes de carbono por la población de *Pseudomonas* asociadas a suelo contrastando con maíz teocintle.
- Figura 12** Utilización porcentual de diferentes fuentes de carbono por la población de *Pseudomonas* asociadas a suelo contrastando
-

con maíz total.

Figura 13 Siembra por medio del replicador de Steers en caja Petri con medio Goldstein adicionado con CaHPO_4 ; 4 días después se observa la presencia de halos de solubilización.

INDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Caracterización básica de cepas: 1.Tinción de Gram, 2.movilidad, 3.oxidasa y catalasa, 4.medio OF y 5.crecimiento en agar MacConkey.

1. RESUMEN

El maíz posee importancia alimenticia, económica, social, industrial y tecnológica, pero poco se ha estudiado sobre el efecto que ejerce la influencia humana en el ecosistema de las variedades de maíz. En el presente trabajo, se realizó la caracterización bacteriana de la rizósfera del suelo agrícola asociado a *Zea mays* L. procedente de la zona de San Juan Atenco, Puebla, México. Como objeto de estudio se utilizó al suelo sembrado con diferentes variedades de maíz: amarillo, azul, rojo, silvestre (teocintle) y el híbrido de alta calidad proteica (QPM), empleándose al suelo sin presencia de maíz como control. Se obtuvo la población de bacterias a estudiar, de la cual se seleccionaron las del género *Pseudomonas* específicamente aquellas fluorescentes obteniéndose un total de 93 bacterias a las que se les caracterizó mediante ensayos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. Las bacterias fueron caracterizadas bioquímicamente, como similares; mediante el sistema API 20 NE® de Biomerieux y sus correspondientes pruebas complementarias. Las especies de bacterias que se identificaron por API 20NE en asociación con maíz fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas* sp. Únicamente *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* se encontraron de manera significativa en los suelos de la rizósfera en comparación con las demás especies. Cada variedad de maíz mostró diferencia tanto en las especies asociadas a la rizósfera como en el número presente en dicha variedad, lo anterior puede estar relacionado tanto con el efecto que tienen las raíces de las plantas al liberar diferentes compuestos químicos que pueden estimular o inhibir a los microorganismos que se encuentran a su alrededor. Además se realizó una caracterización metabólica bacteriana mediante el uso de API 50CH y se realizó una comparación del uso de los diferentes tipos de carbohidratos disponibles entre el suelo control y cada una de las variedades de maíz estudiadas obteniendo una mayor variabilidad metabólica en el suelo influenciado por la rizósfera, en especial la relacionada con el maíz QPM. Se concluye que la variedad de la planta de maíz

es un agente de selección de especies bacterianas predominantes del suelo, lo cual puede ser tomado en cuenta al momento de selección en los programas sustentables de empleo de bacterias que incrementan el desarrollo de las plantas. La razón de esas interacciones puede ser establecida en estudios posteriores.

Palabras clave: *Rizósfera, suelo agrícola, caracterización bioquímica, caracterización metabólica, variabilidad de maíz, variabilidad metabólica.*

1.1 ABSTRACT

Despite the alimentary, economical, social, industrial and technological importance is little research about the effect that human influence generates on the ecosystem of maize varieties. In this work characterization of bacterial rhizosphere of agricultural land associated with *Zea mays* L was performed from soil located in San Juan Atenco, Puebla, Mexico. It was used soil without the presence of maize as control and as object of study, the one with different maize varieties planted: yellow, blue, red, wild (teosinte) and the hybrid quality protein (QPM). The bacteria population to study was then obtained, for which the gender *Pseudomonas fluorescens* was specifically selected; obtaining a total of 93 bacteria which were characterized morphologically, physiologically and biochemically. Bacteria were biochemically characterized as similar, with the API 20 NE® system of Biomerieux and their corresponding complementary tests. The bacteria in association with maize identified by API 20NE were: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas* sp. Only *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* were found significantly in the rhizosphere soils compared to other species. Each maize variety showed difference in both, species associated with rhizosphere and in the number of associated bacteria, this may be related with both, the effect that the roots of plants who release different chemical compounds that can stimulate or inhibit microorganisms that are around. Moreover bacterial metabolic characterization was performed using API 50CH and a comparison of the use of different types of carbohydrates available between soil control and each of the varieties of maize was performed to obtain a higher metabolic studied variability in soil influenced by rhizosphere, especially related to the QPM. We conclude that the variety of the corn plant is a selection agent predominant bacterial species in the soil, which can be taken into account when selecting programs in sustainable use of bacteria that increase plant growth. The reason for these interactions can be established in future studies.

Keywords: *Rhizosphere, agricultural land, biochemical characterization, metabolic characterization, variability of maize, metabolic variability.*

2. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la importancia de conocer a profundidad las interacciones que ejercen los microorganismos en la rizósfera de los cultivos ha ido en aumento, sobre todo con el fin de obtener un mayor beneficio para el ser humano pero con la directiva de ser sustentables. Uno de los aspectos primarios, que se debe conocer de las interacciones de los microorganismos con las plantas, es el metabolismo que desarrollan los géneros bacterianos asociados a los cultivos. Sin embargo, a pesar de la necesidad creciente de la experimentación geomicrobiológica para su implementación en procesos agrícolas y la importancia que han supuesto los análisis de la diversidad microbiana utilizando tecnología genética, estamos aún lejos de dilucidar en su totalidad el papel que juegan las interacciones intergénero e interespecie de bacteria-planta para que se presente el fenómeno de adaptación selectiva.

La cantidad de especies asociadas a un cultivo es muy amplia, es por eso que el presente estudio se enfocó en la investigación de los procesos metabólicos de las bacterias del género *Pseudomonas* y específicamente del subgrupo fluorescente asociadas a la rizósfera de maíz criollo rojo, criollo azul, criollo amarillo, silvestre (teocintle) y el maíz híbrido de alta calidad proteica (QPM) mediante el método de identificación multipruebas API 20 NE y API 50 CH.

3. Marco teórico

3.1. La importancia del maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es un cultivo gramíneo propio de Mesoamérica que ha sido parte importante de la cultura mexicana. Los indígenas lo nombraron así por considerarlo “lo que sustenta la vida” (Rodríguez, 2008). Diversos restos arqueológicos, indican que la población del territorio de lo que hoy es México no se ha alimentado siempre de maíz ya que otras plantas predominaron por mucho tiempo en su dieta y donde el maíz fue ganando popularidad paulatinamente (Fernández *et al*, 2013).

El interés por la diversidad de maíz viene desde los tiempos prehispánicos, como se refleja en las leyendas sobre el origen de la planta y en los códices (Navarrete, 2011). Sin embargo, del periodo comprendido entre la Colonia hasta el siglo XIX son muy escasos los escritos que hablan acerca de las variedades de maíz. Y es sólo hasta el siglo XX que se empiezan a estudiar y coleccionar en forma sistemática poblaciones locales nativas de maíz conocidos como teocintles (Ortega, 2003)

Los teocintles son gramíneas muy similares al maíz, que crecen de manera natural principalmente en México y en parte de Centroamérica. Se considera que las poblaciones de teocintle del centro del México pudieron ser los ancestros de los cuales se domesticó el maíz como planta cultivada (Matsuoka *et al*, 2002). Gracias a que los indígenas mexicanos hicieron evolucionar al maíz, sembrando las variedades nativas y las variedades criollas. Con la formación de las razas obtenidas y con los cruzamientos interraciales se dio origen a las razas modernas (Márquez, 2008). Figura 1.

A lo largo de este tiempo, el hombre fue moldeando la especie a sus necesidades tanto alimenticias como de cultivo, dando como resultado una de las mayores diversidades genéticas de las que se tenga noticia. En el caso particular de México, tal diversidad queda representada por las más de 50 razas de maíz

catalogadas, las cuales representan aproximadamente 23% de la diversidad genética presente en el continente Americano (Goodmany Brown, 1988).

Con el auge de la cultura ecológica se cultiva maíz disminuyendo el impacto ambiental que pueden tener el uso de fertilización química entre otros procesos. Dentro de este tipo de agricultura se promueven las actividades sustentables, como el uso de los inoculantes microbianos o biofertilizantes. Además, de que el maíz forma parte de un conjunto de relaciones e interacciones con el ecosistema y que son fundamentales para el desarrollo del cultivo. (Khosro y Yuosef, 2012)



Figura 1: Semillas de maíz de diferentes variedades. Se presenta de izquierda a derecha. Maíz silvestre teocintle, maíz rojo, maíz amarillo, maíz azul y maíz híbrido QPM de alta calidad proteica. (Obtenido de López-Reyes, 2013).

3.2. El suelo y su relación con el ambiente

La Norma Oficial Mexicana-021 sobre Recursos Naturales (Diario Oficial de la Federación, 2002) define al suelo como: “Colección de cuerpos naturales formados por sólidos (minerales y orgánicos), líquidos y gases, sobre la superficie de los terrenos. Presenta, ya sea, horizontes o capas, que se diferencian del

material de origen como resultado de adiciones, pérdidas, migraciones, y transformaciones de energía y materia; o por la habilidad de soportar raíces de plantas en un ambiente natural”.

La formación de los suelos es un proceso complejo y muy lento, ya que involucra cinco factores independientes entre sí: El material, el clima, los factores bióticos, la topografía y el tiempo (Ibáñez *et al.*, 2004; Smith y Smith, 2001). La textura del suelo influye directamente en la relación agua, suelo, aeración y la penetración de las raíces a través de sus espacios porosos. Indirectamente, también influye en el estado nutricional del suelo. La proporción relativa de los sólidos minerales y orgánicos y el espacio llenado por agua o gases son determinantes para la distribución del tamaño de partícula del mineral (textura del suelo) y para las uniones de estas partículas fundamentales en unidades mayores o agregados (Barker, 1998).

Los procesos microbiológicos del suelo pueden ser el resultado de una sola especie microbiana o de una asociación entre dos o más. La base de la asociación puede ser el sinergismo, en el cual ningún organismo es capaz de llevar a cabo todo el proceso pero cada miembro del consorcio se encarga de una parte de manera secuencial. Además, es posible que no todos los miembros de una asociación de microorganismos participen directamente en el proceso, sino que realicen reacciones relativas como generar un determinado pH que faciliten el proceso (Lutz, 2002). Los microorganismos en el entorno superficial del suelo están involucrados en distintos procesos vitales, incluyendo el mantenimiento de la degradación del ambiente. Algunas de las actividades importantes de estos microorganismos son: la formación del suelo, el ciclo de los nutrientes y la biorremediación (Sharma, 2005). Los microorganismos contribuyen a la evolución del suelo mineralizando algunos o todos los componentes de la materia orgánica durante su proceso de deterioro. Algunos de los productos metabólicos de este deterioro, como los ácidos inorgánicos, CO₂ y NH₃, interactúan de manera lenta con los minerales y causan su alteración y solución, un paso importante para caracterización (Barker, 1998). Las bacterias del suelo son las principales

responsables por la mineralización de la materia orgánica, por la fijación de nitrógeno, nitrificación, desnitrificación (Campbell, 1967) y otros procesos geoquímicos importantes como la reducción de sulfatos, actuando como catalizadores en algunos procesos geoquímicos, o como productores o consumidores de ciertas sustancias del suelo y así influir en la velocidad de las reacciones geoquímicas en las que tales sustancias son reactivos o productos (Ehrlich, 1996).

3.3. Relación bacteria- agroecosistema

El componente microbiano del suelo es importante para mantener el equilibrio en los ecosistemas. Los procesos agrícolas y el manejo de los recursos vegetales afectan la biodiversidad y la densidad de las poblaciones microbianas. La sustentabilidad de un agro ecosistema depende del uso mínimo de fertilizantes y pesticidas químicos para el desarrollo agrícola. El manejo integral de cultivos puede verse beneficiado por el empleo de cepas de microorganismos con un alto potencial de acción sobre el crecimiento, el control de patógenos y desarrollo de las plantas. (Olalde y Aguilera, 1998).

3.4. Interacción bacteria- planta

La diversidad y los tipos de microorganismos asociados a los vegetales, son propensos a variar dependiendo de la especie de planta, edad y estado nutricional; de las características fisicoquímicas del suelo, del ecosistema en el que se desarrolla, así como de su uso. (Marschner *et al.*, 2004; Adeboye *et al.*, 2006). Los exudados de las raíces de las plantas pueden favorecer el establecimiento de relaciones entre los microorganismos del suelo. (Kloepper, 1994). Se ha demostrado que la densidad bacteriana y fúngica presente en esta zona de directo intercambio de la planta puede llegar a ser entre 10 y 50 veces más grandes que el suelo no influenciado por las raíces de las plantas. (Reyes *et al.*, 2006).

3.5. Efecto de las raíces en los microorganismos de la rizósfera

En la rizósfera, que es el suelo directamente influenciado por las raíces de las plantas, se genera un ambiente propicio para el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos, ya sea por medio de procesos tales como la captación de agua por la planta o los exudados de sustancias orgánicas que actúan como sustratos para dichos microorganismos, debido a que constituyen una importante fuente de nutrientes. Los exudados de la raíces de las plantas tienen influencia sobre las propiedades biológicas y químicas del suelo y en consecuencia sobre la variedad microbiana que se desarrollará en torno a la rizósfera. (Pacheco y Pineda, 2004). La composición de las excreciones de la raíz y los constituyentes químicos de sus tejidos, determinan en gran medida la composición microbiana del ambiente. (Atlas, 2002; Velázquez, 1999). La masa y células viables cercanas a la raíz indican que la planta está excretando sustancias orgánicas (Duke, 1996). Los productos encontrados por los microorganismos varían de planta en planta. (Mantilla *et al*, 2009).

3.6. Efecto de los microorganismos de la rizósfera en las raíces.

Los microorganismos de la rizósfera ejercen influencia en el crecimiento de las plantas, ya que estas aumentan el reciclado y solubilización de los nutrientes minerales. Las bacterias que reaccionan a la presencia de las raíces pertenecen a varios grupos taxonómicos, fisiológicos y morfológicos claramente diferentes. Los que responden marcadamente son los bacilos cortos Gram negativos que, casi invariablemente, ocupan el mayor porcentaje de la rizósfera comparado con la flora normal del suelo; mientras que el porcentaje de incidencia de los bacilos cortos Gram positivos, los cocobacilos y las bacterias que forman esporas (*Bacillus* spp.) disminuye. Aparentemente no existe una estimulación o inhibición selectiva de los bacilos Gram variables del grupo *Arthrobacter* de los bacilos largos que no forman esporas. (Vázquez, *et al*, 2000). Existe una proporción relativamente mayor de bacterias móviles de crecimiento rápido como el género *Pseudomonas* asociadas a plantas, los exudados de las raíces favorecen a los microorganismos con una elevada tasa de crecimiento, ya que a su vez las

poblaciones bacterianas pueden producir compuestos químicos que estimulan el crecimiento de las plantas (Bashan y Holguín, 1996).

3.7 Importancia de la caracterización bacteriana en la agroindustria

Según datos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en México se consume anualmente alrededor de 30 millones de toneladas de maíz, lo que deja ver la gran importancia que tiene en la alimentación de los mexicanos. Sin embargo, el suministro que se genera es insuficiente y México necesita importar dicha gramínea de países que lo superan en su cultivo como Estados Unidos, China y Brasil como podemos observar en la Figura 2, (FAO Statics Division, 2009) por lo que en los últimos años se han innovado tecnologías para lograr el mejoramiento de la producción.

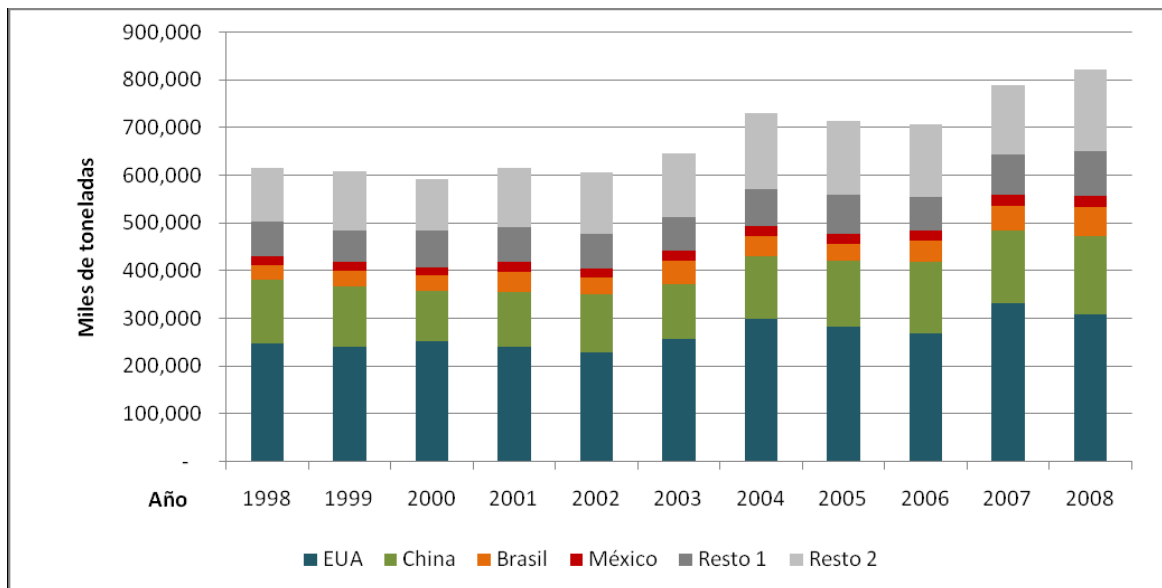


Figura 2. Principales países productores de maíz (1998-2008)

Fuente: FAOSTAT | © FAO Statistics Division 2009

La diversidad y densidad de microorganismos son indicadores biológicos en estudios de calidad y sostenibilidad del suelo. La presencia de microorganismos en la rizósfera participa en procesos bioquímicos, lo que influye sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas y se relaciona directamente con el aumento de elementos químicos útiles para el control de patógenos (Reyes y Valery, 2007).

El desarrollo de biotecnologías agrícolas alternativas, requieren de estrategias y procesos de investigación e innovación a corto y mediano plazo, los cuales incluyen aislamientos de cepas, evaluación, selección, multiplicación y producción. (López *et al*, 2008). Los biofertilizantes y bioestimuladores son parte importante de los sistemas agrícolas sustentables; constituyen un campo económico aún joven y con mucho por explotar. Permiten reducir el uso de sustancias químicas y mejoran la cantidad y calidad de los recursos propios del suelo, gracias a la utilización de microorganismos debidamente seleccionados, capaces de aportar a los cultivos nitrógeno fijado de la atmósfera, fósforo transformado a partir del que está fijado en el suelo y sustancias fisiológicamente activas que, al interactuar con la planta, ocasionan una mayor activación del metabolismo (Bauer, 2001: Burdman *et al.*, 2000).

3.8. Género *Pseudomonas*.

El género *Pseudomonas* y algunos otros géneros estrechamente relacionados como *Burkholderia* sp., comparten las características de ser bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvos que son aerobios estrictos; la mayoría de las cepas son móviles por medio de uno o más flagelos polares; utilizan glucosa y otros hidratos de carbono en forma oxidativa; suelen ser citocromo oxidasa positivos (Lippnicot *et al.*, 2006). La importancia de la presencia del género *Pseudomonas* en el suelo ha quedado evidenciada en muchas investigaciones, siendo *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* las especies sobre las que se han realizado más estudios y se ha observado que poseen la capacidad de producir sideróforos, servir como antagonistas del crecimiento fúngico (Torrez *et al.*, 2000), o jugar un papel importante en la absorción de fósforo y rendimiento de ciertos cultivos o servir como un factor de control en enfermedades de ciertas semillas como el caso particular de *P. fluorescens* (Faggioli *et al.*, 2010) (Pérez, *et al.*, 2000). Sin embargo, estudios más recientes nos demuestran que otras especies poseen igual importancia para el ecosistema, como lo es la asociación entre *P. alcaligenes* y el género *Azotobacter* (Flores *et al.*, 2012), la tolerancia y degradación de glifosato por *P. oryzihabitans* (actualmente *Flavimonas*

oryzihabitans) (Martínez *et al.*, 2012) o el antagonismo fúngico de *P. putida* (Torres *et al.*, 2000). El género *Pseudomonas* es muy amplio por lo que se decidió estudiar a un solo de los subgrupos que lo componen: el subgrupo fluorescente.

3.8.1. Subgrupo fluorescente

Se considera *Pseudomonas* fluorescentes a la bacterias que se caracterizan por la producción de pigmento hidrosoluble que da fluorescencia en tonos que van desde blanco a verde azulado cuando son sometidos a la luz ultravioleta. Las características de este subgrupo están resumidas en el Cuadro 1.

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular secretados por las raíces de las plantas (fitosideróforos) y las bacterias que se relacionan con la captación en la rizósfera de elementos, como el hierro. Diversas bacterias de vida libre, en especial del género *Pseudomonas* se han asociado con la producción de sideróforos (Zdor y Anderson, 1992). En un estudio realizado con *Pseudomonas* 7NSK, se observó un aumento en la producción de, maíz, trigo y cebada; la capacidad de producir pioverdina, sideróforo fluorescente que es producido por la bacteria en condiciones de deficiencia de hierro o de otros metales, en condiciones de pH bajo, o como agente inhibidor de varios hongos fitopatógenos, puede ayudar a explicar el aumento en el rendimiento de la producción de grano de dichos cultivos. La producción de pioverdina puede ser estratégica en la rizosfera, no sólo para el abastecimiento de hierro, sino, también, como un mecanismo de defensa contra otros microorganismos (Höfte *et al.*, 1991). Además de la pioverdina, las especies del género *Pseudomonas*, son capaces de generar pigmentos difusibles que son observables a luz UV en medio B de King como las piocianinas y fluoresceínas. (Cid, 2006).

Cuadro 1. Características del subgrupo de *Pseudomonas* fluorescentes (Mádigan y Parker, 2003)

Características de *Pseudomonas* fluorescentes

Subgrupo fluorescente	La mayoría producen pigmentos fluorescentes verde-amarillento solubles en agua; no forman poli- β -hidroxibutirato; único grupo de homología de DNA
<i>P. aeruginosa</i>	Producen piocianina, crecen hasta 43°C, flagelo polar único, desnitrificantes
<i>P. fluorescens</i>	No producen piocianina, no crecen a 43°C; penacho de flagelos polares
<i>P. putida</i>	Semejante a <i>P. fluorescens</i> pero no licua la gelatina y crece en benzilamina
<i>P. syringae</i>	Carece de dihidrolasa, oxidasa negativo, patógeno para las plantas
<i>P. stutzeri</i>	Saprófito del suelo, fuerte desnitrificador y no fluorescente

4. MARCO DE REFERENCIA

Para poder entender el comportamiento, la función y los efectos que un grupo bacteriano ejerce tanto sobre el suelo, como en la rizósfera de los cultivos, es necesario en primera instancia, determinar las características de dicho grupo. Sin embargo, debido a que existen diferentes rutas metabólicas bacterianas, resulta complejo analizar grandes poblaciones; es por ello que se ha optado por trabajar muestras representativas de la diversidad bacteriana en un suelo con la ayuda de sistemas de identificación multipuebas API, los cuales tienen la ventaja de ser fáciles en su manejo (Cid, 2006), ya que permite entre otras cosas, poner de manifiesto parte del sistema metabólico de la bacteria (Quempis, 2010). El realizar estudios complementarios, como la capacidad solubilizadora de fosfatos Figura 3 (Lara *et al*, 2011; Medina, 2011) o la producción de sideróforos (Lozano, 2004) proporciona información del efecto antagonista de las bacterias en el crecimiento de otros microorganismos que conviven en la rizósfera. Se han realizado estudios referentes a la influencia que la rizósfera ejerce sobre la diversidad bacteriana asociada a las plantas de maíz y la participación de los exudados radicales en la selección bacteriana. Además, se ha demostrado que el género *Pseudomonas* es el más abundante en asociación con diferentes variedades de maíz Cuadro 2 (López-Reyes, 2013). El conocer la variabilidad de la población de *Pseudomonas* fluorescentes asociadas a maíz resulta de interés ya que se ha demostrado que en las alternativas de producción sustentable de maíz reduce costos económicos y ambientales, lo que puede estar en relación con la población bacteriana asociada a maíz (Carcaño, 2003).

Cuadro 2. Géneros bacterianos asociados a la rizósfera de diferentes variedades de maíz (2×10^6)

Género	Rojo	Azul	Silvestre Teocintle	Suelo	QPM	Amarillo	Maíz Total
<i>Achromobacter</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>Acinetobacter</i>	3	10	1	1	1	0	16
<i>Aeromonas</i>	0	0	0	3	0	0	3
<i>Alcaligenes</i>	0	1	0	0	0	1	2
<i>Bordetella</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>Brevundimonas</i>	1	0	1	0	2	2	6
<i>Burkholderia</i>	5	2	9	11	1	14	42
<i>Chromobacterium</i>	1	1	8	0	1	1	12
<i>Chryseobacterium</i>	1	2	0	1	11	1	16
<i>Eikenella</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Enterobacter</i>	1	0	0	0	2	0	3
<i>Mannheimia</i>	0	0	0	1	0	1	2
<i>Ochrobactrum</i>	2	2	1	0	0	4	9
<i>Oligella</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Photobacterium</i>	0	0	0	1	0	0	1
<i>Pseudomonas</i>	14	21	15	12	17	11	90
<i>Psychrobacter</i>	0	1	0	0	0	0	1
<i>Ralstonia</i>	5	13	0	0	0	5	23
<i>Rhizobium</i>	0	0	2	1	0	0	3
<i>Stenotrophomonas</i>	3	1	3	6	11	10	34
<i>Shewanella</i>	1	0	0	1	0	0	2
<i>Sphingobacterium</i>	0	0	0	0	1	0	1
<i>Sphingomonas</i>	0	2	2	4	0	1	9
<i>Wautersia</i>	0	3	0	0	0	0	3
No identificadas	3	0	0	4	1	6	14
TOTAL	41	60	42	48	48	57	296

Maíz total, incluye los datos de todas las variedades ensayadas y el suelo control

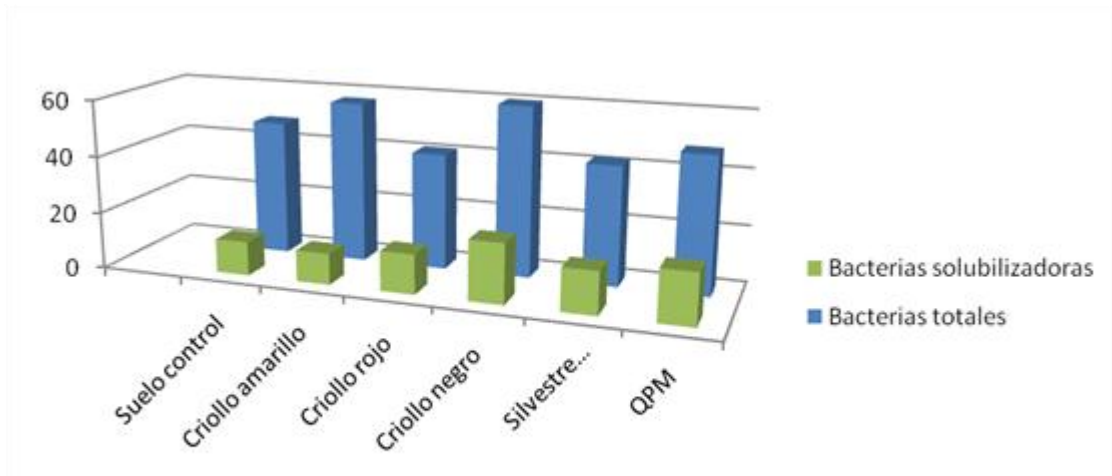


Figura 3. Bacterias solubilizadoras de fosfatos presentes en la región de San Juan Atenco Puebla. México. (Medina, 2011).

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diversidad de maíz y suelos ha cambiado durante el paso de los siglos, sin tener evidencias claras de los cambios existentes en la microbiota relacionada con el cultivo, derivado de las cruces interraciales u obtención de maíz genéticamente modificado, así como el uso de las diferentes técnicas agropecuarias que involucran el uso de sustancias químicas en el afán de mejorar la calidad y producción del cultivo de maíz.

Las actividades humanas han generado que se establezcan nuevas interacciones en la rizósfera, siendo dichas interacciones, diferentes para cada variedad de maíz e incluso produciendo variabilidad en el metabolismo dentro de una misma especie bacteriana.

6. JUSTIFICACIÓN

El maíz es un cultivo que ha desempeñado un papel esencial en la cultura mexicana a lo largo de los siglos; posee una importancia alimenticia, económica, social, industrial y tecnológica, sobre todo en lo que se refiere a sistemas de producción para solventar la demanda de una población que va en aumento; lo que genera una presión en el ecosistema, y es la rizósfera, la más sensible a sufrir cambios. A pesar de que México es poseedor de una gran variedad de maíz, desde los silvestres, pasando por los nativos e híbridos, poco se conoce sobre la influencia de las variedades de maíz en la diversidad de bacterias mesofílicas aeróbicas asociadas al suelo de la rizósfera de maíces, en especial de uno de los géneros más abundantes como es *Pseudomonas*.

Es por tanto, necesario conocer las modificaciones que se generan en la población bacteriana asociada a maíz de las variedades más comúnmente sembradas en México como lo son los maíces : amarillo, rojo, azul, QPM y teocintle; dichos cambios pueden ser considerados no solo como indicador de alteración del sistema agrícola por el cultivo intensivo, también nos reflejan una adaptabilidad selectiva de las plantas debido a problemas ambientales, muchos de ellos generados por el desconocimiento que las actividades humanas ejercen sobre el medio.

7. HIPOTESIS

7.1. Hipótesis nula

Se presentará una alta variabilidad de las bacterias del género *Pseudomonas* para cada variedad de maíz como indicador de adaptación selectiva de las plantas.

7.2. Hipótesis alternativa

No se presentará una alta variabilidad de las bacterias del género *Pseudomonas* para cada variedad de maíz como indicador de adaptación selectiva de las plantas.

8 OBJETIVOS

8.1. Objetivo general:

Determinar la diversidad de *Pseudomonas* fluorescentes asociadas a maíz de diferente variedad.

8.2. Objetivos particulares:

- 1.** Aislar bacterias del género *Pseudomonas* del subgrupo fluorescente asociadas a la rizósfera de maíz criollo rojo, criollo azul, criollo amarillo, silvestre (teocintle) y el maíz híbrido de alta calidad proteica (QPM).
- 2.** Realizar la caracterización de las bacterias colectadas en la rizósfera de maíz mediante el método de identificación de multipruebas API 20 NE y API 50 CH.
- 3.** Determinar la capacidad solubilizadora de fosfatos y la producción de pigmentos fluorescentes de cada una de las bacterias caracterizadas.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1. Materiales.

Los materiales empleados en la presente investigación se muestran en el Cuadro anexo 1.

9.2. Muestreo

Se seleccionó suelo de la rizósfera de plantas de maíz con crecimiento de 20 días posterior a la siembra, desarrolladas en la zona San Juan Atenco en Puebla (100 g aproximadamente por planta). Se guardó en bolsas de plástico de cierre hermético debidamente marcadas y se transportaron al Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del ICUAP para su procesamiento.

9.3. Aislamiento de bacterias

Se realizaron diluciones con base diez partiendo de 1.0 g de cada una de las muestras de suelo hasta 10^{-7} : De cada dilución, se tomó 1.0mL y se sembró colocando el inóculo sobre la placa de agar soya y triptica (TSA) distribuyéndolo con una varilla de vidrio estéril; posteriormente, se incubó durante 24 h a 36°C. (Chiarini *et al.*, 1998; Reyes y Valery, 2007). Pasado este tiempo, se observó el crecimiento y se tomó de la caja contable, 20 bacterias al azar. Se resembraron en agar TSA mediante la técnica de estría cruzada. Se incubaron durante 24 h a 36°C, posteriormente se realizaron resiembras hasta la obtención de un cultivo axénico.

9.4. Caracterización bacteriana por medio del sistema api de Biomerieux

Las cepas purificadas, se sometieron a pruebas de caracterización para establecer el género y la especie de cada una de ellas empezando por una tinción de Gram. Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas, el crecimiento en agar de MacConkey, el tipo de metabolismo en medio, las pruebas de catalasa y oxidasa.

Se procedió a utilizar los sistemas de caracterización bacteriana por medio del sistema APIWEB® de Biomerieux para API 20E y API 20 NE. Posteriormente se determinaron el patrón de asimilación de carbohidratos de cada una de las bacterias que fueron identificadas como pertenecientes al subgrupo de *Pseudomonas* fluorescentes mediante el API 50CH.

9.4.1. Sistemas de identificación multipruebas galería API 20NE

El API 20 NE es un sistema para la identificación de bacilos Gram negativos. El sistema está estandarizado, y combina 8 pruebas convencionales (NO₃, TRP, GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG) y 12 de asimilación (GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT, PAC, OX). El kit consta de una galería con 20 microtubos conteniendo medios y/o sustratos en forma deshidratada. Los test convencionales, se inoculan con una suspensión bacteriana de la cepa a analizar en solución salina. Tras un periodo de incubación de 24-48 horas a 30 °C se pueden observar virajes de color en el medio, bien directamente o tras adición de reactivos. Los significados de las abreviaturas del sistema API20NE, se muestran en el Cuadro 3

Cuadro 3. Sustratos incluidos en cada uno de los 20 recipientes de la galería API 20 NE

Núm.	Código	Sustrato
0	NO ₃	NIT 1y NIT2
1	TRP	Triptofano
2	GLU	Glucosa
3	ADH	Arginina
4	URE	Urea
5	ESC	Esculina
6	GEL	Gelatina
7	PNPG	p-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
8	GLU	Glucosa.
9	ARA	Arabinosa
10	MNE	Manosa
11	MAN	Manitol
12	NAG	N-acetil-glucosamina
13	MAL	Maltosa
14	GNT	Gluconato
15	CAP	Caprato
16	ADI	Adipato
17	MLT	Malato
18	CIT	Citrato
19	PAC	Fenil-acetato
20	OX	Citocromo

9.4.2. Sistemas de identificación bioquímico galería API 50CH

El patrón de utilización de hidratos de carbono, fue determinado con la galería enzimática API 50 CH, API 50CHL y el software API WEB. Cada test API 50 CH consta de cincuenta microtubos. El primer microtubo no contiene ningún sustrato y se usa como control negativo. El resto de recipientes contienen una cantidad determinada de sustrato deshidratado, pertenecientes a la familia de hidratos de carbono y sus derivados (heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos). La lista de los sustratos se encuentra en el Cuadro 4. Se realizan dos lecturas, una a las 24 horas y otra a las 48 horas, siendo la definitiva la de 48 horas.

Cuadro 4. Sustratos incluidos en cada uno de los 50 recipientes de la galería enzimática para bacterias ácido-lácticas API 50 CH.

Núm.	Código	Sustrato	Núm.	Código	Sustrato
0	CONTROL	CONTROL	25	ESC	Esculina
1	GLY	Glicerol	26	SAL	Salicina
2	ERY	Eritritol	27	CEL	Celobiosa
3	D-ARA	D-Arabinosa	28	MAL	Maltosa
4	L-ARA	L-Arabinosa	29	LAC	Lactosa
5	RIB	Ribosa	30	MEL	Melibiosa
6	D-XYL	D-Xilosa	31	Suc	Sucrosa
7	L-XIL	L-Xilosa	32	TRE	Trealosa
8	ADO	Adonitol	33	INU	Inulina
9	β-M-D-X	β-Methyl-D-Xylosida	34	MLZ	Melezitosa
10	GAL	Galactosa	35	RAF	Rafinosa
11	GLU	Glucosa	36	Starch	Almidón
12	FRU	Fructosa	37	GLYG	Glicogen
13	MaN	Manosa	38	XLT	Xilitol
14	SorB	Sorbosa	39	GEN	Genobiosa
15	RHA	Ramnosa	40	D-TUR	D- Turanosa
16	DUL	Dulcitol	41	D-LYX	D-Lixosa
17	INO	Inositol	42	D-TAG	D-Tagatosa
18	MAN	Manitol	43	D-FUC	D-Fucosa
19	SOR	Sorbitol	44	L-FUC	L-Fucosa
20	1-M-D-M	1-Methyl-D-Mannosido	45	D-AR	D-Arabitol
21	1-M-D-G	1-Methyl-D-Glucosido	46	L-AR	L-Arabitol
22	N-A-G	N-Acetyl-Glucosamina	47	GNT	Gluconato
23	AMY	Amigdalina	48	2-K-G	2-Keto-Gluconato
24	ARB	Arbutina	49	5-K-G	5-Keto-Gluconato

9.5 Detección de la actividad solubilizadora de fosfatos

Una vez aisladas, purificadas e identificadas las bacterias, se evaluaron su capacidad solubilizadora de fosfatos utilizando la técnica de formación de halos de

solubilización. Para ello, se inocularon tubos de caldo nutritivo con las cepas y se dejaron crecer en agitación a 30°C por un periodo de 24 h; posteriormente, la población de bacterias se ajustó con el tubo 5 en la escala del Nefelómetro de McFarland que corresponde aproximadamente a 1500 millones de bacterias mL (Somasegaran y Hoben, 1994). Se colocaron 100µL del inóculo en los pozos del replicador de Steers y se sembraron en placas con medio Goldstein haciendo dos repeticiones, una para fosfato monobásico de calcio y la otra para fosfato dibásico de calcio; las bacterias se dejaron crecer a 30°C durante 4 días, después de lo cual se observó la formación de halos transparentes alrededor de las colonias. (Goldstein, 1986).

9.6 Detección de la fluorescencia

Se sembraron también dichos cultivos en el medio Kings B y se dejaron crecer por cinco días, esto para determinar la presencia de pigmentos fluorescentes al hacer incidir luz ultravioleta (Cid, 2006), aplicándola a las longitudes de onda de 312nm y 265nm.

10. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Tipo de investigación

Experimental, pues tiene como base el sistema de prueba y error, además de requerir el empleo de diversas técnicas para la obtención de resultados.

Descriptivo, pues es necesario hacer un análisis de los datos obtenidos.

Prospectiva, ya que se pretende utilizar los resultados obtenidos como base para futuras investigaciones.

Universo del trabajo

Bacterias del género *Pseudomonas* provenientes del suelo de la rizósfera de plantas de maíz con crecimiento de 20 días posterior a la siembra, desarrolladas en la zona San Juan Atenco en Pueblay que no entren dentro de los criterios de exclusión.

Criterios de inclusión

- Bacterias del género *Pseudomonas* que al someterlas al método de identificación de multipuebas API 20NE presenten un perfil metabólico único.

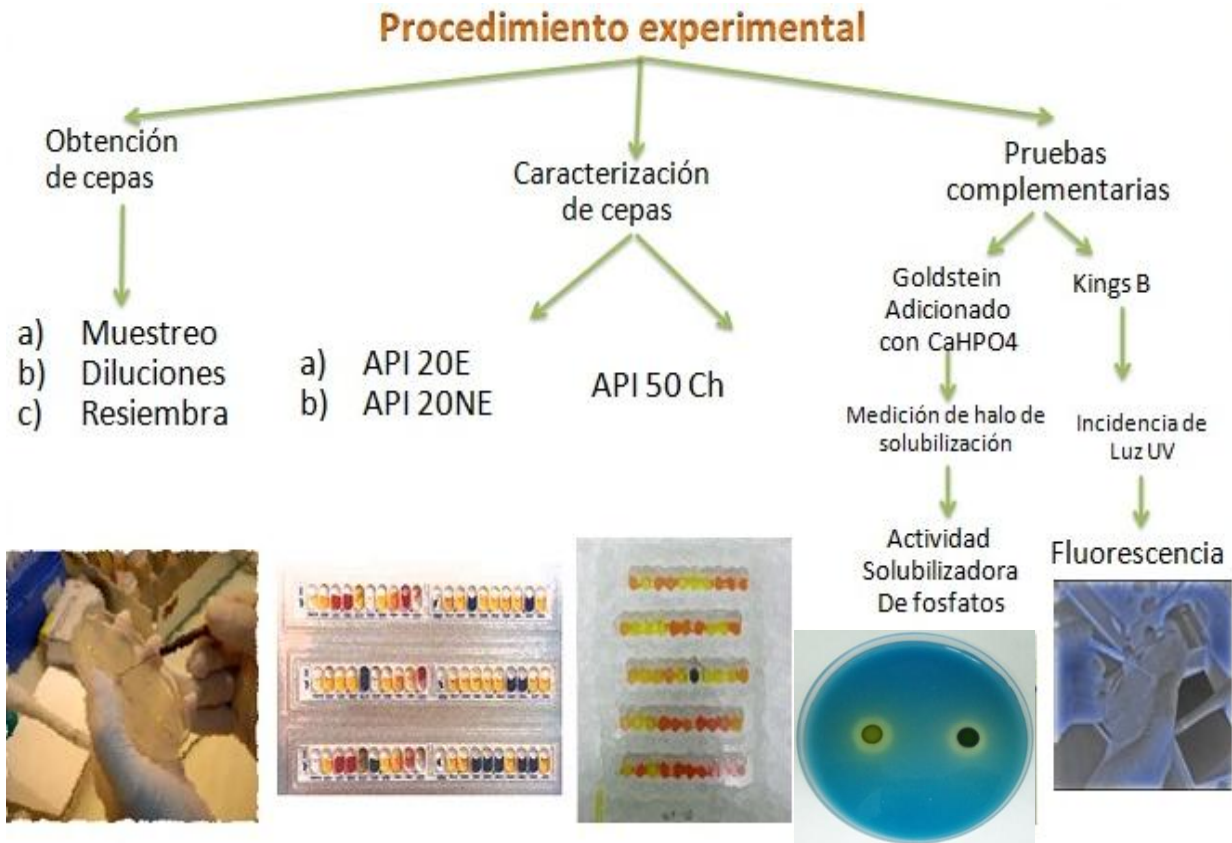
Criterios de exclusión

- Bacterias del género *Pseudomonas* que al someterlas al método de identificación de multipuebas API 20NE presenten un perfil metabólico idéntico a otra de las bacterias identificadas.

Criterios de eliminación

- Bacterias provenientes del suelo de la rizósfera de plantas de maíz con crecimiento de 20 días posterior a la siembra, aislados de plantas que crecen en la zona de San Juan Atenco Puebla, que no pertenezca al género *Pseudomonas* después de someterlas al método de identificación de multipuebas API 20NE.
- Para que las bacterias fueran sembradas en API 50CH fue necesario que su perfil bioquímico resultante del método de identificación multipuebas API 20NE no coincidiera con alguno de las otras bacterias.

11. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



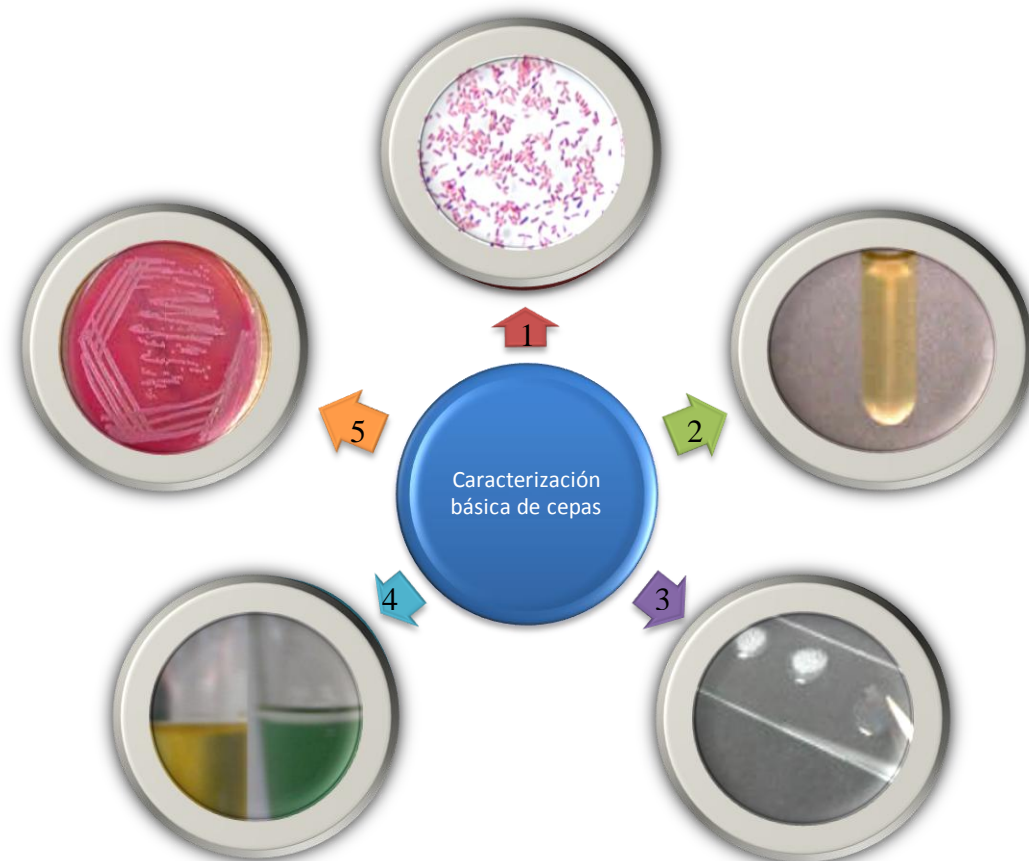
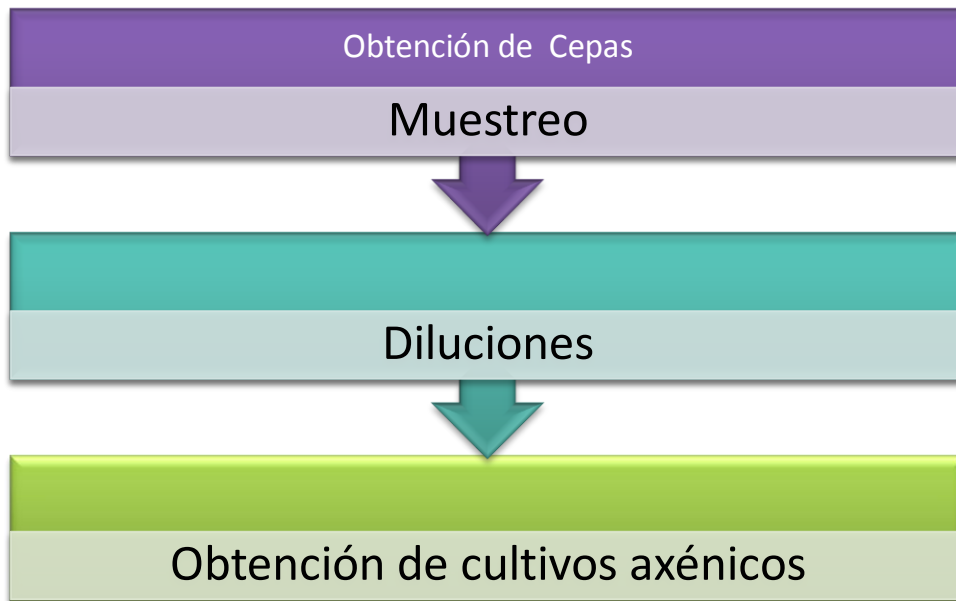


Diagrama 1. Caracterización básica de cepas: 1.Tinción de Gram, 2.movilidad, 3.oxidasa y catalasa, 4.medio OF y 5.crecimiento en agar MacConkey.

12. Resultados y Discusión

12.1 Caracterización de bacterias aisladas de diferentes variedades de maíz

Los cultivos axénicos obtenidos a partir de las diluciones de suelo fueron conservados en viales a -80 °C para formar parte de la colección de bacterias del Laboratorio de Microbiología de Suelos del ICUAP. Las cepas purificadas se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas como el crecimiento en agar MacConkey, el tipo de metabolismo mediante el crecimiento en medio OF; además de la prueba de catalasa y oxidasa. Se procedió a utilizar los dos grupos de galerías de Biomerieux, la API 20E® y API20NE® en el sistema de software APIWEB de Biomerieux para cada aislado; siguiendo las indicaciones del fabricante se inoculó cada tubo de la galería donde la producción de ácido se determinó por el vire del indicador al cambiar el pH. Se capturó la información y fue posible entonces determinar el género y la especie bacteriana a la que pertenece cada una de las cepas. (Figura 4). Del total de bacterias, 93 fueron identificadas como pertenecientes de género *Pseudomonas*.

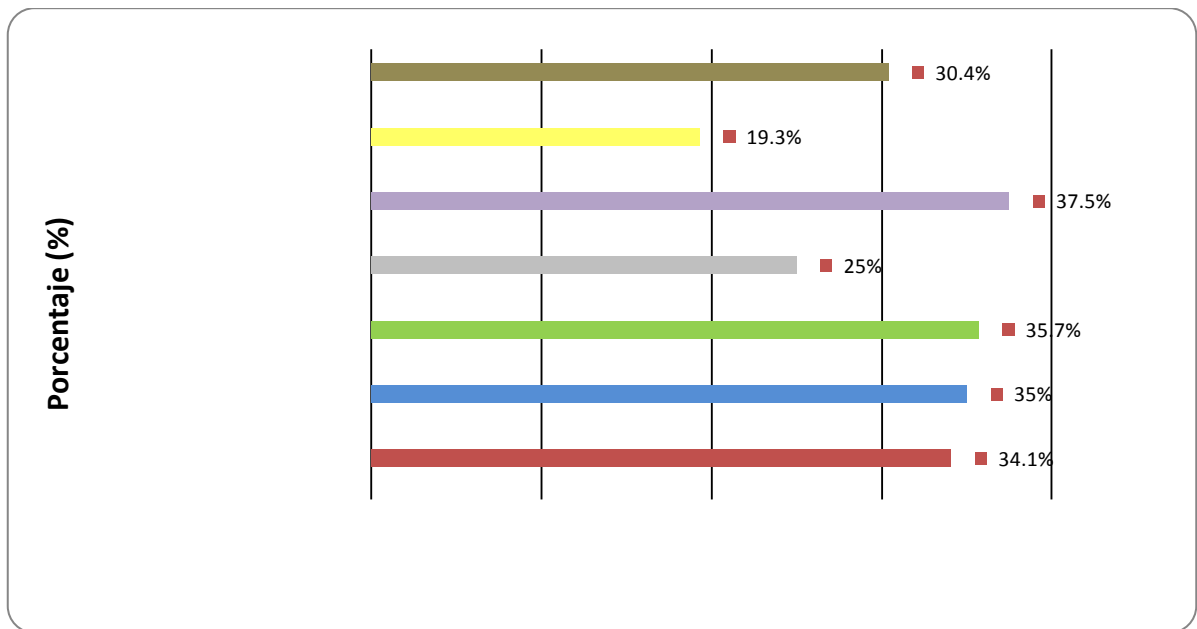


Figura 4: Porcentaje de bacterias del género *Pseudomonas* identificadas en las variedades de maíz analizadas.

Las especies de bacterias que se identificaron por API 20E en asociación con maíz fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas* ssp. (Cuadro 5). Únicamente *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* se encontraron de manera significativa en los suelos de la rizósfera en comparación con las demás especies

Cada variedad de maíz mostró diferencia tanto en las especies asociadas a su rizósfera como en el número presente en dicha variedad (Cuadro 5) pudiendo observar por ejemplo, que la rizósfera de la variedad de criollo azul y criollo rojo tienen una marcada tendencia a la asociación de *Pseudomonas aeruginosa*, en contraste con la rizósfera del teocintle y del maíz QPM donde predomina *Pseudomonas fluorescens*; lo anterior puede estar relacionado tanto con el efecto que tienen las raíces de las plantas al liberar diferentes compuestos químicos que pueden estimular o inhibir a los microorganismos que se encuentran a su alrededor (Velázquez *et al.*, 1999), como con el genotipo y la edad de la planta ya que estos son factores que pueden influir en las especies de las bacterias que se asocian a su rizósfera (Pereira *et al.*, 2011). Además la presencia de especies de *Pseudomonas* asociadas a maíz ha demostrado ser una ventaja ecológica por su capacidad de producir un incremento de la productividad, biorremediación del medio y control de patógenos ya que son algunas de las características del género (Hayat *et al.*, 2010).

Cuadro 5. Total de bacterias *Pseudomonas* encontradas para cada una de las variedades de maíz analizadas

Variedad de Maíz	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. sp</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. alcaligenes</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. luteola</i>	<i>P. oryzae</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>
Suelo control	12	1	1	0	0	10	0	0	0
Criollo amarillo	11	4	1	1	2	3	0	0	0
Criollo rojo	14	0	9	0	1	3	0	0	1
Criollo azul	21	3	11	2	1	0	0	1	3
Teocintle	17	3	3	0	6	2	2	1	0
QPM	18	1	3	0	14	0	0	0	0
Maíz total	93	12	28	3	24	18	2	2	4

12.2 Caracterización fisiológica bacteriana

También mediante las galerías de Biomerieux, API20NE® se pudo generar un perfil bioquímico para cada aislado bacteriano, el cual se ajustó en forma porcentual. Ese perfil se comparó entre las variedades de maíz como se observa en el Cuadro 6, dónde podemos notar que existe diferenciación en la actividad metabólica de la población bacteriana de acuerdo al maíz evaluado. La diversidad funcional tanto de la planta como de la bacteria tiene un efecto determinante en la estabilidad a largo plazo de un ambiente (Sharma *et al.*, 1998). Esto se encuentra en estrecha relación con el tipo de compuestos liberados en la rizósfera de las plantas de las diferentes variedades de maíz.

La importancia de elaborar los perfiles bioquímicos reside en poder analizar dichos perfiles a nivel de comunidad, donde es posible medir su funcionalidad mediante diversas técnicas bioquímicas (Mulder *et al.*, 2006)

La predominancia de un grupo bacteriano en la raíz de maíz depende de su especificidad así como de la influencia que el suelo ejerce sobre ella (Remenant *et al.*, 2009). La diferencia en la actividad metabólica de las bacterias está relacionada con las fuentes de carbono disponibles, pues dicha disponibilidad es un factor que controla el crecimiento bacteriano en el suelo y la utilización de sustratos, además de ser importante a nivel taxonómico (Carvalho *et al.*, 2011).

Cuadro 6. Diversidad bioquímica de aislados bacterianos asociados a seis variedades de maíz determinada mediante el Sistema API20NE.

	N O 2	T R P	G L U	A D H	A U R	E S C	G E L	P N G	G L U	A R A	A M N	M A N	M A N	M A N	G L U	G N T	C A P	A D I	M L T	C I T	P A C	O X
	%																					
Amarillo (10)	60	0	0	0	10	30	60	40	90	90	20	90	70	30	90	60	0	90	100	10	40	
Suelo (8)	38	0	0	0	13	50	38	63	88	88	63	88	50	63	88	25	0	100	75	38	38	
Azul (10)	90	0	0	0	0	0	70	0	90	90	0	80	60	0	90	90	20	100	90	0	90	
Rojo (8)	88	0	0	0	38	25	50	25	75	75	25	88	50	25	100	63	25	88	50	25	25	
QMIP (6)	0	0	0	100	33	33	100	17	100	83	100	83	83	33	83	100	0	83	83	0	33	
Teocintle (8)	75	0	13	25	13	13	25	13	100	100	25	88	88	13	100	88	0	100	100	0	50	
Promedio (50)	62	0	2	16	16	24	56	26	90	88	34	86	66	26	92	70	8	94	84	12	48	

API 20 NE para obtener datos de: NO₃ (Reducción de nitratos a nitritos), N2 (Reducción de nitratos a nitrógeno), TRP (Formación de indol), GLU (Fermentación de glucosa), ADH (Arginina deshidrolasa), URE (ureasa), ESC (hidrólisis de β-glucosidasa), GEL (protesas), PNPG (β- galactosidasa), GLU (asimilación de glucosa), ARA (asimilación de arabinosa), MNE (asimilación de manosa), MAN (asimilación de manitol), NAG (asimilación de N-acetil glucosamina), MAL (asimilación de maltosa), GNT (asimilación de gluconato), CAP (asimilación de caprato, ADI(asimilación de adipato), MLT (asimilación de malato), CIT (asimilación de citrato), PAC (asimilación de fenil acetato) y OX (tetrametil-p-fenildiamina).

12.3 Caracterización metabólica de las bacterias

Para la realización de esta prueba fue necesario emplear un proceso de eliminación en el cual se descartaron los aislados bacterianos que presentaran el mismo perfil bioquímico resultante en la prueba del API 20 NE (Figura 5). El patrón de utilización de hidratos de carbono, fue determinado con la galería enzimática API 50 CH (Figura 6), API 50CHL y con el software API WEB. Se realizan dos lecturas, una a las 24 h y otra a las 48 h, siendo la definitiva la de 48 h, posteriormente se elaboró un perfil metabólico y se ajustó de manera porcentual (Cuadro 7).

De manera similar que con el API 20 E y el API20NE se decidió separar los resultados para cada una de las diferentes variedades de maíz analizadas; sin embargo en este caso fueron comparándose individualmente con las bacterias del suelo control. Para cada una de las gráficas se decidió omitir aquellas enzimas que no presentaran actividad metabólica en las comparaciones.



Figura 5. Galería multipuebas API20NE transcurridas 24 horas de incubación a 37°C

Las Figuras 7 , 8, 9, 10, 11 y 12 muestran la utilización de carbohidratos para las bacterias del género *Pseudomonas* procedentes de maíz amarillo, maíz azul, maíz rojo, maíz QPM, maíz silvestre teocintle y la población total asociada a todas las variedades de maíz, para entender mejor las figuras, se utilizará el Cuadro 7 como referencia al CH utilizado. En todos los casos se puede notar una preferencia por monosacáridos en comparación de los disacáridos. Además de que las poblaciones que se asocian a maíz tienden a tener una mayor actividad metabólica comparada con las bacterias asociadas a suelo. Lo anterior puede estar en relación con los compuestos liberados en la rizósfera de las plantas de maíz ya que se ha demostrado que se pueden encontrar los carbohidratos: Fuc,

Glm, Rha, Gal, Glu, Xyl, Man, Gla y Gua junto con aminoácidos y ácidos carboxílicos (Bacic, 1986; Carvalhaizet *al.*, 2001).



Figura 6. Galería multipuebas API 50CH transcurridas 24 horas de incubación a 37°C

Cuadro 7. Diversidad metabólica presente en los aislados bacterianos asociados a 6 variedades de maíz determinada mediante API 50 CH.

Núm.	Código	Porcentaje	Núm.	Código	Porcentaje
0	CONTROL	0	25	ESC	50
1	GLY	58	26	SAL	12
2	ERY	6	27	CEL	38
3	D-ARA	12	28	MAL	44
4	L-ARA	80	29	LAC	30
5	RIB	30	30	MEL	26
6	D-XYL	66	31	Suc	36
7	L-XIL	0	32	TRE	58
8	ADO	8	33	INU	8
9	β -M-D-X	2	34	MLZ	6
10	GAL	74	35	RAF	18
11	GLU	80	36	Starch	6
12	FRU	68	37	GLYG	6
13	MaN	72	38	XLT	6
14	SorB	2	39	GEN	20
15	RHA	2	40	D-TUR	26
16	DUL	2	41	D-LYX	0
17	INO	16	42	D-TAG	6
18	MAN	52	43	D-FUC	64
19	SOR	18	44	L-FUC	48
20	1-M-D-M	6	45	D-AR	18
21	1-M-D-G	10	46	L-AR	2
22	N-A-G	4	47	GNT	0
23	AMY	10	48	2-K-G	0
24	ARB	12	49	5-K-G	0

*Para ver el sustrato referente al código ir al Cuadro 4

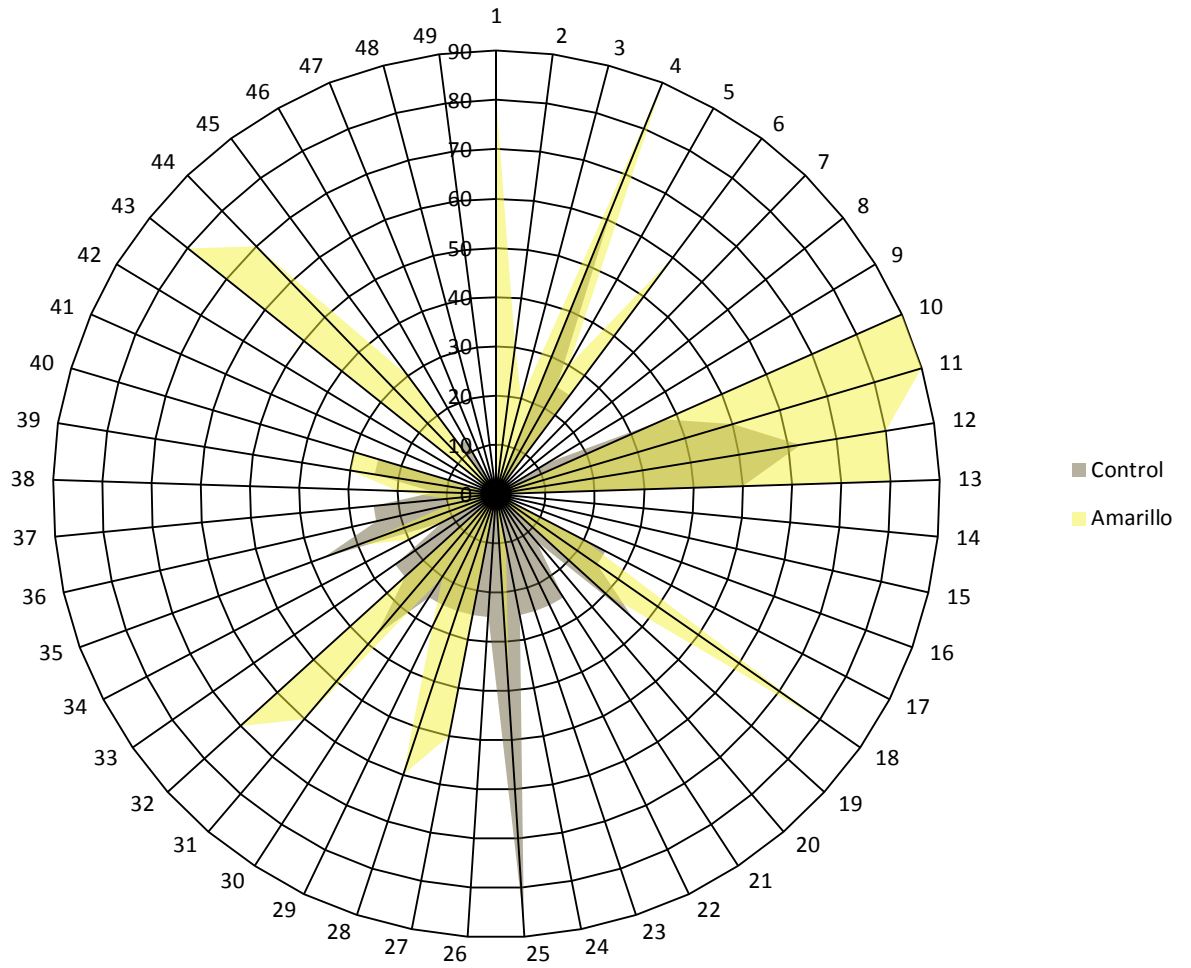


Figura 7. Utilización porcentual de diferentes fuentes de carbono por la población de *Pseudomonas* asociadas a suelo contrastando con maíz amarillo.

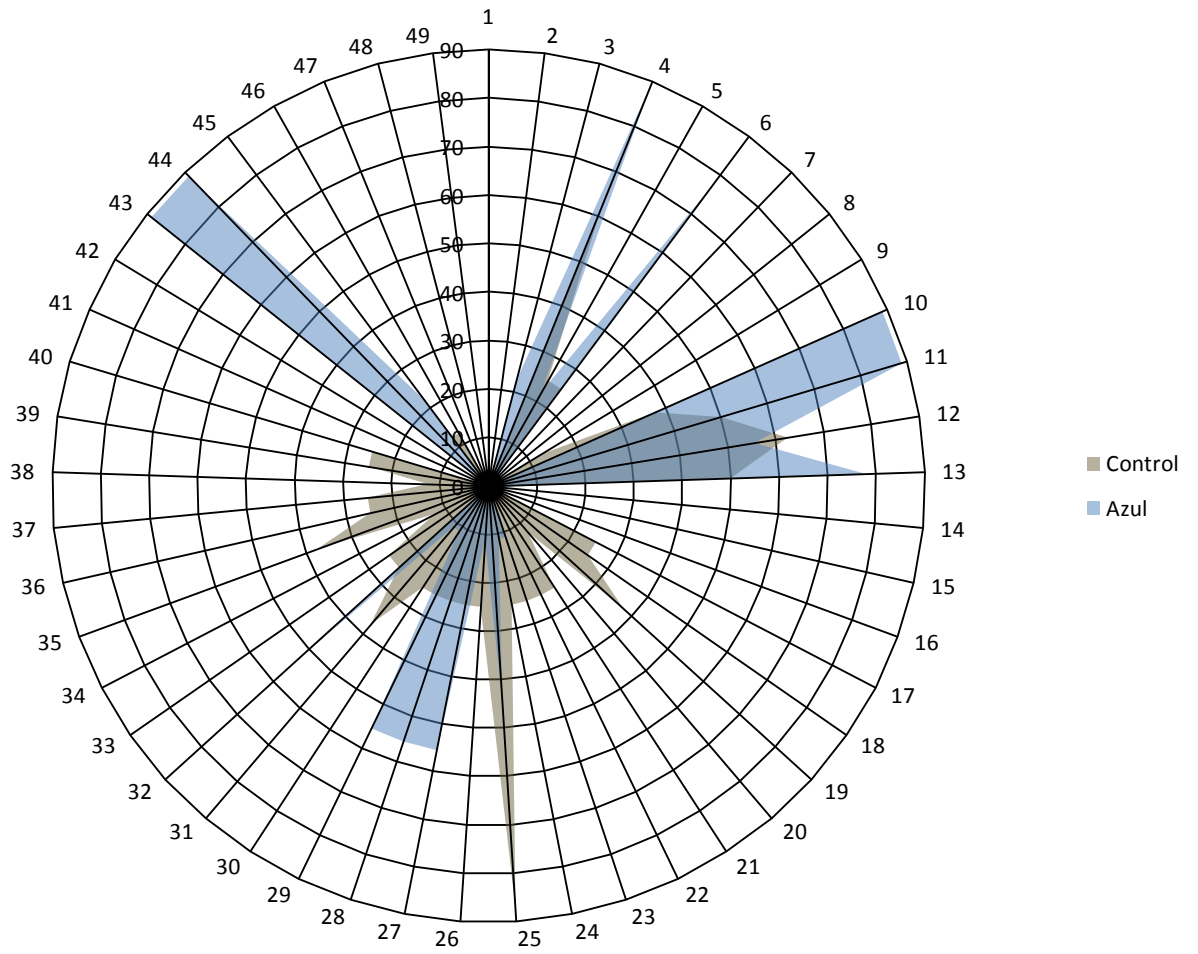


Figura 8. Utilización porcentual de diferentes fuentes de carbono por la población de *Pseudomonas* asociadas a suelo contrastando con maíz azul

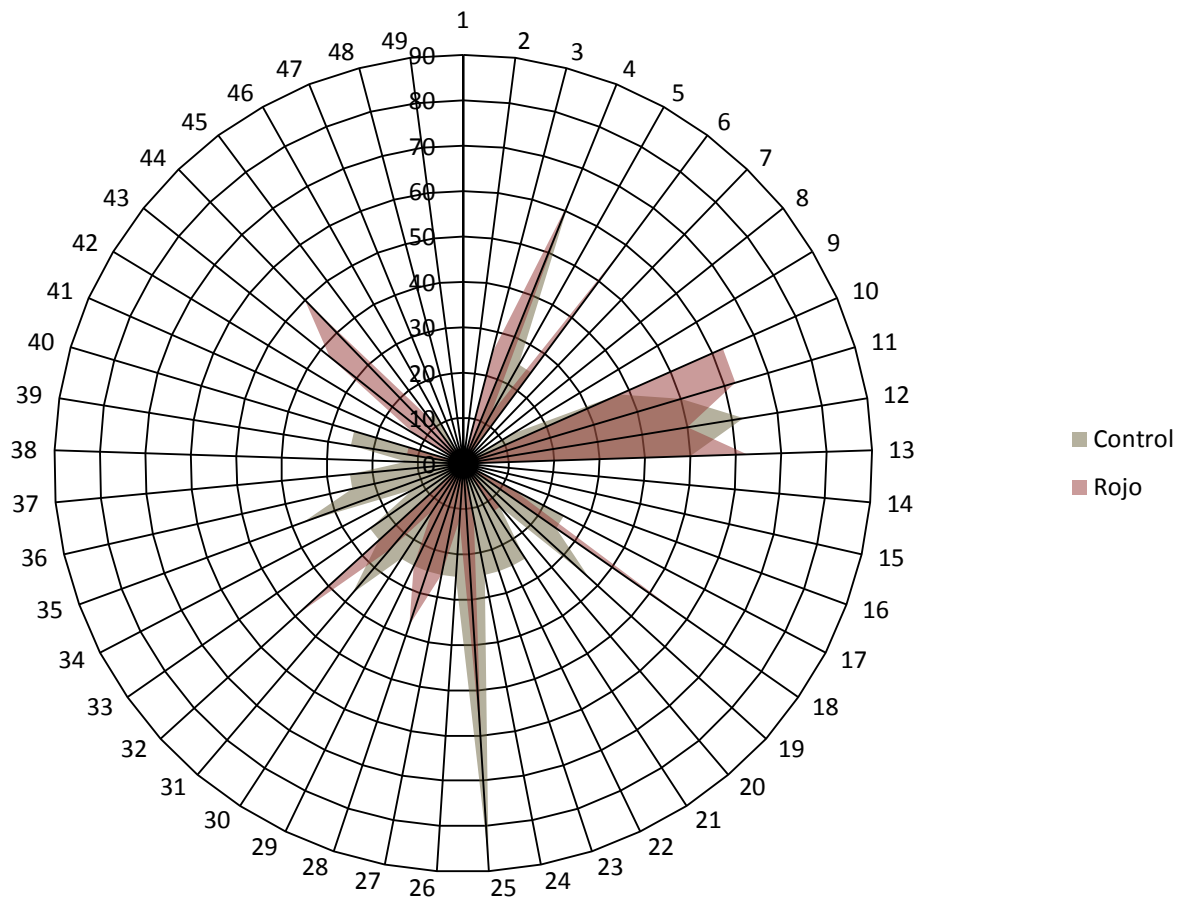


Figura 9. Utilización porcentual de diferentes fuentes de carbono por la población de *Pseudomonas* asociadas a suelo contrastando con maíz rojo.

Una de las fuentes de carbono menos utilizadas por las poblaciones bacterianas asociadas al maíz es la esculina, a excepción de maíz rojo, Figura 9, con un 63% de la población bacteriana con actividad de hidrólisis de la esculina (β -glucosidasa) y que se acerca al 83% de la población control. Esto podría indicar la presencia de un alto contenido de carbohidratos de tipo polimérico en la variedad de maíz rojo (Li *et al.*, 2008).

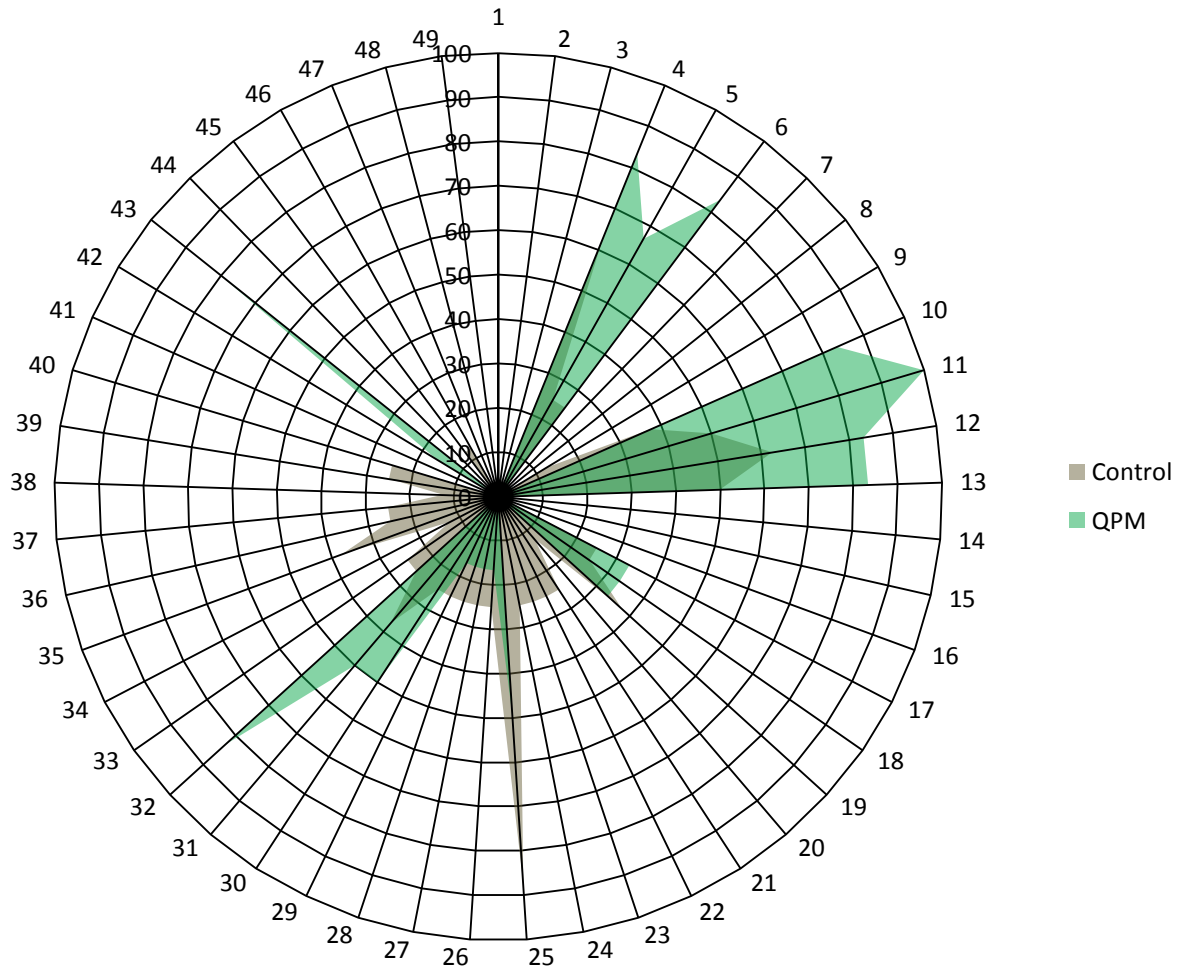


Figura 10. Utilización porcentual de diferentes fuentes de carbono por la población de *Pseudomonas* asociadas a suelo contrastando con maíz QPM.

El maíz QPM ha sido generado como un producto de alta cantidad de proteína, lisina y triptófano, esto se ve reflejado en la Figura 10 donde se observa una alta actividad de las enzimas arginina, lisina y ornitina descarboxilasa en el API20NE. (Peña-Valdivia et al., 2007). Además los sustratos de urea y gelatina demuestran alta afinidad a la población bacteriana asociada a maíz QPM.

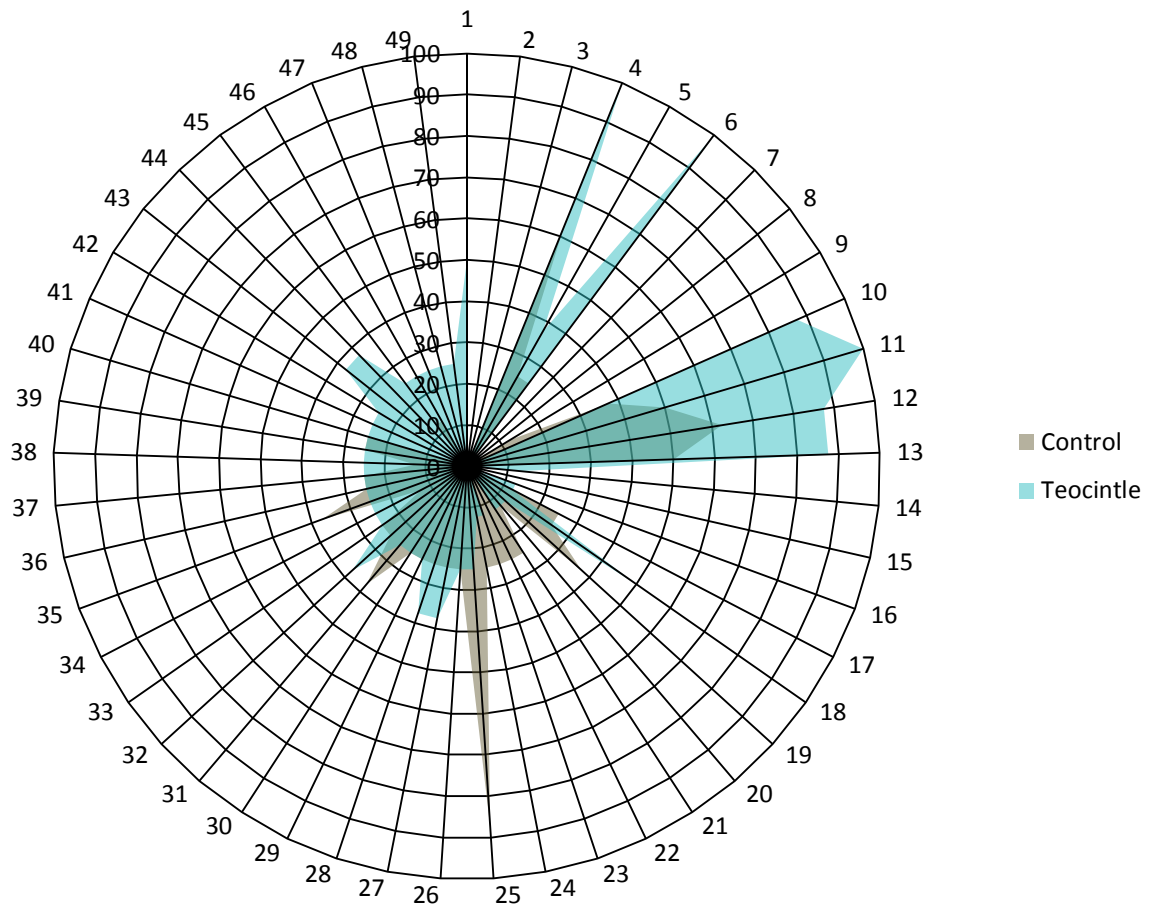


Figura 11. Utilización porcentual de diferentes fuentes de carbono por la población de *Pseudomonas* asociadas a suelo contrastando con maíz Teocintle.

En la Figura 11 se observa que la población bacteriana asociada a teocintle, a diferencia de las anteriores variedades de maíz, presenta mayor necesidad en la asimilación de carbohidratos como: glucosa, arabinosa, manitol, D-xilosa, así como la utilización de enzimas capaces de metabolizar sustratos como keto- gluconato, tagatosa, turanosa, rafinosa entre otros. Los ácidos grasos y adipato, son utilizados mayormente por la población bacteriana asociada a maíz azul seguido de maíz silvestre teocintle, lo cual indica la presencia de componentes semejantes en la rizósfera de estos tipos de maíz.

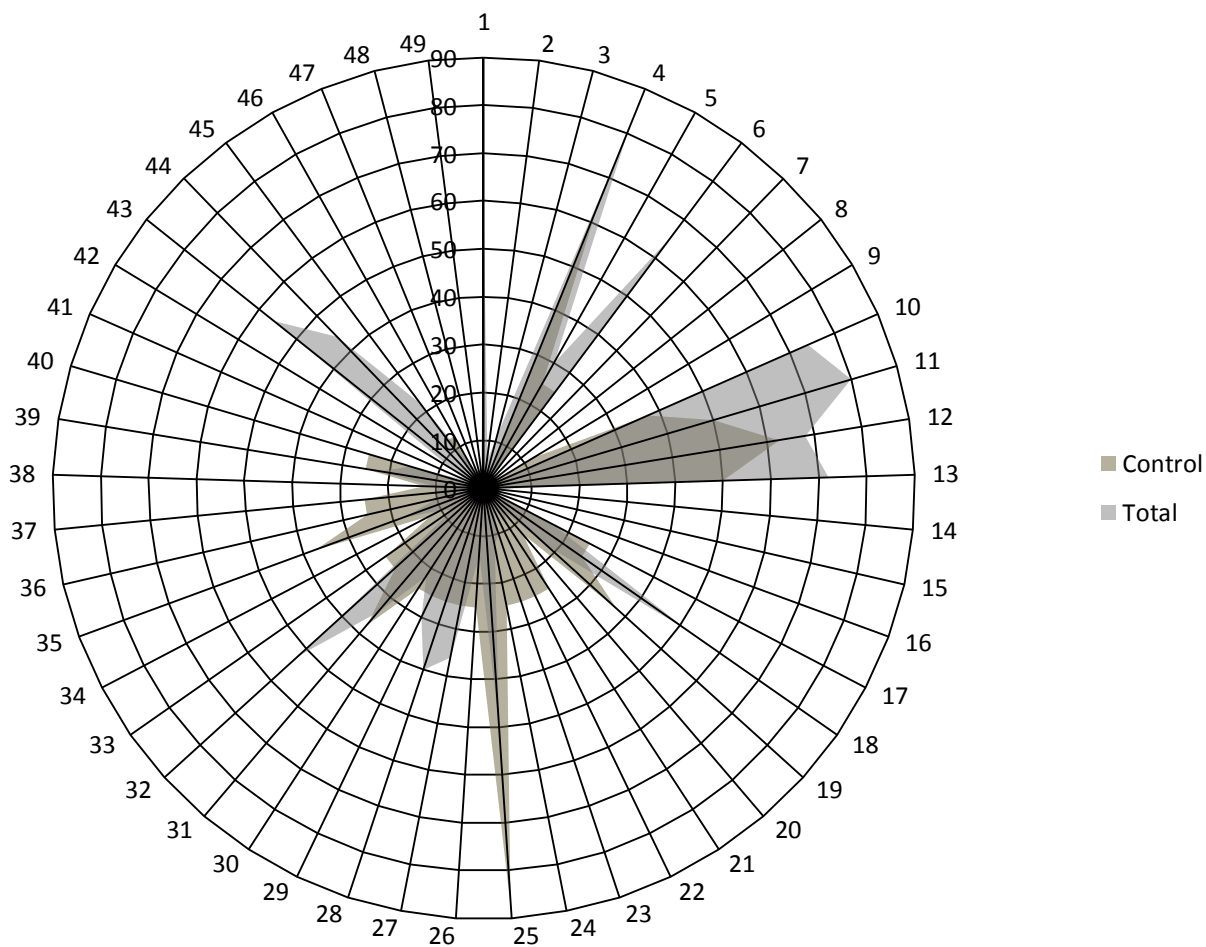


Figura 12. Utilización porcentual de diferentes fuentes de carbono por la población de *Pseudomonas* asociadas a suelo control contrastando con maíz total.

En la Figura 12 podemos notar el contraste de la presencia de bacterias del género *Pseudomonas* del suelo control frente al suelo de la rizósfera en las variedades de maíz; a nivel metabólico existe un incremento tanto en la diversidad de carbohidratos utilizados, así como en el porcentaje de bacterias que lo utilizan, siendo los más empleados GLU, GAL, FRU. L-ARA, D-XYL y D-FUC.

12.4. Detección de la actividad solubilizadora de fosfatos

Una vez identificadas las bacterias, se evaluó su capacidad solubilizadora de fosfatos utilizando la técnica de formación de halos de solubilización. Para ello, se inocularon tubos de caldo nutritivo con las cepas y se dejaron crecer en agitación a 30°C por un periodo de 24 h; posteriormente, la población de bacterias se ajustó con el tubo 5 en la escala del Nefelómetro de McFarland que corresponde aproximadamente a 1500 millones de bacterias ml (Somasegaran y Hoben, 1994). Se colocaron 100 µL del inóculo en los pozos del replicador de Steers y se sembraron en placas con medio Goldstein adicionado con CaHPO₄; las bacterias se dejaron crecer a 30°C durante 4 días, después de lo cual se observó la formación de halos transparentes alrededor de las colonias (Figura 13). Los resultados de la detección de la actividad solubilizadora de fosfatos ajustados de manera porcentual se pueden observar en el Cuadro 8.

El fósforo es uno de los nutrientes inorgánicos más requeridos por las plantas y los microorganismos; su presencia en el suelo es un factor determinante para el desarrollo vegetal debido a que se encuentran de manera no disponible tanto en su forma orgánica como en la inorgánica además el fósforo soluble en el suelo es generalmente muy bajo (Bais *et al.*, 2006). La síntesis de algunas enzimas bacterianas puede modular el nivel de solubilización de fosfato inorgánico y la mineralización de fosfato orgánico para hacer el fósforo disponible para la planta (Loredo-Osti *et al.*, 2004). La inoculación de bacterias solubilizadoras de fósforo favorece la producción de ácidos orgánicos y fosfatasas que facilita la mineralización del fósforo orgánico en el suelo y beneficia su absorción (Rodríguez *et al.*, 1999). La solubilización del fosfato por los ácidos orgánicos depende del pH del suelo y a su mineralogía, pues gracias a esto permite la formación de complejos estables con Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ y Al³⁺ (Paredes-Mendoza y Espinosa-Victoria, 2010).

Cuadro 8. Porcentaje de especies de *Pseudomonas* y solubilización de fosfatos en diferentes variedades de maíz

Especies Bacterianas	Suelo		Maíz amarillo		Maíz rojo		Maíz azul		Maíz Silvestre Teocintle		Maíz QPM		Maíces Total	
	No (%)	SF (%) ^a	No (%)	SF (%)	No (%)	SF (%)	No (%)	SF (%)	No (%)	SF (%)	No (%)	SF (%)	No (%)	SF (%)
<i>P. aeruginosa</i>	1 (8.3)	0 (0)	1 (9.1)	1 (100.0)	9 (64.3)	3 (33.3)	11 (52.4)	9 (81.8)	3 (17.6)	1 (100.0)	3 (16.7)	3 (100.0)	28 (30.1)	17 (60.7)
<i>P. alcaligenes</i>	-	-	1 (9.1)	0 (0)	-	-	2 (9.5)	0 (0)	-	-	-	-	3 (3.2)	0 (0.0)
<i>P. fluorescens</i>	-	-	2 (18.2)	2 (100.0)	1 (7.1)	1 (100.0)	1 (4.8)	0 (0)	6 (35.3)	4 (66.7)	14 (77.8)	13 (92.9)	24 (25.8)	20 (83.3)
<i>P. luteola</i>	10 (83.3)	0 (0)	3 (27.3)	0 (0)	3 (21.4)	0 (0)	-	-	2 (11.8)	0 (0)	-	-	18 (19.4)	0 (0.0)
<i>P. oryzae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (11.8)	2 (100.0)	-	-	2 (2.1)	2 (100)
<i>P. putida</i>	-	-	-	-	-	-	1 (4.8)	0 (0)	1 (5.9)	1 (100.0)	-	-	2 (2.1)	1 (50)
<i>P. stutzeri</i>	-	-	-	-	1 (7.1)	1 (100.0)	3 (14.3)	1 (100.0)	-	-	-	-	4 (4.3)	1 (25)
<i>P. sp.</i>	1 (8.3)	0 (0)	4 (36.4)	3 (75.0)	-	-	3 (14.3)	1 (33.3)	3 (17.6)	3 (100.0)	1 (5.6)	1 (100.0)	12 (12.9)	8 (66.6)
Especies Total	12 (100)	0 (0)	11 (100)	7 (63.6)	14 (100)	5 (35.7)	21 (100)	11 (52.4)	17 (100)	10 (58.8)	18 (100)	94.4 (100)	93 (100)	50 (53.8)

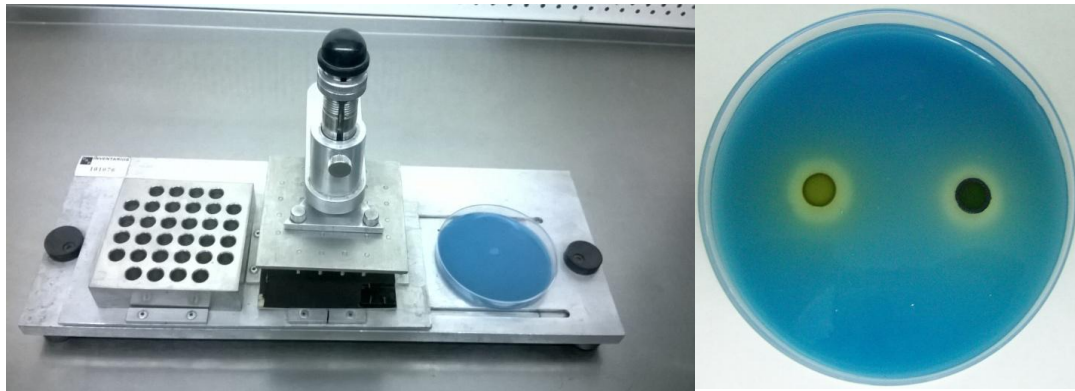


Figura 13. Siembra por medio del replicador de Steers en placas con medio Goldstein adicionado con CaHPO_4 ; 4 días después se observa la presencia de halos de solubilización

En un estudio previo, se obtuvo una solubilización bacteriana característica para cada variedad de maíz con respecto a la población total bacteriana: maíz amarillo 51.72%, maíz azul 40%, maíz rojo 28%, teocintle 43.18%, QPM 44.89% y suelo 6.6% (Medina et al., 2011). En el Cuadro 8, se observa la proporción por especie en las diferentes variedades de maíz, el porcentaje de las especies de *Pseudomonas* con capacidad de solubilizar fosfatos. Se aprecia que *P. luteola* y *P. alcaligenes* no presentan dicha propiedad, mientras que *Pseudomonasaeruginosa*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *P. stutzeri*, *P. fluorescens* y *P. putida* lograron solubilizar los fosfatos en un 67.9%, 100%, 75%, 83.3% y 50% respectivamente siendo especies pertenecientes al género *Pseudomonas* previamente reportado como organismo solubilizador de fosfatos minerales (Díaz et al., 2001; Hay et al., 2010).

12.5. Producción de sideróforos

La producción de pioverdina puede ser una estrategia bacteriana en la rizósfera, no sólo para el abastecimiento de hierro, sino, también, como un mecanismo de defensa contra otros microorganismos (Höfte et al., 1991). Además de la pioverdina, las especies del género *Pseudomonas*, son capaces de generar

pigmentos solubles que son observables a luz UV en medio B de King's como las piocianinas y fluoresceínas, esto se puede ver en los resultados del Cuadro 9 que concuerdan con los datos de Cid (2006), quien observó una marcada tendencia por parte del género *Pseudomonas* a producir dichos pigmentos.

Cuadro 9. Porcentaje de las especies de *Pseudomonas* que producen pigmentos fluorescentes en las diferentes variedades de maíz.

Especie	Total de bacterias	Bacterias que presentan fluorescencia	Porcentaje %
Indefinido	12	5	42
<i>Pseudomonasaeruginosa</i>	28	20	71
<i>Pseudomonasalcaligenes</i>	3	0	0
<i>Pseudomonasfluorescens</i>	24	16	67
<i>Pseudomonasluteola</i>	18	0	0
<i>Pseudomonasoryzihabitans</i>	2	0	0
<i>Pseudomonasputida</i>	2	0	0
<i>Pseudomonasstutzeri</i>	4	0	0

De manera similar a la solubilización de fosfatos, la presencia de pigmentos fluorescentes en la mayoría de las *Pseudomonas* analizadas nos indica la preferencia que tienen las variedades de maíz a rodearse de bacterias que le permitan no solo facilitar la absorción de nutrientes como los fosfatos y el hierro, sino sirvan al mismo tiempo de defensa contra agentes patógenos.

13 CONCLUSIONES

Del total de bacterias obtenidas del suelo, 93 fueron identificadas como pertenecientes al género *Pseudomonas* mediante el método de identificación multipruebas API 20NE.

Las especies de bacterias que se identificaron por API 20NE en asociación con maíz fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas* sp. Únicamente *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* se encontraron de manera significativa en los suelos de la rizósfera en comparación con las demás especies

Comparado con el total de bacterias de la región de San Juan Atenco, Puebla, México, el género *Pseudomonas* presentó una alta capacidad para solubilizar fosfatos, llegando hasta un 83.3% en el caso de *P. fluorescens*. Esto puede ser un factor que nos indique la importancia del fosfato en el metabolismo de las variedades de maíz y el por qué de la predominancia de éste género en su rizósfera.

Pseudomonas aeruginosa (42%) y *Pseudomonas fluorescens* (67%) fueron las únicas especies identificadas que presentaron la capacidad para producir pigmentos fluorescentes.

14. BIBLIOGRAFIA

- Adeboye M.K.A., E.N.O Iwuafor y J.O. Agbenin. 2006. The effects of crop rotation and nitrogen fertilization on soil chemical and microbial properties in Guinea Savanna Alfisol of Nigeria. *Plant Soil* 281: 97-107
- Atlas R.M. 2002., *Ecología Microbiana y microbiología ambiental*, Ed Addison Wesley, Madrid, 696 p.
- Bacic A., S. F. Moody y A. Clarke. 1986. Structural Analysis of Secreted root Slime from Maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol.* 80: 771-777.
- Bais H. P., T. L. Weir, L. G. Perry, S. Gilroy, J. M. Vivanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 233–266.
- Barker y J.F. Banfield. 1998. Zones of chemical and physical interactions at interfaces between microbial communities and minerals: A model. *Geomicrobiology*, 15: 223-244.
- Bashan Y. y G. Holguin. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos beneficiosos II. Bacterias asociativas de la rizosfera. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (Mexico). *FAO. Terra* 14(2):195-210.
- Bauer T. 2001. Microorganismos fijadores de nitrógeno. (<http://www.microbiologia.com/nf/suelo/rhizobium.html>). Consultado el 14/Febrero/2014
- Burdman, S., E. Jarkevicht y Y. Okón. 2000. Recent advances in the use of PGPR in Agriculture. *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*. Science Publishers Inc., Plymouth, UK. 29-250 p.
- Campbell, Lees H. 1967. *Bioquímica del suelo* Vol. 1 New York: Marcel Dekker, pp 194- 334.
- Carcaño-Montiel M.G., M.A. Mascarúa-Esparza y L. López-Reyes. 2003. Producción y comercialización de inoculantes bacterianos en México. Módulo 6. XXI Curso diplomado internacional de Edafología "Nicolás Aquilera". Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Carvalho L. C., P. G. Dennis, D. Fedoseyenko, M. Hajirezaei, R. Borriss, y N. von Wirén. 2011. Root exudation of sugars, amino acids, and organic acids by maize as affected by nitrogen, phosphorus, potassium, and iron deficiency. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174: 3–11
- Carvalho E. B., V. M. A. Carvalho, I. E. Marriel, G. V. E. Pitta y J. Guedes. 2011. Rhizosphere properties of maize genotypes with contrasting phosphorus efficiency. *R. Bras. Ci. Solo.* 35:171-181.
- Chaiarini L., A. Bevivino, C. Dalmastrì, C. Nacamulli y S. Tabacchioni. 1998. Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. *Appl Soil Ecol.* 226: 11-18.
- Cid, M. I. S. (2006). Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.) (Doctoral dissertation, Universidad Austral de Chile). pp77.
- Diario Oficial de la Federación, 2002, Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.
- Duke S.O. 1996. Phytochemicals of microbial origin with potential for use as herbicides: Ed. Copping, Crop protection agents for nature: Natural products and analogues, Royal society of Chemistry, Cambridge pp 110-113
- Ehrlich, 1996, How microbes influence mineral growth and dissolution. *CemGeol* 132: 5-9.
- Faggioli, S, Cazorla, R. Cristian. A. Vigna, y M. Berti, 2010, Fertilizantes biológicos en maíz, ensayo de inoculación con cepas de *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*, Estación experimental agropecuaria Marcos Juárez. Facultad de Agronomía- UBA. Disponible en: http://agrolluvia.com/wp-content/uploads/2010/01/eea-marcos-juarez-fertilizantes-biologicos-en-maiz_5.pdf
- Fernández S.R, C. L. A., Morales, M.A. Gálvez, 2013, Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional. Una revisión indispensable, *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 36 Supl. 3-A: 275 – 283.

- Flores A. C., J. C Contreras., M. H. Reyes., y R. Rodríguez .2012. Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del género *Azotobacter*, Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, 4 (8)
- Goldstein, A.H. 1986. Bacteria solubilization of mineral phosphates; Historical perspective and future prospects. American Journal of Alternative Agriculture. 1: 51-57.
- Goodman, M. M. y W. L. Brown. 1988. Races of corn. In: G.F. Sprague y J.W. Dudley editors. Corn and Corn Improvement, Agronomy Monographs No.18. American Society of Agronomy, Madison, WI. Crop Science Society of America, Inc. and Soil Science Society of America, Inc. pp. 33-79.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. y Ahmed, I., 2010, Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Annals of Microbiology, 60:579-598.
- Höfte, M., K.Y. Seong, E. Jurkevitch y W. Verstraete. 1991. Pyoverdine production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain 7NSK2: Ecological significance in soil. Plant Soil 130: 249-257.
- Ibañez, C., S. Palomeque y F. Fontúrbel. 2004. Elementos principales del suelo, geodinámica y dinámica de los principales componentes del suelo. En: Fontúrbel pp 1-3
- Khosro M. y S. Yousef, 2004. bacterial biofertilizers for sustainable crop production: a review, Asian Research Publishing Network, 7 (5): 307-316
- Kloepper, J. 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). En: *Azospirillum/* Plant Association. Okon J. (ed). Boca Ratón, FL. CRC Press. pp137-160.
- Li K., Ch. Xu, Z. Li, K. Zhang, A. Yang, y J. Zhang. 2008. Comparative proteome analyses of phosphorus responses in maize (*Zea mays* L.) roots of wild-type and low-P-tolerant mutant reveal root characteristics associated with phosphorus efficiency. 55:927-939.
- Lippincott Williams y Wilkins 2006, Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas a color. 6a edición Editorial panamericana, España, pp 1623.
- López M., R. Martínez, M. Brossard, A. Bolívar, N. Alfonso., A. Alba y H. Pereira. 2008. Efecto de biofertilizantes bacterianos sobre el crecimiento de un

- cultivar de maíz en dos suelos contrastantes Venezolanos. *Agronomía Tropical*. 58(4): 391-401.
- Loredo-Osti C., López-Reyes L. & Espinosa-Victoria. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*. 22:25-239.
- Lozano F. J. 2004. Efecto antagonista de *Azospirillum* sp. Contra hongos colonizadores de semillas de *Zea mays* L. BUAP. Tesis de Licenciatura escuela de Biología Puebla. 68
- Lutz H. 2002, *Geomicrobiology*, fourth edition, Marcel Dekker pp ,155
- Madigan M.T. J. Parker. 2003 *Biología de los microorganismos*, 10ª edición Ed. Pearson S.A. pp 370- 371
- Mantilla-Paredes A, G. Cardona, C. Peña-Venegas, U. Murcia, M. Rodríguez y M. Zambrano, Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana, Instituto Amazónico de Investigación Científica-SINCHI, *Rev. de Biología tropical*57(4):915-927.
- Márquez F. 2008. De las variedades criollas de maíz (*Zea mays* L.) a los híbridos transgénicos. I: recolección de germoplasma y variedades mejoradas, *Agricultura, sociedad y desarrollo*, Volumen 5(2): 152-156
- Martínez P., Bernal J., Agudelo E. y S. Bernier, 2012, tolerancia y degradación del glifosato por bacterias aisladas de suelos con aplicaciones frecuentes de roundupsl, *Revista Pilquen Sección Agronomía*, 5(12): 126.
- Marschner, P., D. Crowley y C. Hong Yang. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant soil* 261: 199- 208
- Matsuoka Y, M. M. Goodman Y. Vigouroux, Sanchez-G J, E. Buckler y J. Doebley. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (PNAS) USA. 99:6080-6084. Disponible en: teosinte.wisc.edu/pdfs/Matsuoka_et_al_PNAS.pdf, consultado el 21/Enero/2014

- Medina G. 2011. Diversidad de bacterias solubilizadoras de fosfatos asociadas a maíz (*Zea mays* L.). BUAP. Testis de Licenciatura, Escuela de Biología Puebla. 56.
- Mulder C., M. Wouterse, M. Raubuch, W. Roelofs y M. Rutgers. 2006. Cantransgenic maize affect soil microbial communities?. PLOS. Computational Biology. 2:128.
- Navarrete C, 2011, Los mitos del maíz entre los mayas de las tierras altas, Acervo de la Biblioteca Jurídica Virtual, Instituto de Investigaciones Jurídicas UNAM, publicación electrónica vol2. Disponible en: <http://biblio.juridicas.unam.mx/libros/6/2898/15.pdf>, consultado el 18/Junio/2013.
- Olalde P.V., L.I.G. Aguilera. 1998. Microorganismos y biodiversidad, Terra. 16(3) 289-292
- Ortega Packza R. 2003 Sin Maíz no hay país, CONACULTA, Dirección de Culturas populares e Indígenas p 123.
- Paredes-Mendoza M y Espinosa-Victoria D, 2010, Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica, Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. México, Terra Latinoamericana, vol. 28(1):pp. 61-70.
- Peña-Valdivia C., C. Trejo, J. Galicia y Sánchez-Urdaneta. 2007. Reaction of quality protein maize to substrate water potential: germination and inicial root growth. Rev. Fav. Agron. 24:236-331.
- Pérez C., L. De La Fuente, A. Arias y N. Altier, 2000, Uso de *Pseudomonas fluorescentes* nativas para el control de enfermedades de implantación de *Lotus corniculatus* L. Agrociencia, 4(1):41-47
- Pereira P., F. Ibañez, M. Rosenblueth, M. Etcheverry y E. Martínez-Romero. 2011. Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L.) through culture-dependent and culture-Independent methods. ISRN Ecology versión electrónica. pp 1-10
- Petenello M. C. Romagnoli y M. González. 2002. Poblaciones de microorganismos rizosféricos de maíz (*Zea mays*). Revista FAVE – Ciencias Agrarias. 1(1): 57-64.

- Pacheco J. y J. Pineda, 2004. Efecto de exudados de raíces de dos variedades de cebolla (*Allium cepa*) sobre el desarrollo de pyrenochaeta terrestres, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Postgrado de Agronomía, Venezuela, Fitopatología, 17(2): 33-37
- Quempis C. M. N. 2010. Determinación del efecto de los antibióticos en la diversidad de *Raoultella sp.* BUAP. Tesis de Licenciatura, Ciencias Químicas. Puebla. 52.
- Reyes, I., A. Valery y Z. Valduz. 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soil of colonizer plants at abandoned rock phosphate mine. Plant Soil 287: 69-75
- Reyes, I. y A. Valery. 2007. Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacterspp.* Bioagro 19(3): 117- 126.
- Rodríguez R. 2008 El Cultivo del maíz: temas selectos México: Colegio de Postgraduados / Mundi-Prensa; Año: 2008 (1ª Ed.). p 127.
- Selander R.K. y J.L. Musser. 1986 Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systemic, Applied and Environmental Microbiology 51:873-884.
- Sharma S., A. Rangger y H. Insam. 1998. Effects of decomposing maize litter on community level physiological profiles of soil bacteria. Microbial Ecology. 35:301-310.
- Sharma P. 2005 Enviromental microbiology, Alpha Science International Ltd. p2
- Smith, R. y T. Smith. 2001. Ecología. 4º edición. Addison Wesley, Madrid, p 642.
- Somasegaran, P. y H.J. Hoben, 1994, Handbook for Rhizobia: Methods in legume-rhizobium technology
- Torrez M.G., S.A. Valencia, J. Bernal, y P. Martinez, 2000, Isolation of Enterobacteria, *Azotobacter sp.* and *Pseudomonas sp.*, Producers of Indole -3-Acetic acid and siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere, Revista Latinoamericana de Microbiología, 42: 171-176.
- Vazquez P., G. Holguin, M.E. Puente, A. Lopez-Cortés, y Y. Bashan, 2000, Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of

mangroves in a semiarid coastal lagoon, *Biology and Fertility of Soils* 30 (5-6): 460-468.

Velázquez M. 1999 Estudio de la interacción Maiz- *Burkholderia cepacia*, *Asociación latinoamericana de Microbiología*, 41: 17-23

Zdor, R.E. y A.J. Anderson. 1992. Influence of root colonising bacteria on the defence responses of bean. *Plant Soil* 140:99-107.

15. ANEXOS

Anexo 1

Lista de materiales a emplear

- Cajaspetri estériles 90x60
- Cajaspetri estériles 60x15
- Tubos de ensayo de 10 mL
- Tubos de ensayo de 30 mL
- Micropipeta de 1.0 mL
- Micropipeta de 0.1 mL
- Varilla de vidrio
- Frascos Schott Duran 250 mL
- Frascos Schott Duran 500 mL
- Frascos Schott Duran 2000 mL
- Galería multipruebas API 20 E
- Galería multipruebas API 20 NE
- Galería multipruebas API 50 CH
- Nefelómetro de McFarland
- Replicador de Steers
- Azas bacteriológicas