



**BENEMÉRITA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE SUELOS

**TESIS**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS  
ASOCIADAS AL SISTEMA SUELO RAÍZ DE *Pinus cembroides***

PRESENTA

DAMARIS ANEL TEOMITZI CUAMATZI

DIRECTOR

M.C. Moisés Graciano Carcaño Montiel

ASESOR INTERNO

M.C. Reyna Almiray Pinzon



Puebla, Pue.

2014

El presente trabajo se realizó en el laboratorio Microbiología del Suelo del Instituto de Ciencias Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la dirección del M. C. Moisés Graciano Carcaño Montiel.

Este trabajo fue financiado por el proyecto SEP-PROMEP “Uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal en la producción de plantas destinadas a la reforestación”. Del cuerpo académico de Microbiología del Suelo BUAP CA-99 año 2013 y el proyecto Institucional de desarrollo de Biofertilizantes BiofosfoBUAP del cuál la sustentante fue becaria.

## **Agradecimientos**

*Este fue un proyecto que se convirtió en un reto personal más que cualquier tipo de meta culminada, la satisfacción que siento es infinita y aprovecho para agradecerles.*

*A mi Jesús, por ser mi roca, mi fortaleza, mi luz y el centro de mi vida.*

*A mi Ángel hermoso que me impulsa cada día, a mis padres y hermano por que han sido luz en mi vida, por brindarme su apoyo en todo lo que eh querido hacer en la vida, me han impulsado en los momentos en lo que eh querido dar marcha atrás, me han aguantado en los días de gran cansancio y desesperación, a su inmenso cariño y comprensión. Por haber sufrido y reído con migo, este éxito no es solo mío es de los cinco.*

*Al M. C. Moisés Graciano Carcaño Montiel, quien me dio la oportunidad de seguir y confió en mí. Por su dirección en los momentos en que lo necesite, su paciencia y constancia en lograr que esto llegara a su fin.*

*A Lupita quien me enseñó técnicas importantes para este trabajo, tuvo paciencia durante el entrenamiento y que también me ayudo a terminar mis experimentos cuando lo necesite.*

*A la M. C. Reyna Almiray Pinzon por su apoyo y consejos como asesor interno.*

*A la comisión revisora de tesis integrada por la Dra. Lucia López Reyes, la MSP. María de la Cruz Meneses Sánchez y el Q.F.B Oscar Perez Toriz.*

*Al Mtro. Armando Tapia Hernández por informarme de los apoyos económicos a los que pude acceder para la impresión de mi tesis.*

*A mis compañeros que me acompañaron durante este proceso como Lupita, Elizabeth, Lili, David, Edgar y los chicos de servicio que ya no están pero que en su momento fueron de gran apoyo.*

## ÍNDICE

### 1. INTRODUCCIÓN

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Generalidades

### 3. MARCO DE REFERENCIA

#### 3.1 Distribución e importancia del genero *Pinus* en México

#### 3.2 Distribución e importancia del genero *Pinus cembroides*

#### 3.3 Generalidades de las Bacterias

#### 3.4 Bacterias Gram negativas

#### 3.5 Suelo

#### 3.6 Deforestación

#### 3.7 Importancia de los microorganismos en la relación suelo-planta

#### 3.8 Interacción microorganismo-planta

#### 3.9 Microorganismos benéficos: Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

#### 3.10 Fijación biológica de nitrógeno

#### 3.11 Solubilización de Fosfatos vía microbiana

#### 3.12 Detección de sideróforos en bacterias

#### 3.13 Producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal

#### 3.14 Detección de bacteriocinas

### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 5. JUSTIFICACIÓN

### 6. OBJETIVOS

#### 6.1 Objetivo general

#### 6.2 Objetivos particulares

### 7. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

#### 7.1 Tipo de estudio

#### 7.2 Tamaño de muestra

#### 7.3 Sede y lugar de estudio

#### 7.4 Periodo de muestreo

#### 7.5 Criterios de inclusión

#### 7.6 Criterios de exclusión

7.7 Análisis estadístico de la información

7.8 Recursos Humanos

7.9 Recursos materiales

7.10 Recursos financieros

8. METODOLOGÍA

8.1 FASE DE LABORATORIO

8.1.1 Lugar de muestreo

8.1.2 Aislamiento de bacterias Gram negativas

8.1.3 Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno mediante ensayo cualitativo.

8.1.4 Identificación y caracterización de bacterias Gram negativas

8.1.5 Determinación de la actividad reductora de acetileno (ARA)

8.1.6 Cuantificación de índoles totales

8.1.7 Determinación de antibiosis *in vitro*

8.1.8 Determinación de sideroforos

8.1.9 Determinación de la actividad solubilizadora de fosfato tricálcico

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Aislamiento de bacterias

9.2 Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno mediante ensayo cualitativo

9.3 Identificación y caracterización de bacterias Gram negativas

9.4 Determinación de la actividad nitrogenasa por cepas de *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Cryseobacterium*, *Aeromonas* y *Rahnella*.

9.5 Producción de índoles totales por cepas de *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Cryseobacterium*, *Aeromonas* y *Rahnella*.

9.6 Determinación de antibiosis *in vitro* y determinación de sideróforos

9.7 Determinación de solubilización de fosfato tricálcico

10. Conclusión

11 Literatura citada

La presente tesis titulada “Aislamiento y caracterización de bacterias Gram negativas asociadas al sistema suelo raíz de *Pinus cembroides* realizada por la alumna Damaris Anel Teomitzi Cuamatzi, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención de grado de

Licenciado en Químico Farmacobiólogo

San Manuel, Puebla, Noviembre del 2014

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR DE TESIS

---

M.C. Moisés Graciano Carcaño Montiel

ASESOR EXTERNO

---

Dra. Lucia López Reyes

ASESOR INTERNO

---

M.C. Reyna Almiray Pinzon

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde el origen de la vida, las interacciones entre los microorganismos y el entorno han moldeado el ambiente actual de nuestro planeta. Estudios realizados nos han mostrado que la biomasa de microorganismos terrestres es muy grande y posiblemente sea el constituyente principal del planeta, particularmente las bacterias juegan un papel esencial en el sostenimiento de nuestra atmósfera, lo cual se ha dado a través del desarrollo de los ciclos biogeoquímicos (Escalante, 2007).

En la actualidad es conocido que las bacterias son ubicuas; algunos ambientes donde las bacterias han sido localizadas: son el suelo y el agua. Incluso, han sido encontradas en ambientes donde se consideraría que no existiera vida, como es el caso de manantiales ácidos o calientes, fuentes hidrotermales, ambientes contaminados con desechos radioactivos y ambientes extremadamente fríos como el antártico (Fredrickson *et al.*, 2004).

Los bosques son ecosistemas en los cuales se desarrolla un gran número de interacciones entre la comunidad biótica y las condiciones abióticas en las que viven sus elementos. Una de las interacciones que son de interés para esta investigación es estudiar la relación de *Pinus cembroides* con las bacterias Gram negativas asociadas al sistema suelo-raíz que es lo que se conoce como rizósfera. Por tal motivo es importante lograr aislarlos y caracterizar a estos microorganismos ya que algunos miembros de la comunidad bacteriana de *Pinus cembroides* están involucrados en procesos que afectan el crecimiento del pino como: la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de los fosfatos del suelo, la producción de auxinas así como la generación de sustancias antagonistas entre otros. Por tal motivo se evalúa a los microorganismos asociados a *Pinus cembroides*.

## **2. MARCO DE REFERENCIA**

### **2.1 Generalidades**

La raíz de un *Pinus sylvestris* se encuentra asociada a bacterias pertenecientes a *Bacillus* spp., *Burkholderia* spp., *Serratia* spp., y *Pseudomonas* spp., las cuales se utilizaron en experimentos de microcosmos para investigar los efectos de bacterias en *P. sylvestris*, las cuales presentaron actividad antifúngica en la raíz del pino (Bending *et al.*, 2002).

En 2009 de 45 muestras recolectadas de la rizosfera de *Pinus patula* se aislaron 151 cepas, de las cuales se seleccionaron 62 cepas fijadoras de nitrógeno, los resultados de las pruebas bioquímicas arrojaron que 8 pertenecían a *Azotobacter chroococcum*, 22 cepas pertenecieron a *Bacillus macerans*, 14 cepas pertenecían a *Enterobacter agglomerans* y 18 cepas pertenecieron a *Pseudomonas* sp., las cuales demostraron durante el experimento *in vivo* que ayudan a mejorar el crecimiento de las plantas y la captación de nitrógeno (Orozco-Jamarillo *et al.* 2009).

Durante el 2011 se caracterizaron cepas provenientes de *Pinus brazil* del cual se tomaron 9 muestras. Durante la caracterización se obtuvo que 9 cepas pertenecían a la familia *Bacillaceae*, 11 cepas pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae* y 1 cepa pertenecía a la familia *Pseudomonaceae*, las cuales fueron caracterizadas con potencial de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Riberio *et al.* 2012).

## **3. MARCO TEÓRICO**

### **3.1 Distribución e importancia del género *Pinus* en México**

El género *Pinus* está representado por más de 100 especies en el mundo, en México se encuentra el mayor número de especies y variedades (Farjon *et al.*, 1997; Price *et al.*, 1998). La distribución natural del género *Pinus* abarca desde las regiones árticas y subárticas de Norteamérica y Euroasia hasta las regiones tropicales y subtropicales de Centroamérica. El mayor centro de diversificación del género es Norte y Centroamérica; la mayor concentración de especies se



encuentra en México, California y el sureste de Estados Unidos (Price *et al.*, 1998). Particularmente en México y Centroamérica se agrupan el mayor número de especies de pinos comparado con las especies conocidas de cualquier otra región, de tamaño similar; esta región se considera como una segunda zona de evolución y especiación para el género (Perry *et al.*, 1998). El género *Pinus* en México, está representado por aproximadamente 45 especies; sin embargo Villaseñor (2004), considera un total de 71 especies distribuidas en todas las entidades federativas del país con excepción de Tabasco y Yucatán (Farjon y Styles, 1997). Ello coloca al país como el mayor poseedor de especies de pinos del mundo (Martínez, 1992).

El género *Pinus* es distintivo de los sistemas montañosos de Baja California, Sierra Madre Occidental y Oriental, Eje Volcánico Transversal, Sierra Madre del Sur, Sierra Norte de Oaxaca, Macizo Central de Chiapas y Sierra Madre de Chiapas (Rzedowski, 1981). El género *Pinus* es considerado como un recurso forestal de mucha importancia, ya que de él se obtiene madera, trementina, semilla, carbón, aguarrás, brea, ácido piroleñoso, alquitrán y alcohol metílico entre otros subproductos (Martínez, 1992).

### **3.2 Distribución del género *Pinus cembroides***

*Pinus cembroides* se distribuye en 19 estados de la República Mexicana. Forma masas puras en la Sierra Madre Oriental al norte del Trópico de Cáncer. Las mayores poblaciones están en: Chihuahua, Durango, Coahuila, Nuevo León, Hidalgo y Zacatecas a una altitud de 1,350 a 2,800 m; los estados con menor población son: Aguas Calientes, Baja California, Baja California Sur, Distrito Federal, Guanajuato, Jalisco, Puebla, Querétaro, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y San Luis Potosí (Eguiluz, 1982).

*Pinus cembroides* es una especie típica de suelos pobres, secos, pedregosos o calizos, grisáceos o negros, calcáreos con alto contenido de yeso, normalmente prefiere los suelos neutros a alcalinos, suele crecer en suelos con pH de 4 a 8; se desarrolla en clima árido a húmedo con temperaturas que oscilan entre 7°C a

40°C; alcanzando mínimas extremas de -7°C y máximas de 42°C o a veces mayores, resiste de 7 a 8 meses de sequía (Vásquez *et al.*, 1999).

### **3.3 Generalidades de las bacterias**

Las bacterias son organismos procariotas, unicelulares que puedan vivir en diferentes ambientes y presentar diversos tamaños y formas. Se tiene datos registrados de que fueron los organismos unicelulares que se desarrollaron sobre la tierra desde hace aproximadamente 3 500 millones de años (Schopf, 1993).

La mayoría de las bacterias son de vida libre, a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada como *Chlamydias* y *Rickettsias*. Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas. Como característica principal, no poseen compartimientos intracelulares delimitados por membranas, por lo que carecen de membrana nuclear. Es importante destacar que el ADN procariota es circular y cerrado.

Las bacterias poseen una pared celular compuesta por peptidoglicano (a excepción de los Mycoplasmas). Se reproducen por división simple (forma asexual). Los procariotas no poseen citoesqueleto, poseen fimbrias o pilis, pueden poseer flagelos. Su tamaño oscila entre 0.5 a 3 µm, pudiendo llegar en algunos tipos a 10 µm.

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral).

Las bacterias pueden observarse sin tinción (en fresco) o con tinción usando distintas coloraciones que mejoran su visualización ya que son células incoloras. Dichas tinciones se basan en la afinidad que presentan los colorantes por las estructuras bacterianas.

En 1978, Wose, propuso tres dominios: Bacteria, Archea y Eucaria. El dominio Eucaria se encuentra formado por los animales, plantas, hongos y protistas. El dominio Bacteria incluyo a todos los procariontes patógenos así como la mayoría de los procariotas no patógenos que se encuentran en el suelo y agua. El dominio

Archea se formó de todos los procariontes que no tienen peptidoglucano en sus paredes celulares y frecuentemente se les encuentra en ambientes extremos (Wose *et al.*, 1990).

El dominio Bacteria se divide en varios Filos: *Acidobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chlamydia*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Planctomyces*, *Proteobacteria*, *Spiritochaetes*, entre otros, dando un total de 25 filotipos (Cicarelli *et al.*, 2006).

Las bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, son microorganismos procariontes, pertenecen al Dominio Bacteria, con dos Reinos, propuestos en base a las características comparativas de RNA 16S o 18S. En la era actual estudios bioquímicos y genéticos sobre marcadores moleculares específicos de cada taxón, permitirá abrir el camino para descubrir nuevas características bioquímicas y fisiológicas, que son propiedades únicas de los grupos microbianos (Gao y Gupta, 2012).

### **3.4 Bacterias Gram negativas**

Para poder identificar a las bacterias Gram negativas es necesario realizar un tipo de tinción diferencial llamada tinción de Gram; esta es una prueba potente y rápida que nos permite diferenciar dos clases de bacterias estas son: Bacterias Gram positivas y las Gram negativas.

Las bacterias Gram negativas tienen una capa de peptidoglucanos mucho más delgada que las Gram positivas es por ello que no retiene el violeta cristal y por esto las células se tiñen con safranina y las observamos rojas. En el Cuadro 1 se esquematizan las diferencias entre bacterias Gram negativas y Gram positivas (Tortora *et al.*, 2007).

**Cuadro 1. Diferencias entre bacterias Gram negativas y Gram positivas**

| BACTERIAS GRAM POSITIVAS  | BACTERIAS GRAM NEGATIVAS  |
|---|---|
| <p>Poseen una pared celular interna y una pared de peptidoglucano.</p> <p>*Peptidoglucano: es un exoesqueleto que da consistencia y forma esencial para replicación y supervivencia de la bacteria.</p> | <p>Poseen una pared celular más compleja:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-pared celular interna</li> <li>-pared de peptidoglucano</li> <li>- bicapa lipídica externa</li> </ul> |
| <p>No tiene membrana externa</p>  | <p>Membrana externa: forma un saco rígido alrededor de la bacteria, mantiene estructura y es barrera impermeable a macromoléculas, ofrece protección en condiciones adversas</p>            |
| <p>No tiene espacio periplasmático</p>  | <p>Espacio periplasmático: espacio entre la superficie externa de la membrana citoplasmática y la interna de la membrana externa.</p>   |
| <p>La red de mureína está muy desarrollada y llega a tener hasta 40 capas</p>   | <p>La red de mureína presenta una sola capa</p>   |
| <p>La penicilina mata a las gram positivas, ya que bloquea la formación de enlaces peptídicos entre las diferentes cadenas del peptidoglucano</p>   | <p>La penicilina no mata a las Gram negativas, a causa de la capa de lipopolisacáridos situada en la parte externa de la pared celular.</p>   |
| <p>No contiene LPS</p>  | <p>Contiene LPS: estimulador de respuestas inmunes: activa células B, liberación de IL, FNT, IL 6 por macrófagos.</p>   |
| <p>En la tinción de Gram, retienen la tinción azul</p>  | <p>Quedan decoloradas.</p>  |
| <p>Son esporulantes y no esporulantes, como <i>Streptococcus</i>, <i>Cisteria</i>, <i>Frankia</i>.</p>  | <p>Pueden ser anaerobios o aerobios</p>   |
| <p>Poseen otros componentes: ácidos teicoicos y lipoteicoicos, y polisacáridos complejos.</p>   | <p>Poseen proteínas con concentraciones elevadas.</p>   |

Fuente: Tortora *et al.*, 2007

### **3.5 Suelo**

Es el material mineral no consolidado sobre la superficie de la tierra, que sirve como medio natural para el crecimiento de las plantas y que ha estado sujeto e influenciado por factores genéticos y del medio ambiente que son: el material parental, el clima (incluyendo humedad y efectos de temperatura), organismos y topografía, actuando dentro de un periodo de tiempo y originando un producto, suelo, que difiere del material del cual se deriva, en muchas propiedades y características físicas, químicas, biológicas y morfológicas (Soil Survey Staff, 1995). Por su parte, la Norma Oficial Mexicana define al suelo como una 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 o pérdidas, y migraciones y transformaciones de energía y materia; o por la habilidad de soportar raíces de plantas en un ambiente natural (SEMARNAT, 2003).

El suelo es un recurso natural básico para la permanencia de los ecosistemas forestales. Se estima que 64% de los suelos del país presentan problemas de degradación en diferentes niveles que van de ligera a extrema, 13% son terrenos desérticos o rocosos y zonas abandonadas o improductivas y 23% mantienen actividades productivas sustentables o sin degradación aparente. De los suelos afectados por algún nivel de degradación, 37% presentan erosión hídrica y 15 % son afectados por erosión eólica, particularmente en las zonas áridas, semiáridas y subhúmedas secas; mientras que la degradación química afecta una superficie aproximada de 13 millones de hectáreas, correspondientes en su mayoría a zonas agrícolas (SEMARNAT, 1999).

### **3.6 Deforestación**

Una de las mayores amenazas para la vida del hombre en la Tierra es la deforestación ya que los bosques constituyen uno de los ecosistemas más valiosos del mundo, contienen más del 60% de la biodiversidad del planeta. Los bosques juegan un papel fundamental en la regulación climática, el mantenimiento

de las fuentes y caudales de agua y la conservación de los suelos. Por ello, las selvas y demás bosques son posiblemente el patrimonio natural más importante pero también el más amenazado y depredado por la mano del hombre.

Cuando se elimina un bosque y el terreno es destinado, a la explotación agrícola o ganadera, disminuye en gran medida la capacidad de la superficie terrestre para controlar su propio clima y composición química (INEGI, 2005).

### ***Cuadro 2. Principales grupos de comunidades vegetales naturales de México***

| <b>Comunidad</b>              | <b>Superficie (Mha)</b> |
|-------------------------------|-------------------------|
| Bosques                       | 33.508                  |
| Selvas                        | 32.110                  |
| Matorral xerófilo             | 58.087                  |
| Otras asociaciones forestales | 15.988                  |
| Total                         | 139.693                 |

Fuente: Conjunto de datos Vectoriales de la Carta de uso del Suelo y Vegetación, escala 1:250,000 Serie III, continuo nacional del INEGI, publicado en la Evaluación de los recursos forestales mundiales 2005. México. Informe Nacional. FAO 2005.

### **3.7 Importancia de los microorganismos en la relación suelo-planta.**

La biota del suelo comprende cientos de miles de especies de organismos, los cuales pasan al menos una parte de su ciclo de vida en el suelo. La extraordinaria diversidad de organismos conforman la biota del suelo la cual incluye representantes de los tres dominios: bacterias, eucariotas y arqueas, representando el producto de un largo proceso evolutivo a través del cual se han establecido complejas interacciones entre los organismos y su medio (Wose, 1998; Wose, 2000).

El sistema radical de las plantas en el agroecosistema se encuentra asociado con el ambiente inanimado, compuesto de sustancias orgánicas e inorgánicas y con una abundante comunidad de microorganismos metabólicamente activos. La región de la raíz en la que se presenta la proliferación de microorganismos se ha dividido en diferentes áreas como: rizoplano, el cual constituye la superficie de la raíz y la fina capa de suelo adherida firmemente a ella y la rizósfera, definida por Hiltner en 1904 como la región del suelo que es fuertemente influenciada por la

raíz (Cante, 2011) .La extensión de la rizósfera puede variar con el tipo de suelo, especie vegetal, edad y muchos otros factores. Generalmente se asume que se extiende de la superficie de la raíz hacia el suelo unos cuantos milímetros o posiblemente algunos centímetros en casos extremos en algunas plantas del desierto y dunas arenosas (Campbell y Greaves, 1990). Aunque experimentalmente a menudo la rizósfera la definen como el suelo adherido a la raíz, el crecimiento de las raíces cambia las propiedades físicas y químicas del suelo, incluyendo el contenido mineral y orgánico, el potencial de agua, el pH y la salinidad. Mientras que la mayoría de los suelos son pobres en nutrientes, la rizósfera es rica en nutrientes, ya que esta región contiene exudados de bajo peso molecular liberados durante el metabolismo normal de las células de la raíz, conteniendo polisacáridos, ácidos orgánicos, vitaminas y aminoácidos, convirtiéndose en un excelente sustrato para el crecimiento microbiano (Beattie, 2007).

### **3.8 Interacción microorganismo – planta**

En la segunda mitad del siglo XX, un tema importante de la microbiología fue tratar de entender el comportamiento de los microorganismos bajo condiciones de laboratorio, en la actualidad y en el futuro el reto es estudiar el comportamiento de los microorganismos en su hábitat natural y muchas veces complejo, tales como la rizósfera. Con el fin de entender el comportamiento de un microorganismo en determinado hábitat, es esencial entender que genes se expresan, sus funciones, las condiciones bióticas, abióticas y los procesos de los que dependen (Lugtenberg *et al.*, 2002).

Sobre la base de sus efectos sobre la planta los microorganismos que interactúan con plantas se pueden clasificar como: patógenos, saprofitos y benéficos. Los patógenos pueden atacar a las hojas, raíces y tallos, los saprofitos que viven en la plantas muertas desempeñan un papel en los procesos de ciclos de nutrientes y el compostaje, los microorganismos benéficos se utilizan a menudo como inoculantes, se pueden clasificar de acuerdo con el objetivo de su aplicación en biofertilizantes, tales como *Rhizobium*, fitoestimulantes productores de auxinas

que promueven el alargamiento de la raíz como *Azospirillum*, rizoremediadores utilizados en la degradación de contaminantes los cuales usan los exudados de la raíz como fuente de carbono y bioplaguicidas (Tarka *et al.*, 2008).

Una asociación microorganismo-planta depende del proceso de establecer una exitosa colonización radical, el cual es un prerrequisito para que cualquier microorganismo tenga efecto sobre la planta, y puede darse por los siguientes tipos de interacción:

1. La bacteria puede detectar las raíces y moverse a la rizósfera debido al fenómeno quimiotáctico hacia productos excretados por las raíces (Millet *et al.*, 1984).
2. Adhesión a la raíces, ya que en estas existen receptores (por ejemplo *Klebsiella* sp, se adhiere a compuestos como fructosa y manosa) (Millet *et al.*, 1984; Haahtela *et al.*, 1986).
3. Invasión de espacios intracelulares o el interior de las células y posteriormente ellos pueden ser capaces de utilizar algún exudado de la planta. Mediante este tipo de interacciones se puede prever el establecimiento de microorganismos, y su efecto en la planta sería mediante excreción de sustancias promotoras del crecimiento, fijación de nitrógeno (Millet *et al.*, 1984; Michiels *et al.*, 1989), producción de antibióticos y cianuros de hidrogeno (HCN) que generan una disminución en la población de fitopatógenos (Zahir, 2004).

En algunos casos se ha propuesto la existencia de un efecto sinérgico entre la producción de hormonas y la fijación de nitrógeno, donde la fisiología de las bacterias involucradas desempeña un papel importante en su ecología. Estas bacterias diazotróficas se han aislado principalmente de la endorizosfera, proporcionando evidencia de la selectividad microbiana por el cultivo (Haahtela *et al.*, 1988). Por tal razón la capacidad para que establezcan diferentes asociaciones dependen de la variabilidad de las cepas para ocupar estructuras de la planta y responder a sustancias específicas, así como de los caracteres de las plantas que tienen receptores y ciertos componentes que ocupa el



microorganismo, los cuales permiten la compatibilidad entre microorganismo-planta (O'Hara *et al.*, 1981; Millet *et al.*, 1984; Haahtela *et al.*, 1985; Michiels *et al.*, 1989).

### **3.9 Microorganismos benéficos: Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal**

Kloepper definió en 1978 a un tipo de bacteria como PGPR (por sus siglas en inglés, que significan plant growth promoting rhizobacteria, o rizobacteria promotora del crecimiento vegetal), la cual mostró una alta eficiencia para aumentar el crecimiento de las plantas e incrementar su tolerancia a otros microorganismos causantes de enfermedades. En años recientes se ha creado cierta controversia respecto de cuándo considerar a una rizobacteria como PGPR, por lo que se han establecido algunas características que definen a este grupo. En primer lugar, que tengan una elevada densidad poblacional en la rizósfera después de su inoculación en las plantas, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microbiota nativa del suelo. Después, que posean capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y, como consecuencia, puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta. Además, que puedan controlar de manera natural y eficiente a otros microorganismos del suelo capaces de enfermar a las plantas; y por último, que no produzcan daño en el hombre. La aplicación de este tipo de rizobacterias ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas, observándose un incremento en la emergencia, vigor, biomasa. Actualmente, el uso de microorganismos representa sólo 1.4% (380 millones de dólares) del mercado global para el control de plagas y enfermedades. Ejemplo de ello es el producto generado a partir de la rizobacteria *Bacillus thuringiensis*, que ha mostrado ser un organismo altamente eficiente para el control de plagas, siendo el bioplaguicida más abundante en el mercado mundial. (Hernández *et al.*, 2003).

### 3.10 Fijación biológica de nitrógeno

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, son fijadoras de nitrógeno y productoras de sustancias reguladoras del crecimiento, por lo que ejercen un efecto benéfico en las plantas con las cuales interactúan. Esta asociación microorganismo-planta puede mejorar el crecimiento de los cultivos a través de la combinación de fijación biológica de nitrógeno, producción de sustancias hormonales, incremento de la disponibilidad de los nutrientes del suelo y supresión de enfermedades, con un uso reducido de recursos no renovable (Carcaño *et al.*, 2006).

El nitrógeno es uno de los elementos más abundantes en la naturaleza, encontrándose distribuido en tres principales reservorios: el atmosférico, que representa alrededor del 78%, el suelo y el contenido en la biomasa. El nitrógeno existente en la litosfera, a pesar de representar cuantitativamente el mayor depósito de dicho elemento, tiene una participación muy baja en el ciclo del nitrógeno de la biosfera, y la mayor parte del nitrógeno necesario para el crecimiento de las plantas proviene en último término de la atmósfera. El nitrógeno gaseoso o dinitrógeno ( $N_2$ ) es relativamente inerte pero puede reaccionar con otros compuestos y convertirse en productos asimilables por las plantas o por otros microorganismos. La cantidad de  $N_2$  fijado en la naturaleza es de  $230 \times 10^6$  Tm por año. De esta cantidad, aproximadamente un 13% es fijado por oxidación provocada por las descargas eléctricas de las tormentas, del  $N_2$  a ácido nítrico en presencia de  $O_2$  y vapor de agua, y el 78% restante es fijado por microorganismos. Este último proceso se denomina fijación biológica del nitrógeno (Aparicio-Tejo *et al.*, 2000).

Esta gran reserva sólo puede servir de fuente de nitrógeno a ciertos organismos procarióticos, las llamadas bacterias fijadoras de nitrógeno o diazótrofos. Esta notable capacidad bioquímica no ha evolucionado en células eucarióticas (lo más que ha llegado la evolución es a seleccionar ciertos tipos de asociaciones simbióticas entre diazótrofos y ciertos eucariotas).

La fijación de N<sub>2</sub> es un proceso de reducción que convierte el nitrógeno molecular en amoníaco, según la siguiente ecuación:



Esta reacción es catalizada por un complejo enzimático denominado nitrogenasa o dinitrogenasa, la cual consta de dos componentes, el componente I o nitrogenasa propiamente dicha, que posee un cofactor de hierro y molibdeno (FeMoCo) y que forma parte del centro activo. Por ello, a este componente también se le conoce como molibdoferroproteína. El componente II o nitrogenasa-reductasa, que posee átomos de Fe acomplexados con azufre de determinadas cisteínas, se le conoce como ferroproteína.

La fijación biológica de nitrógeno atmosférico, contribuye al aporte de este elemento necesario para la producción de proteínas vegetales y animales (Caballero y Valdés, 1983; Chalk, 1991). La fijación biológica de nitrógeno, la realizan algunos procariontes que tienen la información genética para ello, y cuando se asocian con plantas pueden contribuir a su desarrollo suministrándole nitrógeno reducido en forma de amonio (Cante, 2011). En el Cuadro 3 se ejemplifican algunas bacterias fijadoras de nitrógeno.

**Cuadro 3. Géneros en los cuales se incluyen microorganismos fijadores de nitrógeno del suelo y sistemas inundados**

| <b>BACTERIAS HETEROTROFAS</b>  | <b>BACTERIAS AUTOTROFAS</b>                 |
|--------------------------------|---|
| <b>Microaerofilicas</b>        | <i>Cianobacterias</i>                       |
| <i>Azospirillum</i>            | <i>Formas filamentosas con heterocistos</i> |
| <i>Aquaspirillum</i>           | <i>Anabaena</i>                             |
| <i>Thiobacillus</i>            | <i>Anabaenopsis</i>                         |
| <i>Pseudomonas</i>             | <i>Aulosira</i>                             |
| <i>Xanthobacter</i>            | <i>Cylindrospermum</i>                      |
| <i>Rhizobium</i>               | <i>Nostoc</i>                               |
| <i>Methylosinus</i>            | <i>Calothrix</i>                            |
| <i>Methylococcus</i>           | <i>Fischerella</i>                          |
| <i>Mycobacterium</i>           | <i>Hapalosiphon</i>                         |
|                                | <i>Scytonema</i>                            |
| <b>Anaerobios facultativos</b> | <i>Tolypothrix</i>                          |
| <i>Klebsiella</i>              | <i>Stigonema</i>                            |
| <i>Erwinia</i>                 | <i>Westiella</i>                            |
| <i>Enterobacter</i>            | <b>Formas filamentosas sin heterocistos</b> |
| <i>Citrobacter</i>             | <i>Phormidium</i>                           |
| <i>Escherichia</i>             | <i>Plectonema</i>                           |
| <i>Bacillus</i>                | <i>Oscillatoria</i>                         |
|                                | <i>Pseudanabaena</i>                        |
| <b>Anaerobios</b>              | <b>Formas unicelulares</b>                  |
| <i>Desulfovibrio</i>           | <i>Gloeothece</i>                           |
| <i>Desulfotomaculum</i>        | <i>Cyanothece</i>                           |
| <i>Clostridium</i>             | <b>Otras bacterias fototrofas</b>           |
|                                | <i>Rhodospirillum</i>                       |
|                                | <i>Rhodopseudomonas</i>                     |
|                                | <i>Rhodomicrobium</i>                       |
|                                | <i>Chromatium</i>                           |
|                                | <i>Thiocystis</i>                           |
|                                | <i>Chlorobium</i>                           |

Fuente: Roper y Ladha, (1995)

### **3.11 Solubilización de fosfatos vía microbiana**

El fósforo es un elemento esencial para la vida; las plantas lo necesitan para crecer y desarrollar su potencial genético y forma la base de un gran número de compuestos, de los cuales los más importantes son los fosfatos. Estos desempeñan un papel esencial en los procesos de transferencia de energía, y el metabolismo (Salazar, 2005). La insuficiencia de fósforo en el suelo puede influir en el retraso de la cosecha, la madurez, el desarrollo de planta, disminuyendo el rendimiento en la cosecha; por esta razón, los microorganismos solubilizadores de este elemento; además presentan ventajas frente a fertilizantes químicos, pues colaboran con la preservación del medio ambiente, ya que no implican sustancias tóxicas que afectan el sistema, generando de esta manera una agricultura sostenible (Chen *et al.*, 2006).

Su principal función fisiológica de los microorganismos solubilizadores de este elemento es intervenir en procesos de acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular (Conney, 2000); sin embargo, el fósforo soluble es un nutriente limitado para producción de biomasa en un ecosistema natural (Hameeda *et al.*, 2006).

Dependiendo del tipo de suelo, se puede decir que entre el 60-50% corresponde a la fracción orgánica, mientras que el resto se encuentra en forma inorgánica. Las plantas absorben el fósforo en forma inorgánica en estado soluble, pero cuando se introduce al suelo, más del 90% de este pasa rápidamente a formas no disponibles. De esta manera, gran parte de los fertilizantes fosfatados que se aplican no son utilizados por las plantas, si no que se almacenan en el suelo (Fernández *et al.*, 2005).

El suelo contiene gran variedad de sustratos orgánicos que pueden ser fuente importante de fósforo y que deben pasar por un proceso de mineralización para hacer de estas fuentes una forma disponible, pasando de fósforo orgánico a inorgánico mediante hidrólisis.

Un mecanismo para la solubilización de fósforo es por medio de enzimas conocidas como fosfatasas, producidas por microorganismos intracelularmente si la disponibilidad de fosfato es baja, liberándolas al suelo luego su lisis por las plantas, estas enzimas pueden persistir por largos periodos de tiempo cuando están protegidas por minerales de arcilla y coloides húmicos, que les brinda una gran resistencia a la desnaturalización térmica, deshidratación y proteólisis. El término fosfatasas se emplea para designar a un amplio grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos del ácido fosfórico; según la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica las clasifico de acuerdo con el tipo de enlace y compuestos sobre los que actúan en: Fosfatasas que actúan sobre enlaces de tipo éster que se dividen en monoésterfosfato hidrolasa, diésterfosfato hidrolasas, trifosfato monoéster hidrolasas, difosfato monoéster hidrolasas y triésterfosfato hidrolasas. (Pant y Warman, 2000).

Los fosfatos insolubles que no pueden ser asimilados por las plantas, pueden ser llevados a formas solubles por la acción de muchos microorganismos. La vía principal de solubilización es mediante la producción de ácidos orgánicos tales como el ácido nítrico y sulfúrico.



Fosfato tricalcico      Ácido nítrico                                      Fosfato dicálcico      Nitrato de calcio

Solubilización de compuestos inorgánicos del fósforo por producción de ácidos orgánicos

La solubilización puede producirse por dos mecanismos diferentes: por la acción de ácidos orgánicos producidos por microorganismos o por quelación de los elementos responsables de la insolubilidad de los fosfatos presentes; un mecanismo indirecto para la solubilización ocurre cuando los microorganismos asimilan directamente los fosfatos insolubles acumulándolos en sus células y liberándolos posteriormente. Otra forma de acción es la mineralización del fósforo. (Henaó y Rincon, 2008).

El mecanismo de solubilización en los suelos se favorece cuando estos presentan pH bajos, con un bajo contenido en calcio y alto contenido de materia orgánica,

además depende también del contenido de fósforo presente en la solución de suelo.

Existen distintos mecanismos de solubilización de fósforo, asociados a materia orgánica mediado por microorganismos, el principal que realizan los microorganismos para solubilizar el fósforo es mediante producción de ácidos orgánicos, que actúan sobre compuestos insolubles de fosfato inorgánico como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica. Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el oxálico, cítrico, láctico succínico, isovalérico, isobutírico y acético, se producen en el suelo. La cantidad y tipo de ácidos orgánicos depende de los tipos de microorganismos. Los ácidos orgánicos permiten que haya solubilización debido a que la presencia de estos implica un descenso en el pH hasta valores aproximados a 2, valores necesarios para que se pueda llevar a cabo la solubilización. La producción de ácidos orgánicos a partir de la fermentación de la glucosa da como resultado la acidificación de la célula y sus alrededores (Henao y Rincon, 2008).

Diversos investigadores han reportado la capacidad que tienen diferentes especies bacterianas para solubilizar compuestos inorgánicos insolubles como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica (Chen *et al*, 2006: Ivanova *et al*, 2006 y Mikanova, 2002). Algunos microorganismos que se han reportado como solubilizadores de fosfato se encuentran reportados en el Cuadro 4.

#### **Cuadro 4. Microorganismos solubilizadores de fosfatos**

---

##### **Bacterias solubilizadoras de fosfatos**

---

*Erwinia herbicola*

*Pseudomonas cepacia*

*Enterobacter agglomerans*

*Rahnella aquatilis*

*Serratia marcescens*

*Morganella morganii*

*B. amyloliquefaciens*

---

Fuente: Saraf *et al*. (2011).

### 3.12 Detección de Sideróforos en bacterias

Los sideróforos son compuestos producidos por diferentes microorganismos en el suelo que basan su actividad en fenómenos de quelación, un fenómeno rutinario en los sistemas biológicos (Neilands, 1995). La gran mayoría de los microorganismos fijadores de nitrógeno producen sideróforos para obtener el hierro, elemento necesario para llevar a cabo la fijación de N, ya que la enzima nitrogenasa, que está compuesta de varias unidades proteicas, requiere 36 átomos de hierro para su correcto funcionamiento (Silvia, 2005).

El hierro  $Fe^{3+}$  tiene muy poca solubilidad a pH neutro, por ende no puede ser utilizado por los organismos. Los sideróforos disuelven estos iones a complejos de  $Fe^{3+}$  que pueden ser asimilados por mecanismos de transporte activo. Muchos sideróforos son péptidos no ribosomales.

Visto de otra forma: Bajo condiciones anóxicas, el hierro está generalmente en el estado de oxidación +2 (ferroso) y soluble. Sin embargo, bajo condiciones óxicas, el hierro se encuentra generalmente en la valencia +3 (férrico), formando varios minerales insolubles. Para obtener hierro de dichos minerales, las células producen sideróforos acoplables al hierro para la unión y transporte hacia dentro de la célula. Gran parte de los sideróforos consisten en derivados del ácido hidroxámico, el cual actúa muy fuerte como quelante férrico. (Sylvia, 2005). A continuación en el Cuadro 5 se muestran ejemplos de sideróforos producidos por bacterias.



**Cuadro 5. Ejemplos de sideróforos producidos por bacterias**

| <b>Microorganismos</b>             | <b>Sideroforos producidos</b> |
|------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Ustilago sphaerogena</i>        | Ferricromo                    |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>      | Pyochelina y Pyoverdina       |
| <i>Escherichia coli</i>            | Enterobactina                 |
| <i>Bacillus subtilis</i>           | Bacillibactin                 |
| <i>Streptomyces pilosus</i>        | Ferrioxamina B                |
| <i>Fusarium roseum</i>             | Fusarinina C                  |
| <i>Yersinia pestis</i>             | Yersiniabactina               |
| <i>Vibrio cholerae</i>             | Vibriobactina                 |
| <i>Azotobacter vinelandii</i>      | Azotobactina                  |
| <i>Pseudomonas B 10</i>            | Pseudobactina                 |
| <i>Saccharopolyspora erythraea</i> | Eritrobactina                 |

Fuente: Saraf *et al.* (2011).

### **3.13 Producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal**

Entre las fitohormonas, las auxinas fueron las primeras reconocidas y químicamente detectadas. Un número de compuestos indólicos y derivados fenilacéticos han sido reportados con actividad auxínica, entre estos compuestos se tienen el ácido indol-3-acético (AIA) considerado como la auxina fisiológicamente más activa en plantas. Las auxinas están involucradas en una gran variedad de respuestas diversas en el desarrollo y crecimiento de las plantas. Sin embargo sus mecanismos de acción no están completamente investigados, hoy en día, varias auxinas sintéticas son usadas en aplicaciones comerciales. Por otra parte, la biosíntesis de auxinas no está completamente limitada a plantas superiores (Frankenberger y Arshad, 1995).

Un diverso grupo de microorganismos del suelo son capaces de producir auxinas fisiológicamente activas, que pueden tener efectos pronunciados en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los microorganismos aislados de la rizósfera de varios cultivos tienen un gran potencial para sintetizar y liberar auxinas como metabolitos secundarios a causa del suministro rico en nutrimentos liberados por la raíz

(Brown, 1972). La producción de auxinas por los microorganismos aislados varía grandemente entre diferentes especies y cepas de la misma especie, y es también influenciado por las condiciones del cultivo, estado de crecimiento y disponibilidad de sustratos, también seguido de las diferentes vías de biosíntesis de las auxinas en los microorganismos. En estudios *in vitro* se ha observado que algunos cultivos microbianos pueden producir pequeñas cantidades de AIA en ausencia de un precursor fisiológico. Sin embargo, en presencia de triptófano como precursor, la microbiota muchas veces libera grandes cantidades de AIA y otros derivados indólicos (Carcaño *et al.*, 2006).

La estructura química de varias auxinas naturales han sido identificadas; las más importantes son: El AIA, el ácido indol-3-piruvico, el ácido indol-3-acetaldehído y el indol-3-acetonitrilo; todos ellos son considerados precursores del AIA con débil actividad auxínica. El ácido indol-3-butirico ha sido considerado una auxina sintética; sin embargo, se ha comprobado que se encuentra en forma natural (Epstein y Ludwing-Muller, 1993; Frankenberger y Arshad, 1995). Muchas auxinas sintetizadas químicamente están también disponibles, las cuales muchas veces se usan como herbicidas, las más comunes son 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T); algunas de ellas estimulan el crecimiento de plantas de hoja ancha, y el crecimiento de la raíz y otras incrementan la madurez del fruto para prevenir la abscisión del fruto. Estas auxinas sintéticas son más estables que su contraparte las naturales, son menos sensibles a la degradación enzimática por la planta, así como la degradación no biológica debida a agentes como el calor y la luz (Davies, 1990).

### **3.14 Detección de bacteriocinas**

Las enfermedades de las plantas son comúnmente controladas por productos químicos y en algunos casos con prácticas agrícolas. Sin embargo, la amplia distribución de compuestos químicos ha sido tema de análisis público debido al efecto dañino potencial en el ambiente, su efecto indeseable en otros organismos no patógeno y la posible carcinogenicidad de algunos químicos. Otros problemas incluyen el desarrollo de razas resistentes a patógenos y la renuencia de algunas

compañías productoras de agroquímicos para desarrollar y probar nuevos químicos debido a los problemas de registro y costosos procesos de producción. Es clara la necesidad de eliminar gradualmente algunos pesticidas, además de desarrollar alternativas no químicas para solucionar estos problemas (Heydari y Misaghi, 1998).

El control biológico de patógenos de plantas usando rizobacterias como agentes de control biológico ha recibido mucha atención, centrándose en la discusión de los mecanismos de acción. La supresión de patógenos por agentes de control biológico incluye las áreas de antibiosis, competencia y parasitismo (Kloepper, 1993). La antibiosis se define como la inhibición o lisis de un organismo mediada por productos metabólicos del antagonista; estos productos incluyen agentes líticos, enzimas, compuestos volátiles y otras sustancias tóxicas (Sylvia *et al.*, 1999). La antibiosis es uno de los métodos más frecuentes usados para seleccionar bacterias con potencial como agentes de control biológico; involucra la selección de bacterias para antibiosis hacia patógenos *in vitro*. Aunque la antibiosis *in vitro* no necesariamente se relaciona con la antibiosis en la rizósfera, hay algunos ejemplos donde existe actividad *in vitro* y se correlaciona con antibiosis en la zona de la raíz. La naturaleza de la antibiosis *in vitro* varía con la cepa, sugiriendo que los sideróforos y antibióticos son los responsables de la actividad (Kloepper, 1993).

Baker (1980) menciona que muchas poblaciones microbianas pueden tener una estabilidad dinámica por la producción de amortiguadores biológicos para la competencia dentro del grupo. Los microorganismos compiten por nutrientes, oxígeno y nichos ecológicos favorables y son seleccionados para tolerar condiciones de pH, CO<sub>2</sub>, agua y toxinas microbianas. Los microorganismos secretan metabolitos, algunos de los cuales inhiben otros microorganismos mientras otros los estimulan para formar estados esenciales de su ciclo de vida. El balance biológico de los microorganismos es realizado a través del antagonismo y que comprende varios mecanismos como: competencia por nutrientes, sitios favorables, oxígeno, antibiosis por metabolitos de otros microorganismos, parasitismo y predación por otros microorganismos.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad existe un amplio territorio forestal que está siendo talado, lo cual genera entre otros problemas la reducción de los recursos maderables ya que al querer restablecer la población que han sido talada suele haber un alto índice de muerte de los Pinos, ya sea por el pH del suelo, el tipo de suelo y la flora bacteriana del mismo, así como los nutrientes presentes. Por lo cual la presente investigación estudia la flora microbiana Gram negativa asociada al sistema suelo-raíz de *Pinus cembroides* para aislar microorganismos benéficos con potencial de ser usados en las plantas de Pino que crecen en el suelo donde es trasplantado y así aumentar el éxito de supervivencia en el área reforestada. Por todo esto nos planteamos la siguiente pregunta científica en base a: ¿Cuáles son las bacterias Gram negativas asociadas al sistema suelo-raíz de *Pinus cembroides*?

## 5. JUSTIFICACIÓN

Este estudio beneficiara a toda la población en general ya que este árbol provee una amplia variedad de servicios ecológicos y económicos, suministra alimentos, leña, madera para la construcción, y productos medicinales a grupos étnicos desde la prehistoria hasta la actualidad, la extracción comercial de las semillas de pino piñonero se lleva a cabo cada otoño ya que tienen un alto valor energético, siendo la principal fuente de ingresos para las regiones dominadas por esta especie de pino en México. Además de que se conoce poco acerca de las poblaciones microbianas asociadas a la planta, por lo cual en este trabajo de investigación se inician los estudios para conocer qué población de bacterias Gram negativas colonizan el sistema suelo-raíz de *Pinus cembroides*, además de la posibilidad de poder producir un biofertilizante que ayude a mejorar el desarrollo del pino en aéreas reforestadas a partir del aislamiento y caracterización de la comunidad bacteriana asociada a este pino.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo general**

Aislar y caracterizar bacterias Gram negativas asociadas al sistema suelo raíz de *Pinus cembroides*.

### **6.2. Objetivos particulares**

1. Aislar, identificar y caracterizar bacterias Gram negativas del suelo y la rizósfera de plantas de *Pinus cembroides*.
2. Evaluar la fijación biológica de nitrógeno en las bacterias aisladas mediante pruebas de reducción de acetileno.
3. Detectar en las bacterias asociadas a *Pinus cembroides* la producción de sideróforos y bacteriocinas.
4. Determinar la producción de índoles totales y la solubilización de fosfatos en las bacterias aisladas.

## **7. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **7.1 Tipo de estudio**

Se realizará un estudio aleatorio, prospectivo y transversal de las muestras tanto de suelo como de raíz.

### **7.2 Tamaño de muestra**

Se recolectaran 8 muestras de suelo y 8 muestras de raíz de *Pinus cembroides*.

### **7.3 Sede y lugar de estudio**

Municipio de Tepeyahualco de Hidalgo, Puebla. El cual se localiza en la parte noreste de el Estado de Puebla, sus coordenadas geográficas son los paralelos 19° 23' 06" y 19° 42' 42" de latitud norte y los meridianos 97° 21' 54" y 97° 21' 18" de longitud occidental, colinda al norte con Chignautla, al sur con Guadalupe Victoria, Oriental y San Nicolás Buenos Aires, al este con Veracruz y Xiutetelco, al oeste con Libres y Cuyuaco. Con clima semiseco templado y templado subhúmedo, con lluvias en verano. El municipio presenta gran diversidad vegetativa y de uso del suelo: Los cerros Pinto, Pizarro, las Águilas entre otros, están cubiertos de bosques de pino, donde predominan pino, sauce pirul, ocote, piñonero, palmilla, sabino, soyate, capulín, durazno, etc. Dentro de la diversidad edafológica, se identifican a suelos pertenecientes a los grupos: Litosol, Solonchak, Feozem, Andosol y Regosol ([www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/.../21170a.html](http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/.../21170a.html).) consulta 26-08-2014.

### **7.4 Periodo de muestreo**

Julio del 2011

### **7.5 Criterios de inclusión**

Muestras de suelo y raíz de *Pinus cembroides* de las cuales se aislen Bacterias Gram negativas.

## **7.6 Criterios de exclusión**

Se rechazarán las muestras de suelo y raíz de las cuales se aíslen Bacterias Gram positivas.

## **7.7 Análisis estadístico de la información**

Los resultados obtenidos se analizarán mediante un análisis de varianza y prueba de comparación de medias para observar las diferencias existentes entre los diferentes tratamientos y se utilizara la prueba de Tukey con  $P \leq 0.05$ .

## **7.8 Recursos humanos**

Director de Tesis: M.C. Moisés Graciano Carcaño Montiel

Tesista Becaria: Damaris Anel Teomitzi Cuamatzi

## **7.9 Recursos materiales**

Material de vidrio y plástico, equipos, medios de cultivo y reactivos que serán suministrados por el Laboratorio de Microbiología del Suelos del CICM ICUAP.

## **7.10 Recursos financieros**

Esta investigación fue financiada por el proyecto SEP-PROMEP “**Uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal en la producción de plantas destinadas a la reforestación**”. Del Cuerpo Académico de Microbiología del Suelo BUAP CA-99 año 2013.



## **8. METODOLOGÍA**

### **8.1 FASE DE LABORATORIO**

#### **8.1.1 Lugar de muestreo**

Municipio de Tepeyahualco de Hidalgo, Puebla, el cual se localiza en la parte noreste del Estado de Puebla, lugar donde crece en forma natural *Pinus cembroides*. Para la toma de muestra con ayuda de los productores se seleccionaron a las plantas que tenían en promedio tres años de edad.

#### **8.1.2 Aislamiento de bacterias del sistema suelo-raíz de *Pinus cembroides***

Se pesaron por separado 10 gramos de cada muestra de suelo dispersándolo en 90 mL de agua destilada estéril para preparar la suspensión de suelo y raíz, se mezclaron con 90 mL de agua destilada estéril para hacer una suspensión. Posteriormente se hicieron diluciones de la suspensión de suelo y raíz se emplearon las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , para sembrarlas por diseminación en agar MacConkey, posteriormente se incubaron las cajas petri a 32 °C de 24 a 72 horas. Las cajas donde hubo aislamiento se seleccionaron para continuar con el siguiente paso que fue la selección de las colonias, las cuales se transfirieron en medio MacConkey para purificar las cepas, se sembraron por estría cruzada, se incubaron bajo las mismas condiciones, posteriormente se procedió a la conservación de las mismas, para lo cual se propagaron en caldo nutritivo con la correspondiente cepa, se incubaron en agitación durante 24 horas a 32°C a 220 rpm, posteriormente se centrifugo el cultivo y se decantó el paquete celular se resuspendio en caldo nutritivo adicionando glicerol al 10% se colocó en un tubo eppendorf, tipo criovial, se rotuló con la clave correspondiente, las cepas bacterianas aisladas se conservaron a -70 °C en un ultracongelador.

### **8.1.3 Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno mediante ensayo cualitativo**

Para realizar este ensayo se procedió de la siguiente manera: Las cepas aisladas y purificadas en Medio MacConkey se inocularon en caldo nutritivo (previamente esterilizado), se incubó en agitación por 24 h a 32°C a 220 rpm, posteriormente se procedió a ajustar la población bacteriana igualando la población al tubo No. 4 del nefelómetro de MacFarland equivalente a 1200 millones de células por mililitro, a continuación se inoculó el medio Hino y Willson's (semigelificado) con 10µL de la población previamente ajustada, se incubaron por 24 h a 32°C, esta prueba se realizó con tres ensayos consecutivos, ya que se busca que las bacterias con capacidad de fijar nitrógeno puedan crecer en el medio de cultivo sin nitrógeno, el resultado final positivo fue el crecimiento bacteriano en cada traspaso hasta el tercer ensayo.

### **8.1.4 Identificación y caracterización de bacterias Gram negativas**

Para la identificación de las bacterias se utilizó la tinción de Gram, el sistema API 20E de Biomeriux más pruebas complementarias como catalasa, oxidasa y medio OF. Las cepas bacterianas puras se sembraron por estría cruzada en medio MacConkey se incubaron a 32°C por 24 h, posteriormente de una colonia aislada en medio MacConkey se transfirió inóculo a un tubo con solución salina de cloruro de sodio estéril al 0.85%, para hacer una suspensión bacteriana homogeneizando cuidadosamente las bacterias en el medio, después con una micropipeta se colocó una alícuota de la suspensión bacteriana en la galería del sistema API 20E, evitando la formación de burbujas en el fondo de los tubos. Una vez llena cada galería según corresponda se cerró la cámara y se incubaron a 32°C por 24 h, pasado el tiempo requerido de incubación se realizó la lectura de la galería para su posterior identificación con la ayuda del software apiweb™, la cual se obtiene a partir del perfil numérico obtenido de la lectura correspondiente a cada galería

### **8.1.5 Determinación de la actividad reductora de acetileno (ARA)**

Las cepas que resultaron fijadoras de nitrógeno a partir del ensayo de fijación de nitrógeno mediante ensayo cualitativo, se les determinó la actividad de la enzima nitrogenasa, mediante el método de actividad reductora de acetileno (ARA) (Hardy *et al.*, 1973). Para bacterias Gram negativas la determinación de ARA se desarrolló directamente en viales serológicos tipo antibiótico con medio de cultivo líquido Hino y Willson's libre de nitrógeno, fueron inoculados con cultivos de 24 h con una población  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, e incubados a 32 °C por 48 h (Dalton, 1980), posteriormente se sustituyó en el medio líquido Hino y Willson's el 35% v/v de espacio gaseoso de aire por gas acetileno a los cultivos descritos, incluyendo el control. Se determinó la cantidad de acetileno transformado a etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) mediante cromatografía, utilizando un cromatógrafo de gases Focus GC modelo Thermo. Una actividad que exceda los 10 nmoles de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup> se considerará como actividad positiva (Idris *et al.*, 1981).

### **.8.1.6 Cuantificación de índoles totales**

La producción de ácido indol-3-ácetico e índoles relacionados por las bacterias Gram negativas se analizó por el método de Salkowski, para lo cual se utilizó el método descrito por Jain y Patriquin, (1985); se utilizaron matraces de 125 mL de capacidad con 50 mL del medio de cultivo a base de sales minerales, ácido succínico, fructuosa y triptófano, se inoculó por separado 1.0 mL de cultivo bacteriano con  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> de cada cepa, esto se realizó por triplicado para cada cepa. Los cultivos se incubaron a 32 °C durante 96 h en agitación a 220 rpm. Posteriormente los cultivos bacterianos fueron centrifugados a 5000 rpm por 20 minutos a 4°C para separar el paquete celular del medio de cultivo con el sobrenadante obtenido, el AIA se extrajo con tres lavados de acetato de etilo.

Para la obtención del extracto que contiene el AIA e índoles relacionados, el acetato de etilo se evaporó a sequedad al vacío a 37 °C, el residuo se suspendió y se colectó en 1.0 mL de metanol. La determinación cuantitativa de AIA se realizó en un espectrofotómetro marca Jenway modelo 6300 a 535 nm a través de la reacción colorimétrica con el reactivo de Salkowski (Hartman *et al.*, 1983; Tien *et*

*al.*, 1979). Los datos obtenidos de absorbancia se interpolaron a una curva de calibración para conocer la concentración de AIA e índoles relacionados.

#### **8.1.7 Determinación de antibiosis *in vitro***

Para la determinación de la prueba de antibiosis, se utilizó el procedimiento de doble capa de medio de cultivo descrito por Tapia-Hernández *et al.* (1990). Las bacterias seleccionadas fueron propagadas en caldo nutritivo, las cuales se incubaron a 32 °C por 24 h. Posteriormente la población bacteriana se ajustó a  $10^5$  unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL<sup>-1</sup>), alícuotas de estos cultivos se transfirieron al multiinoculador de Steer para inocular las placas de Petri con el medio BD para detectar antagonismo o sinergismo. Después de 48 h de incubación el crecimiento se removió con un portaobjetos por deslizamiento sobre el cultivo. El remanente de células vivas se eliminaron por inversión de la placa de Petri sobre vapores de cloroformo por 30 minutos; todo el residuo de cloroformo se evaporo en condiciones de esterilidad. Las cepas se incubaron por 48 h en caldo nutritivo, posteriormente se tomó 0.1 mL ( $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) de caldo con crecimiento, se mezcló con 4.9 mL del medio de cultivo BD y se colocó uniformemente sobre la capa de agar donde estaban las colonias muertas para detectar antagonismo o sinergismo. Las zonas de inhibición alrededor de las colonias bacterianas muertas después de 18 h se consideraron como posible antagonismo entre ellas, mientras que las zonas con alto crecimiento bacteriano se consideraron como sinergismo (Carcaño-Montiel *et al.*, 2006).

#### **8.1.8. Determinación de sideróforos**

Las cepas seleccionadas fueron sembradas en agar MacConkey, las cuales se incubaron a 32°C por 24 h. Posteriormente de cada cepa se tomó una colonia bien aislada y pura, se propago en Caldo Nutritivo, se incubaron a 32°C por 24 h en agitación a 220 rpm, se procedió a inocular utilizando el multiinoculador de Steer en cajas Petri conteniendo el medio de cultivo cromo azurol S (CAS), se incubaron a 32 °C durante 72 h, la prueba positiva para la producción de sideróforos fue el cambio del vire del medio de azul a anaranjado (Alexander y Zuberer, 1991; Carcaño-Montiel *et al.*, 2006; Neilands y Leong, 1986).

### **8.1.9. Determinación de la actividad solubilizadora de fosfato tricálcico**

Las cepas seleccionadas serán sembradas en agar MacConkey, las cuales serán incubadas a 32°C por 24 h. Posteriormente de cada cepa se tomó una colonia aislada y se propagó en Caldo Nutritivo, estas se incubaron a 32°C por 24 h en agitación a 220 rpm, se procedió a inocular las bacterias con una población de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, utilizando el multiinoculador de Steer en cajas de Petri conteniendo el medio Goldstein adicionado de fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) se incubaron a 32°C durante 72 h, la prueba positiva para la solubilización de fosfatos fue la formación de un halo transparente alrededor de las colonias indicando que las cepas aisladas son solubilizadoras de fosfato (Salas-Moras, 2000).

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1 Aislamiento de bacterias

Ha sido ampliamente demostrado que los microorganismos del suelo interactúan con las raíces de las plantas y son constituyentes del suelo en la interfase raíz-suelo. Este gran conjunto de interacciones entre raíces y microorganismos da lugar a desarrollo de un ambiente dinámico conocido como rizósfera, donde una variedad de formas microbianas pueden desarrollarse activamente y en equilibrio. Sin embargo la mayoría de los estudios microbiológicos de la rizósfera, especialmente aquellos que describen interacciones microbianas cooperativas, han centrado su atención en bacterias y hongos (Pedraza *et al.*, 2010).

*Pinus cembroides* Zucc. también conocido como pino piñonero, son árboles pequeños ampliamente distribuidos en regiones semiáridas desde el sur de Estados Unidos hasta Puebla, México (Malusa, 1992), constituyen una comunidad natural en la Sierra Madre Occidental y Sierra Madre Oriental en México, este árbol provee una amplia variedad de servicios ecológicos y económicos a la población humana local durante siglos ha suministrado alimentos, leña, madera para la construcción, y productos medicinales a grupos étnicos desde la prehistoria hasta la actualidad, las semillas tienen un alto contenido de grasa (41%) y proteínas (37%). Cada otoño, la extracción comercial de las semillas de pino piñonero, es la principal fuente de ingresos para las regiones dominadas por esta especie de pino en México (Susan-Azpiri *et al.*, 2002). Debido a la importancia de la planta y además de que se conoce poco acerca de las poblaciones microbianas asociadas a la planta, se inician los estudios para conocer qué población de bacterias Gram negativas colonizan el sistema suelo-raíz.

Durante el ensayo de aislamiento se obtuvieron 109 colonias las cuales fueron sembradas en medio MacConkey para su posterior conservación. En esta etapa se eligieron colonias aisladas cuyas características morfológicas difirieran de las otras colonias, el criterio de elección de las mismas dependió del tamaño, forma y el tipo de borde.

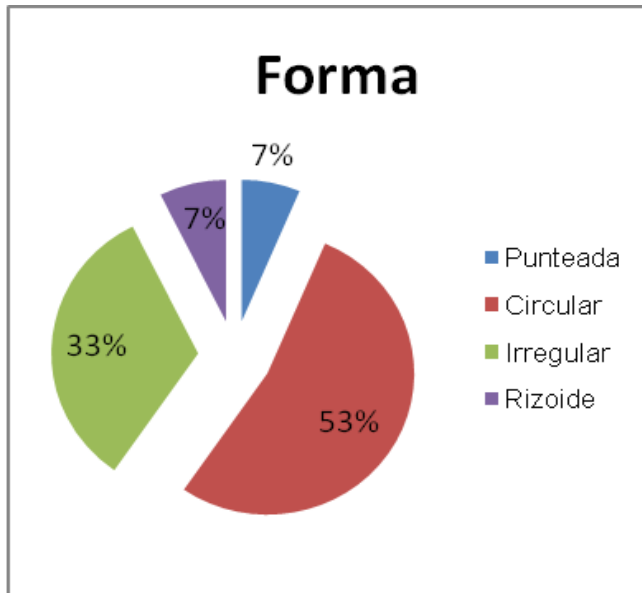


Figura 1. Porcentaje de formas

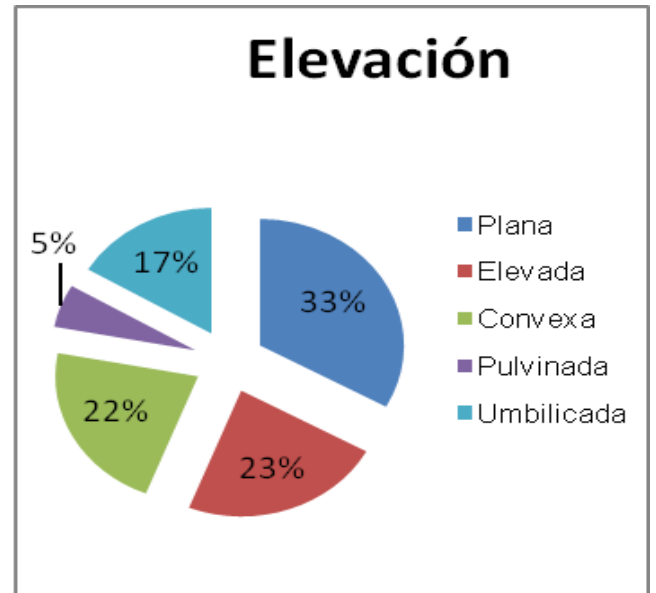


Figura 2. Porcentaje de elevación

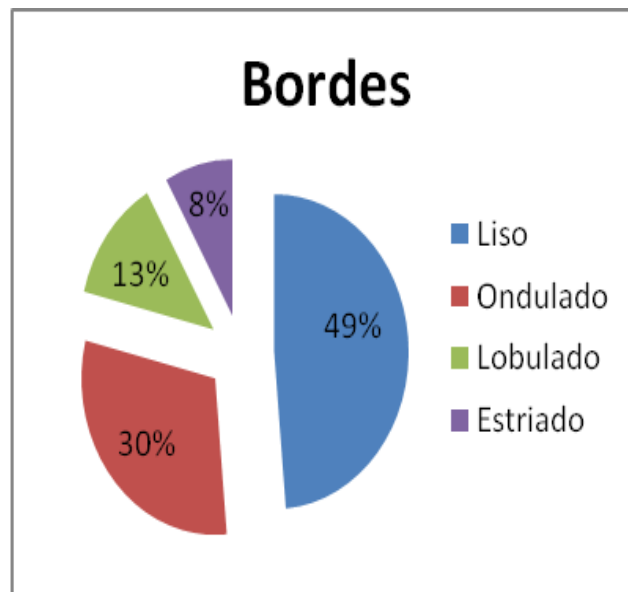


Figura 3. Porcentaje de bordes

La Figura 1 corresponde a la forma que presentaron las 109 cepas aisladas de las cuales el 53% (58 cepas) mostraron forma circular, el 33% (36 cepas) creció con forma ondulada, el 7% (8 cepas desarrollo forma rizoide, y 7% (7 cepas) exhibió forma punteada.

En la Figura 2 se observa que de las 109 cepas el 33% (36 cepas) mostró elevación plana, 23% (25 cepas) se mostraron elevadas, 22% (24 cepas) crecieron con elevación convexa, 17% (18 cepas) desarrollo elevación umbilicada, y 5% (6 cepas) con elevación pulvinada.

En la Figura 3 se muestra que 49% (53 cepas) desarrollo bordes lisos, el 30% (33 cepas) tuvo bordes ondulados, 13% (14 cepas) mostró bordes lobulados y el 8% (9 cepas) creció con bordes estriados. (Granados y Villaverde, 2003).

Puesto que es importante la descripción colonial en las placas de agar como: tamaño, forma, elevación, color, aspecto con luz reflejada y luz transmitida; ya que estas características con frecuencia son típicas de ciertas especies, en ocasiones hay variaciones dependiendo de las condiciones de cultivo por lo cual se considera un factor importante para la identificación pero no es determinante para la completa identificación de un género y especie en particular (Granados y Villaverde, 2003), por lo que se complementó con tinción de Gram y se usó la batería de pruebas bioquímicas del API20 E de Biomeriux para su correcta identificación esta parte se encuentra descrita en la parte de identificación y caracterización de bacterias Gram negativas.

## **9.2 Identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno mediante ensayo cualitativo**

En el Cuadro 5 se observan los resultados del tratamiento cualitativo de fijación de nitrógeno, al cual se sometieron 109 cepas de las cuales solo 33 cepas fijaron nitrógeno en medio de cultivo Hino y Willson's en las tres repeticiones, también se aprecia que algunas cepas mostraron en los primeros dos tratamientos actividad de la enzima nitrogenasa, para que la cepa resultara seleccionada tuvo que pasar positivamente los tres pases con sus tres repeticiones, el que algunas de las cepas mostraran crecimiento en los dos primeros tratamientos pudo deberse a que en el medio de cultivo de propagación existieran restos de alguna fuente de nitrógeno, que permitieron el crecimiento de las bacterias en el medio sin nitrógeno, las bacterias con capacidad de fijar nitrógeno y que mostraron crecimiento en los tratamientos, se tomó como criterio de fijación biológica de nitrógeno, mediada por la enzima nitrogenasa. Los tres tratamientos sirvieron de filtro para seleccionar las cepas con el mejor mecanismo de adaptación "*in vitro*" para fijar el nitrógeno en condiciones de anaerobiosis.



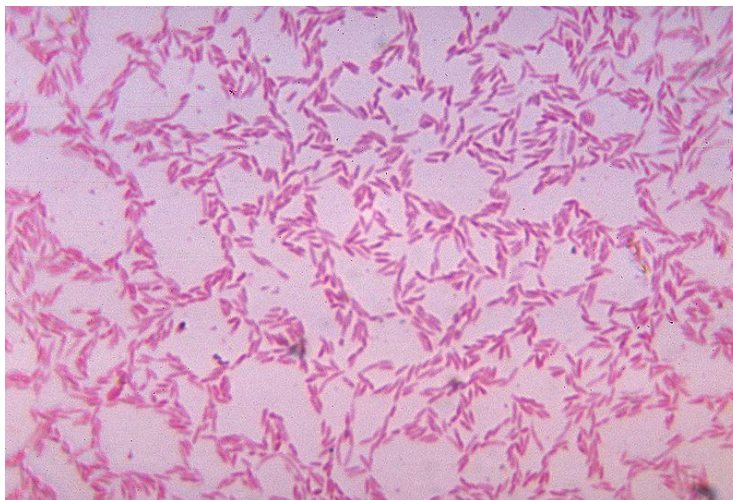
**Cuadro 5. Resultados del tratamiento cualitativo de fijación de nitrógeno**

| Clave de cepas | Tratamientos |   |   | Clave de cepas | Tratamientos. |   |   | Clave de cepas | Tratamientos. |   |   |
|----------------|--------------|---|---|----------------|---------------|---|---|----------------|---------------|---|---|
|                | 1            | 2 | 3 |                | 1             | 2 | 3 |                | 1             | 2 | 3 |
| M1NS-A1        | 1            | 1 | 0 | M6NS-F3        | 1             | 1 | 0 | M9NS-C7        | 1             | 1 | 1 |
| M1NS-A2        | 1            | 1 | 0 | M6NS-G1        | 1             | 1 | 1 | M9NS-D1        | 1             | 1 | 0 |
| M1NS-A3        | 1            | 1 | 0 | M6NS-G2        | 1             | 1 | 1 | M9NS-D2        | 1             | 1 | 0 |
| M1NS-B1        | 1            | 1 | 0 | M6NS-H1        | 1             | 1 | 0 | M9NS-D3        | 1             | 1 | 0 |
| M3NS-A1        | 1            | 0 | 0 | M6NS-I1        | 1             | 1 | 0 | M9NS-D4        | 1             | 0 | 0 |
| M3NS-A2        | 1            | 1 | 1 | M6NS-J1        | 1             | 1 | 0 | M9NS-D5        | 1             | 1 | 1 |
| M3NS-A3        | 1            | 1 | 1 | M6NS-L1        | 1             | 1 | 0 | M9NS-D6        | 1             | 1 | 0 |
| M3NS-B1        | 1            | 1 | 1 | M6NS-L2        | 1             | 1 | 1 | M9NS-E1        | 1             | 1 | 1 |
| M6NS-A1        | 1            | 1 | 1 | M6NS-M1        | 1             | 1 | 1 | M9NS-E2        | 1             | 1 | 0 |
| M6NS-A2        | 1            | 1 | 1 | M6NS-N1        | 1             | 1 | 1 | M9NS-E3        | 1             | 1 | 1 |
| M6NS-A3        | 1            | 1 | 1 | M7NS-A1        | 1             | 0 | 0 | M9NS-E4        | 1             | 1 | 0 |
| M6NS-A4        | 1            | 1 | 0 | M7NS-A2        | 1             | 0 | 0 | M9NS-F1        | 1             | 1 | 1 |
| M6NS-A5        | 1            | 0 | 0 | M7NS-A3        | 1             | 1 | 0 | M9NS-F2        | 1             | 1 | 0 |
| M6NS-A6        | 1            | 1 | 1 | M7NS-B1        | 1             | 0 | 0 | M9NS-F3        | 1             | 0 | 0 |
| M6NS-A7        | 1            | 1 | 1 | M7NS-B2        | 1             | 0 | 0 | M11NS-A1       | 1             | 1 | 0 |
| M6NS-A8        | 1            | 1 | 1 | M7NS-B3        | 1             | 0 | 0 | M11NS-A2       | 1             | 1 | 1 |
| M6NS-B1        | 1            | 0 | 0 | M7NS-C1        | 1             | 0 | 0 | M11NS-A3       | 1             | 0 | 0 |
| M6NS-B2        | 1            | 1 | 1 | M7NS-C2        | 1             | 0 | 0 | M11NS-A4       | 1             | 1 | 0 |
| M6NS-B3        | 1            | 1 | 1 | M7NS-D1        | 1             | 1 | 0 | M11NS-A5       | 1             | 1 | 1 |
| M6NS-B4        | 1            | 0 | 0 | M9NS-A1        | 1             | 0 | 0 | M11NS-A6       | 1             | 1 | 1 |
| M6NS-B5        | 1            | 0 | 0 | M9NS-A2        | 1             | 1 | 0 | M11NS-B1       | 1             | 1 | 1 |
| M6NS-B6        | 1            | 0 | 0 | M9NS-A3        | 1             | 0 | 0 | M11NS-B2       | 1             | 1 | 1 |
| M6NS-C1        | 1            | 0 | 0 | M9NS-A4        | 1             | 1 | 0 | M11NS-B3       | 1             | 1 | 0 |
| M6NS-C2        | 1            | 0 | 0 | M9NS-A5        | 1             | 1 | 0 | M11NS-B4       | 1             | 1 | 0 |
| M6NS-C3        | 1            | 1 | 0 | M9NS-A6        | 1             | 1 | 0 | M11NS-B5       | 1             | 1 | 1 |
| M6NS-C4        | 1            | 1 | 1 | M9NS-B1        | 1             | 0 | 0 | M11NS-C1       | 1             | 1 | 0 |
| M6NS-C5        | 1            | 0 | 0 | M9NS-B2        | 1             | 1 | 0 | M11NS-C2       | 1             | 1 | 0 |
| M6NS-D1        | 1            | 1 | 0 | M9NS-B3        | 1             | 0 | 0 | M11NS-D1       | 1             | 1 | 1 |
| M6NS-D2        | 1            | 0 | 0 | M9NS-B4        | 1             | 1 | 0 | M11NS-D2       | 1             | 1 | 1 |
| M6NS-D3        | 1            | 0 | 0 | M9NS-B5        | 1             | 1 | 0 | M11NS-D3       | 1             | 1 | 0 |
| M6NS-D4        | 1            | 0 | 0 | M9NS-B6        | 1             | 0 | 0 | M11NS-D4       | 1             | 1 | 0 |
| M6NS-E1        | 1            | 0 | 0 | M9NS-C1        | 1             | 0 | 0 | M11NS-E1       | 1             | 1 | 1 |
| M6NS-E2        | 1            | 1 | 1 | M9NS-C2        | 1             | 0 | 0 | M11NS-E2       | 1             | 1 | 1 |
| M6NS-E3        | 1            | 0 | 0 | M9NS-C3        | 1             | 1 | 0 | M11NS-F1       | 1             | 1 | 1 |
| M6NS-E4        | 1            | 1 | 0 | M9NS-C4        | 1             | 1 | 0 | M11NS-F2       | 1             | 1 | 0 |
| M6NS-F1        | 1            | 1 | 0 | M9NS-C5        | 1             | 1 | 0 |                |               |   |   |
| M6NS-F2        | 1            | 1 | 1 | M9NS-C6        | 1             | 1 | 1 |                |               |   |   |

M=muestra, 1, 3,6,7,9,11= número de la muestra, N=*Pinus cembroides* que creció de forma natural, S= muestra obtenida de suelo y raíz .

### 9.3 Identificación y caracterización de bacterias Gram negativas

Después de la selección de las 33 cepas fijadoras de nitrógeno se aplicó la tinción de Gram a cada una, se observaron al microscopio con objetivo de inmersión (100x) a las 33 bacterias, la cuales resultaron Gram negativas. En la Figura 4 se aprecian bacilos Gram negativos.



**Figura 4. Bacilos Gram negativos (100x)**

Posteriormente a las 33 cepas se les aplicó la prueba API 20 E. Esta prueba se realizó a partir de un cultivo de 24 h de MacConkey del cual se tomó una colonia y se transfirió a caldo nutritivo, el cual se incubó por 24 h, después del periodo de incubación, la población bacteriana se estandarizó usando el tubo No. 4 del nefelómetro para posteriormente tomar 10  $\mu$ L de muestra para realizar una suspensión bacteriana con 5 mL de medio de NaCl al 0.85% homogenizando cuidadosamente e inmediatamente se procedió a introducir la suspensión bacteriana en los tubos de la galería como lo explica el manual de Sistema API 20 E (BioMeriux **SA**). Las galerías se incubaron a 32°C por 24 h excepto aquellas donde el número de pruebas antes de añadir los reactivos fuera inferior a 3, estas cepas se incubaron otras 24 h. Después se procedió a identificarlas, en el Cuadro 7 se observan los resultados obtenidos.

La identificación de estas bacterias se realizó sembrando las cepas seleccionadas en agar MacConkey por estría cruzada; *Enterobacter* es una enterobacteria, que

mostro la siguiente morfología: bacilo Gram negativo, oxidasa negativo catalasa positivo con movilidad positiva y su metabolismo es fermentativo determinadas ambas pruebas en medio OF; se observó en la prueba api 20 E que utiliza los carbohidratos: glucosa, D-Manitol, D-Sacarosa; *Pseudomonas* mostro ser un bacilo Gram negativo, aerobio, oxidasa negativo con metabolismo fermentativo, en el caso de *P. oryzihabitans*, *P. fluorescens* y *P. aeruginosa* son oxidasa positiva: *Chryseobacterium indologenes* mostró ser bacilo Gram negativo, aerobio, oxidasa y catalasa positivo con metabolismo fermentativo de Xilosa, en la prueba API 20 E, no utilizo carbohidratos (no fermentador); *Aeromonas* sp. Mostró ser un bacilo Gram negativo, oxidasa positivo, catalasa positivo, con metabolismo fermentativo en la prueba API 20 E utilizo los carbohidratos: glucosa, D-Manitol, D-Sacarosa. (Holt *et. al.* 1994).

**Cuadro 6. Prueba de identificación de bacterias Gram negativas aisladas de *Pinus cembroides* mediante el sistema API 20 E.**

| Clave de cepas | Bacteria                         | Clave de cepas | Bacteria                            |
|----------------|----------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| M11NS-B5       | <i>Rahnella aquatilis</i>        | M11NS-B1       | <i>Enterobacter cloacae</i>         |
| M9NS-D5        | <i>Aeromonas</i> sp.             | M11NS-D2       | <i>Enterobacter cloacae</i>         |
| M9NS-C6        | <i>Aeromonas</i> sp.             | M11NS-E1       | <i>Enterobacter cloacae</i>         |
| M6NS-B2        | <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> | M11NS-E2       | <i>Enterobacter cloacae</i>         |
| M6NS-C4        | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    | M6NS-B3        | <i>Chryseobacterium indologenes</i> |
| M3NS-A2        | <i>Pseudomonas fluorescens</i>   | M6NS-F2        | <i>Chryseobacterium indologenes</i> |
| M6NS-A2        | <i>Enterobacter</i> sp.          | M6NS-L2        | <i>Chryseobacterium indologenes</i> |
| M9NS-E1        | <i>Enterobacter</i> sp.          | M6NS-M1        | <i>Chryseobacterium indologenes</i> |
| M6NS-A6        | <i>Enterobacter cloacae</i>      | M6NS-N1        | <i>Chryseobacterium indologenes</i> |
| M6NS-A7        | <i>Enterobacter cloacae</i>      | M9NS-C7        | <i>Chryseobacterium indologenes</i> |
| M6NS-E2        | <i>Enterobacter asburiae</i>     | M9NS-F1        | <i>Chryseobacterium indologenes</i> |
| M6NS-A3        | <i>Enterobacter cloacae</i>      | M11NS-A5       | <i>Chryseobacterium indologenes</i> |
| M6NS-A8        | <i>Enterobacter cloacae</i>      | M11NS-A6       | <i>Chryseobacterium indologenes</i> |
| M11NS-A2       | <i>Enterobacter cloacae</i>      | M11NS-B2       | <i>Chryseobacterium indologenes</i> |
| M6NS-G1        | <i>Enterobacter cloacae</i>      | M11NS-D1       | <i>Chryseobacterium indologenes</i> |
| M6NS-G2        | <i>Enterobacter cloacae</i>      | M11NS-F1       | <i>Chryseobacterium indologenes</i> |
| M11NS-A1       | <i>Enterobacter cloacae</i>      |                |                                     |

Como se muestra en el Cuadro 6 se identificaron a 33 cepas bacterianas aisladas del sistema suelo-planta: Una de ellas correspondió a *Rahnella aquatilis*, dos a *Aeromonas* sp. En el caso de las tres cepas de *Pseudomonas*, se identificaron a las especies: *oryzihabitans*, *aeruginosa* y *fluorescens*. En el caso de las cepas de *Enterobacter* se aislaron 15 cepas, de las cuales 12 correspondieron a *Enterobacter cloacae*, una a *Enterobacter asburiae* y dos no identificadas de esta especie. Para bacterias del género *Chryseobacterium* se aislaron 12 cepas de diferentes muestras. Algunos de estos géneros como *Enterobacter*, y *Pseudomonas* aisladas de la rizosfera de *Pinus cembroides* en este estudio coinciden con bacterias aisladas de otros pinos como en el caso de *Pinus sylvestris* que en 2006 se aislaron de su raíz a *Pseudomonas* spp., (Bending *et al.*, 2006), así como en *Pinus patula* se aislaron en 2009 de la rizosfera del pino a *Enterobacter agglomerans* y *Pseudomonas* sp. (Orosco-Jamarillo *et. al.* 2009), y en un estudio realizado en 2011 a *Pinus brazil* del cual se aislaron cepas de la familia *Pseudomonaceae* y de la familia *Enterobacteriaceae* (Riberio *et. al.* 2011). Los resultados arrojados de la presente investigación y comparadas con otras realizadas a diferentes especies de pinos muestran que estos géneros de bacterias podrían tener un gran impacto en el desarrollo de los mismos ya que se han encontrado en diferentes pinos de diferentes especies.

#### **9.4 Determinación de la actividad nitrogenasa por cepas de *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Aeromonas* y *Rahnella***

El nitrógeno es un elemento necesario para la composición de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, siendo así una molécula esencial para el crecimiento de todos los organismos. El  $N_2$  tiene un triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, que hace a la molécula casi inerte, por lo cual no puede ser aprovechado por la mayoría de las formas vivientes, sino sólo por un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados, que incluyen algas, bacterias y actinomicetes. Para ser utilizado en el crecimiento, este debe ser primero reducido y luego “fijado” (combinado) en la forma de iones amonio ( $NH_4^+$ ) o nitrato ( $NO_3^-$ ). El proceso a través del cual los microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable conocido como fijación biológica de nitrógeno. El

proceso puede ser llevado a cabo por microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas, y el mismo no sólo permite usar el nitrógeno atmosférico sino también revertir o reducir la degradación del suelo (Allan y Graham 2002; Parson, 2004). El fundamento del ensayo de reducción de acetileno radica en la actividad “inespecífica” de la enzima nitrogenasa ya que puede reducir otras pequeñas moléculas provistas de triples enlaces, como cianuros ( $N\equiv C$ ) y acetileno ( $HC\equiv CH$ ). Los componentes de la enzima nitrogenasa y ATP son requeridos para la reducción de acetileno a etileno sirviendo de base para medir la actividad nitrogenasa. El ensayo de reducción de acetileno requiere que la muestra a probar sea colocada en un frasco cerrado conteniendo acetileno, después de un periodo de incubación, una muestra de la fase gaseosa se toma con una jeringa y se inyecta a un cromatógrafo, el cual cuantifica la cantidad de etileno formado. Este ensayo es extremadamente sensible y puede ser usado para estudios de campo donde las muestras pueden ser almacenadas en viales para su análisis. (Brill, 1980). El mayor problema con la técnica de reducción de acetileno a pesar de la incapacidad para medir cuantitativamente los niveles exactos de nitrógeno fijado, el ensayo de reducción de acetileno es sumamente útil para la selección de bacterias diazotrofas (Boddey y Victoria, 1987).

La actividad nitrogenasa en las cepas aisladas del sistema suelo-planta fue variable, el valor menor fue de  $0.23 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$  en la cepa M11NS-F1 de *Chryseobacterium indologenes*, y la cepa M6NS-A8 de *Enterobacter cloacae* tubo la mayor actividad de la enzima con  $19.53 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$  como se observa en el Cuadro 7 existen diferencias estadísticas significativas entre las cepas independientes del género y especie.

**Cuadro 7. Actividad nitrogenasa en 33 cepas aisladas de *Pinus cembroides***

| Cepa     | Actividad nitrogenasa (ARA) nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> α | Cepa     | Actividad nitrogenasa (ARA) nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> mL <sup>-1</sup> α |
|----------|---|----------|---|
| M6NS-A8  | <i>E. cloacae</i> 19.53 ± 3.72a   | M11NS-B5 | <i>R. aquatilis</i> 2.26 ± 0.05def  |
| M6NS-C4  | <i>P. aeruginosa</i> 18.62 ± 6.82a  | M11NS-A2 | <i>E. cloacae</i> 2.13 ± 0.68def  |
| M6NS-B3  | <i>C. indologenes</i> 17.81 ± 4.75a   | M11NS-A6 | <i>C. indologenes</i> 1.25 ± 0.14ef   |
| M6NS-B2  | <i>P. oryzae</i> 17.76 ± 6.17a  | M11NS-D1 | <i>C. indologenes</i> 0.95 ± 0.02f  |
| M6NS-A2  | <i>Enterobacter</i> sp. 16.70 ± 2.65a   | M9NS-C7  | <i>C. indologenes</i> 0.81 ± 0.07f  |
| M6NS-E2  | <i>E. asburiae</i> 15.39 ± 3.74a  | M9NS-D5  | <i>Aeromonas</i> sp. 0.81 ± 0.08f   |
| M6NS-A6  | <i>E. cloacae</i> 15.29 ± 2.65a   | M6NS-G2  | <i>E. cloacae</i> 0.78 ± 0.21f  |
| M6NS-F2  | <i>C. indologenes</i> 14.50 ± 1.22ab  | M6NS-G1  | <i>E. cloacae</i> 0.78 ± 0.01f  |
| M6NS-A7  | <i>E. cloacae</i> 12.70 ± 3.28abc   | M11NS-E1 | <i>E. cloacae</i> 0.68 ± 0.11f  |
| M11NS-B1 | <i>E. cloacae</i> 8.33 ± 1.36bcd  | M9NS-F1  | <i>C. indologenes</i> 0.60 ± 0.04f  |
| M11NS-A5 | <i>C. indologenes</i> 7.86 ± 0.62bcde   | M6NS-M1  | <i>C. indologenes</i> 0.57 ± 0.04f  |
| M3NS-A2  | <i>P. fluorescens</i> 6.73 ± 1.48cdef   | M6NS-L2  | <i>C. indologenes</i> 0.51 ± 0.06f  |
| M11NS-D2 | <i>E. cloacae</i> 5.16 ± 0.75def  | M9NS-C6  | <i>Aeromonas</i> sp. 0.50 ± 0.13f   |
| M11NS-E2 | <i>E. cloacae</i> 3.73 ± 0.16def  | M9NS-E1  | <i>Enterobacter</i> sp. 0.48 ± 0.08f  |
| M11NS-A1 | <i>E. cloacae</i> 3.49 ± 1.44def  | M6NS-N1  | <i>C. indologenes</i> 0.43 ± 0.05f  |
| M6NS-A3  | <i>E. cloacae</i> 3.18 ± 1.05def  | M11NS-F1 | <i>C. indologenes</i> 0.23 ± 0.03f  |
| M11NS-B2 | <i>C. indologenes</i> 2.96 ± 0.20def  |          |   |

α=valores promedio ± desviación estándar, n=3 con tres lecturas de cada una. Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas, de acuerdo a la prueba de Tukey a P≤0.05.

Las cepas que tuvieron mayor actividad de la enzima nitrogenasa pertenecen a la misma muestra M6NS (M=muestra, 6= número de muestra, N=natural. S= suelo), de las cuales 4 pertenecen al género *Enterobacter*: *Enterobacter cloacae* (M6NS-A8, M6NS-A6, M6NS-A7), *Enterobacter* sp (M6NS-E2), 2 cepas pertenecen al género *Pseudomonas*: *Pseudomonas aeruginosa* (M6NS-C4), *Pseudomonas oryzae* (M6NS-B2), y 2 cepas pertenecen al género y especie de *Chryseobacterium indologenes* (M6NS-B3 y M6NS-F2).

Posteriormente se observa que 3 muestras diferentes M3NS, M6NS y M11NS, muestran actividad de la enzima nitrogenasa no tan alta, esta actividad es mayor en las cepas que pertenecen a la muestra M11NS. En el cuadro 7 se observa que estas cepas son: *E. cloacae* (M11NS-B1, M11NS-D2, M11NS-E2, M11NS-A1, M6NS-A3), *Chryseobacterium indologenes* (M11NS-A5), *P. fluorescens* (M3NS-A2). Las cepas que mostraron pobre actividad de la enzima nitrogenasa

pertencen en su mayoría a la muestra M9NS, M11NS, y en menor proporción a M6NS.

Analizando el comportamiento de la actividad de la enzima nitrogenasa de las cepas del cuadro 7 la variación en la actividad de la enzima nitrogenasa entre cepas del mismo género, especie y diferente género, puede deberse a diversas razones ya sea que fijen nitrógeno en simbiosis con plantas lo que podría suceder en el caso de *Chryseobacterium indologenes* y *Aeromonas* sp. o que las condiciones de incubación como son la fuente de carbono, temperatura, oxígeno y pH no sean las adecuadas para la actividad de la enzima nitrogenasa en el caso particular de esas cepas y es por eso que muestran una baja actividad de la misma, y puede que las condiciones de incubación hayan contribuido a una mayor actividad en las otras cepas, aun que en cualquier caso existen patrones reguladores comunes, en cada caso el fijador en cuestión reacciona frente a las variaciones ambientales de un modo general o particular y con mayor o menor complicación lo cual se manifiesta en una mayor o menor producción de la enzima. Como en el caso de la cepa M6NS-C4 (*Pseudomonas aeruginosa*) que produjo mayor cantidad de la enzima nitrogenasa cuya concentración fue de 18.62 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>; aun cuando esta bacteria es aerobia, se ha reportado que fija nitrógeno en condiciones de microaerofilia (Roper y Ladha, 1995); se sabe que el oxígeno puede inhibir a la enzima por lo que las bacterias aerobias emplean dos mecanismos de protección de la nitrogenasa; la protección respiratoria, donde se produce una elevada tasa respiratoria a expensas de un alto consumo de carbono y energía, manteniendo así una concentración intracelular de oxígeno baja; y la protección conformacional, en la cual la nitrogenasa cambia su disposición a una forma reversible inactiva (Robson y Postgate, 1980, Segura y Espín, 1998) mecanismos que por lo observado en el ensayo proporcionan un mejor ambiente en la síntesis de la enzima dando como resultado mayores concentraciones de la misma; estos mismos mecanismos explicarían por que las otras dos cepas del mismo género y diferente especie como las cepas M6NS-B2 de *P. oryzae* con 17.76 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup> y M3NS-A2 de *P. fluorescens* con 6.73 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup> mostraron mayores concentraciones de la enzima nitrogenasa en comparación a

otras cepas de diferente género y especie como: *E. cloacae*, *C. Indologenes*, *R. Aquatilis* y *Aeromonas* sp.

### **9.5 Producción de índoles totales por cepas de *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Aeromonas* y *Rahnella***

Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de plantas. La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (AIA), muy activo en bioensayos y presente comúnmente en concentraciones nanomolares. Otras formas naturales de auxinas son el ácido 4-cloro-indolacético (4-Cl-AIA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (Ludwig-Müller y Cohen 2002).

La producción de auxinas por diferentes microorganismos varía grandemente entre diferentes especies y cepas de la misma especie y también es influenciado por las condiciones de cultivo, etapa de crecimiento y disponibilidad de sustratos. Además de las diferentes vías biosintéticas de producción de auxinas. Estudios *in vitro* han demostrado que algunos cultivos microbianos pueden producir pequeñas cantidades de ácido indol acético (AIA) en ausencia de un precursor fisiológico. Sin embargo, en presencia de triptófano la microbiota muchas veces libera gran cantidad de AIA y sus derivados (Frankenberger y Ashad, 1995).

La determinación de la auxina se llevó a cabo utilizando el reactivo de Salkowski, que permite la oxidación de los compuestos indólicos por sales férricas; cuando la respuesta es positiva se obtiene una coloración que va desde el rosa claro a intenso dependiendo de la concentración del AIA presente. Cabe destacar que al medio de cultivo utilizado para determinar la auxina, se le adicionó el aminoácido triptófano que induce a la producción de ésta; numerosos estudios han demostrado que el AIA es sintetizado a partir del triptófano y el proceso es llevado a cabo por microorganismos a través de una conversión oxidativa (Müller y Weiler, 2000).

En la presente investigación se evaluó la producción de índoles totales en 33 cepas encontrándose que produjeron auxinas en intervalos 2.0 a 34.66  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sus valores promedio se relacionan en el Cuadro 8. La producción registrada de



índoles totales en estas cepas fue de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  para: M6NS-L2, M6NS-N1, M11NS-A6, M11NS-B2 (*Chryseobacterium indologenes*) M6NS-A2, M6NS-A3, M6NS-A8, M6NS-G1, M11NS-A1, M11NS-A2, M11NS-B1 (*Enterobacter cloacae*) M3NS-A2 (*P. fluorescens*), M6NS-C4(*P. aeruginosa*) M9NS-C6, M9NS-D5 (*Aeromonas*); y un valor máximo para la cepa M9NS-F1 (*Chryseobacterium*) seguida por las cepas M6NS-E2 de *E. asburiae* con una producción de  $16.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ , y por M11NS-B5 de *Rahnella aquatilis* con una producción de  $11.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  como se puede observar en el Cuadro siguiente.

**Cuadro 9. Producción de índoles totales en 33 cepas aisladas de *Pinus cembrifolia***

| Cepas    | Indoles totales <sup>β</sup> $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Cepas    | Indoles totales <sup>β</sup> $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
|----------|--|----------|--|
| M9NS-F1  | <i>C. indologenes</i> 34.66 ± 5.12 a               | M6NS-A3  | <i>E. cloacae</i> 2.00 ± 0 g                       |
| M6NS-E2  | <i>E. asburiae</i> 16.33 ± 0.67 b                  | M6NS-L2  | <i>C. indologenes</i> 2.00 ± 0 g                   |
| M11NS-B5 | <i>R. aquatilis</i> 11.00 ± 1.17 c                 | M6NS-N1  | <i>C. indologenes</i> 2.00 ± 0 g                   |
| M9NS-E1  | <i>Enterobacter sp.</i> 7.33 ± 1.45 cd             | M9NS-C6  | <i>Aeromonas sp.</i> 2.00 ± 0 g                    |
| M6NS-M1  | <i>C. indologenes</i> 7.33 ± 2.50 cd               | M9NS-D5  | <i>Aeromonas sp.</i> 2.00 ± 0 g                    |
| M6NS-B2  | <i>P. oryzihabitans</i> 6.33 ± 1.5 de              | M6NS-A8  | <i>E. cloacae</i> 2.00 ± 0 g                       |
| M6NS-F2  | <i>C. indologenes</i> 6.33 ± 1.61 de               | M3NS-A2  | <i>P. fluorescens</i> 2.00 ± 0 g                   |
| M6NS-G2  | <i>E. cloacae</i> 6.00 ± 1 def                     | M6NS-B3  | <i>C. indologenes</i> 2.00 ± 0 g                   |
| M11NS-E1 | <i>E. cloacae</i> 5.33 ± 1.76 defg                 | M11NS-A1 | <i>E. cloacae</i> 2.00 ± 0 g                       |
| M11NS-E2 | <i>E. cloacae</i> 5.00 ± 0.33 defg                 | M11NS-A2 | <i>E. cloacae</i> 2.00 ± 0 g                       |
| M11NS-D2 | <i>E. cloacae</i> 4.33 ± 1.53 defg                 | M11NS-A5 | <i>C. indologenes</i> 2.00 ± 0 g                   |
| M11NS-D1 | <i>C. indologenes</i> 4.00 ± 1.0 defg              | M11NS-A6 | <i>C. indologenes</i> 2.00 ± 0 g                   |
| M6NS-A6  | <i>E. cloacae</i> 3.00 ± 0.69 efg                  | M11NS-B1 | <i>E. cloacae</i> 2.00 ± 0 g                       |
| M6NS-A7  | <i>E. cloacae</i> 3.00 ± 0.52 efg                  | M11NS-B2 | <i>C. indologenes</i> 2.00 ± 0 g                   |
| M9NS-C7  | <i>C. indologenes</i> 2.33 ± 0.58 fg               | M6NS-C4  | <i>P. aeruginosa</i> 2.00 ± 0 g                    |
| M11NS-F1 | <i>C. indologenes</i> 2.33 ± 0.58 fg               | M6NS-G1  | <i>E. cloacae</i> 2.00 ± 0 g                       |
| M6NS-A2  | <i>Enterobacter sp.</i> 2.00 ± 0 g                 |          |  |

<sup>β</sup>=valores promedio ± desviación estándar, n=3 con tres lectruas. Letras iguales dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas.

La muestra M11NS fue la cepa más eficiente en la producción de índoles, seguida en desempeño por cepas de la muestra M6NS y M9NS. Ya que las bacterias pertenecientes a los géneros: *Azotobacter sp*, *Azospirillum sp*, *Pseudomonas sp*, *Xantomonas sp*, *Enterobacter sp*, *Arthrobacter sp*, *Bacillus subtilis*, se destacan por su potencial como biofertilizantes (Glick, 1995; Bashan y Holguin, 1997; Dobbelaere *et al.*, 2003) según se ha reportado coincide con algunas cepas

aisladas en este ensayo como son: *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas oryzihabitans*, reportando adicionalmente en este trabajo a *C. indologenes*. La producción de AIA está íntimamente relacionada con los tropismos de la planta, como inclinaciones, giros o curvaturas del tallo; además estimula el desarrollo del sistema radical de la planta, interviene en los procesos de división celular de la misma por lo que crece abarcando mayor área del suelo y así obtiene mayor cantidad de nutrientes del mismo, estimula el desarrollo de frutos y número de hojas (Franco 2008).

Posteriormente se observa que 3 muestras diferentes M3NS, M6NS y M11NS, muestran actividad de la enzima nitrogenasa no tan alta, esta actividad es mayor en las cepas que pertenecen a la muestra M11NS. En el Cuadro 8 se observa que estas cepas son: *E. cloacae* (M11NS-B1, M11NS-D2, M11NS-E2, M11NS-A1, M6NS-A3), *Chryseobacterium indologenes* (M11NS-A5), *P. fluorescens* (M3NS-A2). Las cepas que mostraron pobre actividad de la enzima nitrogenasa pertenecen en su mayoría a la muestra M9NS, M11NS, y en menor proporción a M6NS. El ensayo de reducción de acetileno evidencia que varios géneros bacterianos establecen una simbiosis asociativa con plantas de *Pinus cembroides*. Esta interacción planta bacteria puede estar influenciada por la clase de suelo y la época de lluvias, las cuales favorecen en incremento del número de especies vegetales y el porcentaje de raíces asociadas con bacterias fijadoras de nitrógeno y la tasa de actividad reductora de acetileno, se sugiere que el estado hídrico de los suelos, pueden controlar de alguna manera, el mayor o menor número de bacterias que establecen asociación simbiótica y alterar la composición de la microbiota de la planta, además de la propiedades inherente a la planta y al propio ciclo de vida de ella, coincidiendo con el estado de floración, donde los exudados radicales o suministros carbonados de la planta, le permiten mantener una población rizosférica diazotrófica (Marquina *et al.*, 2002)

## 9.6 Determinación de antibiosis in vitro y determinación de sideróforos

Las bacteriocinas son sustancias peptídicas con actividad antimicrobiana, producidas por diferentes cepas bacterianas. Las bacteriocinas producidas por diferentes bacterias pueden servir como barreras antimicrobianas que ayudan a reducir los niveles de microorganismos patógenos. Existen numerosas bacteriocinas y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada para inhibir microorganismos patógenos y mejorar el rendimiento en la supervivencia de diferentes especies de plantas. Por lo que este experimento es muy importante porque de él pueden derivar cepas que podrían ser usadas para mejorar la supervivencia de Pinos en el caso particular de *Pinus cembroides*.

Al evaluar el efecto de antagonismo entre las 33 cepas se observó que solo 2 especies presentaron antibiosis, estas cepas fueron: M6NS-G1 Y M11NS-A1 que vienen siendo la misma bacteria *Enterobacter cloacae*, y M9NS-C6 (*Aeromonas* spp.).

Otro mecanismo por medio de los cuales se puede presentar antibiosis es por la producción de sideróforos, los cuales son definidos como sustancias orgánicas de bajo peso molecular, con alta afinidad al ion  $Fe^{3+}$  utilizado como agente de transporte. Los sideróforos son producidos por microorganismos y que se encuentran ampliamente distribuidos en microorganismos y que se encuentran ampliamente distribuidos en microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, pero ellos difieren en su eficiencia de producción (Neilands y Leong, 1986).

La producción de sideróforos que quelatan al ion férrico en la rizosfera puede resultar en la inhibición del crecimiento de otros microorganismos, incluyendo a microorganismos patógenos cuya afinidad por el hierro es baja. La competencia por el hierro es probablemente más importante en la rizosfera que en el volumen del suelo. La promoción de crecimiento de las plantas por los sideróforos se debe principalmente a los siguientes descubrimientos: la adición de  $Fe^{3+}$  disuelto en el ambiente previene la inhibición del antagonismo *in vitro* y también nulifica la promoción del crecimiento de la planta por inducción de la bacteria; la producción

del sideróforo puro por ciertas cepas inhibe a patógenos de plantas *in vitro* y también promueve el crecimiento de la planta en el suelo (Kapulnik, 1996).

En el Cuadro 9 se observan las cepas que resultaron con producción de sideroforos de las cuales 17 de un total de 33 cepas dieron positivo en este ensayo. Como se puede apreciar la cepa que tuvo un mayor producción fue la M6NS-G2 y las cepas con menor producción fueron: M6NS-A2, M6NS-A6, M6NS-A8, M6NS-B2, M6NS-E2, M6NS-F2, en la Figura 5 se aprecia a los géneros que presentaron mayor producción de sideroforos, ya que no todas las cepas produjeron sideroforos.

**Cuadro 9. Producción de Sideroforos en bacterias Gram negativas aisladas de *Pinus***

| <b><i>Cembroides</i></b> |               |                   |
|--------------------------|---------------|-------------------|
| Nombre de cepa           | Clave de Cepa | Diámetro del halo |
| <i>Enterobacter sp.</i>  | M6NS-A2       | 1.1               |
| <i>E. cloacae</i>        | M6NS-A3       | 1.2               |
| <i>E. cloacae</i>        | M6NS-A6       | 1.1               |
| <i>E. cloacae</i>        | M6NS-A7       | 1.2               |
| <i>E. cloacae</i>        | M6NS-A8       | 1.1               |
| <i>P. oryzihabitans</i>  | M6NS-B2       | 1.1               |
| <i>C. indologenes</i>    | M6NS-B3       | 1.2               |
| <i>C. indologenes</i>    | M6NS-C3       | 1.2               |
| <i>P. auroginosa</i>     | M6NS-C4       | 1.2               |
| <i>E. asburiae</i>       | M6NS-E2       | 1.1               |
| <i>C. indologenes</i>    | M6NS-F2       | 1.1               |
| <i>E. cloacae</i>        | M6NS-G1       | 1.3               |
| <i>E. cloacae</i>        | M6NS-G2       | 1.6               |
| <i>Aeromonas sp.</i>     | M9NS-C6       | 1.3               |
| <i>Aeromonas sp</i>      | M9NS-D5       | 1.3               |
| <i>Enterobacter sp.</i>  | M9NS-E1       | 1.5               |
| <i>C. indologenes</i>    | M9NS-F1       | 1.5               |

IS=Diámetro del halo.

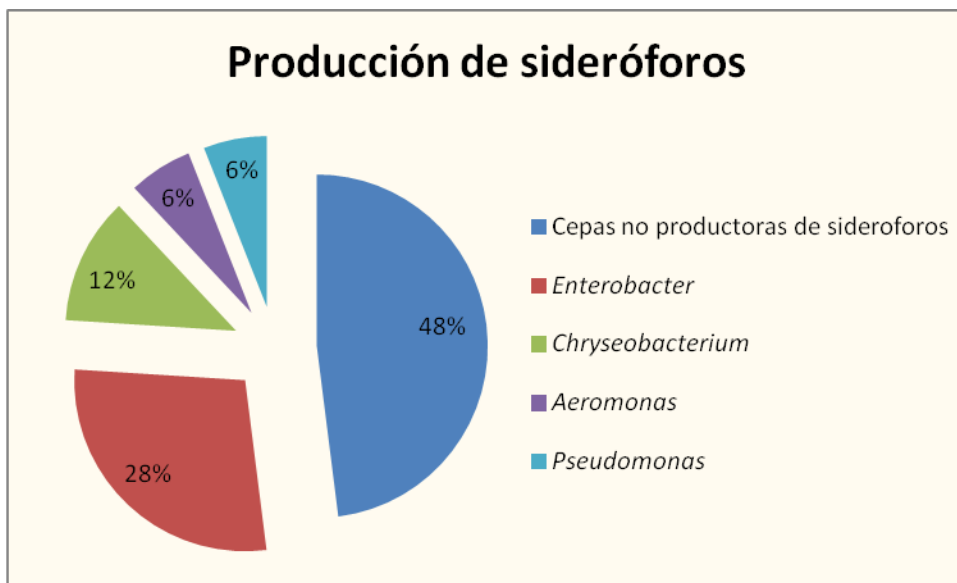


Figura 5. Producción de sideróforos.

En la Figura 5 se puede apreciar a los géneros que tuvieron producción de sideroforos los cuales fueron: *Enterobacter*, *Chryseobacterium*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*, donde el género *Enterobacter* registro mayor capacidad de síntesis de sideroforos.

### 9.7 Determinación de solubilización de fosfato tricálcico

El propósito principal de las bacterias solubilizadoras de fosfato es optimizar la disponibilidad de P para la planta de dicho elemento en el suelo, lo que como resultado generaría un incremento en la supervivencia de pinos usados para reforestar ya que cambia las formas insolubles de P en el suelo en formas solubles dependiendo de la biota circundante que le confiere cierto pH al suelo así como el clima y el tipo de suelo que también influyen en la generación de P soluble. Del ensayo de solubilización de fosfato se observa que de 33 cepas probadas solo 23 tienen la capacidad de solubilizar el P, en el Cuadro 11 se muestran cuales cepas resultaron efectivas para este ensayo.

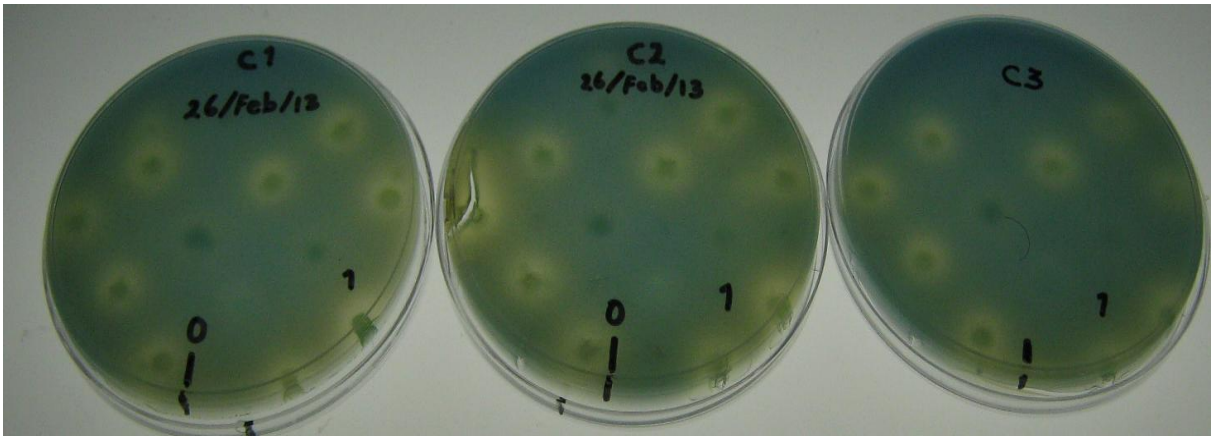


Figura 6. Solubilización de fosfatos.

En la Figura 6 se muestra la prueba de solubilización de fosfato tricálcico, mostrando los halos de solubilización alrededor de la colonia. Cabe mencionar que no todos los aislados produjeron halos completamente translucidos y que la mayoría de los aislados rizosféricos presentan la capacidad de solubilizar el fosfato tricálcico.

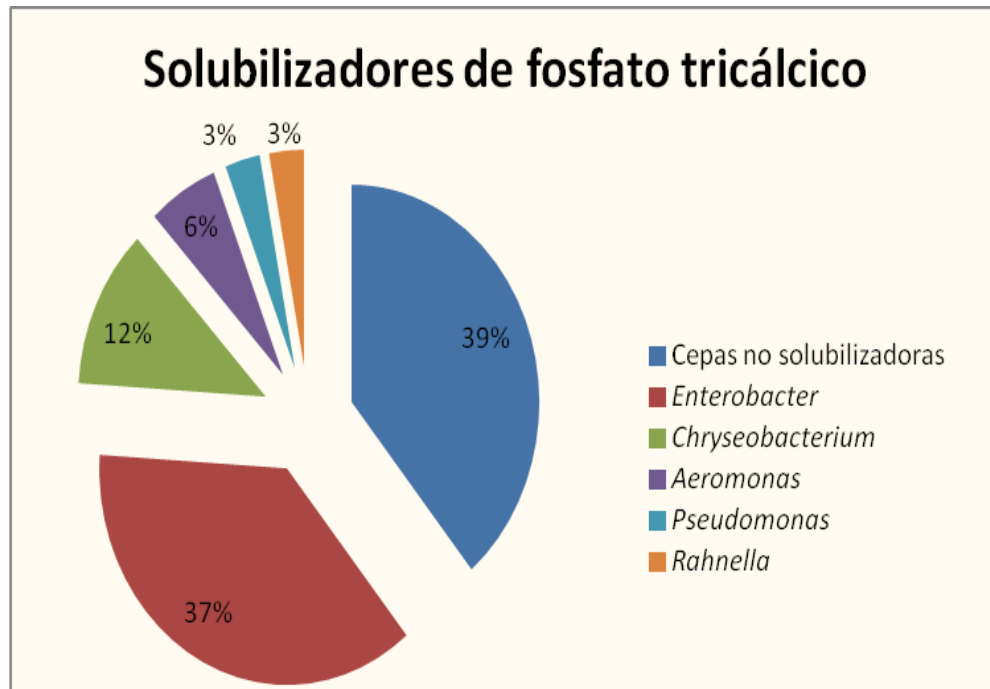


Figura 7. Cepas solubilizadoras de fosfatos.

En la Figura 7. Solubilizadores de fosfato tricálcico se aprecian a los géneros que mostraron mayor capacidad para solubilizar fosfato tricalcico, en esta misma se aprecia con mayor actividad solibilizadora a *Enterobacter* y con menor actividad a los géneros *Rahnella* y *Pseudomonas*.

En la Cuadro 10. Solubilización de fosfato tricálcico se observa que la cepa M3NS-A2 correspondiente a *Pseudomonas fluorescens* es la que mayor actividad mostró en la solubilización de fosfato tricálcico, seguida por *Enterobacter cloacae* con clave M6NS-A6. El índice de solubilización arrojó resultados interesantes ya que de 33 cepas solo 20 mostraron poseer mecanismos para solubilizar fosfato tricálcico, lo que indica que el 61 % de las cepas presentan esta característica. De estas 7 cepas: M3NS-A2, M6NS-A6, M6NS-A7, M6NS-A8, M6NS-A3, M6NS-E2 y M9NS-D5 mostraron mayor índice de solubilización por lo que deberían ser utilizados para estudios posteriores de eficacia de solubilización en maceta y finalmente en campo. También es posible notar que 13 cepas mostraron menor desempeño, lo que posiblemente nos indica la presencia de muchas bacterias solubilizadoras en el suelo, pero que no tienen una eficiencia muy grande dentro del proceso. Esto podría explicar por qué a pesar de encontrarse una fracción alta de solubilizadores de fosfato tricálcico en el suelo, no son tan eficaces para brindar a las plantas la provisión de fosforo necesario para su desarrollo normal.

**Cuadro 10. Solubilización de fosfato tricálcico por bacterias Gram negativas asociadas a *Pinus cembroides*.**

| Nombre de Cepa          | Clave de Cepa | IS  |
|-------------------------|---------------|-----|
| <i>P. fluorescens</i>   | M3NS-A2       | 2.7 |
| <i>E. cloacae</i>       | M6NS-A3       | 2.2 |
| <i>E. cloacae</i>       | M6NS-A6       | 2.3 |
| <i>E. cloacae</i>       | M6NS-A7       | 2.2 |
| <i>E. cloacae</i>       | M6NS-A8       | 2.1 |
| <i>E. asburiae</i>      | M6NS-E2       | 2.2 |
| <i>C. indologenes</i>   | M6NS-F2       | 1.3 |
| <i>E. cloacae</i>       | M6NS-G1       | 1.4 |
| <i>E. cloacae</i>       | M6NS-G2       | 1.9 |
| <i>Aeromonas sp.</i>    | M9NS-C6       | 1.8 |
| <i>Aeromonas sp.</i>    | M9NS-D5       | 2.2 |
| <i>Enterobacter sp.</i> | M9NS-E1       | 1.7 |
| <i>C. indologenes</i>   | M9NS-F1       | 1.7 |
| <i>E. cloacae</i>       | M11NS-A2      | 1.2 |
| <i>C. indologenes</i>   | M11NS-A5      | 1.4 |
| <i>R. aquatilis</i>     | M11NS-B5      | 1.8 |
| <i>C. indologenes</i>   | M11NS-D1      | 1.2 |
| <i>E. cloacae</i>       | M11NS-D2      | 1.4 |
| <i>E. cloacae</i>       | M11NS-E1      | 1.6 |
| <i>E. cloacae</i>       | M11NS-E2      | 1.4 |

IS=Índice de solubilización

Este ensayo permitió obtener resultados alentadores relacionados a la búsqueda de bacterias eficientes en la solubilización de fósforo. El potencial de este tipo de bacterias podría ser usado en la elaboración de un bioproducto, el mismo que sería benéfico, debido a la disminución de costos de fertilizantes, sino también al ambiente porque evitaría la acumulación de fertilizantes en el suelo, favoreciendo así la conservación del medio ambiente.



## 10. CONCLUSIONES

1. Del total de 109 bacterias se lograron aislar 33 cepas fijadoras de nitrógeno; las 33 cepas resultaron Gram negativas.
2. Las 33 cepas presentaron actividad reductora de acetileno en distintas concentraciones, la cual se extrapola a la fijación biológica de nitrógeno en condiciones “*in vitro*” a condiciones “*in vivo*”.
3. Se detectaron 20 cepas solubilizadoras de fosfato tricálcico y 17 cepas productoras sideroforos.
4. Hubo diferencia entre las cepas ya que solo se observaron 3 de ellas con mayor producción de índoles; en el experimento de antibiosis se identificaron 2 cepas productoras que exhibieron producción de sustancias inhibitorias.
5. Estas bacterias podrían tener potencial biotecnológico puesto que en la presente investigación se demostró que *Pinus cembroides* está asociado a diferentes bacterias benéficas para su desarrollo las cuales pueden ser utilizadas en procesos de inoculación.

## 11. LITERATURA CITADA

Alexander, B.D y A.D. Zuberer. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 12:39-45.

Allan, D. y P. Graham. 2002. *Soil Biology and Fertility Symbiotic Nitrogen Fixation, other N<sub>2</sub>-Fixing Symbiosis*. Dep. Of soil water and climate. University of Minnesota.

Aparicio-Tejo, P. M., C. Arrese-Igor y M. Becana. 2000. Fijación biológica de nitrógeno y bioquímica vegetal. pp. 247-260. In: J. Azcón-Bieto y M. Talón (eds.). *Fundamentos de la Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill. Barcelona, España.

Baker, K. F. 1980. Microbial antagonism-the potential for biological control. In: Ellwood, D.C., J.N. Hedger, M.J. Latham, J.M Lynch and J.H. Slater (eds.). *Contemporary Microbial Ecology*. Academic Press Inc. London. UK. Pp.327-347.

Baley, D. K y Haksworth. 1988. Phytogeography and taxonomy of the pinyin pines *Pinus* subsection *cembroides*. *Memorias del II Simposio Nacional sobre Pinos Piñoneros*. CEMCA. Centro de Genética Forestal. Chapingo, México.

Bashan , Y. y G. Holguín. 1995. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. II. Bacterias asociativas de la rizósfera. pp 2-14.

Beattie, G. A. 2007. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. pp 1-56. *In: S. S. Gnanamanickam (ed.) Plant-Associated Bacteria*. Springer. The Netherlands.

Bending D. G. Poole J.E., Whipps M. J., Read J. D. (2002). Characterization of bacteria from *Pinus sylvestris*-*Suillus luteus* mycorrhizas and their effects and root-fungus interactions and plant growth. *FEMS Microbiology Ecology* (39):219-227.

Boddey, R.M. 1987. Methods for cuantification of nitrogen fixation with Gramineae. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 6:209-266.

Brill, W.J. 1980. Nitrogen fixation. In Carlson, P.S. (Ed.). *The Biology of crop Productivity*. Academic Prees. New York. pp.53-76.

Brown, M.E. 1972. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. *J. Appl. Bacteriol.* 40:341-348.

Cante M. J. 2011. Influencia de los inoculantes bacterianos como alternativa agroecológica para producir trigo de calidad. Tesis de Maestría. Puebla, México. Instituto de Ciencias Posgrado en Ciencias Ambientales, BUAP. pp123.

Caballero-Mellado, J. y M. Valdés. 1983. Incidencia a *Azospirillum* en algunas gramíneas del trópico subhúmedo cálido de México. *Turrialba* 33:83-88.

Campbell, R., y M. P. Greaves. 1990. Anatomy and community structure of the rhizosphere. Pp. 11-34. In J.M. Lynch. (Ed.0. *The rhizosphere*. John Wiley and Sons. New York.

Carcaño M. M. G., R. Ferrera C. J., Pérez M. J. D., G. Molina. y Y. Bashan. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideroforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoamericana* 24:493-502.

Cicarelli, F.D., T. Doerks, C. Von Mering, C.J. Creevy, B. Snel y P. Bork. 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*. 311: 1283-1287.

Conney, M. 2000. *Microbiología del suelo: Un enfoque exploratorio*. Ed. Paraninfo. Madrid España. Pp. 178-182.

Chalk, P.M. 1991. The contribution of associative and symbiotic nitrogen fixation the nitrogen nutrition of non-legumes. *Plant and soil* 132:29-39.

Chen Y.P., P.D. Rekha, A. B. Arun, F.T Shen, W.A Lai, C.C. Young. 2006. Phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol.* 34:33-41.

Dalton, H. 1980. The cultivation of diazotrophic microorganisms. In: Bergersen, F.J. (ed). *Methods for evaluation biological nitrogen fixation*. John Wiley and Sons Ltd. New York. pp. 13-64.

Davies, P.J. 1990. Plant hormones and their role in plant growth and development. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.

Dobbelaere, S., J. Vanderleyden y Y. Okon. 2003. Plant Growth-Promoting Effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci*, 22(2):107-149.

Eguiluz P. T. 1982. Clima y distribución del genero Pinus en Mexico. *Revista Ciencia Forestal*. No. 38. Vol. 7. pp. 30-37.

Epstein, E. y J. Ludwig-Muller 1993. Indole 3 butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiol. Plant*. 88:382-389.

Escalante, A. 2007. Ecología Molecular en el Estudio de las comunidades bacterianas. *Ecología Molecular*. Inst. Nac. De Ecol. Capitulo 12:394-424.

Frankenberger Jr, W. T. y M. Arshad. 1995. Phytohormones in soils: microbial production and function. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. pp 503.

Farjon, A. y T. Styles 1997. Pinus (Pinaceae). *Flora Neotropica*. Monograph 75. The new Cork Botanical Garden. USA. pp.25-27.

Fernández, L., P. Zalba., M. Gómez. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Cienc. Suelo*, 23(1):31-37.

Franco C. M. 2008. Evaluación de caracteres PGRP en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Departamento de Fisiología Vegetal. Universidad de Granada. pp. 266.

Fredrickson, J.K., J. M. Zachara, D. L. Balkwill, D. Kennedy, S- W. Li, H. M. Kostandarithes, M.J. Daly, M.F. Romine y F.J. Brockman. 2004. Geomicrobiology of high-level nuclear waste- contaminated vadose sediments at the hanford site, Washington State. *Appl Environ. Microbiol*. 70(7):4230-4241.

Gao, B. y R.S. Gupta. 2012. Microbial systematics in the post-genomics era. *Antonie van Leeuwenhoek* 101:45-54.

Glick B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol*. 41:109-117.

Granados P. R. y M.C.P. Villaverde. 2003. Microbiología Tomo I, Bacteriología. Características y clasificación bacteriana. Virología. Características y técnicas bioquímicas. Internacional Ediciones Paraninfo, S.A. 1ª Edición, 3ª reimpresión, España. pp 251-153.

Haahtela, K., y T.K. Korhonen. 1985. In vitro adhesión of N<sub>2</sub>-fixing enteric bacteria to roots of grasses and cereals. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1186-1190.

Haahtela, K., T. Laakso, E.L. y T.K. Korhonen. 1986. Associated nitrogen fixation by *Klebsiella* spp. Adhesion sites and inoculation effects on grow roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:1074-1079.

Haahtela, K., T. Laakso, E.L. Nurmiäho – Lassila y T. K. Korhonen. 1988. Effects of inoculation of *Poa pratensis* and *Triticum aestivum* with root-associated, N<sub>2</sub>-fixing *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Azospirillum*. *Plant and Soil* 106:239-248.

Hameeda, B., G. Harini., O. Rupela., P. Wani., G. Reddy. 2006. Growth promotion of Maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from compost and macrofauna. *Microbial Research*.

Hardy, R. W. F., R.C. Burns y R. D. Holsten. 1973. Application of acetylene ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* 5:47-81.

Hartman, A., M. Singh y W. Klingmuller. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants, excreting high amounts of indolacetic acid. *Can J Microbiol*, 29:916-925.

Henao B. C., S.C.V. Rincon. 2008. Aislamiento y evaluación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Hernández M., G. Luis y Escalona A. M. A . 2003. Microorganismos que benefician a las plantas. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*. Vol. XVI, No. 1. pp. 29-32.

Heydari, A. y I.J. Misaghi. 1998. Biocontrol activity of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide-treated soils. *Plant and soil* 202:109-116.

Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Stanley y Williams. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Ninth edition. Lippincott Williams and Willkins. Baltimore, USA. pp. 787.

Idris, M., F.P. Vinther y V. Jensen. 1981. Biological nitrogen fixation associated with roots of field-grown barley (*Hordeum vulgare* L.). *Z. Pflanzernernaehr. Bodenk.* 144:385-394.

INEGI. 2005. Conjunto Nacional de Uso del Suelo y Vegetación, escala 1:250,000. Serie III. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México.

Ivanova, R., D. Bojinova, K. Nedialkova. 2006. Rock Phosphate solubilization by soil bacteria. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 41(3):297-302.

Jain, D. K. y D. G. Patriquin. 1985. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of root hairs. *Can J Microbiol.* 31:206-210.

Kapulnik, K. 1996. Nonsymbiotic nitrogen-fixing soil microorganisms. In: Wasielec, Y., A. Eshel y U. Kafkafi (eds.). *Plants Roots the hidden half*. 2a edition. Marcel Dekker, New York, 1996. pp.757-767.

Kloepper, J.W. 1993. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Biological Control Agents. In: F. Blaine Metting, Jr (Ed.). *Soil Microbial Ecology*. Marcel Dekker, Inc. New York. pp.255-274.

Malusa, J. 1992. Phylogeny and biogeography of the Pinyon pines (*Pinus subsect. Cembroides*). *Systematic Botany* 17(1):42-66.

Martínez, M. 1992. *Los Pinos Mexicanos*. 3er Ed. Ediciones Botas, México, D.F. pp. 38-78.

Marquina M. E., R.M. Skwierinski y B. Briceño. 2002. Actividad reductora de acetileno de bacterias asociadas a las Glumifloras del páramo Loma Redonda, Mérida Venezuela. *Pittiera* 2 (31): 57-69.

Michiels, K., J. Varderleyden y A. Van Gol. 1989. Azospirillum-Plant root associations: A review. Biol. Fertil. Soils. 8:356-368.

Millet, E., Y. Avivi y M. Feldman. 1984. Yield response of various wheat genotypes to inoculation with *Azospirillum Brasilense*. Plant and soil 80:261-266.

Mikanova, O y J. Novakova. 2002. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. Rostlinná Výroba 48(2): 379-400.

Mulder, E.G. y S. Brotonogoro, 1974. Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria, In: Quispel A. (Ed.). The biology of nitrogen fixation. New York, USA. pp: 37-85.

Müller, A. y E.W. Weiler, 2000. IAA-synthase an enzyme complex from *Arabidopsis thaliana* catalyzing the formation of indole-3-acetic acid from (s)-tryptophan. Biol and Chem, 381:679-686.

Neilands, J.B y S.A. Leong. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annu Rev. Plant Physiol.* 37:187-208.

Neilands, J.B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. The Journal Biological Chemistry. November 10. 270:26723-26726.

O'Hara, G. W., M. R. Davey y J.A. Lucas. 1981. Effect of inoculation of *Zea mays* with *Azospirillum brasilense* strains under temperate conditions. Can J. Microbiol. 27:871-877.

Orozco J. C., Martínez N. M. 2009. Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. Bosque (Valdivia). 30(2):70-77.

Pant H., y P. Warman. 2000. Enzymatic hydrolysis of soil organic phosphorus by immobilized phosphatases. Biol. Fertil. Soils. 30:306-311.

Patten, Ch. L. y B. R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of indol-3-acetic acid. *Can J Microbiol.* 42:207-220.

Pedraza, R. O., K. R. S. Teixeira, A. Fernández Scavino, I. García de Salamone, B. E. Baca, R. Azcón, V. L. D. Baldani y R. Bonilla. 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(2):155-164.

Perry, P.J., A. Graham, y D.M. Richardson. 1998. en: Richardson, D.M. (com). *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge, University Press, United Kingdom.

Price R. A., A. Liston y S. H. Strauss. 1998. Phylogeny and systematic of *Pinus*. En: D. M. Richardson (ed.). *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge University. pp. 49-68.

Riberio M. C. y E. J. B. N. Cardoso. 2012. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiological Research*. 167:69-78.

Roper, M. M. y J. K. Ladha. 1995. Biological N<sub>2</sub> fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with Straw. *Plant and Soil* 174:211-224.

Rzedowski, J. 1981. *Vegetación de México*. Limusa. México. pp. 432.

Salas-Moras, L.E. 2000. Identificación de microorganismos solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo de maíz de tres áreas edafoclimáticas diferentes. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología. BUAP. pp 73.

Salazar J. 2005. El fósforo en los sistemas ganaderos de leche. *Agronomía Mesoamericana*. 16 (002): 231-238.

Schopf, J.W. 1993. Microfossils of the Early Archean Apex Chert; New evidence of the antiquity of life. *Science*. 260:640.



Saraf M., S.R. Kumar y T. Saha. 2011. Perspectives of PGPR in Agri-Ecosystems. Maheshwari D. K. (ed.). Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems. India, Guajarat. Springer. pp. 361-378.

SEMARNAT, 2003. NOM-021, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.

SEMARNAT. 1999. El sector forestal de México, situación actual y perspectivas. México.

Silva, R. G., E.E. Jorgensen, S.M. Holub y M.E. Gonsoulin.2005. Relationships between culturable soil microbial populations and gross nitrogen transformation processes in a clay loam soil across ecosystems. Nutrient Cycling in Agroecosystems 71:259-270.

Sylvia D. M., Fuhrmann J.J. Hartel, y Zuberer D. 2005. Principles and applications of soil microbiology. Second Edition. Prentice Hall. New Jersey. pp. 464-466.

Shishido, M. y C.p. Chanway. 1998. Storage effects on indigenous soil microbial communities and PGPR efficacy. *Soil Biol. Biochem.* 30:939-947.

Soil Survey Satf. 1995. Claves para la Taxonomia de Suelos, versión 1994. Traducción de: Carlos A. Ortiz Solorio, María del Carmen Gutiérrez Castorena y José Luis García Rodríguez. Primera Edición en Español. 1995. Publicación Especial No. 3 Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo (SMCS). Chapingo, México. pp.306.

Susán-Azpiri, H., G. Sánchez-Ramos, J. G. Martínez- Avalos, S. Villa-Melgarejo y M. Franco. 2002. Population structure of *Pinus nelsoni* Shaw, an endemic pinyon pine in Tamaulipas, México. *Forest Ecology and Management* 165:193-203.

Sylvia, D. M., J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel y D.A. Zuberer. 1999. Principles and Applications of Soil Microbiology, Prentice Hall, Inc. USA. pp. 550.

Tapia-Hernández, A., M. A. Mascarúa-Esparza y J. Caballero-Mellado. 1990. Production of bacteriocins and siderophore-likeactivity by *Azospirillum brasilense*. *Microbios* 64:73-83.

Tarka M. T., Frey K. P. (2008). Mycorrhiza Helper Bacteria. En: Mycorrhiza. A. Varma (ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 113-132.

Teobaldo Eguluz Piedra. 1982. Clima y Distribución del genero Pinus en México. Revista Ciencia Forestal. No. 38 Vol. 7. pp.30,34,41,42.

Tien, T. M., M. H. Gaskins y D. H. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl Environ Microbiol. 37:1016-1024.

Tortora J. G., R. F. Berdell., L. C. Christine. 2007. Introducción a la microbiología. 9ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Capitulo 4.

Vázquez-Yanes, C., A. I. Batis Muñoz, M. I. Alcocer Silva, M. Gual Díaz y C. Sánchez Dirzo. 1999. Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Reporte técnico del proyecto J084. CONABIO. Instituto de Ecología, UNAM.

Villaseñor, J.L. y O. V. Téllez. 2004. Distribución potencial de las especies del género Jefeá (Asteraceae) en México. Anales de Biología. Serie Botánica 75(002):205-220.

Wose C. R. 1998. The universal ancestor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95:6854-6859.

Wose, C.R., O. Kandler y M.L. Wheelis.1990.Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archea, Bacteria y Eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 4576-4579.

Wose, C.R. 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. Department of Microbiology, University of Illinois at Urbana-Champaign, B103 Chemical and Life Sciences Laboratory, MC-110, 601 South Goodwin Avenue, Urbana, IL 61801-3709.

Zahir Z. A., M. Arshad., W. T. Frankenberg. 2004. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives in Agricultura. *Advances in Agronomy*. 81:97-108.