



ISSN en trámite

KUXULKAB'

-Tierra viva o naturaleza en voz Chontal-

Volumen XX

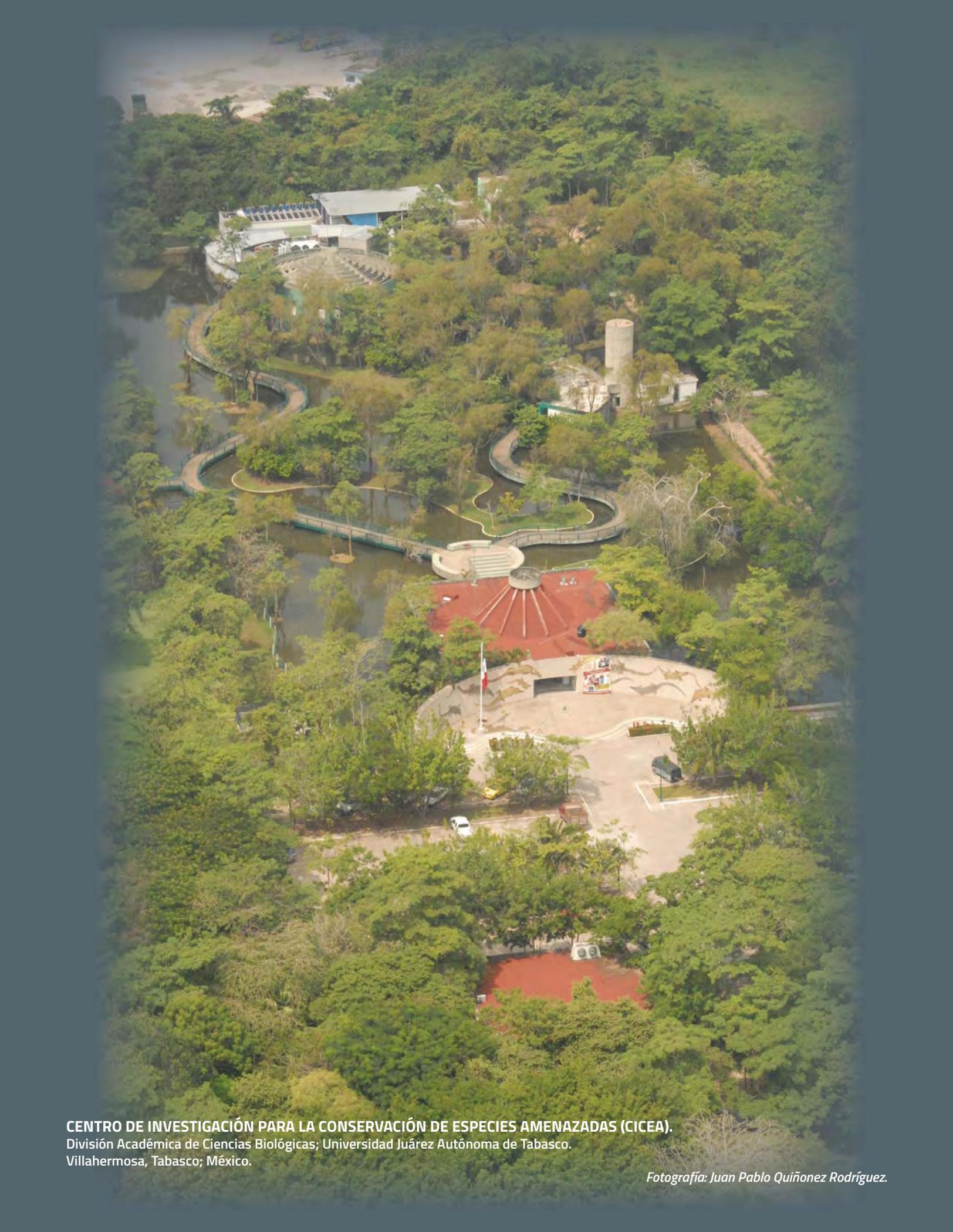
Número 39

Julio-Diciembre 2014

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
División Académica de Ciencias Biológicas



« REVISTA DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA »



CENTRO DE INVESTIGACIÓN PARA LA CONSERVACIÓN DE ESPECIES AMENAZADAS (CICEA).
División Académica de Ciencias Biológicas; Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
Villahermosa, Tabasco; México.

Fotografía: Juan Pablo Quiñonez Rodríguez.

DIRECTORIO

Dr. José Manuel Piña Gutiérrez
Rector

Dra. Dora María Frias Márquez
Secretaría de Servicios Académicos

Dr. Wilfrido Miguel Contreras Sánchez
Secretario de Investigación, Posgrado y Vinculación

M. en A. Rubicel Cruz Romero
Secretario de Servicios Administrativos

L.C.P. Marina Moreno Tejero
Secretaría de Finanzas

M.C.A. Rosa Martha Padrón López
Directora de la División Académica de Ciencias Biológicas

Dr. Carlos Alfonso Álvarez González
Coordinador de Investigación y Posgrado, DACBiología-UJAT

M. en A. Arturo Enrique Sánchez Maglioni
Coordinador Administrativo, DACBiología-UJAT

M. en C. Andrés Arturo Granados Berber
Coordinador de Docencia, DACBiología-UJAT

M.C.A. Otilio Méndez Marín
Coordinador de Difusión Cultural y Extensión, DACBiología-UJAT

COMITÉ EDITORIAL DE KUXULKAB'

Dr. Andrés Reséndez Medina (†)
Editor fundador

Dra. Lilia María Gama Campillo
Editor en jefe

Dra. Carolina Zequeira Larios
M. en C. María Elena Macías Valadez Treviño
Editores asociados

Biól. Fernando Rodríguez Quevedo
Coordinador editorial

M.C.A. Ma. Guadalupe Rivas Acuña
L.D.C. Rafael Sánchez Gutiérrez
Correctores de estilo

M.C.A. María del Rosario Barragán Vázquez
Corrector de pruebas

Téc. Juan Pablo Quiñonez Rodríguez
Pas. L.D.G. María Cristina Sarao Manzanero
Diseñadores

L.Comp. José Juan Almeida García
Soporte técnico institucional

L.C.I. Francisco García Ulloa
Traductor

CONSEJO EDITORIAL (EXTERNO)

Dra. Julieta Norma Fierro Gossman
Instituto de Astronomía, UNAM - México

Dra. Tania Escalante Espinosa
Facultad de Ciencias, UNAM - México

Dr. Ramón Mariaca Méndez
El Colegio de la Frontera Sur, ECOSUR San Cristóbal, Chiapas - México

M. en C. Mirna Cecilia Villanueva Guevara
Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Tabasco - México

Dr. Julián Monge Nájera
Universidad Estatal a Distancia (UNED) - Costa Rica

Dr. Jesús María San Martín Toro
Universidad de Valladolid (UVA) - España

KUXULKAB'

La revista KUXULKAB' (vocablo chontal que significa «tierra viva» o «naturaleza») es una publicación semestral de divulgación científica la cual forma parte de las publicaciones periódicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; aquí se exhiben tópicos sobre la situación de nuestros recursos naturales, además de avances o resultados de las líneas de investigación dentro de las ciencias biológicas, agropecuarias y ambientales principalmente.

El objetivo fundamental de la revista es transmitir conocimientos con la aspiración de lograr su más amplia presencia dentro de la propia comunidad universitaria y fuera de ella, pretendiendo igualmente, una vinculación con la sociedad. Se publican trabajos de autores nacionales o extranjeros en español, con un breve resumen en inglés, así como también imágenes caricaturescas.

KUXULKAB' se encuentra disponible electrónicamente y en acceso abierto en la siguiente dirección: www.revistas.ujat.mx; por otro lado se halla citada en:

PERIÓDICA (Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias):
www.dgbiblio.unam.mx

LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal):
www.latindex.unam.mx/index.html

Nuestra portada:

Fauna residente en la División Académica de Ciencias Biológicas, UJAT.

Diseño de:

Fernando Rodríguez Quevedo & Ydania del Carmen Rosado López; División Académica de Ciencias Biológicas, UJAT.

Fotografías de:

Coordinación de Difusión Cultural y Extensión de la DACBiología-UJAT, a través de la Biól. Blanca Cecilia Priego Martínez.

KUXULKAB', año XX, No. 39, julio-diciembre 2014; es una publicación semestral editada por la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) a través de la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBiología). Av. Universidad s/n, Zona de la Cultura; Col. Magisterial; Villahermosa, Centro, Tabasco, México; C.P. 86040; Tel. (993) 358 1500, 354 4308, extensión 6415; <http://www.revistas.ujat.mx>; kuxulkab@ujat.mx. Editor responsable: Lilia María Gama Campillo. Reservas de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2013-090610320400-203; ISSN: en trámite, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número: Coordinador editorial de la revista, Fernando Rodríguez Quevedo; Kilómetro 0.5 de la carretera Villahermosa-Cárdenas, entronque a Bosques de Saloya; CP. 86039; Villahermosa, Centro, Tabasco; Tel. (993) 358 1500, 354 4308, extensión 6415; Fecha de la última modificación: 14 de julio de 2014.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la revista, ni de la DACBiología y mucho menos de la UJAT. Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.



Editorial

Estimados lectores:

En este segundo volumen con la nueva imagen de nuestra revista de divulgación de la División Académica de Ciencias Biológicas, empezaran a notar cambios importantes asociados a las estrategias que nuestra máxima casa de estudios está realizando a través de la Secretaría de Investigación, Posgrado y Vinculación; para fortalecer las diferentes revistas que se publican en la Universidad. A través del trabajo colegiado realizado por nuestro comité editorial, así como talleres y cursos organizados por la Secretaría para los participantes en estos procesos, estamos realizando los ajustes que nos permitan no solo mejorar nuestra imagen, sino hacer más ágiles nuestros procesos y fortalecer nuestra revista. Esta labor ha sido posible gracias al apoyo editorial, así como las personas que colaboran en nuestra División Académica que se han sumado a este proceso y a quienes reiteramos nuestro agradecimiento.

Todos queremos salir de la crisis ambiental en el que todo nuestro planeta está inmerso. Sin duda, una posibilidad de salir de esto es conocer los impactos que generamos y realizar acciones para disminuirlos, acciones como el uso racional y eficaz de los recursos energéticos, considerando la sostenibilidad ambiental y económica. ¿Qué podemos hacer?, ¿Qué opciones tenemos? En lo que a energía se refiere, sin duda optar por las vías de la eficiencia y la sostenibilidad que no generen emisiones, es una importante apuesta. En las siete interesantes contribuciones que aquí se presentan sobre temas de contaminación, mitigación, conservación y biodiversidad, hay coincidencia en que la situación ambiental de nuestro Estado no es sostenible. Además nos recuerdan que dependemos de la energía y los recursos naturales; pero lo más importante, es tener información expuesta y disponible como lo hace nuestra revista, esto para reflexionar en las acciones que podríamos tomar al respecto.

Buscar cómo fortalecer nuestras capacidades de respuesta al cuidado de nuestro planeta, nos lleva a recordarles que la comunicación de información en estos temas nos permite no solo conocer de ellos, sino tomar mejores decisiones. Aprovechamos al despedirnos, agradecer nuevamente a todos los que han contribuido a esta nueva imagen, a los árbitros y colaboradores, así como de reiterar que KUXULKAB' es una opción para divulgar los temas de actualidad e investigaciones que realizamos tanto en la DACBIOL como en nuestra universidad, al igual que a los investigadores de otras instituciones. Recuerden que conocer los avances en la ciencia permite saber que está pasando en nuestro entorno y comprometerlos a cuidarlo mejor. Esperamos que nuestros estudiantes encuentren atractiva esta nueva imagen, sigan aprovechando y considerando este espacio para escribir sobre temas de relevancia.

Lilia María Gama Campillo
EDITOR EN JEFE DE KUXULKAB'

Rosa Martha Padrón López
DIRECTORA DE LA DACBIOL-UJAT

Contenido

MODELADO DE LA EVOLUCIÓN DE LAS EMISIONES DE CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS PROVENIENTE DEL SUBSECTOR TRANSPORTE EN EL ESTADO DE TABASCO	5
Jorge Ulises Reyes López, Ebelia del Ángel Meráz, Dora María Frías Márquez & Ana Luis Gómez Calzada	
MONITOREO PILOTO DE EMISIONES DE ÁCIDO SULFHÍDRICO EN EL CÁRCAMO «LAGUNA EL ESPEJO» EN VILLAHERMOSA, TABASCO	9
José Aurelio Sosa Olivier; José Ramón Laines Canepa; Stephany Moscoso Alejo; Roberto de la Peña de la Fuente; Estrellita Guadalupe Plancarte de la Cruz & Paola de Jesús Torres Cortes	
PROPUESTA DE REUTILIZACIÓN DE LODOS PROVENIENTES DE PLANTAS DE AGUAS RESIDUALES	17
Faviola González Borraz, Ebelia del Ángel Meráz & Anabel González Díaz	
DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE UN SUELO CULTIVADO CON <i>Eucalyptus sp.</i>	25
Anabel González Díaz, Miguel Ángel Hernández Rivera, Reyna Lourdes Fócil Monterubio, Yolanda Córdova Bautista & Marcia Eugenia Ojeda Morales	
NUESTROS VECINOS ALADOS: LAS AVES URBANAS	33
Juana Lourdes Trejo Pérez	
APUNTES PARA LA HISTORIA DEL CONOCIMIENTO TEMPRANO DE LOS COCODRILOS DE TABASCO	37
Jaime Javier Osorio Sánchez	
LAS ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS HOY EN DÍA	49
Juan de Dios Valdez Leal, Coral Jazvel Pacheco Figueroa, Elías José Gordillo Chávez, Lilia María Gama Campillo, Ena Edith Mata Zayas, Luis José Rangel Ruiz & Eduardo Javier Moguel Ordoñez	

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE UN SUELO CULTIVADO CON *Eucaliptus sp.*

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF NITROGEN FIXING BACTERIA IN A CULTIVATED SOIL OF *Eucaliptus sp.*

Anabel González Díaz^{1✉}, Miguel Ángel Hernández Rivera², Reyna Lourdes Fócil Monterrubio³, Yolanda Córdova Bautista² & Marcia Eugenia Ojeda Morales²

¹Egresada del posgrado de la División Académica de Ciencias Biológicas (DACBiol); Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT). ²Egresado de la División Académica de Ingeniería y Arquitectura (DAIA-UJAT). Profesora-investigadora de tiempo completo de la DACBiol-UJAT.

^{1,3}Carretera Villahermosa-Cárdenas km 0.5, entronque a Bosques de Saloya; C.P. 86039; Villahermosa, Tabasco; México. ²Carretera Cunduacán-Jalpa de Méndez km 1; C.P. 86690; Cunduacán, Tabasco; México.

✉ anaiq86@hotmail.com

Como referenciar:

González Díaz, A.; Hernández Rivera, M.A.; Fócil Monterrubio, R.L.; Córdova Bautista, Y. & Ojeda Morales, M.E. (2014). Detección y caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno de un suelo cultivado con *Eucaliptus sp.* *Kuxulkab'*, XX(39): 25-32, julio-diciembre.

Disponible en:

<http://www.revistas.ujat.mx>

<http://www.revistas.ujat.mx/index.php/kuxulkab>

Resumen

El uso indiscriminado de fertilizantes aunado a la mecanización ha generado el deterioro del suelo, pero existen alternativas para su recuperación. Una de ellas es el uso de microorganismos benéficos, estos presentes en los suelos, y comercialmente llamados biofertilizantes; sin embargo, puede estar en riesgo debido a las condiciones del suelo problema. El objetivo de esta investigación fue caracterizar la actividad promotora del crecimiento vegetal de las bacterias nativas fijadoras de nitrógeno (BFN) del género *Azotobacter* y *Azospirillum*, aisladas de suelo rizosférico de un cultivo de eucalipto, ubicado en Huimanguillo, Tabasco, México. En la morfología externa y a nivel de colonia en placa, se encontraron diferencias en forma, elevación y borde, resultando seis cepas de *Azospirillum* y ocho cepas de *Azotobacter*; la caracterización interna dio como resultado bacterias Gram negativas. Se evaluó su capacidad en producción de compuestos indólicos; indicando potencial para su utilización como inoculantes microbianos beneficiosos del cultivo.

Palabras clave: Biofertilizante, crecimiento, *Azotobacter*, *Azospirillum*.

Abstract

The indiscriminate use of fertilizers coupled with mechanization has led to soil deterioration, but there are alternatives for its recovery. One alternative is the use of beneficial microorganisms presented in these soils, commercially called biofertilizers; however, you may be at risk due to soil condition problems. The objective of this research is to characterize the plant growth promoting activity of native nitrogen-fixing bacteria (BFN) of the *Azotobacter* and *Azospirillum* kind, isolated from rhizosphere soil of eucalyptus crop, located in Huimanguillo, Tabasco, Mexico. In the external morphology and plate colony level, differences in shape, elevation and edge were found, resulting in six strains of *Azospirillum* and eight strains of *Azotobacter*; its internal characterization resulted in Gram negative bacteria. Its ability in production of indole compounds was evaluated; indicating potential for using it as a beneficial microbial inoculant crop.

Keywords: Biofertilizer, growth, *Azotobacter*, *Azospirillum*.

El eucalipto es la fuente principal de materia prima para diferentes industrias, gracias a su rápido crecimiento, versatilidad y fácil adaptación a diversos climas y ambientes, con resultados que se pueden resumir en alta rentabilidad. Actualmente, es cultivado a nivel mundial como una fuente de fibra para producir pulpa de celulosa, papel, madera aserrada, chapas y tableros, productos de ingeniería, entre otros. Muchos viveristas promueven el rápido crecimiento de las plántulas de eucalipto, mediante la aplicación de elevadas tasas de fertilización química, especialmente elevadas concentraciones de nitrógeno (Smethurst *et al.*, 2003; Forrester *et al.*, 2013). La energía para elaborar estos biofertilizantes deriva de fuentes no renovables, como petróleo, gas o carbón, que conlleva a un riesgo potencial de contaminación y eutrofización de las aguas dulces por la lixiviación de nitratos (NO_3) de los suelos, por lo que hace necesaria la búsqueda de otras opciones de manejo que contribuya a una agricultura más sana.

La Comisión Nacional Forestal pone a disposición los instrumentos de certificación, actualmente los representantes de plantaciones forestales de importancia comercial han mostrado interés ya que es un proceso voluntario, por el cual se evalúa el desempeño de las operaciones forestales a través de los diferentes instrumentos de certificación, que se incorporan en el «Sistema Nacional de Certificación Forestal y Cadena de Custodia» y tiene como objeto, facilitar la incorporación de manera voluntaria de los productores forestales a un proceso de certificación gradual a través de los diferentes instrumentos, así como el promover bosques manejados sustentablemente. En este sentido, es importante mencionar que se utilizan diferentes microorganismos con funciones específicas en la agricultura para mejorar la productividad de especies vegetales, pudiendo ser una herramienta muy útil para una agricultura sustentable (Armenta *et al.*, 2010). Todos son una fuente facilitadora del manejo de los nutrimentos que benefician el funcionamiento de los cultivos, y forman parte de una tecnología que garantiza una productividad biológica, económica y ecológica más exitosa y sin contaminación del ambiente y de inocuidad reconocida para el hombre (Aguirre *et al.*, 2009).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre más estudiadas son *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Klebsiella*; los cultivos en donde han sido más estudiados estos procesos de fijación de nitrógeno son: caña de azúcar, arroz, sorgo, trigo y pastos tropicales forrajeros; donde la fijación de nitrógeno (N_2) por bacterias asociativas y de vida libre es importante (Döbereiner *et al.*, 1995). El propósito de este estudio fue detectar bacterias fijadoras de nitrógeno y promotoras del crecimiento vegetal asociadas al eucalipto que contribuyan al crecimiento, desarrollo y establecimiento de esta especie.

¿Cómo hicimos la investigación?

Selección del sitio de muestreo. Se delimitó una superficie de 1,000 m² en el interior de una plantación de eucalipto con edad de 1.5 años del municipio de Huimanguillo, Tabasco; en donde se seleccionaron 10 puntos al azar, en cada punto se tomó muestra de raíz (suelo rizosférico) y suelo a distancia (suelo no rizosférico). Se colectaron cuatro submuestras en cada punto, se mezclaron homogéneamente y se formaron muestras compuestas de cada horizonte.

Las muestras compuestas para los análisis de las propiedades físicas y químicas se introdujeron en bolsas de plástico; las muestras de suelo rizosférico

«El eucalipto es cultivado como una fuente de fibra para producir papel, chapas y tableros, productos de ingeniería, entre otros»

«Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre más estudiadas son *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Klebsiella*»

para determinar la población de bacterias se reservaron en frascos de vidrio esterilizados, cerrados con tapa de rosca y se cubrieron con papel aluminio, se preservaron durante el trabajo de campo dentro de una nevera con hielo y después se almacenaron -en el laboratorio- durante una semana en refrigeración a una temperatura de 4 °C.

Análisis de propiedades fisicoquímicas del suelo. Las muestras de suelo que serían utilizadas para la medición de las propiedades fisicoquímicas, se secaron a la sombra a una temperatura no mayor a 35 °C y una humedad relativa entre 30 y 70 %, se molieron con mazo; las muestras orgánicas se fragmentaron con rodillos y se tamizaron en malla 10 (2 mm). Se evaluó nitrógeno total (%), fósforo disponible (mg Kg⁻¹ de suelo), materia orgánica (%), pH, contenido de humedad (%), conductividad eléctrica (dS m⁻¹) y densidad aparente (g cm⁻³), siguiendo las rutinas analíticas indicadas en la NOM-021-SEMARNAT-2000 (SEMARNAT, 2002).

Evaluación de poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN). La evaluación de la densidad de poblaciones de bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* en suelo rizosférico se realizó con el método de conteo viable de células vivas por siembra en superficie (Madigan *et al.*, 2009). Se utilizaron diluciones seriadas, se diluyeron 10 g de suelo en 90 mL de agua estéril, hasta 10⁻⁴. Posteriormente de las diluciones 10⁻³ y 10⁻⁴ por triplicado se tomó 0.1 mL de cada dilución y se colocó en el centro de la caja de Petri con medios de cultivos sólidos específicos, distribuyéndose con una espátula de Drigalski. Los cultivos se incubaron a 28 °C en una incubadora Yamato Mod. IC403C; a los cinco días de incubación se contaron las células viables, contando las unidades formadoras de colonias (UFC) que crecieron en la superficie del medio de cultivo, luego se transformó a UFC g⁻¹ de suelo seco.

El conteo se realizó de manera manual y visual, para esto cada caja (con colonias desarrolladas en la superficie de medios de cultivos sólidos) se colocó a contra luz en una campana de flujo laminar horizontal Scorpion Scientific Mod. A75000, se consideraron las colonias bacterianas apreciables a simple vista y se colocó una marca en el lugar de cada colonia.

El medio de cultivo para bacterias del género *Azospirillum* fue Rojo Congo compuesto de 5 g ácido málico, 0.5 g K₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄ 7H₂O, 0.1 g NaCl, 0.5 g extracto de levadura, 0.015 g FeCl₃ 6H₂O, 4.8 g KOH, 15 mL de rojo congo, 15 g de agar y 1.0 L agua destilada, pH 7 (Döbereiner *et al.*, 1995; Holguín *et al.*, 1996).

Para las bacterias del género *Azotobacter* se utilizó el medio de cultivo Ashby constituido de 5 g manitol, 5 g K₂HPO₄, 0.2 g MgSO₄ 7H₂O, 0.5 g NaCl, 0.1 g K₂SO₄, 5 g CaCO₃, 15 g de agar y 1.0 L de agua destilada, pH 7 (Subba, 1999). Los resultados fueron considerados positivos cuando se observó que las colonias de BFN del género *Azospirillum* absorbieron el color rojo Congo (Holguín *et al.*, 1996) y las colonias de *Azotobacter* mostraron un aspecto translucido (Subba, 1999).

Aislamiento y caracterización fenotípica de BFN. Las colonias de BFN se caracterizaron en su morfología externa a nivel colonia en placa, evaluando algunas características macroscópicas (forma, elevación, borde, consistencia y color). Se analizó la morfología celular de las cepas identificadas por microscopía electrónica de barrido, la preparación de las muestras consistió en suspender cada cepa en agua destilada estéril y se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente, posteriormente el contenido de cada tubo se filtró en papel filtro de 2 µm, el filtrado se fijó con glutaraldehído (OHC(CH₂)₃CHO) y se deshidrató con diluciones de etanol al 50 %, 75 %, 95 % y 100 %, se colocó sobre cinta de carbono de doble cara en un portamuestras y se metalizó con una capa ultradelgada de oro, y finalmente se observó a alto vacío en un microscopio electrónico de barrido JEOL Mod. 6010-LA (Dykstra, 1993).

Para la caracterización interna se realizó la tinción de Gram a cada cepa (Madigan *et al.*, 2009). Las colonias fueron purificadas, aislando de manera individual y por triplicado con la técnica en estría cruzada en caja de Petri sobre medio de cultivo sólido.

Producción de ácido indolacético (AIA). Se tomaron los cultivos bacterianos y se realizaron suspensiones celulares ajustadas al tubo #5 del patrón de turbidez de Mc Farland. Se cuantificó su concentración por recuento de unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹) sobre agar. El recuento se realizó a las 72 h y se ajustó la concentración celular con solución salina (0.85 % NaCl) hasta obtener 1x10⁷ UFC mL⁻¹. Se inoculó 30 mL de caldo Dygs al 2 % y se incubó durante 48 h a 32 °C y 120 rpm. La biomasa obtenida se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y las células se suspendieron en 30 mL de buffer fosfato estéril 0.06 M. De esta suspensión celular se tomaron 100 mL y se inocularon 50 mL de caldo BT modificado, sin solución de vitaminas y con una concentración de 20 g L⁻¹ de triptona como precursor del ácido indolacético y 0.2 g L⁻¹ de NH₄Cl como fuente de nitrógeno.

Se incubaron en oscuridad y se agitaron a 120 rpm y 32 °C durante 48 h (Celis & Gallardo, 2007; Obando *et al.*, 2010). Posteriormente, se centrifugaron 10 mL del caldo microbiano a 8,000 rpm durante 10 min, se tomaron 2 mL del sobrenadante y se adicionaron 8 mL de reactivo de Salkowsky hasta obtener la coloración rosada (confirmación de presencia de compuestos indólicos). Se realizó la lectura de la absorbancia de las muestras a 535 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Agilent Mod. 8453.

La concentración AIA se calculó mediante la concentración de compuestos indólicos, utilizando una ecuación ajustada por el método de mínimos cuadrados. Esta ecuación se obtuvo realizando regresión lineal a una curva de calibración que se construyó a partir de diferentes concentraciones de AIA (25, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 µM) con la adición del reactivo de Salkowsky y leídas a 535 nm de longitud de onda en el mismo espectrofotómetro (Kuss, 2006; Obando *et al.*, 2010).

Lo que encontramos en la investigación

Propiedades fisicoquímicas del suelo. Los resultados de los análisis químicos evidenciaron que es un suelo que favorece el crecimiento de colonias de bacterias, ya que nutrimentalmente posee los elementos químicos necesarios para el crecimiento bacteriano (tabla 1). El contenido de nitrógeno total en el suelo determinado a través del procedimiento de digestión de la muestra para convertir el nitrógeno a NH_4^+ (método AS-25), SEMARNAT (2000) se clasifica como muy alto.

Al respecto Pedraza *et al.* (2010), mencionan que muchos de los parámetros que se emplean para medir la calidad del suelo están directamente ligados a la actividad metabólica dependiente de los microorganismos, como la fijación de nitrógeno molecular o la oxidación de amonio (NH_4^+) a nitrito (NO_2^-) y posteriormente a nitrato (NO_3^-), que son procesos biológicos llevados a cabo sólo por bacterias nitrificantes.

En cuanto al fósforo disponible determinado por el procedimiento de Bray y Kurtz (método AS-11), SEMARNAT (2000) se considera alto, según la clasificación que hace esta norma. Uno de los mecanismos más ampliamente conocidos es la solubilización del fosfato del suelo, que hace al fósforo disponible para las plantas, el cual es mediado por un alto porcentaje de bacterias de la rizósfera y el rizoplasma, ya que producen ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el AIA, oxálico, cítrico, láctico, málico, glucónico, acético, entre otros (Paredes & Espinosa, 2009; Armenta *et al.*, 2010).

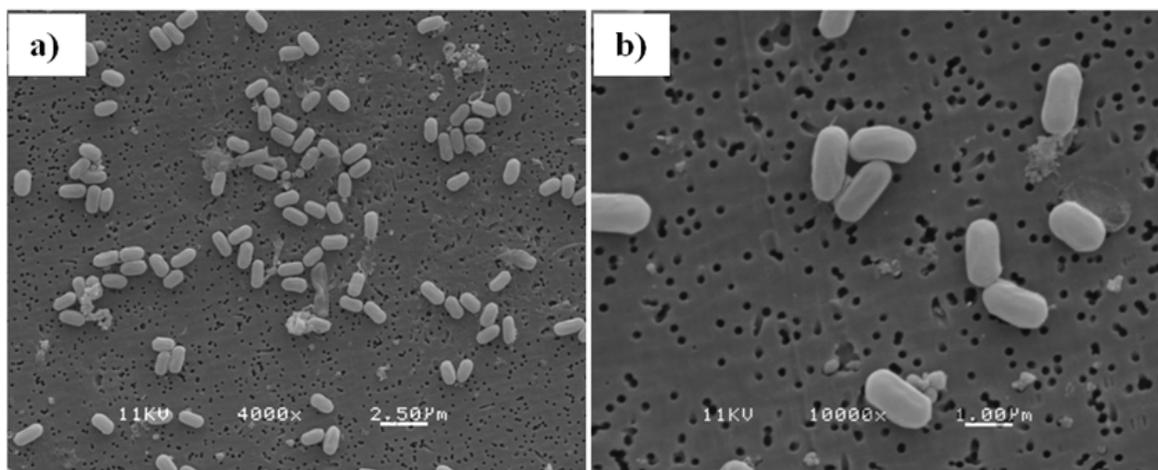
Se utilizó el procedimiento de Walkley y Black (método AS-07), (SEMARNAT, 2000) para determinar el contenido de materia orgánica, y se determinó la densidad aparente por el método del terrón parafinado (método AS-03), (SEMARNAT, 2000), de acuerdo a los resultados obtenidos, la norma lo clasifica como un suelo orgánico con un alto contenido de materia orgánica, esto indica que existen altos niveles de carbono en el suelo, lo cual incrementa la fertilidad, de modo que los microorganismos del suelo pueden utilizarlo como fuente energética.

De acuerdo a la clasificación de suelos que hace la NOM-021-SEMARNAT-2000, el suelo es moderadamente ácido. El pH del medio es importante para el crecimiento de los microorganismos e influye en los procesos metabólicos, la mayoría de ellos se desarrollan mejor en medios con un pH neutro. Según Alfonso *et al.* (2005) la efectividad en el uso de microorganismos se logra cuando se dan las condiciones óptimas para metabolizar los sustratos, como disponibilidad de agua, oxígeno, pH y temperatura, así como la disponibilidad de fuentes energéticas, al respecto Reyes & Valery (2007) mencionan que el flujo de la biomasa microbiana del suelo está determinado por el pH y el carbono orgánico presente en el suelo.

Los resultados de conductividad eléctrica que se obtuvieron por el método AS-18 (SEMARNAT, 2000) demuestran efectos despreciables de la salinidad, este resultado resalta la habilidad que posee este suelo para aumentar el crecimiento bacteriano, debido a que no hay estrés osmótico en las mismas. Las propiedades físicas del suelo son apropiadas para la multiplicación de las bacterias, destacando contenidos de humedad normales en todo el perfil, lo cual favorece los contenidos de oxígeno en el espacio poroso.

Densidad de bacterias en suelo rizosférico. Se ha reportado en distintas investigaciones (Manoharachary & Mukerji, 2006; Reyes *et al.*, 2008; Rivera *et al.*, 2010) que existe una mayor densidad de microorganismos alrededor de la raíz respecto al suelo a distancia, debido a que se depositan compuestos como aminoácidos, vitaminas, azúcares, ácidos orgánicos, nucleótidos, flavonoides, enzimas, glucósidos, giberelinas, auxinas, saponínicos y taninos, los cuales tienen un efecto selectivo sobre los microorganismos.

Al cuantificar la densidad de las BFN (tabla 2) se observó que el género *Azospirillum* se comportó como predominante con relación al género *Azotobacter*, según Alfonso *et al.* (2005) y Collados (2006) este resultado puede deberse a la amplia gama de hormonas vegetales que las bacterias *Azospirillum* exudan al medio, al metabolismo carbonado y nitrogenado



Fotografía 1. Micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido: a) bacilos cotos del género *Azospirillum*; b) bacilos cortos del género *Azotobacter*.

muy versátil que poseen, lo que les permite adaptarse, establecerse y colonizar el ambiente rizosférico con mayor facilidad. Otras investigaciones (Croes *et al.*, 1993; Pereg-Gerk *et al.*, 1998) han reportado que las bacterias del género *Azospirillum*, en un primer contacto con la planta, se unen a la superficie de la raíz en una rápida e irreversible adsorción debido a su flagelo polar glucosilado que es considerado una adhesina, seguido de un anclaje de agregados de células bacterianas, formados por la producción de material fibrilar.

Aislamiento y caracterización fenotípica de BFN. Se aislaron catorce cepas de bacterias, seis corresponden al género *Azospirillum* (BFNazp) y ocho al género *Azotobacter* (BFNazt), las características macroscópicas y microscópicas se observan en la tabla 3. Esta heterogeneidad en las características morfológicas, muestra que en el suelo cultivado con eucalipto existe gran diversidad de bacterias benéficas. La densidad y diversidad de microorganismos son susceptibles a variar dependiendo de la especie vegetal, edad y estado nutricional de la planta, de las características físico-químicas del suelo, de su manejo y de las condiciones ambientales (Marschner *et al.*, 2004; Reyes & Valery, 2007).

La fotografía 1 muestra los resultados de la microscopía electrónica de barrido, los aislados se caracterizaron por su forma de cocos y bacilos cortos Gram negativos, resultados similares obtenido por Obando *et al.* (2010), al aislar doce cepas *Azotobacter* y cinco aislamientos presuntivos de *Azospirillum*, todos bacilos gram negativos.

Prueba de ácido indolacético (AIA). Los resultados indican que las cepas estudiadas de *Azotobacter* y *Azospirillum* son productoras de auxinas. El rango de concentraciones varió desde 12.8 μg mL⁻¹ hasta 52.8 μg mL⁻¹, donde BFN azp1,

Tabla 1. Características fisicoquímicas del suelo cultivado con eucalipto.

N _{Total} (%)	0.2856
P _{Disponible} (mg·Kg ⁻¹)	31.9
Materia orgánica (%)	5.599
pH	5.3
Conductividad eléctrica (dS·m ⁻¹)	0.32
Densidad aparente (g·cm ⁻³)	0.93

Tabla 2. Número de bacterias diazotróficas del género *Azospirillum* y *Azotobacter* asociadas a *Eucalyptus* sp.

Perfil	UFC·g ⁻¹ suelo seco	
	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>
Suelo rizosférico	101 x 10 ³	75 x10 ³

BFN azp2, BFN azp5, BFN azt1, BFN azt3 y BFN azt4 fueron las mayores productoras y BFN azp4, BFN azt2 y BFN azt7 tuvieron la menor producción (tabla 4). Los valores de auxinas son comparables con los obtenidos por Obando *et al.* (2010) al estudiar bacterias diazotróficas asociadas al eucalipto, con valores de AIA de 4 μg mL⁻¹ a 49.57 μg mL⁻¹.

Estos resultados podrían estar relacionados con la producción de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal por las cepas en estudio, en este sentido la producción de auxinas del tipo AIA promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas, además se ha demostrado que la influencia de este metabolito en el desarrollo y las

Tabla 3. Características fenotípicas de los aislamientos de bacterias del género *Azotobacter* y *Azospirillum* a partir de suelo rizosférico de eucalipto.

Cepa	Morfología					Microscopía	
	Forma	Borde	Elevación	Consistencia	Color	Gram	Forma
BFN ^a azp ^b 1	Amiboide	Ondulado	Plana	Viscosa	Rojo escarlata	Negativa	Bacilos cortos
BFN azp2	Fusiforme	Ondulado	Plana	Viscosa	Rojo escarlata	Negativa	Bacilos cortos
BFN azp3	Circular	Ondulado	Plana	Seca	Rojo escarlata	Negativa	Bacilos cortos
BFN azp4	Amiboide	Lobulado	Plana	Viscosa	Rojo escarlata	Negativa	Bacilos cortos
BFN azp5	Circular	Entero	Plana	Seca	Rojo escarlata	Negativa	Bacilos cortos
BFN azp6	Amiboide	Ondulado	Elevada	Viscosa	Rojo escarlata	Negativa	Bacilos cortos
BFN azt ^c 1	Amiboide	Ondulado	Convexa	Acuosa	Transparente	Negativa	Bacilos cortos
BFN azt2	Circular	Entero	Convexa	Acuosa	Transparente	Negativa	Cocos
BFN azt3	Amiboide	Ondulado	Elevada	Viscosa	Café traslucido	Negativa	Bacilos cortos
BFN azt4	Amiboide	Ondulado	Rugosa	Seca	Café/lechosa	Negativa	Bacilos cortos
BFN azt5	Circular	Ondulado	Convexa	Acuosa	Transparente	Negativa	Cocos
BFN azt6	Amiboide	Entero	Convexa	Acuosa	Transparente	Negativa	Bacilos cortos
BFN azt7	Circular	Ondulado	Elevada	Viscosa	Café traslucido	Negativa	Cocos
BFN azt8	Circular	Entero	Elevada	Viscosa	Café traslucido	Negativa	Bacilos cortos

^aBacteria fijadora de nitrógeno, ^bBacteria del género *Azospirillum* y ^cBacteria del género *Azotobacter*.

Tabla 4. Producción de AIA por BFN de los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter*.

Cepa	Producción de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Cepa	Producción de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
AZP1	52.8	AZT1	50.15
AZP2	49.1	AZT2	12.8
AZP3	41.25	AZT3	50.4
AZP4	17.85	AZT4	44.3
AZP5	51.7	AZT5	26.35
AZP6	30.1	AZT6	27.2
		AZT7	14.3
		AZT8	34.95

funciones de la raíz en plantas inoculadas, es probablemente uno de los factores de mayores beneficios para los cultivos, pudiendo desempeñar una función vital en los efectos obtenidos en plantas colonizadas (Patten & Glick, 2002; Spaepen *et al.*, 2007).

Conclusiones

Los aislamientos bacterianos permitieron seleccionar tres cepas promisorias de *Azospirillum* (BFN azp1, BFN azp2 y BFN azp5) y tres de *Azotobacter* (BFN azt1, BFN azt3 y BFN azt4), por mostrar alto potencial de colonización, ser fijadoras de nitrógeno y por su eficiencia en la producción de hormonas estimuladoras del crecimiento vegetal.

Los resultados demuestran que el uso de BFN puede tener un impacto positivo sobre los parámetros de crecimiento y nutrición de plantas de eucalipto, lo que les otorga a estas cepas un potencial de uso en la agricultura sostenible, para ser utilizadas como biofertilizantes, después de haberse evaluado su efectividad.

Referencias

- Aguirre, J.F.; Irizar, M.B.; Durán, A.; Grajeda, O.A.; Peña, M.A.; Loredó, C. & Gutiérrez, A.** (2009). *Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México* (p. 80). Chiapas, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), campo experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas.
- Alfonso, E.T.; Leyva, A. & Hernández, A.** (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate ("*Lycopersicon esculentum*", Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2): 47-54
- Armenta, A.D.; García, C.; Camacho, J.R.; Apodaca, M.A.; Gerardo, L. & Nava, E.** (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*, 6(1): 51-56
- Celis, B. & Gallardo, I.** (2007). *Estandarización de métodos de detección de promotores de crecimiento vegetal (ácido indolacético y giberelinas) en cultivos microbianos* (Trabajo de grado de Microbiología Industrial; pp: 153-155). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C.
- Collados, C.C.** (2006). *Impacto de inoculantes basados en "Azospirillum" modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizósfera de trigo y maíz* (Tesis de Grado Doctoral; p. 90). Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Depto. de microbiología.
- Groes, C.; Moens, S.; Bastelaere, E.V.; Vanderleyden, J. & Michiels, K.** (1993). The polar flagellum mediates "*Azospirillum brasilense*" adsorption to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.*, 139: 2261-2269
- Döbereiner, J.; Urquiaga, S.; Boddey, R.M. & Ahmad, N.** (1995). Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture: nitrogen economy in tropical soil. *Fertilizer Research*, 42: 339-346
- Dykstra, M.J.** (1993). Routine schedule for the preparation of cell and tissue samples for scanning electron microscopy. En: *Manual of applied techniques for biological electron microscopy biological* (pp: 18-20). New York, U.S.A.: Plenum Press.
- Forrester D.I.; Collopy, J.J.; Beadle, C.L. & Baker T.G.** (2013). Effect of thinning, pruning and nitrogen fertiliser application on light interception and light-use efficiency in a young "*Eucalyptus nitens*" plantation. *Forest Ecology and Management*, 288: 21-30
- González, A.** (2013). *Micrografías del SEM JEOL 6010 LA*. Laboratorio de Análisis y Caracterización de la División Académica de Ingeniería y Arquitectura: Cunduacán, Tabasco; México: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Holguín, G.; Bashan, Y. & Ferrera-Cerrato, R.** (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos: III procedimientos para el aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos y rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas. *Terra*, 14: 211-224

Kuss, A.V. (2006). *Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado* (Tese de Doutorado; pp: 151-158). Universidade Federal de Santa Maria.

Madigan M.T.; Martinko J.M.; Dunlap P.V. & Clark D.P. (2009). *Brock: biología de los microorganismos* (12a Ed.; p. 1096). Madrid, España: Editorial PEARSON Addison Wesley.

Marschner, P.; Crowley, D. & Hong Yang, C. (2004). Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*, 261: 199-208

Manoharachary, C. & Mukerji, G.K. (2006). *Rhizosphere biology-an overview*. In: *Microbial activity in the rhizosphere* (pp. 1-38). Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Obando, D.M.; Burgos, L.B.; Rivera, D.M.; Rubiano, M.F.; Divan, V.L. & Bonilla, R.R. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto ("*Eucalyptus* sp.") en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biol. Colomb.*, 15(3): 107-120

Paredes, M. & Espinosa, D. (2009). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28(1): 61-70

Patten, C.L. & Glick, R. (2002). Role of "*Pseudomonas putida*" indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ Microbiol.*, 68(8): 3795-3801

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

Pereg-Gerk, L.; Paquelin, A.; Gounon, P.; Kennedy, I.R & Elmerich, C. (1998). A transcriptional regulator of the LuxR-UhpA family, FlcA, controls flocculation and wheat root surface colonization by "*Azospirillum brasilense*" Sp7. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(3): 177-187

Reyes, I.; Álvarez, L.; El-Ayoubi, H. & Valery, A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, 20(1): 37-48

Reyes, I. & Valery, A. (2007). Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz ("*Zea mays*" L.) con "*Azotobacter spp.*" *Bioagro*, 19(3): 117-126

Rivera, M.C.; Trujillo, A. & Alejo, D.E. (2010). Los biofertilizantes integrados con bacterias fijadoras de N, solubilizadoras de P y sustratos orgánicos en el crecimiento de naranjo agrio "*Citrus aurantium*" L. *Interciencia*, 35(2): 113-119

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2002). *Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000: que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos* (p. 85). México: SEMARNAT-Diario Oficial de la Federación.

Smethurst, P.; Baillie, C.; Cherry, M. & Holz, G. (2003). Fertilizer effects on LAI and growth of four "*Eucalyptus nitens*" plantations. *Forest Ecology and Management*, 176: 531-542

Spaepen, S.; Vanderleyden, J. & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4): 425-448

Subba Rao, N.S. (1999). *Soil microbiology: fourth edition of soil microorganisms and plant growth* (p. 407). U.S.A.: Science Publishers, Inc.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN PARA LA CONSERVACIÓN DE ESPECIES AMENAZADAS (CICEA).
División Académica de Ciencias Biológicas; Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
Villahermosa, Tabasco; México.

Fotografía: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT).

«La disciplina es no perder de vista lo que se desea alcanzar»

DACBiol



CENTRO DE INVESTIGACIÓN PARA LA CONSERVACIÓN DE ESPECIES AMENAZADAS (CICEA).
División Académica de Ciencias Biológicas; Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
Villahermosa, Tabasco; México.

Fotografía de Juan Pablo Quiñonez Rodríguez



KUXULKAB'

División Académica de Ciencias Biológicas; Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

☎ +52 (993) 358 1500, 354 4308 ext. 6415

✉ kuxulkab@ujat.mx • kuxulkab@outlook.com

🌐 www.revistas.ujat.mx

Carretera Villahermosa-Cárdenas km 0,5, entronque a Bosques de Saloya. C.P. 86039.
Villahermosa, Tabasco. México.

