

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS
NATIVAS DE BACTERIAS BENÉFICAS PARA MAÍZ
A PARTIR DE MAÍCES CRIOLLOS**

Tesis

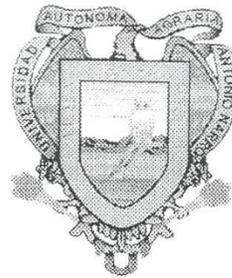
Que presenta **MARCO AURELIO PUENTE FLORES**
como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

Torreón, Coahuila.

Septiembre de 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS
NATIVAS DE BACTERIAS BENÉFICAS PARA MAÍZ
(*Zea mays*) A PARTIR DE MAÍCES CRIOLLOS

Tesis

Que presenta MARCO AURELIO PUENTE FLORES

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS


Dr. Sergio A. Rodríguez Herrera
Nombre del Director (UAAAN)


Dra. Miriam P. Luévanos Escareño
Nombre del Director Externo

Torreón, Coahuila.

Septiembre de 2016

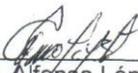
ii

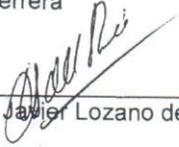
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS
NATIVAS DE BACTERIAS BENÉFICAS PARA MAÍZ
A PARTIR DE MAICES CRIOLLOS

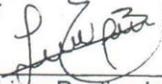
Tesis

Elaborada por MARCO AURELIO PUENTE FLORES como
requisito parcial para obtener el grado de Doctor en
Ciencias Agrarias con la supervisión y aprobación del
Comité de Asesoría


Dr. Sergio A. Rodríguez Herrera
Asesor principal


Dr. Alfonso López Benítez
Asesor


Dr. Alejandro Javier Lozano del Río
Asesor


Dra. Miriam Paulina Luévanos
Escareño
Asesor


Dra. Oralia Antuna Grijalva
Asesor


Dr. Raúl Villegas Vizcaino
Jefe del Departamento de Postgrado


Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Postgrado

Torreón, Coahuila, septiembre de 2016

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE
BACTERIAS BENÉFICAS PARA MAÍZ
A PARTIR DE MAICES CRIOLLOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



Inoculación de bacterias diazotróficas en
Genotipos de Maíz Forrajero

Y

Aislamiento de cepas nativas de bacterias
benéficas para maíz

Artículos

Que presenta MARCO AURELIO PUENTE FLORES

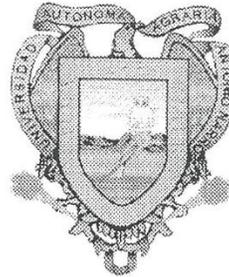
como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

Torreón, Coahuila.

Septiembre de 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



Inoculación de bacterias diazotróficas en
Genotipos de Maíz Forrajero

Y

Aislamiento de cepas nativas de bacterias
benéficas para maíz

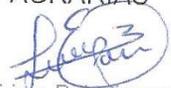
Artículos

Que presenta MARCO AURELIO PUENTE FLORES

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS


Dr. Sergio A. Rodríguez Herrera

Nombre del Director (UAAAN)


Dra. Miriam P. Luévanos Escareño

Nombre del Director Externo

Torreón, Coahuila.

Septiembre de 2016

v

Agradecimientos

A Dios por darme el tiempo, salud y energía para terminar este proyecto.

A mi asesor principal el Dr. Sergio A. Rodríguez Herrera por darme la oportunidad y el honor de ser su asesorado, además de su apoyo, paciencia y por compartir su conocimiento sin los cuales no hubiera podido ni siquiera iniciar el doctorado.

A la universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por permitirme ser uno de sus estudiantes y apoyarme en mi superación profesional tanto con conocimientos, como transporte y alimentación.

A mi comité de asesoría Dr. Alfonso López Benítez, Dr. Alejandro Javier Lozano del Río, Dra. Miriam Paulina Luevanos Escareño y a la Dra. Oralia Antuna Grijalva por sus conocimientos y orientación durante la realización del doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología CONACYT por su apoyo económico y profesional, sin los cuales no hubiera sido posible estudiar el doctorado.

A mi esposa Fátima L. Hernández Aguirre por su amor, apoyo y paciencia.

A mis padres María Flores Valerio y Marco Aurelio Puente Flores por su apoyo, consejos y ejemplo.

Al Dr. Alfonso López Benítez y al Dr. Edmundo Rodríguez Campos por su apoyo en este proyecto al permitir la elaboración de los experimentos en sus laboratorios (Fitomejoramiento y Ciencias básicas UAAAN)

A mis compañeros y amigos de fitomejoramiento Carlos Acuña, Odilón Gayosso, Julio Ek, Samuel Alcalá, por su apoyo, consejos y asesoría tanto en las materias como en hacer más agradable mi estancia en la universidad.

Índice general

I-Introducción.....	1
Objetivo.....	2
Hipótesis.....	2
II-Revisión de literatura.....	3
2.1.- Fertilización con nitrógeno.....	3
2.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno.....	3
2.3 Pruebas bioquímicas.....	6
III- Materiales y métodos.....	10
3.1 Maíces criollos	9
3.1.2 Equipo, Material de laboratorio y reactivos.....	9
3.2 Aislamiento de bacterias benéficas para el maíz.....	12
3.3 Identificación de cepas aisladas.....	12
3.3.1 Pruebas bioquímicas.....	14
3.4 Análisis de suelos.....	22
IV.-RESULTADOS Y DISCUSION.....	22
4.1 Aislamiento e Identificación de bacterias de Michoacán.....	21
4.2 Aislamiento e Identificación de bacterias de Celaya, Guadalajara y Torreón.....	32
V.-CONCLUSIONES.....	41

VI-REFERENCIAS.....	42
VII-ANEXOS	49
Anexo 1.-Composición de medios de cultivo y pruebas bioquímicas.....	49
Anexo 2.-Morfología macroscópica de las bacterias aisladas en medio sólido (JMV, LGI y NFB).....	54
Anexo 3.-Morfología macroscópica de las bacterias aisladas en medio rojo Congo NFB.....	56

Lista de Cuadros

Cuadro 1.-Interpretacion de la prueba de Oxidación reducción (OF).....	18
Cuadro 2.-Cepas aisladas e identificadas de Michoacán parte 1.....	24
Cuadro 3.-Cepas aisladas e identificadas de Michoacán parte 2.....	25
Cuadro 4.- Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Michoacán parte 1.....	28
Cuadro 5. Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Michoacán parte 2.....	29
Cuadro 6.- Análisis de suelos de Michoacán.....	31
Cuadro 7.-Cepas aisladas e identificadas de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 1	34
Cuadro 8.-Cepas aisladas e identificadas de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 2.....	35
Cuadro 9.- Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 1.....	37
Cuadro 10.- Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 2.....	38
Cuadro 11.- Análisis de suelos de Celaya, Torreón y Guadalajara.....	40

Anexo 1.1.- Composición de medio JMV.....	49
Anexo 1.2.- Solución de elementos traza.....	50
Anexo 1.3.- Solución de vitaminas.....	50
Anexo 1.4.- Composición de medio NFB.....	51
Anexo 1.5.-Composicion de medio LGI.....	52
Anexo 1.6.-Composicion de medio Agar rojo Congo NFB.....	53
Anexo 1.7.-Composicion de medio basal OF.....	54
Anexo 1.8.-Composicion de medio Agar nitrato.....	54
Anexo 1.9.-Composicion de medio de SIM.....	53
Anexo 2.1.- Morfología macroscópica en medio solido Nahuatzen.....	56
Anexo 2.2.- Morfología macroscópica medio sólido Pátzcuaro	56
Anexo 2.3.- morfología macroscópica medio sólido Aranza	57
Anexo 2.4.- Morfología macroscópica medio sólido Cuanajo.....	57
Anexo 2.5.- Morfología macroscópica medio sólido Zirahuen.....	58
Anexo 2.6.- Morfología macroscópica medio sólido Celaya	58
Anexo 2.7.- Morfología macroscópica medio sólido Guadalajara G1	59
Anexo 2.8.- Morfología macroscópica medio sólido Guadalajara G2.....	59
Anexo 3.1.- Morfología macroscópica Rojo Congo NFB Nahuatzen.....	60
Anexo 2.9.- Morfología macroscópica medio sólido Torreón.....	61
Anexo 3.2.- Morfología macroscópica Rojo Congo NFB Pátzcuaro.....	61
Anexo 3.3.- Morfología macroscópica medio Rojo Congo NFB Aranza.....	62
Anexo 3.4.- Morfología macroscópica medio Rojo Congo NFB Cuanajo.....	62

Anexo 3.5.- Morfología macroscópica medio Rojo Congo NFB Zirahuen.....	61
Anexo 3.6.- Morfología macroscópica Rojo Congo NFB Celaya.....	63
Anexo 3.7.- Morfología macroscópica medio Rojo Congo NFB Guadalajara G1.....	64
Anexo 3.8.-Morfología macroscópica medio Rojo Congo NFB Guadalajara G2.....	65
Anexo 3.9.- Morfología macroscópica medio Rojo Congo NFB Torreón	65

Lista de figuras

Figura 1.- Prueba de la Filancia.....	14
Figura 2.- Prueba de la catalasa.....	15
Figura 3.- Prueba de la oxidasa.....	16
Figura 4.-Desarrollo bacteriano en agar mac conkey.....	17
Figura 5.-Desarrollo bacteriano en agar medio basal OF.....	18
Figura 6.-Prueba positiva para el medio de agar nitrato.....	19
Figura 7.- Prueba positiva para el medio de SIM.....	20
Figura 8.-Crecimiento en forma de velo en medios semisólidos JMV, NFB y LGI.....	22
Figura 9.- Crecimiento en forma de velo acercamiento.....	23
Figura 10.- Crecimiento en agar rojo Congo NFB.....	26

Resumen

Uno de los nutrientes indispensables para la producción es el nitrógeno, el cual utilizan mediante fertilizantes sintéticos que aumentan los costos de producción y pueden contaminar el suelo, lo cual podría disminuir gracias a la fijación biológica del nitrógeno llevada a cabo por bacterias denominadas diazotróficas por ejemplo: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter* y *Acetobacter*.

En este trabajo se aislaron e identificaron bacterias benéficas para maíz (*Zea mays*) a partir de maíces criollos de Michoacán, Celaya, Guadalajara y Torreón las cuales podrían tener efectos benéficos al asociarse a otras líneas mejoradas de maíz forrajero. Se utilizaron los siguientes medios de cultivo semisólidos selectivos para microorganismos fijadores de nitrógeno: JMV, LGI y NFB, posteriormente se utilizaron estos medios en forma sólida, se analizó la morfología macroscópica y microscópica, posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas para identificar el género de la bacteria aislada, después se inocularon en rojo Congo NFB y se realizaron nuevamente pruebas bioquímicas para confirmar la determinación del género de la bacteria aislada. Mediante este procedimiento se lograron aislar 90 cepas distintas procedentes de raíces de maíces criollos de las localidades del estudio. Se identificaron 45 cepas correspondientes a diferentes géneros para cada localidad como *Azospirillum sp.*, *Azotobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Clostridium sp.*, *Xanthobacter sp.*, *Acetobacter sp.*, Los géneros *Azospirillum sp.*, *Azotobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, han demostrado ser biofertilizantes mejorando el rendimiento en maíz.

Palabras clave: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter* y *Acetobacter*.

Abstract

One of the most important nutrients for the production is the nitrogen, which is used through synthetic fertilizers that increase the production's cost and it can pollute the soil, which could be decreased by the biological fixation of nitrogen carried out by bacteria denominated diazotrophs, for example: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter* y *Acetobacter*.

In this project, beneficial bacteria were isolated and identified for the maize (*Zea mays*), beginning with native corn of de Michoacán, Celaya, Guadalajara y Torreón, which could have positive effects associated with other lines of fodder maize were used by the following semisolid culture media selective for nitrogen-fixing microorganism of nitrogen JMV, LGI y NFB, afterwards they were used on solid media way, its analyzed macroscopic and microscopic morphology, afterwards biochemical tests were used to identify the gender of the isolated bacteria, after, they were inoculated on red congo NFB medium and again biochemical tests were carried out for to confirm the gender of the bacteria. Throughout this process 90 different crops were isolated from native maizes of work's locations. 45 crops were identified from different gender for each location like *Azospirillum sp*, *Azotobacter sp*, *Pseudomonas sp* y *Burkholderia sp*, *Clostridium sp*, *Xanthobacter sp*, *Acetobacter sp*. The genders *Azospirillum sp*, *Azotobacter sp*, *Pseudomonas sp* y *Burkholderia sp* have demonstrated to be biofertilizers that improve the corn development.

Key words: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter* y *Acetobacter*

I.-INTRODUCCION

Uno de los nutrientes indispensables para la producción de los cultivos es el nitrógeno, del cual el 78% se encuentra en la atmósfera en forma de gas (N_2 o nitrógeno molecular) las plantas no utilizan esta forma para su metabolismo debido a que no pueden fijarla (Döbereiner, 1997). El nitrógeno lo utilizan las plantas mediante fertilizantes sintéticos, sin embargo el uso de fertilizantes nitrogenados genera contaminación de mantos acuíferos con nitratos, eutrofización y lluvia ácida (Ramanathan *et al.*, 1985). Los nitratos además de contaminar aguas superficiales y subterráneas contribuyen a la emisión de dióxido y monóxido de nitrógeno los cuales contaminan la atmósfera (Puckett, 1995).

Otra forma para obtener el nutriente es gracias a la fijación biológica del nitrógeno llevada a cabo por bacterias denominadas diazotróficas. Dichas bacterias convierten la molécula de nitrógeno atmosférica en amonio rompiendo el enlace doble gracias a la actividad de la enzima nitrogenasa (Okon y Vanderleyden, 1998) Esta fijación biológica de nitrógeno (FBN) no conlleva los daños al subsuelo, mantos freáticos ni esterilidad del suelo, que producen como efecto secundario los fertilizantes químicos, dando un valor agregado para los productores.

Dichas bacterias además de fijar nitrógeno, promover el desarrollo de las plantas por lo que se les conoce también como PGRP, bacterias promotoras del desarrollo vegetal (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Baldani *et al.*, 1997). Esta actividad la llevan a cabo mediante la producción de sustancias favorables para el desarrollo de las plantas como por ejemplo giberelinas.

Algunos ejemplos de PGRP asociados con gramíneas son: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter* y *Acetobacter*. De los cuales *Azospirillum* ha demostrado aumentar el peso seco, el nitrógeno total, la producción y peso de

los granos, el grado de germinación tanto en invernadero como en campo (Pandey *et al.*, 1998)

En este proyecto se aislarán e identificarán mediante pruebas macroscópicas, microscópicas y bioquímicas cepas de PGRP de las raíces de maíces criollos de las localidades de Celaya, Michoacán, Torreón y Guadalajara. con el fin de obtener bacterias benéficas para el cultivo de maíz (*Zea mays*) para utilizarlo como forraje con mayor calidad, además de ofrecer una alternativa para disminuir los costos de producción en cuanto a la fertilización se refiere así como disminuir el impacto ecológico.

Objetivos

- Aislar cepas nativas de bacterias benéficas para maíz a partir de maíces criollos de cuatro localidades: Celaya, Guadalajara, Michoacán y Torreón
- Caracterización morfológica de su crecimiento en medios de cultivo
- Identificación de las cepas mediante pruebas bioquímicas

Hipótesis

Las localidades examinadas cuentan con bacterias fijadoras de nitrógeno como *Azospirillum sp*, *Azotobacter sp*, *Pseudomonas sp* y *Burkholderia sp* y se pueden aislarla e identificarla mediante pruebas microbiológicas y bioquímicas.

II.- REVISION DE LITERATURA

2.1.-Fertilización con nitrógeno

Entre los insumos que requiere el cultivo se encuentran los fertilizantes con su respectivo costo, además para obtener un maíz forrajero de alta calidad es necesario utilizar dosis altas de fertilizantes sintéticos, que aumentan los costos de producción y pueden contaminar el suelo y los mantos freáticos. Dicha contaminación puede afectar a cultivos posteriores y al consumidor, ya que el uso de fertilizantes nitrogenados genera contaminación de mantos acuíferos con nitratos, eutrofización y lluvia ácida, emisión de dióxido y monóxido de nitrógeno los cuales contaminan la atmósfera (Ramanathan *et al.*, 1985). El aumento de la población de ganado bovino, especialmente el lechero, y por lo tanto el incremento de la demanda de forraje de calidad nutritiva y digestiva, conlleva a la necesidad de la búsqueda de paquetes tecnológicos que sean capaces de cubrir dicha demanda.

2.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno

Uno de los nutrientes indispensables para la producción es el nitrógeno, del cual el 78% se encuentra en la atmósfera en forma de gas (N_2 o nitrógeno molecular) las plantas no utilizan esta forma para su metabolismo debido a que no pueden fijarla (Döbereiner, 1997).

Otra forma para obtener el nutriente es gracias a la fijación biológica del nitrógeno llevada a cabo por bacterias denominadas diazotróficas (Martínez *et al.*, 2003). Dichas bacterias convierten la molécula de nitrógeno atmosférica en amonio rompiendo el enlace doble gracias a la actividad de la enzima nitrogenasa (Okon y Vanderleyden, 1998) Esta fijación biológica de nitrógeno (FBN) no conlleva los daños al subsuelo, mantos freáticos ni esterilidad del suelo, que producen como efecto secundario los fertilizantes químicos, dando un valor agregado para los productores.

Dichas bacterias además de fijar nitrógeno, promover el desarrollo de las plantas por lo que se les conoce también como PGRP (bacterias promotoras del desarrollo vegetal por sus siglas en inglés) (Baldani *et al.*, 1997). Esta actividad la llevan a cabo mediante la producción de sustancias favorables para el desarrollo de las plantas como por ejemplo giberelinas (Arshad y Frankenberger, 1998; Khalid *et al.*, 2004 y Carcaño *et al.*, 2006). Algunos ejemplos de PGRP asociadas con gramíneas son: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Acetobacter* (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Acetobacter presenta células elipsoidales a bacilos, mide de 0.6 a 4 micras, movilidad variable, aerobias obligadas metabolismo oxidativo, catalasa positivo, oxidasa negativo y crecen bien en sales de ácidos orgánicos tales como el acetato y el lactato. Son acidófilas, crecen a pH tan bajos como 4, con un crecimiento óptimo entre 5 y 6. Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 25 y 30 °C (Dobereiner, 1995). El por ciento molecular de G+C del DNA es aproximadamente 51-65 % (Ley *et al.* 1984; Stainer *et al.*, 1985) *Acetobacter diazotrophicus* es una especie fijadora de nitrógeno, produce ácido indol acético el cual favorece el crecimiento de la raíz del cultivo. (Cavalcante *et al.*, 1988), La cual se ha utilizado como biofertilizante en caña de azúcar (James y Olivares, 1998).

Otra bacteria PGRP es *Herbaspirillum*, la cual presenta una célula gram negativa, vibroide, a veces helicoidal, miden 0.6 a 0.7 micras, presenta un metabolismo oxidativo y no fermenta azúcares, bajo condiciones microaerofílicas es fijador de nitrógeno, oxidasa, catalasa y ureasa positivo. Utiliza ácidos orgánicos como fuente de carbono como citrato, fumarato, succinato y piruvato. Utiliza varias azúcares como glucosa, galactosa, glicerol, crece en un pH de 5.3 a 8. (Baldani *et al.*, 1986). Esta bacteria se ha aislado en gramíneas como endófito, en la rizósfera y en las hojas del cultivo (Urquiaga *et al.*, 1992). La inoculación en cereales con *Herbaspirillum sp* y *Azospirillum sp*. puede incrementar el desarrollo y la producción del grano (Okon, 1985). Se ha reportado la producción de sustancias con efecto fitohormonal a partir de

Herbaspirillum sp. como Acido Indol Acético y giberelinas que ayudan a aumentar el rendimiento (Bastian *et al.*, 1998)

Azotobacter es una bacteria gram negativa con forma de bacilo o coco, aeróbica y algunas anaeróbicas, con metabolismo oxidativo a variable, catalasa positivo, oxidasa variable, degrada carbohidratos como la glucosa o lactosa, produce colonias fluorescentes o amarillas, su pH óptimo es de 7 a 7.5 no se desarrolla a pH 4 a 5. Utiliza nitrato, amonio y algunos aminoácidos como fuente de carbono, fijador de nitrógeno por lo cual necesita molibdeno o vanadio, no proteolítica, (Whitman *et al.*, 2012). *Azotobacter* sp. inoculado en trigo aumento la producción en 30 a 45% comparado con la inoculación con *Bacillus*. (Kloepper *et al.*, 1989). Además produce ácido indol acético, por lo cual aumenta el peso seco de las hojas y raíces en varios cultivos de gramíneas como trigo y maíz, después de inocular sus raíces (Barbieri *et al.*, 1986)

Las *Pseudomonas* son bacterias gram negativas, aerobias, móviles a variable, no son formadores de esporas, con un amplia capacidad metabólica pueden utilizar distintas fuentes de carbono y carbohidratos, catalasa positiva, (Whitman *et al.*, 2012). *Pseudomonas* aumenta el rendimiento de grano y el peso seco del mismo inoculado en gramíneas como el trigo, inoculando *Pseudomonas* sp. únicamente o en combinación con *Glomus* sp. (Kumar *et al.*, 1992; Valdivia *et al.*, 1999).

El género *Azospirillum* presenta células vibroides gruesas, o bacilos rectas, con gránulos de poly B hidroxibutirato. Móviles por un único flagelo polar. También puede tener un flagelo en medio solido a 30C. Las colonias de algunas cepas forman colonias rosas pálido o rojo en agar NFB rojo Congo (Rodríguez, 1982) Las condiciones óptimas para su desarrollo es una temperatura de 34 a 37 °C. pH 7 aunque algunas cepas prefieren uno más acido, una fuente de nitrógeno fijado por ejemplo sales de amonio. Su metabolismo es respiratorio con oxígeno, algunas utilizan nitratos como aceptor de electrones. Su habilidad fermentativa es débil, pero también ocurre. Bajo condiciones de oxigeno

limitado algunas cepas pueden convertir nitratos a nitritos u óxido nitroso a nitrógeno molecular. Se desarrollan bien en sales de ácidos orgánicos como malato, succinato, lactato y piruvato. Algunos carbohidratos también pueden ser utilizados. Algunas cepas requieren biotina. No hace nódulos con las raíces. (Whitman *et al.*, 2012)

Azospirillum sp. ha demostrado aumentar el peso seco, el nitrógeno total, la producción y peso de los granos, el grado de germinación tanto en invernadero como en campo (Bashan *et al.*, 1996; Pandey *et al.*, 1998). Dicho microorganismo se puede aislar tanto de rizósfera, como de suelo y también se ha logrado el aislamiento de cepas endófitas (Rangel *et al.* 2011; Hernández *et al.*, 2002). En condiciones de invernadero se inoculo *Azospirillum* en trigo, cebada y avena, se logró disminuir los costos de producción en cebada al suplementar el 20% de uso de fertilizante (Huerta *et al.*, 2011), además de un aumento de hasta 9% en la producción de grano en trigo (Dalla *et al.*, 2004). En invernadero se han logrado incremento la producción de biomasa hasta en un 90% (García *et al.*, 2007).

2.3 Pruebas bioquímicas

Como complemento en la identificación de las bacterias aisladas se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: Filancia, catalasa, oxidasa, agar Mac conkey, medio basal (OF), agar nitrato, medio de SIM. A continuación se describe el modo de empleo e interpretación.

a) Filancia. La reacción positiva detecta microorganismos gram (-) debido a la reacción entre el peptidoglucano presente en la pared celular de la bacteria y el hidróxido de potasio del reactivo, formando un hilo viscoso. (Gottschalk, 1986; MacFaddin, 2000; Farmer, 2003)

b) Catalasa

Se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La principal excepción es *Streptococcus*. Si se invierte el orden puede provocar falsos positivos. (Beauchamp y Fridovich, 1973; Kono y Fridovich 1982)

c) Oxidasa

El sistema de citocromo actúa transfiriendo electrones al oxígeno con formación de agua. Se encuentra en organismos aerobios y anaerobios facultativos. La prueba del citocromo oxidasa utiliza el diclorato de tetrametil para fenilendiamina que actúa como aceptor final de electrones, el compuesto es incoloro en estado reducido. En presencia de oxidasa y oxígeno atmosférico se oxida formando azul de indofenol. (Strittmatter, 1959; Farmer, 2003)

d) Agar MacConkey

Este medio evalúa la capacidad de un microorganismo de desarrollarse en concentraciones moderadas de sales biliares. Las sales biliares y el cristal violeta inhiben considerablemente la flora gram positiva. La lactosa con indicador de pH rojo neutro, sirven para la comprobación de la degradación de dicho azúcar. Las colonias lactosa negativas son incoloras, mientras que las lactosa positivas son rojas con un halo turbio debido al descenso de pH provocado por los ácidos biliares. (MacFaddin, 2000; Farmer, 2003)

e) Medio basal OF

Los microorganismos glucolíticos degradan la glucosa por mecanismos fermentativos u oxidativos. Los productos finales de la fermentación son ácidos mixtos relativamente fuertes que pueden detectarse con medios de fermentación convencionales. Los ácidos producidos por la degradación

oxidativa de la glucosa son sumamente débiles y se requiere un medio más sensible para detectarlos. (Hugh y Leifson, 1953; MacFaddin, 2000).

f) Agar nitrato

Este medio se utiliza para aislar bacterias gram negativas aerobias o anaerobias facultativas para realizar la prueba de reducción de nitratos a nitritos, la cual es una capacidad metabólica de los microorganismos para sustraer oxígeno del nitrato y formar nitritos.

Los nitritos son incoloros y reaccionan con agentes como el ácido sulfanílico y el α -naftil amina con la formación de un compuesto color rojo. En una reacción positiva los microorganismos reducen los nitratos a nitritos, si la reacción es negativa los microorganismos son incapaces de reducir los nitratos. En este caso es necesario añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc, el cual reduce los nitratos a nitritos. Si se desarrolla un color rojo o anaranjado indica que los nitratos están presentes inicialmente y son reducidos por el zinc y no por la bacteria indicando una reacción negativa. Si persiste la ausencia de color, indica que los nitratos fueron reducidos a nitritos y subsecuentemente a otros compuestos por lo que la reacción es positiva. (Forbes *et al.*,1986; MacFaddin, 2000)

g) Medio de SIM

Es un medio semisólido que sirve para verificar la movilidad, la producción de indol y de sulfuro de hidrogeno, en un mismo tubo. Es útil para diferenciar miembros de la familia de *Enterobacteriaceae*. El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas y particularmente de la tripteína que puede ser oxidada por algunas bacterias para formar indol. En el proceso intervienen un conjunto de enzimas llamado triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de kovac's o de Erlich, para originar un compuesto color rojo. La movilidad se verifica por la turbidez que producen los microorganismos al crecer fuera del área de siembra. Por último, la producción de sulfuro de

hidrogeno forma un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio mantenga un pH mayor a 7.2. (MacFaddin, 2000)

III.- MATERIALES Y METODOS

3.1 Maíces criollos

Se tomaron muestras de plantas de maíces criollos de localidades de Michoacán, Celaya, Torreón y Guadalajara. Las localidades de Michoacán fueron Pátzcuaro, Cuanajo, Zirahuen, Nahuatzen y Aranza.

3.1.2 Equipo, Material de laboratorio y reactivos

- Incubadora
- Campana de flujo laminar con luz ultravioleta
- Microscopio óptico compuesto
- Refrigerador
- Ultracongelador
- Potenciómetro
- Espectrofotómetro de absorción de masas
- Medio de cultivo NFB
- Medio de cultivo LGI
- Medio de cultivo JMV
- Agar
- Agar nutritivo
- Medio de cultivo Rojo Congo NFB
- Medio de cultivo Mac Conkey
- Medio de cultivo SIM
- KOH 10 N
- H₂SO₄ 10 M
- H₂O₂ al 30%
- Reactivo de kovac's o de Erlich
- Azul de bromotimol
- Nitrato de potasio
- ácido sulfanílico
- ácido acético 5 N

- α -naftilamina
- Manitol
- Fosfato monobásico de potasio
- Fosfato dibásico de potasio
- Sulfato de magnesio
- Cloruro de sodio
- Cloruro de calcio
- Fe-EDTA
- ZnSO₄
- MnCl₂
- HBrO₃
- CoCl₂ x 6H₂O
- CuCl₂ x 2H₂O
- NiCl₂ x H₂O
- Na₂MoO₄ x 2H₂O
- Riboflavina
- Tiamina
- Acido nicotínico
- Piridoxina
- Pantotenato de calcio
- Biotina
- Ácido fólico
- Vitamina B12
- Acido málico
- Sacarosa
- Tripona
- Extracto de carne
- Peptona
- NH₄F 0.03N
- HCl concentrado

- Ácido ascórbico
- Fosforo
- $K_2Cr_2O_7$ 1N
- Difenildiamina
- $FeSO_4$ 1N
- Rojo Congo
- Etanol concentrado
- Caldo nutritivo
- Glicerina
- Tinción de gram
- $SnCl_2$

3.2 Aislamiento de bacterias benéficas para el maíz

Para el aislamiento de bacterias benéficas para el maíz se utilizó como base la técnica descrita por (Jhaa *et al.*, 2009). La cual consiste en lo siguiente: De cada planta de maíz forrajero se pesaron 0.5 g de raíces, se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de suelo, en seguida se colocaron con solución salina estéril en agitación por 25 minutos. Posteriormente se hicieron diluciones con agua destilada estéril donde se tomó 0.1 ml en 10 ml de solución salina estéril y se inoculó la dilución 10^{-5} en los siguientes medios semisólidos selectivos para microorganismos fijadores de nitrógeno: JMV, LGI y NFB (paso #1), cuya preparación se describe en el Anexo 1 Composición de medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Después se incubaron a 30°C por cinco a diez días hasta observar la formación de “velo” debajo de la superficie del medio, la cual fue característica del crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno en este medio que es comúnmente utilizada para aislar rizobacterias (Martínez *et al.*, 2003; Tejera *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2006). El paso #2 consistió en resembrar nuevamente en medio semisólido e incubar a 30 C° durante tres a cinco días hasta observar la formación de velo. Enseguida el paso #3 en el cual se resembraron los microorganismos a medio sólido, con una varilla de vidrio

estéril, además se realizaron diluciones donde se tomó 0.1 ml de medio en 10 ml de agua destilada estéril y de la dilución 10^6 y 10^7 se sembraron en placa depositando 100 μ L en la placa y dispersándolo con una varilla de vidrio. Se incubaron las placas a 30 °C por cinco a siete días, después de los cuales se analizó morfología macroscópica, microscópica y se realizaron pruebas bioquímicas para identificar el género de la bacteria aislada que se analizaran a más detalle en la sección de identificación. A continuación el paso #4 fue resembrar en medio semisólido nuevamente y se incubó a 30°C por tres a cinco días hasta observar la formación de velo. Enseguida en el paso #5 se llevó a cabo la resiembra en placas de medio sólido agar rojo Congo NFB según (Rodríguez, 1982) cuya composición se muestra en el Anexo 1.6.-Composición de medio Agar rojo Congo NFB, para lo cual se realizaron diluciones con agua destilada estéril y de la dilución 10^6 y 10^7 se sembraron en placa depositando 100 μ L en la placa y dispersándolo con una varilla de vidrio. Se incubaron las placas a 30°C por cinco a siete días, después de los cuales se analizó morfología macroscópica y microscópica y se realizaron pruebas bioquímicas para identificar el género de la bacteria aislada que se analizaran a más detalle en la sección de identificación. Estas pruebas se hicieron para comprobar que no hubiera contaminación y que la bacteria aislada coincidía con la cepa en los pasos anteriores. Posteriormente en el paso #6 se sembraron dichas bacterias a caldo nutritivo y se incubaron por dos a siete días a 30°C. Por último en el paso #7 se mezclaron con glicerina al 40%, en una mezcla de caldo/glicerina (4:1) y se almacenaron en un ultracongelador a -75°C a -80°C.

3.3 Identificación de cepas aisladas

Para llevar a cabo la identificación de cepas se analizó la morfología macroscópica y microscópica de los cultivos en placa de paso #3 medio sólido y paso #5 Agar rojo Congo NFB. Para realizar la descripción de la morfología macroscópica se observaron las siguientes características para cada cepa: Tamaño, forma, margen, propiedades ópticas, elevación, textura, pigmento. Para la morfología microscópica se utilizó la tinción de gram. (MacFaddin, 2000)

3.3.1 Pruebas bioquímicas

A las bacterias aisladas se realizaron pruebas bioquímicas para complementar su caracterización: Filancia, catalasa, oxidasa, agar Mac conkey, medio basal (OF), agar nitrato, medio de SIM. A continuación se describe su preparación, modo de empleo e interpretación. Los componentes de los medios de cultivo SIM, Mac conkey y agar nitrato se describen en el anexo 1 “composición de medios de cultivo y pruebas bioquímicas”

a) Filancia

- 1) Colocar sobre un portaobjetos una gota de KOH al 3%
- 2) Suspender una asada de cultivo a partir de medio sólido y homogenizar.
- 3) Elevar el asa para formación de hilo viscoso que se interpreta como prueba positiva (gram negativo), como se muestra en Figura 1.- Prueba de la filancia; por el contrario sin la formación de hilo viscoso se interpreta como prueba negativa (gram +)

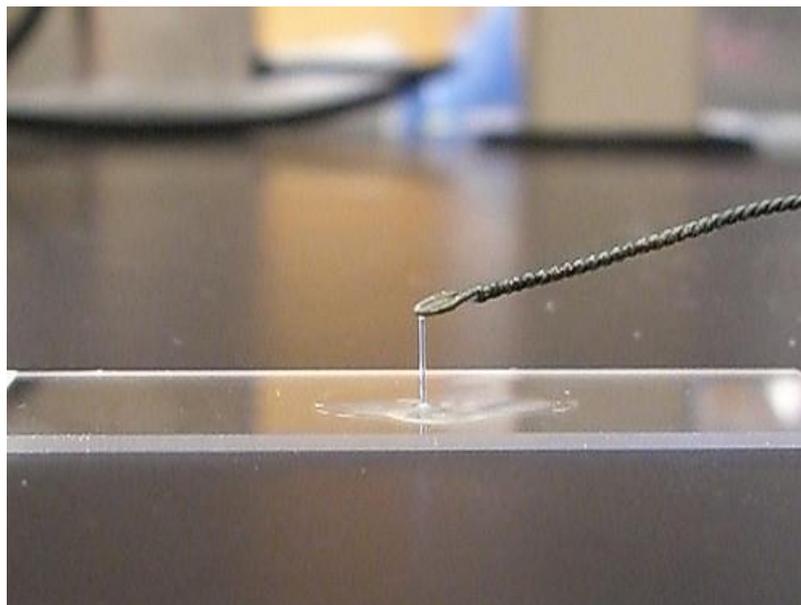


Figura 1.- Prueba de la filancia

b) Catalasa

- 1) Con el asa de siembra recoger del centro de la colonia y colocar sobre un portaobjeto
- 2) Agregar una gota de H_2O_2 al 30% sobre el microorganismo
- 3) Observar la formación de burbujas lo cual indica un resultado positivo, como se muestra en la Figura 2.- Prueba de la catalasa.

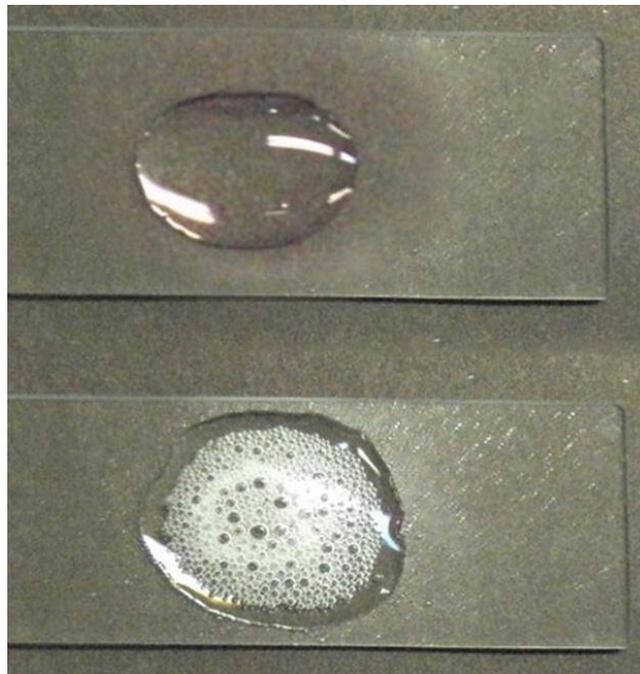


Figura 2.- Prueba de la catalasa

c) Oxidasa

Para realizar la prueba se colocan cuadros de papel filtro estéril en una caja petri o portaobjetos, se humedecen con el reactivo y se coloca una asada de la colonia, hay que trabajar rápidamente un color azul oscuro indicara prueba positiva, ausencia de color indicara prueba negativa como se muestra en Figura 3.- Prueba de la oxidasa.



Figura 3.- Prueba de la oxidasa

d) Agar Mac Conkey

El medio se prepara de la siguiente manera: suspender 50 g del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Dejar reposar de 10 a 15 minutos calentar suavemente agitando frecuentemente y hervir por un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y vaciar en placas. Se siembra una asada del cultivo y se esteriliza a 30°C durante 24 a 48 horas. Las colonias lactosa negativas son incoloras, mientras que las lactosa positivas son rojas con un halo turbio debido al descenso de pH provocado por los ácidos biliares. Como se muestra en la Figura 4.-Desarrollo bacteriano en agar mac conkey



Figura 4.-Desarrollo bacteriano en agar mac conkey

e) Medio basal OF

Los ingredientes del medio se describen en el anexo 1 “composición de medios de cultivo y pruebas bioquímicas”. Para preparar el medio se mezclan los componentes, se disuelven y se calienta la mezcla hasta disolver por completo el agar. Se ajusta el pH a 6.8 y se distribuyen 3 ml en tubos pequeños. Se esteriliza a 121°C por 15 minutos. Para realizar la prueba se siembra hasta el fondo por punción, posteriormente uno de los tubos se sella con aceite mineral estéril, se incuban a 30°C por 7 días. La reacción positiva se logra al observar un color amarillo, mientras que la reacción negativa se relaciona con un color verde y se interpreta como lo describe el Cuadro 1.-Interpretacion de la prueba de Oxidación reducción (OF) y se muestra en la figura 5.-Desarrollo bacteriano en agar medio basal OF.

Cuadro 1.-Interpretacion de la prueba de Oxidación reducción (OF)

Tubo abierto	Tubo sellado	Metabolismo
Amarillo	Verde	Oxidativo
Amarillo	Amarillo	Fermentativo
Verde	Verde	No oxidativo



Figura 5.-Desarrollo bacteriano en agar medio basal OF

f) Agar nitrato

A la cepa aislada se agregó una gota ácido sulfanilico y otra del α -naftil un color rojo o naranja índico reacción positiva. Si no hubo cambios de color se añadió trazas de polvo de zinc, si hubo la reacción es negativa, si permaneció sin cambios nuevamente la reacción es positiva, como se muestra en la Figura 6.-

Prueba positiva para el medio de agar nitrato. Para preparar el medio se mezclan los ingredientes y se calienta hasta fundir el agua, se ajusta el pH a 7. Posteriormente se distribuye en tubos. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.



Figura 6.-Prueba positiva para el medio de agar nitrato

g) Medio de SIM

Para preparar el medio se suspenden 30 g en un litro de agua destilada, se mezcla hasta disolver, calentando y agitando constantemente, se hierve por un minuto. Posteriormente se distribuye en tubos pequeños y se esterilizan a 121 °C por 15 minutos. Para realizar la prueba se toma una asada de la colonia y se siembra por punción profunda con asa recta en el centro del tubo, con 2/3 de profundidad del medio de cultivo. Se incuba de 18 a 24 horas a 37 °C. Un color oscuro en el área de siembra o en todo el medio de cultivo es una evidencia de la producción de SH_2 , el color rojo es indicativo de una prueba positiva para la producción de indol y desarrollo fuera del área de siembra es señal de motilidad positiva, como se muestra en figura 7.-Prueba positiva para el medio de SIM



Figura 7.- Prueba positiva para el medio de SIM

3.4 Análisis de suelos

Se realizó análisis del suelo de las localidades en cuanto al pH, fósforo, potasio, materia orgánica, textura. El cual se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Aguilar *et al.* (1987); Fuentes *et al.* (1989); Carter (1993); Bashan *et al.* (1995).

a) pH

Se pesó 20 g de suelo seco al cual se le agregaron 40 ml de agua destilada, se mezclaron durante 30 minutos y se tomó la lectura de pH en el potenciómetro.

b) Fósforo

Se pesó 2.5 g de suelo a los cuales se le agrego 20 ml de una solución conformada por NH_4F 0.03N y 2.1 ml HCL concentrado, se agito por 5 minutos

y se filtró. Se tomó una muestra de 5ml y se mezcló con 30 ml de agua destilada. A esta solución se le agregó 5 ml de una solución de molibdato de amonio y ácido ascórbico al 0.5%. Esta mezcla se aforó a 50 ml con agua destilada y se mezcló. Después de 30 minutos de agregado el reductor se leyó la absorbancia a 882 nm en el espectrofotómetro. Se realizó una curva con una solución patrón de 2 ppm de fósforo para calcular la concentración de fósforo en la muestra.

c) Potasio

Se pesó 2.5 g de suelo, se mezcló con 50 ml de bicarbonato de sodio y 2.5 g de carbón activado. Después se agitó por 30 minutos en un agitador automático, posteriormente se filtró, del filtrado se tomaron 20 ml, se mezclaron con 10 ml de molibdato de amonio, se aforó a 100 ml y se agregó una gota SnCl_2 . Después de mezclar se tomó la lectura a 660 nm de absorbancia en el espectrofotómetro. Se utilizó la misma mezcla sin muestra como blanco.

d) Materia orgánica

Se pesó 1 g de suelo al cual se le agregó 10 ml de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1N y 10 ml de H_2SO_4 concentrado y dejar reposar 30 minutos. Posteriormente se agregaron 200 ml de agua destilada y 8 gotas de difenildiamina, se agito hasta que la muestra tomo un color café o rojo ladrillo y se tituló con FeSO_4 . Se anotan los ml de FeSO_4 gastados. Para obtener el punto de vire final se preparó un blanco con agua destilada, 10 ml de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1N y 10 ml de H_2SO_4 concentrado.

e) Textura

Se pesó 150 g de suelo a los cuales se le agregaron 150 ml de agua, la mezcla se calentó y se añadió 50 ml de peróxido de hidrógeno, se calentó por 5 minutos. Posteriormente la mezcla se pasó a una probeta, a la cual se le agregó agua hasta alcanzar 450 ml, después de una hora se mide la distribución de arena, limo y arcilla. Con el triángulo de textura se determinó el tipo de suelo.

IV.-RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Aislamiento e Identificación de bacterias de Michoacán

Para cada localidad se procesaron dos muestras las cuales se denominaron A y B éstas demostraron crecimiento en forma de velo en los medios NFB, LGI y no hubo crecimiento en JMV excepto en las localidades de Aranza y Cuanajo (Cuadro 2.-Cepas aisladas e identificadas de Michoacán parte 1 y Cuadro 3.- Cepas aisladas e identificadas de Michoacán parte 2). Para estas cepas se analizó la morfología macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas. La gran mayoría de las bacterias fijadoras de nitrógeno crecen en forma de “velo” debajo de la superficie de los medios semisólidos descritos para su aislamiento JMV, NFB y LGI (Doebereiner, 1995; Jhaa *et al.*, 2009). Este crecimiento se muestra en la Figura 8.-Crecimiento en forma de velo en medios semisólidos JMV, NFB y LGI” y figura 9.- Crecimiento en forma de velo acercamiento.



Figura 8.-Crecimiento en forma de velo en medios semisólidos JMV, NFB y LGI

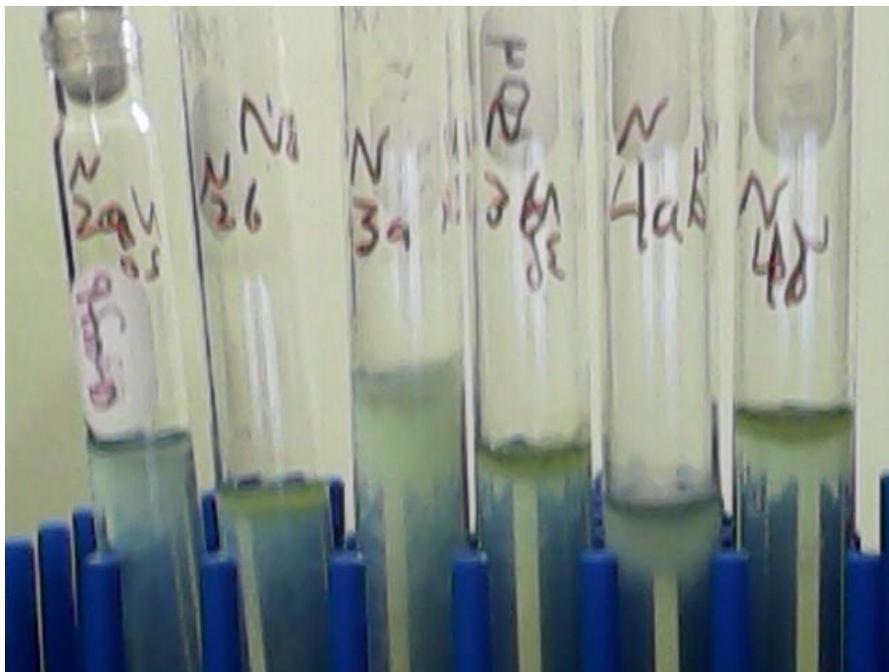


Figura 9.- Crecimiento en forma de velo acercamiento

Al revisar el desarrollo de los microorganismos en medios semisólidos coinciden con esta descripción. Posteriormente en medio sólido se revisó la morfología macroscópica la cual se describe a detalle en el anexo 2.-Morfología macroscópica de las bacterias aisladas en medio sólido (JMV, LGI y NFB) y en el anexo 3.-Morfología macroscópica de las bacterias aisladas en medio rojo Congo NFB.

Para las cepas 1, 8,18, 40, 41 se observaron colonias puntiformes, color rosa, con borde entero y elevación convexa junto con las pruebas bioquímicas (Cuadro 4.- Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Michoacán parte 1 y Cuadro 5. Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Michoacán parte 2) presentan pruebas características del género *Pseudomonas* sp. como bacilo gram (-), metabolismo no oxidativo y catalasa (+) (Whitman *et al.*, 2012).

Con el mismo seguimiento para las cepas 3,10, se obtuvieron los mismos resultados para las pruebas bioquímicas: Coco gram (+), con desarrollo de cepas color morado, lactosa (+), catalasa (+) y mediante la morfología de las

cepas crecidas en agar rojo Congo (colonia circular, elevación plana, borde entero, y color rojo, es probable que se cuente con una bacteria del genero *Azotobacter sp* (Holt *et al.*, 2000).

Cuadro 2.-Cepas aisladas e identificadas de Michoacán parte 1

Localidad	Medio	#Cepa	Nombre	Identificación
Nahuatzen	NFB	1	AN212 crema	<i>Psuedomonas</i>
Nahuatzen	NFB	2	BN222 crema	<i>No identificada</i>
Nahuatzen	LGI	3	AL212 amarilla	<i>Azotobacter</i>
Nahuatzen	LGI	4	AL212 crema	<i>No identificada</i>
Nahuatzen	LGI	5	BL122 crema	<i>No identificada</i>
Pátzcuaro	NFB	6	AN2 blanca	<i>Clostridium</i>
Pátzcuaro	NFB	7	AN2 amarilla	<i>Clostridium</i>
Pátzcuaro	NFB	8	AN2 verde	<i>Pseudomonas</i>
Pátzcuaro	LGI	9	AL1 amarilla	<i>No identificada</i>
Pátzcuaro	NFB	10	BN1 Blanca	<i>Azotobacter</i>
Pátzcuaro	NFB	11	BN1 verde	<i>No identificada</i>
Pátzcuaro	LGI	12	BL1 blanca	<i>No identificada</i>
Aranza	LGI	13	AL2 Blanca	<i>Azospirillum</i>
Aranza	LGI	14	AL2 amarilla	<i>No identificada</i>
Aranza	NFB	15	AN1Blanca	<i>Azospirillum</i>
Aranza	NFB	16	AN1amarilla	<i>Xanthobacter</i>
Aranza	NFB	17	AN1acua	<i>Azospirillum</i>
Aranza	JMV	18	AJ1 amarillo	<i>Pseudomonas</i>
Aranza	JMV	19	AJ1 crema	<i>No identificada</i>
Aranza	LGI	20	BL1 Blanca	<i>No identificada</i>
Aranza	LGI	21	BL1 amarilla	<i>No identificada</i>
Aranza	NFB	22	BN1 Blanco	<i>Azospirillum</i>
Aranza	NFB	23	BN1 Crema	<i>Azospirillum</i>
Aranza	JMV	24	BJ1 crema	<i>Azospirillum</i>
Aranza	JMV	25	BJ1 amarillo	<i>No identificada</i>
Cuanajo	NFB	26	AN1 Blanca	<i>Azospirillum</i>
Cuanajo	NFB	27	AN1 crema	<i>No identificada</i>

Cuadro 3.-Cepas aisladas e identificadas de Michoacán parte 2

Localidad	Medio	#Cepa	Nombre	Identificación
Cuanajo	NFB	28	AN1 Verde	<i>No identificada</i>
Cuanajo	JMV	29	AJ1 crema	<i>No identificada</i>
Cuanajo	NFB	30	BN1 crema	<i>Azospirillum</i>
Cuanajo	NFB	31	BN1 acua	<i>Azospirillum</i>
Cuanajo	LGI	32	BL1 crema	<i>No identificada</i>
Cuanajo	JMV	33	BJ2 blanca	<i>Azospirillum</i>
Zirahuen	NFB	34	AN1 Blanca	<i>No identificada</i>
Zirahuen	NFB	35	AN1 Naranja	<i>No identificada</i>
Zirahuen	LGI	36	AL2 Filiforme	<i>Acetobacter</i>
Zirahuen	LGI	37	AL1 filiforme	<i>No identificada</i>
Zirahuen	LGI	38	BL1 Blanca	<i>Acetobacter</i>
Zirahuen	NFB	39	AN2 Blanca	<i>No identificada</i>
Zirahuen	NFB	40	AN2 Naranja	<i>Pseudomonas</i>
Zirahuen	NFB	41	BN4 blanca	<i>Pseudomonas</i>
Zirahuen	NFB	42	BN3 naranja	<i>Clostridium</i>
Zirahuen	LGI	43	AL2 blanca	<i>No identificada</i>
Zirahuen	LGI	44	BL1 filiforme	<i>No identificada</i>
Zirahuen	LGI	45	BL1 crema	<i>Clostridium</i>
Zirahuen	LGI	46	AL2 verde	<i>No identificada</i>
Zirahuen	LGI	47	BL2 crema	<i>No identificada</i>
Zirahuen	LGI	48	BL2 blanca	<i>No identificada</i>
Zirahuen	LGI	49	AL1 amarilla	<i>Clostridium</i>

Al revisar la morfología y pruebas bioquímicas (Cuadro 4.- Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Michoacán parte 1 y Cuadro 5. Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Michoacán parte 2) se observó que las cepas 6,7, 42, 45 y 49 presentan una pigmentación rosa en agar rojo Congo NFB, un margen entero, una elevación plana, un coco gram (+) con un metabolismo no oxidativo y resultados negativos para las pruebas de catalasa, oxidasa, la movilidad y positiva para nitratos las cuales podrían representar la presencia de *Clostridium* sp. (Whitman *et al.*, 2012). Haciendo el

mismo seguimiento para la cepas 13, 15, 17, 22, 24, 26, 30, 31 y 33 (Cuadro 4.- Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Michoacán parte 1 y Cuadro 5. Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Michoacán parte 2) se observó que las cepas presentan una pigmentación rosa en agar rojo Congo NFB, forma circular, margen entero, elevación plana, como se muestra en la figura 10.-Crecimiento en agar rojo Congo NFB, además de presentar una morfología microscópica de bacilo gram (-) con un metabolismo fermentativo y resultados positivos para las pruebas de nitratos, catalasa, oxidasa y la movilidad, así como una prueba negativa para lactosa y crecimiento en Mc conkey las cuales podrían representar la presencia de *Azospirillum* sp. (Bacilio *et al.*, 2003). Aunque la prueba de movilidad es positiva en la mayoría de las cepas de *Azospirillum* sp y es útil para su identificación como una prueba secundaria, las cepas no móviles se unen más rápidamente a las raíces de la planta (Van y Heijnen, 1994). Estos resultados también podrían representar la presencia de *Azospirillum* sp.

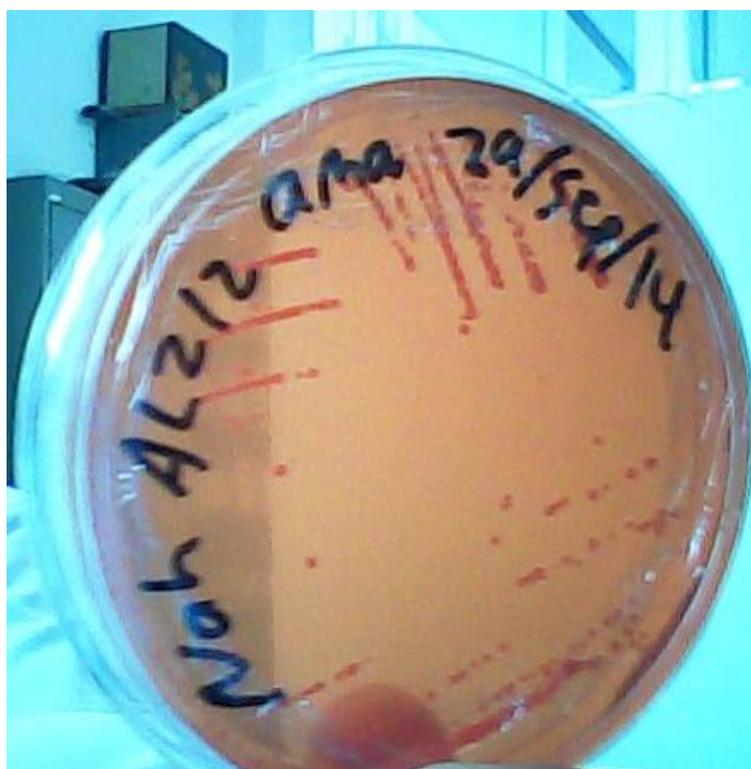


Figura 10.- Crecimiento en agar rojo Congo NFB

Para la cepa 16 revisando el cuadro anteriormente mencionado, presentan una cepa con pigmentación blanca en agar rojo Congo NFB, un forma circular, con margen entero, una elevación plana, bacilo gram (-) con un metabolismo oxidativo y resultados positivos para las pruebas de nitratos, catalasa, oxidasa, negativo para lactosa, crecimiento en Agar Mc conkey para la movilidad, las cuales podrían representar la presencia de *Xanthobacter sp.* (Whitman *et al.*, 2012)

Al observar la morfología macroscópica y las pruebas bioquímicas de las cepas 36 y 38 (Cuadro 4.- Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Michoacán parte 1 y Cuadro 5. Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Michoacán parte 2) se observó que la cepas presentaron una pigmentación rosa en agar rojo Congo NFB, forma irregular, margen entero, con elevación acuminada, bacilo gram (-) con un metabolismo oxidativo y resultados negativos para las pruebas de nitratos, catalasa, oxidasa y movilidad, prueba positiva para lactosa y crecimiento en Mc conkey podrían representar la presencia de *Acetobacter sp.* (Whitman *et al.*, 2012).

Cuadro 4.- Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Michoacán parte 1

Cepa	Localidad	M	SH ₂	In	Met	MC	L	N	O	C	G	F
1	Nahuatzen	+	-	-	NO	-	-	-	+	+	B-	-
2	Nahuatzen	-	+	-	F	NR	-	-	-	+	C+	-
3	Nahuatzen	-	-	-	O	+	+	-	+	+	C+	+
4	Nahuatzen	-	-	-	NO	+	+	-	-	+	C+	+
5	Nahuatzen	-	+	-	NO	+	+	+	+	+	C+	+
6	Pátzcuaro	-	-	-	NO	I	-	+	-	-	C+	-
7	Pátzcuaro	-	-	-	NO	NC	-	+	-	-	B+	-
8	Pátzcuaro	-	+	-	NO	I	-	-	+	+	B+	-
9	Pátzcuaro	-	-	-	NO	I	-	-	+	+	C-	-
10	Pátzcuaro	-	-	-	NO	R	+	+	-	+	C-	-
11	Pátzcuaro	-	+	-	NO	I	-	+	+	+	C-	-
12	Pátzcuaro	+	+	-	F	R	+	-	+	+	C-	+
13	Aranza	+	-	-	F	I	-	+	+	+	B-	-
14	Aranza	-	-	-	O	I	-	-	+	+	C-	-
15	Aranza	-	-	-	O	I	-	+	+	+	B-	+
16	Aranza	-	-	-	O	I	-	+	+	+	B-	+
17	Aranza	-	-	-	O	I	-	+	+	+	B-	+
18	Aranza	-	-	+	O	R	+	+	+	+	B-	-
19	Aranza	+	-	-	O	I	-	+	-	-	C-	-
20	Aranza	-	+	-	F	I	-	+	+	+	C+	+
21	Aranza	-	-	-	NO	R	+	-	+	+	C+	-
22	Aranza	+	+	-	O	I	-	+	+	+	B+	+
23	Aranza	-	-	-	O	I	-	+	+	+	B+	+
24	Aranza	+	-	-	O	I	-	+	+	+	B+	+
25	Aranza	-	-	+	NO	I	-	-	-	+	C+	+
26	Cuanajo	-	+	-	O	I	-	+	+	+	B+	-
27	Cuanajo	-	-	-	NO	NC	-	+	+	+	C+	+

M= motilidad, SH₂ = Sulfuro de hidrogeno, In= Indol, Met = Metabolismo, Mc= Agar Mac Conkey, L= Lactosa, N= Nitratos, O= Oxidasa, C= Catalasa, G= Gram, F= Filancia, NO= No oxidativo, oxidativo, F= Fermentativo, I= incolora, R= Roja, NC= No crecimiento, B= bacilo, C= Coco, E= Esporas.

Cuadro 5. Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Michoacán parte 2

Cepa	Localidad	M	SH ₂	In	Met	MC	L	N	O	C	G	F
28	Cuanajo	-	-	-	NO	I	-	+	+	+	B+	+
29	Cuanajo	-	-	-	NO	NC	-	+	-	-	B-	-
30	Cuanajo	+	+	-	O	I	-	+	+	+	B+	+
31	Cuanajo	-	-	-	O	I	-	+	+	+	B+	+
32	Cuanajo	-	-	-	F	R	+	+	+	+	B-	+
33	Cuanajo	-	+	-	F	I	-	+	+	+	B+	+
34	Zirahuen	-	-	-	NO	R	+	-	-	-	B-	-
35	Zirahuen	-	-	-	O	I	-	-	-	-	B-	-
36	Zirahuen	-	-	-	O	R	+	-	-	-	B-	-
37	Zirahuen	+	-	-	F	R	+	-	-	-	E	-
38	Zirahuen	+	-	-	O	R	+	-	-	+	B-	-
39	Zirahuen	+	-	-	NO	R	+	+	+	-	B-	-
40	Zirahuen	-	-	-	NO	I	-	-	+	-	B-	+
41	Zirahuen	-	-	-	NO	R	+	-	-	-	B-	-
42	Zirahuen	-	-	-	NO	I	-	-	-	-	B-	+
43	Zirahuen	+	-	-	F	I	-	-	+	-	E	-
44	Zirahuen	-	-	-	F	I	-	-	+	-	E	-
45	Zirahuen	-	-	+	NO	I	-	+	-	-	B-	-
46	Zirahuen	-	-	+	NO	R	+	+	-	-	C-	-
47	Zirahuen	-	-	-	NO	R	+	+	-	-	C+	-
48	Zirahuen	-	-	-	NO	R	+	+	-	-	E	-
49	Zirahuen	+	-	-	NO	I	-	-	+	-	B-	-

M= motilidad, SH₂ = Sulfuro de hidrogeno, In= Indol, Met = Metabolismo, Mc= Agar Mac Conckey, L= Lactosa, N= Nitratos, O= Oxidasa, C= Catalasa, G= Gram, F= Filancia, NO= No oxidativo, oxidativo, F= Fermentativo, I= incolora, R= Roja, NC= No crecimiento, B= bacilo, C= Coco, E= Esporas.

Para el resto de las cepas se demuestra que crecen en forma de velo debajo de la superficie en los medios semisólidos de NFB JMV y LGI. Sin embargo no fue posible determinar el género al no coincidir con las pruebas bioquímicas para alguna bacteria fijadora de nitrógeno según el manual de Bergey para identificación de bacterias (Whitman *et al.*, 2012).

Al revisar las cepas aisladas y sus géneros (Cuadro 2.-Cepas aisladas e identificadas de Michoacán parte 1 y Cuadro 3.-Cepas aisladas e identificadas de Michoacán parte 2) se puede observar que se aislaron 49 cepas, de las cuales se identificaron 24 a nivel de género mediante medios diferenciales tanto semisólidos como sólidos y con pruebas bioquímicas. En esta tabla se incluye la localidad, el medio selectivo para fijador de nitrógeno del cual fue aislada, la clave y el género de la bacteria, excepto las que no se obtuvo su identificación.

Como se puede observar en el análisis de suelos (Cuadro 6.- Análisis de suelos de Michoacán) la diferencia entre los tipos de suelos de las localidades analizadas, por ejemplo el pH de los suelos de Zirahuen, Nahuatzen, Pátzcuaro es muy ácido 4.90, 4.90 y 4.95 respectivamente, donde no se observa crecimiento en el medio de aislamiento JMV, en cambio los valores de pH para Cuanajo 5.31 y Aranza 6.30, en estas últimas localidades si hay crecimiento en el medio de aislamiento JMV el cual el pH = 4.2 a 4.5 es muy bajo (Jhaa *et al.*, 2009).

De las cinco localidades analizadas se aislaron e identificaron 24 cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno, esta identificación debe corroborarse en trabajos posteriores utilizando técnicas de biología molecular, además de corroborar el género de la bacteria aislada con estas técnicas se puede ampliar la identificación a nivel de especie (Magnani *et al.*, 2010; Roesch *et al.*, 2008). Los géneros identificados corresponden a rizobacterias como *Azospirillum sp*, *Azotobacter sp*, *Pseudomonas sp*, estos géneros se han utilizado asociadas a cultivos como biofertilizante para mejorar el rendimiento. (Hernández *et al.*, 2002, Reyes *et al.*, 2008; Rangel *et al.*, 2011).

Cuadro 6.- Análisis de suelos de Michoacán

Localidad	pH	P(ppm)	K (ppm)	MO	Textura%	Clasificación
Zirahuen	4.90	13.42	350	3.5	46 arena 16 arcilla 38% limo	Migajón
Nahuatzen	4.95	14.99	1190	4.75	36 arena 22 arcilla 42 limo	Migajón
Pátzcuaro	4.95	52.48	600	3.93	22 arena 36 arcilla 42 limo	Migajón arcilloso
Aranza	6.30	56.39	750	4.51	46 arena 18 arcilla 36 limo	Migajón
Cuanajo	5.31	11.85	250	4.40	20 arena 50 arcilla 30 limo	Arcilla

Ppm= partes por millón, K= potasio, MO= Materia orgánica.

4.2 Aislamiento e Identificación de bacterias de Celaya, Guadalajara y Torreón

Para los maíces criollos de Celaya y Guadalajara se procesaron dos muestras las cuales se denominaron uno y dos, mientras los de Torreón fueron cuatro muestras procesadas denominadas con números del uno al cuatro. Para Celaya se observó crecimiento en forma de velo en los medios NFB, LGI y no se observó desarrollo en JMV, para Guadalajara y Torreón hubo crecimiento de microorganismos en forma de velo en todos los medios, NFB, LGI y JMV (Cuadro 7.-Cepas aisladas e identificadas de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 1 y Cuadro 8.-Cepas aisladas e identificadas de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 2). Para estas cepas se analizó su morfología macroscópica la cual se describe a detalle en el anexo 2.-Morfología macroscópica de las bacterias aisladas en medio sólido (JMV, LGI y NFB) y en el anexo 3.-Morfología macroscópica de las bacterias aisladas en medio rojo Congo NFB. Además se analizó su morfología microscópica y pruebas bioquímicas para lograr su identificación.

El crecimiento en medios semisólidos para microorganismos fijadores de nitrógeno como los medios JMV, NFB y LGI en forma de “velo” debajo de la superficie es indicativo del desarrollo de la presencia de microorganismos fijadores de nitrógeno (Dobereiner, 1995, Jhaa *et al.*, 2009, Martínez *et al.*, 2003) Las cepas aisladas en Celaya, Torreón y Guadalajara corresponden a este tipo de desarrollo, Al observar la morfología macroscópica en medio sólido de las cepas 9, 13,20, se observaron colonias puntiformes, color rosa, con borde entero y elevación convexa, junto con las pruebas bioquímicas (Cuadro 7.-Cepas aisladas e identificadas de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 1) presentan pruebas características del género *Pseudomonas sp.* como bacilo gram (-), metabolismo no oxidativo y catalasa (+) (Whitman *et al.*, 2012).

Al observar los resultados para las pruebas bioquímicas para las cepas 14, 27, 28, 30, 32 y 38 (Cuadro 9.- Identificación bioquímica de géneros bacterianos de

Celaya, Torreón y Guadalajara parte 1 y Cuadro 10.- Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 2) como coco gram (+), lactosa (+), catalasa (+) y mediante la morfología de las cepas crecidas en medio sólido JMV, LGI o NFB color naranja, amarillo o verde acu fluorescente, es probable que se cuente con una bacteria del género *Azotobacter sp* (Holt *et al.*, 2000).

Cuadro 7.-Cepas aisladas e identificadas de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 1

Localidad	Medio	#Cepa	Nombre	Identificación
Celaya	NFB	1	AN2 Blanca	No identificada
Celaya	NFB	2	AN1 Acua	<i>Azospirillum</i>
Celaya	LGI	3	AL1 crema	<i>Azospirillum</i>
Celaya	NFB	4	BN2 blanca	No identificada
Celaya	NFB	5	BN2 amarilla	<i>Xanthobacter</i>
Celaya	NFB	6	BN2 Verde	No identificada
Celaya	LGI	7	BL1 blanca	No identificada
Celaya	LGI	8	BL1 Acua	<i>Azospirillum</i>
Guadalajara	LGI	9	GL1 blanca	<i>Pseudomonas</i>
Guadalajara	LGI	10	GL1 irregular	No identificada
Guadalajara	JMV	11	GJ1 crema	<i>Azospirillum</i>
Guadalajara	JMV	12	GJ1 puntiforme	No identificada
Guadalajara	NFB	13	GN1 rizoide	<i>Pseudomonas</i>
Guadalajara	NFB	14	GN1 amarilla	<i>Azotobacter</i>
Guadalajara	NFB	15	GN1 verde	<i>Burkholderia</i>
Guadalajara	NFB	16	GN2 Blanca	<i>Azospirillum</i>
Guadalajara	NFB	17	GN2 Crema	No identificada
Guadalajara	NFB	18	GN2 Rizoide	No identificada
Guadalajara	JMV	19	GJ2 Translucida	<i>Azospirillum</i>
Guadalajara	JMV	20	GJ2 Amarilla	<i>Pseudomonas</i>
Guadalajara	LGI	21	GL2 incolora	<i>Azospirillum</i>

Cuadro 8.-Cepas aisladas e identificadas de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 2

Localidad	Medio	#Cepa	Nombre	Identificación
Torreón	NFB	22	T1N Blanca	<i>Azotobacter</i>
Torreón	NFB	23	T1N irregular	<i>Azotobacter</i>
Torreón	LGI	24	T1L crema	<i>Azotobacter</i>
Torreón	LGI	25	T1Lpuntiforme	No identificada
Torreón	JMV	26	T1J blanca	No identificada
Torreón	NFB	27	T2N blanca	<i>Azotobacter</i>
Torreón	LGI	34	T3L rizoide	No identificada
Torreón	LGI	35	T3L crema	<i>Azospirillum</i>
Torreón	JMV	36	T3J crema	<i>Azospirillum</i>
Torreón	NFB	37	T4N amarilla	No identificada
Torreón	NFB	38	T4N irregular	<i>Azotobacter</i>
Torreón	LGI	39	T4L rizoide	No identificada
Torreón	JMV	40	T4J rizoide	No identificada
Torreón	JMV	41	T4J crema	No identificada

Para la cepas 2, 3, 8, 11, 16, 19, 21, 35 y 36 se observó que las cepas presentan una pigmentación rosa en agar rojo en medio Congo NFB, forma circular, margen entero, elevación plana, bacilo gram negativo (Rodríguez, 1982). Estas cepas presentaron un metabolismo fermentativo y resultados positivos para las pruebas de nitratos, catalasa, oxidasa y la movilidad, así como una prueba negativa para lactosa y crecimiento en Mc conkey (Cuadro 9.- Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 1 y Cuadro 10.- Identificación bioquímica de géneros

bacterianos de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 2) las cuales podrían representar la presencia de *Azospirillum* sp. (Bacilio *et al.*, 2003). La prueba de motilidad es positiva en la mayoría de las cepas de *Azospirillum* sp y es útil para su identificación como una prueba secundaria, sin embargo, las cepas no móviles se unen más rápidamente a las raíces de la planta (Van y Heijnen, 1994). Estos resultados también podrían representar la presencia de *Azospirillum* sp. Para la cepa 15 se observó una cepa con pigmentación roja en agar rojo Congo NFB, forma filamentosa, margen filamentosa, con elevación convexa, bacilo gram (-) con un metabolismo no oxidativo y resultados negativos para las pruebas de oxidasa, catalasa, movilidad, lactosa y crecimiento en Mc conkey y positivo para la prueba de nitratos (Cuadro 9.- Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 1); estas pruebas podrían representar la presencia de *Burkholderia* sp. (Caballero *et al.*, 2004). Para la cepa 5 se observó una cepa con pigmentación blanca en agar rojo Congo NFB, un forma circular, con margen entero, una elevación plana, bacilo gram (-) con un metabolismo oxidativo y resultados positivos para las pruebas de nitratos, catalasa, oxidasa, negativo para lactosa, crecimiento en Agar Mc conkey para la movilidad (Cuadro 9.-Cepas aisladas e identificadas de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 1), las cuales podrían representar la presencia de *Xanthobacter* sp. (Whitman *et al.*, 2012)

Cuadro 9.- Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 1

Cepa	Localidad	M	SH ₂	In	Met	MC	L	N	O	C	G	F
1	Celaya	-	-	-	NO	R	+	+	+	+	B+	+
2	Celaya	-	+	-	O	NC	-	+	+	+	B+	+
3	Celaya	-	+	-	O	I	-	+	+	+	B+	+
4	Celaya	+	-	-	O	NC	-	-	+	+	C-	+
5	Celaya	-	-	-	O	I	-	+	+	+	B+	+
6	Celaya	-	+	-	NO	I	-	+	+	+	C+	+
7	Celaya	+	-	-	O	R	+	+	+	-	B+	-
8	Celaya	-	+	-	O	I	-	+	+	+	B+	+
9	Guadalajara	-	-	-	NO	I	-	-	+	+	C-	-
10	Guadalajara	-	-	-	NO	R	+	+	-	+	C-	-
11	Guadalajara	-	+	-	NO	I	-	+	+	+	C-	-
12	Guadalajara	+	+	-	F	R	+	-	+	+	C-	+
13	Guadalajara	+	-	-	F	I	-	+	+	+	B-	-
14	Guadalajara	-	-	-	O	I	-	-	+	+	C-	-
15	Guadalajara	-	-	-	O	I	-	+	+	+	B-	+
16	Guadalajara	-	-	-	O	I	-	+	+	+	B-	+
17	Guadalajara	-	-	-	O	I	-	+	+	+	B-	+
18	Guadalajara	-	-	+	O	R	+	+	+	+	B-	-

M= motilidad, SH₂ = Sulfuro de hidrogeno, In= Indol, Met = Metabolismo, Mc= Agar Mac Conckey, L= Lactosa, N= Nitratos, O= Oxidasa, C= Catalasa, G= Gram, F= Filancia, NO= No oxidativo, oxidativo, F= Fermentativo, I= incolora, R= Roja, NC= No crecimiento, B= bacilo, C= Coco, E= Esporas.

Cuadro 10.- Identificación bioquímica de géneros bacterianos de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 2

Cepa	Localidad	M	SH ₂	In	Met	MC	L	N	O	C	G	F
19	Guadalajara	+	-	-	O	I	-	+	-	-	C-	-
20	Guadalajara	-	+	-	F	I	-	+	+	+	C+	+
21	Guadalajara	-	-	-	NO	R	+	-	+	+	C+	-
22	Torreón	+	+	-	O	I	-	+	+	+	B+	+
23	Torreón	-	-	-	O	I	-	+	+	+	B+	+
24	Torreón	+	-	-	O	I	-	+	+	+	B+	+
25	Torreón	-	-	+	NO	I	-	-	-	+	C+	+
26	Torreón	-	+	-	O	I	-	+	+	+	B+	-
27	Torreón	-	-	-	NO	NC	-	+	+	+	C+	+
37	Torreón	+	-	-	F	R	+	-	-	-	E	-
38	Torreón	+	-	-	O	R	+	-	-	+	B-	-
39	Torreón	+	-	-	NO	R	+	+	+	-	B-	-
40	Torreón	-	-	-	NO	I	-	-	+	-	B-	+
41	Torreón	-	-	-	NO	R	+	-	-	-	B-	-

M= motilidad, SH₂ = Sulfuro de hidrogeno, In= Indol, Met = Metabolismo, Mc= Agar Mac Conckey, L= Lactosa, N= Nitratos, O= Oxidasa, C= Catalasa, G= Gram, F= Filancia, NO= No oxidativo, oxidativo, F= Fermentativo, I= incolora, R= Roja, NC= No crecimiento, B= bacilo, C= Coco, E= Esporas.

El resto de las cepas presentaron crecimiento en forma de velo debajo de la superficie en los medios semisólidos de NFB JMV y LGI. Sin embargo no fue posible determinar el género al no coincidir con las pruebas bioquímicas para alguna bacteria fijadora de nitrógeno (Whitman *et al.*, 2012).

Al revisar las cepas aisladas y sus géneros (Cuadro 7.-Cepas aisladas e identificadas de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 1 y Cuadro 8.-Cepas aisladas e identificadas de Celaya, Torreón y Guadalajara parte 2) se puede observar que se aislaron 41 cepas, de las cuales se identificaron 20 a nivel de género mediante medios diferenciales tanto semisólidos como sólidos y con pruebas bioquímicas. En estos cuadros se incluye localidad, el medio selectivo para fijador de nitrógeno del cual fue aislada la cepa, la clave y el género de la bacteria, excepto las que no coincidieron con alguna bacteria fijadora de nitrógeno. Para complementar el estudio se realizó un análisis el análisis de suelos (Cuadro 11.- Análisis de suelos de Celaya, Torreón y Guadalajara) donde se muestra las condiciones que probablemente favorecieron el desarrollo de los diferentes géneros bacterianos aislados, por ejemplo el pH de Celaya es 7.54 con suelo de tipo migajón, mientras que Guadalajara 1 tiene un pH de 6.53 con un suelo de tipo migajón arcilloso y Guadalajara 2 tiene un pH 5.88 con un suelo de tipo migajón, ambos suelos ácidos. Por último se observó que las cuatro localidades en de Torreón tienen las mismas características como un pH de 8.06 y un suelo de tipo miagaron arcilloso arenoso. Estas condiciones favorecen el desarrollo de unos microorganismo por sobre otros.

Por último cabe señalar que las cepas aisladas corresponden a los géneros *Azospirillum sp*, *Azotobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Xanthobacter* y *Burkholderia* estos géneros se han utilizado asociadas a cultivos como biofertilizante para mejorar el rendimiento. (Hernández *et al.*, 2002, Reyes *et al.*, 2008, Huerta *et al.*, 2011, Rangel *et al.*, 2011 y Caballero *et al.*, 2003).

Se aislaron 41 cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno de las localidades de Celaya, Torreón y Guadalajara; de las cuales se identificaron 20 cepas a nivel de género de las ocho localidades analizadas. Para confirmar el género y

conocer la especie de la bacteria aislada se recomienda realizar un análisis molecular (Jhaa *et al.*, 2009, Magnani *et al.*, 2010, Roesch *et al.*, 2008). Estas cepas pueden utilizarse en trabajos posteriores en invernadero o campo para aumentar el rendimiento en maíz en las localidades analizadas.

Cuadro 11.- Análisis de suelos de Celaya, Torreón y Guadalajara

Localidad	pH	P(ppm)	K (ppm)	MO	Textura%	Clasificación
Celaya	7.54	36.39	1030	2.23	42 arena	migajón
(1 y 2)					26 arcilla	
					32 limo	
Gdl 1	6.53	35.41	1620	81.90	36 arena	Migajón
					30 arcilla	arcilloso
					34 limo	
Gdl 2	5.88	39.65	1710	80.51	36 arena	Migajón
					26 arcilla	
					38 limo	
Torreón	8.06	40.82	1130	1.74	46 arena	Migajón
(T1 a T4)					30 arcilla	arcilloso
						arenoso
					24 limo	

Ppm= partes por millón, K= potasio, MO= Materia orgánica, Gdl= Guadalajara.

V.-CONCLUSIONES

- De las 12 localidades analizadas se aislaron 90 bacterias fijadoras de nitrógeno
- Se identificaron 45 cepas probablemente correspondientes a diferentes géneros para cada localidad como *Azospirillum sp*, *Azotobacter sp*, *Pseudomonas sp* y *Burkholderia sp*, *Clostridium sp*, *Xanthobacter sp*, *Acetobacter sp*
- Estas bacterias podrían utilizarse en estudios posteriores para aumentar el rendimiento en maíz forrajero en las localidades analizadas
- Se recomienda realizar pruebas de biología molecular para confirmar la identificación de dichas cepas.

VI-REFERENCIAS

- Aguilar, A., J. D. Etchevers, y J. Z. Castellanos. Análisis químico para evaluar la fertilidad del suelo. México: Ed. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, 1987, 217.
- Arshad, M. and W.T. Frankenberger. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Adv. Agron.* 1998, 62, 45–151.
- Bacilio-Jimenez, M., S. Aguilar-Flores, E. Ventura-Zapata, E. Pérez-Campos, E. Bouquelete y E. Zenteno. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and soil.* 2003, 249, 271-277.
- Baldani, J. I., V. L. D. Baldani, I. Seldin, and J. Dobereiner. Characterization of a herbaspirillum seropedicae gen. nov. sp. nov. A root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International journal of systematic bacteriology.* 1986, 36:86-93.
- Baldani, J.I., L. Caruso, V.L.D. Baldani, S.R. Goi, J. Dobereiner, Recent advances in BNF with non-legume plants, *Soil. Biol. Biochem.* 1997, 29, 911–922.
- Barbieri, P., T. Zanelli and E. Galli, Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 1986, 36, 87-90.
- Bashan, Y., Puente, M.E., Rodríguez, M.N., Toledo, G., Holguín, G., Ferrera, R. and Pedrin, S. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995, 61, 1938-1945.
- Bashan, Y., Holguín, G., y Ferrera, R. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra.* 1996, 14, 2, 159-194.

- Bastian, F., A. Cohen, P. Piccoli, V. Luna, R. Baraldari, R. Bottini. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*. 1998, 24, 7-11
- Beauchamp, C.O. and I. Fridovich. Isoenzymes of superoxide dismutase from wheat germ. *Biochim Biophys Acta*. 1973, 317, 50-64.
- Caballero-Mellado, J., L. Martínez-Aguilar, S. Tenorio, J. Onofre and P. Estrada-de los Santos. Characterization of plant-associated N₂-fixing Burkholderia, and their potential use in agriculture. XI Int. Mol. Plant-Microbe Interact. Congress, St. Petersburg: 2003, 80.
- Caballero-Mellado, J., L. Martínez-Aguilar, G. Paredes-Valdez and P. Estrada-de los Santos, Burkholderia unamaesp nov., a N₂-fixing rhizospheric and endophytic species, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004, 54, 1165-1172.
- Carcaño, M.G., Ferrera, D., Pérez, J., Molina, J.D y Bashan, Y. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideroforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra latinoamericana*. 2006. 24(4):439-502.
- Carter, M.R. Muestreo del Suelo y métodos de análisis. Boca Raton, Florida: Editorial Lewis, 1993.
- Cavalcante, V.A. and J.A. Dobereiner, new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*. 1988, 108, 23.
- Dalla-Santa, O. R., C. R. Soccol, P. Ronzelli, R. F. Hernández, G. L. M. Alvarez, H. S. Dalla Santa, and A. Pandey. Effects of inoculation of *Azospirillum* sp. in maize seeds under field conditions. *Food, Agriculture and Environment (JFAE)*. 2004, 2, 238-242.
- Dobbelaere, S., J. Vanderleyen, and Y. Okon, Plant growth-promotion effects of diazotrophs in the rizosphere. *Critical reviews in Plants sciences*. 2003, 22, 2, 107-149.

- Dobereiner, J., Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants, in: K. Alef (Ed.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Nannipieri. London: P. Academic. Press, 1995, 134–141.
- Döbereiner, J., A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. *Biotecnología Ciencia and Desenvolvimento - Encarte especial*, 1997, 1, 2-3.
- Farmer III, J.J., Enterobacteriaceae: introduction and identification. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, , 2003.
- Forbes, B.A., D.F. Sahn, D.F. Shan, A.S. Weissfeld, *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, ed 7, St Louis: CV Mosby, 1986,490.
- Fuentes-Yagiie, J.L., *El suelo y los fertilizantes*, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1989.
- García-Olivares, J. G.; V. R. Moreno-Medina, I.C. Rodríguez-Luna, A. Mendoza-Herrera y N. Mayek-Pérez. Efecto de cepas de *Azospirillum brasilense* en el crecimiento y rendimiento de grano del maíz. *Rev. Fitotec. México*. 2007, 30, 3.
- Gottschalk, G., *Bacterial Metabolism*, ed 2, New York: Springer-Verlag, 1986,34-35. 208-209 and 223.
- Huerta-González, A., D. J. Pérez-López, O. F. Mora, A. B. Melgarejo, F. Gutiérrez- Rodríguez, H. Romero-Salas. Respuesta de tres cultivares de maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense* bajo cuatro diferentes dosis de nitrógeno. *Ciencia Ergo sum*, 2011, 18,1.
- James, E. K., and F.L. Olivares. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 1998, 17, 1, 77–119.

- Hernández-Annía, P. R., M. Gloria, and J. L. Santander. Estudio de algunos géneros microbianos asociados a diferentes variedades de trigo (*triticum aestivum* L) en suelo ferralítico rojo. *Cultivos tropicales*. 2002, 23, 1, 15-20.
- Holt J., N. Krieg, P. Sneath, J. Staley y W. Stanley. *Manual de determinative bacteriology*. Ninth edition. Baltimore: Lippincot Williams and Wilkins. 2000, 787.
- Hugh, R. and E. Leifson, The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bacteriol*. 1953, 66-24.
- Jhaa, B., C. Mukund-Thakura, I. Gontiaa, V. Albrechtb, M. Stoffelsb, M. Schmidb, A. Hartmannb, Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. *European journal of soil biology*, 2009, 45, 62–72.
- Khalid, A., M. Arshad and Z. A. Zahir, Screening plant-growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat, *J. Appl. Microbiol*. 2004,96:473-480.
- Kono, Y., and I. Fridovich, Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem*. 1982, 257,10, 5751-5754.
- Kloepper, J. W., K. Lifshitz, R. M. Zablotowicz, Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in Biotechnology*, 1989, 7, 39–43.
- Kumar, B. S., y Dube H.C. Seed Bacterization with a fluorescent *Pseudomonas* for enhanced plant growth, yield and disease control. *Soil. Biol. Biochem*. 1992. 24, 539-542.
- Ley, J. D., J. Swings, and F. Gossele, Key to the genera use of the family Acetobacteraceae. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (Eds. N.R. Kreig and J.G. Holt). Baltimore, USA: Ed. Williams & Wilkins. 1984, 268.

- MacFaddin. J. F., Biochemical tests for identification of medical bacteria, 3rd ed. Baltimore Md: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- Magnani, G.S., Didonet, C.M., Cruz, L.M., Picheth, C.F., Pedrosa, F.O. and Souza, E.M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. *Genet. Mol. Res.* 2010, 9, 1, 250-258.
- Martínez, L., J. Caballero-Mellado, J. Orozco, and E. Martinez-Romero. Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). *Plant. Soil*, 2003, 257, 35–47.
- Okon, Y., *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends in Biotechnology*. 1985, 3, 223–228.
- Okon, Y. and J. Vanderleyden, Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *Features*, 1998, 63, 366-370.
- Pandey, A., E.Sharma, and L. M. S. Palni, Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim himalaya. *Soil Biol. Biochem.*, 1998, 30, 379-384.
- Peng G., H. Wang, G. Zhang, W. Hou, Y. Liu, E. Wang, Z. Tan, *Azospirillum melinissp. nov.*, a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006, 56, 1263–1271.
- Puckett, L. J., Identifying the major sources of nutrient water pollution. *Environmental Science and Technology*.1995, 408-414.
- Ramanathan, V., R. J. Cicerone, H. B. Singh and Kiehl. Trace gas trends and their potential role in climate change. *J. Geophys. Res.* 1985, 90, 5547-5566.
- Rangel-Lucio, J. A., M. N. Rodríguez-Mendoza, C. J. Ferrera-Ronald, A. E. Ramírez-Rosa, Alvarado Estefania. Afinidad y efecto de *Azospirillum sp.* en maíz. *Agronomía Mesoamericana*. 2011, 22, 2, 269-279

- Reyes-Isbelia, A. L., H. El-Ayoubi, A. Alexis. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, 2008, 20,1, 37-48.
- Rodríguez, E.A., Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ Microb.* 1982,44, 990–991.
- Roesch, L.F., F.A. Camargo, F.M. Bento and E.W. Triplett. Biodiversity of diazotrophs within the soil, root and stem of field grown maize. *Plant. Soil.* 2008, 302, 91–104.
- Stainer, R.Y., E.A. Adelberg, and J.L. Ingraham. Bacterias gram negativas: quimioheterótrofos aeróbicos. *Microbiología*. Barcelona: Editorial Reverté, S.A. 1985, 567.
- Strittmatter, C. F., Flavin-linked oxidative enzymes of *Lactobacillus casei*. *J. Biol. chem.* 1959, 234, 4, 2794-2800.
- Tejera, J., C. Lluch, M. Martínez and J. González, Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant. Soil.* 2005, 7, 223-232.
- Urquiaga, S., K. H. S. Cruz, R. M. Boddey Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Sci Soc Am J.* 1992, 56:105-11
- Valdivia, U.V., Y. J. Sánchez, C. E. Peña, B.J. Fernández, Efecto de la inoculación con *Glomus* spp y *Pseudomonas putida* en trigo. *Rev. Lat. Micro.* 1999, 41, 231-237.
- Van-Veen, J. A. and C.E. Heijnen. The fate and activity of microorganisms introduced into soil. In: *Soil biota, Management in sustainable farming systems*. C.E. Pankhurst, B.M. Doube, V.V.S.R. Gupts y P.R. Grace (eds.). CISRO, Victoria, Australia. 1994, 50-62.

Whitman, W., M. Goodfellow, M. Kamper, H. Busse, W. Ludwig, K. Suzuki,
Manual de Bergey. Manual de bacteriología sistemática. USA: Ed.
Springer Verlag, 2012

VII-ANEXOS

Anexo 1.-Composición de medios de cultivo y pruebas bioquímicas

Anexo 1.1.- Composición de medio JMV

Componentes	1000ml
Manitol	5
K ₂ HPO ₄	0.6
KH ₂ PO ₄	1.8
MgSO ₄	0.2
NaCl	0.1
CaCL ₂	0.2
Bromotimol ml	2
Solución de elementos	
traza ml	2
FE-EDTA ml	4
KOH g	4.5
Solución de vitaminas	1
Agar	2.1
pH	4.2-4.5

Anexo 1.2.- Solución de elementos traza

Componentes	mg. en 1000ml
ZnSO ₄	100
MnCl ₂	30
HBrO ₃	300
CoCl ₂ x 6H ₂ O	200
CuCl ₂ x 2H ₂ O	10
NiCl ₂ x H ₂ O	20
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	30

Anexo 1.3.- Solución de vitaminas

Componentes	mg. en 1000ml
Riboflavina	10
Tiamina	50
Acido nicotínico	50
Piridoxina	50
Pantotenato de calcio	50
Biotina	100
Ácido fólico	200
Vitamina B12	200

Anexo 1.4.- Composición de medio NFB

Componentes	1000ml
ácido málico g	5
K ₂ HPO ₄	0.6
KH ₂ PO ₄	1.8
MgSO ₄	0.2
NaCl	0.1
CaCl ₂	0.2
Bromotimol ml	2
Solución de elementos	
traza ml	2
FE-EDTA ml	4
KOH g	4.5
Solución de vitaminas	
ml	1
Agar	1.8
pH	6.5

Anexo 1.5.-Composicion de medio LGI

Componentes	1000ml
Sacarosa	5
K ₂ HPO ₄	0.6
KH ₂ PO ₄	1.8
MgSO ₄	0.2
NaCl	0.1
CaCL ₂	0.2
Bromotimol ml	2
Solución de elementos	
traza ml	2
FE-EDTA ml	4
KOH g	4.5
Solución de vitaminas	
1 ml	1
Agar	1.8
pH	6.0-6.2

Anexo 1.6.-Composicion de medio Agar rojo Congo NFB

Componente	Cantidad por litro
Ácido málico	5
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0.2
NaCl	0.1
Extracto de levadura	0.5
$FeCl_3 \times 6H_2O$	0.015
KOH	4.8
Agar	20
Solución acuosa de rojo Congo	(1:400)
pH	7

Anexo 1.7.-Composicion de medio basal OF

Componente	Cantidad (g o ml)
Glucosa	10
Triptona	2
Cloruro de sodio	5
Fosfato acido de potasio	0.3
Azul de bromotimol	0.08
Agar	2
Agua destilada	1000
pH	6.8

Anexo 1.8.-Composicion de medio Agar nitrato

Componente	Cantidad en g o mL
Peptona	2g
Extracto de carne	5g
Nitrato de potasio	0.3g
Agar bacteriológico	12g
Agua destilada	1000mL
pH final	7

Anexo 1.9.-Composicion de medio de SIM

Componentes	Cantidad
Peptona	6.1g
Sulfato de hierro y amonio	0.2g
Tiosulfato de sodio	0.2g
Agar	3.5g
pH	7.3 +/- 0.2

Anexo 2.-Morfología macroscópica de las bacterias aisladas en medio sólido (JMV, LGI y NFB)

Anexo 2.1.- Morfología macroscópica en medio solido Nahuatzen

Cepa	Tamaño mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
AN212 crema	3	Circular	Entero	Opaca	Convexa	suave	Crema
BN222 crema	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	suave	Crema
AL212 amarilla	4	Circular	Entero	Opaca	Plana	suave	Amarilla
AL212 crema	4	Circular	Entero	Opaca	Plana	suave	Crema
BL122 crema	3	circular	Entero	Opaca	Convexa	mucoide	crema

Anexo 2.2.- Morfología macroscópica medio sólido Pátzcuaro

Cepa	Tamaño mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
BN1 Blanca	1	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Blanca
BN1 verde	1	Circular	Irregular	Opaca	Convexa	Suave	Verde
BL1 blanca	2	Circular	Ondulado	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
AN2 blanca	2	Circular	Regular	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
AN2 amarilla	3	Circular	Entero	Opaca	Plana	Suave	Amarilla
AN2 verde	2	Circular	Ondulado	Opaca	Plana	Suave	Verde
AL1 amarilla	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	amarilla

Anexo 2.3.- morfología macroscópica medio sólido Aranza

Cepa	Tamaño mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
AL2 Blanca	4	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
AL2 amarilla	3	Circular	Entero	Opaca	Plana	Suave	Amarillo
AN1 Blanca	3	Circular	Ondulado	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
AN1 amarilla	4	Circular	Ondulado	Opaca	Plana	Suave	Amarillo
AN1 acua	9	Irregular	Ondulado	Opaca	Plana	Suave	Acua
AJ1 amarillo	3	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Amarillo
AJ1 crema	3	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Crema
BL1 Blanca	3	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
BL1 amarilla	3	Circular	Entero	Opaca	Plana	Suave	Amarillo
BN1 Blanco	3	Irregular	Ondulado	Opaca	Plana	Suave	Blanco
BN1 Crema	3	Circular	Ondulado	Opaca	Plana	Suave	Crema
BJ1 crema	4	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Crema
BJ1 amarillo	4	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Amarillo

Anexo 2.4.- Morfología macroscópica medio sólido Cuanajo

Cepa	Tamaño mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
AN1 Blanca	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	suave	Blanco
AN1 crema	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	suave	Crema
AN1 Verde	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	suave	Verde
AJ1 crema	3	Circular	Entero	Opaca	Convexa	suave	Crema
BN1 crema	3	Circular	Ondulado	Opaca	Convexa	suave	Crema
BN1 Acua	4	Circular	Ondulado	Opaca	Convexa	suave	Acua
BJ2 blanca	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	suave	Blanco

Anexo 2.5.- Morfología macroscópica medio sólido Zirahuen

Cepa	Tamaño mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
AL2 verde	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	blanca
BL1 crema	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	blanca
BL2 crema	2	Circular	lobulado	Opaca	Convexa	Suave	crema
BL2 blanca	2	Circular	Rizoide	Opaca	Plana	Suave	blanco
AL1 amarilla	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	convexa	Suave	crema
AL2 filiforme	3	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	crema
AL1 filiforme	4	Rizoide	Rizoide	Opaca	Plana	Suave	opaca
BL1 blanca	3	Circular	Entero	Opaca	cóncava	Suave	blanca
BL1 filiforme	6	Filiforme	Filamentoso	Opaca	convexa	Algodón	Blanca
AN1 Blanca	9	Irregular	irregular	Transparente	Plana	Suave	Incolora
AN1naranja	puntiforme	Redondo	Entero	Brillante	convexa	suave	amarilla
AN2 blanca	3	Circular	Entero	Opaca	convexa	suave	crema
AN2 naranja	puntiforme	Circular	Entero	transparente	convexa	suave	incolora
BN3 blanca	puntiforme	Circular	Entero	Opaca	convexa	suave	blanca
BN4 blanca	3	Circular	Entero	Opaca	convexa	suave	blanca
BN3 naranja	puntiforme	Circular	Entero	Opaca	convexa	suave	blanca
AL2 blanca	4	Rizoide	filamentoso	Opaca	Plana	suave	blanca

Anexo 2.6.- Morfología macroscópica medio sólido Celaya

Cepa	Tamaño mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
AN2 Blanca	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
AN1 Acua	10	Irregular	Lobulado	Opaca	Plana	Suave	Acua
AL1 crema	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Crema
BN2 blanca	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanca
BN2 amarilla	3	Irregular	Lobulado	Opaca	Convexa	Suave	Amarilla
BN2 Verde	2	Irregular	Entero	Opaca	Plana	Suave	Verde
BL1 blanca	4	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanca
BL1 Acua	6	Circular	Ondulado	Opaca	convexa	Suave	Acua

Anexo 2.7.- Morfología macroscópica medio sólido Guadalajara G1

Cepa	Tamaño mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
GL1 blanca	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
GL1 irregular	3	Irregular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
GJ1 crema	3	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Crema
GJ1 puntiforme	Puntiforme	Circular	Irregular	Opaca	Convexa	Suave	Incolora
GN1rizoide	3	Circular	Entero	Translucida	Plana	Suave	Verde
GN1 blanca	Puntiforme	circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
GN1verde	3	circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	verde

Anexo 2.8.- Morfología macroscópica medio sólido Guadalajara G2

Cepa	Tamaño mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
GN2 Blanca	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
GN2 Crema	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Crema
GN2 Rizoide	4	Irregular	Ondulado	Opaca	Acuminada	Suave	Crema
GJ2 Translucida	4	Circular	Entero	Translucida	Plana	Suave	Incolora
GJ2 Amarilla	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Amarillo
GL2 incolora	3	Irregular	Entero	Transparente	Convexa	Suave	Incolora

Anexo 2.9.- Morfología macroscópica medio sólido Torreón

Cepa	Tamaño mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
T1J blanca	2	Circular	Ondulado	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
T2J blanca	3	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Blanco
T3J crema	6	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Crema
T1N Blanca	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanca
T1N irregular	3	Irregular	Lobulado	Translucida	Plana	Suave	Crema
T1L crema	4	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Crema
T1Lpuntiforme	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Crema
T2N blanca	3	Circular	Entero	Opaca	Plana	Suave	Crema
T2N amarilla	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Amarilla
T2L rizoide	5	Filamentosa	Filamentoso	Opaca	Convexa	Suave	Blanca
T2L blanca	4	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanca
T3N amarilla	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Amarilla
T3N irregular	3	Irregular	Lobulado	Opaca	Plana	Suave	Transparente
T3L rizoide	3	Filamentosa	Filamentoso	Opaca	Convexa	Suave	Blanca
T3L crema	3	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Crema
T4N amarilla	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Amarilla
T4N irregular	3	Irregular	Lobulado	Opaca	Plana	Suave	Crema
T4L rizoide	3	Filamentosa	Filamentoso	Transparente	Plana	Suave	Blanca
T4J rizoide	4	Filamentosa	Filamentoso	Opaca	Plana	Suave	Blanca
T4J crema	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	crema

Anexo 3.-Morfología macroscópica de las bacterias aisladas en medio rojo Congo NFB

Anexo 3.1.- Morfología macroscópica Rojo Congo NFB Nahuatzen

Cepa	Tamaño mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
AN212 crema	puntiforme	Circular	Entero	Opaca	convexa	Suave	Rosa
BN222 crema	puntiforme	Circular	Entero	Opaca	convexa	Suave	Rosa
AL212 amarilla	puntiforme	Circular	Entero	Opaca	convexa	Suave	Rojo
AL212 crema	2	Circular	Entero	Opaca	convexa	mucoide	Blanco
BL122 crema	2	Circular	Entero	Opaca	convexa	Suave	Rosa

Anexo 3.2.- Morfología macroscópica Rojo Congo NFB Pátzcuaro

Cepa	Tamaño mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
AN2 blanca	1	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Tenaz	Rosa
AN2 amarilla	4	Irregular	Irregular	Transparente	Plana	Suave	Incolora
AN2 verde	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Rosa
AL1 amarilla	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	rosa
BN1 Blanca	1	Redonda	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Blanco
BN1 verde	1	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	blanco
BL1 blanca	3	Circular	Ondulado	Opaca	Convexa	Suave	Blanco

Anexo 3.3.- Morfología macroscópica medio Rojo Congo NFB Aranza

Cepa	Tamaño Mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
AL2 Blanca	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Rosa
AL2 amarilla	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Rosa
AN1Blanca	4	Circular	Ondulado	Opaca	Plana	Mucoide	Blanca
AN1amarilla	3	Circular	Entero	Opaca	Plana	Mucoide	Blanca
AN1acua	4	Circular	Ondulado	Opaca	Plana	Mucoide	Rosa
AJ1 amarillo	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Roja
AJ1 crema	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Rosa
BL1 Blanca	1	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Rosa
BL1 amarilla	1	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Rosa
BN1 Blanco	3	Circular	Ondulado	Opaca	Plana	Mucoide	Rosa
BN1 Crema	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Blanca
BJ1 crema	4	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Rosa
BJ1 amarillo	1	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Roja

Anexo 3.4.- Morfología macroscópica medio Rojo Congo NFB Cuanajo

Cepa	Tamaño Mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
AN1 Blanca	1	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Rojo
AN1 crema	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Blanco
AN1 Verde	4	Irregular	Ondulado	Opaca	Plana	Mucoide	Rosa
AJ1 crema	Puntiforme	Irregular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Rosa
BN1 crema	2	Circular	Entero	Opaca	Plana	Mucoide	Rosa
BN1 Acua	8	Irregular	Ondulado	Opaca	Plana	Mucoide	Roja
BJ2 blanca	3	Circular	Ondulado	Opaca	Convexa	Mucoide	Blanco

Anexo 3.5.- Morfología macroscópica medio Rojo Congo NFB Zirahuen

Cepa	Tamaño mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
AN1 blanca	5	Irregular	Irregular	Transparente	Plana	suave	incolora
AN1 naranja	6	Irregular	Irregular	Transparente	Plana	suave	Incolora
AL2 filiforme	2	Irregular	Entero	Opaca	Acuminada	suave	Rosa
AL1 filiforme	2	Circular	Filamentoso	Opaca	Convexa	suave	Blanca
BL1 blanca	Puntiforme	Circular	Entero	Translucida	Convexa	suave	Incolora
AN2 blanca	Puntiforme	Circular	Entero	Brillante	Convexa	suave	Rojo
AN2 naranja	Puntiforme	Circular	irregular	Transparente	Convexa	suave	Incolora
BN4 blanca	2	Circular	Irregular	Translucida	Convexa	suave	Naranja
BN3 naranja	2	Circular	Irregular	Translucida	Convexa	suave	Incolora
AL2 blanca	2	Irregular	Ondulado	Opaca	Plana	suave	Blanca
BL1 filiforme	Puntiforme	Circular	Filamentoso	Opaca	Convexa	suave	Rosa
BL1 crema	2	Irregular	Ondulado	Opaca	Plana	suave	Blanca
AL2 verde	2	Irregular	Irregular	Translucida	Plana	suave	Incolora
BL2 crema	3	Irregular	Irregular	Transparente	Plana	suave	Incolora
BL2 blanca	3	Irregular	Irregular	Transparente	Plana	suave	Incolora
AL1 amarilla	3	Irregular	Irregular	Translucida	Acuminada	suave	Rosa

Anexo 3.6.- Morfología macroscópica Rojo Congo NFB Celaya

Cepa	Tamaño Mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
AN2 Blanca	1	Irregular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanca
AN1 Acua	4	Irregular	Entero	Opaca	Plana	Suave	Blanca
AL1 crema	4	Irregular	Entero	Opaca	Plana	Mucoide	Rojo
BN2 blanca	1	Irregular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Blanca
BN2 amarilla	2	Irregular	Ondulado	Translucida	Convexa	Mucoide	Amarilla
BN2 Verde	Puntiforme	Irregular	Entero	Opaca	Convexa	Mucoide	Rosa
BL1 blanca	5	Irregular	Ondulado	Opaca	Plana	Mucoide	Roja
BL1 Acua	3	Irregular	Entero	Opaca	Plana	Mucoide	Roja

Anexo 3.7.- Morfología macroscópica medio Rojo Congo NFB Guadalajara G1

Cepa	Tamaño Mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
GL1 blanca	2	Circular	Entero	translucida	Convexa	Suave	Rojo
GL1 irregular	1	Circular	Entero	transparente	Convexa	Suave	Incolora
GJ1 crema	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
GJ1 puntiforme	Puntiforme	Circular	Irregular	Opaca	Convexa	Suave	Rojo
GN1rizoide	4	Filamentosa	filamentosa	Opaca	Convexa	Suave	Rojo
GN1amarilla	6	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	blanco
GN1verde	3	Filamentosa	Filamentoso	Opaca	Convexa	Suave	Rojo

Anexo 3.8.-Morfología macroscópica medio Rojo Congo NFB Guadalajara G2

Cepa	Tamaño mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
GN2 Blanca	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
GN2 Crema	1	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
GN2 Rizoide	Puntiforme	Circular	Entero	transparente	Convexa	Suave	Incolora
GJ2	Puntiforme	Circular	Entero	Translucida	Plana	Suave	Incolora
Translucida							
GJ2 Amarilla	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanco
GL2 incolora	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanco

Anexo 3.9.- Morfología macroscópica medio Rojo Congo NFB Torreón

Cepa	Tamaño Mm	Forma	Margen	Propiedades ópticas	Elevación	Textura	Pigmento
T1J blanca	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Rojo
T2J blanca	3	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Rojo
T3J crema	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Amarilla
T1N Blanca	Puntiforme	Circular	Entero	Transparente	Convexa	Suave	Incolora
T1N irregular	Puntiforme	Circular	Entero	Translucida	Plana	Suave	Incolora
T1L crema	Puntiforme	Circular	Entero	Translucida	Convexa	Suave	Incolora
T1Lpuntiforme	Puntiforme	Circular	Entero	Translucida	Convexa	Suave	Incolora
T2N blanca	5	Circular	Lobulado	Translucida	Plana	Suave	Incolora
T2N amarilla	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Incolora
T2L rizoide	Puntiforme	Filamentoso	Filamentoso	Opaca	Convexa	Dura	Verde
T2L blanca	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Blanca
T3N amarilla	Puntiforme	Irregular	Lobulado	Translucida	Convexa	Suave	Incolora
T3N irregular	4	Circular	Lobulado	Translucida	Plana	Suave	Incolora
T3L rizoide	Puntiforme	Filamentoso	Filamentoso	Opaca	Convexa	Dura	Rojo
T3L crema	Puntiforme	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Incolora
T4N amarilla	Puntiforme	Circular	Entero	Translucida	Convexa	Suave	Incolora
T4N irregular	Puntiforme	Circular	Entero	Transparente	Plana	Suave	Incolora
T4L rizoide	Puntiforme	Irregular	Lobulado	Transparente	Plana	Suave	Incolora
T4J rizoide	12	Circular	Filamentoso	Opaca	Plana	Dura	Rojo
T4J crema	2	Circular	Entero	Opaca	Convexa	Suave	Rojo

