

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA



Reproducción de *Azospirillum* y *Azotobacter* sp en Diferentes
Concentraciones de Extracto Acuoso de Nopal

Por:

MARIA DE LOS ANGELES AGUILAR ZAVALA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

Saltillo, Coahuila, México

Marzo 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

Reproducción de *Azospirillum* y *Azotobacter* sp en Diferentes Concentraciones
de Extracto Acuoso de Nopal

Por:

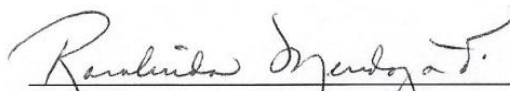
MARIA DE LOS ANGELES AGUILAR ZAVALA


TESIS

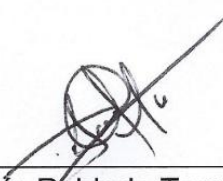
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

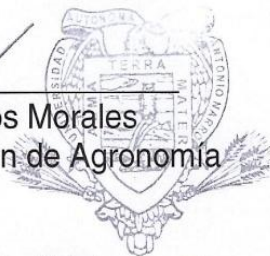
Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Asesor Principal


Dr. Marcelino Cabrera De La Fuente
Coasesor


Dr. Valentin Robledo Torres
Coasesor


Dr. Gabriel Gallegos Morales
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México
División de Agronomía

Marzo 2016

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por haberme dado las armas necesarias para seguir adelante, la capacidad de poder estudiar y la sabiduría para entender las cosas más difíciles, porque me has iluminado y guiado durante esta bonita etapa de mi vida, porque sin ti no hubiera podido salir adelante en todo momento. Tú has hecho de mi lo que hoy soy.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, que me abrió las puertas para emprender una trayectoria de conocimientos para superarme en aspectos profesionales y personales.

A **mi Familia**, por el amor, apoyo y confianza que siempre me han brindado en todos estos años de mi vida, y porque lo único que siempre les ha interesado es mi superación y felicidad, les estaré eternamente agradecida.

A la **Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal**, por su excelente disposición y apoyo dedicado a esta investigación así como la confianza y sencillez mostrada durante este tiempo. ¡Muchas gracias!

Al **Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente**, por su excelente disposición y apoyo durante la realización de este trabajo, por los conocimientos, consejos y confianza que me brindó durante mi estancia en la Universidad.

Al **Dr. Valentín Robledo Torres**, por su valioso apoyo, disposición y colaboración durante la realización del trabajo.

A **T.A. Martina de la Cruz Casillas**, por apoyarme para el desarrollo del trabajo en todo momento y compartir su tiempo.

A **Rafael Pérez Cabrera** por siempre estar a mi lado durante esta investigación; por su apoyo, comprensión, paciencia, amor y dándome ánimos de fuerza y valor para seguir a delante.

A el **Dr. Armando Hernández Pérez**, por su ayuda en la elaboración de mi tesis.

A la **Ing. Claudia Borjas**, por el apoyo en la realización de la investigación.

A **todos mis amigos** de la carrera y de la Universidad, gracias por su apoyo y sobre todo por su amistad incondicional que me brindaron. Me es difícil nombrarlos a todos, pero sepan que los llevo en el corazón a cada uno de ustedes.

DEDICATORIA

En especial a mis padres:

Alfredo Aguilar Bravo y Engracia Zavala Zamarripa

Dedico este trabajo con profundo amor y respeto a ellos quienes creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera y eso fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.

A mis hermanos:

Rosy, Lupita, Juan y Cony

Porque son personas a las que quiero, admiro y respeto, porque son con los que he compartido penas y alegrías en la vida, a quienes tuve como ejemplo para alcanzar mis metas y quienes espero se sientan muy orgullosos de mí, así como yo de ellos, **!ESTE LOGRO NO ES TAN SOLO MIO, SINO DE CADA UNO DE USTEDES!**

A mis sobrinos:

Mayra, Adolfo Ángel, Abel Emanuel y Diego Alexander

Quienes con su inocencia han llenado mi vida de felicidad y no solo a mí sino a toda mi familia porque con su llegada nos llenaron de alegría.

A mis abuelos:

Adolfo y Ma. De la Luz

Que aunque ya estén en el cielo sé que siempre guiaran mis pasos y permanecerán en mi corazón.

Angel y Estanislada

Quienes me han brindado su cariño y apoyo incondicional y al estar siempre al tano de mis acciones.

A mi novio **Rafael Pérez Cabrera**, que siempre me ha brindado su apoyo y amor desde el momento que llegó a mi vida, gracias a él porque con sus palabras, acciones y amor me he levantado de momentos difíciles. Te amo mi cielo.

A la maestra **Xóchitl Ruelas**, por su apoyo incondicional, por su amistad y también por los conocimientos, consejos y confianza que me brindo durante mi estancia en la universidad.

A mis amigos **Lili, Said, Manuel, Toñito y Edgardo**, por compartir momentos inolvidables, durante mi estancia en la Universidad, simplemente los recordare con mucho cariño.

A mis compañeras de cuarto **Silvia, Janine, Marisol y Edith**, que con ellas pase muchos momentos inolvidables, que siempre las recordare y estaré agradecida con dios por haberlas puesto en mi camino.

No hay secretos para el éxito. Este se alcanza preparándose,
trabajando arduamente y aprendiendo del fracaso.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|------|
| AGRADECIMIENTOS..... | I |
| DEDICATORIA | III |
| ÍNDICE DE CONTENIDO | V |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | VII |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | VIII |
| RESUMEN..... | 1 |
| I. INTRODUCCIÓN | 2 |
| Objetivos Generales | 3 |
| Hipótesis..... | 3 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA..... | 4 |
| Género <i>Azospirillum</i> | 4 |
| Clasificación Taxonómica de <i>Azospirillum</i> | 4 |
| Características del Género <i>Azospirillum</i> | 5 |
| Ventajas del uso de <i>Azospirillum</i> sp. | 5 |
| Aislamiento de <i>Azospirillum</i> | 7 |
| Identificación de <i>Azospirillum</i> | 7 |
| Distribución de <i>Azospirillum</i> | 7 |
| Efecto de <i>Azospirillum</i> en la morfología de la planta | 8 |
| Genero <i>Azotobacter</i> | 8 |
| Clasificación Taxonómica de <i>Azotobacter</i> | 9 |
| Características de <i>Azotobacter</i> | 9 |
| Ventajas del uso de <i>Azotobacter</i> sp. | 11 |
| Aislamiento de <i>Azotobacter</i> | 11 |
| Identificación de <i>Azotobacter</i> | 12 |
| Distribución de <i>Azotobacter</i> | 12 |
| Acción del <i>Azotobacter</i> en la filósfera..... | 12 |
| Efecto del <i>Azotobacter</i> sobre el rendimiento de las plantas | 13 |
| Medios de cultivo | 15 |

| | |
|--|----|
| Clasificación de los medios según Azahara, (2009): | 15 |
| Medios para el aislamiento de <i>Azospirillum</i> y <i>Azotobacter</i> | 16 |
| Aspectos generales del nopal..... | 17 |
| Descripción de la planta | 17 |
| Clasificación taxonómica del nopal..... | 19 |
| Estado actual e importancia a nivel nacional del nopal verdura | 19 |
| Hábitat del nopal..... | 19 |
| Propiedades químicas | 20 |
| Usos del nopal en México..... | 21 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 23 |
| Descripción del área experimental | 23 |
| Tratamientos estudiados | 23 |
| Medios selectivos de crecimiento | 24 |
| Preparación del medio NFB adicionado con rojo congo..... | 24 |
| Preparación del sustrato..... | 25 |
| Aislamiento | 25 |
| Identificación..... | 26 |
| Modelo estadístico..... | 26 |
| IV. RESULTADOS..... | 27 |
| V. DISCUSIÓN | 31 |
| Hipótesis..... | 31 |
| VI. CONCLUSIONES | 32 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 33 |
| VIII. APÉNDICE..... | 41 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro | Titulo | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Valor nutritivo del nopal verdura (cantidad respecto a 100 gramos de nopalitas crudos)..... | 20 |
| 2 | Clasificación de los tratamientos utilizados y con tres repeticiones cada uno..... | 23 |
| 3 | Composición del medio NFB adicionado con rojo congo (Rodríguez Cáceres, 1982)..... | 24 |
| 4 | Prueba de comparación de medias de Tukey de rizobacterias desarrolladas en medio de cultivo..... | 27 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | Titulo | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Características macro y microscópicas para Azospirillum. A. Vista macroscópica de la morfología de colonia de Azospirillum. B. Tinción Gram y forma celular de Azospirillum. C. Vista macroscópica de la tinción del polímero B-hidroxibutirato (Hernández, 2003)..... | 5 |
| 2 | Célula quística de Azotobacter sp. (Pankratz, 1995)..... | 10 |
| 3 | Cuadro 3. Efecto de las diferentes concentraciones de nopal y cepas de rizobacterias, en el segundo conteo de unidades formadoras de colonias..... | 28 |
| 4 | Efecto de las diferentes concentraciones de nopal y cepas de rizobacterias, en el tercer conteo de unidades formadoras de colonias..... | 29 |
| 5 | Efecto de las diferentes concentraciones de nopal más las diferentes cepas, en el cuarto conteo de unidades formadoras de colonias..... | 30 |

RESUMEN

La presente investigación se realizó durante el periodo Agosto - Diciembre 2015 en el laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, para estimar el crecimiento de *Azospirillum* y *Azotobacter* en extracto de nopal a diferentes concentraciones e identificar la cepa de rizobacteria que se incrementa a través de un mes. En el experimento, se inocularon cepas de *Azospirillum* spp. cepa T33T la cual fue aislada de raíces de nopal, originario de General Cepeda y *Azotobacter* spp. cepa A29A también de raíces de nopal, obtenida en Torreón, distribuidas en 16 tratamientos y 3 repeticiones, los cuales contenían la bacteria a concentración de 10^{-6} ml⁻¹ más el extracto a concentración de 0.0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5 y 5.0, las cuáles se incubaron a una temperatura de 30°C durante 15 días, enseguida cada semana durante un mes se realizaron conteos de las rizobacterias para lo que se hicieron diluciones hasta 10^{-10} ml⁻¹, esta última se sembró en cajas Petri con medio de cultivo NFB adicionado con rojo, incubándose por 24 h. Los recuentos bacterianos se realizaron en UFC ml⁻¹, la cual se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en nuestros medios de cultivo. Los datos obtenidos de esta investigación se analizaron en el paquete estadístico SAS versión 9.0 con un diseño completamente al azar con arreglo factorial, con 16 tratamientos y 3 repeticiones. Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de 5.0 g. permitió el máximo crecimiento de la bacteria y también se identificó que la cepa A29A (*Azotobacter*) tuvo mayor incremento en este sustrato a través de un mes en el sustrato de nopal.

Palabras clave: *Azospirillum*, *Azotobacter*, Nopal.

Correo Electronico; María de los Ángeles Aguilar Zavala,
angeles93_2008@hotmail.com

I. INTRODUCCIÓN

La importancia fundamental del uso de abonos orgánicos obedece a que éstos son fuente de vida bacteriana para el suelo y necesarios para la nutrición de las plantas. Los abonos orgánicos posibilitan la degradación de los nutrientes del suelo y permiten que las plantas los asimilen de mejor manera ayudando a un óptimo desarrollo de los cultivos (Byron, 2010).

Azospirillum y *Azotobacter* son considerados como géneros de rizobacteria promotoras del crecimiento vegetal más estudiados en la actualidad debido a su capacidad de mejorar significativamente el crecimiento y desarrollo, así como el rendimiento de numerosas especies vegetales agrícolas (Bashan *et al.*, 1997).

Uno de los propósitos en la actualidad es reducir el uso de fertilizantes químicos y sustituirlos por fertilizantes orgánicos y uno de los principales mecanismos propuestos es explicar cómo *Azospirillum* y *Azotobacter sp.* inoculados en las plantas influyen en el crecimiento vegetal y también se su relación con la capacidad de producir y metabolizar compuestos reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas.

El nopal verdura es una fuente importante de componentes funcionales, entre los que destaca la fibra, los hidrocoloides (mucílagos), los pigmentos (betalaínas y carotenoides), los minerales (calcio, potasio), y algunas vitaminas como la vitamina C, buscada entre otros motivos, por sus propiedades antioxidantes; Además de proteínas y lípidos (Silvestre, 2011), y estos son útiles para alimentar bacterias como *Azospirillum* y *Azotobacter*, ya que estas requieren de una fuente protéica así como también de otros elementos para crecer.

Objetivos Generales

Estimar el crecimiento de *Azospirillum* y *Azotobacter* en extracto acuoso de nopal a diferentes concentraciones.

Identificar la cepa de rizobacteria que se incrementa a través de un mes.

Hipótesis

Al menos una concentración de extracto de nopal produce el mayor incremento de *Azospirillum* o *Azotobacter*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Género *Azospirillum*

El nombre *Azospirillum* proviene del francés azote, que significa nitrógeno y del grupo *spirillum*, pequeña espiral. Su descubrimiento data del año 1925 a partir de suelo holandés, a la que primeramente se le nombro *Azotobacter spirillum* y que posteriormente se denominó *Spirillum lipoferum*. En 1978 después de sucesivos aislamientos de esta bacteria, se sugirió agrupar a estos organismos en un nuevo género al que se le llamo *Azospirillum*. Inicialmente dos especies de *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* fueron identificados basándose en diferentes morfologías y fisiologías entre varias cepas y en experimentos de homologías del ADN (Bouillant, 1998).

Eckert *et al.* (2001), mencionan que son reconocidas siete especies actualmente y las más comunes son *Azospirillum lipoferum* y *A. brasilense*. Esta bacteria es de vida libre o asociada con las raíces de los cereales, pastos y plántulas tuberosas. *Azospirillum* sp ha sido el objetivo de numerosos estudios por su capacidad de fijar nitrógeno asociado con las raíces de diversos cultivos de importancia agronómica (Dobbeleare *et al.*, 2001), son conocidas como gram negativas del grupo de las protobacterias.

Clasificación Taxonómica de *Azospirillum*

Clasificación de *Azospirillum* de acuerdo a la novena edición del Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática (Holt *et al.*, 1994).

Azospirillum pertenece al dominio: Bacteria, división: Proteobacteria, clase: Alphaproteobacterias, orden: Rhodospirillales, familia: Rhodospirillaceae, género: *Azospirillum*, especies: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. zaeae*, *A. canadense* y *A. rugosum*.

Características del Género *Azospirillum*

Tapia Hernández *et al.* (1990), mencionan que *Azospirillum* pertenece a un grupo de bacterias Gram negativas, fijador de nitrógeno, productor de fitohormonas como auxinas, giberelinas y citocininas, así como de producir sideróforos y bacteriocinas. *Azospirillum* es un habitante a menudo de la rizósfera de una amplia variedad de plantas así como en diversas regiones climáticas del mundo.

Tarrand *et al.* (1978), encontraron que las bacterias del género *Azospirillum* son ligeramente curvas y de forma bacilar, con 1μ de diámetro y de longitud de 2.1 a 3.8μ son móviles en medio líquido con un flagelo polar, en medio sólido a 30°C presenta numerosos flagelos laterales cortos y fijan el nitrógeno atmosférico.

Figura 1 Características macro y microscópicas para *Azospirillum*. A. Vista macroscópica de la morfología de colonia de *Azospirillum*. B. Tinción Gram y forma celular de *Azospirillum*. C. Vista macroscópica de la tinción del polímero B-hidroxibutirato (Hernández, 2003).



Ventajas del uso de *Azospirillum* sp.

Azospirillum pueden ser una alternativa emergente a los fertilizantes químicos inorgánicos para incrementar la fertilidad y producción de los cultivos en agro ecosistemas sustentables (Wu *et al.*, 2005).

Esta bacteria también es productora de algunos reguladores de crecimiento como auxinas, ácido indolacético (AIA), citocininas, y proteínas como poli amina, fijan nitrógeno, incrementar el crecimiento radicular, además pueden acelerar y potenciar el crecimiento de las plantas (Villegas *et al.*, 2010).

Fisher *et al.* (2007), mencionan que *Azospirillum* tiene efectos benéficos los cuales incrementan el rendimiento y la reducción de la fertilización química, incluyendo la fertilización nitrogenada que es importante para la agricultura.

Caesar *et al.* (2007), explican que la bacteria *Azospirillum* participa en la formación de los micro agregados rizosféricos, estos micro agregados son ricos en metabolitos microbianos y los que principalmente se tienen son del tipo aminoácidos y polisacáridos.

Estas bacterias contribuyen en la degradación de moléculas orgánicas de origen vegetal y animal que son fuente de carbono y energía, esto lo realizan solo al permanecer vivas durante años y reproducirse en el suelo (Rivera *et al.*, 2010).

Bare *et al.* (2005) mencionan que *Azospirillum* participa en diversos procesos del ecosistema, en los cuales se incluyen el reciclaje, solubilización, descomposición y mineralización de compuestos orgánicos y la translocación de bioproductos y elementos minerales que conllevan la movilización de los nutrientes en el ecosistema suelo planta.

Produce sideróforos y antibióticos, disuelven y mineralizan los fosfatos (Vessey, 2003), además, Bashan y Bashan (2005), encontraron que producen enzimas que solubilizan los fosfatos y los hacen más accesibles a la planta, así como factores que facilitan la absorción de oligoelementos.

En condiciones de sequía y en los climas áridos pueden formar alginatos en las raíces de las plantas y se ha demostrado que las bacterias resisten mejor en estas condiciones (Bashan y Bashan, 2005; Arzanesh *et al.*, 2010).

Aumentan la tolerancia a factores que originan estrés (Bashan y Bashan, 2005; Arzanesh *et al.*, 2010) gracias a que las plantas responden a los

mecanismos de estrés a nivel celular y molecular, limitando el crecimiento y rendimiento (Pereyra *et al.*, 2006).

Aislamiento de *Azospirillum*

Actualmente encontramos diversos estudios que nos explican sobre cómo realizar el aislamiento de *Azospirillum* a partir del suelo y raíces de plantas hospederas como por ejemplo, gramíneas, plátano, yuca y algodón. Se han encontrado diferentes tipos de medios de cultivo para su aislamiento pero el que más se emplea es el medio de cultivo NFb (medio libre de nitrógeno) con malato como fuente de carbono (Döbereiner *et al.*, 1976) y el cultivo bacteriano puro es obtenido mediante el uso del colorante Rojo Congo (Rodríguez, 1982).

Identificación de *Azospirillum*

Döbereiner, (1992) explica que existen diversas pruebas para el reconocimiento de las especies de *Azospirillum* entre ellas las bioquímicas y las inmunológicas. Algunas características que nos son útiles en la identificación rutinaria son la forma vibroide, el pleomorfismo y su movilidad en espiral

Distribución de *Azospirillum*

Esta bacteria cuenta con muy amplia distribución geográfica alrededor del mundo; pero estas son mucho más abundantes en las regiones tropicales, pero también se pueden encontrar en las regiones templadas, en regiones frías y desérticas (Peña, 2000).

El pH del suelo es muy importante en la presencia de las especies de este género. Las especies de *A. brasilense* y *A. lipoferum* son las que se encuentran en mayor abundancia en suelos con valores de pH cercanos a la neutralidad, aun cuando a pH abajo de 5 se les encuentra en forma esporádica y no lográndose su aislamiento de suelos con pH menor a 4.5 (Dobereiner, 1976).

Efecto de *Azospirillum* en la morfología de la planta

Okon y Labandera-González (1994), estudiaron las bacterias del género *Azospirillum* y nos explican que esta constituye los inoculantes más comúnmente utilizados en trigo. También encontraron que la inoculación con *Azospirillum* estimula el crecimiento de raíces, aumentando su longitud, densidad y velocidad de crecimiento.

Los efectos de la inoculación de las plantas con *Azospirillum*, se producen en los estadíos iniciales de crecimiento, en las primeras semanas después de la colonización radicular y también promueve la producción de auxinas, lo cual incrementa la tasa de crecimiento aéreo y radicular. Esto se ve reflejado en una mayor absorción de agua y nutrientes (Fallik *et al.*, 1994).

Las bacterias del género *Azospirillum* en asociaciones con los vegetales promueven el crecimiento y rendimiento de los cultivos bajo condiciones apropiadas (Okon *et al.*, 1985). Las bacterias de este género colonizan la rizósfera de plantas (Fallik y Okon, 1996), pero también se pueden encontrar libres en el suelo o en asociación con las raíces de las plantas (Burdman *et al.*, 2000; Okon y Labandera-González, 1994).

Bashan, en 1999 menciona que entre el 60 a 70 por ciento de experiencias con *Azospirillum*, muestran resultados favorables en rendimiento, oscilando los incrementos entre un 5 a un 30 por ciento. En nuestro país, trabajos pioneros encontraron incrementos de rendimiento de entre 13 y 33 por ciento (Barrios *et al.*, 1986; Rodríguez- Cáceres *et al.*, 1994).

Genero *Azotobacter*

La literatura señala que el género *Azotobacter* fue descubierto por Beijerinck en el año 1901 y desde entonces se ha desplegado mucho interés en estudiar estos organismos debido a la contribución que pueden hacer a la nutrición nitrogenada de las plantas superiores, como lo plantea Frobisher (1969) y Brown *et al.* (1992).

Martínez y Dibut (1996) mencionan que la bacteria *Azotobacter* es uno de los primeros géneros conocidos como fijadores asociativos de nitrógeno, siendo este género de los más estudiado en el ámbito mundial.

Su nombre proviene de la palabra francesa “azoto” que significa nitrógeno y del griego “bacter” que significa bacilo (Hernández *et al.*, 1994) y esos autores no explican que son microorganismos de vida libre en el suelo que requieren de sustancias orgánicas como fuente de energía, pero si hay abundancia de NO_3^- y NH_4 , lo emplean con facilidad y no fijan nitrógeno. Son bacterias gram negativas, móviles; las colonias son viscosas, convexas, lisas o arrugadas y poseen pequeñas inclusiones granulares, el color se presenta en diferentes matices de pardo, producen pigmentos que en ocasiones se difunden en el medio de cultivo selectivo para este género (Rubenchik, 1960).

Clasificación Taxonómica de *Azotobacter*

Clasificación taxonómica de las bacterias del género *Azotobacter* según Joint Genome Institute (2009) y Uniprot Consortium (2009).

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Gammaproteobacteria

Orden: Pseudomonadales

Familia: Pseudomonadaceae

Género: *Azotobacter*

Especies: *A. vinelandii*, *A. chroococcum*, *A. beijerinckii*

Características de *Azotobacter*

El género Azotobacter es una de las bacterias de vida libre y que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico y esta bacteria pertenece a la clase Gammaproteobacteria. Este género ha sido estudiado por más de cien años, por científicos de todo el mundo. *A. vinelandii* fue el organismo de experimentación de muchos investigadores durante la emergencia de la

bioquímica como una disciplina dominante en las ciencias de la vida (Setubal, 2009).

Las especies del género *Azotobacter* producen células ovoides y grandes de 1.5 a 2.0 μm de diámetro, viven generalmente en suelos y aguas frescas. Son bacterias pleomórficas, cuya morfología varía desde bacilos hasta células en forma de cocos. Se las observa como células individuales, como pares, en agregados irregulares y algunas veces cadenas de tamaño variable (Espín, 2002).

Algunas especies como *A. vinelandii* y *A. chroococum* sufren procesos como diferenciación para formar quistes resistentes a la desecación. Se mueven por flagelos peritricos; son aerobios, pero pueden crecer en concentraciones de oxígeno bajas. Algunas cepas producen pigmentos solubles o insolubles en agua (Espín, 2002).

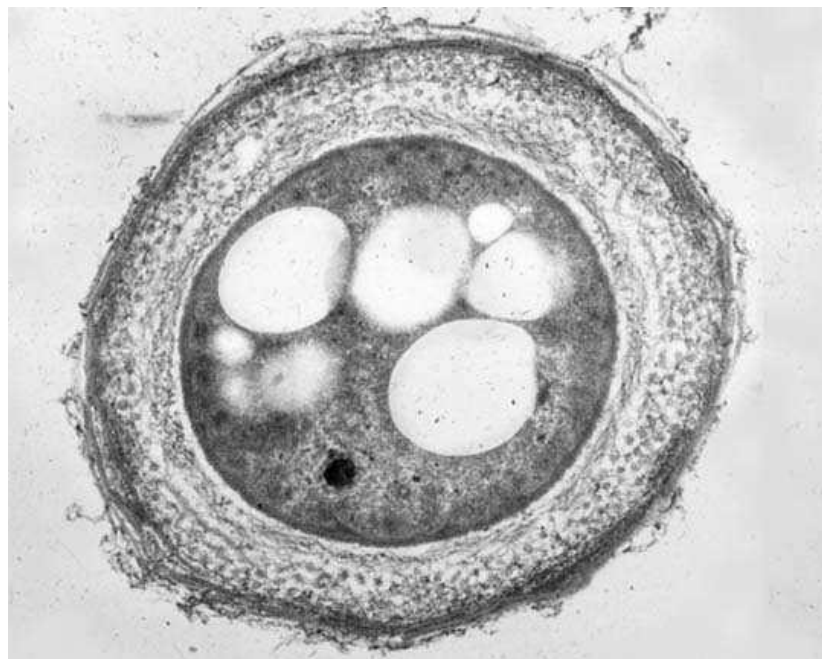


Figura 2 Célula quística de *Azotobacter* sp. (Pankratz, 1995).

Las bacterias del género *Azotobacter* son quimioorganotróficas, es decir, que utilizan azúcares, alcoholes y sales inorgánicas para crecer. Utilizan nitrato y sales de amonio y ciertos aminoácidos como fuentes de nitrógeno. Responden positivamente al reactivo catalasa (Espín., 2002).

Esta bacteria ha cautivado a científicos no sólo debido a su capacidad notable de fijar el nitrógeno, sino también porque puede hacer esto bajo condiciones atmosféricas de oxígeno (20%), en contraste con otras bacterias diazotróficas que deben fijar el nitrógeno anaerobio o microaerobicamente. Para el caso específico de *A. vinelandii*, el hidrógeno producido como subproducto de la fijación de nitrógeno se recicla de tal modo que aumenta su eficacia. Además, el ATP adicional generado vía la respiración aerobia puede utilizarlo para apoyar las altas demandas energéticas de la 18 nitrogenasa. Por lo tanto la fijación de nitrógeno aeróbico requiere una concentración de O₂ mínima. Son capaces de utilizar una gran cantidad de fuentes de carbono, como azúcares, alcoholes y sales de ácidos orgánicos, para el crecimiento. Se calcula que fijan al menos 10 mg de N₂ por gramo de carbohidrato (glucosa) consumido (Hornick *et al.*, 2007).

Ventajas del uso de *Azotobacter* sp.

- Estimula el crecimiento y una buena producción vegetal.
- Aumenta la fijación biológica de nitrógeno atmosférico.
- Solubiliza las fuentes nutritivas.
- Las raíces y pelos absorbentes se encuentran en mayor cantidad, mejor desarrollados y sin enfermedades.
- Mejora la estructura y fertilidad de los suelos.
- Reducción considerable de la aplicación de fertilizantes nitrogenados

Fuente: www.controlbiologico.com

Aislamiento de *Azotobacter*

Holt, en el 2000 explica algunos de los métodos más utilizados para aislar bacterias del género *Azotobacter* que incluyen el aislamiento en medio libre de nitrógeno, enriquecimiento en solución de Winogradsky y posterior siembra en medio libre de nitrógeno, y siembra de gránulos individuales de suelo en medio libre de nitrógeno.

Identificación de *Azotobacter*

Para la identificación bioquímica del género *Azotobacter* se emplean técnicas convencionales, las cuales se basan en la utilización de cuatro azúcares, benzoato y fenol como fuente de carbono, prueba de la catalasa, prueba de Nessler, hidrólisis de almidón y producción de ácido 3-indolacético. Estas pruebas bioquímicas se utilizan ya que permiten diferenciar el género *Azotobacter* de otras bacterias fijadoras de nitrógeno. Además se toman en cuenta las observaciones macro y microscópicas (morfología celular y de la colonia) así como pigmentación en medio para identificación preliminar (Tejera *et al.*, 2005).

Distribución de *Azotobacter*

Según Delgado *et al.* (2003) y Crum (2004), la bacteria de *Azotobacter* se encuentra en suelos alcalinos a neutros, en ambientes acuáticos y en la rizósfera de las plantas. El *Azotobacter chroococcum* es la especie más común en el suelos, además sintetiza tiamina (vitamina B-1), ácido nicotínico, ácido pantoténico y otras vitaminas capaces de estimular la germinación de las semillas, el crecimiento y desarrollo de algunas especies vegetales; siempre que sea adecuada la concentración de las bacterias en la zona de la rizósfera de la planta.

El rango de pH en el que crecen en presencia de nitrógeno combinado es de 4,8 a 8,5; el pH óptimo para crecer cuando fijan nitrógeno es de 7.0 a 7.5. Según Garassini (1967), la presencia de *Azotobacter* en el suelo está relacionada directamente con el pH del mismo, pues no se desarrollan en medios con valores por debajo de 6.0.

Acción del *Azotobacter* en la filósfera.

Debinstein (1970), menciona que de acuerdo algunos estudios realizados la abundante población microbiana que se encuentra en las hojas es por sí misma, prueba de un ambiente que posee considerable valor nutritivo; la humedad contribuye también al desarrollo y supervivencia de esta población, ofreciéndole espacio y estimulando el intercambio de productos metabólicos.

Esta propiedad y la habilidad para concentrar materia resuspendida o disuelta en la atmósfera con gran rapidez, hace que las hojas tengan una gran importancia en los agroecosistemas agrícolas (Bhat *et al.*, 1971).

La zona de crecimiento de este microorganismo se encuentra en la superficie de las hojas de las plantas como filósfera (Ruinen, 1975). Según datos reportados por Martínez *et al.*, (1999) en condiciones tropicales, ocurre también fijación de nitrógeno en la filósfera, zona que está en contacto con la hoja y la atmósfera, sometida a la actividad reguladora de ambas.

Efecto del *Azotobacter* sobre el rendimiento de las plantas

Se conoce el importante papel que desempeña el *Azotobacter* en el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluso son capaces de incrementar el rendimiento de los cultivos, los valores varían de acuerdo con la bacteria y su afinidad por el cultivo, lo que indica especificidad del microorganismo e incluso de las cepas (Larson y Neal, 1978).

Delgado *et al.* (2003) demostraron que cepas de *Azotobacter*, purificadas de suelos cubanos, aceleraron el porcentaje de germinación de semillas de café (*Coffea arabica*) variedad Caturra Rojo, entre el 55 y el 62 %, a los primeros 50 días del tratamiento. También demostraron que plántulas de café inoculadas con dichas cepas alcanzaron a los siete meses de la inoculación, mayores valores morfológicos de altura, diámetro del tallo, pares de hojas, masa seca y área foliar, con relación a un testigo.

Rubenchick (1960) estudió los 1095 experimentos realizados en Rusia sobre la respuesta en rendimiento al *Azotobacter*, de ellos en el 81 por ciento se observó un aumento del rendimiento de los cereales, hortalizas y cultivos industriales, además informa que los experimentos efectuados en Checoslovaquia sobre la azotobacteria en 1954, demostraron que los rendimientos de la remolacha azucarera, el maíz, la zanahoria y la col, habían aumentado el 39, 15.4, 19.2 y 2.9 por ciento, respectivamente, y los estudios efectuados en Rumania en 1954 mostraron un aumento del 50% en el rendimiento de la corona de girasol. Ridge y Rovira (1968), demostraron que con la inoculación de la azotobacteria había mucha más tendencia al

aumento del rendimiento en el grano del trigo que a la disminución. Burges (1968) plantea que en la aplicación del biofertilizante con la dosis completa de fertilizante nitrogenado no hay fijación de nitrógeno, porque las bacterias utilizan el que abundantemente tienen a su alcance y no gastan energía en la fijación (que tiene un alto costo de energía biológica), pero se observa el incremento del rendimiento por la acción de las sustancias activas de la bacteria.

Según Hamdi (1985), muchos de los resultados encontrados fuera de Rusia sobre la respuesta en varios cultivos a la azotobacteria carecen de uniformidad, en Alemania se observaron aumentos del 11% en el rendimiento de la zanahoria, 6.25% en la patata y el 13% en la sustancia verde de la mostaza. En otros casos, por ejemplo en Suiza, Dinamarca, Finlandia y Estados Unidos de América, los resultados han sido negativos.

En Cuba se desarrolla, desde 1990, un programa de fabricación y aplicación de *Azotobacter* a base de cepas seleccionadas que son capaces de suministrar hasta 50% de los requerimientos de nitrógeno de las plantas mediante la fijación biológica, lo que permite ahorros considerables de fertilizantes químicos, al mismo tiempo que se reduce la contaminación ambiental y los daños a la salud humana ya que se disminuyen las elevadas proporciones de nitratos en los cultivos agrícolas (Bohlool *et al.*, 1992).

Martínez *et al.* (1996) comprobó que las aplicaciones foliares de *Azotobacter* en las extensas plantaciones de cítricos del país, eran de gran efectividad no sólo en la sustitución del fertilizante, sino en la estimulación de la floración y fructificación, lo que se traduce en rendimientos más altos.

En el caso de la yuca y el camote se aprovecha, además de la actividad fijadora de nitrógeno, la capacidad que tienen las sustancias activas sintetizadas por las bacterias de estimular la fotosíntesis (acumulación de compuestos) y reducir la respiración (gastos compuestos) de las plantas, lo que permite el almacenamiento de fotosintatos, que constituye la base de la formación de tubérculos y raíces, constituida por material de reserva (Martínez, 1998).

Medios de cultivo

El medio de cultivo es el material alimenticio en el que crecen los microorganismos y el crecimiento de los microorganismos en el Cultivo. Se han preparado más de 10.000 medios de cultivo diferentes. Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Los medios de cultivo deben contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante (Azahara, 2009).

Las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y Peptona a la que se añadirán otros ingredientes (Azahar, 2009).

El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40 grados. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él. La adición de hidratos de Carbono es por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos. El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes. También se añaden colorantes que actúan como indicadores (Azahara, 2009).

Clasificación de los medios según Azahara, (2009):

- Según su consistencia
 - Sólidos: que llevan una sustancia que se llama agar, que da consistencia sólida y va a ser el soporte de los compuestos necesarios en la nutrición de las bacterias.
 - Semisólidos: tienen menos agar, una proporción de 0.1% a 0.5%.

- Líquidos: se llaman caldos.
- Según su composición
 - Medios sintéticos: que son medios de cultivo de composición conocida o definida, se utilizan muy poco y suelen hacerse para cultivar una especie de bacterias determinada.
 - Medios generales: tienen una composición en la que crecen la mayor parte de los microorganismos. Aportan los componentes nutritivos más comunes para todas las bacterias.
 - Medios enriquecidos: son medios generales a los que se les añade sustancias que aumentan su poder nutritivo y pueden crecer heterótrofos exigentes.
 - Medios selectivos: se le adicionan al agar nutritivo, sustancias que inhiben el crecimiento de un grupo de microorganismos, sin aceptar el desarrollo de otras.
 - Medios diferenciales: llevan reactivos que nos permiten diferenciar entre todas las bacterias crecidas unas de otras.
 - Medios de caracterización: se utilizan para identificar bacterias, dan lugar a una respuesta concreta al metabolismo bacteriano.

Medios para el aislamiento de *Azospirillum* y *Azotobacter*

El medio más comúnmente utilizado para el aislamiento de *Azospirillum* es el medio NFb semi-sólido (Dobereiner y Day, 1976; Dobereiner *et al.*, 1976). Se han desarrollado varias modificaciones útiles y se mencionan a continuación.

Medio OAB (Okon *et al.*, 1977): Este medio fue modificado es más apropiado para el crecimiento de *Azospinillum* que para su aislamiento. No es muy selectivo para este género, pero provee mayor capacidad amortiguadora que el medio original. Incluye en su composición química microelementos, una concentración limitada de NH₄ para iniciar el crecimiento en condiciones aerobias y una pequeña cantidad de extracto de levadura para acortar la fase de latencia (lag phase) del crecimiento y contribuir a un crecimiento vigoroso.

Medio semi selectivo NFB-rojo congo (Rodríguez Cáceres, 1982): Este medio es básicamente el medio NFB suplementado con 15 ml l⁻¹ de solución acuosa de rojo congo (1:400) esterilizada por separado.

Este medio permite reconocer las colonias de *Azospirillum* facilitando el aislamiento, ya que las colonias se tiñen de color rojo oscuro o escarlata, con características coloniales típicas; otras bacterias de suelo no absorben el rojo congo.

Medio BL y BLCR (Bashan y Levanony, 1985): Este medio es apropiado para el aislamiento de *Azospirillum* a partir de la rizosfera, ya que las colonias son fáciles de reconocer, especialmente en el medio BLCR. Sin embargo, algunas cepas de *A. brasilense* no pudieron crecer en este medio (Horemans *et al.*, 1987) y, en general, el crecimiento de *Azospirillum* en medio BLCR, es significativamente más lento que en el medio OAB original (aproximadamente 10 días de incubación).

Medio para el aislamiento de *Azotobacter* (Kole *et al.*, 1988): El medio no contiene fuente de nitrógeno y se basa en la utilización de extracto de suelo y de manitol como fuente de carbono.

Aspectos generales del nopal

El nopal (*Opuntia ficus-indica*) pertenece a la familia Cactáceae. Se considera como centro de origen de este género el área del Golfo de México y el Caribe, debido a la gran variabilidad genética que se encuentra en dicha zona. Habita en las zonas desérticas de Estados Unidos, México y América del Sur (Sosa y García, 1997).

Descripción de la planta

Es una planta arbustiva suculenta, ramificada con porte variable desde rastrero hasta arborescente grande. El tallo y las ramas están constituidos por pencas o cladodios con apariencia de cojines ovoides y aplanados, unidos unos con otros, pudiendo en conjunto alcanzar hasta 5 m de altura (Mir, 1997).

La raíz es fibrosa y el sistema radicular extenso, pero poco profundo penetrando con gran facilidad en las grietas y suelos más duros y pedregosos. Generalmente son gruesas, pero no suculentas de tamaño y ancho variables y a menudo es proporcional al tamaño de la parte aérea. Tiene un desarrollo rápido, formando una red o malla que aprisiona el suelo evitando la erosión. No suelen presentar pelos absorbentes, cuando se encuentra en un medio edáfico con escasa humedad, mientras que en suelos húmedos si existe un abundante desarrollo de estos (Mir, 1997).

El tallo, a diferencia de otras especies de cactáceas, está conformado por tronco y ramas aplanadas que posee cutícula gruesa de color verde de función fotosintética y de almacenamiento de agua en los tejidos (Sosa y García, 1997).

Las hojas caducas sólo se observan sobre tallos tiernos, cuando se produce la renovación de pencas, en cuyas axilas se encuentran las aréolas de las que brotan las espinas, de aproximadamente 4 a 5 mm de longitud. Las hojas desaparecen cuando los cladodios han alcanzado un grado de desarrollo y en cuyo lugar quedan las espinas (Sosa y García, 1997).

Las flores son solitarias, localizadas en la parte superior del cladodio, de 6 a 7 cm de longitud. Cada aréola produce por lo general una flor, aunque no en una misma época de floración unas pueden brotar el mismo año, otras el segundo y tercero. Las flores se abren a los 35 a 45 días de su brotación. Sus pétalos son de colores vivos: amarillo, anaranjado, rojo y rosa. Sépalos numerosos de color amarillo claro a rojizo o blanco (Sosa y García, 1997).

El fruto es una baya polisperma, carnosa, de forma ovoide esférica, sus dimensiones y coloración varían según la especie; presentan espinas finas y frágiles de 2 a 3 mm de longitud, son comestibles, agradables y dulces (Sosa y García, 1997).

En el nopal los cladodios, las flores y aún los frutos en desarrollo son capaces de diferenciación, sin embargo los cladodios son la unidad típica de propagación (Pimienta, 1990). Los cladodios separados de manera natural

de la planta madre son el mecanismo típico de dispersión en las nopaleras silvestres (Nava *et al.*, 1991).

Clasificación taxonómica del nopal

La clasificación taxonómica del nopal verdura según Ontivero y Saldaña (1986), es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales;

Familia: Cactaceae

Género: *Opuntia*

Nombre científico: *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller.

Estado actual e importancia a nivel nacional del nopal verdura

Los principales estados productores de nopal verdura o nopalitos a nivel nacional en el año 2014 son: Jalisco en primer lugar con un promedio de 1, 590, 378. 81 Ha⁻¹ sembradas, en segundo lugar Veracruz con 1, 499,328.37 Ha⁻¹ en tercer lugar Chiapas con 1, 433,126.63 Ha⁻¹ sembradas y en cuarto lugar se encuentra Tamaulipas con 1, 426,210.99 Ha⁻¹ sembradas (SIAP 2014).

Hábitat del nopal

El nopal tiene una especial adaptación para desarrollarse en las zonas cálidas, áridas y semiáridas de la mayor parte del mundo (principalmente en Centro y Suramérica). Esta especie ofrece la peculiaridad de estar adaptada a condiciones de sequía, debido al tipo de metabolismo especial que posee y a sus estructuras anatómicas, siendo por este motivo capaz de producir una abundante cantidad de materia orgánica con una gran eficiencia en la utilización de agua (Mir, 1997).

Los nopalitos verdes pueden ser producidos rápido y abundantemente de plantas expuestas a altas temperaturas con poca agua, condiciones desfavorables para la producción de muchas de las hortalizas verdes de hoja (Barbera, 1999).

Propiedades químicas

Se ha descubierto una gran cantidad de propiedades que se puede extraer, por ejemplo del fruto se puede obtener vitaminas y propiedades astringentes y antisépticas; se utiliza para producir miel, vinos, alcoholes y confituras como el queso de tuna un dulce muy apreciado en México con textura de cajeta. Por su parte las pencas del nopal sirven como forraje, son medicinales, además son un alimento delicioso para el consumo humano (Sosa y García, 1997).

Tanto los frutos como los cladodios del nopal son una fuente interesante de componentes funcionales, entre los que destaca la fibra, los hidrocoloides (mucílagos), los pigmentos (betalaínas y carotenoides), los minerales (calcio, potasio), y algunas vitaminas como la vitamina C, buscada entre otros motivos, por sus propiedades antioxidantes; todos estos compuestos son muy apreciados desde el punto de vista de una dieta saludable y también como ingredientes para el diseño de nuevos alimentos (Sáenz, 2006).

Cuadro 1. Valor nutritivo del nopal verdura (cantidad respecto a 100 gramos de nopalitos crudos).

| | |
|--------------------|------------|
| Porción comestible | 78.00% |
| Energía | 27.00 kcal |
| Proteínas | 0.17 g |
| Grasas | 0.30 g |
| Carbohidratos | 5.60 g |
| Calcio | 93.00 g |
| Fierro | 1.60 mg |
| Tiamina | 0.03 mg |
| Riboflavina | 0.06 mg |
| Niacina | 0.03 mg |
| Ácido ascórbico | 8.00 mg |

Fuente: (Silvestre, 2011)

Usos del nopal en México

El uso del nopal en México data desde la época prehispánica, cuando tuvo una función importante en la economía agrícola del imperio azteca. En décadas recientes las plantaciones para producción de fruto y forraje, así como para hábitat de la cochinilla (*Dactylopius coccus*), insecto productor de grana (colorante rojo) y nopalitos se han extendido en muchos países de África, América, Asia y Europa. El nopal es importante para la economía de zonas áridas y semiáridas tanto para subsistencia como para una agricultura orientada al mercado (Barbera, 1999).

Los nopales son dignos de ser considerados para la industrialización. Entre los alimentos elaborados con base en los cladodios se encuentran: encurtidos, jugos, mermeladas y productos mínimamente procesados, entre otros. Enseguida se enumera una serie de sectores industriales que pueden obtener y/o beneficiarse con productos obtenidos a partir de los nopales:

- Agroindustria de alimentos y bebidas para consumo humano (producción de diversos alimentos, bebidas alcohólicas y analcohólicas de tuna y nopalitos);
- Agroindustria de alimentos para animales (suplementos y piensos de cladodios y de desechos de la industria procesadora de tuna, como las cáscaras y semillas);
- Industria farmacéutica (protectores gástricos de extractos de mucílagos; cápsulas y tabletas de polvo de nopal);
- Industria cosmética (cremas, champúes, lociones de cladodios);
- Industria de suplementos alimenticios (fibra y harinas de cladodios);
- Industria productora de aditivos naturales (gomas de cladodios; colorantes de la fruta);
- Sector de la construcción (compuestos ligantes de los cladodios);
- Sector energético (producción de biogás a partir de las pencas);
- Sector productor de insumos para la agricultura (productos del nopal como mejoradores del drenaje de suelos);
- Sector turismo (artesanías en base a cladodios lignificados);

- Industria textil (uso de colorantes naturales como el carmín de cochinilla).

Los cladodios son una fuente importante de fibra, la que se obtiene al secarlos y molerlos para obtener polvo. Este polvo o harina se destina a las industrias de alimentos, complementos alimenticios y farmacéutica (Ricardo *et al.*, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área experimental

El experimento se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos del Departamento de Horticultura, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buenavista Saltillo, Coahuila. México, se ubica en las coordenadas geográficas 25° 21' 20" latitud N y 101° 02' 07" longitud W, a una altitud de 1763 msnm, en el periodo agosto - diciembre 2015.

Tratamientos estudiados

En el experimento, se inocularon cepas de *Azospirillum spp.* cepa T33T viene de raíces de nopal, cultivados en General Cepeda y *Azotobacter spp.* cepa A29A también de raíces de nopal, cultivado en Torreón, distribuidas en 16 tratamientos y 3 repeticiones, como se muestra en el Cuadro 1, los cuales contenían la bacteria más el extracto a concentración de 0.0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5 y 5.0, evaluando el crecimiento de *Azospirillum* y *Azotobacter* en el extracto de nopal.

Cuadro 2. Clasificación de los tratamientos utilizados y con tres repeticiones cada uno.

| Concentración (extracto de nopal) | Bacteria (<i>Azospirillum</i>) | Concentración (extracto de nopal) | Bacteria (<i>Azotobacter</i>) |
|---|-------------------------------------|---|------------------------------------|
| 0.0 | T33T | 0.0 | A29A |
| 0.1 | T33T | 0.1 | A29A |
| 0.25 | T33T | 0.25 | A29A |
| 0.5 | T33T | 0.5 | A29A |
| 0.75 | T33T | 0.75 | A29A |
| 1.0 | T33T | 1.0 | A29A |
| 2.5 | T33T | 2.5 | A29A |
| 5.0 | T33T | 5.0 | A29A |

Medios selectivos de crecimiento

Se utilizó un medio selectivo, NFB adicionado con rojo congo para aislar cepas del género *Azotobacter sp.* y *Azospirillum sp.* para la selección de cultivos puros.

Medio NFB adicionado con rojo congo para cepas de *Azospirillum sp.* y cepas del género *Azotobacter sp.* Los cuales permiten el aislamiento y crecimiento de microorganismos que pueden fijar biológicamente nitrógeno atmosférico.

Cuadro 3. Composición del medio NFB adicionado con rojo congo (Rodríguez Cáceres, 1982).

| Reactivo | Concentracion (g l ⁻¹) |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| K ₂ HPO ₄ | 5.0 |
| MgSO ₄ -7H ₂ O | 0.2 |
| NaCl | 0.1 |
| Extracto de levadura | 0.5 |
| FeCl ₃ -6H ₂ O | 0.015 |
| Ácido málico | 5.0 |
| KOH | 4.8 |
| Agar | 20.0 |
| Rojo Congo | 15 ml/l |

Preparación del medio NFB adicionado con rojo congo

La preparación del medio de cultivo se realizó colocando 50 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer, este se puso a calentar en una parrilla agitadora, introduciéndole un agitador magnético, en seguida se colocaban los reactivos uno a uno para que estos se disolvieran en el agua. Después de disolverlos se aforaba a un litro y se deja enfriar, cuando este ya estaba frío se ajustaba el pH a 7.0, se colocaba un tapón y posteriormente se esterilizo en una autoclave a 120 PSI por un período de 20 minutos.

El reactivo rojo congó se agrega por separado, se vierte el reactivo en un matraz Erlenmeyer, se afora a 25 ml con agua destilada y se esteriliza en

una autoclave 120 PSI por un período de 20 minutos. El colorante rojo congo es una solución acuosa en relación 1:400, y se esterilizó por separado. Se agregaron 15 ml del reactivo rojo congo al resto del medio de cultivo, enseguida se vierte en las cajas Petri para su solidificación y se tapan las cajas Petri.

Preparación del sustrato

El extracto de nopal verdura fue lavado previamente, molido, pesado y mezclado con agua destilada, para obtener las siguientes concentraciones: 0.1, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.5 y 5.0%. Se colocaron en frascos con sus diferentes concentraciones se afora a 100ml de agua destilada y se esteriliza en una autoclave 120 PSI por un período de 20 minutos.

Aislamiento

Cuando el sustrato ya está listo se realizan disoluciones de las cepas de rizobacterias en tubos de ensayo de 10ml los cuales contenían 9ml de agua destilada y fueron esterilizados. Las disoluciones se hacen en la campana de flujo laminar con la ayuda de una micro pipeta SAMPLER SYSTEM 1ml y puntillas para micro pipeta, se obtienen disoluciones de 10^{-6} , colocando 1ml de cada disolución de la cepa en nuestras concentraciones de sustrato de nopal y se llevaron a la incubadora con una temperatura de 30°C.

Se realizaron 4 siembras en cajas Petri, primera siembra se hizo a los 15 días de haber inoculado la cepa en el sustrato (nopal) se realizaron disoluciones en la campana de flujo laminar teniendo 10^{-1} hasta 10^{-10} de la cual solo tomaba la disolución 10^{-10} , de esta disolución se sembró en las cajas Petri con medio de cultivo NFB adicionado con rojo congo donde la siembra se realizó con la ayuda de un Drigalski de vidrio, las otras tres siembras se realizaron con intervalos de 8 días una de la otra, hasta obtener cuatro siembras y observar el comportamiento de las bacterias en el sustrato de nopal.

Identificación

En la identificación se utilizó la técnica de UFC, la cual se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en el medio de cultivo después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo.

Modelo estadístico

El estudio se realizó con un diseño completamente al azar con arreglo factorial con 16 tratamientos y 3 repeticiones.

Los datos obtenidos, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con prueba Tukey ($p < 0.05$), procesados mediante el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.0.

IV. RESULTADOS

En el primer conteo de las unidades formadoras de colonias no se observan diferencias significativas (ns) entre las concentraciones de nopal, ni en las dos cepas de Bacterias (Cuadro 4). Mientras que en el conteo 2, 3 y 4 si se encontraron diferencias significativas por efecto de las diferentes concentraciones de nopal y de las cepas de estas Bacterias (Cuadro 4). La interacción entre concentraciones de nopal y de las cepas de las bacterias afecta significativamente las unidades formadoras de colonias (Cuadro 4).

Cuadro 4. Prueba de comparación de medias de Tukey de rhizobacterias desarrolladas en medio de cultivo.

| Concentración de nopal (g 100ml ⁻¹) | Conteo 1 | Conteo 2 | Conteo 3 | Conteo 4 |
|---|----------------------|----------|----------|----------|
| | UFC ml ⁻¹ | | | |
| 0.0 | 201.0 a | 42.0 d | 12.33 f | 8.66 d |
| 0.1 | 201.0 a | 102.16 c | 26.0 ed | 1.16 c |
| 0.25 | 201.0 a | 104.16 c | 20.66 e | 14.0 dc |
| 0.5 | 201.0 a | 26.33 e | 35.50 cb | 35.66 b |
| 0.75 | 201.0 a | 115.83 b | 37.33 b | 36.33 b |
| 1.0 | 201.0 a | 201.0 a | 38.50 b | 36.0 b |
| 2.5 | 201.0 a | 201.0 a | 29.83 cd | 118.66 a |
| 5.0 | 201.0 a | 201.0 a | 201.0 a | 116.66 a |
| Anova P ≤ | NS | 0.001 | 0.001 | 0.001 |
| Bacterias | | | | |
| <i>Azospirillum</i> (T33T) | 201.0 a | 106.79 b | 55.50 a | 26.16 b |
| <i>Azotobacter</i> (A29A) | 201.0 a | 141.58 a | 44.79 b | 69.12 a |
| Anova P ≤ | NS | 0.001 | 0.001 | 0.001 |
| CV | 0 | 2.69 | 6.14 | 6.76 |
| Interacción | NS | 0.001 | 0.001 | 0.001 |

La cepa T33T disminuye la cantidad de UFC con 0.1, 0.25 y 0.5 g de nopal en comparación con el testigo, sin embargo, cuando la concentración de nopal es superior a 0.5 g incrementa la cantidad de UFC de esta cepa (Figura 3). Para la cepa A29A aumenta la cantidad de UFC con el incremento de la concentración de nopal, a excepción cuando la concentración fue igual a 0.5 y 0.75 g, pues estas concentraciones decrecen el número de UFC con respecto al testigo y de las demás concentraciones de nopal (Figura 3).

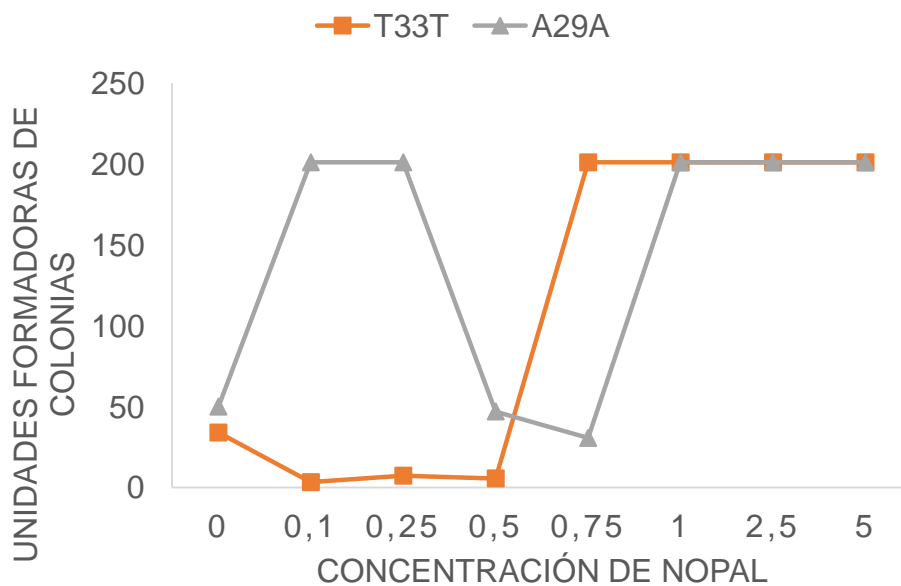


Figura 3. Efecto de las diferentes concentraciones de nopal y cepas de rizobacterias, en el segundo conteo de unidades formadoras de colonias.

La cepa T33T en la lectura tres aumenta la cantidad de UFC con el incremento de la concentración de nopal, sin embargo, cuando la concentración de nopal es superior a 2.5 g el incremento de estas fue mucho mayor que con las concentraciones menores a esta (Figura 4). La cepa A29A disminuye la cantidad de UFC con 0.1 y 2.5 g de la concentración de nopal en comparación con el testigo y con las concentraciones 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 y 5.0 g incrementa las UFC, siendo más marcado este aumento con 5.0 g (Figura 4).

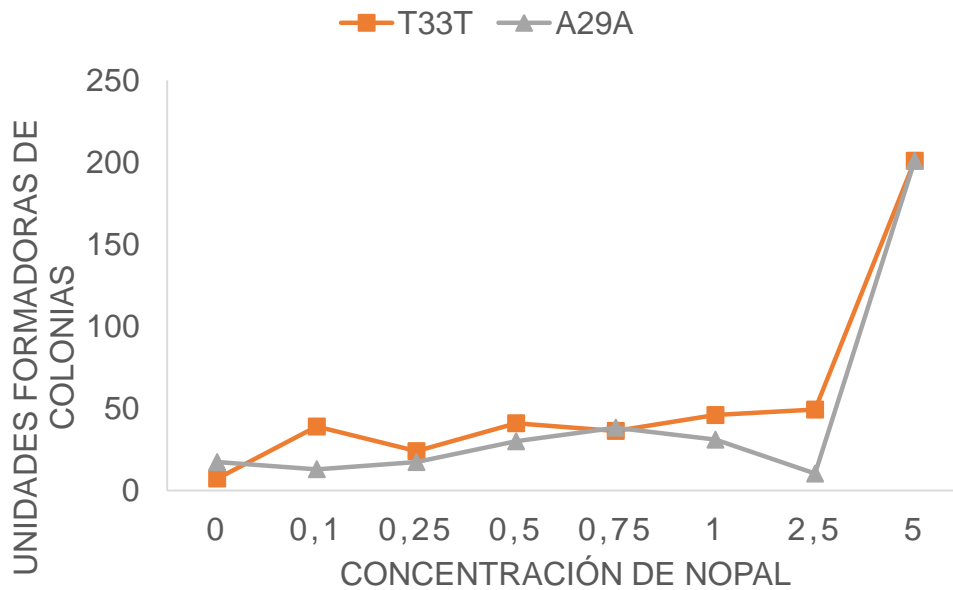


Figura 4. Efecto de las diferentes concentraciones de nopal y cepas de rizobacterias, en el tercer conteo de unidades formadoras de colonias.

La cepa T33T en la lectura cuatro, muestra que a partir de 0.1 g de la concentración de nopal aumenta la cantidad de UFC en comparación con el testigo (Figura 5). La cepa A29A aumenta la cantidad de UFC a partir de 0.1 g de la concentración de nopal en comparación con el testigo, sin embargo, cuando la concentración de nopal es superior a 1.0 g el incremento de esta cepa fue mucho mayor que con las concentraciones menores a 1.0 g (Figura 5).

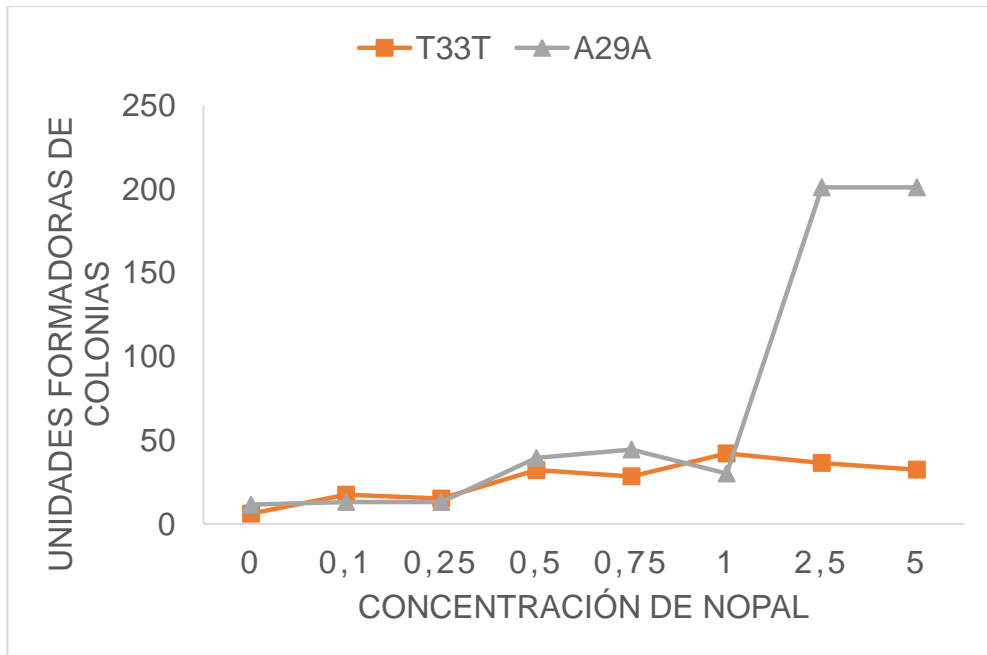


Figura 5. Efecto de las diferentes concentraciones de nopal más las diferentes cepas, en el cuarto conteo de unidades formadoras de colonias

V. DISCUSIÓN

Respecto al crecimiento evaluado con diferentes concentraciones, se observó que el crecimiento de *Azospirillum* y *Azotobacter* se incrementaba conforme incrementaba la concentración de nopal, observando que la concentración de 5.0 g siempre tuvo más UFC con cualquiera de las dos cepas, por lo que nuestros resultados no concuerdan con lo reportado por Juliana *et al.* (2010), quienes señalan que a concentraciones de melaza más elevadas (30%), las bacterias alcanzan la fase estacionaria más rápido, antes de consumir todo el sustrato, lo que hace que el microorganismo no produzca más biomasa, por el estado de saturación del sustrato, respecto a la concentración microbiana.

Estimar el crecimiento de *Azospirillum* y *Azotobacter* en extracto acuoso de nopal a diferentes concentraciones.

Identificar la cepa de rizobacteria que se incrementa a través de un mes.

Hipótesis

Al menos una concentración de extracto de nopal produce el mayor incremento de *Azospirillum* o *Azotobacter*.

VI. CONCLUSIONES

Esta investigación permitió evaluar el crecimiento de *Azospirillum* y *Azotobacter* en un extracto acuoso de nopal a diferentes concentraciones, con lo cual, se logró incrementar el desarrollo microbiano de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, a partir de este sustrato. El tratamiento que permitió el máximo crecimiento del microorganismo fue la concentración de 5.0 g.

Se identificó que la cepa A29A (*Azotobacter*) tuvo mayor incremento en este extracto a través de un mes.

Por lo que se recomienda realizar los recuentos hasta 6 meses para ver si la concentración sigue con la misma tendencia, además de probar la vida de anaquel.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Arzanesh M, H Alikhani, K Khavazi, H Rahimian, M Miransari. 2010. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. Under drought stress. Springer. World Journal Microbiol Biotechnol. 1-9.
- Azahara Cabrera Ortega. 2009. MEDIOS DE CULTIVO Y TINCIÓN DE GRAM. 02-03
- Barbera, G. 1999. Historia e importancia económica y agro-ecológica. Agroecología, cultivo y usos del nopal. FAO, Roma. Pp. 1-12.
- Bare J, M Pozo, R Azcon, A Aguilar, 2005. Microbial co-operation in the rizosphere. Journal of experimental Botany 56(417): 1761-1778.
- Barrios, S., A. Potenza and M.V. López. 1986. Utilización del *Azospirillum* (diazotrofo rizosférico) en el triticultivo. In: Actas del Primer Congreso Nacional de AIANBA. Pergamino, Argentina, 6-10 de Octubre.p.15-35.
- Bashan Y, L de Bashan 2005. Bacteria / Plant growth – promotion. En Hillel D (Ed). Encyclopedia of soils in the environment. Vol. 1. Elsevier. Oxford. RU. Pp. 103-115.
- Bashan, Y. 1999. Interactions of *Azospirillum* spp in soils: a review. Biol Fertil Soils. 29:246-256.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1985. An improved selection technique and médium for the isolation and enumeration of *Azospirillum brasilense*. Can. J. Microbiol. 31:947-952.
- Bhat, J. B., E. S. Limayer y B. L. Vasantharajam. 1971. Ecology of the leaf surface microorganism. 322.
- Bohlool, G. B., J. K. Lhada., D. P. Garrity and T. George. 1992. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture a perspective, 230 pp.
- Bouillant, M.1998. Inhibition of *Striga* seed germination with Sorghum growth promotion by soil bacteria. Sciences de la Vie. vol. 320, no. 2, p. 159-162.

- Brown, M. E., S. K. Burlingham and R. M. Jackson. 1992. Studies on Azotobacter species in soil. II. Population of Azotobacter in the Rhizosphere and Effects on Artificial Inoculation. *Plant and Soil*. 28: p.320- 332.
- Burdman, S.; Hamaoui, B. y Okon, Y. 2000. Improvement of legume crop yields by co-inoculation with Azospirillum and Rhizobium. The Otto Warburg Center for Agricultural Biotechnology. The Hebrew University of Jerusalem, Israel. pp. 145-152
- Burges, A. 1968. Introducción a la microbiología del suelo. Ed. La Habana. Cuba. 200p.
- Byron Mosquera, 2010. Abonos orgánicos Protegen el suelo y garantizan alimentación sana Manual para elaborar y aplicar abonos y plaguicidas orgánicos. pp.3.
- Caesar T, A Caesar, J Gaskin, U Sainju, W Busscher. 2007. Taxonomic diversity of predominant culturable bacteria associated with microaggregates from two different agroecosystems and their ability to aggregate soil in vitro. *Applied Soil Ecology* 36 (1): 10-21.
- Crum, A., 2004, "Azotobacter, soil microbiology", http://filebox.vt.edu/users/chagedor/biol_4684/microbes/AZOTO.html
- Debinstein, J. 1970. A. Tropical Rain Forest. John Wiley and Sons Ed., New York, 230 pp.
- Delgado, Y., Cupull, R., Perez, C., Sanchez, A. y Vilchez, M., 2003, "Efecto de Azotobacter spp. en la estimulación de la germinación y desarrollo de posturas de Coffea arabica L".
- Dobbelaere S, A Croonenborghs, Thys D, Ptacek D, Labandera C, Caballero J , Aguirre J, Burdman S, Sang S, Okon J 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with Azospirillum. *Aust. Journal. Plant physiology*.28 (9):871-879
- Döbereiner J. 1992. The genero Azospirillum and Herbaspirillum, En A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. Springer-Verlag. New York. p. 2236 2253.

- Döbereiner, J. and Day, J.M. 1976. Associative simbiosis in tropical grasses. Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: Proceedings of the first international symposium on nitrogen fixation. (Eds) Washington State University Press, Pulman. Pp. 518 – 538.
- Dobereiner, J., I.E. Marriel y M. Nery 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Can. J. Microbiol. 22: 1464-1473.
- Doberreiner, J. y J.M. Day. 1976. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: Proc. 1st Int. Symp. Nitrogen fixation. W.E: Newton y C.J. Nyman (Eds). Washington State University Press. Pullman, USA. 518-538.
- Dübereiner, J., I. E. Marriel, and M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum*
- Eckert B, O Baller, G Kirchhof, A Halbritter, M Stoffels, A Hartman. 2001. *Azospirillum doebereineraespp. nov.*, a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4 – grass *Miscanthus*. Internat. J. Sistem. Evolut. Microbiol.51: 17-26.
- Espín, G. s.f. Biología de *Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Fallik, E. and Y. Okon. 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: Biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. Soil Biol. Biochem pp. 123-126.
- Fallik, E.; Sarig, S. and Okon, Y. 1994. Morphology and physiology of plant roots associated with *Azospirillum*. In *Azospirillum/Plant Associations*. Edit. Ed. Okon, pp 77-86. CRC Press.
- Fisher S E, S I fisher, S Magris, G Mori. 2007. Isolation and Characterization of bacteria from the rizosphere of wheat. World Journal Microbiology Biotechnology. 23: 895-903.
- Frobisher, M. 1969. Microbiología. Ed. Ciencia y Técnica, La Habana, Cuba. 743 pp.
- Garassini, L. 1967. "Microbiología Agraria". Parte II. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, pp 415- 417

- Hamdi, Y. A. 1985. La fijación del nitrógeno en la explotación de los sus suelos. Boletín de Suelos. FAO. Roma. 188 pp.
- Hernández, M., M. Pereira y M. Tang. 1994. Utilización de microorganismos Biofertilizantes en los cultivos tropicales. Pastos y Forrajes. 17 (3): 183 – 192.
- Hernandez, W. 2003. Aislamiento e identificación de cepas de Azospirillum, y evaluación de su capacidad para suplir las necesidades del nitrógeno en las plantas de *Oryza Sativa* (arroz). Informe de práctica de especialidad. Bachiller en ingeniería en biotecnología. Cargo, Costa Rica. Instituto tecnológico de Costa Rica. Carrera de ingeniería en biotecnología escuela de Biología. Pp 46.
- Holt J 2000, Bergey's manual to determinative bacteriology. Novena Edición. Baltimore, Maryland. Ed. Williams y Wilkins. USA Pp: 77, 105, 118, 135
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Sneath, P., Staley, J. y Williams, S. (1994). Berguey's Manual of Determinative Bacteriology. Novena edición. Williams & Wikins. Baltimore, USA. 39-56 pp.
- Horemans, S., S. Demarsin, J. Neuray y K. Vlassak. 1987. Suitability of the BLCR médium for isolating Azospirillum brasilense. Can J. Microbiol. 33:806-808.
- Hornick, L.; Peters, L y Hugenholtz, P. 2007. Azotobacter vinelandii. Tree of Life. Bacteria. Proteobacteri. University of California.
- Kole, M.M., W.J., page y I. Altosaar. 1988. Distribution of Azotobacter in Eastern Canadian soils and in association with plant rhizospheres. Can. J. Miclobiol. 34:815-817.
- Larson, R. L. y L. J. Neal. 1978. Selective colonization of the rhizosphere of wheat by nitrogen fixing blue –green algae and asymbiotic bacteria. Ecol. Bull. 26. p. 331-342.
- Jiménez, D. 2007. Caracterización molecular de sepas nativas colombianas de Azotobacter spp. mediante el análisis de restricción del ADN ribosomal 16S. trabajo de grado previo para la obtención del título de Microbiólogo Industrial. Pontifica Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. P 86.

- Juliana Andrea Ossa, María Consuelo Vanegas, Ángela María Badillo. 2010. Evaluación de la Melaza de Caña como Sustrato para el Crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. Artículo Científico.
- Lipoferum Beijerinck. Can. J. Microbiol. 22:1464-1473.
- Martínez, A., I. Chang e I. Alemán. 1985. Caracterización biológica de los principales suelos de Cuba. IV. Fijadores Asimbióticos de N atmosférico. Ciencia de la Agricultura. 25. p. 77-86.
- Martínez, R., L. Toledo., R. García y C. Arguelles. 1999a. Introducción al conocimiento sobre los biofertilizantes. Documento en imprenta Universidad Tecnológica de la hausteca hidalguense Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT). CUBA, p. 19
- Martínez, V. y B. Dibut. 1996. Los biofertilizantes como pilares básicos de la Agricultura Sostenible. En Curso-Taller Gestión Medio Ambiental de Desarrollo Rural, p. 62-81.
- Martínez, V. y B. Dibut. 1996. Los biofertilizantes como pilares básicos de la Agricultura Sostenible. En Curso-Taller Gestión Medio Ambiental de Desarrollo Rural, p. 62-81.
- Martínez, V.R. 1998. Los biofertilizantes como factores de economía y productividad en la agricultura tropical. En: Curso- Taller sobre Agricultura Sostenible en el Trópico, La Habana, p. 26-41.
- Mir, U. M. 1997. Instrucción para el cultivo del nopal y la cría de la grana cochinilla aplicar en Centro y Suramérica. España. 44 pp.
- Mir, U. M. 1997. Instrucción para el cultivo del nopal y la cría de la grana cochinilla aplicar en Centro y Suramérica. España. 44 pp.
- Mir, U. M. 1997. Instrucción para el cultivo del nopal y la cría de la grana cochinilla aplicar en Centro y Suramérica. España. 44 pp.
- Nava, C. R., López, J. J. y Gasto J. 1991. Propagación asexual. Agroecología cultivos y usos del nopal. FAO, Roma, 71pp.
- Okon and C. Labandera-Gonzalez. 1994. Agronomic applications of Azospirillum: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem. Vol 26 (12):1591-1601.

- Okon Y. 1985. Azospirillum as a potential inoculant for agriculture. 1985. Trends Biotechnol. 3:223-228
- Okon. Y., S.; Albrecht y R.H. burris. 1977. Methods for growing spirillum lipoferum and for counting it in pure culture and in association with plants. Appl. Environ. Microbiol. 33:85-88.
- Ontivero Pérez José Luis y Saldaña Angulo, 1986. Colección, identificación y evaluación de nopal tunero *Opuntia* spp. en el sur del estado de Nuevo León. Tesis de la F.A.U.A.N.L. México. Pp.50-53.
- Peña-Cabriales, J. J. 2000 La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: el aporte de las técnicas isotópicas. Ed. IMPROSA, SA. de C.V, Irapuato. México. 120 p.
- Pereyra M, C Zalazar, C Barassi 2006. Root phospholipids in Azospirillum– inoculated wheat seedling exposed to water stress. Plant Physiology Biochemical. 44:873-879.
- Ricardo DAVID V. C., Fidel B. M., Rigoberto E. Vázquez A. y Rafael M. Q. 2008. Producción y Usos Del Nopal Para Verdura. Pp. 6-8
- Ridge, E. H. and Rovira, A.D. 1968. Microbiol. Inoculation of Wheat. 9th Congreso Int. de Ciencias del Suelo Trans. Vol. III. p. 473-481.
- Rivera C, A Trujillo, D Alejo 2010. Los biofertilizantes integrados con bacterias fijadoras de Nitrógeno, Solubilizadoras de P y sustratos orgánicos en el crecimiento de naranja Agrio. (*Citrus aurantium* L.). Interciencia. 35: 2.
- Rodríguez casares, E.A. 1982. Improved médium for isolation of Azospirillum spp. Appl. Environ. Microbiol. 44:990-991.
- Rodriguez, C. 1982. Improved medium for isolation of Azospirillum spp. Environ. Microbiology. 44: 990-991.
- Rubenchick, L. I. 1960. Azotobacter and its use in agriculture. 1960. Translated from Russian Published for The National Science Foundation, Washington D. C. US Dept. of comerce, Washington 25, D. C.
- Rubenchick, L. I. 1960. Azotobacter and its use in agriculture. 1960. Translated from Russian Published for The National Science

Foundation, Washington D. C. US Dept. of commerce, Washington 25, D. C.

- Ruinen, J. 1975. Nitrogen fixation in the phyllosphere. Ed. W. D. P. Stewart. Cambridge University Press, Nueva York, EEUU. 85-100 pp.
- Saéñz H Carmen. et al. 2006. Utilización Agroindustrial del Nopal. Servicio de Tecnologías de Ingeniería Agrícola y Alimentaria (AGST) con la Colaboración de la Red Internacional de Cooperación Técnica del Nopal (FAO-CACTUSNET). Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO. Boletín No. 162. Italia.
- Silvestre Ruiz López. 2011. El nopal: propiedades y paquete tecnológico para su producción. Pp. 11
- Sosa, V. E. y García M. P. 1997. Especies arbóreas y arbustivas para las zonas áridas y semiáridas de América Latina. FAO, Santiago, Chile. Pp. 100- 105.
- Sosa, V. E. y García M. P. 1997. Especies arbóreas y arbustivas para las zonas áridas y semiáridas de América Latina. FAO, Santiago, Chile. Pp. 100- 105.
- Sosa, V. E. y García M. P. 1997. Especies arbóreas y arbustivas para las zonas áridas y semiáridas de América Latina. FAO, Santiago, Chile. Pp. 100- 105.
- Sosa, V. E. y García M. P. 1997. Especies arbóreas y arbustivas para las zonas áridas y semiáridas de América Latina. FAO, Santiago, Chile. Pp. 100- 105.
- Sosa, V. E. y García M. P. 1997. Especies arbóreas y arbustivas para las zonas áridas y semiáridas de América Latina. FAO, Santiago, Chile. Pp. 100- 105.
- Tapia-Hernández, A., M. A. Mascarua-Esparza, and J. Caballero-Mellado. 1990. Production of bacteriocins and siderophore-like activity in *Azospirillum brasilense*. *Microbios* 64:73-83.
- Tarrand, J.J., Krieg, N.R and Döbereiner, J. 1978. A taxonomic study of the *S. lipoferum* grup. with description of a new genus *A. lipoferum* Beijerinck. *Con nov. and A. brasilense*. *Can. J. Microbiol.* (24): 967-980. Canadá.

- Tejera J, Lluch C, Martínez M y González J (2005) Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant Soil* 7: 223-232
- Vessey K. 2003. Plant growth promoting rizobacterias as biofertilizers. *Plant and soil*. 255: 571- 586.
- Villegas J, E Rueda, A Murillo, M Puente, O Grimaldo, S Avilés, J Ponce. Efecto en la inoculación de *Azospirillum halopraeferens* y *Bacillus amyloliquefaciens* en la germinación de *prosopis chilensis*. 2010. *Tropical and subtropical Agroecosystems*. 12 (1): 19-32.
- Wu S, Z Cao, Z Li, M Cheung, W Wong. 2005. Effects of biofertilizers containing Nfixer, P y K solubilizers and AM on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*.125:155-166.

Páginas web

- Bacteria *Azospirillum brasilense* y *Azotobacter chocoocum* promotoras del crecimiento vegetal. Obtenida el día 12 de febrero de 2016 http://www.controlbiologico.com/ep_azotobacter_azospirillum.htm
- Espín, G. 2002. "Biología de *Azotobacter vinelandii*". http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_09/Capitulo09.pdf. (Julio 2009).
- Joint Genome Institute. 2009. "Taxon Details". http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi?section=TaxonDetail&page=taxonDetail&taxon_oid=638341010 (Junio 2009)
- Pankratz, S. 1995. "*Azotobacter* Cysts". <http://microbezoo.commtechlab.msu.edu/zoo/zdrs0309.jpg> (Junio 2009)
- SAGARPA 2014. Consultado el 4 de febrero del 2016, Pagina wue de servicio gubernamental <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Setubal, J. 2009. "*Azotobacter vinelandii* genome Project". <http://www.azotobacter.org/project.html> (Junio 2009)
- Uniprot Consortium. 2009. "*Azotobacter vinelandii* DJ". <http://www.uniprot.org/taxonomy/322710> (Junio 2009)

VIII. APÉNDICE

Concentración de datos utilizados para el análisis de varianza.

| Concentración de nopal | Bacteria | Tratamiento | Repetición | Lectura 1 UFC | Lectura 2 UFC | Lectura 3 UFC | Lectura 4 UFC |
|---------------------------|----------|-------------|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 0 | T33T | 1 | 1 | 201 | 32 | 8 | 5 |
| 0 | T33T | 1 | 2 | 201 | 34 | 7 | 6 |
| 0 | T33T | 1 | 3 | 201 | 36 | 7 | 7 |
| 0,1 | T33T | 2 | 1 | 201 | 3 | 33 | 19 |
| 0,1 | T33T | 2 | 2 | 201 | 4 | 39 | 17 |
| 0,1 | T33T | 2 | 3 | 201 | 3 | 45 | 16 |
| 0,25 | T33T | 3 | 1 | 201 | 7 | 24 | 18 |
| 0,25 | T33T | 3 | 2 | 201 | 8 | 20 | 12 |
| 0,25 | T33T | 3 | 3 | 201 | 7 | 28 | 15 |
| 0,5 | T33T | 4 | 1 | 201 | 5 | 41 | 32 |
| 0,5 | T33T | 4 | 2 | 201 | 7 | 40 | 36 |
| 0,5 | T33T | 4 | 3 | 201 | 5 | 42 | 28 |
| 0,75 | T33T | 5 | 1 | 201 | 201 | 36 | 32 |
| 0,75 | T33T | 5 | 2 | 201 | 201 | 30 | 25 |
| 0,75 | T33T | 5 | 3 | 201 | 201 | 43 | 28 |
| 1 | T33T | 6 | 1 | 201 | 201 | 40 | 39 |
| 1 | T33T | 6 | 2 | 201 | 201 | 52 | 42 |
| 1 | T33T | 6 | 3 | 201 | 201 | 46 | 45 |
| 2,5 | T33T | 7 | 1 | 201 | 201 | 46 | 36 |
| 2,5 | T33T | 7 | 2 | 201 | 201 | 49 | 33 |
| 2,5 | T33T | 7 | 3 | 201 | 201 | 53 | 40 |
| 5 | T33T | 8 | 1 | 201 | 201 | 201 | 34 |
| 5 | T33T | 8 | 2 | 201 | 201 | 201 | 32 |
| 5 | T33T | 8 | 3 | 201 | 201 | 201 | 31 |
| 0 | A29A | 9 | 1 | 201 | 50 | 20 | 11 |
| 0 | A29A | 9 | 2 | 201 | 57 | 15 | 10 |
| 0 | A29A | 9 | 3 | 201 | 43 | 17 | 13 |
| 0,1 | A29A | 10 | 1 | 201 | 201 | 11 | 11 |
| 0,1 | A29A | 10 | 2 | 201 | 201 | 13 | 15 |
| 0,1 | A29A | 10 | 3 | 201 | 201 | 15 | 13 |
| 0,25 | A29A | 11 | 1 | 201 | 201 | 19 | 15 |
| 0,25 | A29A | 11 | 2 | 201 | 201 | 17 | 11 |
| 0,25 | A29A | 11 | 3 | 201 | 201 | 16 | 13 |
| 0,5 | A29A | 12 | 1 | 201 | 47 | 28 | 45 |
| 0,5 | A29A | 12 | 2 | 201 | 54 | 32 | 34 |
| 0,5 | A29A | 12 | 3 | 201 | 40 | 30 | 39 |
| 0,75 | A29A | 13 | 1 | 201 | 39 | 38 | 44 |
| 0,75 | A29A | 13 | 2 | 201 | 22 | 37 | 52 |

| | | | | | | | |
|------|------|----|---|-----|-----|-----|-----|
| 0,75 | A29A | 13 | 3 | 201 | 31 | 40 | 37 |
| 1 | A29A | 14 | 1 | 201 | 201 | 31 | 31 |
| 1 | A29A | 14 | 2 | 201 | 201 | 27 | 30 |
| 1 | A29A | 14 | 3 | 201 | 201 | 35 | 29 |
| 2,5 | A29A | 15 | 1 | 201 | 201 | 9 | 201 |
| 2,5 | A29A | 15 | 2 | 201 | 201 | 10 | 201 |
| 2,5 | A29A | 15 | 3 | 201 | 201 | 12 | 201 |
| 5 | A29A | 16 | 1 | 201 | 201 | 201 | 201 |
| 5 | A29A | 16 | 2 | 201 | 201 | 201 | 201 |
| 5 | A29A | 16 | 3 | 201 | 201 | 201 | 201 |
