



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

ANÁLISIS DE LA FLUCTUACIÓN ESTACIONAL DE LA DIVERSIDAD  
MICROBIANA DE UN SUELO AGRÍCOLA UTILIZADO PARA EL CULTIVO DE  
CAÑA DE AZÚCAR: ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA Y  
METABÓLICA ASOCIADA A LAS DIFERENTES ETAPAS DE SU CULTIVO

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

**P R E S E N T A**

ADRIANA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor:** RAUL GENARO AGUILAR CABALLERO  
**VOCAL:**               **Profesor:** JOSE ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS  
**SECRETARIO:**       **Profesor:** JOSE ADELFO ESCALANTE LOZADA  
**1er. SUPLENTE:**     **Profesora:** LAURA CARMONA SALAZAR  
**2do. SUPLENTE:**     **Profesor:** FELIPE CRUZ GARCIA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA  
CELULAR Y BIOCATÁLISIS, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.**

### **ASESOR DEL TEMA:**

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

### **SUSTENTANTE:**

Adriana Vázquez Domínguez

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme una formación sólida.

Al Instituto de Biotecnología por permitirme conocer un verdadero ambiente de investigación.

Al Dr. José Adelfo Escalante Lozada, por darme la oportunidad de formar parte de este proyecto, por ser un excelente guía, su amable trato y siempre entusiasta compañía.

A Alejandra Vargas por las horas amenas de convivencia y porque siempre se preocupó en ayudarme cuando me veía en apuros.

A Larisa, Marco Antonio, Andrea y César, por todas las pláticas tan entretenidas.

A Mechita, por todo el apoyo que me dio desde el primer día que llegué.

A todos los miembros del Laboratorio Bolívar-Gosset.

A la Unidad de Secuenciación del IBT.

Al Ingeniero Juan Solano Zamora, Supervisor de calidad y al Ingeniero Héctor López de la Oficina de campo del Fideicomiso Comercializador (FICO).

Al Ingenio Emiliano Zapata, Zacatepec, Morelos, por su valioso apoyo para la obtención de las muestras de suelo analizadas en este proyecto.

El presente trabajo contó con el apoyo económico del proyecto Ciencia Básica CONACYT 106428.

## DEDICATORIAS

A mi familia que todo el tiempo me ha apoyado, no sólo en los estudios sino en todos los aspectos de mi vida. Gracias por su amor incondicional e infinita comprensión.

A Moomin, mejor conocida como Mariana Lozano, mi contraparte, hermana y eterna amiga. Juntas descubrimos el significado de una verdadera amistad que seguramente durará hasta el fin de nuestros días.

A Sam, por estar siempre, siempre, a mi lado. 大好き。

## Contenido

Resumen .....	1
1. Introducción .....	2
2. Generalidades .....	4
2.1 Estudio de la diversidad bacteriana y metabólica del suelo .....	4
2.2 Impacto de la actividad humana sobre la pérdida de la capacidad agrícola de los suelos: efectos negativos sobre su diversidad microbiana.....	9
2.3 Cultivo de caña de azúcar.....	12
3. Justificación, hipótesis y objetivos .....	16
Justificación .....	16
Hipótesis .....	16
Objetivo general.....	17
Objetivos particulares.....	17
4. Materiales y métodos.....	18
4.1 Toma de muestras .....	18
4.2 Aislamiento y purificación de microorganismos cultivables.....	18
4.3 Mantenimiento en ultracongelación.....	18
4.4 Extracción de ADN cromosomal .....	18
4.5 Amplificación por PCR de los genes ADNr 16S.....	19
4.6 ARDRA e identificación de aislados únicos .....	20
4.7 Purificación de los amplificados .....	20
4.8 Análisis de secuencias.....	21
Secuenciación de aislados únicos.....	21
Búsqueda de identidad de las secuencias de ADNr 16S .....	21
4.9 Perfil metabólico.....	21

Preparación de placas EcoPlate.....	21
5. Resultados y discusión.....	22
5.1 Ubicación de la zona de muestreo.....	22
5.3 ARDRA de aislados .....	26
5.4 Implicaciones biológicas de los grupos bacterianos detectados en las muestras T0-T2.....	44
5.5 Perfil metabólico determinado por el sistema EcoPlate .....	48
6. Conclusiones .....	53
7. Perspectivas .....	54
8. Referencias .....	54

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Mezcla de reacción de la PCR para amplificar ADNr 16S.....	19
<b>Tabla 2.</b> Mezcla de reacción utilizada para la digestión con <i>HaeIII</i> .....	20
<b>Tabla 3.</b> Cuenta microbiana presente en muestras analizadas.....	26
<b>Tabla 4.</b> Tipos ARDRA detectados en muestras de suelo T0 .....	30
<b>Tabla 5.</b> Tipos ARDRA detectados en muestra de suelo T1 .....	31
<b>Tabla 6.</b> Tipos ARDRA detectados en muestra de suelo T2.....	33
<b>Tabla 7.</b> Distribución de aislados identificados en las muestras de suelo T0-T2 .	39
<b>Tabla 8.</b> Índice de Shannon-Weaver y valor de <i>Evenness</i> .....	41
<b>Tabla 9.</b> Características relevantes de los principales microorganismos detectados en las muestras T0-T1 de suelo utilizado para cultivo de caña .....	45
<b>Tabla 10.</b> Perfil metabólico (patrón de uso de las 31 fuentes de carbono) de las muestras de suelo T0-T2 obtenido por el sistema EcoPlate.....	51

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estrategia del análisis de una muestra ambiental por técnicas dependientes del cultivo. ....	8
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de los diferentes ciclos que pueden estar involucrados en el cultivo de caña de azúcar. ....	15
<b>Figura 3.</b> Ubicación geográfica del campo de muestreo en la localidad de Lagunillas, Municipio de Tlaquitenango, Morelos. ....	22
<b>Figura 4.</b> Vista general del área de cultivo muestra T0, suelo arado (19 de Enero de 2010). ....	23
<b>Figura 5.</b> Vista general del área de cultivo muestra T1, durante la plantación de caña y recién regado (25 de Enero de 2010). ....	24
<b>Figura 6.</b> Vista general del área de cultivo muestra T2, después de la adición de herbicida y segundo riego (12 de Febrero de 2010). ....	25
<b>Figura 7.</b> Patrones de restricción generados con <i>HaeIII</i> (parte superior) y <i>Sau3AI</i> (parte inferior). ....	27
<b>Figura 8.</b> Digestiones con <i>HaeIII</i> que producen diferentes patrones de restricción. ....	28
<b>Figura 9.</b> Árbol construido por UPGMA de los tipos ARDRA detectados e identificados en las muestras T0-T2. ....	35
<b>Figura 10.</b> Abundancia relativa de tipos ARDRA detectados e identificados en las muestras T0-T2. ....	37
<b>Figura 11.</b> EcoPlate después de incubación por 96 horas. ....	48
<b>Figura 12.</b> AMR (A) y CMD (B) de las muestra T0, T1 y T2. ....	49

## Resumen

El cultivo de la caña de azúcar dio origen a un sistema agroindustrial que ocupa un lugar preponderante y trascendente en la actividad económica y social de México. A pesar de su importancia, existen problemas de diversa índole asociados al cultivo de la caña de azúcar; sin embargo, no existen reportes que consideren el efecto de las prácticas agrícolas empleadas sobre la diversidad bacteriana presente en los suelos utilizados durante su cultivo. En este trabajo se analizó la diversidad bacteriana cultivable, así como su perfil metabólico, presente en una muestra de suelo empleado para el cultivo de caña de azúcar en la localidad de Lagunillas, Municipio de Tlalquitenango, Estado de Morelos, durante tres etapas del ciclo de cultivo: 1) suelo recién arado; 2) después de plantar la caña y riego; 3) después de aplicar herbicida. La tipificación de los microorganismos se realizó mediante la técnica de ARDRA, mientras que para el análisis del perfil metabólico presente se utilizó el sistema EcoPlate de Biolog. El análisis de diversidad bacteriana a lo largo de las etapas de cultivo permitió detectar una presencia relativamente constante de especies pertenecientes a los grupos Firmicutes,  $\gamma$ -Proteobacterias y Bacteroidetes; principalmente del género *Bacillus*, y el aislado identificado como H (relacionado con *Pseudomonas*). El perfil metabólico de la comunidad microbiana mostró que no existen diferencias entre las muestras analizadas en este trabajo.

## 1. Introducción

La caña de azúcar es la principal fuente de obtención de azúcar a nivel mundial y nacional. En nuestro país, el cultivo de caña se realiza en 15 Estados y en la zafra 2009 – 2010 tuvo una molienda de 43 millones 370 mil 288 toneladas de caña, se produjeron cuatro millones 825 mil 539 toneladas de azúcar, con 647 mil 937 hectáreas industrializadas, y 57 ingenios que operaron. Su cultivo representa una actividad de gran importancia desde el punto de vista agrícola, comercial y como fuente de empleos. El cultivo de caña de azúcar ha presentado históricamente en nuestro país problemas muy importantes de diversa índole. En lo concerniente al proceso de cultivo, destacan problemas asociados al riego y la disponibilidad de agua; disponibilidad de nutrientes en el suelo, fertilización, presencia y control de malezas y plagas. Aunque se han desarrollado diversas estrategias que resuelven satisfactoriamente muchos de estos problemas, no existen reportes que consideren el efecto de las prácticas agrícolas empleadas durante el cultivo de caña de azúcar sobre la diversidad bacteriana presente en los suelos utilizados para su cultivo.

De todos los organismos presentes en el suelo, las bacterias son sin duda alguna el componente más abundante y probablemente, uno de los más importantes. Como resultado de la actividad microbiana, la materia orgánica e inorgánica del suelo (carbón, nitrógeno y azufre) y el nitrógeno y CO<sub>2</sub> del aire, entra a los ciclos biogeoquímicos y son oxidados y reducidos por diferentes microorganismos para satisfacer sus requerimientos nutricionales. Los efectos de las prácticas de manejo de suelos agrícolas aunadas a los factores naturales que causan también la alteración de sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, pueden tener un impacto muy importante sobre la actividad de las poblaciones microbianas presentes.

Este estudio es parte de la primera aproximación que se lleva a cabo para obtener información sobre la diversidad bacteriana y del perfil metabólico asociado, presentes en un suelo utilizado para cultivo de caña de azúcar ubicado en la localidad conocida como Lagunillas, Municipio de Tlalquitenango, Estado de Morelos, permitiendo con esto (1) la identificación de aquellos grupos que se puedan considerar como dominantes e indicadores del tipo de suelo, durante las primeras etapas del ciclo de cultivo y de las variaciones en el perfil fisicoquímico del suelo. La integración de esta información permitirá elaborar hipótesis sobre la importancia de la presencia de los microorganismos identificados en el suelo utilizado para el cultivo de caña de azúcar; y (2) la creación de una colección bacteriana de referencia para este tipo de suelo.

## **2. Generalidades**

### **2.1 Estudio de la diversidad bacteriana y metabólica del suelo**

El suelo representa uno de los ambientes más importantes sobre la Tierra ya que en él tiene lugar el desarrollo de muchos procesos determinantes para el sustento de la vida sobre nuestro planeta. Los suelos se forman como resultado de una combinación de procesos físicos, químicos y biológicos, que en su conjunto, generan una meteorización del material original (rocas, arena, sedimentos, etc.), que hacen que el suelo adquiera una mayor complejidad, constituida por una gran variedad de microhábitats. Éstos se caracterizan por la presencia de gradientes fisicoquímicos y condiciones ambientales discontinuas que permiten el desarrollo de diferentes formas de vida a ambos lados de su superficie. La actividad combinada de los seres vivos que habitan el suelo (plantas, animales y microorganismos), enriquecen de forma importante la cantidad de nutrientes, agua y aire presentes, generándose así, un ciclo dinámico que mantiene la vida en ellos y en una escala funcional mayor, hacen posible la vida sobre la superficie de la Tierra (Madigan and Martinko, 2006; Tortora *et al.*, 2006).

El suelo es un sistema muy complejo que comprende una variedad de microhábitats en donde viven en conjunto microorganismos con límites más o menos definidos, interaccionando entre ellos y con otros componentes de la biota del suelo. Las bacterias son un componente crucial de la biósfera debido a que catalizan procesos que mantienen la vida en la Tierra y son, por tanto, los motores de los ciclos biogeoquímicos (Torsvik *et al.*, 2002; Torsvik and Øvreås, 2002). El estudio de la diversidad bacteriana y de los procesos en los que participa, es por lo anterior de gran importancia, no tan solo desde punto de vista ecológico, sino también, en el contexto agrícola y biotecnológico.

Tradicionalmente los microorganismos se han caracterizado en base a características fenotípicas, propiedades celulares observables y estructura de componentes celulares. Debido a que su cultivo es un prerrequisito para examinar

dichas propiedades, la mayoría de los microorganismos no puede ser caracterizada en su medio natural, por lo que se vuelve imposible determinar la diversidad bacteriana total de una muestra ambiental. Se estima que la fracción de la comunidad bacteriana del suelo que puede ser cultivada está entre 0.1 y 1% del total; utilizando métodos moleculares se ha podido detectar una diversidad considerablemente mayor. Por esto, el uso de técnicas moleculares para la detección y análisis de microorganismos en el medio ambiente ha ido en aumento constante (Escalante *et al.*, 2001; Smit *et al.*, 2001). Mientras que la tipificación de aislados y clonas parece ser más adecuado para el estudio a detalle de la diversidad bacteriana cultivable, estos métodos pueden no ser adecuados para observar cambios estacionales. Para éste propósito se necesita el análisis de grandes números de aislados o clonas. Para obtener la mayor cantidad de información posible, el análisis de la diversidad microbiana se debe de realizar utilizando un enfoque polifásico que abarque la parte dependiente y la no dependiente del cultivo.

Aislar microorganismos del medio ambiente es el primer paso en el análisis de la diversidad bacteriana presente y para la detección de productos naturales como metabolitos secundarios y enzimas (Figura 1). Desafortunadamente, ningún método de aislamiento puede revelar el número y la variedad total de microorganismos presentes en una muestra. Es posible aislar varios microorganismos distintos mediante técnicas de enriquecimiento o incluso se puede llevar a cabo aislamiento de una sola célula por métodos capilares. Sin embargo, dichas técnicas de enriquecimiento normalmente requieren una gran cantidad de tiempo, trabajo y dinero, mientras que sólo unas pocas especies de un género particular crecen de la muestra. También, los procedimientos podrían requerir modificaciones para ajustarse al crecimiento y metabolismo de géneros distintos, y esto suele ser costoso y tardado. Por esto se requiere una propuesta de aislamiento más enfocado pero menos específico.

Algunos microbiólogos afirman que ya no existe la necesidad de aislar microorganismos pues se pueden aislar ADN y genes de interés directamente del medio ambiente, clonarlos, y realizar ensayos para actividades específicas. Sin embargo, no todos los procesos y productos microbianos pueden ser clonados y expresados en *Escherichia coli* o *Pichia* ssp (dos de los hospederos más ampliamente utilizados para la creación de bancos metagenómicos). Un enfoque exitoso en el descubrimiento de productos naturales como antibióticos y enzimas incluye el considerar las características del producto deseado y el desarrollo del proceso. El uso de métodos ecofisiológicos en el aislamiento puede brindar un análisis con una gran cantidad y variedad de microorganismos a examinar para el producto de interés.

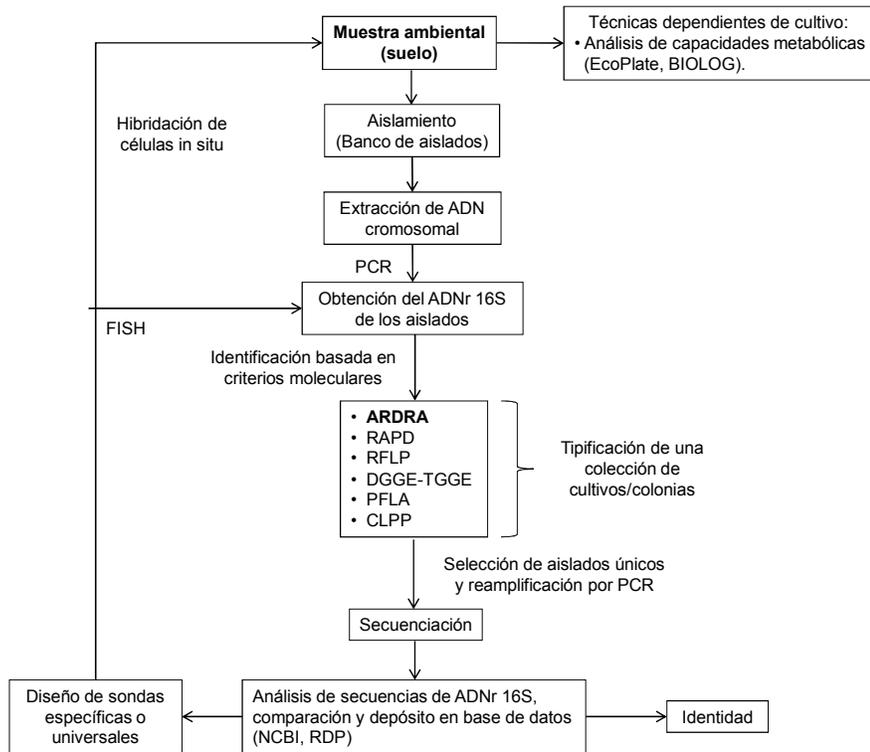
A pesar de la gran adaptabilidad de los microorganismos, grupos microbianos específicos están asociados a diferentes nichos o muestras dentro de un ecosistema específico. Si se muestrea sistemáticamente diferentes nichos dentro de un ecosistema específico, una mayor diversidad microbiana puede ser aislada. La selección del medio, diluyentes, condiciones de incubación, y manejo de muestras determinan el número y tipo de microorganismos aislados de plantas, suelo y agua. Por esto, lo que se aísla del ecosistema o hábitat definido es un reflejo de los procedimientos y condiciones de aislamiento establecidos por el microbiólogo, así como de las condiciones fluctuantes encontradas en la naturaleza.

Algunas reglas generales para aplicar enfoques ecológicos en el aislamiento se enlistan a continuación y pueden aplicarse generalmente en el aislamiento de cualquier grupo de microorganismos en particular (Demian, 1997):

1. Enlistar los grupos de microorganismos a ser aislados.
2. Describir el ecosistema o hábitat en donde se colectarán las muestras.
3. Agrupar las muestras por tipos (plantas, suelos, rocas, etc.).

4. Enlistar los parámetros naturales a ser considerados y medidos, como pH, salinidad, temperatura, composición del suelo.
5. Considerar las limitantes en las condiciones al realizar un escalamiento.
6. Enlistar los substratos naturales en el ecosistema.
7. Designar las técnicas de aislamiento en base a los datos obtenidos en los pasos 1 a 6.
8. Evaluar los métodos ecofisiológicos de aislamiento utilizando como control los métodos estándar.
9. Modificar procedimientos conocidos dependiendo de los requerimientos de los parámetros ecológicos de la muestra a examinar.
10. Utilizar procedimientos de enriquecimiento específicos para grupos microbianos que puedan ser de interés.

Por otro lado, la caracterización de la diversidad metabólica de un ambiente permite identificar las actividades microbianas predominantes y puede ser utilizada como un indicador de su funcionalidad. Una de las aproximaciones metodológicas desarrolladas y aplicadas para este fin es el análisis del perfil metabólico de una muestra por medio de la determinación de algunos marcadores específicos como son el perfil de ácidos grasos de membrana (PFLA, por sus siglas en inglés), o el perfil fisiológico a nivel de comunidad (CLPP, por sus siglas en inglés) (Figura 1). El PFLA y el CLPP no son aproximaciones dependientes de técnicas moleculares basadas en la extracción del metagenoma bacteriano, pero tampoco dependen de la capacidad de poder crecer a los microorganismos en un medio de cultivo. El PFLA permite el análisis de la variabilidad de los ácidos grasos presentes en las membranas celulares de diferentes organismos y se basa en la extracción y análisis de los lípidos por cromatografía de gases para determinar el tipo y concentración de cada uno. Ciertos tipos de PLFA se han utilizado como marcadores específicos para ciertos grupos microbianos, p. e. bacterianos y fúngicos. De este modo, la relación entre los PLFA bacterianos:fúngicos, es utilizada como un índice de la abundancia relativa de estos dos grupos saprofitos del suelo (Torsvik, 2002; Handelsman, 2004; Leckie, 2005).



**Figura 1.** Estrategia del análisis de una muestra ambiental por técnicas dependientes del cultivo.

Abreviaciones: NCBI, National Center for Biotechnology Information; RDP, Ribosomal Database Project; FISH, hibridación fluorescente *in situ*; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; ARDRA, análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado; RAPD, amplificación aleatoria de ADN; T-RFLP, polimorfismo de fragmentos de restricción terminales; DGGE, electroforesis desnaturizante de gradiente en gel; PFLA, perfil de ácidos grasos de membrana; CLPP, perfil fisiológico a nivel de comunidad.

El CLPP es una aproximación utilizada para comparar comunidades microbianas basado en sus capacidades fisiológicas. El CLPP puede ser evaluado directamente de muestras de suelos por medición de la capacidad de catabolizar sustratos específicos o por la producción de CO<sub>2</sub>. Se han desarrollado, estrategias que facilitan este análisis, como es el uso de la microplaca de 96 pozos EcoPlate de Biolog, la cual contiene 31 sustratos diferentes con un control sin fuente de carbono. Cada pozo de estas placas contiene el indicador violeta de tetrazolio, el cual es reducido durante el proceso de degradación del sustrato, causando el desarrollo de un color, cuya intensidad medida espectrofotométricamente, es proporcional a la capacidad de degradación de una determinada fuente de carbono. La actividad metabólica asociada a la diversidad bacteriana presente en una muestra de suelo ha sido utilizada como un indicador de su funcionalidad. Se ha propuesto que las modificaciones en las características metabólicas de la diversidad microbiana, pueden preceder a cambios detectables en las propiedades fisicoquímicas del suelo, por lo que esta característica puede ser utilizada con fines prácticos como un indicador de posibles síntomas de mejoramiento o degradación del suelo (Torsvik and Øvreås, 2002; Handelsman, 2004; Benizri and Amiaud, 2005; Leckie, 2005; Gomez *et al.*, 2006).

## **2.2 Impacto de la actividad humana sobre la pérdida de la capacidad agrícola de los suelos: efectos negativos sobre su diversidad microbiana.**

La aplicación de diferentes tecnologías para la producción de cultivos que satisfagan las demandas de alimentación humana y animal en diferentes partes del mundo, ha tenido un impacto negativo muy importante sobre las características fisicoquímicas y biológicas de los suelos utilizados para su cultivo, debido principalmente a la continua remoción de nutrientes y por el uso intensivo de fertilizantes y pesticidas asociados a la actividad agrícola, resultando en problemas serios de salinización (principalmente asociada a estrategias de irrigación y disponibilidad de agua con una cantidad de sales), acidificación y contaminación de los suelos.

La pérdida de nutrientes y /o materia orgánica inducida por el hombre, ocurre si la agricultura es practicada en suelos pobres o moderadamente fértiles sin la aplicación de abonos o fertilizantes químicos. Esta situación cusa una degradación general de los suelos generando bajos rendimientos en la producción de cultivos. La pérdida de nutrientes en los suelos es un fenómeno generalizado y de gran importancia, sobre todo en países con prácticas agrícolas en las que son reducidas las cantidades de químicos (fertilizantes químicos, insecticidas y herbicidas) (low-input agriculture), aplicadas al suelo y que están por debajo de las dosis comúnmente recomendadas, sin que esto signifique la completa eliminación de su aplicación. Este tipo de prácticas tiene como objetivo por un lado, mantener los rendimientos haciendo énfasis en muchos casos en prácticas tradicionales y por otro, para reducir los costos asociados al cultivo, minimizar el impacto sobre el ambiente o bien debido a la posibilidad del establecimiento de regulaciones estrictas al uso de cierto tipo de pesticidas.

La expansión de áreas de suelo para uso agrícola en respuesta una mayor demanda de cultivos ha tenido como consecuencia, la eliminación de la vegetación que rodea las zonas de uso agrícola, lo que favorece su erosión como consecuencia de la acción de los vientos y la filtración del agua. Esta situación ha llevado en casos extremos, a la pérdida de la capacidad agrícola de regiones geográficas muy extensas tales como la Meseta de Loess en China, en donde el suelo de un área agrícola de más de 210 000 Km<sup>2</sup> sufrió serios problemas de erosión con la consecuente disminución de su producción agrícola. Los países desarrollados enfrentan también otra serie de problemas asociados a la aplicación de prácticas agrícolas intensivas a gran escala, en las que los rendimientos obtenidos dependen del uso de fertilizantes y pesticidas (high-input agriculture). Por otro lado, la tecnificación de las áreas agrícolas ha tenido como consecuencia del uso de tractores y cosechadoras la compactación de la capa de suelo. Este problema en particular se estima que ha afectado a unas 33 millones de hectáreas de cultivo en Europa (Oldeman *et al.*, 1991).

Los efectos de las prácticas de manejo de suelos agrícolas aunadas a los factores naturales que causan también la alteración de sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, pueden tener un impacto muy importante sobre la actividad de las poblaciones microbianas presentes. El análisis de la diversidad microbiana presente en muestras de suelo utilizando estrategias dependientes e independientes de cultivo (Figura 1), han permitido obtener diversas evidencias del impacto negativo de la actividad agrícola sobre la diversidad y actividad microbianas presentes en diferentes. El estudio de la variación estacional de la diversidad bacteriana detectada en un suelo agrícola experimental por análisis de secuencias de ADNr 16S amplificadas a partir del metagenoma del suelo complementado con técnicas de cultivo tradicional, PLFA y por análisis de los perfiles totales de fragmentos de ADNr 16S por DGGE, demostró variaciones importantes en la proporción de bacterias Gram-positivas, proteobacterias, nitrosporas, cianobacterias y bacterias verde-sulfurosas, asociadas a las etapas de arado, fertilización y cosecha (Smit *et al.*, 2001). La caracterización por PFLA y de la composición microbiana total y de bacterias amonio-oxidantes por DGGE en zonas de alta a baja precipitación que son utilizadas para fines agrícolas con diferentes prácticas de cultivo, demostraron un efecto negativo importante en suelos labrados convencionalmente sobre el PFLA y los perfiles de ADNr 16S totales, mientras que no mostró un efecto importante sobre la diversidad de bacterias amonio-oxidativas (relacionadas a *Nitrospora*) (Ibekwe *et al.*, 2002). El análisis de la complejidad genómica presente en suelo para cultivo y determinada por la técnica de reasociación del metagenoma bacteriano extraído y desnaturalizado térmicamente, demostraron que la aplicación de fertilizantes causó una disminución de hasta un 96% en la diversidad genómica microbiana respecto a la determinada para suelos circundantes sin uso agrícola (Øvreås *et al.*, 1998; Torsvik, 2002). Por otro lado el estudio del efecto del uso de herbicidas, como el glifosato e imazaquim, sobre la diversidad bacteriana asociada al rizoplasma y la nodulación de cultivos de soja analizada por la técnica de DGGE, tiene un efecto diferencial sobre la biomasa bacteriana, demostrando que el glifosato es particularmente tóxico para bacterias relacionadas con *Herbaspirillum*,

mientras que el imazaquim afecta preferencialmente a microorganismos relacionados con *Ralstonia* (Zilli *et al.*, 2007). El caso de la sensibilidad microbiana al glifosato, es de particular interés ya que este compuesto inhibe la actividad de la enzima 3-fosfoshikimato-1-carboxivinil transferasa (Pesticide Management Education Program), codificada por el gen *aroA* (en *E. coli*) y que cataliza la reacción de shikimato-3-P a 5-enol-piruvil-shikimato-3-P (EPSP), en la vía común de síntesis de compuestos aromáticos. Es importante destacar que esta vía es una característica metabólica común en plantas y bacterias (Herrmann and Weaver, 1999), por lo que los efectos potenciales de este herbicida sobre la vía de síntesis de metabolitos aromáticos en bacterias pueden tener efectos muy importantes sobre la diversidad microbiana presente en suelos tratados con este compuesto.

### **2.3 Cultivo de caña de azúcar**

A pesar de la importancia del cultivo de caña de azúcar desde el punto de vista agrícola, comercial y como fuente de empleos, existen problemas muy importantes de diversa índole asociados a su cultivo, entre los que destacan: (a) altos inventarios de azúcar, (b) importación desmedida de jarabes fructosados, (c) controversias en el tratado de libre comercio con América del Norte que impiden la exportación de azúcar a los Estados Unidos, (d) bajo precio de azúcar en el mercado internacional, (e) falta de financiamientos para nuevas fábricas y trabajo de campo, (f) regulación del mercado interno y, (g) falta de proyectos de investigación que promuevan el desarrollo de nuevas variedades de caña, la obtención de paquetes tecnológicos y la capacitación de técnicos y productores.

Aunados a estos factores, existe una serie de problemas asociados al lento crecimiento de la planta y consecuentemente el rendimiento del cultivo de caña y también, de forma importante, de factores ambientales en los que se desarrolla la planta (Salgado *et al.*, 2001). Las variedades de caña de azúcar cultivadas comercialmente pertenecen a la familia de las gramíneas y comprenden diferentes especies del género *Saccharum* que han sido modificadas genéticamente para la

obtención de híbridos interespecíficos entre *S. officinarum* y *S. spontaneum*. La caña de azúcar es una de las plantas más rústicas y resistentes a las condiciones adversas del medio, de tal manera que se adapta a condiciones ambientales muy diversas y en ocasiones extremas. Se cultiva tanto en terrenos arcillosos muy pesados y así como en suelos extremadamente arenosos, predominando los suelos de tipo fluvisol, vertisol, gleysol, histosol y ultisol bajo diferentes condiciones climáticas (FICO, comunicación personal).

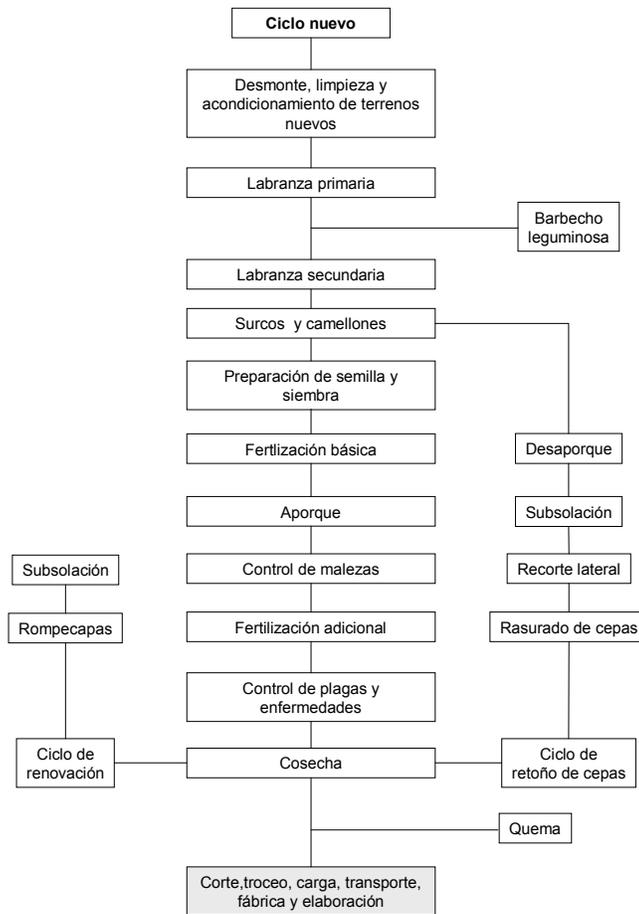
El cultivo de caña es un proceso que comprende varios ciclos (Figura 2):

1. Cultivo a partir de suelos vírgenes (ciclo nuevo). En este caso, la cosecha tendrá lugar aproximadamente de 14 a 18 meses después de la siembra del cultivo nuevo. También se le conoce como plantilla y es seguido de ciclos de retoño de cepas o socas.
2. Cultivo a partir de retoños de cepas (ciclo de retoños). Este ciclo toma 12 meses después de la cosecha anterior. De esta manera, la caña sigue produciendo durante 6 años o más.
3. Cultivo a partir de renovación de cepas (ciclo de renovación). Este ciclo de cultivo comienza con la destrucción de las cepas viejas mediante el proceso de barbecho. Seguido de una operación de subsolación, siguen la preparación del terreno y otras opciones similares a las del ciclo de cultivo nuevo.

El punto de partida para el cultivo de caña es la preparación de las tierras de cultivo, en donde las labores mecánicas de preparación son muy importantes para asegurar una buena germinación y un mejor aprovechamiento de los fertilizantes: limpia del terreno de malezas, nivelación, subsoleo, barbecho, rastreo, levantamiento topográfico y surcado. La preparación de la semilla y la siembra se realiza actualmente por dos métodos de siembra, el directo a partir de trozos de caña y el de trasplante, a partir de plántulas de 1 a 1.5 meses de edad. Las fechas de siembra varían según las regiones agro-climáticas del país. Una fecha es entre junio-agosto y la otra es entre noviembre-febrero, temporada considerada como más conveniente por el mejor aprovechamiento de en la humedad y temperatura,

además de que favorece las labores de cultivo. Finalmente, las labores de cultivo, se refieren a aquellas actividades que deben de realizarse después de la germinación y que favorecen que el cultivo se desarrolle de manera sana y vigorosa y comprenden: el cultivo para control y eliminación de malezas que se realiza cuando la planta alcanza 15 cm de altura; aporque, proceso mecánico sobre el suelo que tiene como finalidad darle a los tallos pequeños un mayor soporte para favorecer así el enraizamiento y para que el amacollamiento sea más vigoroso, esta operación se realiza cuando la planta alcanza los 40-50 cm de altura; redondeo, acción mecánica que tiene la finalidad de definir la forma de los surcos para asegurar una buena circulación de agua y; chapoleo, eliminación de la maleza que se desarrolla en el terreno después del redondeo.

Existen factores como el riego y la disponibilidad de agua; disponibilidad de nutrientes en el suelo, fertilización, presencia y control de malezas y plagas, que se ha determinado afectan de forma importante el cultivo de la caña de azúcar. En la actualidad existen diferentes estrategias que han permitido mantener estos factores dentro de parámetros que aseguran el buen desarrollo de un cultivo, sin embargo, es importante destacar que no existen en la literatura reportes sobre la diversidad bacteriana asociadas a suelos empleados para el cultivo de caña, ni sobre el papel de este componente biológico en relación a las diferentes etapas de su cultivo.



**Figura 2.** Representación esquemática de los diferentes ciclos que pueden estar involucrados en el cultivo de caña de azúcar.

### **3. Justificación, hipótesis y objetivos**

#### **Justificación**

Este estudio forma parte de una línea de investigación desarrollada en el Instituto de Biotecnología, UNAM que tiene como finalidad el análisis de la diversidad bacteriana asociada a diferentes etapas del cultivo de caña de azúcar por medio de un enfoque polifásico que incluye el estudio de la diversidad bacteriana por métodos dependientes e independientes de cultivo, perfil metabólico de la muestra y cambios en el perfil fisicoquímico del suelo utilizado para el cultivo.

Con este estudio se obtendrá por primera vez información sobre la diversidad bacteriana y del perfil metabólico asociados presentes en un suelo utilizado para cultivo de caña de azúcar, permitiendo con esto la identificación de aquellos grupos que se puedan considerar como dominantes e indicadores del tipo de suelo, de las etapas asociadas al ciclo de cultivo. La integración de esta información permitirá definir la importancia de la presencia de los microorganismos identificados en el suelo utilizado para el cultivo de caña de azúcar. Se obtendrá una colección de bacterias cultivables que servirá como referencia para este tipo de suelo.

#### **Hipótesis**

Las actividades agrícolas que conforman un ciclo nuevo de cultivo de caña de azúcar afectarán la composición de la diversidad bacteriana, y sus propiedades metabólicas asociadas, presente en el suelo utilizado para su cultivo.

### **Objetivo general**

Realizar un estudio de los cambios en composición de la diversidad bacteriana y de su perfil metabólico global presentes en el suelo utilizado para cultivo de caña de azúcar, asociados a las diferentes etapas de su cultivo.

### **Objetivos particulares**

- Aislamiento en medio soya-triptona de bacterias presentes en el suelo utilizado para el cultivo de caña de azúcar de la localidad de Lagunillas, Municipio de Tlalquitenango, Estado de Morelos, en diferentes etapas de su cultivo: 0, suelo recién arado; 1, después de plantar la caña y riego; 2, después de aplicar herbicida Gesapax H 375 de Syngenta.
- Purificación de aislados y tipificación por la técnica de ARDRA.
- Secuenciación de aislados únicos e identificación por comparación con la base de datos no redundantes del NCBI (GenBank).
- Analizar el perfil metabólico de cada muestra colectada (0-2) por medio del sistema EcoPlate de Biolog.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1 Toma de muestras**

Las muestras de suelo fueron tomadas de una parcela utilizada para el cultivo de caña de azúcar ubicada en la localidad conocida como Lagunillas, Municipio de Tlalquitenango, Morelos (Figura 3); esta parcela posee un tipo de suelo vertisol.

Se tomaron 5 muestras de alrededor de 1kg de suelo en distintos puntos de la parcela y se mezclaron homogéneamente; el suelo se extrajo a 30cm de profundidad con una barreta. Se transportó al laboratorio y se almacenó a 4°C hasta su análisis.

### **4.2 Aislamiento y purificación de microorganismos cultivables**

Se realizaron diluciones seriales de 10mL (por triplicado) a partir de 10g de las muestras de suelo fresco en agua triptonada 0.1% y se plaquearon alícuotas de 0.1ml (por duplicado) en agar (DIFCO) soya-triptona (AST) suplementado con 100 µg cicloheximida (Fluka) por mL como inhibidor de crecimiento fúngico, hasta una dilución de  $10^{-10}$ . Las placas se incubaron a 30°C y se contaron a los días 2, 3 y 5.

Para el aislamiento y purificación de la diversidad cultivable se seleccionaron las placas de la dilución que presentó de 25 a 250 UFC/mL; se picaron y transfirieron 100 UFC a una nueva placa de AST. Cada aislado se inoculó en tubos conteniendo 3mL de caldo ST + cicloheximida y se incubó a 30°C durante 24h.

### **4.3 Mantenimiento en ultracongelación**

Se tomó 1mL del caldo ST inoculado con los aislados y se transfirió a un criotubo al cual se le adicionó 1mL de glicerol 50% (Baker). Estos criotubos se almacenaron a -70°C.

### **4.4 Extracción de ADN cromosomal**

Se realizó un cultivo de cada aislado en 4 ml de caldo ST incubando a 30°C por 24h. Para la extracción del ADN cromosomal se utilizó el kit de extracción UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (Mobio Laboratories Inc.) siguiendo las

especificaciones del fabricante. El principio de este kit es lisar a los microorganismos mediante una combinación de detergente y fuerza mecánica. El ADN liberado se captura en un filtro de sílica dentro de una columna, se enjuaga y se recupera en un buffer.

#### 4.5 Amplificación por PCR de los genes ADNr 16S

El ADN cromosomal extraído se utilizó como templado para amplificar por PCR los ADNr 16S bacterianos presentes en la muestra en un termociclador (Perkin Elmer modelo 9600) utilizando la enzima TaqDNA Polymerase (Fermentas) y el par de primers universales para ADNr 16S (Fw fD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y Rv rD1: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'), los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 1500 pb (Weisburg *et al.*, 1991). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 min., 30 ciclos de amplificación: 95°C durante 1 min., 42°C durante 1 min, 72°C durante 2 min., y un ciclo de elongación final durante 5 min. Se verificó la presencia del producto esperado en un gel de agarosa 1.2%. En la tabla 1 se muestra la mezcla de reacción utilizada y cada uno de los componentes para las PCR que se llevaron a un volumen final de 50µL.

**Tabla 1.** Mezcla de reacción de la PCR para amplificar ADNr 16S

Componente	Volumen/concentración
ADN cromosomal	1µL
dNTP's 10mM	1µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3µL
Primer Fw fD1	0.5µM*
Primer Rv rD1	0.5µM*
Buffer 10X	5µL
TaqDNA Pol 5U/µL	0.5µL
Agua MQ	38.3µL

\*Concentración final

#### 4.6 ARDRA e identificación de aislados únicos

Se determinó la concentración de ADN mediante el equipo espectrofotómetro (NanoDrop, 200C Spectrophotometer, Thermo Scientific), para estandarizar la concentración a utilizar en las digestiones. Los amplicones se sometieron a un ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) con la enzima *HaeIII* (Fermentas) (Tabla 2), las reacciones se incubaron durante 1 hora a 37°C. Para observar los patrones de restricción se realizó una electroforesis de las muestras en un gel de agarosa al 2.5%, los cuales se visualizaron en un fotodocumentador (Molecular Imager GelDoc™XR+ Image System, BioRad). Las clonas que presentaron un patrón de restricción único fueron reamplificadas, purificadas y enviadas a secuenciar.

**Tabla 2.** Mezcla de reacción utilizada para la digestión con *HaeIII*

Componente	Volumen
ADN amplificado	100ng/ $\mu$ L
Enzima <i>HaeIII</i>	1 $\mu$ L
Buffer 2 10X	2 $\mu$ L
Agua MQ	X $\mu$ L
TOTAL	20 $\mu$ L

#### 4.7 Purificación de los amplificados

Se utilizó el kit de purificación High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE) siguiendo las especificaciones del fabricante.

El principio de este kit se basa en mezclar la muestra con una sal caotrópica y aplicarla a un tubo conteniendo el filtro de fibra de vidrio. Bajo las condiciones del buffer utilizadas en este procedimiento, todos los ácidos nucleicos en la muestra se unen al filtro del tubo, mientras que las sustancias contaminantes (sales, proteínas, nucleótidos, aceites minerales y otros) no se unen. Los pasos breves de lavado y centrifugado remueven rápidamente estos contaminantes. Una vez

purificados, los ácidos nucleicos pueden ser eluidos fácilmente en un volumen pequeño de buffer bajo en sal.

#### **4.8 Análisis de secuencias**

##### **Secuenciación de aislados únicos**

La secuenciación se llevó a cabo por el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing. Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730, en la unidad de secuencia del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para secuenciar se utilizó el producto de PCR a concentraciones de 100ng, los primers utilizados fueron Fw fD1 y Rv rD1, a una concentración de 10pmol para cada clona.

##### **Búsqueda de identidad de las secuencias de ADNr 16S**

Las secuencias obtenidas para cada aislado (hebra forward + hebra reverse) se ensamblaron utilizando la aplicación ClustlaW del programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Las secuencias obtenidas y compuestas por las hebras Fw y Rw se compararon con las depositadas en la base de datos de secuencias de nucleótidos no redundante del GeneBank mediante el programa Blast, utilizando las herramientas en línea de la página del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para conocer su identidad.

#### **4.9 Perfil metabólico**

##### **Preparación de placas EcoPlate**

Se prepararon diluciones seriales de 12mL a partir de 10g de las muestras de suelo fresco en agua triptonada 0.1%. Tomando en consideración los resultados de cuenta de UFC's en placa, se utilizó la dilución representativa por muestra para inocular las placas EcoPlate (BIOLOG). Se empleó una pipeta multicanal para transferir 100µL de la dilución a cada uno de los 96 pozos de la placa. Las lecturas se realizaron en un equipo lector de placas (Versanax Tunable Microplate reader, Molecular Devices) a 590nm, cada 24hrs durante 5 días (incluyendo el tiempo 0).

## 5. Resultados y discusión

### 5.1 Ubicación de la zona de muestreo

La Figura 3 muestra la ubicación geográfica de la zona de muestreo y en las figuras 4-6 se muestran imágenes de la zona durante la toma de muestra T0, T1 y T2.



**Figura 3.** Ubicación geográfica del campo de muestreo en la localidad de Lagunillas, Municipio de Tlaquitenango, Morelos.

En el recuadro se muestra la zona utilizada para cultivo con coordenadas de ubicación geográfica correspondientes a los puntos blancos. El valor de 933 y 921m corresponde a la altura sobre el nivel de mar. Imagen e información obtenidas de Google Earth.



**Figura 4.** Vista general del área de cultivo muestra T0, suelo arado (19 de Enero de 2010).

Trabajadores del Ingenio Cañero Emiliano Zapata apoyando en toma de muestras.



**Figura 5.** Vista general del área de cultivo muestra T1, durante la plantación de caña y recién regado (25 de Enero de 2010).



**Figura 6.** Vista general del área de cultivo muestra T2, después de la adición de herbicida y segundo riego (12 de Febrero de 2010).

## 5.2 Aislamiento e identificación de microorganismos

El análisis de las muestras de suelo de cultivo de caña permitió determinar que la carga microbiana presente en el suelo recién arado está en el orden de  $10^4$  UFC/mL. Después de sembrar y regar el terreno se puede observar un incremento en un orden de magnitud (a  $10^5$  UFC/mL), probablemente debido a que la humedad presente en el suelo posterior al riego favorece el crecimiento de microorganismos (Tabla 3).

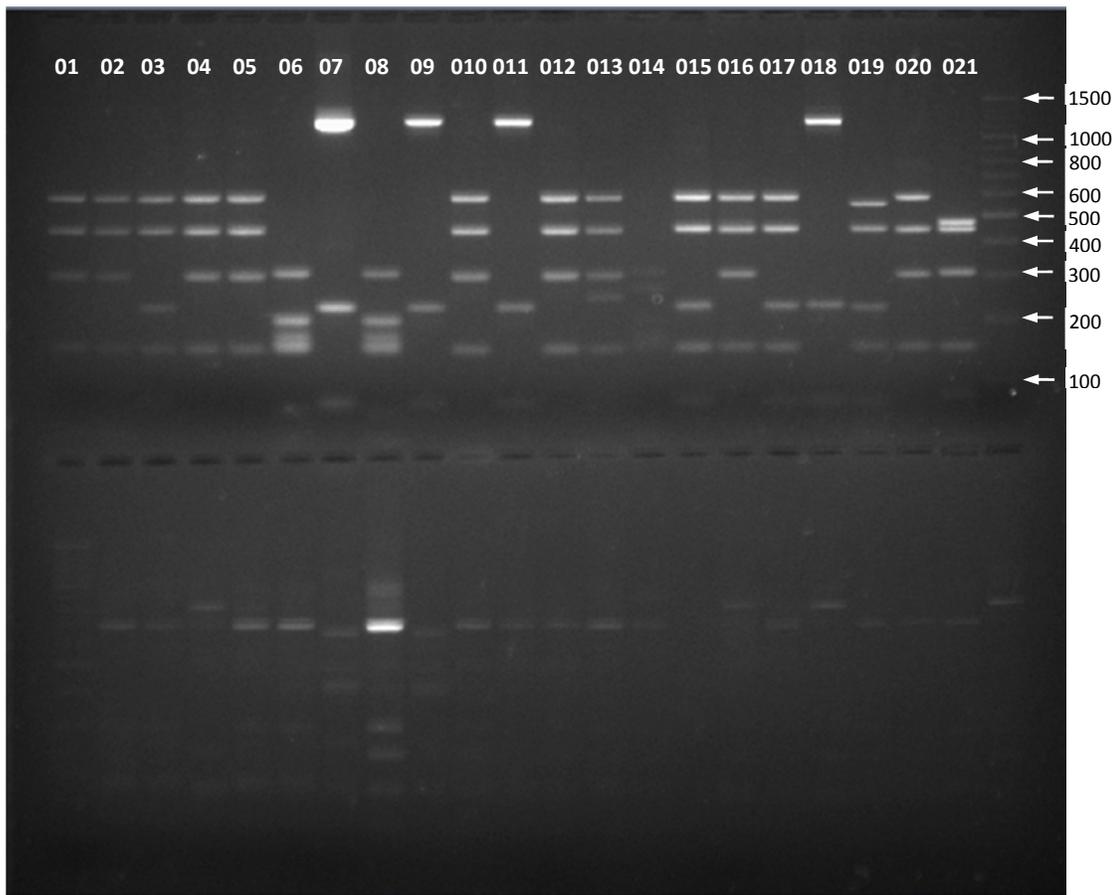
**Tabla 3.** Cuenta microbiana presente en muestras analizadas.

Muestra	UFC/mL	Colonias aisladas	Fecha de muestreo	Condición del suelo
T0	$86 \times 10^4$	79	19-enero-10	Recién arado
T1	$56 \times 10^5$	99	25-enero-10	Después de siembra y riego
T2	$11.2 \times 10^5$	100	12-febrero-10	Después de aplicación de herbicida

De la caja Petri representativa de la serie de diluciones de cada muestra se aislaron y purificaron 100 UFC, las cuales se crecieron en 3ml de caldo nutritivo, y a partir de éstas se extrajo el ADN cromosomal para ser utilizado en la tipificación por ARDRA.

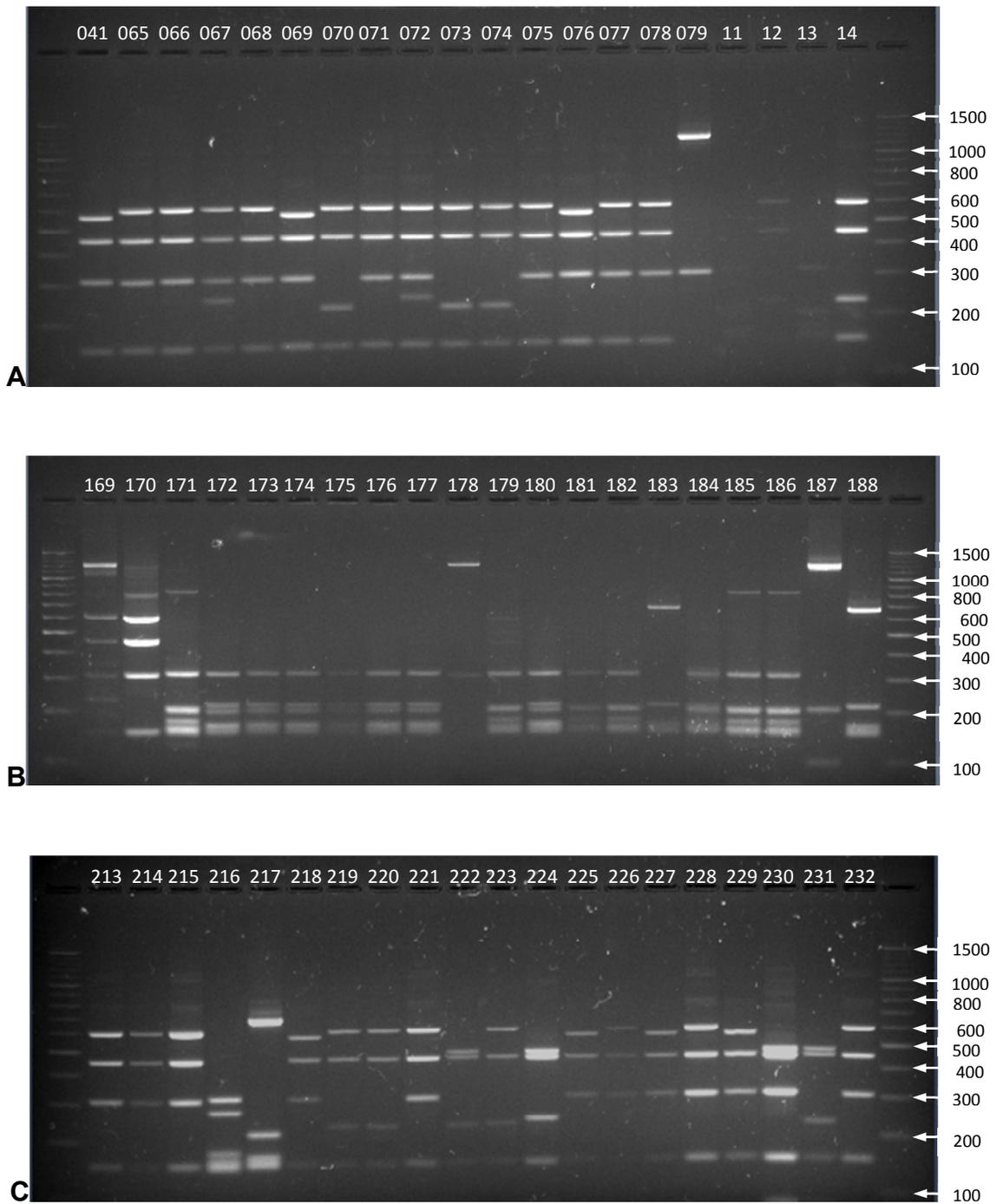
## 5.3 ARDRA de aislados

Este análisis permitió la identificación de tipos únicos basados en el patrón de restricción generado a partir de la digestión del ADNr 16S. Inicialmente se utilizaron las enzimas HaeIII y Sau3AI para la digestión del ADNr 16S de cada aislado, sin embargo se observó un patrón más definido con la enzima *Hae* III por lo que la digestión de todos los aislados se realizó con esta enzima (Figura 7 - 8, Tabla 4 - 6).



**Figura 7.** Patrones de restricción generados con *HaeIII* (parte superior) y *Sau3AI* (parte inferior).

Para esta electroforesis se utilizó el marcador Ladder 100 pares de bases de Fermentas.



**Figura 8.** Digestiones con *HaeIII* que producen diferentes patrones de restricción. A) T0, suelo recién arado; B) T1, después del riego y siembra; C) T2, posterior a la aplicación de herbicida.

Se analizó el perfil de bandeo obtenido para cada aislado, determinando el número de bandas totales y las bandas de cada aislado. A partir de esto se construyó una matriz en la que se registró la presencia (1) y ausencia (0) de cada banda para cada uno de los aislados analizados. Esta matriz fue utilizada para construir un dendograma por el método de UPGMA utilizando las aplicaciones incluidas en el programa TreeCon (Van der Peer and De Wachter, 1994): cálculo de una matriz de distancia y elaboración del árbol por el método de UPGMA, con un análisis de bootstrap (100 réplicas) (Figura 9).

A partir del análisis de los tipos únicos de bandeo se obtuvo la abundancia de cada tipo ARDRA para las muestras analizadas (Figura 10) y se seleccionó un aislado de cada tipo único el cual fue enviado a secuenciar. La identidad obtenida para cada secuencia analizada y la relación con la tipificación por ARDRA se muestra en las tablas 4 – 7.

**Tabla 4.** Tipos ARDRA detectados en muestras de suelo T0

<b>Tipo ARDRA</b>	<b>Identidad</b>	<b>% Abundancia</b>	<b>Aislados con el mismo perfil</b>
T0A	<i>Bacillus</i> sp	43.0%	1,2,4,5,10,12,16,20,22,26,30,34,36,37,34,40,47,48, 49,51,52,53,54,55,56,57,61,65,66,68,71,75,77,78
T0B	<i>B. megaterium</i>	11.4%	3,15,17,50,63,64,70,73,74
T0C	<i>Enterobacter</i> sp	7.6%	6,8,23,25,33,35
T0D	-	7.6%	7,9,11,18,62,79
T0E	<i>Bacillus</i> sp	2.5%	19,24
T0F	<i>Bacillus</i> sp	2.5%	21,27
T0G	<i>B. cereus</i>	16.5%	28,29,31,38,41,44,45,46,58,59,60,69,76
T0P	<i>B. subtilis</i>	3.8%	13,67,72
T0T	<i>Bacillus sphaericus</i>	2.5%	42,43
T0W	<i>Escherichia coli</i>	1.3%	14
T0X	-	1.3%	32

**Tabla 5.** Tipos ARDRA detectados en muestra de suelo T1

<b>Tipo ARDRA</b>	<b>Identidad</b>	<b>% Abundancia</b>	<b>Aislados con el mismo perfil</b>
T1A	<i>Bacillus</i> sp	13.1%	8,9,14,16,27,33,46,47,51,56,92,97,99
T1B	<i>B. megaterium</i>	9.1%	2,4,7,13,20,53,62,90,98
T1C	<i>Enterobacter</i> sp	17.2%	3,19,24,25,26,34,36,42,43,49,50,59,65,79,81,82,84
T1E	<i>Bacillus</i> sp	3.0%	32,54,60
T1G	<i>B. cereus</i>	2.0%	22,28
T1H	-	28.3%	1,5,6,12,15,17,18,21,29,30,35,38,44,45,48,52,57,61,63,64,68,72,73,74,75,76,77,80
T1I	<i>Pseudomonas</i> sp	7.1%	23,31,66,83,88,91,93
T1J	-	2.0%	11,94
T1L	<i>Staphylococcus</i> sp	2.0%	78,89
T1Y	-	3.0%	37,39,40
T1Z	-	3.0%	71,85,86

**Tabla 5.** (Continuación)

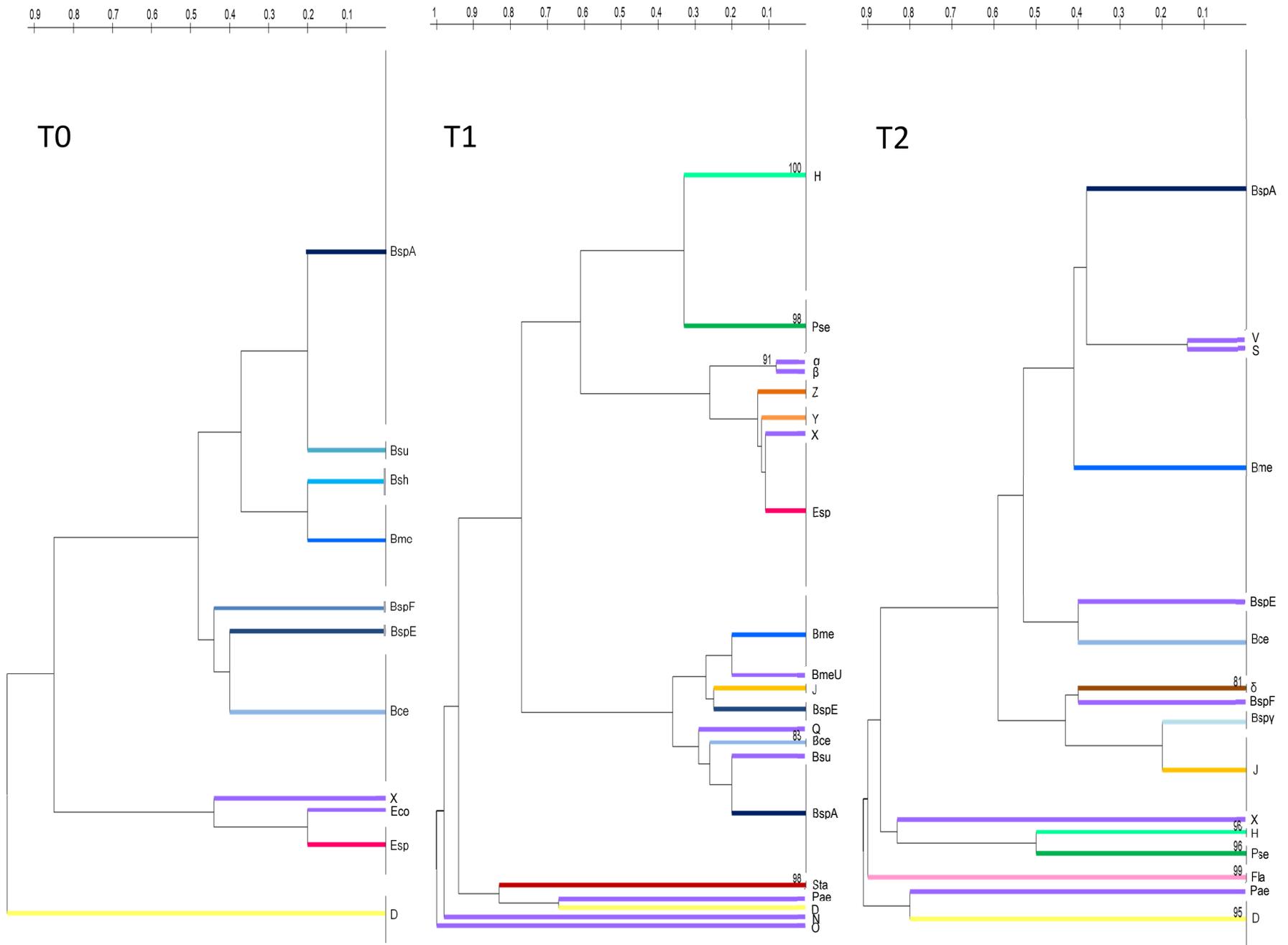
Tipo ARDRA	Identidad	% Abundancia	Aislados con el mismo perfil
T1D	-	1.0%	87
T1N	-	1.0%	55
T1K	<i>Paenibacillus</i> sp	1.0%	58
T1O	-	1.0%	67
T1Q	-	1.0%	69
T1R	<i>B. subtilis</i>	1.0%	70
T1U	<i>B. megaterium</i>	1.0%	10
T1X	-	1.0%	41
T1 $\alpha$	-	1.0%	95
T1 $\beta$	-	1.0%	96

**Tabla 6.** Tipos ARDRA detectados en muestra de suelo T2

<b>Tipo ARDRA</b>	<b>Identidad</b>	<b>% Abundancia</b>	<b>Aislados con el mismo perfil</b>
T2A	<i>Bacillus sp</i>	32.0%	7,8,9,11,13,14,15,21,26,28,32,38,39,41,43,50, 54,61,62,64,65,69,72,73,77,79,81,83,84,88,89,98
T2B	<i>B. megaterium</i>	27.0%	1,4,19,20,23,34,35,36,37,40,42,47,51,52,55,74,76,80,82,85,86,87,90,91,92,95,99
T2D	-	6.0%	2,5,12,48,58,78
T2E	<i>Bacillus sp</i>	1.0%	75
T2F	<i>Bacillus sp</i>	1.0%	30
T2G	<i>B. cereus</i>	8.0%	10,18,25,27,29,49,60,68
T2H	-	2.0%	94,96
T2I	<i>Pseudomonas sp</i>	3.0%	17,66,67
T2J	-	9.0%	3,6,22,24,31,33,56,97,100
T2K	<i>Paenibacillus sp</i>	1.0%	71

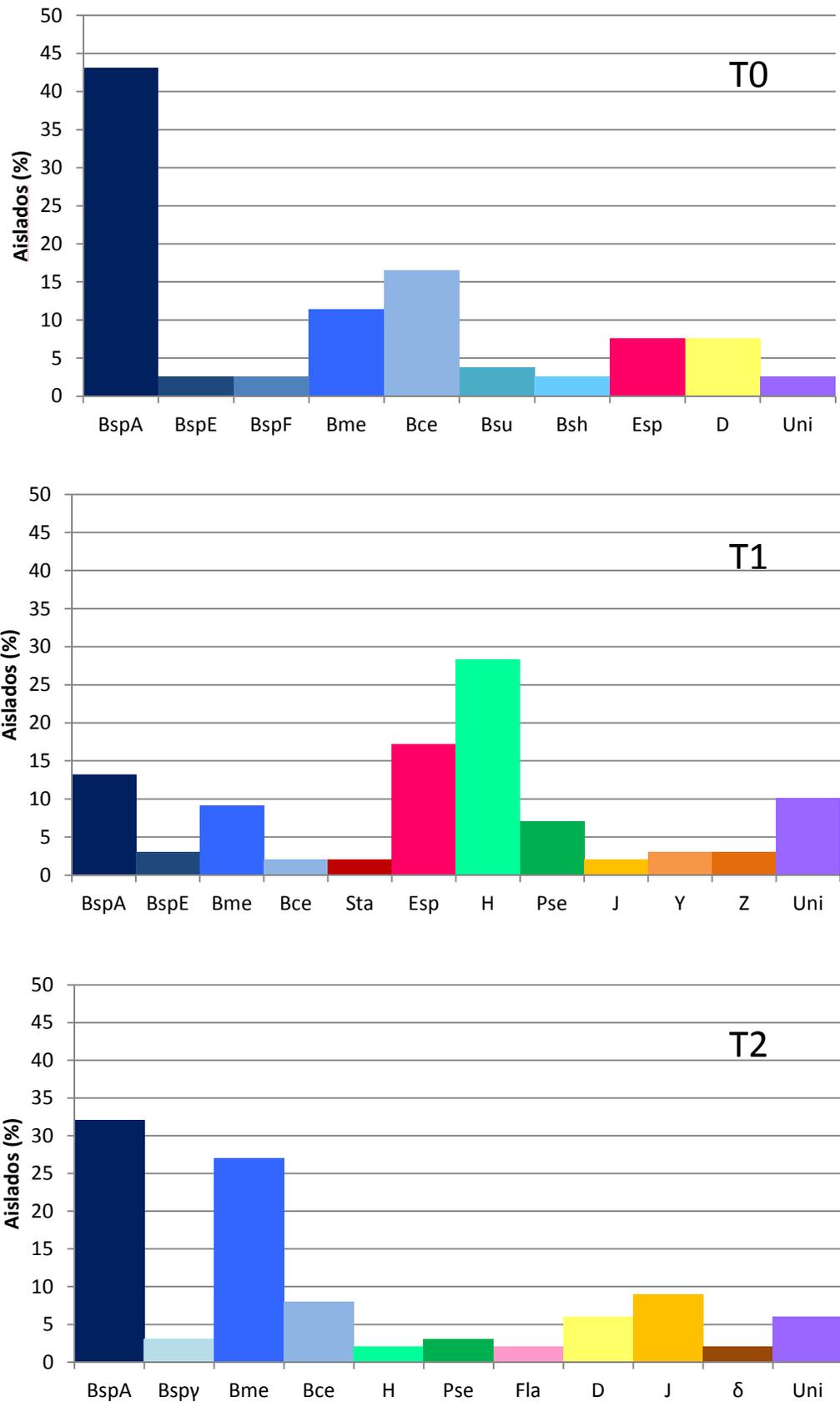
**Tabla 6.** (Continuación)

Tipo ARDRA	Identidad	% Abundancia	Aislados con el mismo perfil
T2M	<i>Flavobacterium</i> sp	2.0%	44,46
T2S	-	1.0%	63
T2V	-	1.0%	45
T2X	-	1.0%	16
T2γ	<i>Bacillus</i> sp	3.0%	53,70,93
T2δ	-	2.0%	57,59



**Figura 9.** Árbol construido por UPGMA de los tipos ARDRA detectados e identificados en las muestras T0-T2.

Bsp, *Bacillus* sp; Bme, *B. megaterium*; Bce, *B. cereus*; Bsu, *B. subtilis*; Bsh, *B. spahericus*; Esp, *Enterobacter* sp; Eco, *Escherichia coli*; Fla, *Flavovacterium* sp.; Pse, *Pseudomonas* sp; Sta, *Staphylococcus* sp.; Pae, *Paenibacillus* sp; D, H, J, N, O, Q, S, V, X, Y, Z,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , Tipos ARDRA no identificados; Uni, tipos ARDRA únicos. Los valores numéricos que aparecen en algunas de las ramas de cada árbol, representan en valor de bootstrap sobre 100.



**Figura 10.** Abundancia relativa de tipos ARDRA detectados e identificados en las muestras T0-T2.

Bsp, *Bacillus* sp; Bme, *B. megaterium*; Bce, *B. cereus*; Bsu, *B. subtilis*; Bsh, *B. spahericus*; Esp, *Enterobacter* sp; Fla, *Flavovacterium* sp.; Pse, *Pseudomonas* sp; Sta, *Staphylococcus* sp.; D, H, J, Y, Z,  $\delta$ , Tipos ARDRA no identificados; Uni, tipos ARDRA únicos.

**Tabla 7.** Distribución de aislados identificados en las muestras de suelo T0-T2

Phyllum/Clase Identidad	No. (%) de aislados detectados en cada muestra			Tipo ARDRA secuenciado
	T0	T1	T2	
<b>Firmicutes/Bacilli</b>				
<i>Bacillus</i> sp	38 (48.0)	16 (16.1)	37 (37.0)	0-37, 0-19, 0-21, 2-53
<i>B. megaterium</i>	9 (11.4)	9 (9.1)	27 (27.0)	0-15, 1-10
<i>B. cereus</i>	13 (16.5)	2 (2.0)	8 (8.0)	0-29
<i>B. subtilis</i>	3 (3.8)	1 (1.0)	0	0-72, 1-70
<i>B. sphaericus</i>	2 (2.5)	0	0	0-42
<i>Paenibacillus</i> sp	0	1 (1.0)	1 (1.0)	2-71
<i>Staphylococcus</i> sp	0	2 (2.0)	0	1-78
<b>Proteobacteria/γ-Proteobacteria</b>				
<i>Enterobacter</i> sp	6 (7.6)	17 (17.2)	0	0-6

**Tabla 7 (continuación).**

Phyllum/Clase Identidad	No. (%) de aislados detectados en cada muestra			Tipo ARDRA secuenciado
	T0	T1	T2	
<i>Escherichia coli</i>	1 (1.3)	0	0	0-14
<i>Pseudomonas sp</i>	0	35 (35.4)	5 (5.0)	1-31
<b>Bacteroidetes/Chlorobi, Bacteroidetes</b>				
<i>Flavobacterium sp</i>	0	0	2 (2.0)	2-44

Para determinar la diversidad bacteriana de las muestra de acuerdo al número total de tipos ARDRA y de la proporción de individuos con el mismo tipo ARDRA, se calculó el índice de Shannon-Weaver ( $H$ ) y el valor de *Evenness* (igualdad) ( $E$ ), de acuerdo a las siguientes expresiones:

Índice de Shannon-Waever ( $H$ )

$$H = -\sum(p_i \ln[p_i])$$

donde  $p_i$  es la proporción de aislados pertenecientes a un tipo ARDRA en relación con el número total de aislados.

*Evenness* ( $E$ )

$$E = H/\ln S$$

donde  $H$  es el índice de Shannon-Weaver y  $S$  es el número total de tipos ARDRA.

**Tabla 8.** Índice de Shannon-Weaver y valor de *Evenness*

<b>Muestra</b>	<b><math>H</math></b>	<b><math>E</math></b>
<b>T0</b>	1.62	0.74
<b>T1</b>	2.23	0.76
<b>T2</b>	1.833	0.71

El valor  $H$  obtenido a partir de los tipos ARDRA mostró que la diversidad de la muestra T1 fue mayor que para las muestras T0 y T2. El valor de  $E$  es una medida de distribución de organismos individuales entre especies; si este valor aumenta, la diversidad de la muestra analizada también aumenta (Borneman *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 200; Escalante *et al.*, 2004).

Como se muestra en las gráficas de la Figura 10, el grupo bacteriano más abundante en la muestra T0 corresponde a miembros del género *Bacillus* (82.2% del total de aislados, por género), entre los que se encuentran *Bacillus* sp. (48.0%), *B. megaterium* (11.4%), *B. cereus* (16.5%), *B. subtilis* (3.8%), y *B. sphaericus* (2.5%); mientras que *Enterobacter* sp (7.6%), y *Escherichia coli* (1.3%), se encuentran en menor proporción en esta muestra. Para el T1 se observó una abundancia importante de aislados identificados como *Bacillus* (28.2% del total de aislados por género), sin embargo se observó que los aislados designado como del grupo H e identificados como *Pseudomonas* sp. (28.3% de aislados) se encontraron en mayor abundancia. En ésta muestra se observó también en menor proporción a *Paenibacillus* sp (1.0%), *Staphylococcus* sp (2.0%), y *Enterobacter* sp (17.2%). En la muestra T2 se detectó a miembros del género *Bacillus* como el grupo más abundante conformado por *Bacillus* sp. (37.0%%), *B. megaterium* (27.0%), *Bacillus cereus* (8.0%), etc., mientras que en menor proporción se detectó a *Paenibacillus* sp (1.0%), *Pseudomonas* sp (3.0%), *Flavobacterium* sp (2.0%).

La diversidad bacteriana detectada en la muestra T0 corresponde a la microbiota asociada naturalmente a la muestra de suelo utilizada para iniciar el ciclo de cultivo de caña de azúcar en la localidad analizada. Si se considera que el terreno no había sido utilizado previamente para el cultivo de caña de azúcar ni de algún otro producto y considerando que no se le dio ningún tipo de tratamiento más que el surcado, se considera que los miembros del género *Bacillus* son los organismos naturalmente asociados a este terreno más abundantes presentes en este momento.

La muestra correspondiente al T1 (después de siembra de siembra recién regada), muestra una disminución de las especies de *Bacillus* detectadas en el T0 y un incremento del género *Enterobacter* y la aparición de la  $\gamma$ -Proteobacteria *Pseudomonas* sp. El incremento de *Enterobacter* sp. permite suponer que la disponibilidad de una mayor cantidad de agua en el medio favoreció su

crecimiento, mientras que la abundante presencia de *Pseudomonas* sp. puede deberse a que aunque pudiera haber estado presente este microorganismos en la muestra T0 y no se detectó, la presencia de agua tuvo el mismo efecto sobre su crecimiento como lo observado para el caso de *Enterobacter* sp., aunque no se descarta la posibilidad de que el agua utilizada para riego pudiera haber incorporado a este microorganismo al suelo analizado. La disminución en la abundancia de *Bacillus* para esta muestra en presencia de una gran cantidad de agua en el suelo, no es fácil de explicar ya que se supondría que aumentará su abundancia de acuerdo a lo detectado para el T0.

La diversidad detectada en la muestra T2 (después de adición del herbicida Gesapax H 375 de Syngenta), permitió observar un incremento en los aislados del género *Bacillus* (72.0% del total de aislados, por género), dentro de los cuales se detectaron a *Bacillus* sp. (37.0%), *B. megaterium* (27.0%), etc. y en menor proporción a *Paenibacillus* sp (1.0%), *Pseudomonas* sp (3.0%), *Flavobacterium* sp (2.0%). Es importante destacar que en esta muestra se presentó una muy importante disminución de las  $\gamma$ -Proteobacterias detectadas como los grupos más abundantes en la muestra T1, lo que sugiere que el incremento de este grupo microbiano se debió al efecto de la abundancia del agua en el suelo como resultado del primer riego.

El herbicida Gesapax es una mezcla de dos ingredientes activos, ametrina + ácido 2,4-D en forma de éster, los cuales en combinación ejercen una acción enérgica contra maleza de hoja ancha y zacates anuales en cultivo de caña de azúcar y maíz. Contiene como compuesto activo a la ametrina (2-(etilamino)-4-iso propilamino-6-metiltio-s-triazina 25% equivalente a 2.45 g de i.a. /L) y al éster isobutilico del ácido 2,4-diclorofeno xiacético (contenido del ácido 2,4-D no menor de 79.78% - 16.5% equivalen te a 1.28 g de i.a /L). La ametrina inhibe la fotosíntesis, al bloquear la reacción de Hill en el fotosistema II; la actividad hormonal del ácido 2,4-D afecta el metabolismo de los ácidos nucleicos y con ello los puntos de crecimiento provocando un desarrollo anormal que afecta la

respiración, reservas alimenticias y la división celular de la maleza. Aunque se reporta a la ametrina como ligeramente tóxica para el humano sólo en dosis elevadas (Syngenta, 2007), el 2,4-D es el componente más tóxico del herbicida y a pesar de que no está reportado el efecto sobre diversos grupos bacterianos, es posible que por su modo de acción tenga un efecto inhibitor sobre el crecimiento microbiano. Aunque en el contexto del proyecto general de trabajo en el que se enmarcar esta tesis se colectó una siguiente muestra posterior a la aplicación del herbicida, los resultados de su análisis no se presentan en este trabajo.

#### **5.4 Implicaciones biológicas de los grupos bacterianos detectados en las muestras T0-T2.**

Con base en la diversidad bacteriana detectada en las muestras T0-T2 y que está conformada por bacterias de los grupos Firmicutes,  $\gamma$ -Proteobacterias y Bacteroidetes (Tabla 7), se realizó una búsqueda de algunas de las características biológicas y posibles papeles que desempeñan en el suelo, de los principales grupos (géneros) de bacterias aisladas e identificadas en las tres etapas iniciales del cultivo de caña de azúcar.

**Tabla 9.** Características relevantes de los principales microorganismos detectados en las muestras T0-T1 de suelo utilizado para cultivo de caña

Phyllum/Clase Identidad	Muestra en la que se detectó	Características relevantes	Referencias
<b>Firmicutes/Bacilli</b>			
<i>Bacillus</i> sp	T0, T1, T2	Los miembros de este género se encuentran generalmente en el suelo y la mayoría de estas bacterias tienen actividad proteolítica. Estos microorganismos juegan un papel importante en el ciclo del nitrógeno (son bacterias desnitrificantes), el cual contribuye a la fertilidad del suelo. Son microorganismos solubilizadores de fosfato. Numerosas especies de <i>Bacillus</i> expresan actividades que suprimen pestes y patógenos, o que de otro modo promueven el crecimiento de las plantas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• McSpadden Gardener, 2004</li> <li>• Marhual <i>et al.</i>, 2011</li> </ul>
<i>B. megaterium</i>	T0, T1, T2	Esta bacteria produce un antibiótico que ha sido utilizada en algunos cultivos para suprimir hongos causantes de enfermedades.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jung y Kim, 2005</li> </ul>
<i>B. cereus</i>	T0, T1, T2	Su actividad de producción y resistencia al antibiótico zwittermicina A se ha correlacionado a la disminución en el marchitamiento fúngico o caída de plántulas en alfalfa.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• He <i>et al.</i>, 1994</li> </ul>

**Tabla 9** (Continuación)

<b>Phylum/Clase Identidad</b>	<b>Muestra en la que se detectó</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Referencias</b>
<i>B. subtilis</i>	T0, T1	Produce toxinas que inhiben el crecimiento o actividad de patógenos fúngicos y nematodos en plantas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Li <i>et al.</i>, 2009</li> </ul>
<i>B. sphaericus</i>	T0	Es ampliamente utilizado para el control de plagas de insectos al producir una toxina con actividad larvicida.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afify <i>et al.</i>, 2009</li> </ul>
<i>Paenibacillus</i> sp	T1, T2	Numerosas especies de <i>Paenibacillus</i> expresan actividades que suprimen pestes y patógenos, o que de otro modo promueven el crecimiento de las plantas. <i>P. polymyxa</i> tiene una amplia gama de propiedades, incluyendo fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de enzimas hidrolíticas y antibióticos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• McSpadden Gardener, 2004</li> <li>• Lal y Tabacchioni, 2008</li> </ul>
<i>Staphylococcus</i> sp	T1	Cepas de este género han sido aisladas de suelos contaminados con petróleo y han mostrado ser útiles para su bioremediación.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chang <i>et al.</i>, 2011</li> </ul>
<b>Proteobacteria/γ- Proteobacteria</b>			
<i>Enterobacter</i> sp	T0, T1	Estas bacterias son conocidas por promover el crecimiento de las plantas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Taghavi <i>et al.</i>, 2010</li> </ul>

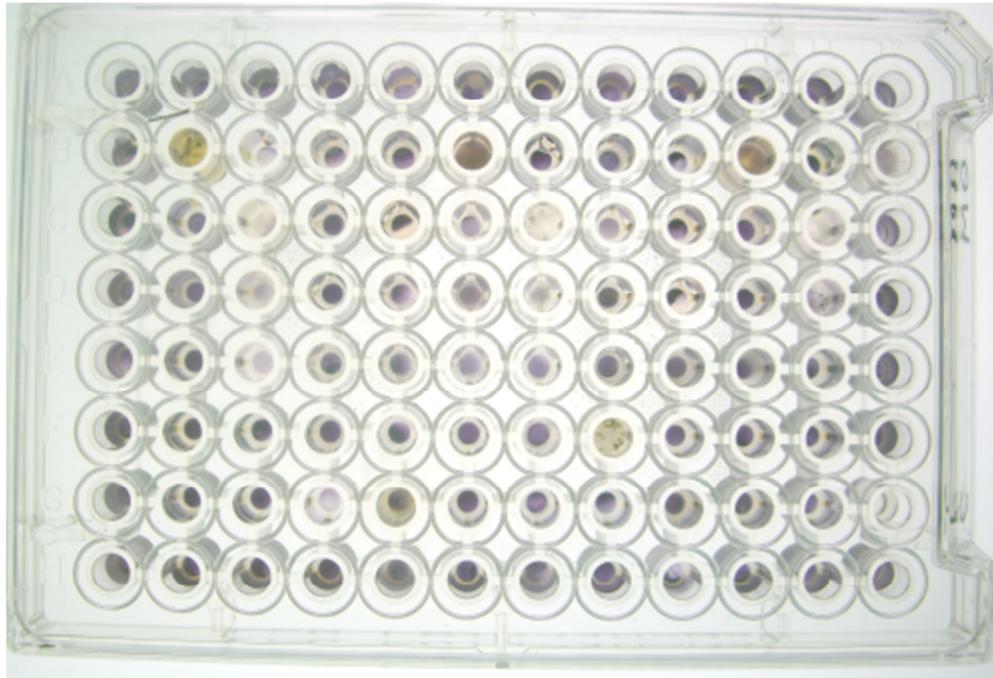
**Tabla 9** (Continuación)

Phylum/Clase Identidad	Muestra en la que se detectó	Características relevantes	Referencias
<i>Escherihchia coli</i>	T0	Es un importante residente del colon de los seres humanos y de otros animales de sangre caliente, y resulta bastante útil en el análisis del agua para determinar si existe contaminación fecal.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prescott <i>et al.</i>, 2004.</li> </ul>
<i>Pseudomonas</i> sp	T1, T2	Este microorganismo, encontrado en las zonas de la rizosfera de los campos de cultivo, son poderosos solubilizadores de fosfato y ciertas especies ( <i>P. putida</i> ) son capaces de transformar las formas orgánicas de sulfuro presentes en suelo a sulfato inorgánico biodisponible. <i>Pseudomonas</i> lleva a cabo la solubilización de fosfatos en el suelo sin representar un peligro al ambiente. Son bacterias desnitrificantes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiwari <i>et al.</i>, 2011</li> <li>• Mirleau <i>et al.</i>, 2005</li> </ul>
<b>Bacteroidetes/Chlorobi,</b> <b>Bacteroidetes</b>			
<i>Flavobacterium</i> sp	T2	Estas bacterias se encuentran en suelo, agua fresca y hábitats marinos. Muchas especies se adaptan al frio, mientras que otras son patógenas a peces de agua dulce.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liu <i>et al.</i>, 2008</li> </ul>

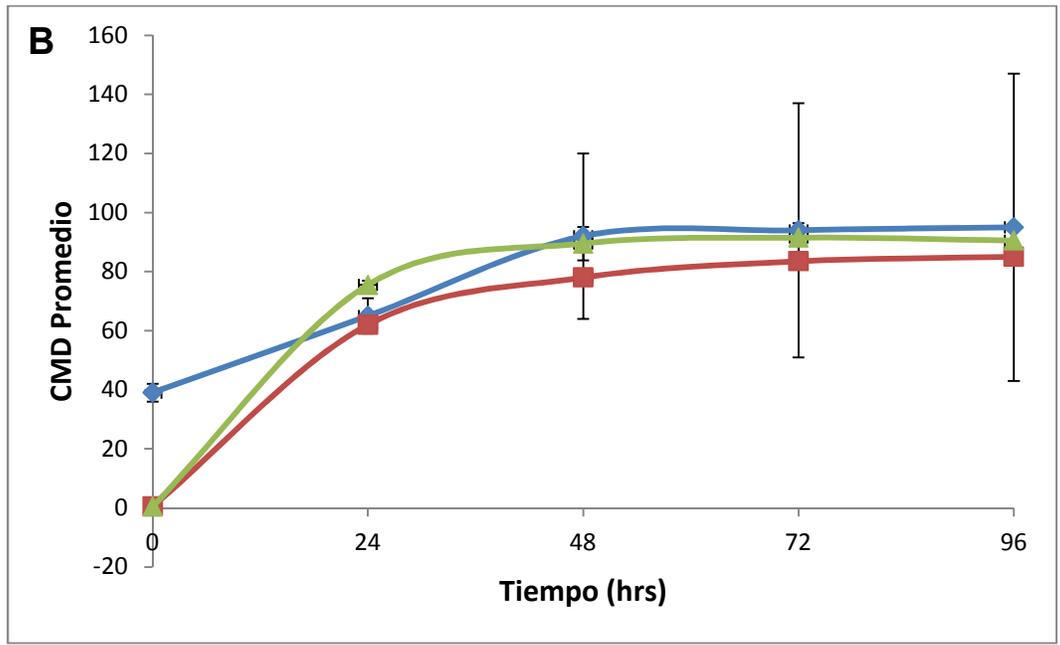
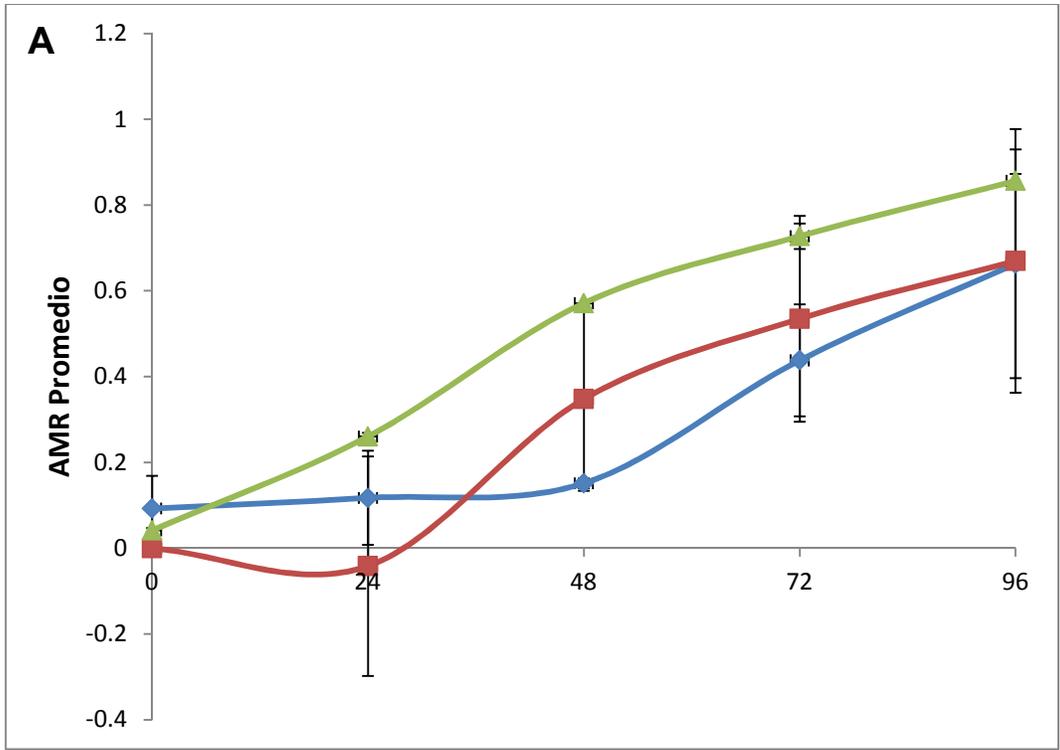
### 5.5 Perfil metabólico determinado por el sistema EcoPlate

Se utilizó el sistema EcoPlate de BIOLOG el cual contiene 31 de las fuentes de carbono (por triplicado) más útiles para el análisis metabólico de la comunidad bacteriana del suelo. Ya que los organismos presentes en una comunidad pueden ser considerados como una unidad funcional caracterizada por la suma de las propiedades metabólicas de los individuos, la determinación del perfil fisiológico a nivel de comunidad (CLPP, por sus siglas en inglés) a través de los indicadores de respuesta metabólica promedio (AMR, por sus siglas en inglés) y la diversidad metabólica de la comunidad (CMD, por sus siglas en inglés), representa un método rápido y sensible para evaluar la diversidad metabólica potencial de comunidades microbianas y así como también el impacto de la adición de hidrocarburos, pesticidas y metales sobre las bacterias del suelo.

A partir de los datos de absorbancia obtenidos para el análisis de cada muestra (Figura 11) se calculó el AMR y CMD (Figura 12).



**Figura 11.** EcoPlate después de incubación por 96 horas.



**Figura 12.** AMR (A) y CMD (B) de las muestra T0, T1 y T2.

Los valores son el promedio de los datos registrados y analizados para dos placas por muestra. ◆ T0, ■ T1, ▲ T2.

Para el cálculo de los parámetros AMR y CMD de las muestras T0-T2 se debe de establecer un valor umbral de absorbancia el cual debe de corresponder a la D.O.<sub>590nm</sub> de la coloración púrpura que indica el uso de una fuente de carbono. Aunque en sentido estricto el valor de absorbancia de cero, indicaría la no asimilación de la fuente de carbono se establece un valor un umbral de O.D.<sub>590nm</sub> = 0.25 (Garland, 1997), se puede observar en la Tabla 10, que los valores promedio absorbancia porcentual para cada fuente de carbono incluidas en la EcoPlate, están en un rango arbitrario de 0% hasta >2.0% indicando respectivamente la no utilización de una fuente de carbono y el máximo detectado de utilización observado para las muestras analizadas. De acuerdo a los datos observados en la Figura 12, no existen diferencias entre los valores de AMR y CMD entre las muestras T0, T1 y T2, lo que sugiere un perfil metabólico microbiano similar entre las tres muestras analizadas. Mientras que los valores de absorbancia porcentual promedio para la utilización de las diferentes fuentes de carbono presentadas en la Tabla 10 muestran que hay una asimilación de diversas aminos, aminoácidos, carbohidratos, ácidos carboxílicos, polímeros y compuestos fenólicos, aunque son pocos los sustratos que presentan una mayor asimilación (>2.0%). Es importante considerar que en la literatura se reportan valores de absorbancia porcentual mayores al valor máximo observado en este trabajo para las muestras T0-T2 (Valores <6%) (Tiquia, 2010), lo que sugiere que el perfil metabólico de las muestras de suelo analizado en este trabajo es bajo. Es importante considerar también que la cuenta microbiana total detectada en las muestras fue de 10<sup>4</sup>UFC/mL para T0 y de 10<sup>5</sup> para T1 y T2, respectivamente y que la diversidad bacteriana detectada se considera relativamente baja en cuanto a la diversidad de grupos bacterianos detectado (Firmicutes,  $\gamma$ -Proteobacteria y Bacteroidetes), y de acuerdo también a la diversidad de sustratos fermentados en el sistema EcoPlate.

Por otro lado, considerando las características del terreno utilizado para cultivo de caña (Lagunillas, Municipio de Tlaquitenango, Morelos), el cual no había sido utilizado para ningún cultivo previo y que se utilizó para dar inicio a un ciclo nuevo

de cultivo de caña, la diversidad bacteriana detectada en el T0 se puede considerar como aquella naturalmente asociada al suelo, mientras que las variaciones observadas seguramente se asocian a las primeras etapas del cultivo de caña (arado, riego del terreno y aplicación de herbicida). Debido a que no existen reportes previos de la diversidad bacteriana asociada a algún tipo de cultivo de caña de azúcar, no es posible establecer una comparación de la diversidad y abundancia microbiana detectada en este trabajo.

**Tabla 10.** Perfil metabólico (patrón de uso de las 31 fuentes de carbono) de las muestras de suelo T0-T2 obtenido por el sistema EcoPlate.

Fuente de Carbono	Muestra		
	T0	T1	T2
<b><u>Aminas</u></b>			
Putrescina			
Feniletilamina			
<b><u>Aminoácidos</u></b>			
L-Arginina			
L-Asparagina			
L-Fenilalanina			
L-Serina			
Ácido glicil-L-glutámico			
L-Treonina			
<b><u>Carbohidratos</u></b>			
α-D-lactosa			
Metil-β-D-glucósido			
D-Celobiosa			
D-Manitol			
I-Eritritol			
Glucosa-1-fosfato			
Ácido D-galactónico y -lactona			
N-acetil-D-glucosamina			

0-0.49%	
0.5-0.99%	
1.0-1.49%	
1.5-1.99%	
>2.0%	

Fuente de Carbono	Muestra		
	T0	T1	T2
D,L- $\alpha$ -glicerol fosfato			
D-Xilosa			
<b><u>Ácidos Carboxílicos</u></b>			
Ácido $\alpha$ -Cetobutírico			
Ácido D-Glucosamínico			
Ácido D-Málico			
Ácido $\gamma$ - Hidroxibutírico			
Piruvato de metilo			
Ácido D-Galacturónico			
Ácido Itacónico			
<b><u>Polimeros</u></b>			
$\alpha$ -Ciclodextrina			
Tween 40			
Tween 80			
Glicogeno			
<b><u>Compuestos Fenólicos</u></b>			
Ácido 2-Hidroxibenzóico			
Ácido 4-Hidroxibenzóico			

El sombreado de las celdas indica el rango de porcentaje de absorbancia del total de absorbancia ( $\lambda=590\text{nm}$ ) de la placa.

## 6. Conclusiones

Este proyecto constituye un primer esfuerzo por analizar de manera sistemática la diversidad bacteriana asociada al suelo utilizado para cultivo de caña de azúcar. Se determinó una cuenta bacteriana inicial de  $10^4$  UFC/mL para la muestra de recién arada (T0) y ésta aumenta a  $10^5$  UFC/mL después del riego y el plantado de caña (T1). La adición de herbicida no tuvo un impacto sobre la cuenta bacteriana total (T2).

La identificación de los aislados de cada una de las muestras permitió identificar una diversidad bacteriana compuesta por Firmicutes,  $\gamma$ -Proteobacterias y Bacteroidetes. En las muestras T0 y T1, el género *Bacillus* fue el grupo microbiano más abundante, mientras que en la muestra T1 el aislado identificado como H (relacionado con *Pseudomonas*).

Debido a la composición relativamente constante de especies identificadas pertenecientes a los grupos Firmicutes,  $\gamma$ -Proteobacterias y Bacteroidetes presentes en las muestras T0, T1 y T2, se puede suponer que ésta diversidad corresponde a la que originalmente se encontraba en el suelo y que las primeras etapas del cultivo de caña no impactan de forma importante la diversidad original presente en el suelo antes de iniciar el cultivo de caña.

Se determinó la presencia de diversos aislados que no fue posible identificar por comparación de sus secuencias de ADNr 16S. Es importante destacar que de estos aislados, el denominado como H, fue el organismo (relacionado con *Pseudomonas*) más abundante presente en la muestra T1.

El perfil metabólico de la comunidad microbiana mostró que no existen diferencias entre las muestras T0, T1 y T2, aunque si hay un patrón diferencial de uso de sustrato entre las muestras analizadas.

## 7. Perspectivas

Análisis de los aislados cuya identidad no se pudo determinar por análisis de secuencias de ADNr 16S: secuenciación del operón ribosomal completo.

Integración de los resultados obtenido en este trabajo con los perfiles de bandeo de genes ribosomales por DGGE y el perfil fisicoquímico de las muestras (en desarrollo).

## 8. Referencias

- Abbot L.K., Murphy D.V. 2007. Soil Biological Fertility, A Key to Sustainable Land Use in Agriculture. 1st Ed. Springer. The Netherlands: 37-91.
- Afify A.E.-M.M.R., Aboul-Soud M.A.M., Foda M.S., Sadik M.W.A., Kahil T., Asar A.R., Al-Khedhairi A.A. 2009. Production of alkaline protease and larvicidal biopesticides by an Egyptian *Bacillus sphaericus* isolate. African Journal of Biotechnology 8 (16): 3864-3873.
- Benizri E., Amiaud B. 2005. Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands. Soil Biology & Biochemistry. 37: 2055–2064.
- Borneman J., Skroch P.W., O’Sullivan K.M., Palus J.A., Rumjanek N.G., Jansen JL, Nienhuis J. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. Applied and Environmental Microbiology. 62: 1935–1943.
- Chang C.-H., Lee J., Ko B.-G., Kim S.-K., Chang J.-S. 2011. Staphylococcus sp. KW-07 contains nahH gene encoding catechol 2,3-dioxygenase for phenanthrene degradation and a test in soil microcosm. International Biodeterioration and Biodegradation 65 (1): 198-203.
- Demian A. L., Davies J. E. 1997. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2nd Ed. ASM Press. 3-4.
- Escalante A., Wachter C., Farrés A. 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. International Journal of Food Microbiology. 64: 21-31.

- Escalante A., Gosset G., Martínez A., Bolívar F. 2004. Diversidad bacteriana del suelo: Métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia*. 38: 583-592.
- Escalante A., Rodríguez M.E., Martínez A., López-Munguía A., Bolívar F., Gosset G. 2004. Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*. 235: 273-279.
- Escalante A., Giles-Gómez M., Hernández G., Córdova-Aguilar M.S., López-Munguía A., Gosset A., Bolívar F. 2008. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*. 124:126-134.
- FICO, Fideicomiso Comercializador de caña de azúcar. [www.fico-calidad.com](http://www.fico-calidad.com).
- Garland, J.L. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*. 24: 289-300.
- Gomez E., Ferreras L., Toresani S. 2006. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresource Technology* 97: 1484–1489.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68: 669–685.
- Herrmann K.M., Weaver L.M. 1999. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*. 50: 473-503.
- He H., Silo-Suh L.A., Handelsman J., Clardy J. 1994. *Tetrahedron Letters* 35 (16): 2499-2502.
- Ibekwe A.M., Kennedy A.C., Frohne P.S., Papiernik S.K., Yang C.-H., Crowley D.E. 2002. Microbial diversity along a transect of agronomic zones. *FEMS Microbiology Ecology* 39: 183-191.
- Jung H.K., Kim S.D. 2005. An antifungal antibiotic purified from *Bacillus megaterium* KL39, a biocontrol agent of red-pepper Phytophthora-blight disease. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15 (5): 1001-1010
- Keller M., Zengler K. 2004. Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews Microbiology*. 2:141-150.

- Lal S., Tabacchioni S. 2009. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: A minireview. *Indian Journal of Microbiology*. 49(1): 2-10.
- Leckie S.E. 2005. Methods of microbial community profiling and their application to forest soils. *Forest Ecology and Management*. 220:88–106.
- Li J., Yang Q., Zhao L.-H., Zhang S.-M., Wang Y.-X., Zhao X.-Y. 2009. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *Journal of Zhejiang University: Science B*. 10 (4): 264-272.
- Liles M.R., Williamson L.L., Rodbumrer J., Torsvik V., Goodman R.M., Handelsman J. 2008. Recovery, purification, and cloning of high-molecular-weight DNA from soil microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:3302-3305.
- Liu H., Liu R., Yang S.-Y., Gao W.-K., Zhang C.-X., Zhang K.-Y., Lai R. 2008. *Flavobacterium anhuiense* sp. nov., isolated from field soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58 (4): 756-760.
- Madigan MT, Martinko JM. 2006. Microbial ecology. In: Brock Biology of the microorganisms. 11<sup>th</sup> Ed. Pearson, Benjamin Cummings. San Francisco: 619-621-684.
- Marhual N.P., Pradhan N., Mohanta N.C., Sukla L.B., Mishra B.K. 2011. Dephosphorization of LD slag by phosphorus solubilising bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65 (3): 404-409.
- McSpadden Gardener. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology* 94 (11): 1252-1258.
- Mirleau P., Wogelius R., Smith A., Kertesz M.A. 2005. Importance of organosulfur utilization for survival of *Pseudomonas putida* in soil and rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (11): 6571-6577.
- Oldeman L.R., Hakkeling R.T.A., Sunbroek W.G. 1991. World map of the status of human-induced soil degradation. An explanatory note. *Global Assessment of Soil Degradation*. <http://www.isric.org/projects/global-assessment-human-induced-soil-degradation-glasod>.

- Øvreås L., Jensen S., Daae F.L., Torsvik V. 1998. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:2739-2742.
- Pesticide Management Education Program. U Cornell, USA.  
<http://pmep.cce.cornell.edu/>.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. 2004. *Microbiología*. 5a Ed. McGrawHill. España: 539-549.
- Rajendran J., Gunasekaran P.. 2008. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnology Advances*. 26:576-590.
- Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM). 2,4-D, Razones para su prohibición mundial. <http://www.rap-al.org/>.
- Salgado García S., Bucio L., Riestra D., Lagunes-Espinoza L.C. 2001. Caña de azúcar. Hacia un manejo sustentable. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. Villa Hermosa.
- Smit E., Leeflang P., Gommans S., van den Broek J., van Mil S., Wernars K. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2284–2291.
- Syngenta. Hoja de datos de seguridad (hds) gesapax h-375 ec.  
<http://www.syngenta.com.mx/>.
- Tamaki H., Sekiguchi Y., Hanada S., Nakamura K., Nombra N., Matsumara M., Kamagata Y. 2005. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:2162-2169.
- Tiquia S.M. 2010. Metabolic diversity of the heterotrophic microorganisms and potential link to pollution of the Rouge River. *Environmental Pollution*. 158 (5): 1435-1443
- Tiwari P., Ekka S.R., Tripathi J. 2011. *In vitro* study of *Pseudomonas* spp. isolated from soil. *Journal of Phytology* 2011, 3(4): 21-23.
- Torsvik V. and Øvreås L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. 5:240–245.

- Torsvik V., Ovreas L., Thingstad T.F. 2002. Prokaryotic diversity –magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*. 296:1064-1066.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case CL. 2006. Environmental microbiology. In: *Microbiology. An introduction*. 9<sup>th</sup> Ed. Pearson, Benjamin Cummings. San Francisco: 809-839.
- Tringe S.G., Hugenholtz P. 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology*. 11:442–446.
- Van de Peer Y., De Wachter R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences*. 10: 569-570.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173 (2): 697-703.
- Zilli J.E., Smiderle O.J., Neves M.C.P., Rumjanek N.G. 2007. Microbial population in soil cultivated with soybean and treated with different herbicides in cerrado area of Roraima. *Acta Amazonica*. 37:201-212.