



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Abundancia de bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* en  
suelos ribereños y su relación con sus contenidos de nitrógeno total  
en un gradiente altitudinal de la Reserva de la Biósfera los Volcanes**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**HERNÁNDEZ SALGADO GUILLERMO OTHOKANI**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. GERARDO CRUZ FLORES**

**ASESORA INTERNA:  
M. en DIIE DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ**



**PROYECTO PAPIME PE215016  
CIUDAD DE MÉXICO FEBRERO DE 2020**



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"  
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno HERNÁNDEZ SALGADO GUILLERMO OTHOKANI, con número de cuenta 311287934, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día 18 de febrero de 2020 a las 15:00 hrs., para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. ELOISA ADRIANA GUERRA HERNÁNDEZ

VOCAL Dr. GERARDO CRUZ FLORES

SECRETARIO M. en DIIE. DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ

SUPLENTE Biól. ANA LAURA MALDONADO TENA

SUPLENTE Dr. JORGE ANTONIO VALDIVIA ANISTRO

El título de la tesis que presenta es: **Abundancia y densidad de bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* en los suelos ribereños y su relación con sus contenidos de nitrógeno total de un gradiente altitudinal de la Reserva de la Biósfera los Volcanes.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad de México, a 05 de febrero de 2020

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD  
DIRECTOR  
ZARAGOZA  
DIRECCIÓN

RECIBI  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. BÁRBARA SUSANA LUNA ROSALES  
JEFE DE CARRERA

## DEDICATORIAS

A mi madre Clara Salgado Ovispo, por ser parte fundamental de mi desarrollo, sin tus enseñanzas y amor no sería la persona que soy hoy en día. Gracias por ser la persona más importante en mi vida.

A mi padre Guillermo Hernández Ruiz, por el apoyo que me ha brindado a lo largo de mi vida.

A mis Hermanos, Daniel y Eduardo, por todos los momentos de dicha que he pasado a su lado.

A Ise, por el apoyo incondicional y motivación que me has brindado estos años.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por haberme abierto las puertas a la comunidad universitaria

Al Dr. Gerardo Cruz Flores, por haberme permitido formar parte de su grupo, y por todas esas charlas que me llevaron a abrir mis horizontes.

A la M.DIIE. Dora Alicia Pérez González, por mostrarme el fascinante mundo de la microbiología.

A los miembros del jurado: M. en C. Eloísa Adriana Guerra Hernández, Dr. Jorge Antonio Valdivia Anistro y Biól. Ana Laura Maldonado Tena; por el tiempo dedicado a enriquecer esta investigación.

A la dirección de Asuntos del Personal Académico por el apoyo otorgado para realizar esta investigación (PAPIME PE215016)

## CONTENIDO

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
MARCO TEÓRICO.....	5
1. ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS .....	5
1.1 RESERVA DE LA BIÓSFERA LOS VOLCANES.....	5
2. ECOSISTEMAS RIBEREÑOS.....	6
2.1. ECOSISTEMAS RIBEREÑOS DE ALTA MONTAÑA.....	7
3. SUELO .....	8
3.1. PROPIEDADES QUÍMICAS DEL SUELO.....	8
3.1.1. MATERIA ORGÁNICA .....	8
3.1.2. pH .....	8
3.1.3. CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA.....	9
3.1.4. NITRÓGENO TOTAL .....	9
3.2. PROPIEDADES FÍSICAS DEL SUELO.....	9
3.2.1. TEXTURA.....	9
3.2.3. HUMEDAD DEL SUELO.....	10
3.3. SUELO COMO COMPONENTE ECOSISTÉMICO .....	11
3.4. CICLOS BIOGEOQUÍMICOS .....	12
3.4.1. CICLO DEL NITRÓGENO .....	12
4 BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (BPCV) .....	14
4.1. BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO (FBN) .....	15
4.1.1. BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE .....	16
5 TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN MICROBIOLÓGICAS .....	18
5.1. MÉTODOS FENOTÍPICOS .....	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS .....	19
MATERIAL Y MÉTODO .....	20
DELIMITACIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO .....	20
MUESTREO .....	22
ANÁLISIS QUÍMICO Y FÍSICO DEL SUELO .....	23

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO .....	23
MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS.....	23
AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS .....	24
PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN BACTERIANA DE LOS GÉNEROS <i>Azospirillum</i> y <i>Azotobacter</i> .....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
DESCRIPCIÓN ECOLÓGICA DE LOS SITIOS DE ESTUDIO .....	26
Cascada Ranita .....	26
Buenavista .....	27
Xalitzintla .....	28
San Nicolás de los Ranchos .....	29
ANÁLISIS QUÍMICO Y FÍSICO DEL SUELO .....	31
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL SUELO .....	37
ÍNDICE DE DIVERSIDAD.....	44
CONCLUSIONES .....	54
REFERENCIAS.....	55
ANEXOS .....	ii
ANEXO 1. CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DE LOS SUELOS.....	ii
Determinación de pH.....	ii
Determinación del porcentaje de humedad .....	ii
Textura por el método de Bouyoucos .....	iii
Nitrógeno total.....	iv
Materia orgánica.....	v
ANEXO 2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	vi
Dilución de suspensión de suelo, inoculación, recuento en placa y aislamiento de cepas .....	vi
Morfología colonial.....	vii
Medio libre de nitrógeno (Nfb).....	viii
Medio líquido Rojo de Fenol con distintas fuentes de carbono (Manitol, Rhamnosa, Glucosa) y su fermentación.....	ix
Medio agar Rojo Congo.....	ix
Prueba de catalasa .....	x
Prueba de oxidasa.....	x

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación espacial de la Reserva de la Biósfera Los Volcanes. ....	6
Figura 2. Triángulo de textura del suelo.....	10
Figura 3. Diagrama representativo del ciclo del nitrógeno.....	13
Figura 4. Tipos, fuente de energía y capacidad biológica de fijación de N <sub>2</sub> .....	15
Figura 5. Representación del hábitat en la rizósfera de bacterias libres fijadoras de nitrógeno y la resiliencia de organismos fijadores de nitrógeno de vida libre. ....	16
Figura 6. Distribución espacial de los sitios de muestreo. ....	21
Figura 7. Representación de la toma de sub-muestras.....	22
Figura 8. Diagrama de flujo de las actividades realizadas.....	25
Figura 9. Cascada Ranita. ....	26
Figura 10. Buenavista. ....	27
Figura 11. Xalitzintla. ....	28
Figura 12. San Nicolás de los Ranchos. ....	29
Figura 13. Relación pH v.s. Materia orgánica del suelo. ....	33
Figura 14. Contenido de la materia orgánica del suelo en los distintos sitios. ....	34
Figura 15. Relación entre conductividad eléctrica del suelo y porcentaje de humedad .....	35
Figura 16. Porcentaje de humedad del suelo y Conductividad eléctrica. ....	36
Figura 17. Relación materia orgánica-N total. ....	37
Figura 18. Unidades formadoras de colonias por sitio .....	38
Figura 19. Relación entre el nitrógeno total y las unidades formadoras de colonias.....	39
Figura 20. Colonia en crecimiento a 72 horas en medio AST.....	43
Figura 21. Medio MIO, Prueba en Agar Rojo .....	47
Figura 22. Morfología colonial y microscópica de una cepa del género <i>Azospirillum</i> .....	52
Figura 23. Morfología colonial y microscópica de una del género <i>Azotobacter</i> .....	52
Figura 25 Diagrama de diluciones .....	vi



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Diámetro de las partículas del suelo (Foth, 1986; SEMARNAT, 2003) .....	10
Cuadro 2. Posición geográfica y uso de suelo de los sitios de estudio. ....	20
Cuadro 3. Métodos empleados en las pruebas químicas y físicas de suelo. ....	23
Cuadro 4. Pruebas bioquímicas empleadas para determinar especies de los géneros <i>Azospirillum</i> y <i>Azotobacter</i> . ....	24
Cuadro 5. Características geográficas, climáticas y tipos de vegetación de los sitios de estudio ....	30
Cuadro 6. Especies arbóreas reportadas en cada sitio (Santiago, 2018). ....	31
Cuadro 7. Porcentaje de las fracciones minerales del suelo en los sitios de estudio. ....	32
Cuadro 8. Propiedades físicas y químicas de los suelos estudiados. ....	32
Cuadro 9. Morfología colonial de las cepas aisladas en medio Nfb del muestreo de octubre 2016.	40
Cuadro 10. Morfología colonial de las cepas aisladas en medio Nfb del muestreo de marzo 2017.	41
Cuadro 11. Morfología colonial de las cepas aisladas en medio Nfb del muestreo de Agosto 2018.	42
Cuadro 12. Morfoespecies encontradas en cada sitio. ....	44
Cuadro 13. Índice de diversidad de los sitios de estudio calculado por el método de Margalef. ....	45
Cuadro 14. Pruebas bioquímicas realizadas en las cepas aisladas del sitio Cascada Ranita. ....	46
Cuadro 15. Pruebas bioquímicas realizadas en las cepas aisladas del sitio Buena Vista. ....	47
Cuadro 16. Pruebas bioquímicas realizadas en las cepas aisladas del sitio Xalitzintla. ....	48
Cuadro 17. Pruebas bioquímicas realizadas en las cepas aisladas del sitio San Nicolás de los Ranchos. ....	49
Cuadro 18. Cepas aisladas de los géneros <i>Azospirillum</i> y <i>Azotobacter</i> por sitio. ....	53

## RESUMEN

En los sistemas naturales, una entrada importante de nitrógeno se realiza mediante la fijación biológica de  $N_2$  por microorganismos diazótrofos simbiotes como *Rhizobium* o de vida libre como *Azotobacter* y *Azospirillum* los cuales fueron estudiados en suelos de cuatro ambientes ribereños a 2400, 2700, 3300 y 3900 m snm a lo largo de un sistema fluvial de régimen permanente en la Reserva de la Biosfera los Volcanes con el objetivo de evaluar la presencia y abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno (géneros *Azospirillum* y *Azotobacter*) y su relación con los contenidos de nitrógeno total en suelos ribereños de montaña en un gradiente altitudinal. El sitio de mayor altitud, Cascada Ranita (3900 m), con vegetación de zacatonal montano desarrollado en un Andosol Vitríco úmbrico, se encuentra en un microvalle formado en una depresión intermontana. En el segundo sitio existen bosques de Pino-Abies sobre un Andosol se distingue como zona turística Buena Vista (3300 m). Sobre los 2700 m se ubicó el tercer sitio (Xalitxintla) donde se realizan actividades agrícolas en una zona boscosa fragmentada sobre fluvisols. Por último, a 2400 m (San Nicolás de los Ranchos) el sitio cuatro, presenta un fluvisol que sustenta árboles frutales y cultivos de temporal. Además de la caracterización edafo-ecológica “*in situ*” y geo-referenciación del sitio; a ambos lados del arroyo (efectos solana-umbría) se colectaron, cada 5 m sobre un transecto de 30 m de largo (a 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 m), pares de muestras que, respecto al borde del arroyo, fueron colectadas a 15, 35, 70 y 100 cm de distancia. Con estas sub-muestras se formaron muestras compuestas para caracterizar los suelos mediante análisis físico y químico y muestras para el análisis microbiológico que fueron trasladadas a laboratorio en refrigeración. Las pruebas químicas y físicas realizadas a los suelos fueron la textura, porcentaje de humedad, materia orgánica, pH, conductividad eléctrica, nitrógeno total y relación carbono-nitrógeno. Para los análisis microbiológicos, mediante la técnica de diluciones seriadas se inoculó una alícuota correspondiente a  $5.6 \times 10^{-6}$  g de suelo en medio de cultivo libre de nitrógeno (Nfb) para cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC) de organismos fijadores de nitrógeno. Posteriormente, se aislaron y mediante pruebas bioquímicas y celulares, se realizó la determinación para el reconocimiento de organismos de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum*. Se realizaron análisis de varianza y correlación, con los cuales se evaluaron las diferencias entre los diferentes ambientes estudiados y las relaciones entre UFC y propiedades químicas y físicas como la materia orgánica, contenido de nitrógeno, pH, humedad del suelo, conductividad eléctrica y temperatura. Se encontró que los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* se registraron en los suelos de todos los sitios del gradiente altitudinal. Se observaron correlaciones positivas entre la abundancia de organismos fijadores de nitrógeno con el incremento de nitrógeno total del suelo y del incremento de las UFC de estas bacterias al disminuir la altitud que trae consigo condiciones ambientales menos hostiles de temperatura y humedad del suelo y ante condiciones de mayores contenidos de MOS. El sitio con mayor valor de UFC fue San Nicolás ( $33 \times 10^5 g^{-1}$ suelo) y el menor en Xalitxintla con ( $1 \times 10^5 g^{-1}$ suelo). Se observó que *Azotobacter* y *Azospirillum* están presentes de manera similar en todos los sitios de estudio y que el contenido de nitrógeno en el suelo tienen correlación estadística positiva ( $r = 0.5058$ ;  $\alpha \leq 0.0001$ ) con las UFC. San Nicolás de los Ranchos, es el sitio con mayor índice de diversidad (IDMg = 4.5) seguido de Cascada Ranita (IDMg = 2.58), Xalitxintla (IDMg = 2.49) y Buena Vista con el valor más bajo (IDMg = 2.45).

## SUMMARY

In natural ecosystems, the activity of symbiont diazotrophic microorganisms such as *Rhizobium* or free-living organisms such as *Azotobacter* and *Azospirillum* make an important contribution of nitrogen through biological fixation of  $N_2$ . In order to evaluating the presence and abundance of nitrogen fixing bacteria (*Azospirillum* and *Azotobacter* genera) and their relationship with the total nitrogen contents in mountain riparian soils, these microbial genera were studied in soils of four riparian environments at 2400, 2600, 3300 and 3900 m asl, along the permanent regime stream in the Los Volcanes Biosphere Reserve. The highest altitude site, Cascada Ranita (3900 m), with montane zacatonal developed in an Umbric Vitric Andosol, is located in a microvalle formed in an intermontane depression. In the second site there are pine-abies forests on an Andosol and it is distinguished as a tourist area, Buena Vista (3300 m). On the 2700 m the third site (Xalitizintla) was located where agricultural activities are carried out in a fragmented forest area on fluvisols. Finally, at 2400 m (San Nicolas de los Ranchos), site four presents fluvisols that support fruit trees and temporary crops. Together with edafo-ecological characterization "in situ" and geo-referencing of site, both sides of the stream (solarium-Umbria effects) were collected, every 5 m on a 30 m long transect (at 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 m), pairs of samples that, with respect to edge of stream, were collected at 15, 35, 70 and 100 cm. With these sub-samples, composite samples were formed to characterize soils by physical and chemical analysis and others for microbiological analysis, which were transferred to laboratory in refrigeration conditions. The chemical and physical tests performed on soils were texture, percentage of humidity, organic matter, pH, electrical conductivity, total nitrogen and carbon-nitrogen ratio. For microbiological analyzes, using an aliquot of  $5.6 \times 10^{-6}$  g de suelo dilution was inoculated into a nitrogen-free culture medium (Nfb) to quantify colony forming units (CFUs) of nitrogen fixing organisms. Subsequently, they were isolated and by means of biochemical and cellular tests, the determination was made for the recognition of organisms of *Azotobacter* and *Azospirillum* genera. Variance and correlation analyzes were performed, through which the differences between different environments studied and relationships between CFUs and chemical and physical properties such as organic matter, nitrogen content, pH, soil moisture, electrical conductivity and temperature were evaluated. It was found that genera *Azotobacter* and *Azospirillum* were found in soils of all sites of the altitudinal gradient. Positive correlations were observed between abundance of nitrogen-fixing organisms with increase in soil total nitrogen and increase in CFU of these bacteria by decreasing the altitude that brings less hostile environmental conditions of soil temperature and humidity and under conditions of higher content of MOS. The site with the highest value of UFC was San Nicolas ( $33 \times 10^5 g^{-1} soil$ ) and the lowest in Xalitizintla with ( $1 \times 10^5 g^{-1} soil$ ). It was observed that *Azotobacter* and *Azospirillum* are similarly present in all study sites and that soil nitrogen content has a positive statistical correlation ( $r = 0.5058$ ;  $\alpha \leq 0.0001$ ) with the CFU. San Nicolás de los Ranchos, is the site with the highest diversity index (IDMg = 4.5) followed by Cascada Ranita (IDMg = 2.58), Xalitixintla (IDMg = 2.49) and Buena Vista with the lowest value (IDMg = 2.45).

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos desempeñan funciones de gran importancia en relación con procesos de edafogénesis como mineralización y humificación de materia orgánica del suelo (MOS); ciclos biogeoquímicos de elementos como carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, hierro y otros elementos; protección frente a patógenos; degradación de compuestos xenobióticos, etc. (Grageda *et al.*, 2004; Nogales, 2005).

El nitrógeno es el elemento más importante desde un punto de vista ecológico y económico debido a que la fertilidad del suelo es definida en gran medida por la cantidad de nitrógeno presente (Grageda *et al.*, 2004; Nuñez, 2010). Por esta razón las actividades agrícolas modernas dependen de fertilizantes sintéticos que tienen la finalidad de generar las condiciones óptimas de desarrollo en los cultivos, sin embargo, la mala implementación y su excesivo uso genera severos problemas ambientales, entre los que destaca la contaminación de cuerpos de agua superficiales y subterráneos (Grageda *et al.*, 2004; Sans, 2007). Recientemente, generan alta preocupación los óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) debido al papel que desempeñan como gas de efecto invernadero en la desnaturalización de la capa de ozono (Grageda *et al.*, 2000).

La creciente preocupación por efectos desfavorables para el medio ambiente por el suministro de fertilizantes sintéticos, ha llevado a buscar alternativas sustentables entre las cuales destaca la implementación de técnicas que utilizan bacterias para la fijación de nitrógeno (Armenta *et al.*, 2010). De acuerdo con diversos autores (Winston, 1990; Baca *et al.*, 2000; Celaya y Catellanos, 2011) la fijación del nitrógeno es un proceso clave para que continúe la vida sobre este planeta, pues gracias a ella se recobra el nitrógeno que se pierde de forma natural por desnitrificación, lixiviación o por la incorporación que hacen las plantas de este elemento (Alexander, 1994; Flores *et al.*, 2009; Nuñez, 2010; Cerón y Aristizábal, 2012).

La fijación de N<sub>2</sub> atmosférico, ya sea de forma simbiótica o de vida libre, recae en un número limitado de especies bacterianas poseedoras de la enzima nitrogenasa donde destacan los géneros *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Agrobacterium*, *Beijerinckia*, *Acetobacter* y *Cyanobacterias* (Madigan *et al.*, 2009; Rariz *et al.*, 2012).

Estos géneros han sido ampliamente estudiados debido a los beneficios que aportan al desarrollo vegetal y edáfico, además de presentar una amplia distribución, lo que genera especial interés en la industria agrícola (Calderon, 2006; Clavijo *et al.*, 2012).

En los sistemas ribereños, como en todos los ecosistemas terrestres, los suelos son cuerpos naturales conformados por materiales minerales, materia orgánica y biota (López, 2015). En el caso de los suelos de ecosistemas ribereños (ER), estos presentan frentes de humedad variable a lo largo del año por lo que las condiciones de aireación también fluctúan (Vázquez *et al.*, 2015). La diferencia entre suelos no ribereños con aquellos que soportan la vegetación riparia, son muy grandes en sus características

morfológicas y en sus condiciones de humedad. Los ER son hábitats diversos, dinámicos y complejos, ya que son la interfase entre los sistemas terrestres y los acuáticos. Estos ambientes controlan el flujo de materia y energía entre ambos sistemas, por lo que presentan una alta biodiversidad (Cerón y Aristizábal, 2012; Vázquez *et al.*, 2015) Además, proporcionan bienes y servicios ambientales esenciales tales como obtención de madera, captura de carbono y productos forestales no maderables, captación y almacenamiento del agua de lluvias, regulación de corrientes superficiales y subterráneas, mejorando la calidad del agua (CONAFOR, 2011; FAO, 2012).

Esta investigación se llevó a cabo en la Reserva de la Biósfera los Volcanes, considerada como una de las áreas protegidas más antiguas de México. El estudio incluye cuatro sitios de estudio considerados representativos de suelos ribereños en montaña alta y media, a través de un gradiente altitudinal entre 2400 y 4000 m dentro de la Reserva de la Biósfera los Volcanes dado que cada sitio presenta condiciones ambientales y antrópicas distintas. La principal diferencia entre los sitios de estudio fue el uso de suelo, donde en la zona de menor altitud se encuentra una zona urbanizada y en el sitio de mayor altitud se encuentran un pastizal de alta montaña poco perturbado.

Los estudios microbiológicos de los suelos generalmente han sido orientados a suelos agrícolas (Domínguez, 2006; Armenta *et al.*, 2010; Clavijo *et al.*, 2012) y en menor cantidad a suelos de ecosistemas naturales sin perturbación (Celaya y Catellanos, 2011). De la revisión de literatura, se concluye que estudios microbiológicos de suelos de ribera son sumamente escasos y particularmente, para México en ecosistemas de montaña son nulos hasta el momento. Por todo lo mencionado en esta sección se plantean las siguientes preguntas de investigación; ¿Entre las bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno en suelos de ribera en ecosistemas de montaña, están los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter*? y si están, ¿en qué densidad se encuentran en los diferentes tipos de uso de suelo que se presentan en el gradiente altitudinal que va de 2400 hasta los 4000 m desde la zona urbana, hasta la zona de conservación?

Con la finalidad de tener un diagnóstico cada vez más completo de cuatro sistemas ribereños en diferentes biotopos se identificó la presencia de bacterias de vida libre aerobias implicadas en la fijación de nitrógeno en suelos con diferente exposición solar en un gradiente altitudinal, el presente proyecto se llevó a cabo en una sección del Río Apol dentro de una microcuenca perteneciente a la cuenca del Alto Balsas.

## MARCO TEÓRICO

### 1. ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS

Las Áreas Naturales Protegidas (ANP) son las zonas del territorio nacional en donde los ambientes originales no han sido significativamente alterados por actividad humana o que requieren ser preservadas y restauradas. Están sujetas a regímenes especiales de protección, conservación, restauración y desarrollo, según categorías establecidas en la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente. La Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas administra actualmente 176 áreas naturales de carácter federal que representan más de 25,394,779 ha divididas en nueve regiones en el país. Cuyo objetivo es mantener la representatividad de los ecosistemas de México y su biodiversidad, asegurando la provisión de sus servicios ambientales mediante su conservación y manejo sustentable, fomentando el desarrollo de actividades productivas, con criterios de inclusión y equidad, que contribuyan a la generación de empleo y a la reducción de la pobreza en las comunidades que viven dentro de las ANP y sus zonas de influencia (CONANP, 2016).

#### 1.1 RESERVA DE LA BIÓSFERA LOS VOLCANES

La Reserva de la Biósfera los Volcanes, es una de las áreas protegidas más antiguas de México. Fue creado en 1935 con el fin de proteger las montañas que conforman la Sierra Nevada, en el centro oriental del Eje Volcánico Transversal, y declarado por la UNESCO como Reserva de la Biosfera Los Volcanes en 2010 (CONANP, 2013). Su ubicación geográfica en el centro de la macrorregión más poblada de la nación, lo hacen invaluable por los servicios ambientales que proporciona, especialmente la provisión de agua (Lopez, 2004; CONANP, 2016).

La región de los volcanes forma parte de lo que fue una extensa región cultural en la época prehispánica. Los primeros habitantes establecidos llamaban a la Sierra Nevada como Sierra de Ahalco o de Ahalulco (lugar coronado de agua), donde suponían que moraban los genios tutelares del Anáhuac, donde culminan las montañas sagradas: el Iztactepetl (blanca montaña) y el Xalliquehuac (arena que se levanta) (CONANP, 2013).

La Reserva de la Biósfera los Volcanes es un área natural de suma importancia debido a la riqueza y diversidad de recursos naturales y servicios ambientales que brinda a la población central del país (López, 2004). Se encuentra dentro del eje Neo-volcánico Transversal y parte de la Sierra Nevada, presenta alta diversidad biológica, debido a la ubicación geográfica y la convergencia de dos zonas biogeográficas: la neo-ártica y la neo-tropical (Figura 1), presenta una variedad de climas que van desde el templado húmedo, frío y muy frío. Presenta un rango altitudinal desde los 3 500 m hasta sobrepasar los 5 000 m. Abarca una superficie de 39 819 ha, divididas entre los estados, Puebla, Morelos y Estado de México (CONANP, 2013).

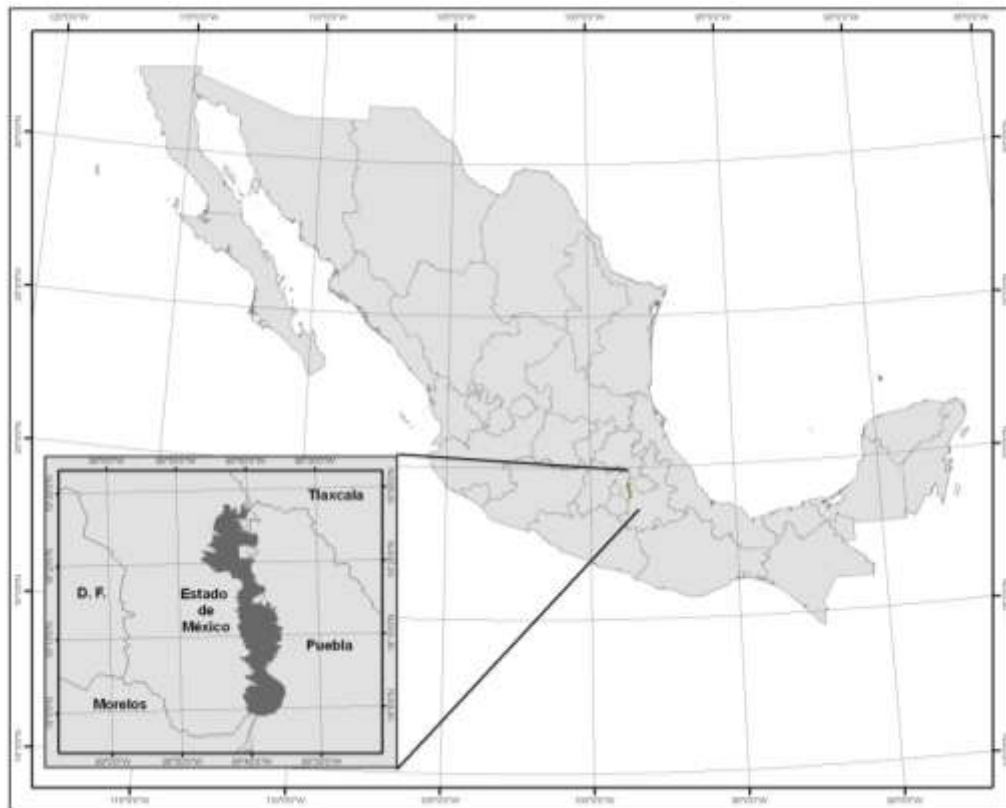


Figura 1. Ubicación espacial de la Reserva de la Biósfera Los Volcanes (CONANP, 2016).

## 2. ECOSISTEMAS RIBEREÑOS

La zona riparia es la región de transición e interacciones entre los medios terrestre y acuático (Granados *et al.*, 2006; Elozegi y Sabater, 2009; Vázquez *et al.*, 2015), pues son considerados corredores ecológicos que mantienen la conectividad del paisaje a lo largo de gradientes ambientales extensos. Por lo que estos corredores son hábitats diversos, dinámicos y complejos, que abarcan diferentes comunidades y procesos ecológicos (Vázquez *et al.*, 2015).

Estos ambientes controlan el flujo de materia y energía entre ambos sistemas (Granados *et al.*, 2006; Elozegi y Sabater, 2009). Los bosques ribereños juegan un papel importante al procesar una mayor cantidad de materia orgánica y retener parte de los nutrientes transportados por la escorrentía hasta los cursos de agua, regulación de la infiltración del agua de lluvia, la retención de sedimentos y la acumulación de materia orgánica (Neill *et al.*, 2001; Elozegi y Sabater, 2009). Por otro lado, frenan la eutrofización y la polución de los ríos, actúan como un filtro ecológico al retener y degradar sustancias tóxicas como los pesticidas, que provienen de terrenos agrícolas, estos aspectos influyen en la dinámica de los cuerpos de agua, procesos y biodiversidad (Granados, 2006). Los bosques ribereños con

frecuencia son excepcionalmente fértiles y productivos. Estas áreas que yacen en las planicies de inundación, por lo general, demuestran ser ricas en nutrientes, debido a que siempre que una corriente de agua escapa de sus bancos, deja un depósito de sedimentos tras de sí (Granados *et al.*, 2006; Vázquez, 2015).

Los sistemas vegetales que se encuentran en la periferia o cercanos a cursos y cuerpos de agua, son una transición entre hábitats terrestres y acuáticos en sus diferentes estratos vegetales cumpliendo un papel ecológico importante en la conservación de los servicios ecosistémicos ribereños (Romero *et al.*, 2014), ya que mantienen una alta biodiversidad y son un hábitat crítico para la conservación de especies raras y amenazadas (Granados *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 2015). La composición de la vegetación ribereña depende de la elevación, y típicamente consta de árboles deciduos de los géneros *Populus*, *Quercus*, *Salix* y *Alnus*, por ejemplo, ahuehuetes, encinos y mezquites. El marcado contraste entre la vegetación de ribera y la de las tierras altas, produce una diversidad estructural, y las características del borde realzan su utilidad para la fauna silvestre (Granados *et al.*, 2006). Estos sistemas funcionan como fuentes de biodiversidad, debido a los rasgos particulares de la ribera se generan un gran número de hábitats y micro-hábitats acuáticos, semi-acuáticos y terrestres. Esto genera reservorios genéticos de las especies que los ocupan. Un claro ejemplo es el aumento de la densidad de aves en reproducción en los bosques ribereños a comparación con las áreas cercanas de tierras altas (Granados *et al.*, 2006).

Los corredores ribereños presentan límites complicados de definir, sin embargo, éstos incluyen el canal del río y la porción más alta del cauce donde se alcanza el nivel máximo. Por lo tanto, la posición y tamaño del río en la red hídrica, el régimen hidrológico y la geomorfología local tienen influencia en la vegetación y en las comunidades de organismos asociadas a ella (aves, mamíferos, invertebrados, algas, etc.) que a su vez afectan la diversidad de atributos funcionales del río (Granados *et al.*, 2006; Vázquez *et al.*, 2015).

Actualmente se reconoce que la interacción de factores biológicos y antrópicos en el suelo se manifiestan en las propiedades químicas y físicas de la vegetación ribereña (Vázquez *et al.*, 2015). La pérdida de agua es uno de los principales problemas que se presentan en estos ecosistemas por dos amplias razones: debido a la perturbación de los bosques que sirven como sistemas de infiltración ante las precipitaciones, y el crecimiento poblacional que exige cada vez más el recurso (CONANP, 2013).

## 2.1. ECOSISTEMAS RIBEREÑOS DE ALTA MONTAÑA

Actualmente los ecosistemas montañosos son poco estudiados, con menor énfasis en zonas ribereñas, sin embargo, los ecosistemas de montaña son hogar y refugio de una quinta parte de la población mundial, así como la reserva de casi 80% del total de agua dulce que existe sobre la superficie terrestre (Agurto *et al.*, 2002). Las montañas de las zonas húmedas aportan 60% del total del escurrimiento hacia las cuencas hidrográficas y hasta el 95% en zonas áridas y semiáridas (FAO, 2012), por lo que se debe



considerar que los ríos que nacen en las montañas como lazos vivos que conectan las montañas y las comunidades de las llanuras, proporciona agua para riego, producción de alimentos y uso doméstico (Agurto *et al.*, 2002).

### 3. SUELO

El suelo se define como el medio natural para el crecimiento de las plantas. También se ha definido como un cuerpo natural que consiste en capas de suelo (horizontes del suelo) compuestas de materiales minerales meteorizados, materia orgánica, aire y agua. El suelo es el producto final de la influencia del tiempo combinado con el clima, topografía, organismos (flora, fauna y ser humano), de materiales parentales (rocas y minerales originarios). Como resultado el suelo difiere de su material parental en su textura, estructura, consistencia, color y propiedades químicas, biológicas y físicas (FAO, 2019).

#### 3.1. PROPIEDADES QUÍMICAS DEL SUELO

##### 3.1.1. MATERIA ORGÁNICA

La materia orgánica es la fracción del suelo que incluye restos vegetales y animales en diferentes estados de descomposición, tejidos y células de organismos que viven en el suelo y las sustancias producidas por sus habitantes (Cepeda, 1991). El porcentaje de materia orgánica depende de distintos factores, los más importantes son el clima y la vegetación. Se compone básicamente de carbohidratos: azúcares, almidones, celulosas y hemicelulosas; proteínas y aminoácidos: ligninas, taninos y en menor porcentaje grasas, aceites, ceras y resinas (Reyes, 1996).

##### 3.1.2. pH

EL pH del suelo constituye una de las propiedades más importantes, expresa la actividad de los iones hidrógeno en la solución del suelo. Este afecta la disponibilidad de nutrientes minerales para las plantas, así como a muchos procesos del suelo (Reyes, 1996) como intemperización de minerales, formación de arcillas, descomposición de la materia orgánica, además de ser un factor que puede limitar o propiciar algunas reacciones bioquímicas, por lo tanto, puede influir de manera significativa en la biota del suelo (Jackson, 1982; Guerra y Cruz, 2014).

### 3.1.3. CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

La conductividad eléctrica (CE) es una medida de la capacidad de un material para transportar la corriente eléctrica. La conductividad eléctrica de una solución electrolítica depende de la concentración total de iones presentes en agua, de su valencia y la temperatura a la que se toma la determinación. En el caso del suelo la CE se mide a través de los constituyentes inorgánicos (sales como  $\text{CaCO}_3$ ) solubles que posee (SEMARNAT, 2003).

### 3.1.4. NITRÓGENO TOTAL

El nitrógeno es uno de los elementos más abundantes en la tierra. Las principales formas químicas de este elemento son: nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), óxido nítrico (NO), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y nitrógeno elemental ( $\text{N}_2$ ), este último comprende el 78% de la corteza terrestre. En el suelo se encuentra principalmente en forma orgánica (< 95%), este se encuentra incluido en la materia orgánica, y para su incorporación a los organismo requiere de ser mineralizada, el resto (< 5%) se encuentra en forma inorgánica y se encuentra disponible para las plantas en forma de amonio y nitrato principalmente (Elizondo, 2006).

El nitrógeno juega un papel importante en la biota, ya que se encuentra presente en biomoléculas esenciales como proteínas y ácidos nucleicos, por lo que su disponibilidad en forma inorgánica (nitratos y amonio) en el suelo es indispensable para el desarrollo vegetal (SEMARNAT, 2003; Guerra y Cruz, 2014).

## 3.2. PROPIEDADES FÍSICAS DEL SUELO

### 3.2.1. TEXTURA

La textura del suelo es la proporción de los diversos grupos de tamaños de las partículas del suelo (Cuadro 1) que pueden separarse por medios físicos y químicos (Guerra y Cruz, 2014). De acuerdo a los porcentajes de las diferentes partículas, los suelos se clasifican en diferentes clases texturales (Figura 2 ).

Cuadro 1. Diámetro de las partículas del suelo (Foth, 1986; SEMARNAT, 2003)

Partícula	Diámetro mm
Arena gruesa	2.00-0.50
Arena media	0.50-0.25
Arena fina	0.25- 0.10
Arena muy fina	0.10-0.05
Limo	0.05-0.002
Arcilla	<0.002

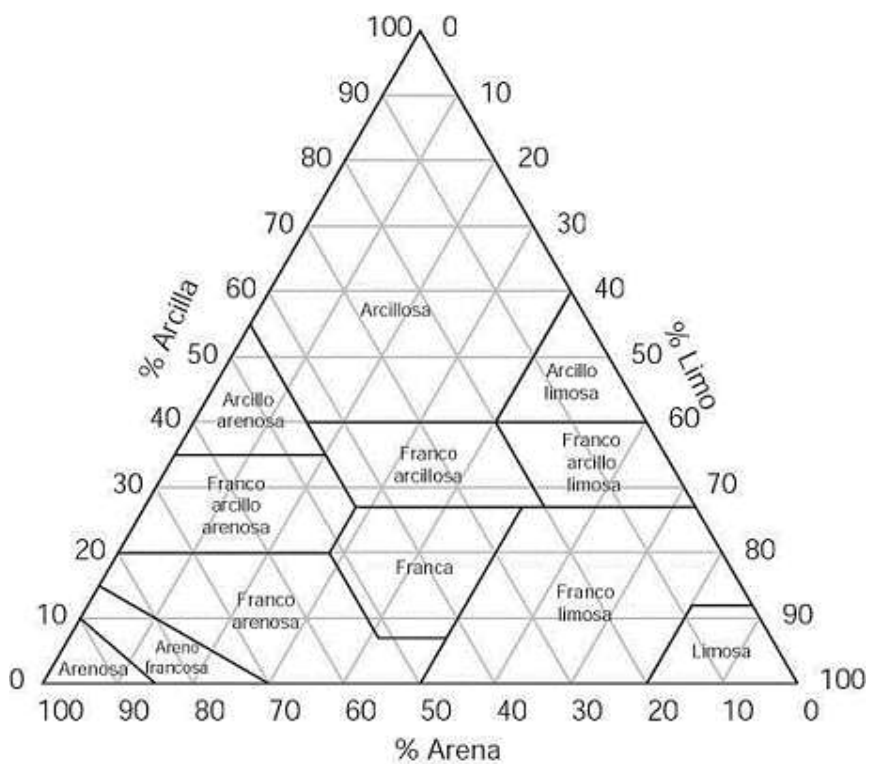


Figura 2. Triángulo de textura del suelo (Foth, 1986; SEMARNAT, 2003).

### 3.2.3. HUMEDAD DEL SUELO

La cantidad de agua que posee el suelo es una de sus características más específicas y variables. Está determinada, fundamentalmente, por la composición de sus fracciones mineral y orgánica y el arreglo que presente el medio físico edáfico.

La cantidad de agua existente en un determinado momento del suelo se conoce como el porcentaje de humedad, y es empleado para la capacidad de campo del suelo y el secado al aire. Ello posibilita la clasificación del agua existente en el suelo como gravitacional, capilar e higroscópica (Palmer y Troeh, 1979; Jaramillo, 2002; SEMARNAT, 2003).

### 3.3. SUELO COMO COMPONENTE ECOSISTÉMICO

Los suelos son cuerpos naturales conformados por materiales minerales, materia orgánica, agua, gases y organismos vivos, como lombrices, insectos, hongos, algas, nematodos, protozoos y otros organismos microbianos como las bacterias (López, 2015). Es considerado el mayor reservorio de diversidad microbiana (Carbonetto, 2014; Cadena *et al.*, 2016), por ejemplo, 1 g de tierra contienen hasta 140 millones de células bacterianas (Detlef *et al.*, 2019), además Gaby y Buckley (2015) señalan que en el suelo existen 50% más de taxones funcionales en comparación con el océano.

La mayoría de los microorganismos de vida libre viven en películas de agua sobre la superficie de los minerales o materia orgánica debido al microambiente existente sobre la superficie (Campbel, 1987; Montañó *et al.*, 2013) sin embargo algunos generan simbiosis con organismos vegetales habitando sobre las raíces, de esta forma pueden beneficiarse de los exudados radicales y estos a su vez promover el crecimiento vegetal a través de la fijación biológica de nitrógeno (FBN), solubilización de fosfatos o formación de hormonas vegetales como es el caso de los géneros *Beijerinckia*, *Derxia*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* (Rives *et al.*, 2007; Armenta *et al.*, 2010). Se conoce que la degradación de materiales orgánicos en ambientes naturales es mediada, principalmente por bacterias y hongos (Hernández *et al.*, 2006), aunque estos grupos de microorganismos llevan a cabo muchas transformaciones similares, las bacterias sobresalen debido a su gran capacidad de degradación y un alto crecimiento poblacional, además de ser las responsables de casi todos los cambios químicos y biológicos del suelo en condiciones anaerobias y aerobias (Alexander, 1994; Madigan *et al.*, 2009). Las bacterias representan el grupo de microorganismos con mayor diversidad y se encuentran en todos los ambientes (Hernández *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2009), estas presentan una gran variedad de aspectos nutricionales y metabólicos, debido a que pueden utilizar la mayoría de los elementos presentes en el suelo (Madigan *et al.*, 2009). Incluso pueden modificar algunas sustancias tóxicas como es el caso de los hidrocarburos (Viñas, 2005; Maldonado *et al.*, 2010).

### 3.4. CICLOS BIOGEOQUÍMICOS

Se pueden considerar a los ciclos biogeoquímicos como conductos a través de los cuales depósitos como el océano, sedimentos y atmósfera se conectan, donde la materia se mueve a través de ellos (Manahan, 2007). Los ciclos de carbono, agua, nitrógeno y azufre se caracterizan por acumulaciones de estos elementos en los distintos reservorios. Están ligados a factores ambientales, distribución de ecosistemas, y actividades humanas (Tortora *et al.*, 2007; Detlef *et al.*, 2019).

Los flujos entre la superficie de la Tierra y la atmósfera son esencialmente controlados por organismos y actividades antropogénicas, mientras que los procesos en la atmósfera dependen en gran medida del aporte de energía solar (Detlef *et al.*, 2019).

Los ciclos elementales son de suma importancia para el ambiente, debido al reciclaje de materia que representan (Manahan, 2007). Los seres vivos de nuestro planeta reciclan constantemente los elementos químicos de los que están compuestos (Tortora *et al.*, 2007).

Las plantas juegan un papel crucial en los ciclos biogeoquímicos a medida que absorben nutrientes desde el suelo, liberar agua a la atmósfera a través de transpiración, respiración y fotosíntesis, y fijación de N atmosférico por simbiosis con *Rhizobium* (leguminosas). Proporcionar el sustrato primario para herbívoros, así como el sustrato para alimentar a los organismos del suelo con materia orgánica a través de exudados de raíz y hojarasca. La mineralización de la materia orgánica esta mediada por microorganismos del suelo, junto con la respiración de la raíz representa uno de los mayores flujos naturales de CO<sub>2</sub> (Detlef *et al.*, 2019). Además, los organismos del suelo también son responsables de la liberación de CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O del suelo a la atmósfera (Bore *et al.*, 2017; Detlef *et al.*, 2019).

#### 3.4.1. CICLO DEL NITRÓGENO

El ciclo del nitrógeno es el más importante desde un punto de vista tanto ecológico como económico (Cerón y Aristizábal, 2012). Esta importancia radica principalmente debido a que el nitrógeno (N) es un elemento necesario en la composición de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, siendo así una molécula esencial para el crecimiento de todos los organismos (Allan y Graham, 2002 citado en Mayz, 2004; Castillo *et al.*, 2005). Además, la fertilidad del suelo es definida en gran medida por la cantidad de nitrógeno del suelo (Alcantar y Trejo, 2009). Las formas de estos nutrientes asimilables por las plantas (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) son producidas por microorganismos mediante la mineralización (Tortora *et al.*, 2007), sin embargo este elemento es escaso en la corteza terrestre, la mayor parte del nitrógeno se encuentra en formas inorgánicas, como amoníaco (NH<sub>3</sub>), nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), o dinitrógeno (N<sub>2</sub>), este último es el más abundante, aproximadamente 78% de la atmosfera (Rodríguez *et al.*, 1984; Castillo *et al.*, 2005; Mantilla *et al.*, 2009). El N es un elemento casi inerte debido a su triple enlace, esto limita su

aprovechamiento a un pequeño grupo de microorganismos (Baca *et al.*, 2000; Tortora *et al.*, 2007; González Ruiz, 2008).

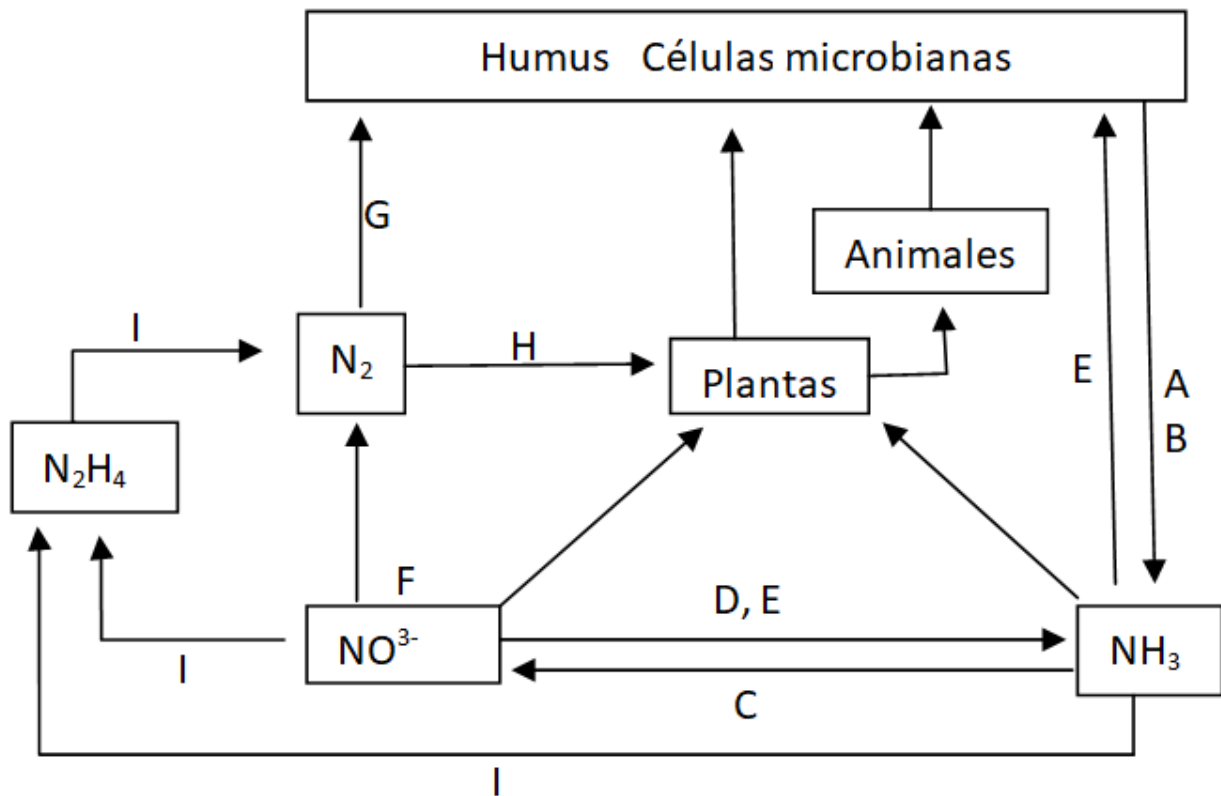


Figura 3. Diagrama representativo del ciclo del nitrógeno. A) Amonificación; B) Mineralización; C) Nitrificación; D) Reducción de nitrato; E) Inmovilización; F) Des-nitrificación; G) Fijación de nitrógeno no simbiótica; H) Fijación de nitrógeno simbiótica; I) Anamox. Toma de Alexander, 1994, modificada con datos de Stein y Klotz (2016).

El ciclo del nitrógeno (Figura 3) depende en gran medida de la actividad de los microorganismos, todos los hábitats dependen de la fijación de nitrógeno atmosférico, las plantas no podrían continuar su metabolismo si no dispusieran de formas fijadas de nitrógeno (Castillo *et al.*, 2005; Manahan, 2007). La fijación biológica del nitrógeno recae en limitadas especies bacterianas (poseedoras de la enzima nitrogenasa) las más estudiadas se presentan dentro de los géneros: *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Nostoc*, *Klebsiella*, *Beijerinckia* (Baca *et al.*, 2000; Domínguez, 2006; Armenta *et al.*, 2010; Celaya y Catellanos, 2011; Escobar *et al.*, 2011). Para esto el nitrógeno sufre un número de transformaciones (procesos oxido reducción) que involucran a compuestos orgánicos, inorgánicos y volátiles, que se efectúan de manera simultánea y opuestas (Alexander, 1994; Stein y Klotz, 2016).

Las formas químicas del nitrógeno dependen de factores ambientales, de los cuales sobresale el clima (Palma, 2010). Mariotti (1983) plantea la propuesta de una disminución de nitrógeno tanto en plantas como en el suelo a medida que la altitud aumenta, la temperatura disminuye y la precipitación

aumentara, y actualmente se ha reportado una caída abrupta de N y C superando los 4100 m (Palma, 2010). De acuerdo con Castillo *et al.* (2005) esto puede deberse a que los iones amonio, nitrato y nitrito se encuentran como sales muy solubles, es por esto que el humus y materia orgánica de los suelos constituye una reserva estable de nitrógeno (Castillo *et al.*, 2005).

#### 4 BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (BPCV)

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal desempeñan un papel clave en la toma de nutrientes, la tolerancia a estrés ambiental y, en general, el mantenimiento de la salud radical, favoreciendo así el aumento del rendimiento de los cultivos. Muchas bacterias presentes en suelo son consideradas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), debido a su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas, a través de diversos mecanismos (Loredo *et al.*, 2004)

- Aporte de N por fijación.
- Producción de sustancias reguladoras del crecimiento.
- Solubilización de minerales.
- Incremento de raíz.
- Resistencia a patógenos.
- Interacción con otros microorganismos del suelo.

Estas bacterias están asociadas a muchas de las especies de plantas que están presentes en la mayoría de los ambientes (Compant *et al.*, 2005 citado en Rives *et al.*, 2007), pero pueden ser de vida libre por lo que presentan características aerobias, anaerobias o anaerobias facultativas (Rodríguez, 1995). Esta flexibilidad metabólica es debida principalmente a su amplia diversidad, podemos encontrar a *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Derxia*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* (Gholami *et al.*, 2009) como los géneros cultivables más representativos donde la variación de las poblaciones de microorganismos responde predominantemente a los cambios de humedad del suelo, más que a las fluctuaciones de temperatura (Herman *et al.*, 1994).

Además de la fuente de carbono, las bacterias aerobias de vida libre requieren de oxígeno o de una baja disponibilidad de este elemento en el caso de bacterias micro-aerobias, demandan también nutrimentos minerales, como: molibdeno, hierro, calcio, potasio y magnesio (Loredo *et al.*, 2004).

Se han descrito diversos géneros que tienen la capacidad de fijar nitrógeno y producir compuestos promotores del crecimiento vegetal, entre los que se destacan: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Benjerinckia*, *Derxia*, *Bacillus*, *Klebsiella* (Rives *et al.*, 2007; Armenta *et al.*, 2010).

#### 4.1. BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO (FBN)

Debido a la sobreexplotación y el mal manejo de los suelos estos presentan bajos niveles de materia orgánica (MOS) esto no proporciona a los cultivos cantidades suficientes de nitrógeno, por lo que la fijación adquiere una gran importancia como fuente de nitrógeno (Chotte *et al.*, 2002). La fijación biológica de nitrógeno (FBN) provee la mayor fuente de nitrógeno para los diferentes ecosistemas. A nivel mundial, este proceso es responsable del 65 % de la fijación anual, mientras que los procesos industriales (fijación por procesos químicos) solamente representan el 25 % (Poly *et al.*, 2001; Hamelin *et al.*, 2002 citado en Mantilla *et al.*, 2009).

Se estima que aproximadamente 97 % de la entrada de nitrógeno a los ecosistemas terrestres sin perturbación es producto de la FBN (Reed *et al.*, 2011) este proceso es exclusivo de organismos procariontes (diazotrofos) a través de la actividad de la enzima conocida como nitrogenasa (Cruz, 2006; González, 2008; Palma, 2010).

Existen tres estrategias de fijación de nitrógeno presentes en los ecosistemas terrestre: simbiosis, asociativa y de vida libre (Cruz, 2006), siendo el género *Rhizobium* el más representativo de las bacterias simbióticas y los géneros, *Azotobacter* y *Azospirillum* los más estudiados de vida libre. De estos géneros destaca *Azotobacter*, por ser el único capaz de fijar nitrógeno en condiciones aerobias y *Azospirillum* en condiciones micro aerobias, por lo cual, las condiciones abióticas afectan la dinámica de estos organismos. Debido a la sensibilidad a la oxidación de la nitrogenasa, la presencia de oxígeno es la principal limitante en la FBN (Madigan *et al.*, 2009). Es por esto que anteriormente se creía que la FBN más exitosa es aquella que se realiza en simbiosis entre, donde al formar nódulos se logra evitar la presencia de oxígeno, en esta estrategia de FBN se consigue fijar de 50-400 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en leguminosas noduladas y 20-300 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> en no leguminosas noduladas. Contrastando con la FBN no nodulada (asociativa y de vida libre) se fijan 1-200 kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Figura 4).




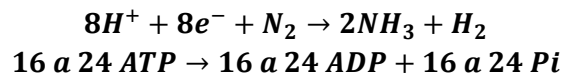
<p>Sistema de Fijación de N<sub>2</sub></p> <p>N<sub>2</sub> → NH<sub>3</sub></p> <p>Microorganismos que están involucrados</p>	 <p><b>SIMBIOSIS</b> <i>Rhizobium</i> <i>Actinomicetes</i></p>	 <p><b>ASOCIACIÓN</b> <i>Azospirillum</i> <i>Azotobacter</i></p>	 <p><b>VIDA LIBRE</b> <i>Azotobacter</i>, <i>Klebsiella</i>, <i>Rodospirillum</i></p>	
	<p>Fuente de energía Carbono orgánico</p>	<p>Sucrosa y sus metabolitos (Apertadas por la planta hospedera)</p>	<p>Exudados de la raíz de la planta hospedera)</p>	<p>Heterótrofos y residuos de plantas</p>
<p>Estimado de cantidad de N<sub>2</sub> fijado kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup></p>	<p>Leguminosas noduladas 50 -400</p> <p>Noduladas pero no Leguminosas 20 -300</p>	<p>10-200</p>	<p>1-2</p>	<p>10-80</p>

Figura 4. Tipos, fuente de energía y capacidad biológica de fijación de N<sub>2</sub> en suelos. (Tomada de Cruz, 2006).



En la fijación biológica de nitrógeno el dinitrógeno es reducido a amoníaco. Este proceso ésta catalizado por el complejo enzimático denominado nitrogenasa, el cual consta de dos proteínas diferentes: la dinitrogenasa y dinitrogenasa-reductasa (González, 2008). La ecuación 1 muestra la reacción de la FBN. El dinitrógeno ( $N_2$ ) es inerte debido a su triple enlace, por lo cual la reducción de  $N_2$  requiere de un alto consumo energético (Madigan *et al.*, 2009).



Ecuación 1. Reacción global de la fijación biológica de nitrógeno (Baca *et al.*, 2000; Steenhoudt y Vanderleyder, 2000; Cruz, 2006).

#### 4.1.1. BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO DE VIDA LIBRE

La fijación de  $N_2$  es un proceso energético costoso, esta alta demanda de energía limita la FBN de tal manera que los diazotrofos solo pueden fijar  $N_2$  cuando hay disponibles suministros adecuados de carbono, sin embargo, los exudados de las raíces de las plantas son ricos en C (polisacáridos) capaces de satisfacer las demandas de energía del diazotrófo por ello, los exudados de la raíz hacen que la rizósfera sea un área clave para la FBN en el suelo (Smercina *et al.*, 2019). Otro factor por el cual las bacterias fijadoras de vida libre es la resiliencia que tienen a las variaciones ambientales (figura 5) (Mantilla *et al.*, 2009; Celaya y Catellanos, 2011; Rariz y Fernández, 2012; Smercina *et al.*, 2019).

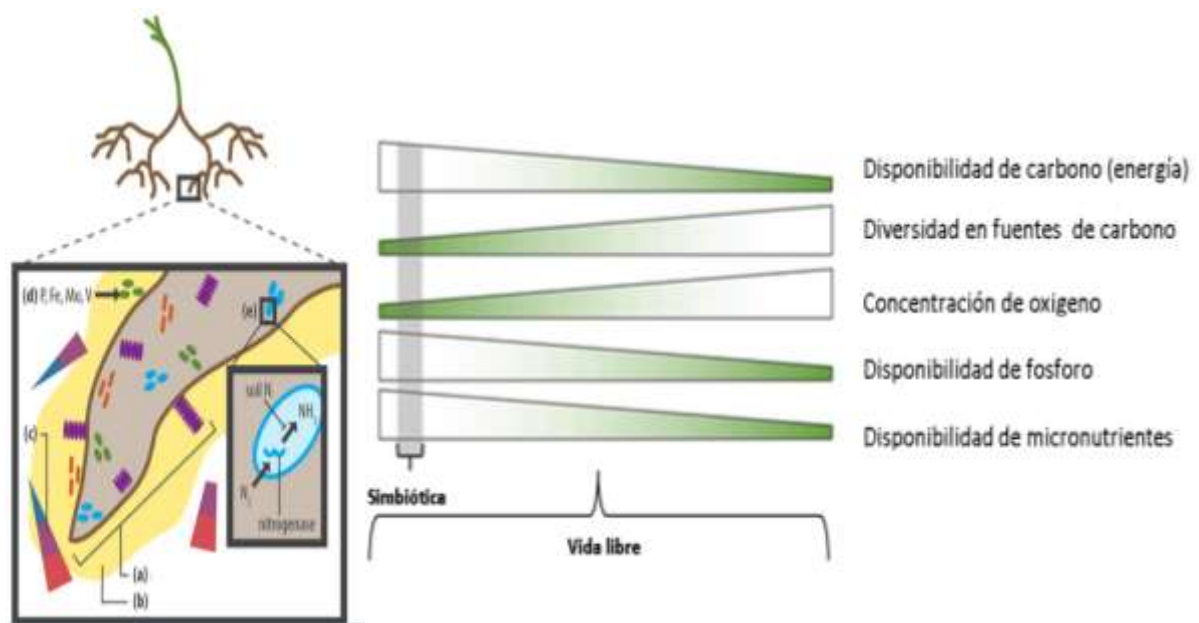


Figura 5. Representación del hábitat en la rizósfera de bacterias libres fijadoras de nitrógeno y la resiliencia de organismos fijadores de nitrógeno de vida libre: a) diversidad bacteriana, b) Carbono orgánico disuelto, c) variación en la concentración de oxígeno, d) Los organismo de vida libre deben adquirir micronutrientes de la solución del suelo, e) Fijación de nitrógeno. (Tomada de Smercina *et al.*, 2019).

#### 4.1.1.1 AZOTOBACTER

El género *Azotobacter* es representativo de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), es capaz de realizar fijación biológica de nitrógeno en condiciones aerobias, lo cual hace evidente la posible existencia de un mecanismo especial para la protección de la nitrogenasa, una posible adaptación es la alta tasa respiratoria que presenta, superando en mucho la de todas las bacterias aeróbicas lo cual podría impedir la penetración de O<sub>2</sub> en los lugares intracelulares de actividad de la nitrogenasa. También se ha sugerido una conformación especial de la nitrogenasa que la hace resistente al oxígeno y la formación de compuestos extracelulares que dificulten la entrada de oxígeno a la célula (Roger, 1992; Madigan *et al.*, 2009). Lo que se ve reflejado en la tasa de fijación de 0.01 g N ha<sup>-1</sup>día<sup>-1</sup> reportada para el caso de este género (González, 2008).

Los miembros de este género presentan morfología celular que va desde helicoidal a cocoide, son de tamaño grande hasta de 2 µm ancho en la mayoría de las especies (Williams y Wilkins, 1990; Roger *et al.*, 1992) y 7 µm de largo, tienen flagelos peritricos. Son Gram variables. Pueden formar cistes. Es común encontrarlos formando filamentos (Williams y Wilkins, 1990; Flores *et al.*, 2014).

#### 4.1.1.2 AZOSPIRILLUM

Otro género característico de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) es *Azospirillum* (Domínguez, 2011). Anteriormente se encontraban en el género *Spirillum*, pero estudios de Taran (1978) con *Spirillum lipoferum* condujeron a la reclasificación, originando el género *Azospirillum* (Domínguez, 2006).

Miembros del género *Azospirillum* han sido aislados de la rizósfera de gramíneas (Domínguez, 2011) e incluso nopal (Rangel *et al.*, 2011) de climas cálidos y tropicales (Domínguez, 2011). Cabe destacar que en esta asociación no se establecen estructuras especializadas, por lo que la bacteria se encuentra sobre la rizo-plana (Pérez y Casas, 2005).

Entre los beneficios reportados por *Azospirillum* se encuentra la fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas, incremento de la permeabilidad de la raíz, mayor captación de minerales y una mayor resistencia a estrés (Roshan y Bashan, 2005) e incluso aceleran la formación de racimos florales y frutos en plantas de jitomate (Domínguez, 2006).

Sin embargo, no siempre se asocian a plantas por lo que han desarrollado mecanismos para sobrevivir sin hospedero, entre estos mecanismos se encuentra la formación de cistes y flóculos como estructuras de protección (Pérez, 2011).

Las bacterias del género *Azospirillum* pertenecen a la clase alfa de las proteobacterias (Williams y Wilkins, 1990; Steenhoudt y Vanderleyder, 2000), puede consumir una gran diversidad de azúcares,

compuestos orgánicos y aminoácidos, tienen forma vibroide aunque presentan pleomorfismo, son Gram negativas a Gram variables, su tamaño es de 0.1 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y 2.1 a 3.8  $\mu\text{m}$  de longitud (Williams y Wilkins, 1984; Pérez y Casas, 2005; Domínguez, 2006), presentan gránulos refringentes de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) llegando a ser hasta 50% de peso seco celular, en medio líquido presentan un flagelo polar y en sólido numerosos laterales.

En medios de cultivo se caracterizan por presentar formación de una película blanca y densa a 2 mm debajo de la superficie del medio, donde se presentan condiciones micro-aerobias (Domínguez, 2006).

## 5 TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN MICROBIOLÓGICAS

Una de las tareas fundamentales del laboratorio de microbiología es la aplicación de una metodología precisa que permita la determinación de los microorganismos.

### 5.1. MÉTODOS FENOTÍPICOS

Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas. Permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación y el estudio de sensibilidad a distintos compuestos. Este método se basa fundamentalmente en la comparación de las características fenotípicas de bacterias desconocidas con aquellas de cultivos tipo (Fernández *et al.*, 2010).

- **Características microscópicas.** El estudio microscópico en fresco y tras tinción revela la forma, la manera de agruparse, la estructura de las células y su tamaño. Las tinciones son el primer paso, y ocasionalmente el único, para la determinación bacteriana. Las tinciones más utilizadas e imprescindibles son azul de metileno y Gram.
- **Características macroscópicas.** La morfología de las colonias es fundamental en la identificación preliminar y para la diferenciación de los microorganismos. Las colonias se describen por cinco características de tamaño, forma, consistencia, y a veces por su color.
- **Pruebas bioquímicas.** Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias. Estas pruebas evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas.

## HIPÓTESIS

Como en la mayoría de los sistemas edáficos, la presencia y mayor abundancia de bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* se encuentran correlacionadas de manera positiva con los contenidos de nitrógeno total, en los suelos ribereños adyacentes a un río de régimen permanente de montaña en la Reserva de la Biósfera los Volcanes se presenta el mismo patrón.

## OBJETIVOS

**Objetivo general:** Evaluar la presencia y abundancia de bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* y su relación con los contenidos de nitrógeno total en suelos ribereños de montaña en un gradiente altitudinal en sitios con diferentes usos de suelo dentro de la Reserva de la Biósfera Los Volcanes.

### Objetivos específicos:

- Caracterizar mediante pruebas físicas y químicas (materia orgánica, pH, nitrógeno total, conductividad eléctrica y textura) suelos ribereños a diferentes gradientes de altitud.
- Cuantificar la densidad poblacional de bacterias fijadoras de nitrógeno en medio selectivo Nfb, aislar y purificar las cepas presentes en las placas con medio Nfb.
- Caracterizar la morfología colonial y fenotípica de las bacterias crecientes en el medio selectivo Nfb, clasificarlas en morfoespecies y calcular el índice de diversidad de Margalef.
- Determinar mediante pruebas bioquímicas y caracteres morfológicos la inclusión de las cepas aisladas dentro de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum*.
- Realizar análisis de la varianza y correlación.
- Encontrar la correlación existente entre abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre con el contenido de nitrógeno total del suelo ribereño de los sitios de estudio.
- Comparar el efecto de la exposición solar sobre las UFC en los diferentes sitios de estudio.

## MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se realizó en cuatro sitios representativos de suelos ribereños en montaña alta y media a través de un gradiente altitudinal entre 2400 y 4000 m dentro de la Reserva de la Biósfera Los Volcanes. Cada sitio presenta condiciones ambientales y de uso de suelo distintas, donde en la zona de menor altitud se encuentra un asentamiento urbano y en el sitio de mayor altitud se encuentran un pastizal de alta montaña poco perturbado.

### DELIMITACIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO

Mediante la carta topográfica E14B42 se eligieron los sitios (figura 6) a estudiar, seleccionándolos por su distinto uso de suelo a lo largo de un sistema fluvial de régimen permanente, dentro de la micro-cuenca del río Apol perteneciente a la cuenca del río Balsas. En 2400 m porque es esta zona donde están los límites más marcados de cambio de uso de suelo, con suelos dedicados a la agricultura y destinados al asentamiento de zonas urbanas y en los 4000 m porque es el límite aproximado de la zona forestal y en la que dominan los zacatonales de alta montaña. Los cuatro sitios son adyacentes al arroyo y presentan distintos usos de suelo y tipo de vegetación (cuadro 2).

Cuadro 2. Posición geográfica y uso de suelo de los sitios de estudio.

Sitio	Altitud	Longitud	Latitud	Tipo de vegetación
	m			
Cascada Ranita	3900	537650	2115807	Zacatonal y <i>Pinus hartwegii</i> en umbría
Buena Vista	3300	542037	2111204	Bosque templado
Xalitzintla	2700	547792	2111726	Fragmentos de bosque <i>Pinus ayacahuite</i> , cultivos de <i>Zea maíz</i>
San Nicolás	2400	554726	2108585	Zona de cultivos y Zona Urbana

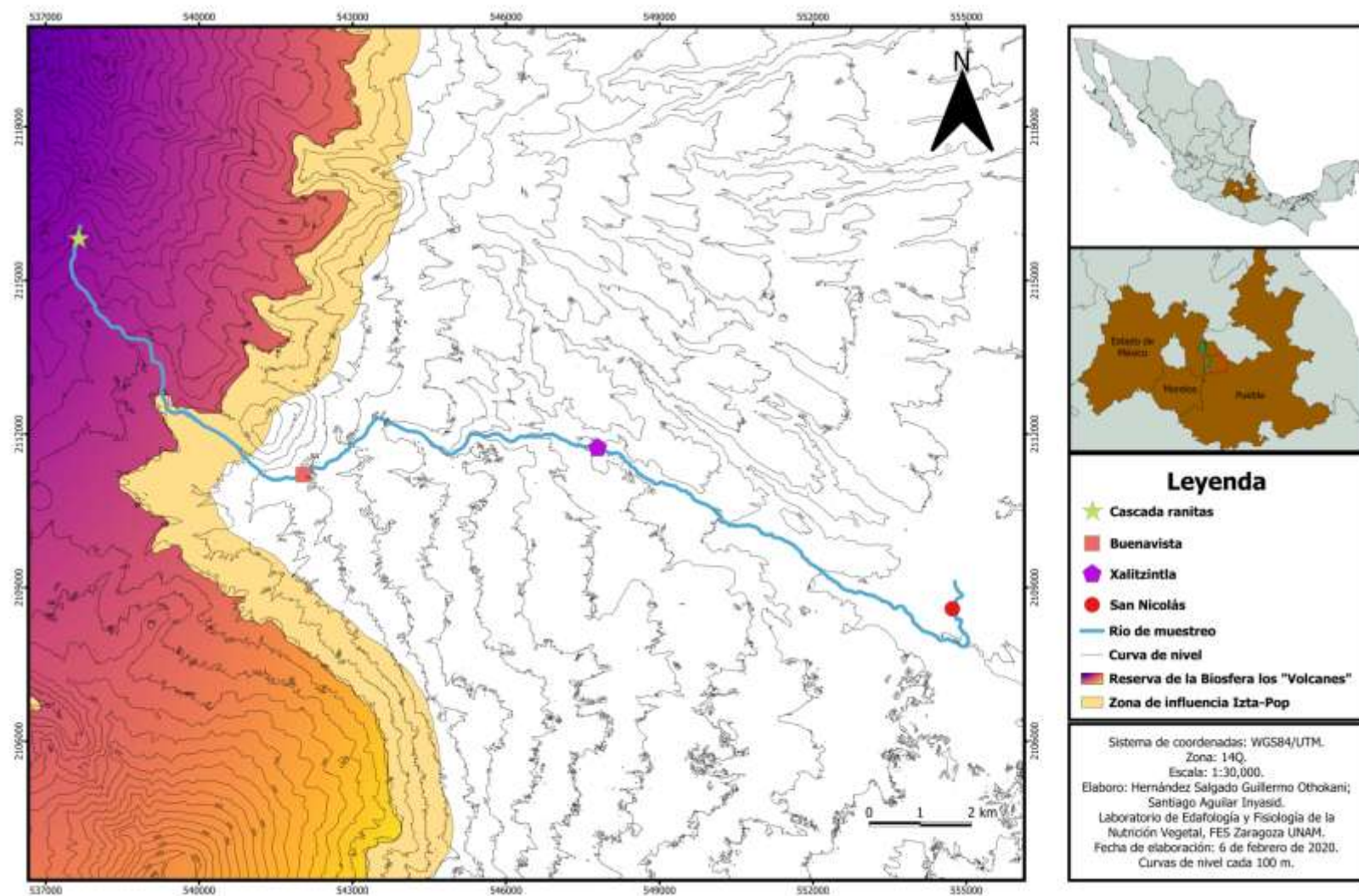


Figura 6. Distribución espacial de los sitios de muestreo.

Se registraron datos *in situ* de suelo y algunas características ambientales. En suelo se midió el pH, la temperatura con un termo-higrómetro (Modelo UNIT-T UT 332), y conductividad eléctrica con un potenciómetro portátil (Conductronic Modelo PC18). Los parámetros ambientales medidos fueron porcentaje de humedad relativa y pendiente.

## MUESTREO

Durante el muestreo de suelos, en cada uno de los sitios, en sus dos variantes de exposición solar se tomaron siete sub-muestras en cada uno de los lados del río, a lo largo de un transecto de 30 m segmentado cada cinco metros (Figura 7). Al inicio y final del transecto (metro cero y metro 30) se tomaron dos sub-muestras 15 cm distantes del cauce del río; a los cinco y 25 m del transecto, se tomaron 2 sub-muestras a 35 cm de distancia al arroyo; otras dos sub-muestras a 10 y 20 m sobre el transecto, a 70 cm de distancia al cauce; finalmente se tomó una sub-muestra a 100 cm de distancia al río a la mitad del transecto (15 m). Con todas estas sub-muestras se forman muestras compuestas que se trasladan a laboratorio en bolsa de plástico en una hielera.

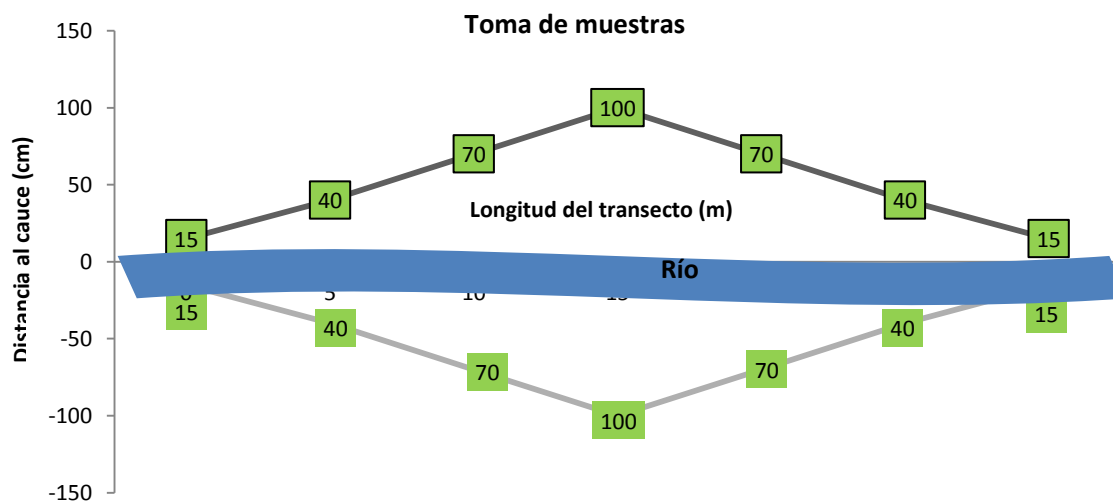


Figura 7. Representación de la toma de sub-muestras.

## ANÁLISIS QUÍMICO Y FÍSICO DEL SUELO

Los métodos utilizados en el presente trabajo se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Métodos empleados en las pruebas químicas y físicas de suelo.

	Parámetro	Método
Químicos	pH	Relación 1:2 Potenciómetro Conductronic Modelo PC18.
	Materia orgánica	Walkey y Black (Jackson, 1982 revisado en Guerra y Cruz, 2014)
	Nitrógeno total	Micro Kjeldhal (SEMARNAT, 2003; Guerra y Cruz, 2014).
	Conductividad eléctrica	Relación 1:5 Conductivímetro Conductronic Modelo PC18.
Físicos	Textura	Bouyoucos (SEMARNAT, 2003)
	Humedad del suelo	Por gravimetría.

## ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

### MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS

- Dadas las características de la zona de estudio y de acuerdo a los resultados obtenidos por Mantilla *et al.* (2009), quienes registraron un mejor desarrollo de comunidades bacterianas que se encuentran en una zona de inundación, se planteó emplear el medio Nfb como medio selectivo para el aislamiento de bacterias del género *Azospirillum*, además, Clavijo y colaboradores (2012) identificaron miembros de otros géneros entre los que se encuentra *Azotobacter* en el mismo medio.
- Medio Agar soya Trypticaseina (AST) Este medio es utilizado para la purificación de las cepas aisladas en medio Nfb, así como el mantenimiento viable de dichas cepas por su alto poder nutritivo (Gil, 2018).
-



## AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS

El aislamiento de las cepas se realizó mediante la técnica de diluciones múltiples y se inoculó en medio selectivo Nfb por el método de vaciado en placa (Anexo 2).

La purificación se realizó con la técnica de estriado empleando el medio Agar Soya tripticasa (AST) para facilitar el desarrollo de las colonias.

## PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN BACTERIANA DE LOS GÉNEROS *Azospirillum* y *Azotobacter*.

Las pruebas bioquímicas son técnicas que permiten determinar las características metabólicas de las bacterias a identificar. Algunas de estas pruebas evalúan la presencia de una enzima y su lectura varía entre unos segundos hasta 48 horas (Cercenado y Cantón, 2010). En el cuadro 4 se resumen las pruebas realizadas, denotando su principio.

Cuadro 4. Pruebas bioquímicas empleadas para determinar especies de los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter*.

Prueba bioquímica	Principio	Autores
Crecimiento en medio líquido rojo de fenol con distintas fuentes de carbono (Manitol, Rhamnosa, Glucosa) y su fermentación	Permite conocer si el microorganismo a estudiar puede emplear el azúcar del medio como fuente de carbono, y su capacidad de fermentar a partir de esta.	Williams y Wilkins, 1990
Crecimiento en medio agar rojo congó	Es una prueba selectiva, donde las bacterias pertenecientes al género <i>Azospirillum</i> presentan una coloración rojo escarlata.	Vital <i>et al.</i> , 2015.
Prueba de catalasa	La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.	Williams y Wilkins, 1990
Prueba de oxidasa	Determina la presencia del citocromo C. El citocromo C oxida al NNN'N', tetrametil, 1-4, fenilendiamina (solución acuosa al 1% p/v). La oxidación se detecta como color azul.	Williams y Wilkins, 1990
Medio MIO (movilidad, indol y ornitina)	Este medio nos permite conocer la movilidad de la bacteria, producción de indol y descarboxilación de ornitina.	VALTEK S.A, 2016
Medio SIM	Es utilizado para verificar la movilidad, producción de indol y sulfuro de hidrógeno.	Laboratorios Britania S.A

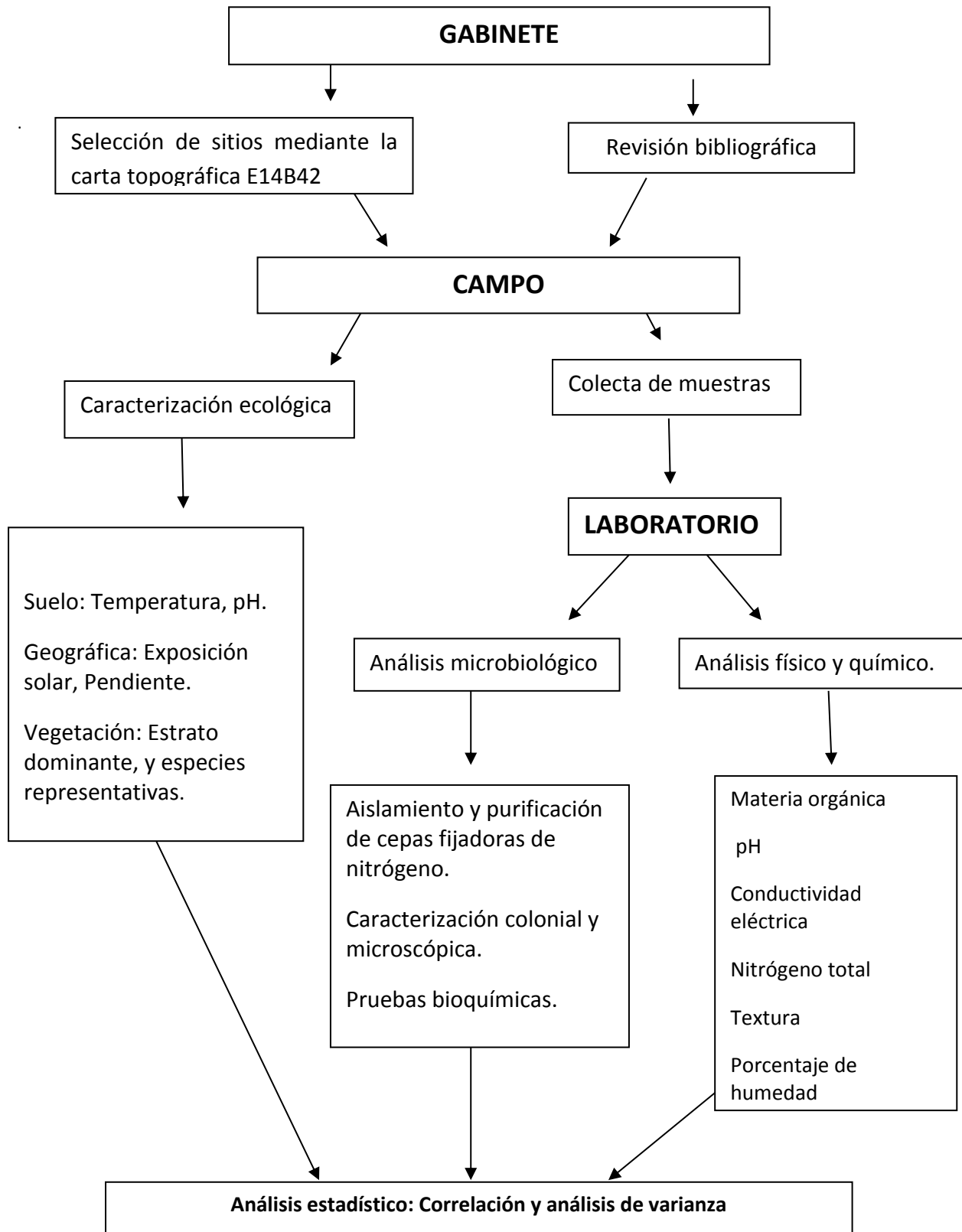


Figura 8. Diagrama de flujo de las actividades realizadas

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### DESCRIPCIÓN ECOLÓGICA DE LOS SITIOS DE ESTUDIO

#### Cascada Ranita

Este sitio presenta una altitud de 3950 m, está ubicado en las coordenadas 537650 m W y 2115807 m N. Se encuentra en un micro valle formado por una depresión intermontana, que le confiere características propias al sitio generando un humedal emergente de montaña (De la Lanza *et al.*, 1999). Adyacente al sitio se encuentra un arroyo permanente con un fondo rocoso y no consolidado. Presenta una pendiente de 2 a 5 %, con un clima Cc (w2) (w) iw'' (CONANP, 2013) con temperatura ambiental promedio de 8 °C y con humedad atmosférica de 37 a 51 % (Figura 9).

De acuerdo con Sandoval (2016), el suelo presente a un costado del arroyo y del humedal es Andosol vítrico úmbrico (dístrico, tixotrópico, endoarénico), presenta un pH moderadamente ácido (5.77) y porcentajes de materia orgánica de 1.6 para solana y 3.6 para umbría.

El suelo se encuentra cubierto por una densa capa vegetal, donde sobresalen gramíneas de los géneros *Muhlenbergia* y *Festuca* (CONANP, 2013). En colinas adyacentes en exposición de umbría, se observaron comunidades de *Pinus hartwegii* achaparrados y los más altos con altura no mayor a 20 m, mientras que en la exposición solana afloran sustratos rocosos en pendientes muy escarpadas.

Este sitio se encuentra en alto grado de conservación y su única perturbación aparente es un sendero cercano.



Figura 9. Cascada Ranita.

## Buenavista

Este sitio se ubica en la montaña, a una altitud de 3300 m, entre las coordenadas 542042 m W y 2111201 m N. Presenta relieve ondulado, con pendientes muy pronunciadas (8-20%). Presenta clima Cb (w) kig (CONANP, 2013), la temperatura ambiental registrada fue de 12 °C, con un porcentaje de humedad relativa entre 40 y 50 %. El río tiene un ancho promedio de 1.18 m y profundidad máxima de 0.5 m, presenta alteraciones mínimas, pero recientemente la colocación de mangueras con la finalidad de extraer agua (Figura 10).

De acuerdo con Sandoval (2016), el sitio presenta suelo de tipo Andosol vítrico úmbrico (dístico, epiarénico). Su pH es moderadamente ácido de 4.9 y su textura es areno francosa. Pese a la fuerte pendiente que existe en el sitio, el suelo se encuentra protegido por una gruesa capa de hojarasca proveniente de la alta abundancia de vegetación en la zona, donde sobresalen especies forestales (*Pinus hartwegii*, *Abies religiosa*), diversas herbáceas (gramíneas) y helechos.

En el sitio se realizan actividades ecoturísticas, principalmente renta de cabañas, el bosque se encuentra en buenas condiciones de conservación.



Figura 10. Buenavista.

## Xalitzintla

En la zona límite del bosque con zonas agrícolas y pecuarias se estudió un sitio ubicado a 2700 m en las coordenadas 547790 m W y 2111726 m N. Presentó un relieve convexo con una pendiente entre 4-7 %. El porcentaje de humedad relativa se registró entre 30 a 52%, el clima de la zona es Cb (w2) (w)' gw'' (CONANP, 2013), la temperatura media registrada fue de de 15 °C. El afluente tiene un ancho promedio de 1.5 m, sin embargo en temporada de estiaje el caudal decrece (Figura 11).

Sandoval (2016), clasificó el suelo del sitio como Fluvisol mólico (ántrico, húmico, endoéutrico, endoesqueletico). Estos suelos presentaron un pH ligeramente ácido (6.1), con textura arenosa y el porcentaje de materia orgánica más bajo del presente estudio (1.4).

La vegetación asociada al cauce está constituida principalmente por una pequeña franja de vegetación de 4 a 5 m donde se encuentran especies forestales como *Pinus teocote* y *Pinus ayacahuite*. Otras especies presentes pertenecen a los géneros *Salvia*, *Senecio*, *Salix*, *Geranium*, *Alchemilla*, algunos helechos pertenecientes a los géneros *Asplenium* y *Cheilanthe*, diversos musgos y hepáticas. En el borde de solana se encontraron áreas con monocultivos de maíz (*Zea maíz*) y en umbría un camino de terracería.

La principal actividad económica realizada en el sitio es la siembra de maíz de temporal, huertos frutales y aprovechamiento del bosque (extracción de madera y especies de interés).



Figura 11. Xalitzintla.

## San Nicolás de los Ranchos

Este sitio se ubica en la parte media de la cuenca a 2400 m, es el lugar de menor altitud en el estudio. Geográficamente se encuentra en 554725 m W y 2108583 m N. La temperatura ambiente promedio registrada fue de 21 °C, el clima presente en la zona es Cb (m) (w) ig (CONANP, 2013) con porcentaje de humedad del 43 a 51 %. Presenta una pendiente entre 2 y 5 % (Figura 12).

De acuerdo con Sandoval (2016), el suelo del sitio fue clasificado como Fluvisol háplico (ántrico, éutrico, tefrico, arénico). El pH del suelo es cercano a la neutralidad (6.7), con bajos niveles de MOS, la conductividad eléctrica fue superior al resto de los sitios, sin embargo, sigue considerándose con valores despreciables. La textura que presentó el sitio se clasifica como arenosa.

En cuanto a la vegetación, están presentes relictos de bosque de pino-encino, sin embargo, domina la vegetación secundaria. Se encuentran especies indicadoras de perturbación (*Alnus* y *Salix*) y especies frutales como durazno (*Prunus pérsica*), tejocote (*Crataegus mexicana*) y capulín (*Prunus salicifolia*). En ambos lados del arroyo se encuentran plantaciones de maíz (*Zea maíz*) y haba (*Vicia faba*).

El uso de suelo se enfoca en la agricultura, sin embargo, en el afluente se vierten desechos sólidos y aguas residuales provenientes del poblado ubicado a un costado del sitio de muestreo.



Figura 12. San Nicolás de los Ranchos, (fotografía, Sandoval, 2016).

Durante la caracterización de los cuatro sitios de estudio, se realizaron distintas mediciones que contribuyeron a describir cada sitio estudiado. El cuadro 5 muestra el resumen de las características climáticas y edáficas principales de los sitios de estudio. Estos resultados demuestran una disminución considerable del porcentaje de humedad relativa con respecto al decremento altitudinal. Caso contrario a la temperatura, que tiende a aumentar a altitudes menores. El pH del agua presenta incremento en zonas más bajas, estos cambios nos indican la delimitación de los diferentes biotopos de la zona. En Cascada Ranita se encuentran pastizales montanos, Buena Vista, presenta un bosque templado; en Xalitzintla, se encuentran fragmentos de bosque junto a sembradíos de temporal y en el caso de San Nicolás prácticamente son zonas de cultivo junto a construcciones urbanas.

Los cuatro sitios de estudio que representan biotopos característicos presentan diferencias considerables respecto al tipo de vegetación dominante, y muestran un deterioro ambiental y un fuerte cambio de uso de suelo en San Nicolás. De acuerdo con los datos obtenidos por Mena (2018) mediante el índice QBR, el grado de perturbación de la vegetación riparia en Cascada Ranita es nula, mientras que en San Nicolás de los Ranchos la perturbación llega a ser del 85 %, lo que muestra un panorama claro de la transformación de los ecosistemas ribereños afectados por el cambio de uso de suelo. Esta perturbación genera la pérdida de biodiversidad en estas zonas de amortiguamiento, y con ello la disminución en calidad y cantidad de los servicios ecosistémicos, como la captura de carbono y filtración de agua (Agurto *et al.*, 2002; FAO, 2012). De acuerdo con Granados *et al.* (2006) una zona riparia de 16 m de ancho puede retener el 50% de N y 95% de P, impidiendo su llegada al agua por lo cual, la disminución de estos elementos desacelera el proceso de eutrofización de aguas superficiales.

Cuadro 5. Características geográficas, climáticas y tipos de vegetación de los sitios de estudio

Sitio/ Altitud	Temperatura				Pendiente		Humedad Relativa		pH		
	agua	ambiental		suelo		ambiental		agua	suelo		
		Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima	Mínima	Máxima		
m	°C				%						
Cascada Ranita/ 3896	5.7	8	17	5	8	2	5	53	59.7	5.4	5.7
Buena Vista/ 3300	9.8	11	20.5	7	14	8	12	38	57	5.2	4.9
Xalitzintla/ 2678	11.2	16	26.5	11	21	13	15	19	56	5.4	6.0
San Nicolás/ 2414	13.6	20	26.5	11	21	13	19	13	56.5	6.0	6.1

No obstante de la fuerte pérdida de cubierta vegetal en la región aún existen especies originarias, como es el caso de *Pinus hartwegii*, que se presenta ampliamente distribuido en las zonas cumbres del parque, por lo que es considerado como especie arbórea representativa de la zona alta (CONANP, 2013) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Especies arbóreas reportadas en cada sitio (Santiago, 2018).

Sitio	Tipo de Vegetación	Especies arbóreas ribereñas
Cascada Ranita	Bosque de <i>Pinus hartwegii</i> y Zacatonal	<i>Pinus hartwegii</i>
Buenvista	Bosque templado	<i>Pinus hartwegii</i> <i>Salix bonplandiana</i> <i>Abies religiosa</i>
Xalitzintla	Fragmentos de bosque <i>Pinus-ayacahuite</i> , cultivos de maíz	<i>Buddleja cordata</i> <i>Pinus ayacahuite</i> <i>Salix bonplandiana</i>
San Nicolás de los Ranchos	Zona de cultivos y Zona Urbana	<i>Alnus acuminata</i> <i>Crataegus mexicana</i> <i>Prunus pérsica</i> <i>Prunus salicifolia</i> <i>Sambucus nigra</i>

## ANÁLISIS QUÍMICO Y FÍSICO DEL SUELO

Las principales propiedades consideradas dentro del análisis de suelos en el presente trabajo fueron el porcentaje de materia orgánica, el pH, la textura y el contenido de nitrógeno total debido a que son ideales para interpretar algunas condiciones del suelo como medio químico donde se desarrollan un conjunto de procesos físicos y químicos (Valenzuela y Visconti, 2018). Los valores obtenidos en laboratorio referentes a la caracterización química y física de los suelos se muestran en el cuadro 7.



Cuadro 7. Porcentaje de las fracciones minerales del suelo en los sitios de estudio.

Sitio	Exposición solar	Altitud m	%			Clase textural
			Arena	Limo	Arcilla	
Cascada Ranita	Umbría	3896	86.7	8.3	5.0	Arenosa
	Solana	3896	85.2	10.8	4.0	Arenosa
Buenavista	Umbría	3300	83.8	11.3	4.9	Arenosa francosa
	Solana	3300	83.3	8.6	8.1	Areno francosa
Xalitzintla	Umbría	2678	87.1	7.8	5.1	Arenosa
	Solana	2678	84.2	10.2	5.6	Arenosa
San Nicolás de los Ranchos	Umbría	2414	86.9	8.5	4.6	Arenosa
	Solana	2414	84.8	10.7	4.5	Arenosa

La distribución del porcentaje de las partículas minerales del suelo no es muy distinto entre sitios, presentan poco contenido de arcillas (4.0 - 8.1%) y limo (7.0 - 11.3%), por lo que texturalmente se les denomina arenosa y areno-francosa (cuadro 7) (SEMARNAT, 2003).

Cuadro 8. Propiedades físicas y químicas de los suelos estudiados.

Sitio/ Altitud	Humedad del suelo	pH	CE	MOS	COS	Nitrógeno total	Relación C/N
m	%		dS m <sup>-1</sup>	%			
Cascada Ranita Umbría 3896	33.6	5.73	0.0027	3.214	1.864	0.261	8.820
Cascada Ranita Solana 3896	43.7	5.8	0.0035	1.403	0.814	0.168	4.843
Buenavista Umbría 3300	36	4.8	0.0035	6.459	4.077	0.224	19.672
Buenavista Solana 3300	27.2	5.1	0.0033	3.263	1.893	0.298	8.651
Xalitzintla Umbría 2678	21.3	6.0	0.0028	1.4186	0.823	0.448	2.109
Xalitzintla Solana 2678	23.1	6.0	0.0048	1.520	0.881	0.336	2.623
San Nicolás Umbría 2414	18.7	6.1	0.0051	2.044	1.186	0.504	4.223
San Nicolás Solana 2414	23.7	6.02	0.0037	2.163	1.255	0.392	3.306

CE = Conductividad eléctrica; MOS = materia orgánica del suelo; COS = Carbono orgánico del suelo

El pH del suelo en los cuatro sitios de estudio muestra valores similares entre sí (cuadro 8), los cuales se clasifican en general como suelos ligeramente ácidos (pH 5-6) (SEMARNAT, 2003). Buenavista es el único sitio cuyo suelo presenta un pH fuertemente ácido (NOM-021-SEMARNAT-

2000), además cuenta con la mayor cantidad de materia orgánica del suelo (MOS) y la vegetación más abundante. En la Figura 13, se muestra una relación negativa entre el pH y la MOS ( $r = -0.66$ ;  $\alpha = 0.0001$ ). Se acepta que, al ser mineralizada la MOS por acción de los microorganismos en sus procesos metabólicos, se producen sustancias que bajan los valores de pH del suelo, y se comprueba lo que afirman algunos autores como Navarro (2013), de que el pH y la materia orgánica se encuentran correlacionados de manera negativa entre sí (Figura 13).

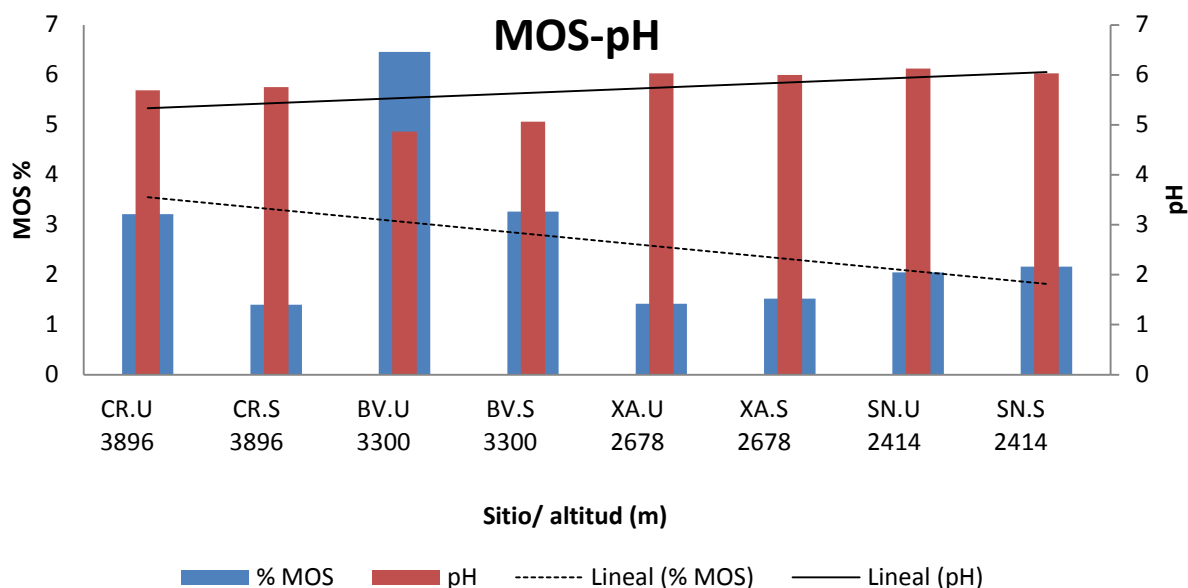


Figura 13. Relación pH v.s. Materia orgánica del suelo. CR.U = Cascada Ranita umbría; CR.S= Cascada Ranita solana; BV.U= Buenavista umbría; BV.S = Buenavista solana; XA.U= Xalitzintla umbría; XA.S = Xalitzintla solana; SN.U = San Nicolás de los Ranchos umbría; SN.S = San Nicolás de los Ranchos solana.

La materia orgánica es uno de los componentes químicos más importante del suelo (Alcantar y Trejo, 2009; Trinidad y Velasco, 2016; Santiago, 2018). La incorporación continua de residuos orgánicos al suelo mantiene una alta biodiversidad de microorganismos, los cuales aceleran el reciclamiento de los distintos bioelementos, de esta manera se proporcionan las condiciones favorables para la auto recuperación del suelo (Trinidad y Velasco, 2016), y mejora así la estructura del suelo y la calidad de sus servicios ecosistémicos, como la purificación de agua. De acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000, los suelos de estudio por derivar de materiales volcánicos presentan porcentajes de materia orgánica muy bajos (Sandoval, 2016), con excepción del suelo de Buena Vista, que presentó valores medios en umbría.

La figura 13, muestra los porcentajes de MOS, en ella se observa que el valor más alto (6.45 %) se encontró en Buenavista y los más bajos en Xalitzintla (1.4%). El ANOVA mostró diferencias

significativas ( $\alpha \leq 0.05$ ) en los contenidos de MOS respecto a la altitud. La prueba de Tukey generó tres grupos estadísticos, donde los suelos de Buena Vista alcanzaron mayores contenidos de MOS y los suelos de San Nicolás y Xalitzintla tuvieron los contenidos más bajos (Figura 14). Estos dos últimos sitios presentaron la menor cantidad de MOS debido a que sufren el mayor impacto por cambio de uso de suelo, dado que al perder la cubierta vegetal nativa y ser sustituida por monocultivos o plantas de huertos frutales estos suelos llegan a perder hasta 50% de la MOS (Zavala *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2013).

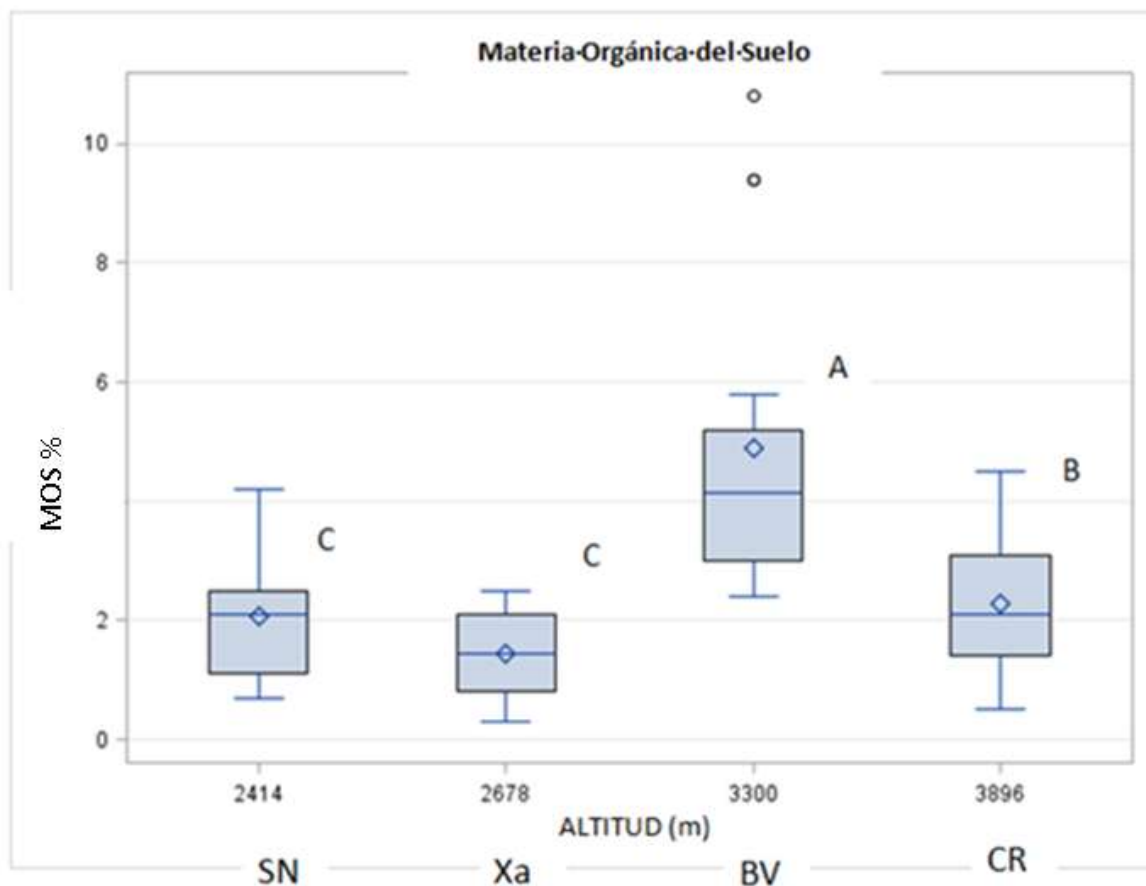


Figura 14. Contenido de la materia orgánica del suelo en los distintos sitios. Letras distintas representas diferencias significativas entre sitios ( $\alpha = 0.05$ ). SN= San Nicolás de los Ranchos; Xa= Xalitzintla; BV= Buena Vista; CR= Cascada Ranita.

Respecto a la conductividad eléctrica, la figura 15 muestra su comportamiento y los porcentajes de humedad del suelo, así como la relación entre ambas variables. Se aprecia una correlación negativa ( $\alpha \leq 0.05$ ) entre ambas variables. En los cuatro sitios de estudio la humedad de los suelos

disminuye significativamente con la altitud de 43.7% a 18.7%. Del ANOVA realizado se observaron diferencias significativas ( $\alpha \leq 0.05$ ) formando cuatro grupos de acuerdo a la prueba de Tukey (figura 16). Se encontraron los valores de humedad del suelo más alto en Cascada Ranita, así como una marcada disminución con respecto a la altitud. En el caso de la conductividad eléctrica, en los sitios estudiados, los valores no presentan diferencias significativas ( $\alpha \leq 0.05$ ), y de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 la conductividad eléctrica (CE) de los suelos en la zona de estudio no es significativa, por una baja cantidad de sales solubles. Sin embargo, se presentan diferencias mínimas en cada sitio, donde se nota una tendencia a incrementar la CE ante una disminución altitudinal (Figura 16). Esta disminución de CE se atribuye a la alta precipitación en los sitios y la dinámica hídrica de las zonas ribereñas que generan un arrastre de las bases (Na, K, Ca y Mg) a zonas bajas (Lozada *et al.*, 2014).

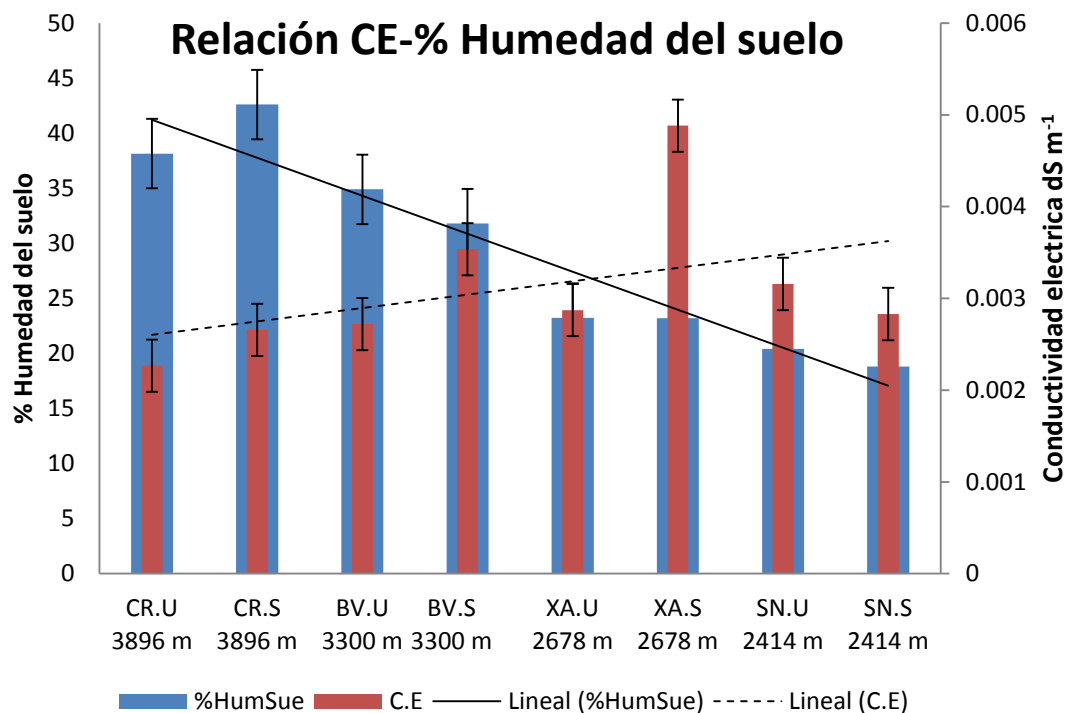


Figura 15. Relación entre conductividad eléctrica del suelo y porcentaje de humedad del suelo. CR.U = Cascada Ranita umbría; CR.S= Cascada Ranita solana; BV.U= Buenavista umbría; BV.S= Buenavista solana; XA.U= Xalitzintla umbría; XA.S= Xalitzintla solana; SN.U = San Nicolás de los Ranchos umbría; SN.S=San Nicolás de los Ranchos solana.

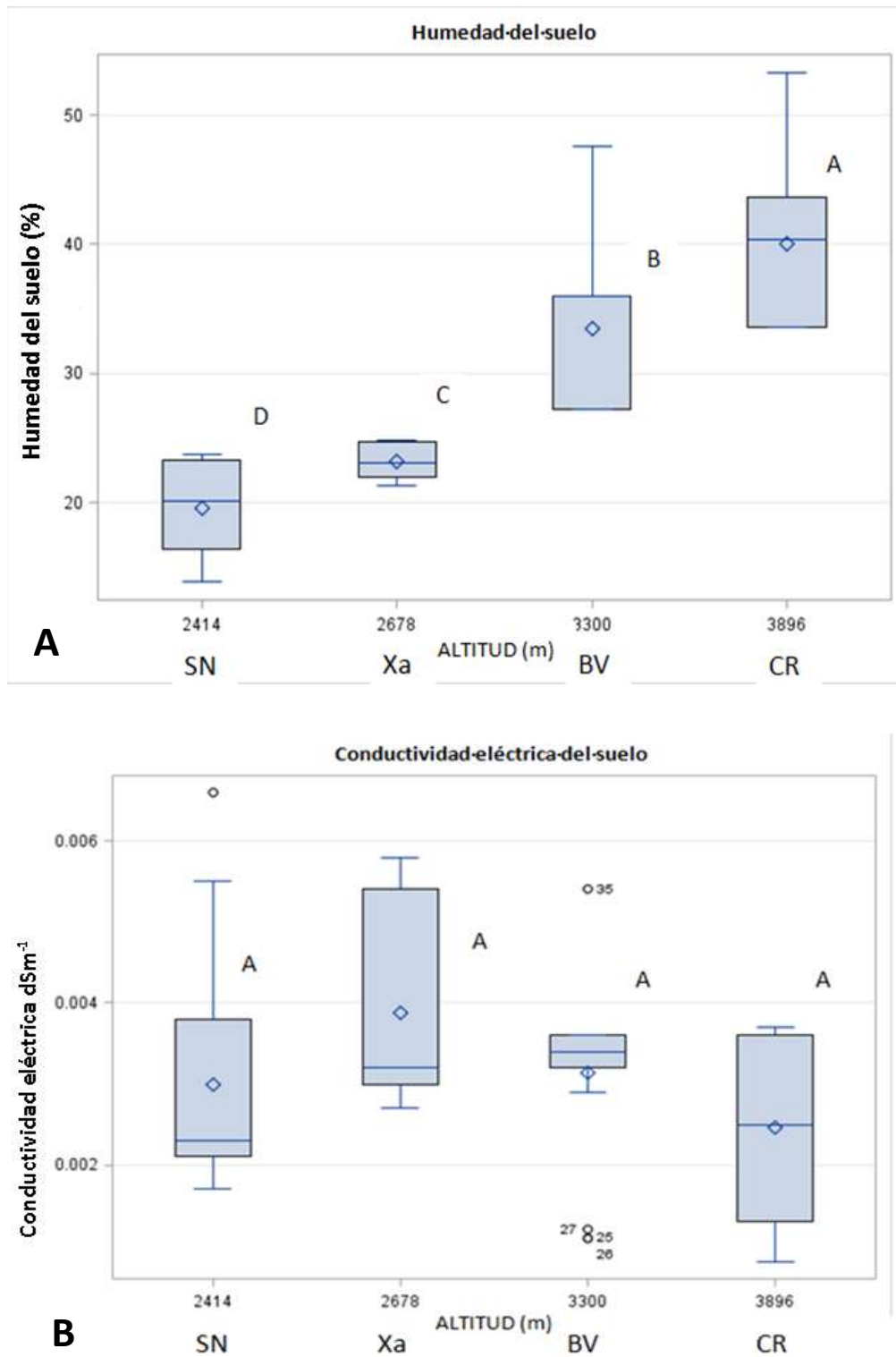


Figura 16 A: Porcentaje de humedad del suelo (A) y Conductividad eléctrica suelo respecto a la altitud (B). Letras distintas representan diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ).

En la figura 17 se presenta la relación entre los porcentajes de nitrógeno y la materia orgánica, ésta mostró una correlación negativa ( $r = -0.1819$ ;  $\alpha \leq 0.05$ ). Se observó que los contenidos de nitrógeno total presentes en el suelo tienden a incrementarse con la disminución de altitud. Se encontraron valores más altos de porcentaje de nitrógeno en los suelos del sitio San Nicolás, y los valores más bajos, en Cascada Ranita.

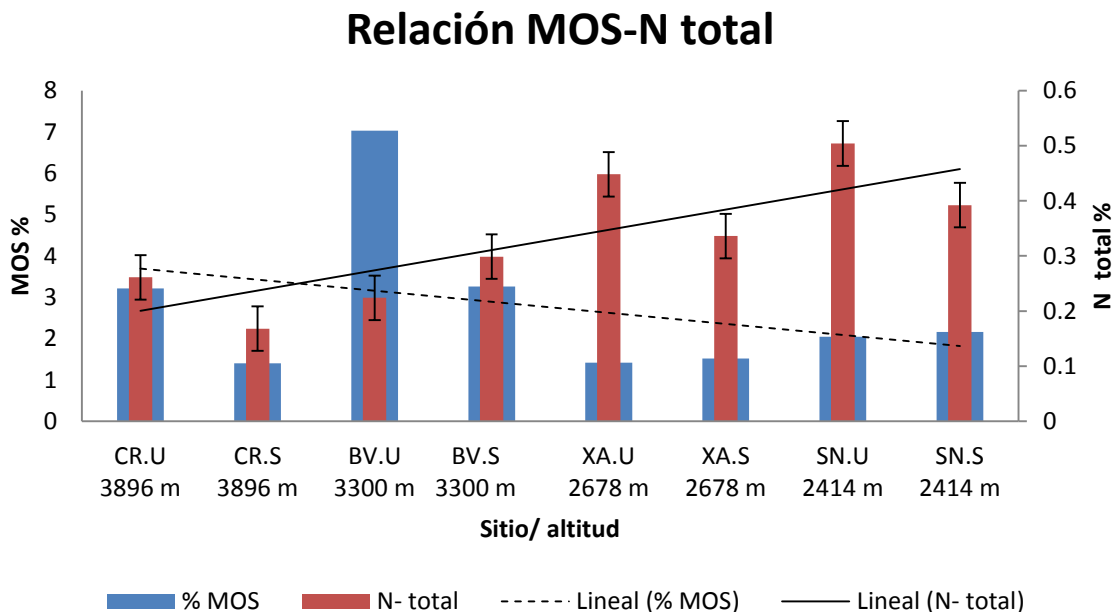


Figura 17. Relación materia orgánica-N total. %MOS= %Materia orgánica del suelo; N total= Nitrógeno total. CR.U = Cascada Ranita umbría; CR.S = Cascada Ranita solana; BV.U = Buenavista umbría; BV.S = Buenavista solana; XA.U= Xalitzintla umbría; XA.S = Xalitzintla solana; SN.U = San Nicolás de los Ranchos umbría; SN.S = San Nicolás de los Ranchos solana.

## ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL SUELO

Junto a la caracterización física y química de los suelos descritos previamente, se realizó el aislamiento de bacterias de vida libre capaces de fijar nitrógeno molecular. En esta búsqueda se priorizo el hecho de encontrar especies pertenecientes a los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum*. Durante los aislamientos, se observó y registró el número de colonias provenientes de los suelos ribereños de los cuatro sitios de estudio.

Durante el mes de octubre de 2016, cuando fue la primera cuantificación, se obtuvo el crecimiento de 53 colonias; para marzo de 2017, durante el segundo periodo de colecta se aislaron 44 colonias y durante el muestreo de agosto de 2018, se observaron 72 colonias. Con estos datos se realizaron los cálculos de las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo.

La figura 18, muestra los valores de las unidades formadoras de colonias encontradas por sitio de estudio en ambas exposiciones y tres momentos diferentes. Se observa una disminución de UFC  $g^{-1}$  suelo, al aumentar la altitud, cuando disminuyen las temperaturas medias del ambiente y del suelo. El sitio donde se encontraron más bacterias por gramo de suelo fue San Nicolás de los Ranchos, el cual posee la temperatura media más alta de la zona de estudio.

Otro efecto para considerar es la exposición solar, esta afecta directamente a las características edáficas de cada sitio y con ello al desarrollo bacteriano. Se encontraron más UFC  $g^{-1}$  suelo en umbría.

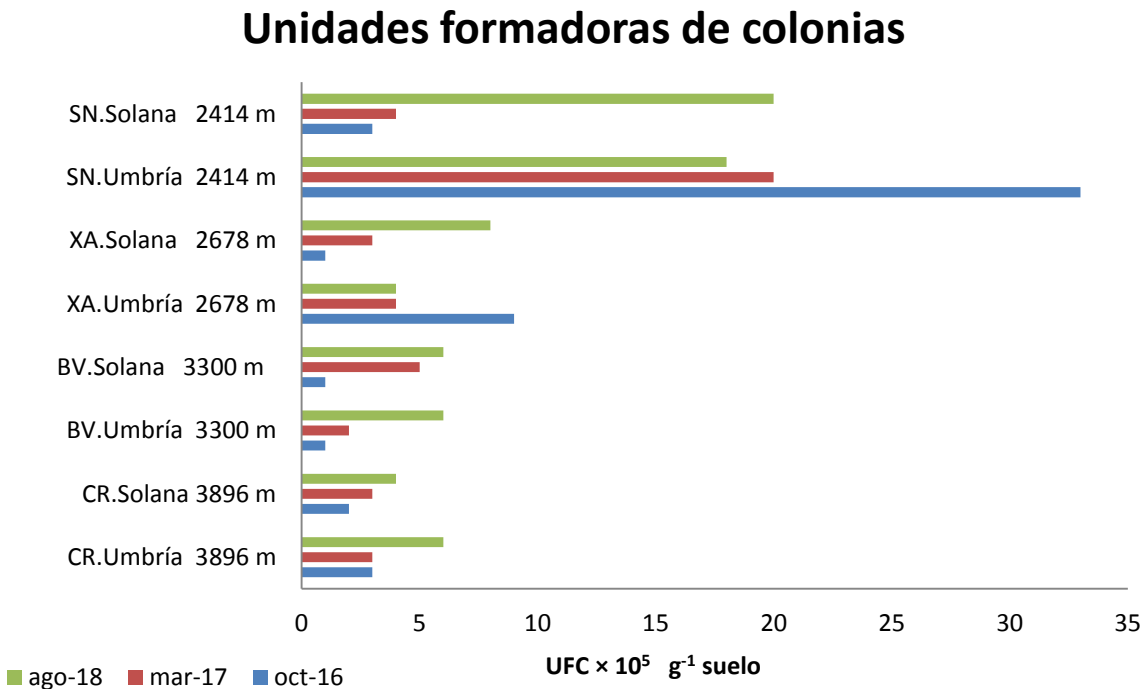


Figura 18. Unidades formadoras de colonias por sitio y muestreo en medio Nfb. CR.U = Cascada Ranita umbría; CR.S = Cascada Ranita solana; BV.U = Buenavista umbría; BV.S = Buenavista solana; XA.U = Xalitzintla umbría; XA.S = Xalitzintla solana; SN.U = San Nicolás de los Ranchos umbría; SN.S = San Nicolás de los Ranchos solana.

El suelo de San Nicolás como zona mas baja y con recepción de residuos municipales presentó el mayor contenido de UFC (  $33 \times 10^5 g^{-1}$  suelo) mostrando una gran diferencia con Xalitzintla que presenta  $1 \times 10^5 UFC g^{-1}$  suelo, este resultado se relaciona con las necesidades nutricionales de los microorganismo, Xalitzintla presenta los valores de MOS bajos, lo que podria derivar en la falta de nutrientes esenciales para el desarrollo bacteriano.

En la figura 19 se presenta las relaciones entre UFC y contenidos de nitrógeno en el suelo. Se observó que las UFC tienen una marcada tendencia a incrementar su número al disminuir la altitud. De acuerdo con el análisis de correlación, la altitud y las UFC tienen una correlación negativa significativa ( $r = -0.4316$ ;  $\alpha = 0.0002$ ). En el caso del nitrógeno, la relación existente con la altitud es negativa ( $r = -0.48741$ ;  $\alpha \leq 0.0001$ ), ya que al disminuir la altitud el contenido de nitrógeno incrementa, esto confirma datos obtenidos por Palma (2010), la caída de nitrógeno en altitudes superiores a los 4000 m, se podría relacionar con la disminución de organismo fijadores. La relación existente entre el nitrógeno y las UFC presenta correlación positiva significativa ( $r = 0.5058$ ;  $\alpha \leq 0.0001$ ), el contenido de nitrógeno en el suelo aumenta cuando las UFC son más abundantes (Domínguez, 2006; Martín *et al.*, 2007)

Los organismos capaces de fijar nitrógeno han sido ampliamente utilizados en el mejoramiento de la fertilidad de suelos principalmente en cultivos de interés agrícola (Baca *et al.*, 2000; Hurzúa, 2005; Martín *et al.*, 2007; Armenta *et al.*, 2010). Estos autores señalan que hay incremento en la disponibilidad de nitrógeno a partir del aumento de las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno. Los resultados de ésta investigación mostraron tendencias similares, donde a mayor abundancia de estos microorganismos se encontraron mayores contenidos de este elemento.

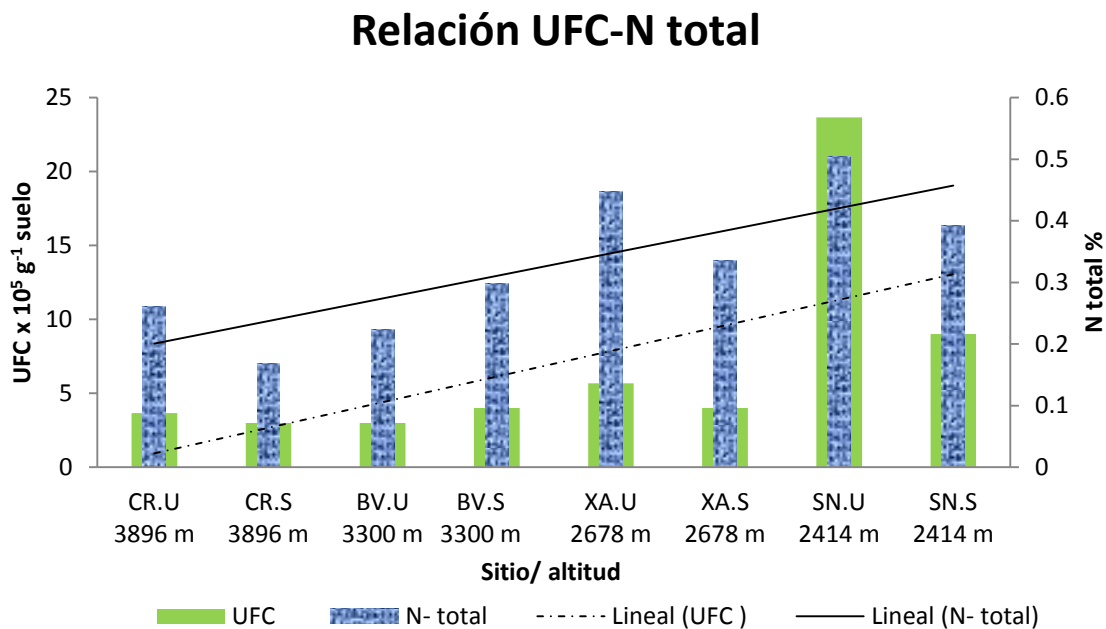


Figura 19. Relación entre el nitrógeno total y las unidades formadoras de colonias por g suelo en medio Nfb. CR.U = Cascada las Ranitas umbría; CR.S = Cascada las Ranitas solana; BV.U = Buenavista umbría; BV.S = Buenavista solana; XA.U = Xalitzintla umbría; XA.S = Xalitzintla solana; SN.U = San Nicolás de los Ranchos umbría; SN.S = San Nicolás de los Ranchos solana.



Posteriormente al aislamiento de cepas bacterianas, en medio selectivo Nfb, se realizó una caracterización morfológica de las colonias de acuerdo al manual escrito por Morales *et al.* (2012) donde se tomó en cuenta el color, tamaño, forma, elevación, borde, aspecto y consistencia (Anexo 2).

En los cuadros 9, 10 y 11 se presentan las características de las colonias aisladas en medio Nfb. La menor cantidad de morfoespecies (especies basadas en características morfológicas, sin considerar ningún otro factor biológico (Sarmiento, 2000) encontradas fue en el periodo de octubre de 2016, donde solo se obtuvieron 18 morfoespecies. El periodo durante el cual se obtuvo la mayor cantidad de morfoespecies fue el correspondiente a agosto de 2018, con un total de 52.

Las cepas aisladas en esta investigación, fueron denominadas de la siguiente manera: con el término cepa y tres numerales que identifican; el periodo de muestreo, el sitio de colecta y el número asignado a la colonia. Ejemplo: En la cepa 2-3-4 el 2 hace referencia al segundo muestreo, el número 3, indica el sitio de colecta, en este caso es Xalitzintla y finalmente el último dígito es el número con el que se diferenció a la cepa. El periodo 1 de muestreo corresponde a octubre de 2016; el número 2 a marzo de 2017 y agosto de 2018 con el 3.

Cuadro 9. Morfología colonial de las cepas aisladas en medio Nfb del muestreo de octubre 2016.

Sitio	Cepa	Color	Textura	Margen	Elevación	Forma	Aspecto
CR.U	1-1-1	Blanca	Suave	Lacerado	Plana	Irregular	Seco
CR.U	1-1-2	Blanca	Dura	Ondulada	Umbeliforme	Circular	Seco
CR.U	1-1-3	Blanca	Dura	Ondulada	Umbeliforme	Circular	Seco
CR.S	1-1-4	Blanca	Dura	Entero	Convexa	Circular	Húmedo
CR.S	1-1-5	Blanca	Suave	Entera	Elevada	Puntiforme	Húmedo
BV.U	1-2-1	Transparente	Dura	ND	ND	Circular	Seco
BV.S	1-2-2	Blanca	Suave	Ondulada	Umbeliforme	Irregular	Seco
Xa.U	1-3-1	Transparente	ND	Ondulada	Umbeliforme	Irregular	Seco
Xa.U	1-3-2	Rosa	Dura	Entero	Monticular	Circular	ND
Xa.S	1-3-4	Blanca/ negro al centro	ND	Ondulada	Umbeliforme	Irregular	ND
SN.U	1-4-1	Rosa	Dura	Entero	Convexa	Circular	Húmedo
SN.U	1-4-2	Amarillo	Suave	Entero	Elevada	Circular	Húmedo
SN.U	1-4-3	Blanca/ negro al centro	Dura	Ondulada	Umbeliforme	Circular	Seco
SN.U	1-4-4	Blanca/oscura a las orillas	Viscosa	Lobulada	Elevada	Irregular	Seco
SN.U	1-4-5	Blanca	Dura	Ondulada	Plana	Circular	ND
SN.S	1-4-6	Blanca	ND	Entero	Elevada	Circular	Seco
SN.S	1-4-7	Blanca	ND	Ondulada	Umbeliforme	Irregular	Seco
SN.S	1-4-8	Blanca	ND	Entero	Elevada	Circular	Húmedo

CR.U = Cascada Ranita umbría; CR.S = Cascada Ranita solana; BV.U = Buena Vista umbría; BV.S = Buena Vista solana; XA.U = Xalitzintla umbría; XA.S = Xalitzintla solana; SN.U = San Nicolás de los Ranchos umbría; SN.S = San Nicolás de los Ranchos solana.

Cuadro 10. Morfología colonial de las cepas aisladas en medio Nfb del muestreo de marzo 2017.

Sitio	Cepa	Color	Textura	Margen	Elevación	Forma	Aspecto
CR.U	2-1-1	Café/rosa	Suave	Entero	Convexa	Circular	Seco
CR.U	2-1-2	Salmón	ND	Entero	Convexa	Circular	ND
CR.S	2-1-3	Blanca	Suave	Entero	Umbilicada	Puntiforme	Húmedo
CR.S	2-1-4	Salmón	Suave	ND	ND	ND	Húmedo
CR.S	2-1-5	Blanca	Suave	Entero	Umbeliforme	Circular	Seco
BV.U	2-2-1	Amarilla	Viscosa	Entero	Elevada	Circular	Húmedo
BV.U	2-2-2	Blanca	Suave	Ondulado	Umbeliforme	Irregular	Seco
BV.S	2-2-3	Blanca/ marrón	Suave	Ondulado	Elevada	Circular	Seco
BV.S	2-2-4	Rosa	ND	Entero	Monticular	Puntiforme	Seco
BV.S	2-2-5	Amarilla	Suave	Ondulado	Umbeliforme	Circular	Seco
BV.S	2-2-6	Transparente	Suave	Entero	Plana	Circular	ND
BV.S	2-2-7	Transparente	Pastosa	Entero	Monticular	Circular	ND
Xa.U	2-3-1	Marrón	ND	Entero	ND	Circular	Húmedo
Xa.U	2-3-2	Blanca	Dura	ND	ND	Irregular	ND
Xa.S	2-3-3	Blanca	Suave	Ondulado	Monticular	Irregular	Seco
Xa.S	2-3-4	Transparente	Pastosa	Ondulado	Umbilicada	Irregular	ND
Xa.S	2-3-5	Blanca	Suave	Entero	Elevada	Circular	Húmedo
Xa.S	2-3-6	Café	ND	Entero	ND	Circular	Húmedo
SN.U	2-4-1	Rosa	ND	Entero	ND	Circular	Húmedo
SN.U	2-4-2	Blanca	Suave	Ondulado	Umbeliforme	Irregular	Seco
SN.U	2-4-3	Café	Suave	Entero	Umbeliforme	Circular	Húmedo
SN.U	2-4-4	Blanca	Suave	Entero	Convexa	Circular	Húmedo
SN.U	2-4-5	Transparente	Suave	Entero	Umbilicada	Circular	Seco
SN.U	2-4-6	Café	Pastosa	Entero	Elevada	Circular	Seco
SN.U	2-4-7	Transparente, punto al centro	Suave	Entero	Elevada	Circular	Seco
SN.U	2-4-8	Rosa pálido	Suave a	Entero	Elevada	Circular	Seco
SN.U	2-4-9	Amarilla	Pastosa	Entero	Elevada	Circular	Húmedo
SN.U	2-4-10	Amarilla	Pastosa	Entero	Elevada	Circular	Húmedo
SN.U	2-4-11	Amarilla	Suave	Entero	Elevada	Circular	Húmedo
SN.U	2-4-12	Amarilla	ND	Ondulado	Umbeliforme	Circular	Seco
SN.U	2-4-13	Amarilla	Suave	Ondulado	ND	Circular	Seco
SN.S	2-4-14	Blanca	Suave	Ondulado	Elevada	Irregular	Seco
SN.S	2-4-15	Amarilla	Suave	ND	ND	Circular	Seco
SN.S	2-4-16	Rosa	ND	ND	ND	Irregular	ND
SN.S	2-4-17	Blanca	Suave	Entero	Monticular	Circular	Seco

CR.U = Cascada Ranita umbría; CR.S = Cascada Ranita solana; BV.U = Buena Vista umbría; BV.S = Buena Vista solana; XA.U = Xalitzintla umbría; XA.S = Xalitzintla solana; SN.U = San Nicolás de los Ranchos umbría; SN.S = San Nicolás de los Ranchos solana.

Cuadro 11. Morfología colonial de las cepas aisladas en medio Nfb del muestreo de Agosto 2018

Sitio	Cepa	Color	Textura	Margen	Elevación	Forma	Aspecto
CR.U	3-1-1	Blanca	Suave	Entero	Monticular	Puntiforme	Seco
CR.U	3-1-2	Beige con centro marrón	Suave	Entero	Umbilicada	Circular	Húmedo
CR.U	3-1-3	Blanca	Suave	Ondulado	Monticular	Circular	Húmedo
CR.U	3-1-4	Gris oscuro	ND	Entero	Monticular	Puntiforme	Seco
CR.U	3-1-5	Beige	Suave	Entero	Monticular	Circular	Húmedo
CR.S	3-1-6	Beige	Suave	Ondulado	Umbilicada	Circular	Húmedo
CR.S	3-1-7	Rojo	ND	Entero	Monticular	Puntiforme	Húmedo
CR.S	3-1-8	Beige con centro marrón	Suave	Entero	Umbilicada	Circular	ND
BV.U	3-2-1	Blanca	ND	Entero	Monticular	Circular	Húmedo
BV.U	3-2-2	Beige	ND	Entero	Convexa	Circular	Húmedo
BV.U	3-2-3	Blanca	ND	Entero	Monticular	Circular	Seco
BV.U	3-2-4	Beige	Suave	Entero	Umbilicada	Circular	Húmedo
BV.S	3-2-5	Beige	ND	Ondulado	Umbilicada	Irregular	ND
BV.S	3-2-6	Marrón	Suave	Entero	Monticular	Irregular	Húmedo
BV.S	3-2-7	Beige con centro marrón	Dura	Entero	Umbeliforme	Circular	Seco
BV.S	3-2-8	Blanca	Suave	Entero	Umbilicada	Circular	Húmedo
Xa.U	3-3-1	Marrón	Suave	Entero	Monticular	Puntiforme	Seco
Xa.U	3-3-2	Beige con centro marrón	Dura	Ondulado	Umbeliforme	Circular	Seco
Xa.U	3-3-3	Beige	Suave	Entero	Umbilicada	Circular	Húmedo
Xa.S	3-3-4	Marrón	Suave	Entero	Monticular	Circular	Seco
Xa.S	3-3-5	Beige	Suave	Ondulado	Elevada	Circular	Húmedo
Xa.S	3-3-6	Beige	Dura	Ondulado	Umbilicada	Irregular	Húmedo
Xa.S	3-3-7	Beige	Suave	Ondulado	Umbilicada	Circular	Húmedo
Xa.S	3-3-8	Marrón	Suave	Entero	Monticular	Puntiforme	Seco
Xa.S	3-3-9	Beige	Suave	Entero	Umbilicada	Circular	Seco
Xa.S	3-3-10	Beige con centro marrón	Suave	Ondulado	Umbeliforme	Circular	Seco
Xa.S	3-3-11	Beige	Dura	Entero	Monticular	Circular	Húmedo
SN.U	3-4-1	Beige	Duro	Lobulado	Umbilicada	Circular	Seco
SN.U	3-4-2	Beige	Suave	Entero	Umbilicada	Irregular	Seco
SN.U	3-4-3	Beige con marrón al centro	Viscosa	Ondulado	Umbeliforme	Irregular	Húmedo
SN.U	3-4-4	Beige con marrón al centro	Viscosa	Rizado	Plana	Irregular	Seco
SN.U	3-4-5	Blanca	Suave	Entero	Elevada	Circular	Húmedo
SN.U	3-4-6	Marrón	Duro	Entero	Monticulada	Puntiforme	Seco
SN.U	3-4-7	Blanca	Duro	Entero	Umbeliforme	Circular	Seco
SN.U	3-4-8	Blanca	Duro	Ondulado	Elevada	Circular	Seco
SN.U	3-4-9	Banca	Suave	Entero	Monticulada	Puntiforme	Húmedo
SN.U	3-4-10	Blanca	Suave	Entero	Umbeliforme	Circular	Húmedo

CR.U = Cascada Ranita umbría; CR.S = Cascada Ranita solana; BV.U = Buena Vista umbría; BV.S = Buena Vista solana; XA.U = Xalitzintla umbría; XA.S = Xalitzintla solana; SN.U = San Nicolás de los Ranchos umbría; SN.S = San Nicolás de los Ranchos solana.

Cuadro 11.1. Morfología colonial de las cepas aisladas en medio Nfb del muestreo de Agosto 2018

Sitio	Cepa	Color	Textura	Margen	Elevación	Forma	Aspecto
SN.U	3-4-11	Beige	Suave	Entero	Umbilicada	Circular	H
SN.U	3-4-12	Marrón	Suave	Ondulado	Umbilicada	Circular	H
SN.U	3-4-13	Marrón	Suave	Ondulado	Monticulada	Irregular	H
SN.S	3-4-14	Rosa	Suave	Entero	Monticulada	Circular	H
SN.S	3-4-15	Marrón	Suave	Entero	Monticulada	Irregular	S
SN.S	3-4-16	Blanco	Suave	Entero	Umbilicada	Circular	H
SN.S	3-4-17	Blanco con gris al centro	Duro	Entero	Umbeliforme	Circular	S
SN.S	3-4-18	Marrón	Suave	Entero	Monticulada	Circular	S
SN.S	3-4-19	Blanco	Duro	Entero	Elevada	Circular	H
SN.S	3-4-20	Blanco	Duro	Entero	Monticulada	Puntiforme	S
SN.S	3-4-21	Blanca	Duro	Entero	Umbeliforme	Circular	S
SN.S	3-4-22	Blanco con gris al centro	Duro	Entero	Umbilicada	Circular	S
SN.S	3-4-23	Blanca	Duro	Entero	Monticulada	Circular	S
SN.S	3-4-24	Blanca	Duro	Entero	Elevada	Circular	S
SN.S	3-4-25	Beige con marrón al centro	Suave	Entero	Umbilicada	Circular	H

CR.U = Cascada Ranita umbría; CR.S = Cascada Ranita solana; BV.U = Buena Vista umbría; BV.S = Buena Vista solana; XA.U = Xalitzintla umbría; XA.S = Xalitzintla solana; SN.U = San Nicolás de los Ranchos umbría; SN.S = San Nicolás de los Ranchos solana.

Debido a las diferencias morfológicas que presentan las colonias, se obtuvieron diversas morfoespecies (Msp), las cuales se presentan en el cuadro 12.

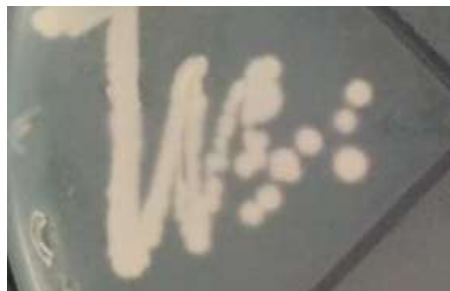


Figura 20. Colonia en crecimiento a 72 horas en medio AST.

Entre los suelos estudiados se encontró la mayor cantidad de morfoespecies en San Nicolás de los Ranchos en exposición umbría y el suelo del sitio Buenavista presentó la menor cantidad de morfo-especies (figura 19). Este resultado en BV, se le atribuye al bajo valor de pH y a la alta relación C/N, donde la materia orgánica al ser principalmente hojas de pino, llegan a ser de difícil mineralización (Farrus y Edelweiss, 2016).

Entre los suelos de los sitios de estudio se presenta una relación negativa entre la altitud y el número de morfoespecies ( $r = 0.4613$ ;  $p \leq 0.0001$ ), por lo que existe la tendencia al aumento de la diversidad de organismos fijadores de nitrógeno con el decremento en altitud. Esto se le atribuye a condiciones ambientales propias de cada sitio, en Cascada Ranita el exceso de humedad (43 %), bajas temperaturas y diferentes calidades en la materia orgánica (relación C/N) limitan el desarrollo de las bacterias (Calvo, 2011), estas variables van cambiando de manera favorable al descender hasta llegar a condiciones más cercanas a las ideales en el suelo (Alcantar González & Trejo Téllez, 2009), como es el caso de San Nicolás de los Ranchos, lo cual nos indica que a pesar de las alteraciones en los ecotonos estudiados, las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, se ven más afectadas por condiciones ambientales sobre las actividades antropogénicas.

Cuadro 12. Morfoespecies encontradas en cada sitio.

Muestra/ Sitio	CR. U	CR. S	BV. U	BV S	Xa. U	Xa. S	SN. U	SN. S	Total
oct-2016	3	2	1	1	2	1	5	3	18
mar-2017	3	3	2	5	2	4	13	4	38
ago-2018	5	3	4	4	3	8	13	12	52

CR.U = Cascada Ranita umbría; CR.S = Cascada Ranita solana; BV.U = Buena Vista umbría; BV.S = Buena Vista solana; XA.U = Xalitzintla umbría; XA.S = Xalitzintla solana; SN.U = San Nicolás de los Ranchos umbría; SN.S = San Nicolás de los Ranchos solana.

## ÍNDICE DE DIVERSIDAD

La diversidad es una característica susceptible a ser medida en cualquier ecosistema, esta refleja las condiciones, complejidad y estructura del sistema, así como la alteración antrópica (Moreno *et al.*, 2011). Por lo cual es ampliamente utilizada para conocer las condiciones en que se encuentra un ecosistema. En el caso de estudio, se emplea el índice de diversidad de Margalef para conocer las condiciones en que se encuentran los sitios de estudio, cabe señalar que la medición de este índice es exclusivamente en cuanto a la diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

Para obtener el índice de diversidad se empleó el método de Margalef

$$D_{Mg} = \frac{S - 1}{\ln N}$$

Dónde:

S= número de especies

N= número total de individuos

Cuadro 13. Índice de diversidad de los sitios de estudio calculado por el método de Margalef.

Sitio	oct/16		mar/17		ago/18		oct/16	mar/17	ago/18	$\bar{x}$
	Msp	N	Msp	N	Msp	N				
CR	5	5	5	6	8	10	2.49	2.23	3.04	2.59
BV	2	2	7	7	8	12	1.44	3.08	2.82	2.45
Xa	3	10	6	7	11	12	0.87	2.57	4.02	2.49
SN	8	36	17	24	25	38	1.95	5.03	6.60	4.53
<b>N total</b>		<b>53</b>		<b>44</b>		<b>72</b>				

Msp = morfoespecies, N = población, IDMg = Índice Diversidad de Margalef. CR = Cascada Ranita; BV = Buenavista; Xa = Xalitzintla; SN = San Nicolás de los Ranchos.

El cuadro 13 muestra los índices de diversidad de Margalef en cada sitio. Se encontró que el sitio con mayor diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre es San Nicolás de los Ranchos (IDMg = 4.53), a pesar de ser el sitio más perturbado por el cambio de uso de suelo. Esta alta diversidad se atribuye a las condiciones ambientales que presenta, ya que a diferencia del resto de los sitios presenta las temperaturas más altas (20-26.5 °C) y a que las condiciones de humedad son favorables en suelos (25 %).

Los otros sitios presentaron índices de diversidad similares, aunque Cascada Ranita presentó el mayor índice de diversidad de los tres (IDMg = 2.5859), el cual a pesar de ser el sitio con la temperatura más baja y una alta saturación de agua en el suelo (hasta 43.7 % de humedad del suelo). Esta alta biodiversidad se le atribuye a sus características ecológicas casi inalteradas con respecto a los dos sitios restantes. Diversos autores (Monroy, 2005; Telleria, 2010; WWF, 2018) señalan al cambio de uso de suelo, contaminación y crecimiento poblacional humano como componentes en la pérdida de diversidad y modificación del equilibrio ecológico.

Tomando como referencia el manual de Bergey (Garrity *et al.*, 2004) se realizó la determinación de pruebas bioquímicas clave en la identificación de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* (cuadro 4).

En los cuadros 14, 15,16 y 17 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en las cepas aisladas. Estos resultados fueron comparados con resultados descritos por: Williams y Wilkins, (1990); Garrity *et al.*, (2004); Schoebitz, (2006); Escobar *et al.*, (2011); Flores *et al.*, (2012) dando como resultado el género mas probable al que pertenecen las cepas aisladas en el presente estudio.

El código de identificación de las cepas descritas en los cuadros 14-17 es el mismo planteado en los cuadros 9-11. Cabe señalar que durante la fase de conservación se perdieron colonias anteriormente aisladas e identificadas como morfoespecies, por lo que no se realizó la determinación del total de las cepas mostradas en los anteriores cuadros. Para el caso de octubre 2016 no se realizaron pruebas bioquímicas.

Cuadro 14. Pruebas bioquímicas realizadas en las cepas aisladas del sitio Cascada Ranita.

Cepa	Umbría marzo 2017			Solana marzo 2017	
	2-1-1	2-1-2	2-1-3	2-1-4	2-1-5
Forma celular	Bacilo	Coco	Cocoide	Cocoide	Cocoide
Pigmento	Marrón	Marrón	-	-	-
Gram	+	+	+	+	-
FRFM	-/-	-/-	-/-	+ <sup>(d)</sup> /-	-/-
FRFR	-/-	+/-	-/-	+ <sup>(k)</sup> /-	-/-
Movilidad	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	+	-
A. Rojo Congo	+	-	-	-	+
Género más probable	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Azospirillum</i>

FRFM = Fermentación Caldo Rojo de Fenol con Manitol; FRFR = Fermentación Caldo Rojo de Fenol con Rhamnosa; Pigmento = Producción de pigmento; A. Rojo congo = Agar rojo congo; d = retardado; k = alcalino; ND = no determinado.

En marzo 2017 en Cascada Ranita se lograron aislar y determinar a organismos pertenecientes a los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* con lo cual confirma la existencia de ambos géneros en el sitio (cuadro 14). Sin embargo, en agosto de 2018 debido a las pérdidas mencionadas anteriormente no se determinó alguna cepa aislada.

Cuadro 15 Pruebas bioquímicas realizadas en las cepas aisladas del sitio Buena Vista.

Cepa	Solana marzo 2017			Solana agosto 2018
	2-2-3	2-2-4	2-2-5	3-2-5
Forma celular	Bacilo	Bacilo chico	Cocoide	Coco
Pigmento	Negro	-	Marrón	-
Gram	+	-	-	+
FRFM	+/+	+/-	+/-	-/-
FRFR	+/+	-/-	+ <sup>(k)</sup> /-	-/-
Movilidad	+	-	+	+
Catalasa	+	-	+	-
Oxidasa	-	-	+	-
A. Rojo Congo	+	-	-	-
Género más probable	<i>Azospirillum</i>	ND	<i>Azotobacter</i>	<i>Azotobacter</i>

FRFM = Fermentación Caldo Rojo de Fenol con Manitol; FRFR = Fermentación Caldo Rojo de Fenol con Rhamnosa; Pigmento = Producción de pigmento; A. Rojo congo = Agar rojo congo; d = retardado; k = alcalino; ND = no determinado.

En el caso de Buenavista las pérdidas de bacterias aisladas impidieron la identificación de organismos en umbría. En solana se identificaron miembros de ambos géneros de interés para el periodo marzo de 2017 y solamente *Azotobacter* en agosto de 2018. No se puede afirmar que solo existen organismos del género *Azospirillum* en cierta época del año debido a las cepas que no fueron identificadas, pero, que se reconocieron como morfo-especies (cuadro 15).

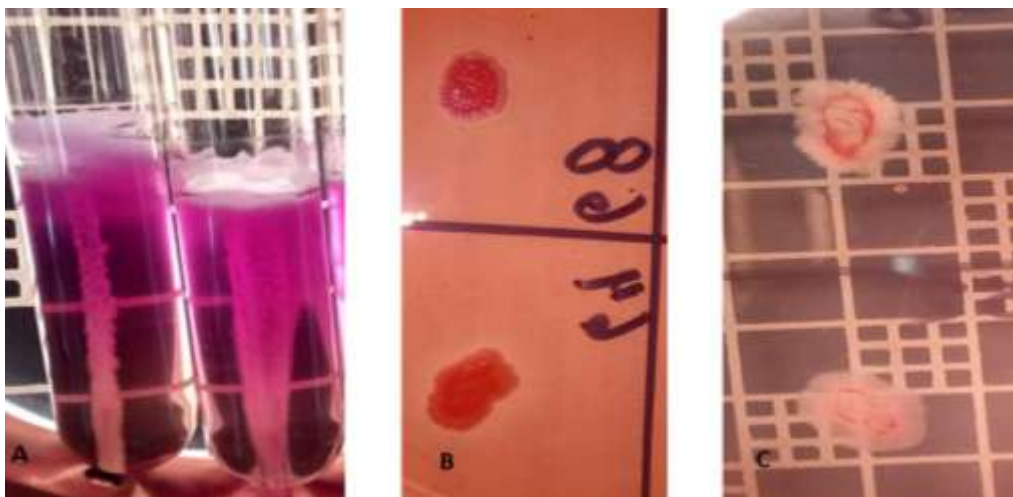


Figura 21. A = Medio MIO, se aprecia la movilidad de las cepas inoculadas; B = Prueba en Agar Rojo Congo positiva; C = Prueba en Agar Rojo Congo negativa.



Cuadro 16. Pruebas bioquímicas realizadas en las cepas aisladas del sitio Xalitzintla

	Umbría marzo 2017		Solana marzo 2017				Umbría agosto 2018	Solana agosto 2018		
Cepa	2-3-1	2-3-2	2-3-3	2-3-4	2-3-5	2-3-6	3-3-1	3-3-4	3-3-5	3-3-10
Forma celular	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo en cadena	Cocoide	Cocoide	Bacilo	x	Bacilo grande	Bacilo chico
Pigmento	Negro	Marrón	-	-	-	Marrón	Amarillo	-	Amarillo	Amarillo
Gram	+	+	-	+	+	+	-	-	-	3
FRFM	-/-	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+ <sup>(k)</sup> /+	-/-	+ <sup>(k)</sup> /-	+/-
FRFR	-/-	+ <sup>(k)</sup> /-	-/-	+ <sup>(k)</sup> /-	+ <sup>(k)</sup> /-	+ <sup>(k)</sup> /-	+ <sup>(k)</sup> /+	-/-	-/-	+/-
Movilidad	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
Catalasa	+	+	+	x	+	+	+	-	+	+
Oxidasa	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
A. Rojo Congo	-	+	+	x	+	-	+	+	+	3
Género más probable	<i>Azotobacter</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Azospirillum</i>	ND	ND	<i>Azotobacter</i>	<i>Azospirillum</i>	ND	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>

FRFM = Fermentación Caldo Rojo de Fenol con Manitol; FRFR = Fermentación Caldo Rojo de Fenol con Rhamnosa; Pigmento = Producción de pigmento; A. Rojo congo = Agar rojo congo; d = retardado; k = alcalino; ND = no determinado.

En Xalitzintla se obtuvieron seis cepas pertenecientes al periodo marzo 2017 (cuadro 16). En umbría se determinaron dos cepas, una de ellas pertenece al género *Azotobacter* y la otra al género *Azospirillum*. En solana se obtuvieron cuatro cepas, una del género *Azotobacter*, una en *Azospirillum* y dos no pudieron ser determinadas (ND). En agosto 2018 se determinó una cepa perteneciente a *Azospirillum* en umbría. En solana se obtuvieron tres cepas, una para cada género de interés y una más como no determinada.

Cuadro 17 Pruebas bioquímicas realizadas en las cepas aisladas del sitio San Nicolás de los Ranchos.

Umbría marzo 2017									
Cepa	2-4-1	2-4-2	2-4-3	2-4-4	2-4-5	2-4-6	2-4-7	2-4-8	2-4-10
Forma celular	Bacilo chico	bacilo chico	Bacilo redondeado	Bacilo chico	Cocobacilo	bacilo	Bacilo chico	Bacilo grande en cadena	Cocoide
Pigmento	-	-	Marrón	-	Negro	Negro	-	Marrón	Marrón
Gram	-	-	+	+	-	-	-	+	+
FRFM	+/-	-/-	+ <sup>(k)</sup> /-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	+/-
FRFR	-/-	-/-	+ <sup>(k)</sup> /-	+ <sup>(k)</sup> /-	+/+	+/+	-/-	+ <sup>(k)</sup> /-	-/-
Movilidad	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Catalasa	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	+	-	+	x	-
A. Rojo Congo	x	-	+	-	+	+	+	+	-
Género más probable	ND	ND	ND	ND	<i>Azospirillum</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Azospirillum</i>	ND	<i>Azotobacter</i>

FRFM = Fermentación Caldo Rojo de Fenol con Manitol; FRFR = Fermentación Caldo Rojo de Fenol con Rhamnosa; Pigmento = Producción de pigmento; A. Rojo congo = Agar rojo congo; d = retardado; k = alcalino; ND = no determinado.

San Nicolás de los Ranchos es el sitio donde se registraron el mayor número de cepas determinadas. En el periodo correspondiente a marzo de 2017 se logró someter a pruebas bioquímicas a 12 cepas aisladas en umbría, de las cuales, tres fueron determinadas como *Azospirillum*, cuatro se consideraron *Azotobacter* y cinco no pudieron ser clasificadas dentro de alguno de estos géneros (cuadro 17).

Continuación cuadro 17.1 Pruebas bioquímicas realizadas en las cepas aisladas del sitio San Nicolás

Cepa	Umbría marzo 2017			Umbría agosto 2018						
	2-4-11	2-4-12	2-4-13	3-4-1	3-4-3	3-4-4	3-4-5	3-4-6	3-4-7	3-4-11
forma celular	Cocoide	Pleomorfica	Bacilo corto	bacilo con espora	bacilo grande en cadena	oval	oval	Bacilos chico	x	Bacilo chico
Pigmento	Marrón	Marrón	-	-	-	-	-	Amarillo	-	Amarillo
Gram	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
FRFM	+ <sup>(k)</sup>	+ <sup>(k)</sup>	+ <sup>(d)</sup> /-	+/-	+/-	+/-	+/+	+ <sup>(k)</sup> /+ <sup>(k)</sup>	-/-	+ <sup>(k)</sup> /-
FRFR	-/-	+ <sup>(k)</sup> /-	-/-	+ <sup>(k)</sup> /-	-/-	-/-	+ <sup>(d)</sup> /-	+ <sup>(k)</sup> /-	-/-	+ <sup>(k)</sup> /-
Movilidad	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Oxidasa	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
A. Rojo Congo	-	-	-	+	+	+	-	-	x	+
Género más probable	<i>Azotobacter</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Azospirillum</i>	ND	ND

FRFM = Fermentación Caldo Rojo de Fenol con Manitol; FRFR = Fermentación Caldo Rojo de Fenol con Rhamnosa; Pigmento = Producción de pigmento; A. Rojo congo = Agar rojo congo; d = retardado; k = alcalino; ND = no determinado.

En el cuadro 17.1 se muestran las siete cepas que fueron sometidas a pruebas bioquímicas de San Nicolás de los Ranchos aisladas en agosto de 2018 con exposición umbría. Tres de ellas fueron determinadas como *Azospirillum*, otras dos como *Azotobacter* y dos más no pudieron ser determinadas.

En solana se identificaron menos cepas. En el periodo de marzo de 2017 se sometió a pruebas bioquímicas a cuatro cepas, de las cuales dos no pudieron ser identificadas y las dos restantes se determinaron como *Azospirillum*. Del aislamiento realizado en agosto de 2018 en solana se determinaron dos cepas pertenecientes al género *Azotobacter* y una al género *Azospirillum* además, de dos cepas no determinadas (figura 17.2).

Continuación cuadro 17.2 Pruebas bioquímicas realizadas en las cepas aisladas del sitio San Nicolás

Cepa	Solana marzo 2017				Solana agosto 2018				
	2-4-14	2-4-15	2-4-16	2-4-17	3-4-14	3-4-15	3-4-19	3-4-22	3-4-24
forma celular	Bacilo mediano en cadena	Coco	Bacilo redondeado	Bacilo grande con gránulo en cadena	Bacilo	Bacilo	Coco	Bacilo grande en cadena	Bacilo grande con gránulo en cadena
Pigmento	Marrón	Marrón	Marrón	Marrón	-	-	-	-	-
Gram	-	+	-	+	-	-	+	+	+
FRFM	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
FRFR	+ <sup>(k)</sup> /-	+ <sup>(k)</sup> /-	+ <sup>(k)</sup> /-	+ <sup>(k)</sup> /-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Catalasa	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	-	+	-	-	-
A. Rojo Congo	+	-	+	-	-	x	-	-	+
Género más probable	<i>Azospirillum</i>	ND	<i>Azospirillum</i>	ND	ND	ND	<i>Azotobacter</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Azospirillum</i>

FRFM = Fermentación Caldo Rojo de Fenol con Manitol; FRFR = Fermentación Caldo Rojo de Fenol con Rhamnosa; Pigmento = Producción de pigmento; A. Rojo congo = Agar rojo congo; d = retardado; k = alcalino; ND = no determinado.

Uno de los principales objetivos del estudio fue la identificación de cepas pertenecientes a los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum*, debido a esto se enfocaron las pruebas bioquímicas y características morfológicas a nivel celular en estos géneros, en la figura 22, se muestra la morfología tipo de organismos pertenecientes al género *Azospirillum*, donde resalta la forma bacilar y a nivel colonia coloración blanca. En la figura 23, se muestra la morfología típica del género *Azotobacter*.



Figura 22. Morfología colonial y microscópica de una cepa aislada en San Nicolás de los Ranchos, presenta características morfológicas típicas del género *Azospirillum*, inoculada en medio AST.

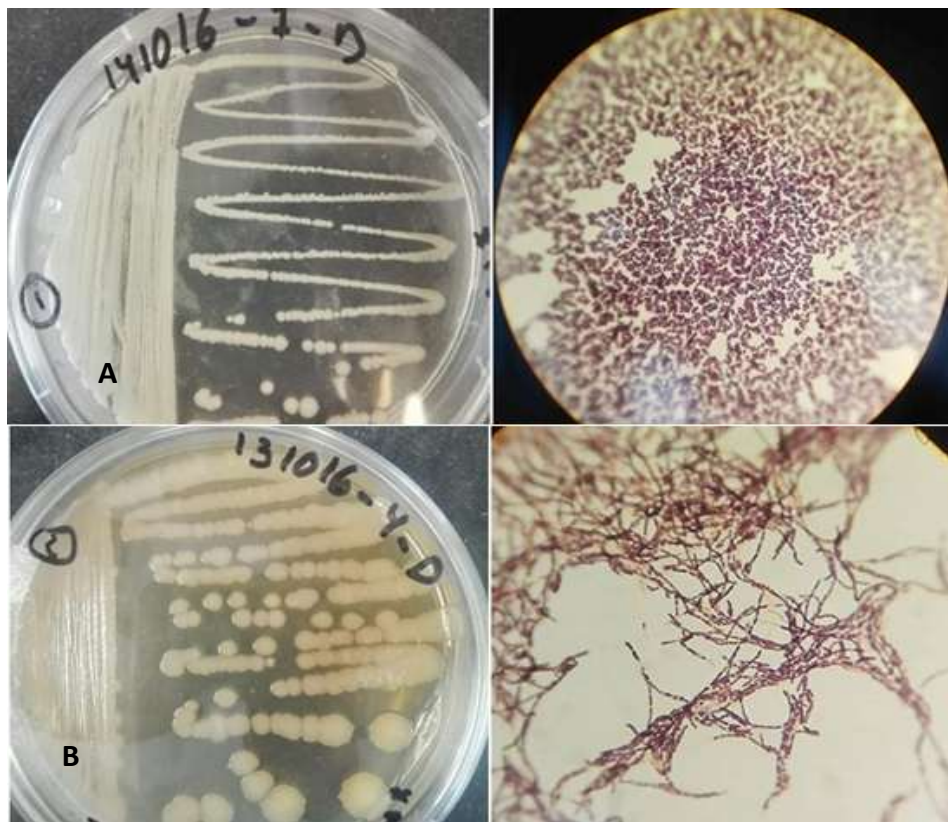


Figura 23. A; Morfología colonial y microscópica de una cepa aislada en Cascada Ranitas; B; Morfología colonial y celular de una cepa aislada en San Nicolás, ambas presentan caracteres morfológicos del género *Azotobacter*, inoculada en medio AST.

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, morfología microscópica y colonial, se relacionaron con resultados descritos por algunos autores (Garrity *et al.*, 2004; González, 2008; Clavijo *et al.*, 2012) para los géneros de interés y fueron empleados para determinar las cepas aisladas. En la figura 21 se muestra la cantidad de cepas aisladas por género respecto a cada sitio y momento de muestreo. En el muestreo correspondiente a agosto de 2018 no se logró identificar alguna cepa del sitio Cascada Ranitas, sin embargo, se registró la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno.

Debido a las pérdidas durante la fase de aclimatación los resultados se encuentran incompletos, por lo cual no se podría afirmar con certeza la mayor abundancia de un género sobre el otro, sin embargo podemos afirmar la existencia de ambos géneros en los cuatro sitios de estudio.

Cuadro 18 . Cepas aisladas de los géneros *Azospirillum* y *Azotobacter* por sitio.

Sitio	Periodo	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>	ND
Cascada Ranita	Marzo 2017	2	3	0
	Agosto 2018	0	0	0
Buenavista	Marzo 2017	1	1	1
	Agosto 2018	0	1	0
Xalitzintla	Marzo 2017	2	2	2
	Agosto 2018	2	1	1
San Nicolás de los Ranchos	Marzo 2017	5	4	9
	Agosto 2018	4	4	4
	Total	16	16	17

El total de las cepas que fueron sometidas a pruebas bioquímicas fue de 49, de las cuales 16 pertenecen al género *Azospirillum*. El género *Azotobacter* también presentó 16 cepas y otras 17 no fueron determinadas. Estos resultados son comparables con lo mencionado por Blaine (1993), donde señala que la cantidad de bacterias del género *Azotobacter* y *Azospirillum*, se presentan casi en la misma cantidad en los suelos.

San Nicolás de los Ranchos es el sitio donde se registró la mayor cantidad de cepas de ambos géneros, mientras que, en Buena Vista se registraron pocas cepas de ambos grupos. Algunos autores (Blaine, 1993; Steenhoudt y Vanderleyder, 2000; Bore *et al.*, 2017) señalan que el pH bajo limita la actividad de bacterias fijadoras de nitrógeno, por lo que el bajo pH de Buena Vista y la alta relación C/N, se encuentran limitando el desarrollo de estas bacterias.

## CONCLUSIONES

Los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum* están presentes de manera similar en todos los sitios de estudio.

La relación existente entre los contenidos de nitrógeno y las UFC es positiva ( $r = 0.5058$ ;  $\alpha \leq 0.0001$ ), por lo cual, al aumentar la cantidad de bacterias fijadoras de nitrógeno, éstas tienden a aumentar el contenido de nitrógeno en el suelo.

San Nicolás de los Ranchos, es el sitio con el mayor índice de diversidad (IDMg = 4.5), seguido de Cascada Ranita (IDMg = 2.58). Xalitxintla presentó un índice de diversidad de (IDMg = 2.49) y Buena Vista presentó el valor más bajo (IDMg = 2.45).

El sitio con mayor cantidad de morfoespecies fue San Nicolás de los Ranchos y con la menor cantidad se encuentra Buena Vista que presentó en ambas exposiciones solares el mismo número de morfoespecies. Las características dominantes fueron, margen entero, forma circular, elevación monticular, de consistencia suave y coloración beige. Esta morfoespecie se encuentra en todos los sitios de estudio.

En San Nicolás de los Ranchos también se encontró la mayor cantidad UFC fijadoras de nitrógeno, dado que este lugar presenta intervalos más favorables de temperatura para la proliferación de estos microorganismos. Por otro lado, el sitio con menor UFC g suelo fue Xalitxintla debido al bajo contenido de MOS.

En cuanto a exposición solar, se puede concluir que los efectos de solana y umbría generan cambios en la composición de la materia orgánica, humedad y temperatura que influyen en la dinámica biótica de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

El pH y la MOS se encuentran correlacionados de manera negativa, por lo que al aumentar la cantidad de MOS el pH tiende a disminuir. En el caso de los sitios de estudio, Buenavista fue el sitio con mayores contenidos de MOS y el que presentó valores de pH más bajos.

Los valores de conductividad eléctrica en los sitios de estudio, son despreciables, sin embargo, se registró una tendencia a incrementarse con la disminución de la altitud. Este mismo comportamiento se registró entre la CE y la humedad del suelo, por lo cual el incremento de la CE se le atribuye a la disminución del arrastre de iones de la solución del suelo.

## REFERENCIAS

- Agurto Belloso, J., Del Mar Torres, A., Delgado Sánchez, N., & Merma, E. (2002). *Gestión de ecosistemas lacustres de alta montaña: El caso de la sub cuenca Pomacanchi*. Cusco. Peru: Instituto de Manejo de Agua y Medio Ambiente.
- Alcantar Gonzáles, G., & Trejo Téllez, L. (2009). *Nutrición de cultivos*. Texcoco, México: Mundi prensa.
- Alexander, M. (1994). *Introducción a la microbiología del suelo*. A.G.T EDITOR.
- Armenta Bojórquez, A. D., García Gutiérrez, C., Camacho Báez, J. R., Apodaca Sánchez, M. Á., Gerardo Montoya, L., & Nava Pérez, E. (Enero-Abril de 2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*, 6(1), 51-56.
- Baca, B. E., Soto Urzúa, L., & Pardo Ruíz, M. P. (Julio-Agosto de 2000). Fijación Biológica de nitrógeno. *Elementos*, 7(38), 43-49.
- Blaine Metting, F. (1993). *Soil microbial ecology*. New York: Marcel Dekker Inc.
- Bore, E. K., Apostel, C., Halicki, S., Kuzyakov, Y., & Dippold, M. (2017). Soil microorganisms can overcome respiration inhibition by coupling intra- and extracellular metabolism: 13C metabolic tracing reveals the mechanisms. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 1423-1433.
- Cadena Zamudi, J., Martínez Peña, M., Guzmán Rodríguez, L., & Arteaga Garibay, R. (2016). Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agroproductividad*, 9(2), 70-83.
- Calvo García, S. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Cuadernos de Tomás*, 173-186.
- Campbel, R. (1987). *Ecología microbiana*. México: Limusa.
- Carbonetto, M. B. (2014). *Diversidad de las comunidades microbianas de los suelos pampeanos. Enfoques ecológicos y metagenómicos*. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
- Castillo Rodríguez, F., Roldán Ruiz, M. D., Blasco PLá, R., Huertas Romero, M. J., Caballero Domínguez, F. J., Moreno Vivián, C., y otros. (2005). *Biotecnología ambiental*. Madrid. España: TEBAR.
- Celaya Michel, H., & Catellanos Villegas, A. E. (2011). Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana*, 29(3), 343-356.
- Cepeda, D. M. (1991). *Química de suelos*. México: Trillas.



- Cercenado, E., y Cantón, R. (2010). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica.
- Cerón Rincón, L. E., y Aristizábal Gutierrez, F. A. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 285-295.
- Chotte, J. L., Schwartzmann, A., Bally, A., y Monrozier, L. J. (2002). Changes in bacterial communities and *Azospirillum* diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. *Soil biology y biochemis*, 1083-1092.
- Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., y Guillén, C. (2012). Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de *Olea europea* (olivo) en Tacna Perú. *Ecología Aplicada*, 89-102.
- Comision Nacional de Areas Naturales Protegidas (CONANP). (8 de Septiembre de 2016). *AREAS NATURALES PROTEGIDAS*. Recuperado el 14 de Marzo de 2017, de <http://www.conanp.gob.mx/regionales/>
- CONAFOR. (2011). *Servicios ambientales y cambio climático*.
- CONANP. (2013). *Parque Nacional Iztccíhuatl popocatepetl*. Obtenido de <https://iztapopo.conanp.gob.mx/>
- CONANP. (8 de Septiembre de 2016). *ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS*. México: Comision Nacional de Áreas Naturales Protegidas.
- Cruz Flores , G. (2006). *Ecología del suelo: un enfoque hacia la nutrición mineral de plantas superiores*. Ciudad de México. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- De la Lanza Espino, G., Cáceres Martínez, C., Adame Martínez, S., y Hernández Pulido, S. (1999). *Diccionario de hidrología y ciencias afines*. México: UNAM.
- Detlef Schulze, E., Beck, E., Buchmann, N., Clemens, S., Hohenstein, K. M., y Lorenzen, M. S. (2019). *Plant Ecology*. Berlin, Alemania: Springer.
- Domínguez Calderón, I. (2006). *Producción y calidad del jitomate con tres biofertilizantes producidos con Azospirillum brasilensis*. México: UNAM.
- Domínguez Mendoza, C. (2011). *Atividade microbiologica como un indicador de biorremediación asistida*. México: UNAM.
- Elizondo, S. J. (2006). El nitrógeno en los sistemas ganaderos de leche. *Agronomía Mesoamericana*, 69-77.

- Elosegi, A., y Sabater, S. (2009). *Conceptos y técnicas en ecología fluvial*. España: Editorial Rubes España BBV Bancomer.
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., y Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuario*, 39-49.
- FAO. (2012). *¿Por que invertir en el desarrollo sostenible de las montañas?* Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- FAO. (2019). *Portal del suelo de la FAO*. Recuperado el 5 de Septiembre de 2019, de <http://www.fao.org/soils-portal/about/definiciones/es/>
- Farrus, M., y Edelweiss, M. A. (2016). *Influencia de la fertilización sobre la actividad biológica del suelo. Estudio comparativo de diferentes fuentes de materia orgánica*.
- Flores Gallegos, A. C., Contreras Esquivel, J. C., Reyes Valdés, M. H., y Rodríguez Herrera, R. (2012). Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del género *Azotobacter*. *Acta química mexicana*, 32-41.
- Flores Gallegos, A., González, V., Aguilar, C., y Rodríguez Herrera, R. (2014). *Biofertilizantes microbianos*. México: Universidad Autónoma de Coahuila.
- Flores López, H. E., Carrillo González, R., Francisco Nicolás, N., Hidalgo Moreno, C., Ruiz Corral, J. A., Castañeda Villanueva, A. A., y otros. (2009). Aportes de nitrógeno y fósforo de tres sistemas agrícolas de la cuenca hidrográfica "El Jihuete", en Jalisco, México. *Agrociencia*, 659-669.
- Foth, H. D. (1986). *Fundamentos de la ciencia del suelo*. Compañía editorial continental.
- Gaby, J. C., y Buckley, D. H. (2015). Assessment of nitrogenase diversity in the environment. En F. J. de Bruijn, *Biological nitrogen fixation* (págs. 209-218). United States of America: Wiley Blackwell.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., y Lilburn, T. (2004). *Taxonomic outline of the prokaryotes Bergeys Manual of systematic bacteriology*. New York: Springer.
- Gholami, A., Shahsavani, S., y Nezarat, S. (2009). The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. *Agricultural and biosystems engineering*, 9-14.
- Gil, M. (2018). Recuperado el 15 de mayo de 2019, de Agar soya tripticaseína: fundamento, preparación y usos.: <https://www.lifeder.com/agar-soya-tripticaseina/>

- González Ruiz, T. (2008). *Dinámica poblacional de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en suelos de dos terrazas aluviales con diferente nivel de deterioro del suelo en el valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla*. México: UNAM.
- Grageda Cabrera, O. A., Medina Cázares, T., Aguilar Acuña, J. L., Hernández Martínez, M., Solís Moya, E., Aguado Santacruz, G. A., y otros. (Noviembre- Diciembre de 2004). PÉRDIDAS DE NITRÓGENO POR EMISIÓN DE  $N_2$  Y  $N_2O$  EN DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO Y CON TRES FUENTES NITROGENADAS. *Agrociencia*, 38, 625-633.
- Grageda Cabrera, O. A., Vermoesen, A., Van Cleemput, O., y Peña Cabriales, J. J. (2000). Efecto del tipo de suelo, humedad y fuente de nitrógeno en las emisiones de  $N_2$  y  $N_2O$ . *Terra Latinoamericana*, 18(1), 1-9.
- Granados Sánchez, D., Hernández García, M., y López Ríos, G. (2006). Ecología de las zonas ribereñas. *Universidad Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 12(1): 55-69.
- Guerra Hernández, E., y Cruz Flores, G. (2014). *Métodos de evaluación y diagnóstico para agua y suelo*. México: UNAM.
- Herman, R. P., Provencio, K., Torrez, R., y Seager, g. (1994). Seasonal and spatial population dynamics of the nitrogen efficient guild in a desert bajada grassland. *Applied an environmental microbiology*, 1160-1165.
- Hernández Jiménez, A., Ascanio García, M., Morales Díaz, M., Bojorquez Serrano, J., García Calderón, N., y Juan, G. P. (2006). *El suelo: Fundamentos sobre su formación, los cambios globales y su manejo*. México: Universidad Autónoma de Nayarit.
- Hurzúa, H. (2005). Beneficios de la fijación simbiótica de nitrógeno en Chile. *Ciencia e investigación agraria*, 32(2), 133-150.
- Jackson, M. I. (1982). *Análisis químicos de suelo*. Barcelona: Omega S.A.
- Jaramillo , D. F. (2002). *Introducción a la ciencia del suelo*. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
- López Vicente, L. (2015). La Composta como mejorador del suelo. En G. Cruz Flores, y A. B. López López, *Re-descubriendo el suelo: su importancia ecológica y agrícola*. (pág. 236). México: UNAM FES Zaragoza.
- López, H. (2004). *Fábrica de agua en la región del Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl*. México D. F. (Edición digital: CONABIO 2006): Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

- López, H. (2004). *Fábrica de agua en la región del Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl*. México D. F. (Edición digital: CONABIO 2006): Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Loredo Osti, C., López Reyes, L., y Espinosa Victoria, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión. *Terra Latinoamericana*, 225-239.
- Lozada, J. R., Soriano, P., y Costa, M. (Marzo de 2014). Relaciones suelo-vegetación en una secuencia del Escudo Guayanés, Venezuela. *Biología Tropical*, 62(1), 385-401.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., y Clark, D. P. (2015). *BROCK. Biología de los microorganismos* (14 ed.). España: PEARSON EDUCACIÓN, S.A.
- Maldonado, C. E., Rivera Cruz, M., Izquierdi Reyes, F., y Palma López, D. (2010). Efectos de rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y ciencia*, 121-136.
- Manahan, S. E. (2007). *Introducción a la química ambiental*. México: Reverte S.A de C.V.
- Mantilla Paredes, A. J., Cardona, G. I., Peña Venegas, C. P., Murcia, U., Rodriguez, M., y Zambrano, M. M. (Diciembre de 2009). Distribucion de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *Biología Tropical*, 57(4), 915-927.
- Mariotti, A. (1983). Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural  $^{15}\text{N}$  abundance measurements. *Nature*, 685-687.
- Martín, G. M., Rivera, R. A., y Mujica, Y. (2007). Estimación de la fijación biológica de nitrógeno de la *Canavalia ensiformis* por el método de la diferencia de nitrógeno total. *Cultivos tropicales*, 28(4), 75-78.
- Martínez Romero, E., y Martínez R, J. C. (s.f.). *Microbios*. Recuperado el 30 de Mayo de 2018, de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html>
- Mayz Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 1-20.
- Monroy Vilchis, O. (2005). Causas de pérdida de diversidad biológica. *Cuadernos de Biodiversidad*, 3-9.
- Montaño, N. M., Sandoval Pérez, A. L., Nava Mendoza, M., Sánchez Yañes, J. M., y García Oliva, F. (2013). Variación espacial y estacional de grupos funcionales de bacterias cultivables del suelo de un bosque tropical seco en México. *Biología Tropical*, 439-453.

- Morales Martínez, M., Pérez Sánchez, R., Juárez Juárez, M., y Moreno Rivera, M. d. (2012). *Manual de Microbiología*. Mexico: Departamento de ciencias básicas Academia de Biología IPN.
- Moreno, C. E., Barragán, F., Pineda, E., y Pavón, N. P. (2011). Reanálisis de la diversidad alfa: alternativas para interpretar y comparar información sobre comunidades ecológicas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82, 1249-1261.
- Moreno, N., y Agudelo Flórez, P. (2010). Aplicación de las pruebas de PCR convencional simple y múltiple para la identificación de aislamientos de *Leptospira spp* en Colombia. *Revista Peruana de Medicina Experimental y salud pública*, 27(4), 548-556.
- Muñoz Iniestra, D. J., Ferreira Ramírez, M., Escalante Arriaga, I. B., y López García, J. (2013). Relación entre la cobertura del terreno y la degradación física y biológica de un suelo aluvial en una región semiárida. *Terra Latinoamericana*, 31(3), 201-210.
- Neill, C., Deegan, L., Thomas, S., y Cerri, C. (2001). Deforestation for pasture alters nitrogen and phosphorus in small amazonian streams. *Ecological Applications*, 1817-1828.
- Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. (A. E. Terrestre, Ed.) *Ecosistemas: revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, 41-51.
- Nuñez Escobar, R. (2010). El suelo como medio natural en la nutrición de los cultivos. En G. Alcántar González, y L. Trejo Téllez, *Nutrición de cultivos* (pág. 450). México: Grupo Mundi-Prensa.
- Palma Jiménez, A. V. (2010). *Variación altitudinal de nitrógeno orgánico e inorgánico en suelos del Pico de Orizaba*. México: UNAM.
- Palmer, R. G., y Troeh, F. R. (1979). *Introducción a la ciencia del suelo*. México: Libros y editoriales S.A.
- Pérez, J., & Casas, M. (2005). Estudio de la interacción Planta-*Azospirillum* en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum sp.*). *Ciencia Agropecuaria*.
- Rangel Lucio, J. A., Rodríguez Mendoza, M., Ferrera Cerrato, R., Castellanos Ramos, J., Ramírez Gama, R. M., y Alvarado Bárcenas, E. (2011). Afinidad y efecto de *Azospirillum sp.* en maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 269-279.
- Rariz Molloa, G., Ferrando, L., y Fernández Scavino, A. (2012). *Aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en plantas de arroz cultivadas en diferentes suelos*. La Plata Argentina: Séptimo congreso de Medio Ambiente AUGM.
- Reed, S., Cleveland, C., y Townsend, A. (2011). Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. *Annual review of ecology evolution and systematics*, 489-512.

- Reyes Jaramillo, A. (1996). *Fundamentos teórico prácticos de temas selectos de la ciencia del suelo*. México: UAM I.
- Rives, N., Acebo, Y., y Hernández, A. (2007). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) Perspectivas de uso en cuba. *Cultivos tropicales*, 29-38.
- Rodríguez Barrueco, c., Sevillano García, F., y Subramaniam, P. (1984). *La fijación de nitrógeno atmosférico: Una biotecnología en la producción agraria*. Salamanca, España: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología.
- Rodríguez Jiménez, R. M., Benito Capa, A., y Portela Lozano, A. (2004). *Meteorología y climatología*. FECYT (Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología).
- Roger, Y., Lingraham, J., y Wheelis, M. (1992). *Microbiología*. España.
- Romero, F. I., Cozano, M. A., Gangas, R. A., y Naulin, P. I. (2014). Zonas ribereñas: protección, restauración y contexto legal en Chile. *Bosque*, 3-12.
- Sandoval Aparicio, J. C. (2016). *Caracterización y clasificación de suelos de sistemas ribereños del parque nacional izta-popo*. Ciudad de México.
- Sans, F. X. (2007). La diversidad de los agroecosistemas. *Ecosistemas: Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, 16(1), 44-49.
- Santiago Aguilar, I. (2018). *Contenidos de carbono orgánico y su compartimentación en sistemas ribereños adyacentes a cuatro biotopos del Parque Nacional Izta-Popo y zona de influencia*. Ciudad de México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UNAM).
- Sarmiento, F. O. (2000). *Diccionario de ecología: paisajes, conservación y desarrollo sustentable para Latinoamérica*. Abya Yala.
- Schoebitz Cid, M. I. (2006). *Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.)*. Chile: Universidad Austral de Chile.
- SEMARNAT. (2003). *Norma oficial mexicana 021*. Recuperado el 20 de Mayo de 2018, de <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/rn/rn021-02.pdf>
- Smercina, D. N., Evans, S. E., Friesen, M. L., y Tiemann, L. K. (2019). To fix or not to fix: Controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere. *Applied and environmental microbiology*.
- Steenhoudt, O., y Vanderleyder, J. (2000). *Azospirillum* free living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *Microbiology*, 487-506.
- Stein, L. Y., y Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 94-98.

- Telleria, J. L. (2010). Pérdida de biodiversidad. Causas y consecuencias de la desaparición de especies. *Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural 2a ép* (págs. 13-25). Madrid: Facultad de Ciencias Biológicas .
- Tortora, G. j., Case, C. L., & Funk, B. R. (2007). *Introducción a la microbiología* (9 ed.). Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Trinidad Santos, A., y Velasco Velasco, J. (Abril de 2016). Importancia de la materia orgánica en el suelo. *Agroproductividad*, 9(8), 52-58.
- Valenzuela B, I. G., y Visconti M, E. F. (2018). Influencia del clima, uso del suelo y profundidad sobre el contenido de carbono orgánico en dos pisos altitudinales andinos del departamento norte de Santander, Colombia. *Revista colombiana de ciencias hortícolas*, 12(1), 233-243.
- Vázquez ., G., García Franco, J. G., Castillo, G., Escobar, F., Guillen, A., y Martínez, M. L. (2015). Ecosistemas ribereños: Un paisaje fragmentado. *Biodiversitas*(119), 7-11.
- Vázquez, G. (2015). Ecosistemas ribereños: un paisaje fragmentado. (CONABIO, Ed.) *Biodiversitas*(119), 7-11.
- Viñas Canals, M. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicología*. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Vital López, L., Cruz Hernández, M. A., Fernández Dávila, S., y Mendoza Herrera, A. (2015). Diversidad bacteriana en raíces de maíz Híbrido convencional y genéticamente modificado. *IYTON Revista internacional de Botánica experimental*, 84, 233-243.
- Williams, y Wilkins. (1990). *Berney's manual of determinative bacteriology*. E.U.A: .
- Winston, B. J. (1990). *Biología de la productividad de cultivos*. España: AGT editor, S.A.
- WWF. (30 de octubre de 2018). *América Latina: la región con más pérdida de vertebrados en el mundo*. Recuperado el 25 de septiembre de 2019, de <http://www.wwf.org.mx/?uNewsID=337500>
- Zavala Cruz, J., Palma López, D., Fernández Cabrera, C. R., López Castañeda, A., y Shirma Torres, E. (2011). *Degradación y conservación de suelos en la cuenca del río Grijalva, Tabasco*. Villa Hermosa, México: Secretaria de Recursos Naturales y Protección Ambiental.

## ANEXOS

### ANEXO 1. CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DE LOS SUELOS

#### Determinación de pH

El pH del suelo se medirá utilizando el método potenciométrico en relación 1:2 (Jaramillo, 2002; SEMARNAT, 2003; Guerra y Cruz, 2014).

Materiales y reactivos:

- 10 g de suelo
- 20 mL de agua destilada
- Potenciómetro
- Solución buffer de pH 4,7 y 10

Procedimiento:

- Calibrar el potenciómetro con los buffer entre los que se encuentre el pH a medir ( pH básico con buffer 7 y 10, pH ácido usar buffer 4 y 7)
- Colocar 10 g de suelo en un vaso de precipitados de 100 mL
- Añadir 20 mL de agua ( relación suelo/ solución 1:2
- Agitar manualmente durante 1 minuto y dejar reposar por 10 minutos. Repetir tres veces
- Agitar la solución de suelo y realizar la medición de pH.

#### Determinación del porcentaje de humedad

Materiales y reactivos:

- Tres crisoles por cada muestra a medir.
- 30 g de suelo por muestra.
- Estufa.
- Balanza.

Procedimiento:

- Pesar un crisol y colocar 10 g de suelo. Pesar el crisol con suelo y registrar
- mantener en estufa a 90 °C y pesar cada 24 horas hasta alcanzar el peso constante.
- Realizar el siguiente cálculo:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{Peso suelo humedo} - \text{Peso suelo seco}}{\text{Peso suelo seco}} \times 100$$



### Textura por el método de Bouyoucos

La textura se basa en la división arbitraria del suelo en tres fracciones según su tamaño: Arena, limo y arcilla (Cuadro 2). La clasificación textural, se realiza utilizando el triángulo de textura que se muestra en la Figura 2. La textura se conocerá por el método de Bouyoucos (SEMARNAT, 2003; Guerra & Cruz, 2014)

#### Materiales y reactivos:

- 180 g de suelo por muestra
- Agua destilada
- Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ )
- Ácido clorhídrico (HCl) 1N
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Nitrato de sodio
- Alcohol etílico
- Baño María
- Tres vasos de precipitado de 1 L por muestra
- Tres probetas de 500 mL por muestra
- Agitador de vidrio (1 por muestra)
- Hidrómetro
- Termómetro
- Cronómetro
- Esquimero

#### Procedimiento:

- Colocar los 60 gramos de suelo en un vaso de precipitado, humedecer con agua destilada y agregar 10 mL de  $H_2O_2$ .
- Colocar en el baño María la mezcla hasta degradar la materia orgánica (agregar  $H_2O_2$  hasta terminar la efervescencia) dejar reposar la mezcla 24 horas.
- Agregar a la muestra 25 mL de HCl 1N y calentar la muestra durante 15 minutos. Verificar que el pH este en un rango 6 a 7.5 (> 7.5 agregar gotas de HCl, Si es < 6 agregar gotas de NaOH). Dejar reposar el suelo durante 24 horas.
- Secar la muestra y pesar 50 gramos. Agregar 10 mL de nitrato de sodio y agitar la muestra por 5 minutos.
- En una probeta de 500 mL verter la mezcla anterior y aforar con agua, y sumergir un termómetro e hidrómetro (si se presenta espuma agregar gotas de alcohol etílico).
- Tomar las lecturas del hidrómetro y del termómetro a 40 y 120 segundos, 30, 60, 120, 180, 240 y 300 minutos.

## Nitrógeno total

### Materiales y reactivos:

- 10 g de suelo por muestra
- Mezcla de ácido sulfúrico-salicílico
- Mezcla catalizadora de sulfatos
- Agua destilada
- Hidróxido de sodio al 50 %
- Ácido bórico al 4 %
- Ácido sulfúrico 0.05 N
- Indicador mixto de verde de bromocresol
- Balanza analítica
- Matraces microkjeldhal de 30 mL
- Plancha de arena para digestión o equivalente
- Campana con extractor de gases
- Pipetas de 10 mL
- Matraces Erlenmeyer de 125 mL
- Equipo de destilación por arrastre de vapor
- Bureta

### Procedimiento:

- Colocar un gramo de suelo tamizado en malla 1.5 mm en matraz Kjeldhal
- Agregar 4 mL de mezcla de ácido sulfúrico-salicílico
- Después de 30 minutos agregar 0.1 g de mezcla catalizadora
- Calentar a temperatura media alta hasta que el digestato se torne claro
- Ebulir la muestra por una hora. A partir de este momento la temperatura se debe regular para que los vapores del ácido se condensen en el tercio inferior del cuello del matraz
- Se deja enfriar, se agrega agua destilada (15 mL) para colocar el digestado en suspensión mediante agitación
- Dejar decantar las partículas de sílice y evite precipitación de cristales de  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ , transferir al equipo de destilación y agregar 15 mL de NaOH al 50%

## Materia orgánica

Para la materia orgánica se emplea el método de Walkley y Black (Jackson, 1982; Reyes, 1996; SEMARNAT, 2003; Hernández & Cruz, 2014) este método consiste en la oxidación de la materia orgánica mediante dicromato de potasio y ácido sulfúrico.

Materiales y reactivos:

- Dicromato de potasio 1.0 N
- Sulfato ferroso 0.5 N
- Indicador de Difenilamina
- Ácido sulfúrico concentrado
- Ácido fosfórico concentrado
- Fluoruro de sodio
- Dos gramos de suelo por muestra
- Tamiz de malla de 2 mm
- Tres matraces Erlenmeyer de 250 mL por muestra.
- Dos buretas
- Probeta de 100 mL

Procedimiento:

- Pesar un gramo de suelo previamente tamizado (malla 100), en caso de tratarse de un suelo rico en materia orgánica, únicamente pesar 0.5 g o 0.2 g. Colocar la muestra en un matraz Erlenmeyer.
- Agregar 10 mL de Dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) 1N y agite suavemente
- Agregar 20 mL de Ácido sulfúrico concentrado, dejando resbalar el ácido por las paredes y mezclar. Agitar un minuto y dejar reposar 10.
- Agregar 100 mL de agua destilada a cada matraz y posteriormente 10 mL de ácido fosfórico, dejar enfriar y añadir tres gotas de indicador de Difenilamina.
- Titular con Sulfato ferroso 0.5N.

Cálculos:

$$\% \text{ M.O.} = 10(1-M/B) \times 1.34$$

M = mL de sulfato ferroso gastados en la titulación

B = mL de sulfato ferroso gastados en el blanco

## ANEXO 2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

### Dilución de suspensión de suelo, inoculación, recuento en placa y aislamiento de cepas

El aislamiento y purificación de las cepas se realizó mediante la técnica de diluciones múltiples y se inoculó en medio selectivo Nfb.

- Para la dilución de la muestra se preparan 500 mL de solución salina al 7%, verter 9 mL de esta solución en varios tubos de ensaye con tapa y esterilizar.
- De las muestras colectadas en campo pesar 1 g de suelo y hacer seis diluciones sucesivas en los tubos con solución salina previamente esterilizados con una pipeta estéril de un mL 1/10 tomar un mL de la disolución, y verter en un tubo que contenga 9 mL de solución salina, este procedimiento se realiza hasta llegar a la dilución 6. Repetir el mismo procedimiento con todas las muestras. En la figura 3 se muestra el procedimiento.
- El medio de cultivo selectivo (Nfb) el cual tiene como característica la ausencia de nitrógeno, es utilizado principalmente como medio líquido, de acuerdo al fin del proyecto se modificará a un medio sólido a través de la adición de 25 g/L de agar bacteriológico, antes de calentar el medio se ajusta el pH a 7 con hidróxido de potasio.

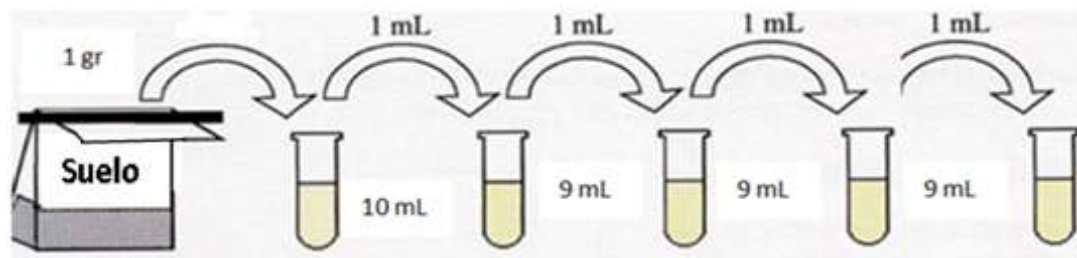


Figura 24 Diagrama de diluciones

- En las cajas petri con medio Nfb se inocula con 0.5 mL de la quinta dilución de cada muestra por el método de vaciado en placa, posteriormente incubar a 35 °C durante seis días. Después del tiempo de incubación contar el número de colonias en un contador de colonias y realizar una descripción morfológica de las poblaciones bacterianas tomando como base el manual escrito por (Morales *et al.*, 2012).
- Inocular las colonias crecientes en medio Nfb por estría en medio AST e incubar a 35 °C por cuatro días. Una vez obtenidos los medios puros realizar un frotis con tinción de Gram con la finalidad de conocer la morfología celular de la bacteria.
- Inocular las cepas aisladas en tubos inclinados con AST.

## Morfología colonial.

### Morfología colonial en placa para bacterias y levaduras

Una vez sembrada la placa la descripción de cada una de las colonias SEPARADAS debe incluir:

**a. Tamaño:** Diámetro en mm, La mayoría de los microorganismos forman colonias de tamaño limitado al tiempo de incubación.

**b. Forma:** Es la apreciación general de su figura la cual puede ser:



**c.- Elevación:** Que puede ser:



**d. Borde:** Se refiere al contorno de las colonias y puede ser: Entero, ondulado, Lobulado, crenado, filamentoso o rizado.



**e. Color:** Blanco, amarillo, negro, marrón, anaranjado, etc.

**f. Aspecto:** Húmedo o seco

**g. Consistencia:** Suave (butirosa), viscosa, membranosa o dura. Esta prueba se realiza con el asa.

### Morfología colonial en placa para mohos:

**Tiempo de crecimiento:** Los mohos filamentosos, tienen colonias de 2-3 cm de diámetro y va de 3 a 5 días.

**Aspecto:** puede ser: aterciopelado, pulverulento, velloso y algodonoso.

**Pigmentación:** Al reverso de la colonia se observa el pigmento del micelio y puede ser de color olivo, verde claro, grises, blancas, rojas, amarillas.

### Medio libre de nitrógeno (Nfb)

Composición del medio Nfb (pH final 5.5)	g L <sup>-1</sup>
Ácido málico	3
glucosa	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (sol.10%)	5 mL
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O (sol.10%)	2 mL
NaCl	0.1
CaCl <sub>2</sub>	0.025
solución de micronutrientes (Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O: 0.2 g L <sup>-1</sup> ; MnSO <sub>4</sub> : 0.235 g L <sup>-1</sup> ; H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> : 0.28 g L <sup>-1</sup> ; CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O: 0.008 g L <sup>-1</sup> ; ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O: 0.024 g L <sup>-1</sup> )	1 mL
EDTA-Fe (sol 1.64%)	4 mL
solución de vitaminas (biotina: 0.1 g L <sup>-1</sup> ; piridoxal-HCl: g L <sup>-1</sup> )	2 mL
Agar bacteriológico	15
KOH	Agregar perlas hasta obtener el pH indicado

### Medio líquido Rojo de Fenol con distintas fuentes de carbono (Manitol, Rhamnosa, Glucosa) y su fermentación.

Este medio permite determinar la capacidad de un microorganismo de degradar un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico con o sin producción de gas y de ácido sulfhídrico H<sub>2</sub>S (Williams & Wilkins, 1990).

Composición del medio	g L <sup>-1</sup>
pH final 7,4	
Peptona de caseína	15
Peptona de carne	5
Extracto de levadura	3
NaCl	5
Lactosa*	10
Sacarosa*	10
Glucosa*	1
Citrato férrico y amonio	0,3
Tiosulfato de sodio	0,3
Rojo fenol	0.024
Agar	12

\*Solo se utiliza una azúcar por medio

### Medio agar Rojo Congo

El medio Rojo Congo es utilizado como selectivo para el género *Azospirillum*, donde las colonias crecientes de este género presentan una coloración rojo escarlata los componentes son (Vital *et al.*, 2015).

Composición del medio	g L <sup>-1</sup>
Ácido málico	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
NaCl	0.1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
Extracto de Levadura	0.4
KOH	2.4
Agar	15
Colorante Rojo Congo (5 µg/mL)	2 mL

## Prueba de catalasa

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva (Williams & Wilkins, 1990).

- 1.- Colocar una gota de agua oxigenada sobre un portaobjetos con ayuda de una pipeta Pasteur.
- 2.- Suspender la bacteria
- 3.- Detectar la formación de burbujas

## Prueba de oxidasa

Determina la presencia del citocromo C. El citocromo C oxida al NNN'N', tetrametil, 1-4, fenilendiamina (solución acuosa al 1% p/v. La oxidación se detecta como color azul (Williams & Wilkins, 1990).

- 1.- Poner un trozo de papel de filtro sobre una tapa de una placa de Petri.
- 2.- Añadir una gota del reactivo NNN'N', tetrametil, 1-4, fenilendiamina (solución acuosa al 1% (p/v).
- 3.- Depositar, sobre el reactivo, masa bacteriana (actuar de forma rápida y con un asa de platino nueva o con un palillo de dientes)
- 4.- La reacción positiva indica un color azul-violeta intenso antes de 10 segundos



## Medio MIO (Movilidad, Indol y Ornitina)

Este medio como su nombre lo indica sirve para observar la movilidad, la producción de indol y descarboxilación de la ornitina. La movilidad se detectará por la presencia de turbidez alrededor del punto de inoculación. El indol se formará si la bacteria tiene la capacidad de producir la enzima triptofanasa que desdoblará el aminoácido triptófano en indol, ácido pirúvico y amonio. El indol es incoloro pero al reaccionar con el reactivo de Kovacs (p-dimetilaminobenzaldehído) que se adiciona después de que creció la bacteria, dará un color rojo violeta. Por lo que respecta a la descarboxilación de la ornitina como el medio tiene púrpura de bromocresol y una pequeña cantidad de glucosa cuando esta se fermenta se produce un color amarillo en el fondo (ornitinadescarboxilasa negativa), sin embargo, al descarboxilarse la ornitina se produce putresina, la cual, es alcalina y sobrepasa la acidez dada por la fermentación de la glucosa resultando en un color morado en el fondo.

## Tabla de correlación

	Altitud	Exposición	Temperatura		Pendiente	pH	Humedad	MOS	Conductividad	Humedad	Nitrógeno	COS	Relación	Arena	Limo	Arcilla	UFC	Numero de	
			Ambiental	Suelo		1: 2	relativa		eléctrica	del Suelo	total		C-N					Morfoespecies	
Altitud	1																		
Exposición	0	1																	
Temperatura Ambiental	-0.98019	0	1																
Temperatura del Suelo	<.0001	1	0.9236	1															
Pendiente	-0.97384	0	<.0001	0.92745	1														
pH	-0.98306	0	<.0001	<.0001	<.0001	1													
Humedad relativa	-0.50485	0.0428	0.59714	0.51847	0.3758	<.0001	1												
Vegetación	0.99842	0	<.0001	-0.97689	-0.98283	-0.97138	<.0001	1											
MOS	-0.94567	0.11868	0.88306	0.95254	0.93345	0.3614	-0.94513												
Conductividad eléctrica	<.0001	0.3208	<.0001	<.0001	<.0001	0.0018	<.0001												
Humedad del Suelo	0.22648	-0.28605	-0.27271	-0.2686	-0.12491	-0.65998	0.25342	1											
Nitrógeno	0.0594	0.0164	0.0224	0.0246	0.3029	<.0001	0.0343												
COS	-0.25014	0.26996	0.19256	0.30579	0.22348	0.11138	-0.25904	-0.19224	1										
Relación C-N	0.0341	0.0218	0.1051	0.009	0.0591	0.3516	0.028	0.1109											
Arena	0.85262	-0.07131	-0.84439	-0.83224	-0.82576	-0.52779	0.8542	0.28794	-0.22111	1									
Limo	<.0001	0.5818	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0257	0.0842										
Arcilla	-0.48741	-0.14998	0.49293	0.4735	0.46699	0.31356	-0.48954	-0.18191	0.11107	-0.45756	1								
UFC	<.0001	0.2119	<.0001	<.0001	<.0001	0.0078	<.0001	0.05347	0.3564	0.0002									
Msp	0.22576	-0.28777	-0.2719	-0.26793	-0.12427	-0.65948	0.25269	0.99988	-0.19174	0.2874	0.2874	-0.17907	1						
	0.0602	0.0157	0.0228	0.0249	0.3054	<.0001	0.0348	<.0001	0.1118	0.026	0.141	0.026							
	0.34136	-0.25014	-0.37964	-0.37412	-0.24984	-0.65491	0.36471	0.87813	-0.21635	0.37334	-0.48	0.87683	1						
	0.0041	0.0382	0.0013	0.0015	0.0384	<.0001	0.0021	<.0001	0.0742	0.0033	<.0001	<.0001							
	-0.04304	-0.1894	0.0519	0.0583	0.01551	0.11204	-0.05062	-0.00785	-0.40207	0.08815	-0.01743	-0.0076	0.05812	1					
	0.7196	0.1111	0.665	0.6267	0.8971	0.3488	0.6728	0.9486	0.0005	0.4957	0.8853	0.9502	0.6352						
	0.04463	0.15041	-0.0399	-0.06242	-0.02623	-0.06255	0.05008	-0.02576	0.35229	-0.08651	-0.00924	-0.02625	-0.08521	-0.97377	1				
	0.7097	0.2073	0.7393	0.6025	0.8269	0.6017	0.6761	0.8324	0.0024	0.5038	0.939	0.8292	0.4863	<.0001					
	0.02753	0.19479	-0.09385	-0.01244	0.01627	-0.26028	0.03739	0.14898	0.31198	0.00152	0.1015	0.14978	0.11082	-0.31793	0.09455	1			
	0.8184	0.1011	0.4329	0.9174	0.8921	0.0272	0.7552	0.2184	0.0076	0.9906	0.3996	0.2159	0.3647	0.0065	0.4295				
	-0.4316	-0.23113	0.49835	0.33861	0.44826	0.35022	-0.57859	-0.22327	0.16247	-0.4462	0.5058	-0.22244	-0.26791	-0.01215	0.01484	-0.01507	1		
	0.0002	0.0508	<.0001	0.0036	<.0001	0.0026	<.0001	0.0632	0.1727	0.0003	<.0001	0.0642	0.026	0.9193	0.9015	0.9			
	-0.46132	-0.04186	0.53586	0.35187	0.48745	0.35516	-0.63999	-0.15069	-0.07114	-0.41153	0.40517	-0.15167	-0.26551	0.11919	-0.1304	0.01005	0.59024	1	
	<.0001	0.727	<.0001	0.0024	<.0001	0.0022	<.0001	0.2131	0.5526	0.0009	0.0005	0.2101	0.0275	0.3187	0.2749	0.9332	<.0001		

