



Microbiología

Beneficios y consecuencias ambientales del empleo de inoculantes microbianos en la agricultura

GRAGEDA CABRERA, O. A.
GONZÁLEZ FIGUEROA, S. S.
CAMPO EXPERIMENTAL BAJÍO

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales,
Agrícolas y Pecuarias

VERA NÚÑEZ, J. A.

PEÑA CABRIALES, J. J.

Centro de Investigación y
de Estudios Avanzados

Instituto Politécnico Nacional

Correo-e: grageda.oscar@inifap.gob.mx

RESUMEN

La tecnología relativamente simple de la biofertilización se practica desde hace siglos y, en la mayoría de los casos, se reportan respuestas positivas sobre el rendimiento. Sin embargo, en México resulta preocupante que no ha sido suficientemente difundida y gran parte de los productores la desconoce. Por tanto, se requiere una mayor vinculación entre la industria y los científicos, con el fin de colaborar en mejorar los sistemas de producción y calidad de los biofertilizantes. Además, es indispensable contar con asesoría, orientación y capacitación sobre su uso para los productores agrícolas.

Palabras clave: bacterias, fertilizantes, hongos inoculantes.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la tasa de crecimiento de la producción agrícola ha disminuido. Aunque, existen tres fuentes principales de crecimiento en la

producción de cultivos: 1) aumento de la superficie cultivada, 2) incremento de la frecuencia de las cosechas y 3) aumento de los rendimientos. Hay indicios de que se está llegando al límite de las posibilidades para las tres fuentes (FAO, 2002).

Entre los años de 1970 a 1990, la tierra de cultivo en el mundo sólo creció el 11 por ciento, mientras que la población mundial casi se duplicó. Como resultado, la tierra de cultivo *per cápita* disminuyó el 40 por ciento, pasando de 0.43 a sólo 0.26 ha (FAO, 2002; Banco Mundial, 2012). No obstante, a lo largo de este mismo período, los niveles de nutrición mejoraron considerablemente y disminuyó el precio de los alimentos. La explicación es que, el crecimiento de la productividad redujo la cantidad de tierra necesaria para producir la misma cantidad de alimentos, en un 56 por ciento. Esta reducción, facilitada por el aumento del rendimiento e intensidad de cultivos, compensó sobradamente la disminución de superficie *per cápita*.

En las últimas décadas se ha tomado conciencia del agotamiento de los recursos naturales, debido a la explotación desmesurada de los mismos. En el ámbito agrícola, el objetivo es lograr altos rendimientos por unidad de superficie, para satisfacer la creciente demanda de alimentos, sin considerar la sostenibilidad de la producción (viabilidad técnica, rentabilidad económica y sin contaminación) (Goddard *et al.*, 2008). Los éxitos de esta estrategia han sido importantes, pero es una agricultura muy ineficiente y altamente contaminante, la cual ha ocasionado la pérdida de la diversidad biológica, disminución de los recursos forestales, erosión del suelo, cambios climáticos, etc. Esta situación ha disminuido la superficie apropiada para la agricultura, causando graves problemas ecológicos, económicos y sociales. Por tal motivo, es necesario encontrar soluciones de



producción adecuadas. Las nuevas tecnologías deben estar orientadas a mantener la sostenibilidad del sistema, mediante la explotación racional de los recursos naturales y aplicación de medidas adecuadas para preservar el ambiente.

Uno de los requerimientos más importantes es el mantenimiento de la fertilidad del suelo. Tradicionalmente, la deficiencia de nutrientes, especialmente la de N, es corregida a través de la adición de fertilizantes. Sin embargo, los altos costos limitan su uso, sobre todo en los países en desarrollo, donde la necesidad de incrementar la producción de alimentos es más urgente. Por otro lado, se estima que los cultivos sólo absorben entre un 20 a 40 por ciento del fertilizante aplicado, el resto se pierde por diversos mecanismos, generando cuantiosas pérdidas económicas y contaminación ambiental, tal como la eutrofización de cuerpos de agua, lluvia ácida, destrucción de la capa de ozono estratosférica e incremento del efecto de invernadero (Duxbury, 1994; FAO, 2008).

La agricultura mexicana

En México, la agricultura se practica en 2.19×10^7 ha (SAGARPA, 2010). La agricultura del pasado se caracterizó por usar una tecnología empírica y poco productiva. La del presente se sigue sustentando en los principios de hace más de 50 años y se caracteriza por el uso de dos tecnologías: 1) La tradicional, empleada desde el pasado en las áreas de temporal y 2) una tecnología intensiva, cara y derrochadora de energía (Gabino de Alba, 2010). El resultado directo es que los precios de los productos agrícolas no son competitivos con los de otros países.

El consumo de fertilizantes sintéticos data desde 1950 y ha crecido ininterrumpidamente hasta llegar al consumo actual de 4.0×10^6 Mg a⁻¹. Prácticamente, el 80 por ciento de la superficie agrícola se fertiliza en diversas dosificaciones, dependiendo de la capacidad económica del productor. En la mayoría de los casos, se aplican sin el rigor técnico requerido, lo que se ha reflejado en que muchos productores apliquen cantidades desmesuradas de fertilizantes. La baja rentabilidad de la actividad agrícola impulsa la investigación para

desarrollar nuevos insumos, con el fin de proveer innovaciones tecnológicas que tiendan a maximizar el ingreso. Bajo estas condiciones, se presenta la alternativa de utilizar tecnologías compatibles con la actividad microbiológica para favorecer la nutrición de las plantas (Bowen y Rovira, 1999; Pooja *et al.*, 2007).

Microbiología y agricultura

La importancia que tienen los microorganismos en la naturaleza y en sus relaciones con el hombre es cada día más evidente. Cuando la agricultura tiene la necesidad de adoptar medidas conservacionistas, los microorganismos tienen un papel sustancial. El desarrollo y uso de los biofertilizantes se contempla como una importante alternativa para la sustitución parcial o total de los fertilizantes minerales.

Los beneficios que presenta el uso de microorganismos en la agricultura pueden concretarse de la manera siguiente: 1) Fitoestimulantes, que estimulan la germinación de las semillas y el enraizamiento, por la producción de reguladores del crecimiento, vitaminas y otras sustancias; 2) Biofertilizantes, que incrementan el suministro de los nutrientes por su acción sobre los ciclos biogeoquímicos, tales como la fijación de N₂, la solubilización de elementos minerales o la mineralización de compuestos orgánicos; 3) Mejoradores, que mejoran la estructura del suelo por su contribución a la formación de agregados estables; 4) Agentes de control biológico de patógenos, que desarrollan fenómenos de antagonismo microbio–microbio; 5) Bioremediadores, que eliminan productos xenobióticos, tales como pesticidas, herbicidas y fungicidas; 6) Mejoradores ecofisiológicos, que incrementan la resistencia al estrés tanto biótico como abiótico (Bowen y Rovira, 1999).

Los biofertilizantes

La interpretación del término biofertilizante es muy amplia, representa desde microorganismos, abonos verdes y estiércoles, hasta extractos de plantas. De manera sintetizada, podemos decir



que son productos que contienen microorganismos, que al ser inoculados, pueden vivir asociados o en simbiosis con las plantas y le ayudan a su nutrición y protección (Vessey, 2003). Estos microorganismos se encuentran de forma natural en el ambiente y abarcan diversos grupos; sin embargo, su población es afectada por el manejo de suelo y uso excesivo de agroquímicos (Caballero–Mellado *et al.*, 1992; Grageda–Cabrerá *et al.*, 2003).

Aunque no se conocía la existencia de las bacterias, hasta que en 1683 von Leewenhoek las describió, su utilización para estimular el crecimiento de las plantas se remonta siglos atrás. Teofrasto (287 a.C.) y Virgilio (30 a.C.) sugerían mezclar el suelo, donde se habían cultivado leguminosas, con suelo donde no se habían cultivado, para remediar sus defectos y adicionarle fuerza (Tisdale y Nelson, 1975).

A finales del siglo XIX, la práctica de mezclar suelo con semillas, se convirtió en un método recomendado para inocular leguminosas en Estados Unidos. Poco después, Nitragin registró la primer patente para inocular plantas con bacterias del género *Rhizobium* spp. En los años 1930's y 1940's, la inoculación con bacterias rizosféricas asociativas, con cepas de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus*, fue utilizada a gran escala en Rusia y Europa del Este. Sin embargo, estas prácticas no tuvieron éxito y fueron abandonadas durante la Segunda Guerra Mundial (Barea *et al.*, 2005; Bashan, 2008).

Todo apuntaba que el futuro de los biofertilizantes era promisorio en el desarrollo de la agricultura del siglo XX. Sin embargo, la asombrosa industrialización y urbanización que surgió después de 1945, demandó una gran cantidad de materias primas y alimentos. Es aquí donde la demanda de los fertilizantes, que son capaces de generar una rápida respuesta productiva, tuvieron su extensa utilización (Duxbury, 1994). Actualmente, existe una gran variedad de biofertilizantes con diversas funciones y atendiendo al tipo de cultivo. En general, los biofertilizantes más difundidos se componen de hongos micorrícicos y bacterias (Pooja *et al.*, 2007; All–Taweil *et al.*, 2009).

Los medios por los cuales, los biofertilizantes

pueden mejorar el estado nutricional de las plantas son: 1) fijación biológica de N_2 ; 2) producción de reguladores del crecimiento, vitaminas y otras sustancias; 3) incremento en la captación de agua y nutrimentos como P, N, K y Ca; 4) incremento en el volumen de exploración de las raíces; 5) protección contra ciertos microorganismos patógenos; 6) incremento en la tolerancia a los cambios de temperatura y acidez extrema del suelo, causadas por la presencia de Al, Mg y S, y; 7) mejoran la estructura del suelo. Por esto es que los microorganismos tienen un gran potencial en el contexto de la agricultura sostenible (Okon y Kapulnik 1986; Bowen y Rovira, 1999; Alarcón y Ferrara, 2000; Gravel *et al.*, 2007; Lugtenberg y Kamilova, 2009; Osman *et al.*, 2010).

Casos exitosos

En la literatura es común encontrar sólo aquellos reportes exitosos del uso de inoculantes. Por consiguiente, es difícil identificar los factores involucrados con la poca o nula respuesta de los cultivos. La aplicación eficaz de inoculantes a base de *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* (Sessitsch *et al.*, 2002); *Azospirillum* (Caballero–Mellado *et al.*, 1992; Okon y Labandera–González, 1994); *Azotobacter* (Somers *et al.*, 2004), *Pseudomonas* (Gravel *et al.*, 2007), microorganismos solubilizadores de fosfato (Lugtenberg y Kamilova, 2009) y *Trichoderma* (Gravel *et al.*, 2007) para mejorar la nutrición de las plantas y la producción agrícola está bien documentado.

En países como Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay, los biofertilizantes constituyen la base de su producción de leguminosas. Uno de los cultivos más importantes es la soya. Este presenta una alta acumulación de proteínas en la semilla, que la convierte en el cultivo con la mayor demanda de N. Así, se estima que se requieren entre 70 y 80 kg N por Mg de grano. Un rendimiento promedio de 3 Mg ha⁻¹ equivale a una demanda de 240 kg N. La soya puede fijar desde 0 a 450 kg N ha⁻¹ y se puede abastecer hasta un 90 por ciento de los requerimientos de N del cultivo, por medio de los microorganismos. En más de 300 ensayos realizados desde 1990 a 2006



CUADRO 1
NITRÓGENO FIJADO SIMBIÓTICAMENTE POR LEGUMINOSAS EN GUANAJUATO, MÉXICO

Leguminosa	Nitrógeno Fijado Estimado con la Técnica de Dilución Isotópica de ^{15}N $\text{kg ha}^{-1} \text{a}^{-1}$
Haba	323
Chícharo	153
Garbanzo	31
Jícama	75–192
Frijol	33–68
Alfalfa	260
Lenteja	77
Soya	60–80

Fuente: Peña–Cabriales y Grageda–Cabrera, 1997.

en Argentina, inoculando la soya con cepas altamente eficientes, se determinó una respuesta positiva en el incremento del rendimiento en un 11 por ciento de los casos (Agrositio.com 31/08/2009 INTA 23/03/2010).

Castellanos *et al.* (1995), en un análisis retrospectivo de ensayos experimentales de inoculación de frijol, con cepas élite llevados en México, en el período de 1980 a 1995, encontraron éxito sólo en el 11 por ciento de los 47 casos analizados. Los tratamientos inoculados superaron a los testigos sin inocular y sin N. Estos datos indican que la vía de inoculación en nuestro país no ha sido exitosa para incrementar la FBN en frijol. La falla en la inoculación quizás se debe a la gran diversidad de cepas nativas, las cuales predominantemente son cepas inefectivas (Peña–Cabriales y Grageda–Cabrera, 1997).

También se evaluaron los biofertilizantes a base de *Azospirillum brasilense*, *Glomus intraradices* y *Rhizobium etli*, durante los ciclos agrícolas Primavera–Verano y Otoño–Invierno 1999–2000, en 1.9×10^6 ha en prácticamente todo el país. Los resultados mostraron que, cuando se aplicaron biofertilizantes, los rendimientos incrementaron en un 62 por ciento, respecto al testigo absoluto, y en un 30 por ciento con relación a la aplicación de fertilizantes sintéticos (Aguirre–Medina, 2004). Actualmente, se estima que se aplican biofertilizantes en 2.5×10^6 ha.

A través del empleo de técnicas convenciona-

les e isotópicas con ^{15}N , se han encontrado grandes diferencias en cuanto a efectividad de fijar N_2 en diferentes especies de leguminosas y sus microsimbiontes. Estudios realizados en leguminosas cultivadas, en El Bajío Guanajuatense, México, muestran tasas de fijación de N_2 muy contrastantes, desde 31 hasta 552 kg N_2 fijado $\text{ha}^{-1} \text{a}^{-1}$ (Cuadro 1) (Peña–Cabriales y Grageda–Cabrera, 1997).

Diversos estudios han demostrado que, la inoculación de cereales con *Azospirillum* spp promueve el crecimiento de las plantas, observándose un incremento en la emergencia, vigor, biomasa, desarrollo del sistema radical e incremento en el rendimiento, en diferentes proporciones. En México, se han obtenido incrementos en el rendimiento de maíz, entre el 30 al 70 por ciento y, en cebada, del 39 por ciento en comparación con el testigo sin inocular (Aguirre–Medina, 2004). Okon y Labandera–González (1994) citan resultados favorables en el rendimiento, en el 70 por ciento de los resultados de investigación realizados de 1974 a 1994 en Latinoamérica. Por su parte, Dobbelaere *et al.* (2001), reporta efectos positivos de la inoculación del 62 al 95 por ciento de los casos.

Por otro lado, varios estudios indican que la inoculación de cereales con BPCV y/o micorrizas permite reducir la dosis de aplicación de fertilizantes N, P y K, sin que disminuya el rendimiento del cultivo. Hay reportes de que la principal



tasa de retorno económico es cuando se fertiliza con el 75 por ciento de la dosis recomendada (Okon y Labandera-González, 1994; El-Sirafy et al., 2006; Bashan, 2008).

Factores que afectan la simbiosis

La eficiencia de la simbiosis depende de los microorganismos, la planta hospedera y las condiciones ambientales (Okon y Kapulnik, 1986; Hardarson, 1993; Kiely et al., 2006). Entre los factores agronómicos y ambientales que afectan la efectividad de la biofertilización, se incluyen la temperatura, humedad, acidez y otros componentes químicos del suelo, tales como el contenido de N, P, Ca, S, Mg, Mo, Fe y Co. Estos pueden disminuir rápidamente la población de cualquier especie microbiana introducida (Abbott y Robson, 1991; Bowen y Rovira, 1999). Generalmente, la fertilización inhibe o disminuye la efectividad de la relación planta-microorganismo.

Uno de los factores que limita la FBN es la presencia de formas combinadas de N en el suelo. Los suelos fértiles con disponibilidad de formas inorgánicas de N afectan el establecimiento de la simbiosis, ya que retardan el inicio de la nodulación e inhiben el funcionamiento del sistema fijador. Para la planta es más fácil tomar N del suelo y/o del fertilizante, que a través de la FBN (Read, 1998).

Perspectivas

El uso a gran escala de los biofertilizantes, en cualquier sistema de producción agrícola, traería grandes beneficios sin ejercer un impacto perjudicial sobre el ambiente. Sin embargo, resulta preocupante que en México, la tecnología relativamente simple de la biofertilización, no ha sido transferida a la mayoría de los productores.

A corto y mediano plazo, la investigación deberá enfocarse en el desarrollo de inoculantes de mejor calidad y más económicos (Díaz-Franco y Mayek-Pérez, 2008). En términos generales, se puede decir que los biofertilizantes tienen un costo para el productor de sólo el 10 por ciento con respecto a la fertilización química, y en la

mayoría de los casos, no debe representar más del 2 al 3 por ciento del costo de producción del cultivo. Además, es necesario desarrollar “tecnologías de punta” *in situ*, con las condiciones locales, ya que las desarrolladas en otros países y aplicadas al nuestro, son la principal causa de la crisis económica y ecológica que agobia a la agricultura mexicana del presente.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, L.K. and Robson, A.D. 1991. Factors influencing the occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizas. *Agric. Ecosystems Environ.* 35: 121–150.
- Agrositio.com. 31/08/2009 INTA 23/03/2010.
- Aguirre-Medina, J.F. 2004. Biofertilizantes microbianos: antecedentes del programa y resultados de validación en México. Simposio de biofertilización “La biofertilización como tecnología sostenible”. Memoria.
- Alarcón, A. y Ferrara, R. 2000. Biofertilizantes: Importancia y utilización en la agricultura. *Agr. Téc. Méx.* 26: 191–203.
- All-Taweil, H.I., Osman, M.B., Hamid A.A., and Yusoff, W.M.W. 2009. Development of microbial inoculants and the impact of soil application on rice seedlings growth. *Am. J. Agric. Biol. Sc.* 4: 79–82.
- Banco Mundial. 2012. Tierras destinadas al cultivo de manera permanente (% del área de tierra). url: <http://go.worldbank.org/EE3AUV8Y50>
- Barea, J.M., Pozo, M.J, Azcon, R. and Azcon-Aguilar, C. 2005. Microbial cooperation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56: 1761–1778.
- Bashan, Y. 2008. El uso de inoculantes microbianos como una importante contribución al futuro de la agricultura mexicana. In: Díaz-Franco A. y Mayek-Pérez, N. (Eds.). *La biofertilización como tecnología sostenible*. Plaza y Valdéz. México. 17–24 pp.
- Bowen, G.D. and Rovira, A.D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 66: 1–102.
- Caballero-Mellado, J., Carcaño-Montiel, M.G, Mascarua-Esparza, M.A. 1992. Field Inoculation



- of Wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. *Symbiosis*. 13: 243–253.
- Castellanos, R.J.Z., Peña–Cabriales, J.J. y Rojas–Martínez, I. 1995. Análisis retrospectivo del uso de inoculantes con cepas élite en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. *Turrialba*. 45: 89–99.
- Díaz–Franco, A. y Mayek–Pérez, N. 2008. La biofertilización como tecnología sostenible. Plaza y Valdés. México. 260 p.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera–González, C., Caballero–Mellado, J., Aguirre, J. F., Kapulnik, Y., Brener, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sang, S., and Okón, J. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 871–879.
- Duxbury, J.M. 1994. The significance of agricultural sources of greenhouse gases. *Fert. Res.* 38: 151–163.
- El–Sirafy, Z.M., Woodard, H.J., and El–Norjar, E.M. 2006. Contribution of biofertilizers and fertilizer nitrogen to nutrient uptake and yield of Egyptian winter wheat. *J. Plant Nutr.* 29: 587–599.
- FAO. 2002. Informe sobre agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. 241 p.
- FAO. 2008. Tendencias y perspectivas mundiales de los fertilizantes hasta 2011/2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. 171 p.
- Gabino de Alba. 2010. El Presente y el futuro de la Agricultura en México. URL: <http://www.itesm.mx/>.
- Goddard, T., Zoebisch, M., Gan, Y., Ellis, W., Watson, A., and Sombatpanit, S. 2008. No–till farming systems. Special Publication No. 3. WASWC. Bangkok. 544 p.
- Grageda–Cabrera, O.A., Mora, M., Castellanos, R.J.Z., Follet, R.F., and Peña–Cabriales, J.J. 2003. Fertilizer nitrogen recovery under different tillage treatments and cropping sequences in a vertisol in central México. *IAEA–TECDOC*. 1354: 39–55.
- Gravel, V., Antoun, H., and Tweddell, R.J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* 39: 1968–1977.
- Hardarson, G. 1993. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant and Soil* 152: 1–17.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. 2009. Plant–Growth–Promoting rhizobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 63: 541–556.
- Okon, Y. and Kapulnik, Y. 1986. Development and function of *Azospirillum*–inoculated roots. *Plant Soil*. 90: 3–16.
- Okon, Y. and Labandera–González, C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum* evaluation of 20 years world wide field inoculation. *Soil Biology*. 26: 1591–1601.
- Osman, M.B., Abdulhamid, A., Mohammad, N., and Wan, M.W.Y. 2010. Comparison of different delivery system of *Trichoderma* and *Bacillus* as biofertilizer. *Adv. Environ. Biol.* 4: 31–33.
- Peña–Cabriales, J.J. y Grageda–Cabrera, O.A. 1997. Dinámica del nitrógeno en el ecosistema agrícola. 345–366 pp. In: Ruíz–Herrera, J. (Ed.). *La Microbiología en México*. IPN. México. 371pp.
- Pooja, S., Dudeja, S., and Neeru, N. 2007. Development of multiple co–inoculants of different biofertilizers and their interaction with plants. *Archives of Agron. Soil Sci.* 53: 221–230.
- Read, D. 1998. Plants on the web. *Nature*. 396: 22–23.
- SAGARPA. 2010, <http://www.siap.gob.mx>.
- Sessitsch, A., Howieson, J.G., Perret, X., Antoun, H., Martínez–Romero, E. 2002. Advances in *Rhizobium* research. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 323–378.
- Somers, E., Vanderleyden, J., and Srinivasan, M. 2004. Rhizosphere bacterial signaling: A love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 30: 205–240.
- Tisdale, S.L. and Nelson, W.L. 1975. *Soil Fertility and Fertilizers*. 3rd Ed. Macmillan Pub. New York, USA. 694 pp.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571–586.



Contribución de los microorganismos del suelo en la degradación de compuestos orgánicos

ALARCÓN, A.

FERRERA-CERRATO, R.

Área de Microbiología

Postgrado del Edafología

Colegio de Postgraduados

Correo-e: aalarconcp@gmail.com

RESUMEN

Los microorganismos del suelo tienen un papel trascendental en el reciclaje y disponibilidad de los nutrientes, así como en la adaptación, crecimiento y productividad de las plantas cultivadas. Además de esta significativa función biológica los microorganismos tienen también la capacidad de mediar transformaciones de compuestos orgánicos de alta complejidad química estructural como la lignina y la celulosa, cualidad que los hace importantes para mineralizar estos compuestos. Con base en lo anterior, ciertos microorganismos del suelo poseen cierta actividad fisiológica para transformar e incluso mineralizar completamente compuestos orgánicos contaminantes que son depositados en el suelo. El presente trabajo mostrara como parte del simposio Microbiología edáfica, el beneficio de algunos grupos microbianos que tienen repercusiones en la actividad agrícola, en relación a la adaptación de las plantas y en su capacidad para degradar compuestos orgánicos contaminantes como petróleo crudo, diesel, hidrocarburos policíclicos aromáticos, y tolerar algunos plaguicidas. Lo anterior con base en las experiencias de investigación que se han llevado a cabo en el Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados.

Palabras clave: hongos filamentosos, bacterias simbióticas, hongos simbiontes, hidrocarburos del petróleo.

TRICHODERMA Y SU RELACIÓN CON LOS HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

El género fúngico *Trichoderma* es más bien conocido por poseer habilidades antagónicas y micoparasíticas hacia otros hongos que causan enfermedades en las plantas (Ibarra-Medina *et al.*, 2010). No obstante, las especies que conforman este género fúngico también tienen características fisiológicas que los hace atractivos para su uso en sistemas de biorremediación e incluso fitorremediación, al tolerar contaminantes, acumular metales o bien, degradar compuestos orgánicos contaminantes (Argumedo-Delira *et al.*, 2009). Con base en las cepas de *Trichoderma* existentes en el cepario del Área de Microbiología, se realizó una serie de ensayos de tolerancia y crecimiento ante petróleo crudo y ante altas concentraciones de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) como naftaleno (dos anillos aromáticos), fenantreno (tres anillos aromáticos), y benzo[a]pireno (cinco anillos aromáticos) con el fin de seleccionar aquellas cepas más prominentes. No todas las cepas de *Trichoderma* fueron capaces de tolerar concentraciones altas de estos contaminantes pero algunas presentaron buen crecimiento (Argumedo-Delira *et al.*, 2012), lo cual fue determinante para realizar ensayos de degradación de los tres HPA mencionados en cultivos con medio mineral mínimo. Así, las cepas *T. virens* (CP1) y *T. viride* (CP4) fueron capaces de degradar en buena proporción los tres HPA, mostrando también la sobreexpresión del complejo citocromo P-450 mono-oxigenasa en presencia de cada HPA (Argumedo-Delira, 2011; Argumedo-Delira *et al.*, datos no publicados).



LOS HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ANTE HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son biotrofos obligados de un sistema radical vivo, que forman simbiosis con más del 80 por ciento de las plantas terrestres conocidas. Estos HMA son importante desde el punto de vista agronómico ya que permiten la adaptación de las plantas ante condiciones edáficas adversas, y estimulan el crecimiento y la nutrición de las diversas plantas de importancia agrícola, frutícola y forestal (Alarcón *et al.*, 2007; Alarcón *et al.*, 2012). En lo que respecta a sus aplicaciones potenciales en materia ambiental, particularmente en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, estos HMA se pueden encontrar presentes en la rizosfera de plantas establecidas en suelos con problemas de derrames crónicos de petróleo (Franco-Ramírez *et al.*, 2009). Además, se han llevado a cabo ensayos *in vitro* para determinar la capacidad de germinación de esporas de diferentes especies de HMA en presencia de HPA y fracciones volátiles de petróleo crudo, encontrándose que los compuestos volátiles del petróleo presentan menor inhibición de la germinación de las esporas en comparación con los HPA aplicados en dosis de hasta $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Alarcón *et al.*, 2006; Franco-Ramírez *et al.*, 2009). De manera más importante, los HMA tienen la capacidad de estimular la degradación de hidrocarburos totales del petróleo o de diesel cuando son inoculados en plantas como *Lolium multiflorum* o *Melilotus albus* (Alarcón *et al.*, 2008; Hernández-Ortega *et al.*, 2012).

RHIZOBIUM: TOLERANCIA Y CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Las bacterias del género *Rhizobium* forman simbiosis con el sistema radical de plantas leguminosas (Fabaceae), donde estructuras llamadas nódulos donde se lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno atmosférico (N_2). Esta simbiosis es trascendental porque reincorpora el N_2 a formas asimilables (NH_4^+), para hacerlo aprovechable

para las plantas y así, satisfacer sus requerimientos metabólicos que derivan en su mejor crecimiento y producción (Martínez-Romero *et al.*, 1991). Esta simbiosis también tiene importancia ambiental ya que es tolerante a diferentes contaminantes inorgánicos u orgánicos. Por ejemplo, a pesar de que la formación de nódulos es afectada por la presencia de HPA como naftaleno, fenantreno o benzo[a]pireno, esta simbiosis presenta buena tolerancia a estos contaminantes (González-Paredes *et al.*, 2007; López-Ortiz *et al.*, 2012), aun cuando la mayoría de los nódulos formados tienen poca acumulación de leghemoglobina (Villegas-Velázquez, 2011).

En vida libre, *Rhizobium tropici* CIAT899 tolera concentraciones de fenantreno y benzo[a]pireno de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $60 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, mostrando buena acumulación de proteína bacteriana y a la vez, mostrando correlación con la degradación de estos dos HPA a partir de las 24 h, y llegando a tener una degradación del 45 por ciento de benzo[a]pireno y de 50 por ciento de fenantreno a las 120 h de crecimiento en medio líquido mínimo (González-Paredes *et al.*, 2012). De manera similar, *Rhizobium tropici* CIAT899 contribuye a degradar fenantreno de manera significativa cuando es inculada en raíces de *Leucaena leucocephala*, en comparación con la sola fertilización nitrogenada en esta planta arbórea (López-Ortiz *et al.*, 2012).

HONGOS FILAMENTOSOS DEL SUELO Y SU CAPACIDAD DE TOLERAR PLAGUICIDAS

Actualmente, las investigaciones en relación a la capacidad de degradación de plaguicidas por microorganismos, están siendo dirigidas al uso de diversos hongos filamentosos aislados de suelo y residuos de paja de trigo. Los hongos que ha sido aislados (*Acremonium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Cunninghammella*, entre otros) han presentado buena tolerancia y crecimiento ante concentraciones altas de endosulfán (insecticida organoclorado altamente recalcitrante) de hasta $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Lo anterior a he permitido seleccionar hongos prominentes para evaluar su capacidad de



producción de biomasa y proteína fúngica ante endosulfán, clorpirifos (insecticida organofosforado), y clorotalonil (fungicida), así como de evaluar su contribución en la degradación de estos plaguicidas comparándolo con aquellas especies fúngicas con actividades enzimáticas ligninolíticas como *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* (Stamatiu–Sanchez *et al.*, datos no publicados).

PERSPECTIVAS

La aplicación de estos grupos microbianos descritos brevemente en este resumen, no solo debe ser dirigida a los aspectos agrícolas, ya que se ha demostrado que su función también puede ser significativa en aspectos de descontaminación y limpieza de suelos contaminados con compuestos orgánicos. En lo futuro, se requiere mayor investigación acerca de su contribución en la biorremediación y fitorremediación de suelos contaminados en combinación con otros procesos de bioestimulación o bioaumentación. Además, se necesita evaluar las interacciones que se establecen entre estos grupos microbianos cuando son inoculados de manera conjunta, y sus repercusiones en la recuperación paulatina de la calidad biológica y de la fertilidad del suelo sujeto a procesos de descontaminación.

BIBLIOGRAFÍA

Alarcón A., J. Delgadillo–Martínez, A. Franco–Ramírez, F.T. Davies Jr., and R. Ferrera–Cerrato. 2006. Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and phytoremediation potencial of *Gigaspora margarita*–*Echinochloa polystachya* symbiosis in benzo(a)pyrene–polluted substrate. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 22:39–47.

Alarcón, A., R. Ferrera–Cerrato and J. Pérez–Moreno. 2007. Mycorrhizae in tropical agriculture. Pp. 197–238. In: C. Hamel and C. Plenchette (Eds.). *Mycorrhizae in crop production*. The Haworth Press. New York. 366 p.

Alarcón, A., F.T. Davies Jr., R.L. Autenrieth, and D.A. Zuberer. 2008. Arbuscular mycorrhiza

and petroleum–degrading microorganisms enhanced phytoremediation of petroleum–contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation* 10:251–263.

Alarcón, A., L.V. Hernández–Cuevas, R. Ferrera–Cerrato and A. Franco–Ramírez. 2012. Diversity and agricultural applications of arbuscular mycorrhizal fungi in Mexico. *Journal of Biofertilizers & Biopesticides* 3:1–10.

Argumedo–Delira, R. 2011. Respuesta fisiológica de miembros del género *Trichoderma* a hidrocarburos poliaromáticos. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Argumedo–Delira, R., A. Alarcón, R. Ferrera–Cerrato y J.J. Peña–Cabriales. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 25:257–269.

Argumedo–Delira, R., A. Alarcón, R. Ferrera–Cerrato, J.J. Peña–Cabriales and J.J. Almaraz. 2012. Tolerance and growth of eleven *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo[a]pyrene. *Journal of Environmental Management (Special Issue)* 95:S291–S299.

Franco–Ramírez, A., R. Ferrera–Cerrato, L. Varela–Fregoso, J. Pérez–Moreno, and A. Alarcón. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi in chronically petroleum–contaminated soils in Mexico and the effects of petroleum hydrocarbons on spore germination. *Journal of Basic Microbiology* 47:378–383.

González–Paredes, Y., R. Ferrera–Cerrato and A. Alarcón. 2007. Effect of three polycyclic aromatic hydrocarbons on nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium tropici*. Annual Meeting Canadian Society of Soil Science. June 3–7, 2007. Quebec, Canada.

González–Paredes, Y., A. Alarcón, R. Ferrera–Cerrato, J.J. Almaraz, E. Martínez–Romero, J.S. Cruz–Sánchez, M.R. Mendoza–López, and E. Ormeño–Orrillo. 2012. Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzo[a]pyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture medium. *Applied Soil Ecology*. In press.

Hernández–Ortega, H.A., A. Alarcón, R. Ferrera–



- Cerrato, H.A. Zavaleta–Mancera, H.A. López–Delgado, and M.R. Mendoza–López. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel–contaminated substrate. *Journal of Environmental Management (Special Issue)* 95:S319–S324.
- Ibarra–Medina, V.A., R. Ferrera–Cerrato, A. Alarcón, M.E. Lara–Hernandez y J.M. Valdes–Carrasco. 2010. Isolation and screening of *Trichoderma* strains antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. *Revista Mexicana de Micología* 31:53–63.
- López–Ortiz, C., R. Ferrera–Cerrato, A. Alarcón, J.J. Almaraz, E. Martínez–Romero, y M.R. Mendoza–López. 2012. Establecimiento y respuestas fisiológicas de la simbiosis *Rhizobium tropici*–*Leucaena leucocephala* en presencia de fenantreno y naftaleno. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 28 (4): En prensa.
- Martínez–Romero, E., Segovia, L., Martins, M.F., Franco, A.A., Graham, P. and 1991. Pardo, M., *Rhizobium tropici* a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *leucaena* sp. trees. *Internatinal Journal of Systematics and Bacteriology* 41:417–426.
- Villegas–Velázquez, I. 2011. Respuestas de *Leucaena leucocephala* en simbiosis con *Rhizobium* y/o micorriza en diferentes etapas de desarrollo durante la fitorremediación de fenantreno. Tesis de Maestría en Ciencias. Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad–Fisiología Vegetal. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.



Técnicas moleculares de vanguardia en el estudio de la diversidad microbiana edáfica

DE LOS SANTOS–VILLALOBOS, S.

PEÑA–CABRIALES, J. J.

Departamento de Biotecnología y Bioquímica

Centro de Investigación y

de Estudios Avanzados

Instituto Politécnico Nacional

RESUMEN

El suelo es un hábitat heterogéneo y complejo, en el cual los microorganismos juegan un papel determinante en su funcionamiento, mediante el ciclaje de nutrientes esenciales para el mantenimiento de su fertilidad y estructura. Por años, la microbiología edáfica ha estudiado procesos biológicos globales, explicándolos a través del aislamiento y caracterización de los principales microorganismos asociados a éstos; sin embargo, la diversidad microbiana involucrada directa e indirectamente, así como el impacto de otros microorganismos, aún no ha sido explorada completamente, debido al escás de herramientas que permitan un confiable análisis a estos niveles. En el presente trabajo se analizarán las ventajas y limitaciones de las nuevas herramientas moleculares y su contribución, aunadas a los estudios microbiológicos y metabólicos, al entendimiento integral de los procesos biológicos que ocurren en el suelo, lo cual permitirá la generación de alternativas más eficientes para el incremento de la productividad agrícola, control de enfermedades, remediación de contaminantes, etc.

Palabras clave: biología molecular, ecología microbiana, microorganismos rizosféricos.

INTRODUCCIÓN

La generación y mantenimiento de la vida en el planeta tierra es posible debido a la transformación de elementos químicos entre componentes abióticos–bióticos y viceversa, en procesos llamados ciclos biogeoquímicos (Pidwirny, 2006). Para lo cual, el suelo es un sistema determinante por su naturaleza dinámica y compleja, donde los microorganismos presentes son los responsables de una gran cantidad de transformaciones, que conducen al ciclaje de estos elementos, por ejemplo: carbono, nitrógeno, fósforo y azufre (Garbeva *et al.*, 2004). De acuerdo con Whitman *et al.* 1998, el número de células procariotas en la biósfera (6×10^{30}) es mayor, en al menos dos a tres ordenes de magnitud, que la suma del número de células de animales y plantas. Así, los microorganismos constituyen alrededor del 60 por ciento de la biomasa total de nuestro Planeta (Singh *et al.*, 2009).

En la actualidad, los microorganismos del suelo han sido estudiados para la generación de conocimiento y su aplicación en tres principales vertientes: incremento de la productividad agrícola, bioremediación de compuestos tóxicos y obtención de materia prima para la industria biotecnológica (Rana *et al.*, 2011; de los Santos–Villalobos *et al.*, 2012; Rameshkumar *et al.*, 2012). La investigación del suelo a nivel microbiológico se ha centrado principalmente en el análisis de procesos microbianos globales; sin embargo, las poblaciones microbianas responsables de estos procesos no han sido suficientemente estudiadas. Por lo cual, el estudio de procesos microbianos edáficos con la finalidad generar u optimizar alternativas enfocadas a la solución de problemas, exige la comprensión integral del fenómeno, incluyendo el estudio de los microorganismos responsables de estos procesos; lo que conducirá a un acercamiento a nivel ecológico de los microorganismos presentes en el suelo.



Estudio de la diversidad microbiana

Hasta hace unos años, la mayoría de las investigaciones enfocadas al estudio de la diversidad microbiana edáfica, se basaba en el aislamiento de microorganismos de este sistema través técnicas microbiológicas clásicas; Sin embargo, solamente entre el 0.1 al 1.0 por ciento del total de estos pueden ser aislados (Staley y Konopka, 1985). Posteriormente, los microorganismos obtenidos son caracterizados fenotípica, metabólica y molecularmente. Así, aunque se cuenta con una colección de microorganismos para ser estudiada posteriormente, la diversidad microbiana en su totalidad sigue siendo desconocida en estos suelos.

El conocimiento de la diversidad microbiana a mayor profundidad se ha logrado recientemente mediante el uso de novedosas técnicas moleculares, la robustez de los sistemas bio-informáticos y el rápido avances de los sistemas de secuenciación (Bolotin *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Este último permite la obtención, en cortos periodos de tiempo, de gran cantidad de información sobre la diversidad microbiana en los procesos de interés, con un menor costo de secuenciación en comparación con las alternativas Sanger de secuenciación de clonas previamente desarrolladas (Hamady y Kinght, 2009). Además, los problemas asociados a las técnicas dependientes de cultivos son eliminados, debido a que es utilizado el ADN total extraído directamente de los microorganismos presentes en los suelos de estudio. Este ADN es utilizado para la amplificación específica, por PCR, de genes de los cuales se necesita conocer su diversidad en este sistema.

Actualmente, el proyecto de base de datos ribosomal (RDP) es la herramienta molecular de referencia para el estudio de la diversidad microbiana. Este proporciona un conjunto de alineamientos de secuencias pertenecientes a la subunidad pequeña del gen RNAR, tanto para arqueas como para bacterias, con una calidad controlada (Cole *et al.*, 2008). Estos avances en la biología molecular permiten por ejemplo, evaluar eficientemente el impacto de las prácticas de manejo de los suelos sobre su diversidad microbiana global o de procesos específicos, entre una casi infinita

posibilidad de análisis en diversos sistemas. Así, Pisa *et al.* 2011 reportaron, bajo ese enfoque, la diversidad bacteriana asociada a la rizósfera de la caña de azúcar bajo diferentes condiciones de fertilización nitrogenada (0 y 20 kg/ha N), observando pocas diferencias entre las muestras a nivel taxonómico alto, predominando el filo Proteobacteria (29.6 por ciento), seguido por Acidobacteria (23.4 por ciento), Bacteroidetes (12.1 por ciento), Firmicutes (10.2 por ciento) y Actinobacteria (5.6 por ciento). La excepción fue el filo Verrucomicrobia cuya prevalencia en los suelos bajo fertilización nitrogenada fue de aproximadamente 0,7 por ciento y aumentó hasta el 5,2 por ciento en el suelo no fertilizado, lo que sugiere que este grupo puede ser un indicador de la disponibilidad de nitrógeno en estos suelos como respuesta a bajos niveles de este elemento.

De manera similar, Köberl *et al.* 2011 estudió el impacto de las prácticas agrícolas sobre la diversidad microbiana edáfica. Un análisis basado en la pirosecuenciación de las regiones del gen 16S RNAR mostró una mayor diversidad en suelos agrícolas comparados con el suelo del desierto. La proporción de Firmicutes en suelo destinado a la agricultura fue significativamente mayor (37 por ciento) que en el desierto (11 por ciento). *Bacillus* y *Paenibacillus* presentaron un papel importante, ya que mostraron el 96 por ciento de los microorganismos antagonistas contra fitopatógenos. La proporción de cepas antagonistas se duplicó en el suelo agrícola en comparación con suelo del desierto (21.6 y 12.4 por ciento, respectivamente). Por el contrario, varios grupos de bacterias extremófilas, por ejemplo, *Acidimicrobium*, *Rubellimicrobium* y *Deinococcus Thermus*, desapareció en el suelo después de su uso agrícola. El género *Herbaspirillum*, como microorganismo fijador de nitrógeno, sólo fue identificado en el suelo del desierto.

El potencial de esta metodología se ve negativamente impactado, debido a que cada paso durante el análisis de la diversidad microbiana está sujeta a errores, tales como: la lisis celular, extracción y purificación de ADN (Martin-Laurent *et al.*, 2001), el diseño de los oligonucleótidos (Wang *et al.*, 2007), y las condiciones de PCR, ya



que es poco probable que un conjunto de parámetros reúna las condiciones de reacción óptima para la amplificación homogénea de los genes de interés en todos los microorganismos que constituyen la muestra (Wang y Wang, 1997).

Perspectivas

Aunque las herramientas moleculares generan gran cantidad de información sobre la diversidad de los microorganismos presentes en el suelo en comparación con las técnicas microbiológicas clásicas, éstas actualmente presentan desventajas operativas que conducen a que la verdadera diversidad siga siendo subestimada. Por lo cual, los estudios de la diversidad microbiana demanda la integración de herramientas microbiológicas, metabólicas y moleculares, que permitan un entendimiento integral de los fenómenos, que conduzcan a un uso sustentable del recurso suelo.

BIBLIOGRAFÍA

- Bolotin, D.A., Mamedov, I.Z., Britanova, O.V., Zvyagin, I.V., Shagin, D., Ustyugova, S.V., Turchaninova, M.A., Lukyanov, S., Lebedev, Y.B., Chudakov, D.M. 2012. Next generation sequencing for TCR repertoire profiling: Platform-specific features and correction algorithms. *Eur J Immunol*.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M., Tiedje, J.M. 2008. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucl Acids Res* 37:141–145.
- De los Santos-Villalobos, S., Hernández Rodríguez, L.E., Villaseñor-Ortega, F., Peña-Cabriales, J.J. 2012. Production of *Trichoderma asperellum* T8a spores by a “home-made” solid-state fermentation of mango industrial wastes. *Biore-sources* 7:4938–4951.
- Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of the microbial populations by plant and soil type and implementations for disease suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol* 42:243–270.
- Hamady, M., Knight, R. 2009. Microbial community profiling for human microbiome project: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res* 19:1141–1152.
- Köberl, M., Müller, H., Ramadan, E.M., Berg, G. 2011. Desert Farming Benefits from Microbial Potential in Arid Soils and Promotes Diversity and Plant Health. *PLoS ONE* 6:1–7.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M. 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol*.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J.C., Soulas, G., Cattroux, G. 2001. DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl Environ Microbiol* 67:2354–2359.
- Pidwirny, M. 2006. The Greenhouse Effect. *Fundamentals of Physical Geography*, 2nd Edition. 18–10–12. <http://www.physicalgeography.net/fundamentals/7h.html>
- Pisa, G., Magnani, G.S., Weber, H., Souza, E.M., Faoro, H., Monteiro, R.A., Daros, E., Baura, V., Bessalho, J.P., Pedrosa, F.O., Cruz, L.M. 2011. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. *Braz J Med Biol Res* 44: 1215–1221.
- Rameshkumar, N., Ayyadurai, N., Kayalvizhi, N., Gunasekaran, P. 2012. Genotypic and phenotypic diversity of PGPR fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *J Microbiol Biotechnol* 22:13–24.
- Rana, A., Saharan, B., Joshi, M., Prasanna, R., Kumar, K., Nain, L. 2011. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Ann Microbiol* 61:893–900.
- Singh, B.K., Campbell, C.D., Sorenson, S.J., Zhou, J. 2009. Soil genomics. *Nature Rev Microbiol* 7:756.
- Staley, J.T., Konopka, A. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 39:321–346.
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. Cole, J.R. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assign-



ment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73:5261–5267.

Wang, G.C., Wang, Y. 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol* 63:4645–4650.

Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J. 1998. Prokaryotes. The unseen majority. *PNAS* 95:6578–6583.



Tópicos edafológicos de actualidad, se terminó de editar en noviembre de 2012, en las oficinas de Proyecto Editorial de la Coordinación de Investigación y Posgrado, Torre de Rectoría, segundo piso, carretera Zacatecas-Guadalajara km 6, Ejido La Escondida, Zacatecas, Zacatecas. La edición constó de 700 ejemplares.



PROYECTO
Editorial
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS