

## LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO Y SU IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA EN LA AGRICULTURA Y EL AMBIENTE

**ROCHA, G.<sup>1</sup>, SANTOYO, Y.<sup>1</sup>, BUSTILLOS, R.<sup>1</sup>, MUÑOZ, J.<sup>1</sup>, PEREZ Y TERRON, R.<sup>2</sup>, MUÑOZ, A.<sup>3</sup>, CONTRERAS, J.L.<sup>4</sup>, VILLEGAS, M.C.<sup>5</sup>, MUNIVE J.A.<sup>1\*</sup>**

- 1) Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- 2) Escuela de Biología, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- 3) Centro de Detección Biomolecular, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- 4) Facultad de Arquitectura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- 5) Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México.

\*Corresponding author: José-Antonio Munive;

Dirección: Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, CICM, ICUAP, BUAP. Avenida San Claudio S/N, Edificio 103J, C.U., Col. San Manuel, Puebla, México, C.P. 72570.

E mail: antonio.munive@correo.buap.mx;

Tel: (+52-222) 2295500 – 2562, 7050, 2555.

Palabras Clave: Biotecnología, Microorganismos, Fijación de Nitrógeno, Fertilización Biológica, Simbiosis, Promoción del Crecimiento Vegetal

### ABSTRACT

Advances in science have opened up new options for farmers responding to market needs and environmental challenges. These techniques are included in what is often referred to as “biotechnology”. Appropriate use of science and technology helps to meet agricultural challenges and consumer needs of the 21st century. Farmers have been improving wild plants through the selection and breeding of desirable characteristics, resulting in the domesticated plants that are commonly used in crop agriculture. In the twentieth century, breeding became more sophisticated, as the traits that breeders select for include increased yield, disease and pest resistance, drought resistance and enhanced flavour. Agricultural biotechnology is a collection of scientific techniques used to improve plants by the use of beneficial microorganisms. Based on understanding life mechanisms, scientists have developed solutions to increase agricultural productivity. Starting from the ability to identify beneficial microorganisms, and the ability to work with such characteristics very precisely, biotechnology enhances farmer’s ability to make improvements in crops. Biotechnology enables improvements that are not possible with traditional crossing of related species alone. A safe and sufficient food supply, grown in an environmentally responsible fashion, is essential for humanity. Like any technology, agricultural biotechnology will have economic and social impacts. Agricultural biotechnology is only one factor among many influencing the health and welfare of farmers and other citizens in the developing world.

### INTRODUCCIÓN

La correcta utilización de biofertilizantes, a base de microorganismos, representa un elemento importante en la agroecología y la forestería, empero, esta es alcanzable sólo mediante la comprensión de la actividad microbiana y su influencia en las propiedades del suelo y de las especies vegetales mismas. A partir de la domesticación de las plantas, con fines de alimentación humana, el hombre no sólo modificó la diversidad vegetal al utilizar sistemas de producción de monocultivo, sino que también generó cambios en las comunidades microbianas que interactúan en el suelo. Estos cambios afectaron significativamente la expresión y persistencia de enfermedades cuando se inició el uso de pesticidas, con la idea de erradicar los agentes causales. Aunado a esto llegó la llamada “Revolución Verde”, caracterizada por el incremento en la aplicación de fertilizantes y otros agroquímicos para el control de plagas y enfermedades, con vistas a incrementar los niveles de producción de alimento. Así, a partir de la segunda mitad del siglo XX, se incrementó la utilización en la agricultura de productos generados mediante reacciones o síntesis químicas, especialmente de los fertilizantes nitrogenados. El nitrógeno es un elemento inerte que abunda en la atmósfera terrestre y solamente es asimilable para la mayoría de los organismos cuando se combina con elementos como el hidrógeno. El proceso industrial tiene altos requerimientos energéticos, mismos que provienen de la combustión de petróleo o carbón. Sin embargo, la reducción del nitrógeno atmosférico y su incorporación a los sistemas biológicos también es posible mediante la acción de algunos microorganismos, los cuales establecen relaciones mutualistas con las plantas superiores, utilizando como energía las fuentes de carbono proporcionadas por las plantas vía la fotosíntesis. La utilización de poblaciones microbianas benéficas para la recuperación y conservación del suelo, y su entorno, se encuentra dentro del contexto llamado fertilización biológica.



## LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

El nitrógeno molecular presente en el aire representa una reserva inagotable de este elemento, sin embargo, ningún organismo eucariótico es capaz de asimilarlo. La triple ligadura que une a los dos átomos de nitrógeno hace de ésta una molécula muy estable. A la reducción del  $N_2$  a amoníaco, mediante un mecanismo biológico, se le llama “Fijación Biológica de Nitrógeno” (FBN). La asimilación del nitrógeno molecular presente en el aire sólo puede ser llevada a cabo por un reducido grupo de microorganismos a los que se ha llamado, en consecuencia, fijadores de nitrógeno. Su capacidad de reducir el nitrógeno molecular esta dada por la presencia de un sistema enzimático denominado “Nitrogenasa”. Entre los fijadores de nitrógeno se despliega una gran biodiversidad que va del metabolismo aerobio a la anaerobiosis estricta, complementados con diversas características metabólicas y, sobre todo, la capacidad de reducción de nitrógeno en forma libre u obligadamente en asociación simbiótica con determinado tipo de plantas. Estos fijadores de nitrógeno juegan un papel ecológico esencial en la biósfera del planeta, equilibrando la actividad de los microorganismos desnitrificantes que liberan a la atmósfera el  $N_2$  producido a partir de los nitratos y nitritos del suelo.

## USOS POTENCIALES DE LOS FIJADORES LIBRES DE NITRÓGENO Y DE LAS RHIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR)

Existe una gran cantidad de literatura que describe los usos potenciales de las bacterias asociadas a las plantas como agentes estimuladores del crecimiento vegetal, del manejo de suelos y de la salud de las plantas. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) se asocian con muchas, si no con todas, las especies de plantas, y se encuentran presentes en una gran variedad de ambientes. El grupo más estudiado de PGPB son las llamadas PGPR's (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) que colonizan la superficie de la raíz y el suelo adherido a esta, la rizósfera. Estas bacterias pueden ser de vida libre o asociativas; aerobias, anaerobias o facultativas y, generalmente, han sido aisladas de suelos y de climas en donde predomina la vegetación gramínea, como pastos de zonas tropicales, templadas, de suelos salinos y pastizales de zonas áridas, así como de gramíneas cultivadas (Loredo-Osti y col., 2004). Algunas de estas bacterias son incluso capaces de penetrar al interior de estas plantas estableciendo relaciones llamadas endofíticas (Gray y Smith, 2005). Además, muchas de estas son capaces de traspasar la barrera de la endodermis, pasando de la corteza al sistema vascular, y subsecuentemente al tallo, hojas y otros órganos. El grado de colonización de los diferentes órganos refleja la capacidad de las bacterias para adaptarse a nichos ecológicos específicos. Los mecanismos utilizados por las PGPR's para promover el desarrollo de las plantas son diversos, aunque los más frecuentes son: 1) la fijación de nitrógeno (Döbereiner y col., 1995), 2) la producción de sustancias reguladoras del crecimiento (Arshad y Frankenberger, 1998), 3) la producción de sideróforos, incrementando la disponibilidad de Fe en la rizósfera, la resistencia sistémica a patógenos e inhibiendo el crecimiento de organismos antagónicos (Utkhede y col., 1999) y, 4) mediante la interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Bashan y col., 1995). Estos mecanismos pueden presentarse aislados, o de manera simultánea.

Cuando se reconoció el papel de las bacterias de la rizósfera en la promoción del crecimiento vegetal, su efecto se atribuyó a su facultad para fijar nitrógeno. Sin embargo, en las últimas décadas se ha destacado su importancia como promotoras del desarrollo debido a su capacidad para sintetizar sustancias reguladoras del crecimiento, llamadas fitohormonas. Estas sustancias son compuestos naturales que afectan los procesos metabólicos de las plantas a concentraciones más bajas de las que presentan los nutrientes o las vitaminas. Las sustancias reguladoras del crecimiento se clasifican en cinco tipos: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico (Loredo-Osti y col., 2004). Entre los principales géneros bacterianos pertenecientes a este grupo tenemos a: *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* (Loredo-Osti y col., 2004). Sin embargo, en la actualidad se han detectado otros géneros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Beijerinckia* y *Clostridium* entre otros (Bastian y col., 1998), muchos de los cuales se han utilizado como inoculantes en la agricultura orgánica en diferentes cultivos, sobre todo de caña de azúcar y gramíneas como el maíz, trigo, sorgo y arroz.

## BACTERIAS NODULANTES DE LEGUMINOSAS Y SU PAPEL BIOTECNOLÓGICO EN LA AGRICULTURA Y EL AMBIENTE

Entre los fijadores simbióticos de nitrógeno, el grupo más estudiado es el las bacterias nodulantes de leguminosas (Zakhia y De Lajudie, 2006), también llamadas comúnmente “Rhizobia”. La taxonomía y filogenia de los rhizobia han evolucionado notablemente en las últimas dos décadas, gracias a la introducción de la taxonomía numérica y de técnicas moleculares como la hibridación DNA/DNA, electroforesis de proteínas totales, análisis de secuencias multilocus y el acceso generalizado a otros métodos genéticos (Villegas y Munive, 2005). A la fecha, el grupo de los rhizobia incluye dieciséis géneros que comprenden más de un centenar de especies. Este grupo bacteriano constituido por miembros de las subclases  $\alpha$  y  $\beta$  Proteobacteria (Moulin y col., 2001) reviste una gran importancia debido a las ventajas, tanto ecológicas como económicas, que puede proporcionar su adecuada aplicación biotecnológica. Los géneros bacterianos incluidos actualmente en el grupo de rhizobia son: *Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Aminobacter*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Ochrobactrum*, *Shinella*, *Phyllobacterium* y *Herbaspirillum* (<http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/node/4>).

Los rhizobia, en asociación con las raíces (Figura 1) o tallos (Figura 2) de las leguminosas, forman una estructura altamente especializada llamada nódulo, dentro del cual se lleva a cabo el proceso de FBN. En el interior de éste, la bacteria encuentra las condiciones fisiológicas adecuadas para poder reducir el  $N_2$ ; esto beneficia a la planta y aumenta su capacidad para desarrollarse en suelos pobres desde el punto de vista nutricional (Trinchant y col., 2001). El establecimiento de la simbiosis comprende varias etapas, entre ellas, la secreción de flavonoides por las plantas, la inducción y expresión de genes bacterianos de nodulación y la infección bacteriana (Hungria y Stacy, 2001; Villegas y Munive, 2005).



Figura 1. Nódulos radiculares formados por *Bradyrhizobium sp.* en raíces de *Aeschynomene americana*. (Foto J.A. Munive).



Figura 2. Nódulos caolinales formados por *Bradyrhizobium sp.* en raíces de *Aeschynomene evenia*. (Foto J.A. Munive).

Debido a la elevada especificidad con que se da este tipo de interacción microorganismo-planta, en diversas ocasiones se ha puesto de manifiesto que la adecuada selección de las parejas simbióticas es lo que determina el éxito alcanzado en sus diversas aplicaciones, por lo cual es importante entender los mecanismos moleculares que regulan la especificidad de estas asociaciones simbióticas (Villegas y Munive, 2005).

La co-inoculación de las leguminosas con bacterias del grupo de los rhizobia y otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal, como *Azospirillum*, ha tenido una interacción positiva en el desarrollo de las plantas (Burdman y col., 1996). De igual forma, en el caso de la simbiosis doble entre la planta y, tanto bacterias del grupo de los rhizobia como hongos micorrícicos, se produce un sinergismo que beneficia a la planta (Aguirre y Velazco, 1994), ya que las micorrizas ayudan a la leguminosa a absorber agua y elementos como el fósforo, mejorando la eficiencia fotosintética de la planta y su capacidad fijadora de nitrógeno. Diversos trabajos han demostrado el efecto benéfico de la simbiosis con gramíneas, especialmente maíz, o bien en simbiosis doble micorriza-rhizobia en *Leucaena*, *Centrosema*, *Stylosanthes* y *Trifolium*, y *Rhizobium-Azospirillum* en frijol (Aguirre y Velazco, 1994; Andreeva y col., 1993; Burdman y col., 2001; Caballero-Mellado, 1991; Mosse y col., 1976). También se ha demostrado la mayor supervivencia de *Leucaena* bajo simbiosis doble en suelos ácidos, así como el incremento de biomasa en leguminosas forrajeras tropicales (Aguirre y col., 1988; Aguirre y Valdés, 1993; De la Garza y col., 1987; Matus y col., 1990; Valdés y col., 1984).

### ACTINOMICETOS FIJADORES DE NITRÓGENO Y SU PAPEL EN LA RECUPERACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL AMBIENTE

*Frankia* es un actinomiceto fijador de nitrógeno, heterótrofo, aerobio y en ocasiones microaerófilo, perteneciente a la familia Frankiaceae, con una sola especie descrita: *Frankia alni* (Normand y col., 1996). Sus miembros son bacterias Gram positivas que establecen una simbiosis con un gran número de plantas representando aproximadamente ocho familias, 25 géneros y más de 200 especies de plantas leñosas, dicotiledóneas, angiospermas perennes, llamadas en su conjunto “Plantas actinorrícicas” (Baker y Schwintzer, 1990; Benson y Silvester, 1993; Bond, 1983; Bousquet y Lalonde, 1990; Swensen, 1996; Swensen y Mullin, 1997).

Las plantas actinorrícicas poseen en común una gran capacidad para crecer en suelos de fertilidad limitada; y con frecuencia son especies pioneras en las etapas iniciales de desarrollo de las comunidades vegetales, tanto en suelos devastados como de reciente formación. Sus representantes pueden encontrarse en una gran variedad de ecosistemas, incluyendo tundras árticas (*Dryas*), dunas costeras (*Casuarina*, *Hippophaë*, *Myrica* y *Elaeagnus*), riveras (*Alnus* y *Myrica*), glaciares (*Alnus* y *Dryas*), bosques (*Alnus*, *Casuarina*, *Coriaria* y *Shepherdia*), chaparrales y zonas secas (*Casuarina*, *Prusia*, *Ceanothus*, *Cercocarpus*, *Comptonia* y *Cowania*), y zonas alpinas (*Alnus*) (Baker y Schwintzer, 1990). Debido a su capacidad para crecer en suelos marginados, las plantas actinorrícicas tienen un gran potencial biotecnológico para el acondicionamiento y recuperación de suelos. Entre estas sobresalen *Alnus*, *Shepherdia*, *Elaeagnus* e *Hippophae*, las cuales juegan un papel vital en la regeneración de los suelos, en general, estas plantas tienen todo el potencial para integrarse en los esquemas de reforestación (Diágme y Le Taçon, 1982; Diem y Gauthier, 1982; Dommergues, 1987; Rose y Youngberg, 1980). Algunas de estas plantas, como los miembros de la familia Casuarinaceae, son utilizadas como cortina rompevientos, para la obtención de pulpa, como madera para construcción y combustible, mientras que otras, *Ceanothus* y *Purshia*, son utilizadas en la dieta humana y como forraje (Diem y Dommergues, 1990; Resch, 1980; Wheeler y Miller, 1990), y en el caso de *Myrica* spp., ésta es utilizada tradicionalmente en la India para curar los resfriados (Verghese y Misra, 2002). Los árboles actinorrícicos son también de gran valor para retener suelo, y para proporcionar sombra y embellecimiento de parques y ciudades (Diem y Dommergues, 1990) (Figura 3).



Figura 3. Árboles de *Casuarina* en terrenos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Municipio Texcoco, Estado de México. (<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/casuarinaceae/casuarina-equisetifolia/fichas/pagina1.htm>).

Este grupo de actinomicetos se caracteriza porque (de forma análoga a los rhizobia en leguminosas) forma nódulos en las raíces de plantas actinorrícicas, sólo que, a diferencia de los que se forman en las leguminosas, fisiológicamente se tratan de raíces modificadas, y no de un órgano “per se”. Morfológicamente poseen una estructura multilobulada, característica de este tipo de simbiosis (Figura 4). La mayoría de los aislados de *Frankia* pueden ser agrupados en cuatro principales grupos de especificidad: 1) *Alnus* y *Myrica*, 2) *Casuarina* y *Myrica*, 3) *Myrica* y *Elaeagnus* y 4) miembros de la familia Elaeagnaceae (*Elaeagnus*, *Hippophae*, *Shepherdia*) (Baker, 1987). Sin embargo, esta clasificación no es completa debido a que no ha sido posible aislar *Frankia* de todas las especies de plantas actinorrícicas (Verghese y Misra, 2002). Además de la especificidad de hospedero, las cepas típicas de *Frankia* pueden ser asignadas a dicho género por criterios morfológicos, citoquímicos, fisiológicos y genéticos. Los criterios morfológicos incluyen la formación de filamentos ramificados y septados, la producción de esporangios multiloculares, la presencia de esporas no móviles en los esporangios y la producción de estructuras de pared gruesa encapsuladas por lípidos llamadas diazovesículas (Beyazova y Lechevalier, 1992; Fontaine y col., 1984; Huss-Danell, 1997; Lechevalier, 1994; Lechevalier y Lechevalier, 1984; Meesters y col., 1985; Meesters y col., 1987) (Figura 5). Incluso han sido aisladas varias cepas atípicas de *Frankia* asignadas al género; incluyendo cepas no infectivas incapaces de fijar nitrógeno en simbiosis o en cultivo puro, así como un grupo de cepas de *Frankia* de amplio espectro que infectan varias especies de plantas hospederas (Baker y col., 1980; Bosco y col., 1992; Hahn y col., 1988).



Figura 4. Nódulos de *Frankia* en la planta actinorrícica *Alnus rubra*, con su típica estructura multilobulada. (Foto P.O.Lundquist) (<http://nature-chronicles.wordpress.com/wild-garden/>).

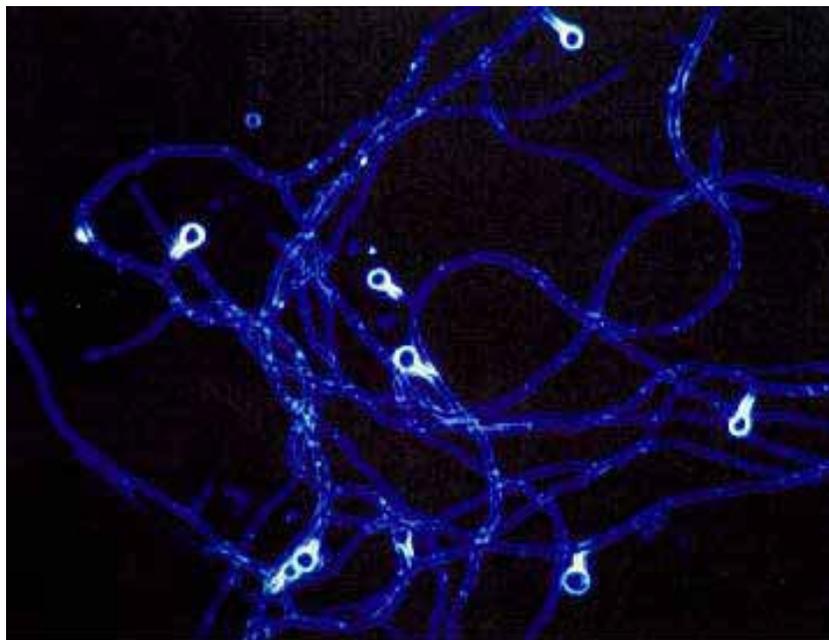


Figura 5. Vesículas fijadoras de nitrógeno en *Frankia* sp. (cepa Ccl3) en condiciones de microaerofilia y de falta de nitrógeno. La pared está hecha de numerosas capas de lípidos hopanoides (iluminados en la microscopia de campo oscuro). El grosor está dado en función de la presión de oxígeno. (Foto W. Silvester y R. Parsons) (<http://www.genoscope.cns.fr/spip/-Frankia-alni-ACN14a-.html>).

Con el surgimiento de la biología molecular, se propuso que para la clasificación de los miembros dentro del género *Frankia* se considerara la utilización de criterios basados en técnicas moleculares (Beyazova y Lechevalier, 1992; Lechevalier, 1994). *Frankia* fue considerado como el único género dentro de la familia Frankiaceae con base en el análisis comparativo de las secuencias del gen *16SrDNA* (Normand y col., 1996). Sin embargo, se propusieron cuatro divisiones dentro del género: 1) *Frankia alni* y cepas típicas pertenecientes al grupo de infección de *Alnus* y *Casuarina*, 2) Cepas no cultivables de especies de *Dryas*, *Coriaria* y *Datisca*, 3) Cepas infectivas de *Elaeagnus* y 4) Cepas atípicas no fijadoras de nitrógeno.

Otro grupo de actinomicetos fijadores de nitrógeno han sido aislados del interior de los nódulos de estas plantas actinorrísticas. Estos actinomicetos fueron descritos por primera vez en la década de los ochenta, al ser aisladas de nódulos de *Casuarina* en México. Estos actinomicetos tienen características morfológicas diferentes al género *Frankia*, como lo es el diámetro de los filamentos, y carencia de diazovesículas y esporangios. Se demostró su capacidad de fijación de nitrógeno, la utilización de  $\Delta^{15}\text{N}$ , y la presencia de genes involucrados en la fijación de nitrógeno, como el gene *nifH* (Valdés y col., 2005). El análisis de las secuencias del gen ribosomal *16SrDNA* mostró que este actinomiceto se encontraba filogenéticamente separado del género *Frankia* y relacionado con el género *Micromonospora* de la familia Micromonosporaceae (Niner y col., 1996), un género que no había sido conocido por su capacidad de fijación de nitrógeno. Los genes *nif* que posee *Micromonospora* se relacionan filogenéticamente con los genes *nif* de *Frankia*, lo que indica la transferencia lateral de estos genes entre estas dos especies, posiblemente como cohabitantes de los nódulos de *Casuarina*. Desde su descubrimiento, varios actinomicetos han sido descritos como poseedores de genes *nif*, siendo un gran número de estos descritos como pertenecientes al género *Micromonospora*. Estos actinomicetos no solamente han sido descritos como simbioses de plantas actinorrísticas, sino que incluso, han sido aislados de plantas de arroz (Tian et al, 2007), trigo (Combs y Franco, 2003), y de nódulos de leguminosas (Trujillo y col., 2007).

Este género fue por mucho tiempo reconocido como una fuente importante de metabolitos secundarios útiles para la biomedicina, como antibióticos y vitaminas. Estos microorganismos también juegan un papel importante en la ecología del suelo, biodegradación, biocontrol, y promoción del crecimiento vegetal, ya que *Micromonospora* estimula el desarrollo vegetal, no solamente por la producción de antifúngicos o compuestos antimicrobianos, sino también activando genes de las vías de defensa de la planta, lo que resulta en la supresión de patógenos. El hecho que esta bacteria sea también capaz de producir un gran espectro de enzimas hidrolíticas la hace buena candidata para la producción de biocombustibles. En conclusión, entender la gran diversidad metabólica existente en este grupo de microorganismos nos permitirá la selección de cepas que impacten no solamente en salud pública, sino también en la producción agrícola y en la producción de biodisel (Hirsh y Valdés, 2009).

## CONCLUSIÓN

La aplicación de fertilizantes complejos NPK (nitrógeno, fósforo y potasio), así como el uso de agentes químicos para el control de plagas, con el fin de incrementar el rendimiento de ciertos cultivos de gran importancia como el maíz, trigo y arroz, conllevan un impacto ecológico negativo, no considerado al momento de la llamada “Revolución Verde”. Los costos tan elevados de estos productos debido los altos requerimientos energéticos, mismos que provienen de la combustión de petróleo o carbón, no solo dañan los ingresos de los campesinos, sino que producen un grave daño al ambiente, al generar en el suelo la acumulación de un gran porcentaje de nitritos y nitratos, los cuales no son utilizados en un 100% por los cultivos, sino que permanecen en el suelo, o son filtrados a los mantos acuíferos, contaminando incluso los mares. Una alternativa para elevar la producción agrícola se ha encontrado en el uso de los llamados “biofertilizantes”, los cuales han ganado gran popularidad en México. Los biofertilizantes se caracterizan por la presencia de microorganismos vivos, bacterias u hongos, que se asocian en forma natural con las raíces de las plantas, beneficiando su crecimiento y el rendimiento de los cultivos mediante diversos mecanismos biológicos, como lo es la reducción del nitrógeno atmosférico, con la generación de amoníaco, la síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, la síntesis de antibióticos, la solubilización de fosfatos, etcétera. Para ello, es necesario hacer una estricta selección de microorganismos, tanto bacterias como hongos, que promuevan el crecimiento vegetal y el rendimiento de los cultivos.

Pero no sólo se puede aplicar esta biotecnología en el área agrícola. La utilización de poblaciones microbianas benéficas para la recuperación y conservación del suelo, y su entorno, también se encuentra dentro del contexto llamado “fertilización biológica”. Estos microorganismos también participan en gran medida en la conservación del ambiente, y pueden ser utilizados en la regeneración de suelos degradados, en la recuperación de sitios contaminados y en procesos de reforestación. Los biofertilizantes resultan ser, a la fecha, una alternativa biotecnológica que emplea la biodiversidad microbiana existente en nuestro planeta para contribuir a la obtención de una agricultura sustentable, y no contaminante del ambiente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, J.F., Valdés, M., y Silvester-Bradley, R.M. Simbiosis entre rizobios y cuatro leguminosas tropicales adaptadas en Chiapas, México. *Pasturas Tropicales*. 10(3): 18-21, (1988).
- Aguirre, J.F., Valdés, M. Establecimiento y producción de *Leucaena leucocephala* inoculada con *Rhizobium* en un suelo ácido. *Pasturas Tropicales*. 15(2): 29-31, (1993).
- Aguirre, J.F., Velazco, M.E. Componentes morfológicos y fisiológicos del rendimiento de *Leucaena leucocephala* al inocularse con micorriza VA y/o *Rhizobium loti*. *Agricultura Técnica en México*. 20(1): 43-54, (1994).
- Andreeva, I.N., Re'kina, T.V., Izmailnov, S.F. The involvement of indoleacetic acid in the stimulation of *Rhizobium-legume* symbiosis by *Azospirillum brasilense*. *Russ. J. Plant Physl.* 40(6): 780-784, (1993).
- Arshad, M., Frankenberger, W.T. Plant growth regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. En: Sparks, D.L. (ed.) *Advances in Agronomy* 62. Academic Press Inc., San Diego, California, USA. Pp: 45-151, (1998).
- Baker D.D., Newcomb, W., Torrey, J.G. Characterization of an ineffective actinorhizal microsymbiont, *Frankia Eul1* (Actinomycetales). *Can. J. Microbiol.* 26: 1072-1089, (1980).
- Baker, D.D. Relationship among pure cultured strains of *Frankia* based on host specificity. *Physiol. Plantarum* 70: 245-248, (1987).
- Baker, D.D., Schwintzer, C.R. Introduction. En: Schwintzer, C.R. y J.D. Tjepkema (eds.). *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. Academic Press Inc., San Diego, California, USA. Pp: 3-11, (1990).
- Bashan, Y., Puente, M. E., Rodríguez-Mendoza, M. N., Toledo, G., Holguin, G., Ferrera-Cerrato, R., Pedrin, S. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1938-1945, (1995).
- Bastian, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R., Bottini, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul.* 24: 7-11, (1998).
- Benson, D.R., Silvester, W.B. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.* 57: 293-319, (1993).
- Beyazova M., Lechevalier, M.P. Low-frequency restriction fragment analysis of *Frankia* strains (Actinomycetales). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 422-433, (1992).
- Bond, G. Taxonomy and distribution of non-legume nitrogen-fixing systems. En: Gordon, J.C. y C.T. Wheeler (eds.). *Biological Nitrogen Fixation in Forest Ecosystems: Foundations and Applications*. Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands. Pp: 55-87, (1983).
- Bosco, M., Fernandez, M.P., Simonet, P., Materassi, R., Normand, P. Evidence that some *Frankia* sp. strains are able to cross boundaries between *Alnus* and *Elaeagnus* host specificity groups. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1569-1576, (1992).
- Bousquet, J., Lalonde, M. The genetics of actinorhizal *Betulaceae*. En: Schwintzer, C.R. y J.D. Tjepkema (eds.). *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. Academic Press Inc., San Diego, California, USA. Pp: 239-261, (1990).
- Burdman, S., Volpin, H., Kigel, J., Kapulnik, Y., Okon Y. Promotion of nod gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) roots inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 30-33, (1996).
- Burdman, S., Hamaoui, H., Okon, Y. Improvement of legume crop yield by co-inoculation with *Azospirillum* and *Rhizobium*. *Agro-nomie* 21: 1-4, (2001).
- Caballero-Mellado, J. Experiencias de inoculación de maíz y trigo con *Azospirillum* a nivel intensivo y de investigación. Memoria III Congreso Nacional de la Fijación Biológica del Nitrógeno, Centro de Fijación Biológica del Nitrógeno. UNAM. Cuernavaca Morelos, México. Pp: 20-24, (1991).
- Combs, J.T., Franco, C.M.M. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5603-5608, (2003).
- De la Garza, H., Valdés, M., Aguirre, J.F. Effect of *Rhizobium* strains, phosphorus and soil type on nodulation and growth of *L. leucocephala*. *Leucaena Research Reports* 8: 42-43, (1987).
- Diagne, O., Le Taçon, F. Interactions between fertilization, mycorrhiza formation and nodulation in *Alnus incana*. *Coloques de l'INRA*. 13: 199-206, (1982).
- Diem, H.G., Dommergues, Y. Current and potential uses and management of *Casuarina* in the tropics and subtropics. En: Schwintzer, C.R. y J.D. Tjepkema (eds.). *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. Academic Press Inc., San Diego, California, USA. Pp: 317-342, (1990).
- Diem, H.G., Gauthier, D. Effet de l'infection endomycorhizienne (*Glomus mossae*) sur la nodulation et la croissance de *Casuarina equisetifolia*. *Comptes rendus de l'Académie de Sciences de Paris*, 249:215-218, (1982).
- Döbereiner, J., Urquiaga, S., Boddey, R. M., Ahmad, N. Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. Nitrogen economy in tropical soil. *Fertil. Res.* 43: 339-346, (1995).
- Dommergues, Y. Comment accroître la fixation symbiotique de l'azote par les arbres en milieu tropical? En : Les arbres fixateurs d'azote et l'amélioration biologique de la fertilité du sol. Actes. ORSTOM, Paris, France. Pp: 18-32 (1987).
- Fontaine, M.S., Lancelle, S.A., Torrey, J.G. Initiation and ontogeny of vesicles in cultured *Frankia* sp. strain HFPA13. *J. Bacteriol.* 160: 921-927, (1984).

- Gray, E. J., Smith, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37: 395-412, (2005).
- Hahn, D., Starrenburg, M.J.C., Akkermans, A.D.L. Variable compatibility of cloned *Alnus glutinosa* ecotypes against ineffective *Frankia* strains. *Plant Soil* 107: 233-243, (1988).
- Hirsh, A., Valdés, M. Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biol. Biochem.* 1:1-7, (2009).
- Hungria M., Stacy, G. Intercambio de señales moleculares entre planta huésped y Rhizobio: Aspectos básicos y aplicación potencial en agricultura. *Soil Biol. Biochem.* 29:819-830, (2001).
- Huss-Danell, K. Actinorhizal symbiosis and their N<sub>2</sub> fixation. *New Phytol.* 136: 375-405, (1997).
- Lechevalier, M.P., Lechevalier, H.A. Taxonomy of *Frankia*. En: Ortiz, L., L.F. Bojalil y V. Yakoleff (eds.). *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. Academic Press, New York, USA. Pp: 575-582, (1984).
- Lechevalier, M.P. Taxonomy of the genus *Frankia* (Actinomycetales). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 1-8, (1994).
- Loredo-Osti, C., López-Reyes, L., Espinosa-Victoria, D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana* 22(2): 225-239, (2004).
- Matus, J.M., Valdés, M., Aguirre, J.F. Capacidad competitiva de cepas de rizobio en la formación de nódulos en *Leucaena leucocephala*. *Pasturas Tropicales* 12 (3): 22-24, (1990).
- Meesters, T.M., van Genesen, S.T., Akkermans, A.D.L. Growth, acetylene reduction activity and localization of nitrogenase in relation to vesicle formation in *Frankia* strains Ccl7 y Cpl2. *Arch. Microbiol.* 143: 137-142, (1985).
- Meesters, T.M., Vliet, W.M., Akkermans, A.D.L. Nitrogenase is restricted to the vesicles in *Frankia* strain EAN1pec. *Physiol. Plantarum* 70:267-271, (1987).
- Mosse, B., Powell, C.L., Hayman, D.S. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. IX. Interactions between VA mycorrhiza, rock phosphate and symbiotic nitrogen fixation. *New Phytol.* 76: 331-342, (1976).
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin, C. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Nat.* 411: 948-950, (2001).
- Niner, B.M., Brandt, J.P., Villegas, M., Marshal, C.R., Hirsh, A.M., Valdés, M. Analysis of partial sequences of genes coding for 16S rRNA of actinomycetes isolated from *Casuarina equisetifolia* nodules in México. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 3034-3036, (1996).
- Normand, P., Orso, S., Cournoyer, B., Jeannin, P., Chapelon, C., Dawson, J., Evtushenko, L., Misra, A.K. Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family Frankiaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 1-9, (1996).
- Resch, H. Utilization of red alder in the Pacific Northwest. *Forest Prod. J.* 30: 21-26, (1980).
- Rose, S.L., Youngberg, C.T. Tripartite associations in snowbrush (*Ceanothus velutinus*): Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on growth, nodulation, and nitrogen fixation. *Can. J. Bot.* 59: 34-39, (1980).
- Swensen, S. The evolution of actinorhizal symbioses: evidence for multiple origins of the symbiotic association. *Am. J. Bot.* 83: 1503-1512, (1996).
- Swensen, S. M., Mullin, B. C. Phylogenetic relationships among actinorhizal plants: The impact of molecular systematics and implications for the evolution of actinorhizal symbioses. *Physiol. Plantarum* 99: 565-573, (1997).
- Tian, X., Gao, L., Tan., H., Han., W., Chen, M., Liu, Y., Zhou, Z. Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice. *Microbial Ecol.* 53: 700-707, (2007).
- Trinchant, J.C., Drevon, J.J., Rigaud, J. Symbiotic nitrogen fixation. En: J. F. MorotGaudry (ed.) *Nitrogen Assimilation by Plants*. Enfield, USA. Pp: 121-134, (2001).
- Trujillo, M.E., Kroppenstedt, R.M., Fernández-Molinero, C., Schumann, P., Martínez-Molina, E. *Micromonospora lupini* sp. nov. and *Micromonospora saelicensis* sp. nov. isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 56:2381-2385, (2007).
- Utkhede, R. S., Koch, C. A., Mezies, J. G. Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythium aphanidermatum*. *Can. J. Plant Pathol.* 21: 265-271, (1999).
- Valdés, M., Velázquez, M., Aguirre, J.F. Eficiencia de tres cepas de *Rhizobium japonicum* para fijar nitrógeno y formar nódulos en soya *Glycine max* (L) Merr. *Agricultura Técnica en México* 10 (2): 99-110, (1984).
- Valdés, M., Pérez, N.O., Estrada-de-los-Santos, P., Caballero-Mellado, J., Peña-Cabriales, J.J., Normand, P., Hirsch, A. M. Non-*Frankia* actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 460-466, (2005).
- Verghese, S., Misra, A.K. *Frankia*-actinorhizal symbiosis with special reference to host-microsymbiont relationship. *Curr. Sci. India.* 83: 404-408, (2002).
- Villegas, M.C., Munive, A. Taxonomía y genética de la nodulación de los rhizobia, el grupo más importante de fijadores simbióticos de nitrógeno. *Biótica* 2(1): 55-106, (2005).
- Wheeler, C.T., Miller, I.M. The utilization of actinorhizal symbiosis in Europe. En: Schwintzer, C.R. y J.D. Tjepkema (eds). *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. Academic Press Inc., San Diego, California, USA. (1990).
- Zakhia, F., De Lajudie, P. La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulantes des légumineuses (BNL). *Can. J. Microbiol.* 52:169-181, (2006).