


Caracterización morfológica y bioquímica de cepas fijadoras de nitrógeno de un consorcio degradador de hidrocarburos aislado de Tlaxcala

Badillo Martínez Fernanda^{1*}, Pérez Vargas Josefina¹, Gómez Guzmán Octavio², Calva-Calva Graciano^{2*}

¹Tecnológico Nacional de México/Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. División de Química e Ingeniería Bioquímica, Av. Tecnológico, s/n esq. Av. Hank González. Col. Valle de Anáhuac. Ecatepec, Estado de México. C.P. 55210. México.

²Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Biotecnología y Bioingeniería. Avenida IPN 2506, San Pedro Zacatenco, Ciudad de México. CP 07360. México.

*Autor para correspondencia: gcalva@cinvestav.mx

ORCID : 0000-0002-0416-1464

Recibido:

26/mayo/2023

Aceptado:

04/noviembre/2023

Palabras clave:

Bacterias fijadoras de nitrógeno, suelos contaminados, biorremediación

Keywords:

Nitrogen fixing bacteria, contaminated soils, biorremediation.

RESUMEN

Con el objetivo de obtener bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico (BFNA) con potencial para la biorremediación de suelos, con base en su crecimiento en medio de cultivo Luria Bertani y otro selectivo para bacterias fijadoras de nitrógeno (Rennie), en este trabajo se caracterizaron nueve cepas de BFNA aisladas a partir de un suelo agrícola de Tlaxcala contaminado por irrigación con agua del río Atoyac. En ambos medios se estudió la morfología colonial y microscópica, observándose colonias circulares e irregulares, pigmentos naranjas y amarillos, formas de cocos y bacilos Gram+ y Gram-. Estas observaciones, junto con pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa y reducción de nitratos, confirmaron a las cepas como BFNA, ubicándolas entre los géneros de *Kocuria*, *Azotobacter* y *Klebsiella*. Aunque se requiere de más estudios para completar su identificación, estos resultados son útiles para evaluar su potencial como biofertilizantes y uso en sistemas de biorremediación de suelos.

ABSTRACT

With the aim of obtain free-living atmospheric nitrogen-fixing bacteria (BFNA) useful for soil bioremediation, based on their growth in Luria Bertani culture medium, and a selective culture medium for nitrogen-fixing bacteria (Rennie), in this work, nine strains of BFNA isolated from an agricultural soil contaminated by irrigation with water from the Atoyac River, Tlaxcala, were characterized. In both culture media, the colonial and the microscopic morphology were studied. Circular and irregular colonies, with orange and yellow pigments, and bacilli and cocci cellular shapes, Gram+ and Gram-, were observed. These results, along with the biochemical tests, such as catalase, oxidase, and nitrate reduction, confirmed the strains as BFNA, placing them among the genera of *Kocuria*, *Azotobacter*, and *Klebsiella*. Although further studies are required to complete the identification, these results are useful for evaluating their potential as biofertilizers and the use in soil bioremediation systems.

Introducción

La contaminación del suelo en México es una problemática grave que afecta a la salud humana y al medio ambiente. Las principales causas de la contaminación del suelo en México son la actividad industrial, la agricultura intensiva y la disposición inadecuada de residuos urbanos e industriales. El problema de la contaminación del suelo en México, causada principalmente por actividades industriales, prácticas agrícolas y por la urbanización, es un tema serio que ha sido ampliamente estudiado por diversos investigadores e instituciones (Rodríguez-Eugenio, et al., 2019). Por ejemplo, en un simposio realizado en el año 2018 por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en la que se explicó cómo es que la contaminación de los suelos afecta a la calidad de los alimentos, el agua, el aire y la salud de nuestros ecosistemas. Esta realidad nos está superando, pero las estrategias biotecnológicas para la biorremediación de suelos y aguas usando microorganismos y plantas pueden ofrecer soluciones viables (Garzón et al., 2017).

Los metales pesados, pesticidas y los hidrocarburos del petróleo son los principales contaminantes que se encuentran en los suelos mexicanos (Rodríguez-Espinosa, et al., 2018a, b). Según la SEMARNAT, este tipo de compuestos son sustancias persistentes, tóxicas y bioacumulables (SPTB) generadas por industrias como la petroquímica, la minera, la agropecuaria y la eléctrica, que pueden tener efectos nocivos sobre la salud humana y el medio ambiente (Sedas Larios y Ruíz Saucedo, 2012). La remoción de contaminantes con agentes biológicos es un área de la Biotecnología llamada Biorremediación, que se divide básicamente en dos estrategias tecnológicas: 1) bioestimulación, en la cual se dan las condiciones óptimas, tanto ambientales como nutricionales, para que la microbiota ya existente en un lugar se mantenga sin necesidad de anexar otros agentes biológicos; y 2) bioaumentación, que se lleva a cabo mediante la adición de microorganismos u organismos externos como bacterias, levaduras, hongos o plantas que puedan remover contaminantes y a su vez aumentar la microbiota natural que estos sitios pudieron haber perdido o disminuido por la presencia de los contaminantes (Harekrushna and Chandan Kumar, 2012). Con la finalidad de contribuir a establecer sistemas biotecnológicos para la remoción de ese tipo de compuestos a partir de suelos, en trabajos previos de nuestro grupo de investigación se aislaron varios grupos de cepas bacterianas de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico (BFNA) a partir de sitios contaminados con compuestos orgánicos y metales pesados, principalmente de suelos de Tabasco impactados por

derrames de hidrocarburos (Pérez-Vargas et al., 2001-2017) y de zonas agrícolas de Tlaxcala contaminadas por irrigación con aguas del río Atoyac (Pérez-Vargas et al., 2020). En continuación con esos estudios, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar fenotípica y bioquímicamente algunas de esas cepas de BFNA para investigar su potencial para ser utilizadas en sistemas de biorremediación de suelos. Las cepas utilizadas se aislaron y clasificaron por su capacidad de crecer en el medio de cultivo de Rennie (Rennie, 1987), un medio de cultivo selectivo para bacterias fijadoras de nitrógeno.

Caracterización bioquímica

La caracterización bioquímica se enfoca en las enzimas y procesos metabólicos involucrados en la degradación de contaminantes y la fijación de nitrógeno. Los microorganismos fijadores de nitrógeno no conforman como tal un grupo taxonómico homogéneo, la única característica que comparten es la presencia de la enzima nitrogenasa. La mayoría de las bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) pertenecen a un género *Rhizobium*, que producen nódulos en las raíces de plantas dicotiledóneas formando simbiosis con la planta, por lo que el número de estas bacterias usualmente es mayor en la zona cerca a la raíz, llamada rizosfera (Mariano et al., 2020).

El tipo de BFN que no requiere hacer simbiosis con plantas para poder fijar el nitrógeno atmosférico se le denomina de vida libre (BFNA). Este grupo de microorganismos pueden ser aerobias obligadas, como, *Clostridium* y *Desulfovibrio*, las cuales dependen de condiciones ambientales específicas de humedad, ausencia de oxígeno y materia orgánica, aunque las más frecuentes son facultativas, como *Klebsiella*, que puede adaptarse a ambientes sin oxígeno o bajas concentraciones de este. Sin embargo, hay bacterias aerobias estrictas como *Azotobacter* y *Beijerinckia* que son aeróbicas, pero que pueden fijar nitrógeno atmosférico y soportar procesos metabólicos anaeróbicos (Mayz Figueroa, 2004).

Metodología

Aislamiento de cepas

A partir de suelo de un campo agrícola de 153 m de largo por 100 m de ancho ubicado entre las coordenadas 19°16'36.6"N 98°21'58.1"W del municipio de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, México sembrado con plantas de haba (*Vicia faba*) y que normalmente se riega con agua del río Atoyac, se prepararon extractos de bacterias totales a partir del rizoplaneo (RZP), rizosfera (RZA) y suelo aledaño, alejado por 30 cm, de la raíz (FL). Para los extractos se tomaron 10 g de suelo y se depositaron en matraces con 90 mL de solución salina (0.85% de NaCl p/v) y se agitaron por 1 h a 250 rpm.

Se realizaron diluciones seriadas de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-5} . De cada dilución se tomaron 100 μL y se dispersaron en placas con medio de cultivo Luria Bertani. Este medio de cultivo contiene nutrientes y amortiguadores que permiten el crecimiento de la población bacteriana total existente en las muestras de suelo. De estos extractos se obtuvieron nueve cepas, etiquetadas como C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 y C9.

Manejo de grupos bacterianos

De los cultivos por dilución en placas con medio LB se tomaron inóculos para iniciar cultivos en medio LB líquido por 24 horas a 30 °C y 120 rpm. De estos cultivos líquidos se toman alícuotas para sembrar por estría cruzada en placa con medio LB. Una vez que se obtuvieron colonias aisladas se utilizaron para realizar los estudios de caracterización.

Caracterización Morfológica y Microscópica

Para realizar la caracterización celular de cada cepa, se tomó una asada de una colonia aislada y se inoculó en tubos con caldo para realizar la descripción de las células en medio líquido LB. Posteriormente se tomó una asada y se inoculó por estría cruzada para la descripción en medio sólido LB. Se realizó el mismo procedimiento con medio Rennie líquido y sólido. Los cultivos en placa se incubaron por 48 h a 30°C para obtener colonias aisladas y describir las características coloniales. Se tomaron en cuenta tamaño, forma, pigmentación, producción de compuestos mucoides, textura y turbidez.

Caracterización microscópica y tinción de Gram

A partir de las cajas utilizadas para la caracterización colonial, se procedió a realizar tinción de Gram de cada cepa. Se tomó una colonia aislada, se suspendió en solución salina al 85%, se tomó una alícuota en el portaobjetos y se procedió a la tinción de Gram, El procedimiento consta de añadir el colorante cristal violeta dejándolo actuar por un minuto, y luego se enjuaga con agua.

Posteriormente se añade una disolución de yodo, se deja actuar por 1 minuto y se enjuaga el excedente. Se añade una solución de alcohol-acetona hasta que se observe que ya no hay colorante. Finalmente se añade la solución con safranina y se reposa durante un minuto, se enjuaga con agua para eliminar el exceso de colorante y se observa al microscopio (Olympus US BX51 con objetivo de 100x) para registrar los fenotipos celulares y el resultado de la tinción de Gram.

Pruebas bioquímicas

Se realizaron de acuerdo con la metodología descrita en MacFaddin (2000). Los medios de cultivo para todas las pruebas se inocularon con células de cultivos de no más de 24h incubados a 37°C y 100 rpm. Las observaciones de las pruebas se leyeron después de 24 h de incubación a 37°C. El tamaño de inóculo depende de la prueba bioquímica, pero generalmente se tomó como inóculo una colonia de cada cepa o alícuotas de 100 μL de cultivos líquidos. Cuando se requiere se inoculó por punción.

Resultados y discusión

Caracterización microscópica y colonial

Los estudios de caracterización morfológica colonial y celular mostraron que el tamaño de las colonias y de las células puede verse afectado por el medio de cultivo y que pueden representar información importante para la identificación de las especies bacterianas. En la Tabla 1 se resume la descripción de la morfología colonial, forma celular y características de los cultivos de cada cepa crecida en el medio de cultivo LB líquido. Se pudo observar que en este medio rico el tamaño de las colonias osciló entre 1-3 mm de diámetro, con colores transparente, blancas, amarillas y naranja, con bordes suaves e irregulares. La cepa C4 fue la única de colore naranja, las demás mostraron coloraciones básicas como blancas o amarillas cremosas. La textura de todas fue suaves o cremosas, a excepción de C8 las cuales fueron duras y rugosas. Las cepas C2, C5 y C6 desprenden olor fétido. En contraste, en los cultivos de las cepas en medio de Rennie (Tabla 2), en general, el tamaño de las colonias fue considerablemente más pequeño (0.5-2 mm de diámetro), con forma coloniales convexas, circulares o puntiformes. Interesantemente, con excepción la C9, la mayoría perdió su color, tornándose transparente.

Pruebas bioquímicas

Los resultados de las pruebas bioquímicas se muestran en la Tabla 3.

Las pruebas bioquímicas nos pueden ayudar a identificar algunas especies que ya están estudiadas, todas se realizaron con cepas tipo ninguna modificación a las pruebas ya estandarizadas 'por lo que en la figura 10 donde se aprecian las reacciones:

a) Catalasa, que puede identificar géneros como *Micrococcus*, *Bacillus* y *Staphylococcus*. Fue positiva por generación de burbujas para todas las del grupo de Tlaxcala.

b) Oxidasa, positiva por coloración violeta en C1, C5, C8 y C9 con reacción (+) coloración morada y reacción (-) sin cambio de color, esta prueba nos ayuda a identificar principalmente *Pseudomonas*.

c) Ureasa la reacción positiva es la coloración rosa intenso presente solamente en C2 se pueden identificar géneros como *Klebsiella* y *Actinobacillus*.

d) MIO la prueba de motilidad y ornitina fueron positivas en los tubos que se ven totalmente purpuras como C1, C2, C3, C5, C6 y C7, con esta prueba se pueden identificar bacilos Gram negativos entéricos.

e) Oxido-fermentación, con reacción positiva a fermentación se realizaron 3 ensayos con diferentes carbohidratos, que cuando fueron reacciones positivas en tubo sellado y abierto, la coloración amarilla viró a medio ácido derivado de metabolismo fermentativo en *E. coli*, C1, C2, C5, C6 y C7 teniendo como fuente de carbono a la sacarosa. Este resultado puede indicar que estas cepas pueden ser de los géneros *Aeromonas*, *Actinobacillus* o *Xanthomonas*.

f) Oxido-fermentación, con reacción positiva a oxidación, los tubos están de color verde tanto en abierto como sellado lo que indica que su metabolismo no es fermentativo sino oxidativo en *P. aeuroginosa*, C3, C4, C8 y C9; podrían ser especies como *Acinetobacter*, *Pseudomonas* o *Micrococcus* oxidativo.

g) Reducción de nitratos como prueba (+) se observa la coloración roja carmín indicado que si hubo hay reducción en C2, C5, C6 y C7 además de que hubo producción de gas, se puede diferenciar especies como *Microbacterium*, *Neisseria* y todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

h) Movilidad e indol reacción (+) a indol con coloración de anillo rojo y formación de gases observados como burbujas en el medio inoculado con *E. coli*, C5, C6, C7 y C8; *Paenibacillus*, *E. coli*, son géneros que se pueden observar con la ayuda de esta prueba.

i) Triple azúcar hierro, siendo prueba (+) en especies como *E. coli* de fermentación y generación de gas teniendo como fuente de carbono sacarosa y glucosa. Fue positiva para C9 y el control *E. coli*. Las reacciones positivas de fermentación solamente de glucosa la presentaron C3, C6, y C7, mientras reacciones negativas fueron presentes en C1, C2, C4 y C8, lo cual reveló bacterias relativas a *Pseudomonas* la cual se utilizó como control negativo en esta prueba.

j) Hidrolisis de almidón reacción (+) coloración púrpura, la reacción fue positiva en todas las cepas. Los géneros que se pueden incluir con esta característica son microorganismos aerobios como *Bacillus* y *Streptococcus* y *E. coli*.

k) Citrato reacción (+) medio azul, se pueden identificar los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y algunas especies de *Salmonella*. Fueron positivas las cepas C2, C5, C6, C8 y C9

l) Agar MacConkey reacción (+) colonias de color rojo. Al utilizar la lactosa en el medio, las bacterias Lac+ como *Escherichia coli*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. En esta prueba fueron positivos las cepas C2, C3 y C4.

Los análisis morfológicos y fisiológicos comunes para la identificación de microorganismos de los géneros de la familia *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Escherichia*) son: oxidasa negativa, catalasa positiva, reducción de nitratos a nitritos y morfológicamente son bacilos gramnegativos. (Farmer et al., 1981, Rodríguez et al., 2020).

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas observamos que las cepas C2, C5, C6 y C7 podrían pertenecer al género *Klebsiella* o *Azotobacter*, sin embargo, nos orientamos más por el género de *Azotobacter* ya que esta reportado como parte del grupo de las bacterias libres fijadoras de nitrógeno atmosférico y porqué son positivos a catalasa, nitrato, citrato e indol y negativas a oxidasa, además que su morfología microscópica fue de bacilos Gram- (Reis et al., 2015).

La cepa 4 podría pertenecer al género *Micrococcos* o *Kocuria*, los cuales se han encontrado en suelos altamente contaminados con metales pesados. (Kumar et al., 2020). De acuerdo con lo repostado por Pérez et al., (2016), la cepa C3 podría estar relacionado con el género *Bacillus* por la morfología colonial. Además, fue positivo a catalasa, reducción de nitratos y oxidasa negativo, lo que concuerda con lo descrito por Ding et al., (2004) para *Bacillus*.

Las cepas C1, C8, C9 podrían pertenecer al género *Citrobacter* ya que son bacilos gran negativos, citrato negativos y productores de sulfuro de hidrógeno, lo que concuerda con los sugerido en MacFaddin (2000) y lo reportado para una cepa de *Citrobacter* reductora de hierro y aislada de sedimentos de agua de río contaminadas con compuestos orgánicos y metales pesados (Liu et al., 2016).

Tabla 1. Morfología colonial, celular y características de cultivos líquidos de cada cepa crecida en medio LB.

Cepa	Morfología colonial	Morfología celular y Gram ()	*Características de cultivo en medio LB líquido
C1	Colonias circulares, \approx 3 mm de \emptyset , color amarillo cremoso, borde entero, convexas, aspecto húmedo, superficie opaca.	Bacilos cortos (+)	Turbidez+, biomasa sedimentada al final del tubo
C2	Colonias circulares \approx 1 mm de \emptyset color blanco cremoso. Aspecto seco, textura cremosa	Bacilos cortos (-)	Turbidez+, biomasa acumulada al fondo del tubo
C3	Colonias circulares \approx 3 mm de \emptyset color blanco cremoso. Aspecto húmedo, textura suave	Bacilos cortos (+)	Turbidez+, células acumuladas al fondo del tubo
C4	Colonias circulares \approx 3 mm de \emptyset color naranja cremoso, textura suave	Cocos (-)	Turbidez+, biomasa sedimentada color naranja al fondo del tubo
C5	Colonias circulares \approx 2 mm de \emptyset color amarillo medio cremoso. Aspecto seco, textura suave	Bacilos cortos (-)	Turbidez++, suspensión de células en todo el medio
C6	Colonias circulares, \approx 1 mm de \emptyset , color blancas cremosas amarillentas, borde entero, convexas, aspecto húmedo	Bacilos cortos (-)	Turbidez+, biomasa sedimentada color blanca al fondo del tubo
C7	Colonias circulares, \approx 1 mm de \emptyset , color Blancas cremosas amarillas brillantes, borde entero, convexas, aspecto húmedo, textura suave	Bacilos cortos (-)	Turbidez++, formación de grumos
C8	Colonias irregulares, \approx 2 mm de \emptyset color blanco brillante borde irregular superficie lisa, aspecto seco, textura rugosa.	Bacilos cortos (+)	Turbidez+, biomasa acumulada al final del tubo
C9	Colonias circulares puntiformes \approx 0.5 mm de \emptyset , color transparente, borde entero, convexas, aspecto húmedo, butírica.	Bacilos cortos (-)	Formación de grumos, turbidez ++

Tabla 2: Morfología colonial, celular y características de cada cepa crecida en medio Rennie.

Cepa	Morfología colonial	Morfología celular y Gram ()	*Características de cultivo en medio Rennie líquido
C1	Colonias circulares \approx 1 mm de \emptyset , color transparente, convexas, aspecto húmedo, de textura densa, mucoide.	Bacilos cortos (+)	Turbidez +, biomasa sedimentada al final del tubo
C2	Colonias Puntiformes \approx 0.5 mm de \emptyset , color transparente, convexas, aspecto húmedo, de textura densa, mucoide.	Bacilos cortos (-)	Turbidez +, biomasa acumulada al fondo del tubo
C3	Colonias circulares \approx 1mm de \emptyset , color transparente, convexas, aspecto húmedo, de textura densa, mucoide.	Bacilos cortos (+)	Turbidez +, células acumuladas al fondo del tubo
C4	Colonias circulares \approx 1 mm de \emptyset , color transparente, convexas, aspecto húmedo, de textura densa, mucoide.	Cocos (-)	Turbidez +, biomasa sedimentada color naranja al fondo del tubo
C5	Colonias circulares \approx 0.5 mm de \emptyset , color transparente, convexas, aspecto húmedo, de textura densa, mucoide.	Bacilos cortos (-)	Turbidez ++, suspensión de células en todo el medio
C6	Colonias circulares puntiformes \approx 0.5 mm de \emptyset , color transparente, aspecto húmedo, de textura suave,	Bacilos cortos (-)	Turbidez +, biomasa sedimentada color blanca al fondo del tubo
C7	Colonias circulares puntiformes \approx 1 mm de \emptyset , color transparente aspecto húmedo, de textura suave,	Bacilos cortos (-)	Turbidez ++, formación de grumos
C8	Colonias circulares, \approx 1 mm de \emptyset transparentes, convexas, aspecto húmedo, de textura suave	Bacilos cortos (+)	Turbidez +, biomasa acumulada al final del tubo
C9	Colonias Puntiformes, \approx 1 mm de \emptyset , color blanco borde entero, planas, aspecto Seco, de textura dura	Bacilos cortos (-)	Formación de grumos, turbidez ++

Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas.

Prueba	Cepa Tipo (+)	Cepa Tipo (-)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
Catalasa	<i>S.ae</i>	<i>NI</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Oxidasa	<i>P. ae</i>	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	+
TSI	<i>E. coli</i>	<i>NI</i>	SC/SC	SC/SC	K/A	SC/SC	A/A Gas	K /A, Gas	K/A	SC/SC	A/A
H ₂ S	<i>S.typh</i>	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad	<i>E. coli</i>	<i>K. Pn</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Indol	<i>E. coli</i>	<i>P. ae</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Ornitina	<i>E. coli</i>	<i>K. Pn</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	-
*OF Sacarosa	<i>E. coli</i>	<i>P. ae</i>	F	F	NR	NR	F	F	F	NR	NR
*OF Xilosa	<i>E. coli</i>	<i>P. ae</i>	OF	OF	NR	NR	OF	OF	OF	NR	NR
*OF Manitol	<i>E. coli</i>	<i>P. ae</i>	F	NR	NR	NR	NR	NR	NR	F	NR
Reducción De Nitratos	<i>E. coli</i>	<i>P. ae</i>	-	(+) Gas	-	-	(+), G	(+), G	(+), G	-	-
Ureasa	<i>K. Pn</i>	<i>E. coli</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	<i>K. Pn</i>	<i>E. coli</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	+
MacConkey	<i>E. coli</i>	<i>P. ae</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Hidrolisis De Almidón	<i>E. coli</i>	<i>NI</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 6.5-7.5	<i>E. coli</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+

E. coli, *Escherichia coli*; (*P.ae*) *Pseudomona aeruginosa*; (*S. typh*), *Salmonella thyphimurium*; (*K. pneu*) *Klebsiella pneumoniae*; (*S.ae*) *Staphylococcus aeurus*; (*NI*); no inoculado; (+), prueba positiva; (-) prueba negativa; K, medio alcalino; A, medio ácido; G, producción de gas; NR, no hubo reacción; OF, oxido fermentativo; F, fermentativo, O oxidativo.

Conclusiones

Por medio de la caracterización morfológica y bioquímica se confirmó que las cepas microbianas aisladas de suelos contaminados por irrigación con agua del río Atoyac son especies fijadoras de nitrógeno capaces de crecer en medio selectivo para este tipo de microorganismos. Además, ya que en estudios previos se ha demostrado que varias de estas cepas pueden crecer en ambientes contaminados con compuestos orgánicos y metales pesados, el reto ahora es realizar pruebas de identificación filogenética para completar su identidad y corroborar los géneros y especies. Con esa información podría explorarse su potencial como biofertilizantes o en sistemas de biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos y metales pesados.

Agradecimientos

Se agradece al CONAHCYT por el apoyo de beca 778490 para el primer autor.

Referencias

- Bellenger, J. P., Darnajoux, R., Zhang, X., y Kraepiel, A. M. L. (2020). Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenases in terrestrial ecosystems: a review. *Biogeochemistry*, 149, 53-73. <https://doi.org/10.1007/s10533-020-00666-7>
- Ding Y, Wang J, Liu Y. y Chen S. (2005). Isolation, and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *J Appl Microbiol*. 2005;99(5):1271-81. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02738.x.
- Farmer 3rd, J. J., Fanning, G. R., Huntley-Carter, G. P., Holmes, B., Hickman, F. W., Richard, C., y Brenner, D. J. (1981). *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family Enterobacteriaceae: identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov. and *Kluyvera cryocrescens* sp. nov. in clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 13(5), 919-933.
- Garzón, J. M., Rodríguez-Miranda, J. P. y Hernández-Gómez, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad y salud*, 19(2), 309-318.
- Kumar, P., Fulekar, M. H., Hiranmai, R. Y., Kumar, R. y Kumar, R. (2020). 16S rRNA molecular profiling of heavy metal tolerant bacterial communities isolated from soil contaminated by electronic waste. *Folia Microbiologica*, 65, 995-1007.
- Liu, L., Lee, D. J., Wang, A., Ren, N., Su, A. y Lai, J. Y. (2016). Isolation of Fe (III)-reducing bacterium, *Citrobacter* sp. LAR-1, for startup of microbial fuel cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(7), 4498-4503.
- MacFaddin, J.F. (2000) *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Mao, J., Luo, Y., Teng, Y. y Li, Z. (2012). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 70, 141-147.
- Mariano, C., Mello, I. S., Barros, B. M., da Silva, G. F., Terezo, A. J. y Soares, M. A. (2020). Mercury alters the rhizobacterial community in Brazilian wetlands and it can be bioremediated by the plant-bacteria association. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 13550-13564. doi: 10.1007/s11356-020-07913-2.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 1-20. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2221548.pdf>
- Medina-Cordoba, L. K., Chande, A. T., Rishishwar, L., Mayer, L. W., Valderrama-Aguirre, L. C., Valderrama-Aguirre, A., Christian Gaby, J., Kostka, J.E., y Jordan, I. K. (2021). Genomic characterization and computational phenotyping of nitrogen-fixing bacteria isolated from Colombian sugarcane fields. *Scientific Reports*, 11(1), 9187. doi: 10.1038/s41598-021-88380-8. PMID: 33911103; PMCID: PMC8080613.
- Michal, G. y Schomburg, D. (2012). *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*. Canadá: John Wiley & Sons, Inc.,
- Morais, P. V., Paulo, C., Francisco, R., Branco, R., Chung, A. P. y Da Costa, M. S. (2006). *Leucobacter luti* sp. nov., and *Leucobacter alluvii* sp. nov., two new species of the genus *Leucobacter* isolated under chromium stress. *Systematic and applied microbiology*, 29(5), 414-421.
- Orlando, M. A. (1981). Fijación simbiótica De nitrógeno, La Expresión De La Capacidad Fijadora Por Rhizobios. Orlando Mario Aguilar Tesis. Universidad Nacional de La Píala Facultad de Ciencias Exactas.
- Pérez Vargas J., Neria Gonzales MaI., Membrillo Venegas I.L., Buenrostro Zagal J.F., Viguera Carmona S.E., Tavera Monrroy S.X., Calva Calva G. (2011). Microbial Remediation of a Hydrocarbon-Contaminated Soil by Bioaugmentation Technology. In: *Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies. Int. Symp. Biorem. Sustainable Environ.* Tech. Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. CD B-07.
- Pérez-Vargas J., Castañeda López C., Palma-Cruz F., Sandoval González V. y Calva Calva G. (2007). Consumo de Hidrocarburos Aromáticos por Bacterias Fijadoras de Nitrógeno Atmosférico Aisladas de Suelos Contaminados por Derrames. *Tecnocultura* 6(15): 13-21. <http://difusion.tese.edu.mx/tese2010/loader.aspx?n=NFKNRAQG>

- Pérez-Vargas J, Flores-Vázquez K, Viguera-Carmona SE, Rivera Casado NA, Gómez Guzmán O, Calva-Calva G. (2020). Chapter 4.2. Biofertilization with nitrogen fixing bacteria to restore soils from agriculture fields contaminated by irrigation with the Atoyac river water / Biofertilización con bacterias fijadoras de nitrógeno para restaurar suelos de campos agrícolas contaminados por riego con agua del río Atoyac. In: Sotelo-Navarro. P. X.; Tecorralco-Bobadilla, A. L.; Escamilla-Alvarado, C.; Bretón-Deval, L.; Hernández-Flores, G.; Romero-Cedillo, L.; Poggi-Varaldo, H. M. (Editors): *Medio ambiente, bioenergías y sostenibilidad 2020*, pages 243-251. Ed. ABIAER A.C., Cinvestav, Mexico City, Mexico. ISBN 978-607-99118-1-2 Extensos SAB2020 27042022.pdf - Google Drive
- Pérez-Vargas J, Neria González M.I., Membrillo Venegas I.L., Buenrostro Zagal J.F., Viguera Carmona S.E., Tavera Monroy S.X. y Calva Calva G. (2011). Microbial Remediation of an Hydrocarbon-Contaminated Soil by Bioaugmentation Technology. In: *Bioremediation and Sustainable Environmental Technologies. First international symposium on bioremediation and sustainable environmental technologies*. Battelle Memorial Institute, Columbus, OH. CD, Work B-07. https://www.researchgate.net/publication/371172986_Microbial_Remediation_of_a_Hydrocarbon_Contaminated_Soil_by_Bioaugmentation_Technology
- Pérez-Vargas J., Viguera-Carmona S. E., Zamudio Moreno E., Rivera Casado N. A., Calva Calva G. (2017). Bioremediation of soils from oil spill impacted sites using bioaugmentation with biosurfactants producing, native, free-living nitrogen fixing bacteria. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 33(Especial Biotecnología e ingeniería ambiental): 105-114. DOI: 10.20937/RICA.2017.33.esp01.09
- Pérez-Vargas, J., Poggi-Varaldo, H. M., Calva-Calva, G., Albores, A., Rodríguez- Vázquez, R., Esparza-García, F. y Ferrera-Cerrato, R. (2001). Azomonas is a NFB capable to use kerosene as a carbon source. In *Sixth International In Situ and On Site Bioremediation Symposium* (pp. 219-226). https://www.researchgate.net/publication/371172936_Azomonas_is_a_NFB_capable_to_use_kerosene_as_a_carbon_source
- Pérez-Vargas, J., Viguera-Carmona, S. E., Gómez-Guzmán, O. y Calva-Calva, G. (2015). Degradación microbiana con BFNA de hidrocarburos aromáticos por bioaumentación en biopilas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 46, 416-423. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181259521017>
- Pérez-Vázquez, F. J., et al. (2017). Persistent organic pollutants and heavy metals in sediments of the Atoyac River, Mexico: Implications for the environmental and human health. *Environmental Pollution*, 231(Pt 1), 1176-1183.
- Reis, V. M., Baldani, V. L. D. y Baldani, J. I. (2015). Isolation, identification and biochemical characterization of *Azospirillum* spp. and other nitrogen-fixing bacteria. *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols*, 3-26.
- Rennie, R. (1987). 15N-Determined effect of inoculation with N2fixing bacteria on nitrogen assimilation in Western Canadian wheats. *Plant and Soil*, 213-223.
- Rippe, M. W. (2011). Nitrogen Fixation methods and protocols. Irvine, California, USA: Humana Press.
- Rippe, M. W. (2011). Nitrogen Fixation. Amsterdam University Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-194-9>
- Rodríguez, E. A., Garzón, L. M., Gómez, I. D. y Jiménez, J. N. (2020). Multidrug resistance and diversity of resistance profiles in carbapenem-resistant Gram-negative bacilli throughout a wastewater treatment plant in Colombia. *Journal of global antimicrobial resistance*, 22, 358-366.
- Rodríguez, S. A., Murillo, O. G. y Sánchez, J. L. (2020). Evaluación de fijadores biológicos de nitrógeno libres sobre el crecimiento de gramíneas en suelo degradado. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 22(1), 87-97. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.78019>
- Rodríguez-Espinosa, P. F., Mendoza-Pérez, J. A., Tabla-Hernández, J., Martínez-Tavera, E. y Monroy-Mendieta, M. M. (2018a). Biodegradation and kinetics of organic compounds and heavy metals in an artificial wetland system (AWS) by using water hyacinths as a biological filter. *International Journal of Phytoremediation*, 20(1), 35-43.
- Rodríguez-Espinosa, P. F., Shruti, V. C., Jonathan, M. P. y Martínez-Tavera, E. (2018a). Metal concentrations and their potential ecological risks in fluvial sediments of Atoyac River basin, Central Mexico: Volcanic and anthropogenic influences. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 1020-1033.
- Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M. y Pennock, D. (2018). La contaminación del suelo: una realidad oculta. <https://www.fao.org/3/i9183es/i9183es.pdf>
- Sedas Larios E. E. J. y Ruíz Saucedo U. (2012). La remediación y reutilización de sitios contaminados. Orientaciones para personal técnico de instituciones públicas de gobierno, pequeñas y medianas empresas e instituciones de educación superior. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, SEMARNAT. <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2011/CD001405.pdf>