

UNIVERSIDAD DEL MAR



“ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE CIANOBACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO, AISLADAS DE SUELOS CULTIVADOS DE PAPAYA”

TESIS

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias con Especialidad en Química Ambiental**

Presenta:

I.Q. KARINA MARTÍNEZ AGUILAR

Dirigido por:

M. en C. Ma. NIEVES TRUJILLO TAPIA

Puerto Ángel, Agosto de 2010.

RESUMEN

Se obtuvo un consorcio de cianobacterias fijadoras de nitrógeno de suelos cultivados de papaya ubicados en Bajos del Arenal, Santa María Huatulco, Oaxaca. Del consorcio se aislaron e identificaron dos géneros de cianobacterias: *Nostoc* sp. y *Fischerella* sp. Se evaluó el crecimiento del consorcio en medios BG-11 y BG-11₀ en estado sólido y líquido. Se determinó la influencia de este consorcio en el crecimiento de plántulas de papaya a diferentes concentraciones de nitrógeno: 0, 0.05 y 0.025 M NO₃⁻. Los controles fueron plántulas de papaya sembradas a las mismas concentraciones de nitrógeno de los tratamientos, sin inoculación de cianobacterias. La diferencia significativa entre experimentos se comprobó mediante un ANOVA multifactorial. Las características fisicoquímicas del suelo permitieron encontrar cianobacterias fijadoras de nitrógeno. Se observó un crecimiento mayor del consorcio de cianobacterias en medio BG-11 en comparación con BG-11₀, en donde el valor máximo de clorofila "a" fue 1.9 veces mayor en medio BG-11 (primeros 17 días) respecto al medio BG-11₀ en el cultivo en placas, mientras que para el medio líquido los valores máximos de clorofila "a" se observaron en el medio BG-11 siendo 2.6 veces más que en el medio BG-11₀. El contenido de proteína total fue similar al de clorofila "a", ya que los valores máximos de proteína se alcanzaron en el medio BG-11, en el cultivo en placas fue 180 veces más alto que el medio BG-11₀ y en el medio líquido fue de 79 veces más alto que en el medio BG-11₀. En los co-cultivos con plantas de papaya y el consorcio, el tratamiento con mayor contenido de nitrógeno (0.025 M NO₃⁻) mostró los valores más altos, en proteínas, clorofila "a", "b" y total. Los tratamientos con cianobacterias no presentaron diferencias significativas respecto a los controles.

Palabras clave: consorcio, co-cultivo, cianobacterias, suelo, papaya.

A MIS PADRES POR HABERME ENSEÑADO QUE LA SUPERACION ES EL CAMINO AL
ÉXITO.

A JORGE LUIS, JOSE GUADALUPE Y YAZMIN POR SU EJEMPLO.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para esta maestría.

A la M. en C. Ma. Nieves Trujillo Tapia por aceptarme en este proyecto, por su apoyo y por compartirme su experiencia.

A los revisores de esta tesis, Dr. Eustacio Ramírez Fuentes, Leticia Sánchez Estudillo, Aitor Aizpuru, a la Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva por sus valiosos comentarios para este trabajo.

A las doctoras Beatriz Hernández Carlos, Judith Amador por compartir sus conocimientos.

A los técnicos de los laboratorios de ambiental, microbiología e investigación.

A mis compañeras de laboratorio, Citla y Cora por haber hecho amena la estancia, por resolver mis dudas y por su ejemplo de profesionalismo.

A Octavio Noriega por su compañía, por su dosis de sarcasmo y buen humor, gracias amigo.

A Sergio por estar siempre conmigo, sus opiniones, sus consejos y por su amor.

INDICE GENERAL

Página

Resumen.....	i
Dedicatorias	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice	iv
Índice de figuras	viii
Índice de cuadros.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Importancia económica de la papaya.....	2
2.2 Papaya	2
2.2.1 Humedad	3
2.2.2 Luz	3
2.2.3 Fertilización	4
2.3 Ciclo del nitrógeno.....	5
2.3.1 Mineralización	6
2.3.2 Inmovilización	7
2.3.3 Fijación biológica de nitrógeno	7
2.3.4 Desnitrificación.....	8
2.3.5 Volatilización amoniacal	8
2.3.6 Lixiviación.....	8
2.4 Cianobacterias fijadoras de nitrógeno.....	9
2.4.1 Morfología	9
2.4.2 Distribución	10
2.4.3 Fijación de nitrógeno	10
2.4.3.1 Efecto del oxígeno sobre la fijación de nitrógeno	11
2.4.3.2 Consideraciones bioquímicas	11
3. ANTECEDENTES	13
4. JUSTIFICACIÓN.....	15
5. HIPOTESIS.....	16
6. OBJETIVOS	17
7. METODOLOGÍA.....	18

7.1 Ubicación del sitio experimental	18
7.1.2 Ubicación del sitio de muestreo.....	18
7.1.3 Colecta del suelo y caracterización fisicoquímica	18
7.1.3.1 pH.....	18
7.1.3.2 Textura del suelo	19
7.1.3.3 Capacidad de intercambio catiónico	19
7.1.3.4 Conductividad eléctrica	20
7.1.3.5 Capacidad de retención de agua.....	20
7.1.3.6 Nitrógeno total	21
7.1.3.7 Densidad real, densidad aparente y espacio poroso	21
7.1.3.8 Determinación de nitratos.....	22
7.1.3.9 Determinación de nitritos	22
7.1.3.10 Determinación de fósforo disponible	23
7.1.3.11 Determinación de materia orgánica.....	23
7.2 Obtención del consorcio de cianobacterias	24
7.2.1 Método de muestreo	24
7.2.2 Obtención del consorcio de cianobacterias fijadoras de nitrógeno del suelo	24
7.2.3 Condiciones de crecimiento.....	24
7.2.4 Aislamiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno	25
7.2.4.1 Técnicas de aislamiento de cianobacterias	25
7.2.4.1.1 Lavado de filamentos.....	25
7.2.4.1.2 Diluciones seriadas	25
7.2.4.1.3 Transferencia en bloque de agar invertido.....	26
7.2.4.1.4 Deslizamiento y fototactismo	26
7.3 Identificación morfológica de las cianobacterias obtenidas.....	26
7.4 Cinéticas de crecimiento	26
7.4.1 Cinéticas en medio sólido.....	26
7.4.1.1 Parámetros de crecimiento.....	27
7.4.1.1.1 Determinación de clorofila “a”	27
7.4.1.1.2 Extracción y cuantificación de proteínas	28
7.4.2 Cinéticas en medio líquido	28
7.4.2.1 Parámetros de crecimiento.....	29
7.4.2.1.1 Determinación de crecimiento de biomasa por absorbancia	29
7.4.2.1.2 Peso celular seco	29

7.4.2.1.3 Determinación de clorofila “a”	30
7.4.2.1.4 Extracción y cuantificación de proteína total	30
7.4.2.1.5 Determinación de amonio en el medio de cultivo.....	30
7.5 Pruebas preliminares in vitro en co-cultivo con plántulas de papaya y el consorcio de cianobacterias.....	31
7.5.1 Obtención y Germinación de la semilla	31
7.5.2 Co-cultivo de plántulas con el consorcio de cianobacterias	31
7.5.3 Determinaciones de los parámetros fisiológicos del co-cultivo	31
7.5.3.1 Longitud radicular y del tallo.....	32
7.5.3.2 Peso fresco y peso seco	32
7.5.3.3 Extracción y cuantificación de proteína total	32
7.5.3.4 Clorofila “a”, “b” y total	32
8. RESULTADOS Y DISCUSION.....	33
8.1 Caracterización fisicoquímica del suelo de cultivo de papaya.....	33
8.1.1 pH.....	33
8.1.2 Textura	33
8.1.3 Capacidad de intercambio catiónico.....	34
8.1.4 Conductividad eléctrica.....	34
8.1.5 Capacidad de retención de agua.....	34
8.1.6 Nitrógeno total.....	35
8.1.7 Fósforo disponible.....	35
8.1.8 Materia orgánica	36
8.2 Cianobacterias obtenidas del suelo con cultivos de papaya.....	36
8.3 Aislamiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno	38
8.4 Identificación morfológica de las cianobacterias obtenidas.....	38
8.5 Cinéticas de crecimiento	43
8.5.1 Cinéticas en medio sólido.....	43
8.5.1.1 Clorofila “a”	43
8.5.1.2 Proteína total	43
8.5.2 Cinéticas en medio líquido	45
8.5.2.1 Absorbancia total	45
8.5.2.2 Peso celular seco	47
8.5.2.3 Clorofila “a”.....	47
8.5.2.4 Proteína total.....	47

8.5.2.5 Amonio disuelto.....	49
8.6 Determinaciones de los parámetros fisiológicos en el co-cultivo	50
8.6.1 Longitud radicular.....	50
8.6.2 Longitud del tallo.....	52
8.6.3 Peso seco	53
8.6.4 proteína total.....	54
8.6.5 Clorofila “a”, “b” y total.....	56
9. CONCLUSIONES.....	60
10. RECOMENDACIONES.....	61
11. LITERATURA CITADA	62
12. ANEXOS	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo del nitrógeno y su afectación por el uso de fertilizantes.....	6
Figura 2. Heterocitos terminales de <i>Anabaenopsis</i> sp.....	9
Figura 3. Sitios muestreados en cultivos de papaya.....	24
Figura 4. Cianobacterias encontradas en suelos con cultivos de papaya.....	36
Figura 5. Crecimiento de colonias de los géneros de cianobacterias.....	38
Figura 6. Características de las células de <i>Nostoc</i> sp. cultivadas en medio sólido BG-11 ₀ a diferentes edades.....	40
Figura 7. Características de las células de <i>Fischerella</i> sp cultivadas en medio sólido BG-11 ₀ a diferentes edades.....	42
Figura 8. Contenido de clorofila (µg/ml) del consorcio de cianobacterias, en medio sólido con y sin fuente de nitrógeno.....	44
Figura 9. Contenido de proteína (µg/ml) del consorcio de cianobacterias, en medio sólido con y sin fuente de nitrógeno.....	45
Figura 10. Curva de crecimiento por turbidez (DO 750 nm) del consorcio de cianobacterias, en medio líquido con y sin fuente de nitrógeno.....	46
Figura 11. Peso seco (mg/L) del consorcio de cianobacterias, en medio líquido con y sin fuente de nitrógeno.....	46
Figura 12. Contenido de clorofila “a” (µg/ml) del consorcio de cianobacterias, en medio líquido con y sin fuente de nitrógeno.....	48
Figura 13. Contenido de proteínas (µg/ml) del consorcio de cianobacterias, en medio líquido con y sin fuente de nitrógeno.....	49
Figura 14. Liberación de amonio al medio de cultivo por el consorcio de cianobacterias, en medio líquido con y sin fuente de nitrógeno.....	50
Figura 15. Co-cultivo de plántulas de papaya con el consorcio de cianobacterias.....	51
Figura 16. Longitud radicular a diferentes tratamientos.....	52
Figura 17. Longitud de tallos a diferentes tratamientos.....	53
Figura 18. Peso seco de plántulas de papaya a diferentes tratamientos.....	55
Figura 19. Valores de proteína total, a diferentes tratamientos.....	55
Figura 20. Valores de clorofila “a”, a diferentes tratamientos.....	57
Figura 21. Valores de clorofila “b”, a diferentes tratamientos.....	57
Figura 22. Valores de clorofila total, a diferentes tratamientos.....	58

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Superficie cultivada (ha) de papaya por entidad durante el período 2000-2005	3
Cuadro 2. Fertilización de Nitrógeno, fósforo y potasio necesario durante el ciclo de cultivo de papaya	5
Cuadro 3. Distribución ecológica y geográfica de cianobacterias fijadoras de nitrógeno con heterocitos	12
Cuadro 4. Diseño experimental para la cinética de crecimiento en medio sólido.....	27
Cuadro 5. Diseño experimental para la cinética de crecimiento en medio líquido.....	29
Cuadro 6. Diseño experimental para la inoculación de cianobacterias en plántulas de papaya	31
Cuadro 7. Características fisicoquímicas de los suelos de cultivos de papaya, en los cuatro puntos muestreados	37

1. INTRODUCCIÓN

El nitrógeno, después del agua, es el factor limitante del crecimiento más importante para las plantas y por lo tanto, para la producción agrícola. Sin embargo, éste elemento está sujeto a diversas transformaciones en el suelo, que impiden su uso eficiente en los cultivos.

Los fertilizantes biológicos o biofertilizantes, que han sido usados durante años, principalmente en países asiáticos como por ejemplo: Finlandia y Vietnam, han ayudado a obtener cosechas considerables, especialmente de arroz. Esto, debido a que los biofertilizantes tienen una lenta liberación de los nutrientes, principalmente nitrógeno, representando una fuente lineal de éstos, haciendo así, más eficiente su absorción, evitando un desgaste excesivo en el suelo. Otro beneficio de gran importancia es que, tanto la producción y consumo de biofertilizantes, son económicos y sin un impacto negativo aparente en el ambiente. El inconveniente en este tipo de fertilizantes es que son de lenta liberación, pero, representan una ayuda para garantizar el rendimiento de los cultivos, sobre todo, para aquellos que no necesitan grandes cantidades de fertilizantes y con tiempos de cultivo más largos, como es el caso de los cultivos semi-perennes disminuyendo a su vez, los costos de producción.

Por ello, es necesaria la búsqueda de fuentes alternativas de nutrientes, que no dependan de los hidrocarburos y en conjunto con prácticas agrícolas adecuadas para los cultivos, se pueden obtener los beneficios antes mencionados.

Por lo anterior, se tiene contemplado conocer la diversidad y las condiciones de crecimiento de las cianobacterias fijadoras de nitrógeno nativas del lugar, principalmente de los suelos agrícolas; con la finalidad de ofrecer un sustituto parcial para los cultivos de papaya presente en la Costa de Oaxaca.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Importancia económica de la papaya

La papaya, por ser un alimento con alto valor nutricional como fruta fresca, se ha cultivado alrededor del mundo de manera importante en la última década, ya que tiene un gran número de aplicaciones en la industria, medicina y alimentación, entre otros, lo que ha originado que países como Tanzania, Uganda y Zaire hayan logrado incorporar a este fruto un valor agregado, al desarrollar técnicas para la obtención de sustancias, utilizadas en diferentes industrias, como la alimentaria (papaína y pectina), la cosmética (esencias) y la farmacéutica (látex) (Castro *et al.*, 2000).

Los principales países productores de papaya en el mundo son: Brasil, Nigeria, México, India e Indonesia, los cuales en conjunto producen alrededor del 75% de la producción mundial. Durante la década de los 90, la producción mundial de papaya registró una relativa estabilidad, situándose en un promedio anual de 4.8 millones de toneladas, con una tasa de crecimiento anual de 0.64% en ese período.

Para el año 2008, en México se establecieron 19,270 hectáreas de papaya, con una producción de 252,616 toneladas, destacando Veracruz con 66,806 toneladas en 7,752 ha, seguido por Chiapas con 63,470 toneladas en 1,863 hectáreas (Cuadro 1). En el estado de Oaxaca se cultivan 1,409 hectáreas de papaya variedad Maradol, con un rendimiento promedio de 20.12 Ton/ha (SIAP-SAGARPA, 2008).

2.2 Papaya

El papayo (*Carica papaya*) es un árbol semi-perenne, originario de las zonas tropicales de América tropical (México y Centroamérica). Las condiciones ambientales de temperatura y humedad del suelo provocan la manifestación de muchas formas florales de transición, las que también se expresan en esterilidad femenina, fusión de estambres al ovario, o mejor conocida como carpeloidia, comúnmente llamada “cara de gato” en las plantas hermafroditas. La carpeloidia causa la producción de fruta deforme y sin valor comercial (Castro *et al.*, 2000).

2.2.1 Humedad

El papayo, tanto en el proceso de germinación, vivero y los primeros meses después de plantado, necesita para su crecimiento y desarrollo una gran cantidad de agua, por lo

que, se recomienda cultivarlo en lugares donde se tengan precipitaciones de 1500 mm a 2500 mm anuales, así como riegos suplementarios indispensables para una buena producción. La cantidad de agua a aplicar y el número de riegos durante los períodos de estiaje, depende en gran medida de la capacidad de retención de agua del suelo y de las temperaturas de la región (Ovando *et al.*, 2007). La humedad relativa que debe prevalecer en las áreas tropicales es superior al 70%.

Cuadro 1. Rendimiento (Ton/ha) de papaya por entidad durante el período 2008-2010.

Estado	2008	2009	2010
Jalisco	29.388	57.559	52.246
Chis.	35.879	32.109	39.208
Mich.	11.306	12.387	15.968
Oax.	20.122	27.777	25.084
Ver.	21.101	22.950	24.326
Gro.	15.958	19.937	31.105
Total	133.754	172.719	187.937

Fuente: SIAP-SAGARPA, 31 de mayo (2008, 2009 y 2010)

2.2.2 Luz

Un factor climático de mucha importancia es la intensidad luminosa u horas luz, especialmente para el control fitosanitario, ya que; incide en la calidad interna de la fruta: a menor luminosidad menos contenido de azúcares (grados Brix). Al ser una planta tropical, ésta tiene un metabolismo de fijación de CO₂ del tipo C4 (Leegood, 1993), siendo más eficientes en la fotosíntesis y por lo tanto; en la producción de fotoasimilados. Los días con poca luminosidad, facilitan la propagación de antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* y hacen el control más difícil (Jiménez - Díaz, 2002).

2.2.3 Fertilización

Para su crecimiento y producción óptima el papayo necesita de 6 macronutrientes: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), además de los micronutrientes: cloro (Cl), boro (B), cobre (Cu) y molibdeno (Mo). Sin embargo, el nitrógeno es el elemento que la planta necesita en mayor cantidad cuando está en la etapa de crecimiento vegetativo (primeros tres meses después de la plantación).

La mayoría de los suelos de México y de la Costa de Oaxaca son pobres en N, siendo deficiente en la mayoría de las plantaciones, esta deficiencia se caracteriza por un amarillamiento del follaje, principalmente de las hojas basales, las cuales se marchitan y llegan a secarse si la deficiencia es severa (Ovando *et al.*, 2007).

De acuerdo a las características del suelo de la región se sugiere aplicar un balance 2-1-1 de N, P, y K respectivamente por planta. En el cuadro 2 se muestra la dosificación y el número de aplicaciones durante el ciclo del cultivo en la región. Por lo que al término del ciclo de cultivo, es necesario aplicar en promedio 5.1 kg de fertilizante por planta y considerando que una hectárea cultivada de papaya tiene aproximadamente 2,400 plantas, se requieren 12.24 toneladas de fertilizante para cada ciclo del cultivo.

No obstante, la idiosincrasia de los productores agrícolas en general y en particular en esta zona es que, a una dosis mayor se obtendrá una producción más alta del cultivo; en una encuesta realizada a los mismos se encontró que aplican una cantidad de fertilizante para cada ciclo de cultivo de 60 toneladas, esta cantidad es 5 veces mayor a la recomendada (Martínez Aguilar, 2007. *com. Pers.*).

Esta práctica no solo representa problemas en la deformación del fruto (Carpeloidia), y por ende en la apariencia comercial del fruto y producción; sino que representa un problema de magnitudes económicas, ecológicas y por supuesto de salud para la población, derivado de la lixiviación de nitrógeno a aguas subterráneas. Desde el punto de vista ecológico, la gran cantidad de fertilizante adicionado afecta al ciclo de nitrógeno, al modificar sus procesos biológicos.

Cuadro 2. Fertilización de Nitrógeno, fósforo y potasio necesario durante el ciclo de cultivo de papaya.

Aplicación	Dosis por planta
1 ^a	50 g a los 30 días *
2 ^a	50 g a los 2 meses de edad
3 ^a	100 g a los 3 meses de edad
4 ^a	100 g a los 4 meses de edad
5 ^a	200 g a los 5 meses de edad
6 ^a	200 g a los 6 a 8 meses de edad
7 ^a	300 g a los 9 a 10 meses de edad

* Después del establecimiento. Fuente: (Ovando *et al.*, 2007).

2.3. Ciclo de nitrógeno

El nitrógeno (N) del suelo está presente en tres formas (Figura1): 1) compuestos orgánicos asociados con el material vegetal, organismos y humus del suelo, 2) nitrógeno amoniacal ($N-NH_4^+$) ligado a las arcillas minerales, por lo que es difícilmente extractable y 3) nitrógeno mineral (N) en disolución en forma de amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). El 95% del N del suelo está en forma orgánica y por lo tanto, no disponible para las plantas (Reigosa *et al.*, 2004).

Derivado del bajo porcentaje de nitrógeno disponible para las plantas, el empleo anual de fertilizantes a nivel mundial se ha incrementado 3 veces desde los años 60 hasta la actualidad. Teniendo en cuenta que, aproximadamente el 50% del N aplicado es extraído en la cosecha, existe un riesgo potencial para que se produzcan pérdidas económicas e impactos ambientales negativos cuando los fertilizantes no se ajustan a las cantidades adecuadas (Murua *et al.*, 2003).

Los problemas ambientales generados se deben principalmente al desequilibrio en este ciclo, ya que; un aumento en la adición de fertilizantes nitrogenados al suelo produce una cantidad mayor de óxido nitroso (N_2O), siendo una molécula de este gas 206 veces más efectiva que el dióxido de (CO_2) en originar un aumento inmediato del calentamiento global (Baird, 2001), por otro lado, la lixiviación de iones nitrato hacia

cuerpos de agua, pueden ocasionar problemas de salud; principalmente cáncer de estómago a las personas que ingieran esta agua debido a la formación de N-nitrosaminas.

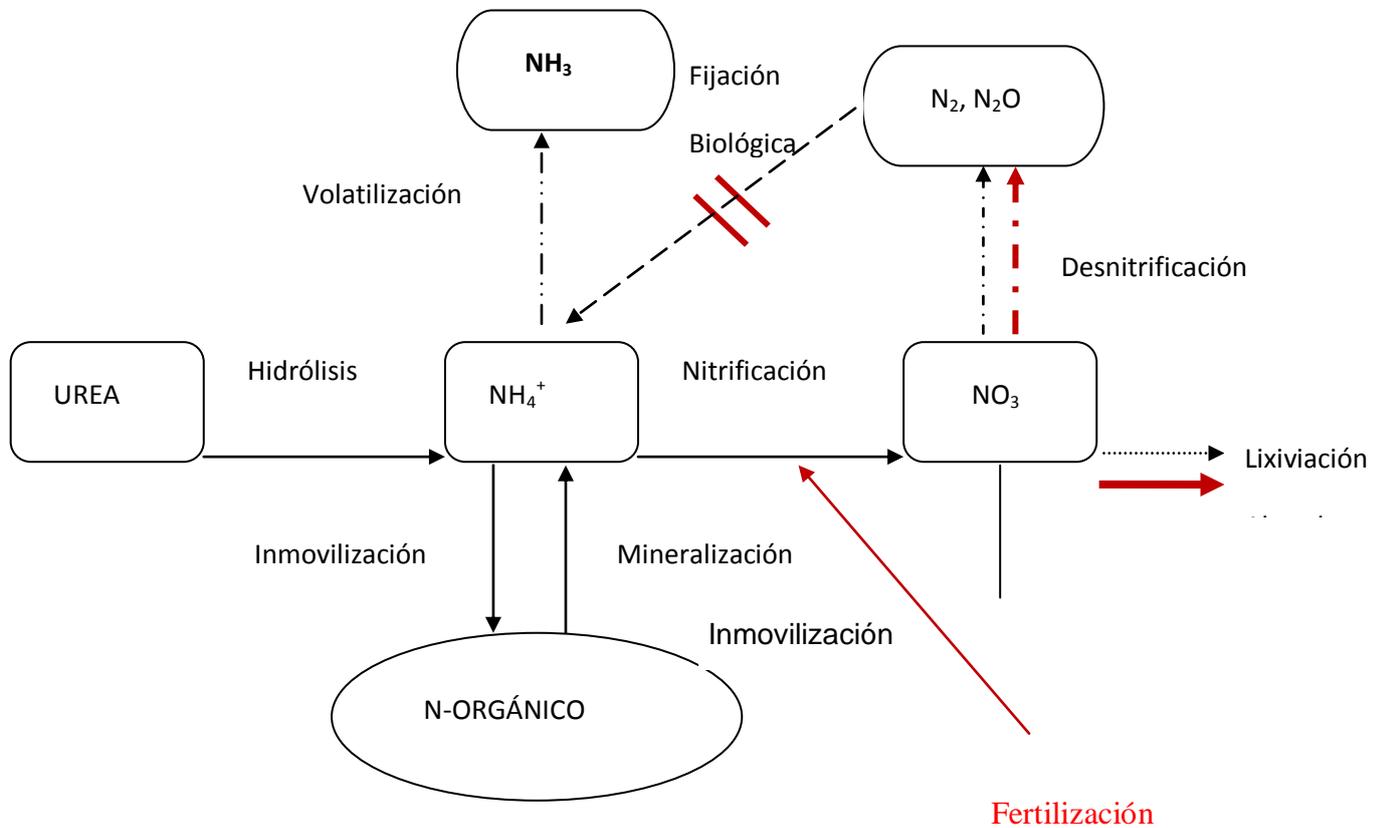


Figura 1. Ciclo del nitrógeno y su afectación por el uso de fertilizantes (Castellanos *et al.*, 2000) (modificado por Martínez-Aguilar, 2010).

2.3.1. Mineralización

Es el proceso de transformación de nitrógeno orgánico a nitrógeno mineral, e involucra dos subprocesos: la amonificación, que es la transformación de N-orgánico a N-amoniacal (N-NH_4^+) y la nitrificación, que es la oxidación de N amoniacal (N-NH_4^+) a N-nítrico (N-NO_3^-). Para la transformación de este último, participan dos géneros de bacterias: *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*. La mineralización se favorece con alta temperatura, humedad del suelo por arriba del 40% (sin sobrepasar el nivel de capacidad de campo) y pH cercano a la neutralidad, éstas condiciones, también resultan óptimas para el cultivo de papaya. Sin embargo, el exceso de nitrógeno adicionado durante su cultivo, afecta los procesos de amonificación y nitrificación que se realizan en el suelo (Murua *et al.*, 2003).

2.3.2 Inmovilización

En este proceso, el N-mineral es transformado a N-orgánico en el interior de la célula microbiana y ocurre como resultado de la alta relación C: N de los residuos que se incorporan al suelo. Debido a que las bacterias construyen su protoplasma celular con 8 a 10 moléculas de carbono por cada molécula de N, y al no existir suficiente N para el proceso de síntesis celular, los microorganismos recurren al N mineral (NH_4^+ o NO_3^-) del suelo para continuar utilizando los residuos como fuente de energía, reduciendo así, las reservas de N mineral en el suelo. Lo anterior implica la competencia entre plantas y microorganismos del suelo por las reservas de nitrógeno mineral. La continua actividad microbiana mediante la respiración (liberación de CO_2), permite que la relación C: N se restablezca y con esto se inicie el proceso de mineralización neta (Castellanos *et al.*, 2000). Sin embargo, el exceso de nitrógeno en estos suelos, ocasionado por el suministro de fertilizantes químicos, modifica la relación C: N, dificultando la utilización completa por los microorganismos y dejando que éste se pierda en forma gaseosa (desnitrificación) o por lixiviación.

2.3.3 Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

La extensa reserva de nitrógeno en la tierra está en forma de nitrógeno molecular, la cual es prácticamente inagotable, sin embargo, debido a la gran estabilidad del triple enlace existente entre los dos átomos de nitrógeno, solo ciertos organismos especializados (diazótrofos) como las micorrizas, actinomicetos, *Rhizobium*, y las cianobacterias, son capaces de fijar el nitrógeno molecular ($\text{N}=\text{N}$) como fuente de nitrógeno e incorporarlo a sus estructuras o convertirlo en N disponible para las plantas. En este importante proceso biológico, el uso de fertilizantes tiene un impacto negativo, ya que, la presencia de nitrógeno inhibe la fijación del mismo y con esto, los microorganismos fijadores ya no invierten energía en la reducción del nitrógeno atmosférico (Castellanos *et al.*, 2000).

2.3.4 Desnitrificación

La desnitrificación es el proceso de reducción del nitrato a sus intermediarios (NO , N_2O) hasta nitrógeno molecular (N_2), reflejándose como la pérdida gaseosa de nitrógeno que se favorece en condiciones de falta de oxígeno y alta disponibilidad de carbono orgánico. En ausencia de oxígeno, los microorganismos utilizan al ion NO_3^- como aceptor de electrones produciendo ATP. El exceso de NO_3^- en el suelo por el uso de fertilizantes y riegos abundantes en los sistemas de cultivo intensivos, favorecen la

desnitrificación y con esto el incremento de los gases invernadero (Castellanos *et al.*, 2000).

2.3.5 Volatilización amoniacal

Las pérdidas de nitrógeno por volatilización amoniacal (NH_3) ocurren cuando se utiliza una fuente amoniacal como amoníaco, urea, sulfato de amonio o nitrato de amonio. Éstas pérdidas se favorecen en suelos con pH por arriba de 7, con baja capacidad de intercambio cationico (CIC), en condiciones de alta temperatura, y cuando la aplicación se realiza de manera superficial (Fenn, 1975; Fenn y Escárzaga, 1976; Fenn y Escárzaga, 1977; Rachhpal y Nye, 1988).

2.3.6 Lixiviación

La lixiviación es el proceso de transporte de N principalmente en forma de ion NO_3^- que al contar con carga negativa, no puede ser retenido por las arcillas como ocurre con los cationes del suelo (NH_4^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+), haciéndolo fácilmente transportable por el agua. Por tal razón, las láminas de agua excesivas en los cultivos o lluvias abundantes, favorecen el arrastre de NO_3^- hacia los estratos inferiores del perfil del suelo, quedando fuera del alcance del sistema radicular de los cultivos. La lixiviación es la principal forma de pérdida de N en la agricultura, con repercusiones importantes en el ambiente ya que los nitratos son arrastrados hacia las reservas de agua subterránea, contaminando los acuíferos con un anión que es tóxico a animales de sangre caliente.

En los años 90, se realizaron estudios sobre los problemas ocasionados por la presencia de NO_3^- en los mantos acuíferos de México y los mecanismos que promueven el proceso de transporte en el perfil del suelo (Castellanos & Peña-Cabriales, 1990). También se estudió el efecto antropogénico en la costa occidental del país, en donde se aplican altas dosis de nitrógeno a las hortalizas (Estrada, 1996), aunque en otros casos, el origen de este anión en las aguas del subsuelo puede ser geológico. Posteriormente, Antón y Díaz (2000) registraron concentraciones de 80 mgL^{-1} de nitrato en agua subterránea del Valle del Mezquital, México; el origen de este nitrato está ligado a la presencia de nitrógeno en el agua residual utilizada para riego. Una año más tarde Pacheco *et al.* reportaron concentraciones de 7 a 156 mgL^{-1} en 12 pozos de agua potable en Yucatán, México.

2.4 Cianobacterias fijadoras de nitrógeno

Las cianobacterias, también conocidas como algas verde azules, son un grupo diverso de procariotas gram negativos fotoautotróficos (Fay, 1992). Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno en especial, contribuyen en gran medida a la presencia de nitrógeno en hábitats terrestres y acuáticos (Fay, 1981). Así, las cianobacterias fijadoras de nitrógeno juegan un papel importante, principalmente en el desarrollo de cultivos como el arroz, donde la cianobacteria *Anabaena azollae* se encuentra en simbiosis con helechos presentes en los cultivos, proporcionando cantidades considerables de nitrógeno a los cultivos de arroz, debido a la fijación realizada por este microorganismo.

2.4.1 Morfología

Las cianobacterias muestran una amplia diversidad morfológica, ya que pueden ser unicelulares (*Chroococcus*) o filamentosas, éstas últimas, en ocasiones presentan ramificaciones (*Anabaena*). Se presentan aisladas, agrupadas o en colonias (*Schizothrix*). Cuando se agrupan se observan como manchas o puntos cafés en rocas sumergidas (*C. fuscus*). La estructura colonial se mantiene por un exopolisacárido que se aprecia como un mucílago o una vaina firme. Las estructuras presentes en las cianobacterias varían dependiendo del género y especie que se trate (Paerl *et al.*, 2000; Castenholz, 2001). Muchas cianobacterias, producen células diferenciadas que sirven para protección, esporulación y reproducción o bien, para realizar funciones vegetativas específicas. Bajo condiciones de limitación de nitrógeno, muchas especies filamentosas poseen células diferenciadas, (llamadas heterocitos), las cuales tienen como única función la fijación de nitrógeno (Cuadro 3). Los heterocitos se forman cada 10 a 15 células vegetativas, y se encuentran distribuidos a lo largo o al final de los filamentos, esto dependerá del género e incluso de la especie (Figura 2).

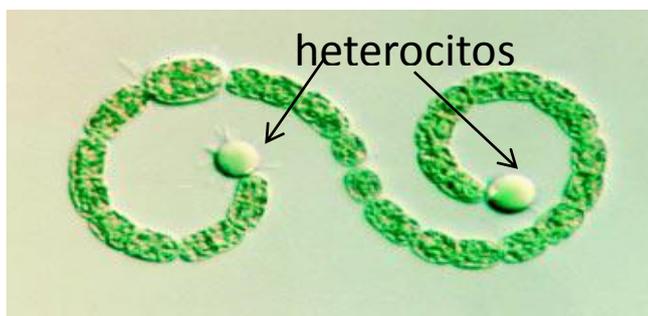


Figura 2. Heterocitos terminales de *Anabaenopsis* sp. (ESF, 2010).

2.4.2 Distribución

Debido a la versatilidad de su metabolismo y a su capacidad para adaptarse con éxito a diferentes ambientes, las cianobacterias son los productores primarios que forman la base de la cadena alimentaria de diferentes ecosistemas, por ejemplo en ambientes de agua dulce, lagos hipersalinos, agua marina, cultivos de arroz, suelos, desiertos y sobre paredes de cuevas por mencionar algunos. Las cianobacterias también pueden ser simbioses con una gran variedad de organismos (ej. en *Rhizosolenia*, raíces de *Cycas* y en hojas de *Azolla*) (Rai, 1990).

2.4.3 Fijación de nitrógeno

Los microorganismos fijadores de nitrógeno en general y las cianobacterias en particular, pueden tomar el nitrógeno de diferentes formas combinadas, tales como: nitrato, amonio, nitrógeno orgánico (aminoácidos), urea o como nitrógeno molecular (N_2). Sin embargo, en la mayoría de los ambientes, estas formas se encuentran en bajas concentraciones. El N-orgánico está sujeto a diversas transformaciones microbiológicas, desaminación, nitrificación y desnitrificación, estas; son el resultado eventual en la conversión de alguna forma combinada de nitrógeno a nitrógeno molecular. Este último elemento, al encontrarse en grandes cantidades en la tierra, es el que todos los microorganismos fijadores de nitrógeno obtienen fácilmente y sin competencia. Lo anterior, es gracias a que cuentan con un complejo enzimático denominado nitrogenasa, que les permite fijar dicho elemento.

Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno poseen el complejo enzimático nitrogenasa, el cual es responsable de catalizar la reacción de reducción del nitrógeno molecular que se encuentra en el ambiente. Este complejo consiste de dos componentes proteínicos, uno es la Mo-Fe proteína denominada dinitrogenasa y la otra es una proteína que contiene hierro denominada dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa, es un tetrámero compuesto de dos pares de diferentes subunidades ($2\alpha 2\beta$), los cuales, contienen cuatro clusters (4Fe-4S) y dos moléculas de Mo-Fe cofactor, su masa molecular es de 245 kDa. La dinitrogenasa reductasa, es un dímero compuesto de dos subunidades idénticas con un cluster sencillo (4Fe-4S) y una masa molecular de 64 kDa. La nitrogenasa es sensible al oxígeno y puede estar solamente activa en un ambiente completamente anóxico (Fay, 1992; Gallon, 1992), sin embargo, estos organismos al ser fotoautótrofos oxigénicos también producen oxígeno intracelular como un producto de la fotosíntesis. Por lo anterior, algunas cianobacterias fijadoras de nitrógeno han desarrollado una estrategia

de protección para el complejo nitrogenasa. Esta protección morfológica es conocida como heterocito (Haselkorn, 1978).

Los heterocitos tienen una pared celular delgada que presenta una barrera de difusión para los gases (Walsby, 1985): el grosor de la pared puede ser alterado por la concentración de oxígeno en el ambiente (Kangatharalingam *et al.*, 1992). Como consecuencia de la actividad respiratoria, el interior celular es virtualmente anaerobio por lo que la función de los heterocitos es separar espacialmente la fotosíntesis oxigénica de la fijación de nitrógeno; evitando de esta manera la difusión del oxígeno, como mecanismo para eliminarlo del sitio de fijación. Una vez fijado el nitrógeno en los heterocitos, éste es transportado a las células vegetativas para llevar a cabo el metabolismo celular (Walsby, 1985).

2.4.3.1 Efecto del oxígeno sobre la fijación de nitrógeno.

La exposición al oxígeno inactiva irreversiblemente ambos componentes del complejo de la nitrogenasa). La Dinitrogenasa reductasa (Fe-proteína) es particularmente sensible al oxígeno, destruyéndose rápidamente en presencia de aire, su vida media es de 30 segundos a 2 minutos. La dinitrogenasa (Mo-Fe- proteína) es menos susceptible, teniendo una vida media en aire de 4.5 a 10 minutos. El cofactor Mo-Fe, es aún más inestable frente al oxígeno que la dinitrogenasa reductasa. La oxidación de las proteínas de la nitrogenasa es probablemente afectada por especies reactivas de oxígeno, tales como, superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo (OH^\cdot), generados en el curso de reducción de oxígeno (Fay, 1992).

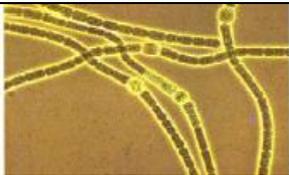
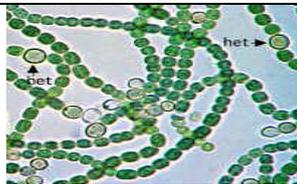
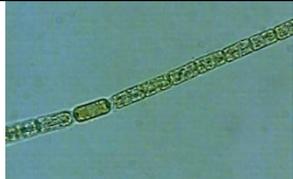
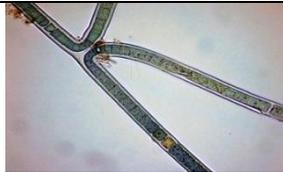
2.4.3.2. Consideraciones bioquímicas

La reducción del dinitrógeno a amonio se lleva a cabo mediante la reacción siguiente:



Como puede observarse la reducción de nitrógeno atmosférico a amonio demanda un alto requerimiento de energía y un bajo potencial electro donador, por lo que los organismos tienen que proporcionar suficiente energía (Fay, 1992).

Cuadro 3. Distribución ecológica y geográfica de cianobacterias fijadoras de nitrógeno con heterocitos (Fay, 1981 y Paerl *et al*, 2000).

GENERO	HÁBITATS	GRUPO	MICROGRAFÍA
<i>Anabaena</i> ^a	Agua dulce, estuarios acuáticos y suelos.	Nostocaleano	
<i>Fischerella</i> ^a	Agua dulce y bentos marinos.	Nostocaleano	
<i>Nostoc</i> ^a	Agua dulce planctónica, Béntica y endosimbiótica, estuarios y suelo.	Nostocaleano	
<i>Aphanizomenon</i>	Agua dulce, estuarios acuáticos, suelos y bentos marinos.	Nostocaleno	
<i>Calothrix</i> ^a	Agua dulce y bentos marinos.	Nostocaleano	
<i>Scytonema</i> ^a	Agua dulce y bentos marinos.	Nostocaleano	
<i>Tolypothrix</i>	Agua dulce, estuarios, plancton, marino y béntico.	Nostocaleano	

^a Algunas cepas de estos géneros viven en simbiosis con plantas (Venkataraman, 1993; Sinha y Häder, 1996). Fuente: imágenes de Banco Nacional de Algas de España (2001).

3. ANTECEDENTES

El empleo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno como biofertilizantes, se ha venido haciendo en cultivos de arroz desde el siglo XV, su presencia y distribución en suelos tropicales ha sido extensamente estudiada (Watanabe, 1959; Roger y Reynaud, 1979), así como los efectos de éstas en el crecimiento y producción de cultivos de arroz (Roger *et al.*, 1981; Venkataraman, 1986), en los estudios, mostraron que las plantas pueden beneficiarse de la presencia de cianobacterias al utilizar los compuestos nitrogenados sintetizados durante la fijación de nitrógeno, los cuales son liberados durante el crecimiento o la autólisis de las células cianobacterianas. Derivado de esto, se comenzó a utilizar de manera extensa la fijación biológica de nitrógeno por medio de la inoculación con algas en cultivos de arroz, principalmente con especies fijadoras de vida libre o en forma simbiótica, como es el caso del helecho de agua *Azolla*. Las condiciones de inundación que presenta el cultivo de arroz, propician el crecimiento y la fijación de nitrógeno por las cianobacterias, y se ha sugerido que la inoculación con estos microorganismos puede ser equivalente a la adición de más de 30 Kg N ha⁻¹ (Venkataraman, 1979; Goyal, 1987). Balandreau y Roger (1996), encontraron que la inoculación con cianobacterias nativas constituye una fuente suplementaria de nitrógeno al ecosistema que puede disminuir el tiempo necesario para que las cianobacterias se dividan y colonicen eficientemente el suelo. Por otro lado, Sinha y Häder (1996), mostraron que el nitrógeno fijado por las cianobacterias puede estar disponible para las plantas de arroz sólo después de su liberación al medio.

Entre los estudios realizados con otros cultivos se encuentran los trabajos de Gantar *et al.*, (1991a, b, 1993 y 1995), quienes investigaron la colonización de cultivos de trigo con cianobacterias fijadoras de nitrógeno, principalmente *Nostoc* y *Anabaena*, obtenidas previamente de suelos de Rusia, sus estudios apoyados con microscopía electrónica mostraron que las cianobacterias penetraron las células vegetales, formando una asociación con el cereal. Por otro lado, los biofertilizantes juegan un papel importante como complemento o suplemento de fertilizantes químicos en cultivos de cereales, debido a que estos sistemas de producción tienen una alta tasa de renovación de nutrientes y al costo excesivo de los fertilizantes químicos (Zaccaro, 2000).

En 1989, Singh y Singh (citado por Vaishampayan *et al.*, 2001), hicieron un estudio en la India, sobre los costos de los fertilizantes químicos vs biofertilizantes a base de cianobacterias y concluyeron que el costo de adicionar 35 Kg de N ha⁻¹ fue

aproximadamente de 2 dólares, mientras que la biomasa de cianobacterias requerida para inocular un campo de arroz (10 Kg ha^{-1}) provee la misma cantidad de nitrógeno, costando menos de un dólar. Por lo que, si la tecnología a base de cianobacterias fuera introducida en el 50% de los campos de arroz de la India, se tendría un ahorro de 3.8×10^5 Ton de nitrógeno con un costo total aproximado de 30,400 dólares, y si los biofertilizantes fueran producidos por los propios agricultores, los costos serían mínimos. Con estos resultados, recomendaron complementar la fertilización de nitrógeno inorgánico con la aplicación de cianobacterias. El costo-beneficio que se calculó fue 1:10, siendo aplicable sólo a la India, por lo que cada país debe hacer sus propias estimaciones (Vaishampayan *et al.*, 2001).

En México se han estudiado los beneficios del uso de cianobacterias como biofertilizantes en cultivos de chile y tomate (López-Cortés *et al.*, 2001; López-Cortés y Maya-Delgado, 2003), y se ha encontrado que su aplicación puede incrementar la calidad de las cosechas en cuanto al contenido de proteína, además de que, se disminuye el uso de fertilizantes químicos nitrogenados, mantiene por más tiempo el agua de riego en el suelo y las células sobreviven cuando menos dos meses en la superficie del suelo. Se siguen realizando trabajos de inoculación de cianobacterias fijadoras y fertilización química para la producción de arroz, en donde se han obtenido beneficios como mayor aportación de nitrógeno inorgánico por efecto del aumento de la mineralización (Irisarri *et al.*, 2006).

4. JUSTIFICACIÓN

Debido a la demanda de productos agrícolas con calidad comercial, se ha creado una dependencia de fertilizantes químicos y sobreexplotación de los suelos cultivados para lograr esta producción a nivel mundial. Lo anterior, no solo ha provocado un empobrecimiento de estos suelos, sino también una contaminación a nivel superficial, lo que ha propiciado la degradación del ambiente, principalmente de las aguas subterráneas contaminadas con lixiviados de nitrógeno y fósforo. Sin embargo, países como Vietnam, India y Filipinas han mantenido una técnica milenaria de cultivo de arroz, basada en el uso de cianobacterias fijadoras de nitrógeno como biofertilizante, obteniendo buenos rendimientos en sus cosechas. En México, actualmente se hacen pruebas de inoculación con cianobacterias en plantas de tomate y chile (López-Cortés y Maya-Delgado, 2003) pero esto, no es suficiente para la lista de cultivos agrícolas que tienen una alta demanda de agroquímicos como el maíz o papaya, por mencionar algunos; por lo que se tiene la necesidad de buscar alternativas viables, que mantengan esta producción y que a su vez sean económicas, pero sobretodo respetuosos del ambiente.

5. HIPÓTESIS

a) Hipótesis

Las características fisicoquímicas de los suelos de la Costa cultivados con papaya son las adecuadas para encontrar por lo menos un género de cianobacterias fijadoras de nitrógeno.

b) Hipótesis

La talla, el peso, el contenido de clorofila y proteína, serán superiores en las plántulas de papaya inoculadas con cianobacterias y una fuente de nitrógeno inorgánica que en aquellas que solo cuentan con la fuente nitrogenada inorgánica.

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar cianobacterias fijadoras de nitrógeno de suelo agrícola, y evaluar su efecto en plántulas de papaya en condiciones *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar fisicoquímicamente el suelo cultivado con papaya.
2. Obtener e identificar morfológicamente un consorcio de cianobacterias fijadoras de nitrógeno a partir de suelo cultivado con papaya.
3. Obtener la cinética de crecimiento del consorcio de cianobacterias en un medio de cultivo adicionado con nitrógeno y sin nitrógeno.
4. Comparar el efecto de las concentraciones de nitrógeno y del consorcio de cianobacterias en co-cultivo con plántulas de papaya en condiciones *in vitro*.

7. METODOLOGÍA

7.1. Ubicación del sitio experimental

La presente investigación se realizó en las instalaciones de la Universidad del Mar, campus Puerto Ángel, Oaxaca, ubicada a una longitud oeste de 96°39'25" y una latitud norte de 15°39'57" y una altitud de 20 metros sobre el nivel del mar (msnm). Los ensayos se realizaron en los laboratorios de: Biotecnología Ambiental, Investigación y Microbiología.

7.1.2 Ubicación del sitio de muestreo

El sitio de muestreo se encuentra ubicado en la localidad de Bajos del Arenal en Santa María Huatulco, Oaxaca, con coordenadas 15°43'36" N y 96°15'9" W. La temperatura media anual es de 22° a 28°C y la temperatura media del mes más frío es de 18°C. El clima que predomina en esta zona es cálido sub-húmedo con lluvias en verano. La precipitación total anual varía de 800 a 2 000 mm (INEGI, 2008).

7.1.3 Colecta de suelo y caracterización Físicoquímica

La colecta del suelo se realizó el 27 de octubre de 2007. Las muestras se tomaron de la capa superficial del suelo (0-10 cm), en cuatro puntos elegidos al azar, el punto 1 se ubicó entre las plantas de papaya y el pasillo (M₁), el punto 2 en el pasillo (M₂), punto 3 cerca de la planta (M₃) y el punto 4 de un terreno cercano el cual no había sido cultivado durante 3 años (M₄).

Una vez obtenidas las muestras de suelo de los cuatro puntos, éstas, se secaron al aire libre y se tamizaron utilizando una malla de 2 cm de apertura, posteriormente se hizo la caracterización físicoquímica; los análisis correspondientes fueron por triplicado. Para hacer el aislamiento de las cianobacterias se tomó muestra de suelo húmedo en cada uno de los sitios.

7.1.3.1 pH

El pH se determinó de acuerdo a la técnica propuesta por Yúfera y Carrasco (1973). Se pesaron 10 g de suelo en un vaso de precipitados y se le adicionaron 25 ml de agua destilada, se agitó mecánicamente por 5 minutos y se dejó reposar durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se tomaron las lecturas introduciendo en la suspensión el electrodo del potenciómetro OAKTON-88066 previamente calibrado.

7.1.3.2 Textura del suelo

En un vaso de precipitados de 500 ml se colocaron 60 g de suelo previamente tamizado y se le agregaron 40 ml de peróxido de hidrógeno para eliminar la materia orgánica presente. Se pesaron 50 g de suelo libre de materia orgánica, y se homogenizaron en un mezclador mecánico Hamilton Beach Classic, modelo 727WM, se le agregaron 10 ml de solución dispersante (NaPO_3 al 10.73%, NaCO_3 al 2.3%, H_2O al 86.97%) y suficiente agua destilada hasta cubrir el suelo. Se mezcló el contenido durante 5 min, se transfirió el contenido a una probeta de 1000 ml y se aforó con agua destilada. El suelo se mezcló nuevamente durante 1 minuto y 20 de segundos, después se tomó la primera lectura de la densidad con un hidrómetro Fisher Brand ERTCO, modelo 2152H-BF, también se registró la temperatura, la muestra se dejó reposar por 2 h más para tomar la segunda lectura del mismo modo que la anterior. Las lecturas con el hidrómetro y las temperaturas se sustituyeron en la siguiente fórmula (Ec.1 y 2), para obtener el porcentaje de arcilla, limo y arena presentes en el suelo (Ec. 3; los cuales se emplean en el triángulo de textura para designar la textura del suelo (Richards, 1993).

$$\% \text{ Limo} + \% \text{ Arcilla} = \left[\frac{\rho_{\text{inicial}} + t_{\text{inicial}} - 20 \cdot C}{g_{\text{sueloempleados}}} \cdot 0.36 \right] 100 \quad \text{Ec. 1}$$

$$\% \text{ Arcilla} = \left[\frac{\rho_{\text{final}} + t_{\text{final}} - 20 \cdot C}{g_{\text{sueloempleados}}} \cdot 0.36 \right] 100 \quad \text{Ec. 2}$$

$$\% \text{ Arena} = 100 - (\% \text{ Limo} + \% \text{ Arcilla}) \quad \text{Ec. 3}$$

$$\% \text{ Limo} = (\% \text{ Limo} + \% \text{ Arcilla}) - (\% \text{ Arcilla}) \quad \text{Ec. 4}$$

7.1.3.3 Capacidad de intercambio catiónico (CIC)

Esta prueba se hizo de acuerdo a la técnica propuesta por Sumner y Miller, 1996. Se colocó 1 g de suelo en un tubo Falcon de 50 ml para centrífuga Hettich® MIKRO 22R, se le adicionaron 25 ml de solución de acetato de bario ($\text{C}_4\text{H}_6\text{BaO}_4$) al 10%, se centrifugó por 5 min a 3000 rpm. Posteriormente, se separó el sobrenadante dejando en el tubo la muestra del suelo al cual se le añadieron 25 ml de MgSO_4 0.1 N y se agitó por 1 minuto. Se centrifugó nuevamente por cinco minutos a 3000 rpm; se agregaron 10 ml del sobrenadante a un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se adicionaron 90 ml de agua

destilada, al mismo tiempo se preparó un blanco a partir de 10 ml de la solución de sulfato de magnesio y diluyendo a 100 ml con agua destilada.

A cada uno de los matraces se les añadieron 10 ml de la solución tampón (NH₄Cl 1N, NH₄OH 1N) más 6 gotas de indicador negro de eriocromo T y se valoró con la solución acomplejante (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O, H₂O) hasta la aparición de un color azul. Los datos obtenidos se sustituyeron en la fórmula siguiente para calcular la C.I.C (Ec. 5):

$$CIC = \frac{M - N \cdot 0.05 \cdot 2.5 \cdot 100}{P} \quad \text{Ec. 5}$$

M= ml de la solución acomplejante para valorar el blanco

N=ml de la solución acomplejante para valorar la muestra

P= peso en g de la muestra de suelo

2.5= factor de dilución (del suelo se extrajeron 25 ml de solución de los cuales sólo se tomaron 10 ml para el análisis)

7.1.3.4 Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica (CE) se obtuvo directamente con un conductímetro marca OAKTON modelo CON 110, en el extracto de suelo saturado (Richards, 1993). Se pesaron 30 g de muestra, se ajustó al 50% de capacidad de retención de agua (CRA), se dejó por 24 h en refrigeración, después se filtró el sobrenadante al vacío y se leyó con el conductímetro. Los valores se reportaron en decisiemens por metro (dSm⁻¹).

7.1.3.5 Capacidad de retención de agua (CRA)

La capacidad de retención de agua (CRA) se determinó de acuerdo a la técnica propuesta por Klute (1986). Se colocaron 20 g de suelo seco en un embudo de 6.5 cm de diámetro con papel filtro previamente pesado, del mismo modo, se colocó un blanco (papel filtro pesado). A ambos embudos se les agregaron 100 ml de agua destilada de manera homogénea y se cubrieron con papel aluminio durante 24 h. Pasado este tiempo, se pesó nuevamente el suelo y el papel filtro con el agua retenida, con los datos obtenidos se sustituyó en la fórmula siguiente (Ec. 6):

Agua retenida= (peso del papel filtro con suelo saturado de agua-peso del papel filtro húmedo + peso del suelo seco).

$$CRA = \left(\frac{ar}{ps} \right) * 100 \quad \text{Ec. 6}$$

7.1.3.6 Nitrógeno total

La determinación de nitrógeno total se realizó por digestión Kjeldahl (Bremner y Mulvaney, 1982), la cual consistió en poner en un matraz Kjeldahl 1 g de suelo seco al que se le agregó 20 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), 7 g de sulfato de potasio (K_2SO_4) y 1 g de óxido de mercurio (HgO). La digestión se inició a baja temperatura incrementándose poco a poco hasta llegar a los $360^\circ C$ y terminó cuando la muestra fue incolora (3 horas después de iniciada la digestión), en un equipo de digestión BÜCHI k-424. La destilación para la determinación del nitrógeno total, se realizó en un equipo de destilación BÜCHI k-314. La titulación de las muestras se realizó con ácido bórico (H_3BO_3).

7.1.3.7 Densidad real, densidad aparente y espacio poroso

Se pesó una probeta graduada de 100 ml vacía, posteriormente se vació el suelo en la probeta hasta la marca de 50 ml. Se volvió a pesar la probeta conteniendo el suelo y se le agregaron lentamente 50 ml de agua destilada, se esperó hasta que saliera todo el aire contenido en el suelo (una vez que dejó de burbujear). Posteriormente, se tomó la altura a la que llegó el agua y suelo (V_{total}). Se midió el diámetro interno de la probeta y la altura de la misma (V_c), Estos valores se utilizaron en la ecuación 7, 8 y 9 para obtener la densidad real (D_r), densidad aparente (D_a) y el espacio poroso (E_p) respectivamente.

$$D_r = \frac{P_{ss}}{V_s} \quad \text{Ec. 7}$$

Para obtener el peso del suelo:

P_{ss} = peso de la probeta con suelo – peso de la probeta vacía

Para obtener el volumen del suelo:

$$V_s = V_{total} - V_{agua}$$

V_{total} , es la lectura de la probeta conteniendo suelo y agua

V_{agua} , los 50 ml que se vaciaron a la probeta

$$D_a = \frac{P_{ss}}{V_c} \quad \text{Ec. 8}$$

Pss = peso de la probeta con suelo – peso de la probeta vacía

$$V_c = \frac{\Pi d^2 h}{4}$$

$\Pi = 3.1416$

d = diámetro interior de la probeta (cm)

h = altura de la probeta (cm)

$$E_p = \left(1 - \frac{Da}{Dr}\right) 100 \quad \text{Ec. 9}$$

7.1.3.8 Determinación de nitratos

La concentración de nitratos se determinó mediante los métodos normalizados de APHA, AWWA, WPCF (1979).

Para la determinación de nitratos se realizó una extracción previa con una solución de sulfato de potasio (K_2SO_4) 0.5 M, se pesaron 10 g de suelo y 40 ml de esta solución, la mezcla se agitó en un equipo reciprocante EBERBACH[®], durante 30 min a 300 rpm, y se filtró, utilizando papel filtro (Whatman 4), de este filtrado se tomaron 10 ml y se evaporaron en una estufa (marca FELISA) a 105°C durante 24 h, las muestras, una vez secas y frías se les agregaron 2 ml de ácido fenildisulfónico, se redisolviéron con 20 ml de agua y 7 ml de hidróxido de potasio (KOH) 12 N. Posteriormente, esta solución se decantó y aforó a 100 ml, lavando el precipitado, al final las muestras se leyeron la absorbancia en un espectrofotómetro BECKMAN DU-530 a una longitud de onda de 410 nm. La concentración de nitratos se obtuvo con la ecuación de la recta de la curva de calibración elaborada con una solución de nitratos (Anexo A).

7.1.3.9 Determinación de nitritos

La determinación de nitritos se hizo de acuerdo a los métodos normalizados de APHA, AWWA, WPCF (1979).

Se tomaron 10 ml del extracto previamente obtenido (7.1.3.8), se colocaron en un matraz de 125 ml y se agregaron 40 ml de agua destilada, se agitó y se adicionó 1 ml de naftilamina ($C_{10}H_9N$), 1 ml de EDTA ($CH_2N(CH_2CO_2Na)CH_2CO_2H$)₂) y 1 ml de ácido sulfanílico ($C_6H_7NO_3S$), se agitó perfectamente con un vórtex y se dejó reposar de 3-10 minutos. Pasado este tiempo, se volvió a adicionar 1ml de naftilamina y 1ml de acetato de sodio (CH_3COONa), se agitó y se dejó reposar de 10–30 minutos, posteriormente, se realizaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro BECKMAN DU-530 a una

longitud de onda 520 nm. La concentración de nitritos se obtuvo con la ecuación de la recta de la curva de calibración elaborada con una solución de nitritos (Anexo B).

7.1.3.10 Determinación de fósforo disponible

Para la determinación de fósforo disponible se realizó una extracción del suelo, en la que se pesaron 2.5 g de suelo tamizado y se colocaron en tubos de polietileno, se adicionaron 50 ml de la solución extractora [bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 0.5 M], los tubos se taparon perfectamente y se agitaron en un agitador EBERBACH[®] durante 30 minutos a 180 rpm, se filtraron inmediatamente a través de un papel filtro Whatman 42. A partir de alícuotas de la solución extractora se preparó un blanco, adicionando todos los reactivos como en las muestras de suelo. Se tomaron 5 ml del filtrado y se colocaron en un matraz aforado de 50 ml, se agregaron 5 ml de solución reductora (ácido ascórbico), se agitó en forma manual y se aforó con agua destilada. Después de 30 minutos se tomaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 882 nm. La concentración de fósforo disponible se obtuvo con la ecuación de la recta de la curva de calibración elaborada con una solución patrón de fosfato de potasio monobásico (Anexo C).

7.1.3.11 Determinación de materia orgánica

La determinación de materia orgánica se evaluó a través del contenido de carbono orgánico con el método de Walkley y Black (1934). Se pesaron 0.5 g de suelo seco y tamizado, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, se adicionaron 10 ml de dicromato de potasio 1N, girando el matraz con cuidado, para que su contacto con el suelo fuera total, posteriormente se agregaron 20 ml de ácido sulfúrico concentrado con una bureta, se giró nuevamente el matraz, se agitó de esta forma durante 1 min. y se dejó reposar durante 30 min. Transcurrido el tiempo se añadieron 200 ml de agua destilada, 5 ml de ácido fosfórico concentrado y al final se agregaron de 5 a 10 gotas de indicador de difenilamina. Por último, se tituló con una disolución de sulfato ferroso 1 M ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) hasta el vire a verde claro. Se procesó un blanco con reactivos por triplicado. Los cálculos se hicieron mediante las siguientes fórmulas (Ec, 10):

$$\% \text{Corgánico} = \left(\frac{B - T}{g} \right) N \quad 0.39 \quad m.c.f$$

Ec. 10

Donde:

B= Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco de reactivos (ml)

T= Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (ml)

N= Normalidad exacta del sulfato ferroso

g= Peso de la muestra empleada (g)

7.2 Obtención del consorcio de cianobacterias

7.2.1 Método de muestreo

Se colectaron 4 muestras de suelo de diferentes puntos en el terreno de cultivo, ubicado en Bajos del arenal, Santa María Huatulco (Figura 3). Los puntos en donde se tomaron son los mismos que en la caracterización fisicoquímica (apartado 7.1.3)

Las muestras se obtuvieron a una superficie de 2-5 cm de suelo, depositándolas en frascos estériles de 500 ml. Los puntos de muestreo fueron elegidos mediante la técnica de la zeta, tomando la muestra cada tercera hilera. Durante el trayecto al laboratorio los matraces con las muestras se mantuvieron en bolsas plásticas a temperatura ambiente (30°C) y se realizaron los análisis a su llegada al laboratorio.



Figura 3. Sitios muestreados en cultivos de papaya: a) M₁, b) M₂, c) M₃ y d) M₄.

7.2.2 Obtención del consorcio de cianobacterias fijadoras de nitrógeno del suelo

Se pesaron 10g de suelo de cada uno de los puntos muestreados, posteriormente el suelo se llevó a saturación con 20 ml de agua destilada, filtrando después el suelo con un tamiz (No. 50). El sobrenadante obtenido, se agregó a un matraz de 250 ml, conteniendo 200 ml de medio BG-11₀ estéril (Ripka *et al.*, 1979) (Anexo D). Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones asépticas.

7.2.3 Condiciones de crecimiento

Los matraces con suelo se mantuvieron en cultivo en lote con medio BG-11₀ estéril, a una temperatura de 22±1° C, con un fotoperíodo de 12:12 (luz-oscuridad), una intensidad luminosa de 3,998 luxes (SPENCER SCIENTIFIC 840020), suministrada por lámparas fluorescentes (70 W). El pH del medio de cultivo tuvo valores de 6.5 a 7.5. El cultivo se mantuvo en aireación constante con un flujo de aire de 1 L min⁻¹.

Después de 14 días de la inoculación, los matraces que mostraron crecimiento de cianobacterias, se inocularon mediante el raspado con espátula de la biomasa adherida a las paredes del matraz, en matraces con 400 ml de medio de cultivo BG-11₀. Transcurridos 30 días se obtuvo la biomasa suficiente para iniciar las cinéticas de crecimiento. La propagación de los cultivos se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 400 ml de medio BG-11₀ estéril y con un inóculo del 5%.

7.2.4 Aislamiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno

Una vez que se obtuvo el consorcio, se procedió al aislamiento por géneros de las cianobacterias. El consorcio fue inoculado en medio BG-11₀ líquido y sólido (se agregaron 15 g de GELRITE[®] para solidificar un litro de medio de cultivo) a una temperatura de 22 ±1°C y a una intensidad luminosa de 3998 luxes. Para observar las características de las muestras en cuanto a la composición de microorganismos se utilizó un microscopio óptico Carl Zeiss[®].

7.2.4.1 Técnicas de aislamiento de las cianobacterias

Para obtener géneros aislados se probaron diferentes técnicas recomendadas por Rippka (1988), las cuales fueron: el lavado de filamentos, las diluciones seriadas, bloque de agar invertido, así como el deslizamiento y fototactismo. Estas técnicas se describen a continuación.

7.2.4.1.1 Lavado de filamentos

En esta técnica se tomó un filamento de la parte más alejada del lugar del inóculo en la caja de Petri y se pasó a un tubo de ensayo con medio líquido, se agitó y con la ayuda de una lámpara (70 W) se localizó y se extrajo el filamento, colocándolo nuevamente en cajas de Petri con agar.

7.2.4.1.2 Diluciones seriadas

En esta técnica (Guillard, 1973; Andersen y Kawachi, 2005), se utilizó 1 ml del cultivo de cianobacterias, el cual se pasó a un tubo con 5 ml de medio de cultivo, de éste se tomó nuevamente 1 ml, el cual se colocó en otro tubo con 5 ml de medio y así sucesivamente hasta hacer 7 transferencias.

7.2.4.1.3 Transferencia en bloque de agar invertido

A partir de cultivos que presentaron crecimiento abundante en medio de cultivo sólido BG-11₀, se procedió a cortar un bloque de la superficie del agar donde se observó crecimiento, el corte se colocó de forma invertida en el centro de otra caja con medio fresco y estéril, la caja fue expuesta a una fuente de luz (3,998 luxes), para permitir el crecimiento de las cianobacterias (Torres-Ariño, 2001).

7.2.4.1.4. Deslizamiento y Fototactismo

Se utilizaron cajas con medio sólido BG-11₀ expuestas a una fuente de luz unidireccional a fin de aislar a las cianobacterias con base a su respuesta fototáctica (Rippka *et al.*, 1979). Se observaron bajo el microscopio, los filamentos más alejados del centro de la caja Petri, fueron transferidos con asa de inoculación a medio sólido fresco. Las cajas se incubaron a 22±1°C y a una intensidad luminosa de 3,998 luxes (Torres-Ariño, 2001).

7.3 Identificación morfológica de las cianobacterias obtenidas

Para observar sus características morfológicas, las cianobacterias, se cultivaron en medio sólido BG-11₀, durante 40 días. La observación se realizó utilizando una porción de muestra del cultivo, la cual se colocó bajo un microscopio óptico Carl Zeiss®. Lo anterior se hizo a diferentes edades de cada cultivo: 12, 21, 25 y 40 días. La identificación se hizo a nivel de género, utilizando los manuales descritos por Allison *et al.*, 1937 y Bergey 1984 (citado por Holt *et al.*, 1994).

7.4 Cinéticas de crecimiento

Las cinéticas de crecimiento se realizaron en medios libres de nitrógeno (BG-11₀) y con nitrógeno (BG-11), en estado sólido y líquido, esto se hizo con el objetivo de mostrar las diferencias en el desarrollo de las cianobacterias, así como para observar la distribución del crecimiento en un medio sólido.

7.4.1 Cinética en medio sólido

Para realizar la cinética, se tomó un inóculo de cianobacterias de 5% (v/v) (obtenido de 7.2.4.1.2), y se resembró en cajas Petri con 15 ml de medio solidificado [con nitrógeno (BG-11) y sin nitrógeno (BG-11₀)]. Las condiciones de cultivo fueron: temperatura de 22±1° C, con un fotoperiodo de 12:12 h (luz-oscuridad), una intensidad luminosa de 3,998 luxes (SPENCER SCIENTIFIC® 840020) suministrada mediante el uso de lámparas fluorescentes de 70 W. Las determinaciones de proteína total y clorofila “a” se realizaron por triplicado, los días 0, 6, 13, 17, 21 y 26. El diseño del experimento se muestra en el cuadro 4.

7.4.1.1 Parámetros de crecimiento

Debido a la dificultad de contar organismos o de obtener el peso seco por el tipo de crecimiento en placa, en este ensayo los únicos parámetros que se midieron fueron clorofila “a” y cuantificación de proteínas como indicadores del incremento de biomasa.

Cuadro 4. Diseño experimental para la cinética de crecimiento en medio sólido.

	CON NITROGENO Y CIANOBACTERIAS (N ⁺ C ⁺)	SIN NITROGENO Y CIANOBACTERIAS (N ⁻ C ⁺)
CON LUZ (L ⁺)	N ⁺ C ⁺ (L ⁺)	N ⁻ C ⁺ (L ⁺)
SIN LUZ (L ⁻)	N ⁺ C ⁺ (L ⁻)	N ⁻ C ⁺ (L ⁻)

7.4.1.1.1 Determinación de clorofila “a”

Para cuantificar el contenido de clorofila, primero se separó la biomasa de cianobacterias de las cajas Petri de cada uno de los tratamientos, se colocó en un tubo de ensayo, el cual se centrifugó a 3,500 rpm en una centrífuga Hettich® MIKRO 22R durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, y su volumen fue sustituido por 5 ml de metanol al 90%, se agitó para re suspender el paquete celular. Después se calentó la suspensión celular a baño María a 60°C por 10 min., en tubos de ensayo tapados perfectamente y se almacenaron por 24 horas a 4°C, posteriormente, las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se aforó con metanol al 90%, hasta obtener nuevamente el volumen original (5 ml). De este sobrenadante, se tomaron las lecturas de absorbancia a 665 y 750 nm con un espectrofotómetro

BECKMAN® DU-530, se utilizó metanol al 90% como blanco. La concentración de clorofila se cuantificó mediante la fórmula de Azov (1982) (Ec. 11)

$$\text{Clorofila "a"} \text{ (mg/L)} = 13.9 \text{ (A}_{665\text{nm}}\text{-A}_{750\text{nm}}) \text{ U/V} \quad \text{Ec. 11}$$

Donde:

U= Volumen de metanol

V= Volumen de la muestra

A= Absorbancia

7.4.1.1.2 Extracción y cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas se hizo por el método de Lowry *et al.*, (1951), para lo cual se extrajeron previamente las proteínas de la biomasa de cianobacterias. La biomasa se colocó en tubos de ensayo y se le agregaron 5 ml de hidróxido de sodio 0.1 N, se cubrió perfectamente la boca de los tubos con papel aluminio y se sometieron a hidrólisis alcalina en baño María a 90 °C durante 20 minutos, se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm, en una centrifuga Hettich® MIKRO 22R por 15 minutos a 10°C. El extracto alcalino (libre de partículas) obtenido, se mezcló en un vórtex, se tomaron 500 µl de este extracto y se colocaron en tubos de ensayo, se completó hasta 1 ml con NaOH 0.1 N y se agitó nuevamente en el vórtex. Una vez listo el extracto se le agregaron 5 ml de la solución A (NaCO₃ al 2% en NaOH 0.1 N + CuSO₄ al 5% y KOCO(CHOH)₂CO₂Na·4H₂O al 1%) en una proporción 50:1, se mezcló en el vórtex y se dejó reposar durante 15 minutos, (ésta solución se prepara al momento de usarse), después se agregaron 500 µl de la solución 1:1 fenol folin:agua destilada, se agitó en el vórtex y se dejó reposar en la oscuridad por 40 minutos, transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 750 nm en el espectrofotómetro BECKMAN DU-530, calibrando el equipo con un blanco preparado junto con las muestras.

La determinación de la concentración de proteínas totales se realizó a partir de la ecuación de la recta de la curva de calibración elaborada con suero de albúmina de bovino como estándar (Anexo E).

7.4.2 Cinética en medio líquido

Para la cinética en medio líquido (Cuadro 5), se inoculó 5% (v/v) de un cultivo de cianobacterias en fase exponencial en 400 ml de medio BG-11₀ estéril. Las condiciones

de crecimiento fueron las mismas descritas en el apartado 7.2.3, con excepción del sistema de cultivo que en esta cinética fue semi-contínuo, con una tasa de remoción para cada tercer día del 30%, la luz ya no se tomó como condición experimental debido a que en el primer ensayo sólo se observó crecimiento en los cultivos que contaron con este factor. Las determinaciones se realizaron por triplicado los días 0, 2, 4, 8, 14, 19, 22 y 25.

Cuadro 5. Diseño experimental para la cinética de crecimiento en medio líquido.

	CIANOBACTERIAS (C1)
CON NITROGENO (N ⁺)	N ⁺ C ₁
SIN NITRÓGENO (N ⁻)	N ⁻ C ₁

7.4.2.1 Parámetros de crecimiento

Para este ensayo los parámetros que se consideraron fueron: crecimiento de biomasa, peso celular seco, clorofila “a”, proteína total y cuantificación de amonio.

7.4.2.1.1 Determinación del crecimiento de biomasa por absorbancia

Para la determinación de biomasa por lecturas de absorbancia se utilizó la técnica propuesta por Kannaiyan *et al.*, (1997), para ello, se tomaron 5 ml de suspensión del consorcio, agitando previamente con la finalidad de homogeneizar el cultivo. Posteriormente se midió su densidad óptica a una absorbancia de 750 nm en un espectrofotómetro BECKMAN DU-530. Se utilizó agua destilada como blanco.

7.4.2.1.2 Peso celular seco

El peso seco se determinó mediante la técnica propuesta por Vonshak, (1986) para lo cual se llevó a peso constante filtros Whatman de número 40, con 42.5 mm de diámetro y con un diámetro de poro de 5-8 µm. Se utilizó un volumen de 10 ml de suspensión del cultivo, el cual se filtró con ayuda de una bomba de vacío. Los filtros con las muestras fueron introducidos en la estufa a 105° C durante 48 h para obtener el peso final. El peso seco de la biomasa se obtuvo por una diferencia de peso y se reportó en mg/L.

7.4.2.1.3 Determinación de clorofila “a”

Para la determinación de clorofila “a” se extrajeron 5 ml del cultivo de los dos tratamientos y se siguió el mismo protocolo usado en la cinética en medio sólido (apartado 7.4.1.1.1).

7.4.2.1.4 Extracción y cuantificación de Proteína Total

La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry *et al*, (1951) ocupado en la cinética en medio sólido (7.4.1.1.2).

7.4.2.1.5 Determinación de amonio en el medio de cultivo

La concentración de amonio disuelto en el medio de cultivo se determinó de acuerdo a los métodos normalizados de APHA; AWWA, WPCF (1979).

Para realizar la cuantificación de amonio, se prepararon previamente las siguientes soluciones:

1. Solución de hipoclorito de sodio (NaClO): a 40 ml de agua desionizada se agregaron 10 ml de un blanqueador comercial al 5 % (v/v), ajustando el pH de 6.5 a 7 con HCl concentrado. Esta solución se preparó cada semana.
2. Solución de sulfato manganoso monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.003 M: se disolvieron 50 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua desionizada.
3. Solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 2.5%: se pesaron 2.5 g de hidróxido de sodio y 10 g de fenol en 100 ml de agua desionizada, manteniendo esta solución en la oscuridad y preparándola cada semana.

Para cuantificar la liberación de amonio en el medio, se utilizó el líquido resultante del filtrado obtenido en la técnica de peso celular seco; se colocaron 10 ml del filtrado en un tubo de ensaye, se agregó una gota de la solución de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, agitando constantemente y agregando 0.5 ml de la solución de NaClO; inmediatamente después se agregaron 0.6 ml de la solución de NaOH. La formación de un color azul en la muestra se desarrolló en aproximadamente 10 min siendo estable durante 24 h. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 630 nm.

La curva patrón se hizo con diferentes concentraciones de amonio y se tomaron lecturas a una longitud de onda de 630 nm en un espectrofotómetro BECKMAN DU-530 (Anexo F).

7.5 Pruebas preliminares in vitro en co-cultivo con plántulas de papaya y el consorcio de cianobacterias

7.5.1 Obtención y germinación de la semilla.

Se utilizaron semillas certificadas (Semillas del Caribe®). Para su germinación las semillas (700) se remojaron en agua destilada durante 48 h y solo las viables se colocaron en una manta húmeda previamente esterilizada, con el fin de mantenerlas húmedas y en oscuridad hasta que germinaron. El porcentaje de germinación obtenido fue de 74%.

7.5.2 Co-cultivo de plántulas con el consorcio de cianobacterias

Los germinados de papaya de 3 días de edad y una altura de tallo de 1.1 cm, se plantaron en frascos de vidrio de 400 ml con 60 ml de medio de cultivo sólido BG11₀ (ver cuadro 6), los tratamientos con diferentes concentraciones de KNO₃ fueron: 0M, 0.015 M y 0.025 M, ya plantadas (5 plántulas por frasco), se inocularon con 5 ml de cultivo de cianobacterias (5 días de edad) (N₀C₀, N₁C₀, N₂C₀). Los tratamientos (N₀C₁, N₁C₁, N₂C₁) no se inocularon con cianobacterias. Al final, las plántulas se mantuvieron en condiciones *in vitro* (temperatura de 22±1° C, fotoperíodo de 12:12 (luz-oscuridad), intensidad luminosa de 3,200 luxes).

Cuadro 6. Diseño experimental para la inoculación de cianobacterias en plántulas de papaya.

PLANTULAS DE PAPAYA		
NITRÓGENO	Plántulas sin cianobacterias (C ₀)	Plántulas con cianobacterias (C ₁)
Sin nitrógeno (N ₀)	N ₀ C ₀	N ₀ C ₁
0.015 M N ₂ (N ₁)	N ₁ C ₀	N ₁ C ₁
0.025 M N ₂ (N ₂)	N ₂ C ₀	N ₂ C ₁

7.5.3 Determinaciones de los parámetros fisiológicos del co-cultivo

Los parámetros fisiológicos de las plántulas se tomaron los días 0, 5, 11, 17, 24 y 34. Debido a la altura de las plántulas fue necesario utilizar 4 plántulas por tratamiento. Las pruebas destructivas se realizaron por triplicado y el resto por sextuplicado.

7.5.3.1 Longitud radicular y del tallo

Se escogieron al azar 4 plántulas de cada tratamiento, las cuales se lavaron perfectamente con agua destilada, para eliminar completamente el medio de cultivo. La longitud radicular se tomó del cuello del tallo hasta la punta de la raíz apical. La longitud del tallo se midió del cuello del tallo hasta la punta apical de cada planta.

7.5.3.2 Peso fresco y peso seco

A las plántulas que se seleccionaron previamente de cada tratamiento (7.5.5.1.), se pesaron en fresco utilizando una balanza analítica (AND[®] GR-120), posteriormente, las plántulas frescas se pusieron a secar en prensas con papel periódico por un periodo de tres días a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo y ya secas las plántulas, se pesaron en una balanza analítica para obtener su peso seco.

7.5.3.3 Extracción y cuantificación de Proteína total

Para la extracción de proteínas se maceraron 0.5 g de hojas en un mortero frío, con 10 ml de la solución extractora [2% PVP, 1mM EDTA, 50 mM de buffer de fosfatos (pH 7), 1mM de ácido ascórbico y 0.5% de tritón], se maceraron perfectamente y se centrifugaron a 6000 rpm, por 30 minutos a 4 °C en un equipo Hettich[®] MIKRO 22R. Una vez obtenido el extracto, se cuantificó de proteína total mediante el método de Lowry *et al.* (1951) descrito anteriormente (apartado 7.4.1.2.2).

7.5.3.4 Clorofila “a”, “b” y total

Para la determinación de clorofilas se realizó la extracción a un gramo de hojas cortadas finamente, las cuales se sumergieron en 10 ml de acetona fría al 80% y se mantuvieron en refrigeración por 30 minutos. Posteriormente, se trituraron por completo en un mortero frío y se centrifugaron a 6000 rpm por 30 minutos a 4°C en un equipo Hettich[®] MIKRO 22R. El sobrenadante se leyó a 2 longitudes de onda (665 y 645 nm), en un espectrofotómetro BECKMAN[®] DU-530.

El contenido de clorofila “a”, “b” y total (g/Kg) se calculó de acuerdo a Arnon (1949):

$$\text{Clorofila a} = 0.01270 A_{663} - 0.00269 A_{645}$$

$$\text{Clorofila b} = 0.0229 A_{645} - 0.00468 A_{663}$$

$$\text{Clorofila total} = 0.0202 A_{645} - 0.008$$

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 Caracterización fisicoquímica del suelo de cultivo de papaya

Los parámetros fisicoquímicos obtenidos del suelo muestreado en Bajos del Arenal, Santa María Huatulco, Oaxaca, fueron: pH, Textura, CIC, CE, CRA, Nitrógeno total, Nitratos, Nitritos, Densidad Aparente, Densidad Real, Fósforo y Materia Orgánica se presentan en el Cuadro 7.

8.1.1 pH

Los valores de pH obtenidos para el suelo muestreado, fueron de neutros a ligeramente alcalinos. El pH del suelo cercano a la planta de papaya (M_1) fue neutro, sin embargo, el suelo del pasillo (M_2) fue ligeramente alcalino (7.6), posiblemente debido a la aplicación de hidróxido de calcio, utilizado en las prácticas sanitarias que se realizan frecuentemente en ese lugar para el control de infecciones por hongos. El pH es un factor muy importante tanto para el crecimiento del cultivo de papaya (5.6 a 7.0) como para el establecimiento y diversidad de cianobacterias, las cuales generalmente se ha reportado que prefieren valores de pH neutros a ligeramente alcalinos (6.5 a 8.5) para su crecimiento óptimo (Singh, 1961; Kaushik, 1991). En este sentido, Okuda, Yamaguchi (1952) y Subrahmanyam *et al.* (1965) mostraron que a valores bajos de pH limitan su crecimiento; mientras que Roger *et al.* (1986) encontraron una correlación negativa entre el pH y la abundancia de cianobacterias fijadoras de nitrógeno en suelos cultivados con arroz, cuando estudiaron el efecto de la inoculación de cianobacterias en suelos ácidos (pH 5.7) y observaron que a pesar del alto nivel de inoculación, no resultó efectiva, ya que no se observó ningún crecimiento o florecimiento de cianobacterias.

8.1.2 Textura

La localidad de Bajos del Arenal se encuentra ubicada cerca de la playa, derivado de esto; la textura del suelo es arenosa (69% en M_4 hasta 94% en M_2). El alto contenido de arena da como resultado una gran cantidad de poros y con esto asegura que el suelo no presenta compactaciones y es friable cuando está húmedo. Lo anterior, facilita la labranza y favorece la penetración y establecimiento del sistema radicular del cultivo, así como el drenaje. Sin embargo, este tipo de suelo tiene poca de retención de nutrimentos y agua (CRA), debido al tamaño y cantidad de poros, y al bajo contenido de arcillas (2-9%); por lo que es un suelo adecuado para las plantas de papaya, ya que, requieren un contenido de arcillas del 10 al 30 % para un desarrollo adecuado. De la

textura del suelo, dependen otras características como son la densidad aparente y real, los valores obtenidos para las muestras de suelo indican que no son compactos.

8.1.3 Capacidad de intercambio catiónico (CIC)

La capacidad de intercambio catiónico obtenida en los suelos indica que la fertilidad dentro de un área determinada es variable bajo estudio, se puede observar desde muy baja, baja y media con valores de 0.8 CmolKg^{-1} (M_1), 13 CmolKg^{-1} (M_2), 17.5 CmolKg^{-1} (M_3) y 22.9 CmolKg^{-1} (M_4).

8.1.4 Conductividad eléctrica (C.E)

Por lo que respecta a la conductividad eléctrica (C.E), los valores obtenidos fueron de 0.7 dSm^{-1} (M_1) (equivalente a 448 mg/l) hasta 1.5 dSm^{-1} (M_2) (equivalente a 960 mg/l), lo que indica que estos suelos contienen niveles bajos de sales, lo cual beneficia al cultivo de papaya y aunado a esto, es importante señalar que los florecimientos de cianobacterias también se vieron favorecidos; tal como lo demostraron Rai *et al.* (2001), quienes trabajaron con altas concentraciones de sales como cloruro de sodio (NaCl), y encontraron que una dosis de 40 mM (equivalente a 1600 mg/l) de ésta sal, que puede inhibir el crecimiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno. Sin embargo, Soltani *et al.* (2007), observaron que *Fischerella* sp.FS18 mostró una halo tolerancia al NaCl al 1%, debido a la expresión de un conjunto de proteínas de estrés salino.

8.1.5 Capacidad de retención de agua (CRA)

El valor máximo de la capacidad de retención de agua (CRA), fue de 61% para la muestra del suelo M_3 y el valor mínimo de 38.7% en el suelo M_4 (terreno sin cultivos) tal porcentaje es el resultado de que no cuentan con plantaciones que puedan retener agua y por lo que no es necesario el riego constante en esa zona. Esta capacidad de retención varía de acuerdo al tipo de textura y con esto, tamaño de poro, ya que, entre más arcillas tenga un suelo, la cantidad de poros es mayor, pero de menor tamaño, reteniendo más agua que aquellos que tienen poros más grandes, como los arenosos. La CRA es un factor de importancia en la aplicación potencial de co-cultivos con cianobacterias, ya que el crecimiento, la fijación de nitrógeno atmosférico y la liberación de compuestos nitrogenados al co-cultivo, estarán en función de las altas demandas de agua que requiera el cultivo (Obreht *et al.*, 1997).

8.1.6 Nitrógeno total

El porcentaje de nitrógeno total encontrado en las muestras de suelo fue muy bajo, de 0.07% (M₁) hasta 0.55% (M₄). Los valores eran los esperados ya que, estos suelos al ser arenosos y tener un bajo contenido de arcillas; permiten una alta volatilización y lixiviación de nitrógeno. Lo anterior, concuerda con los resultados de nitratos y nitritos, que fueron muy bajos y se ve reflejado en la baja fertilidad del suelo que está en función del nitrógeno inorgánico presente; estos valores fueron desde 0.05 mg Kg⁻¹(M₃) hasta 0.2 mg Kg⁻¹ (M₂) para nitratos, y de 1.3 mgKg⁻¹ (M₃) hasta 5.1 mgKg⁻¹ (M₂) para nitritos. Debido a las bajas concentraciones de nitrógeno presentes en este tipo de suelos, los agricultores recurren a la adición de fertilizantes químicos, sin embargo, los trabajos de Roger y Reynaud, 1979; Mahapatra *et al.*, 1971 demostraron que el crecimiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno se ve influenciado por la calidad y cantidad de los fertilizantes nitrogenados. Los mismos autores observaron que la fertilización con nitrógeno y fósforo tiene un efecto positivo sobre el crecimiento total de la biomasa algal, pero no en las cianobacterias fijadoras de nitrógeno, ya que estas se ven favorecidas en ausencia de fertilizantes nitrogenados. Lo anterior fue comprobado por Okuda y Yamaguchi (1952), quienes probaron que la flora de cianobacterias fijadoras de nitrógeno abunda en suelos no fertilizados con nitrógeno. Es importante señalar que, la papaya es un cultivo con altos requerimientos de este nutriente (2500 g N / planta / año) y sin embargo, se encontró este tipo de cianobacterias en el mismo.

8.1.7 Fósforo disponible

Como en la mayoría de los suelos de México, la concentración de fósforo (P) disponible en estos suelos es baja. Se presentaron valores bajos de P: 0.8 mg Kg⁻¹ en M₁, 3 mg Kg⁻¹ en M₂, 1.5 mg Kg⁻¹ en M₃ y 1.1 mg Kg⁻¹ en M₄. El fósforo es necesario para el desarrollo celular, tanto de la planta, como de microorganismos, como las cianobacterias. Así lo demostró Arora (1970), quien encontró que los requerimientos de fósforo para el crecimiento óptimo de cianobacterias varían con respecto a la especie, además; mostró que las cianobacterias asimilan más fósforo del que requieren, almacenándolo en forma de polifosfato, el cual es probable que sea utilizado bajo condiciones de deficiencia de este nutriente. De igual modo, Stewart *et al.* (1979) encontraron que *Anabaena* y *Tolypothrix* fijan más nitrógeno en presencia de fosfato. Posteriormente, Roger *et al.* (1986), encontraron una correlación positiva entre la abundancia de cianobacterias y el contenido de P disponible.

8.1.8 Materia orgánica

Los suelos muestreados presentaron contenidos muy bajos de materia orgánica (1.42-2.18 %), estos valores se relacionan con la CIC y la textura. Los suelos con textura arenosa o gruesa tienden a presentar niveles bajos de materia orgánica.

8.2 Cianobacterias obtenidas del suelo con cultivos de papaya

En todos los suelos muestreados (M₁, M₂, M₃ y M₄) se encontraron 2 géneros de cianobacterias fijadoras de nitrógeno: *Nostoc* sp. y *Fischerella* sp. Los géneros encontrados tienen las características de ser filamentosos y presentar heterocitos (Figura 4).

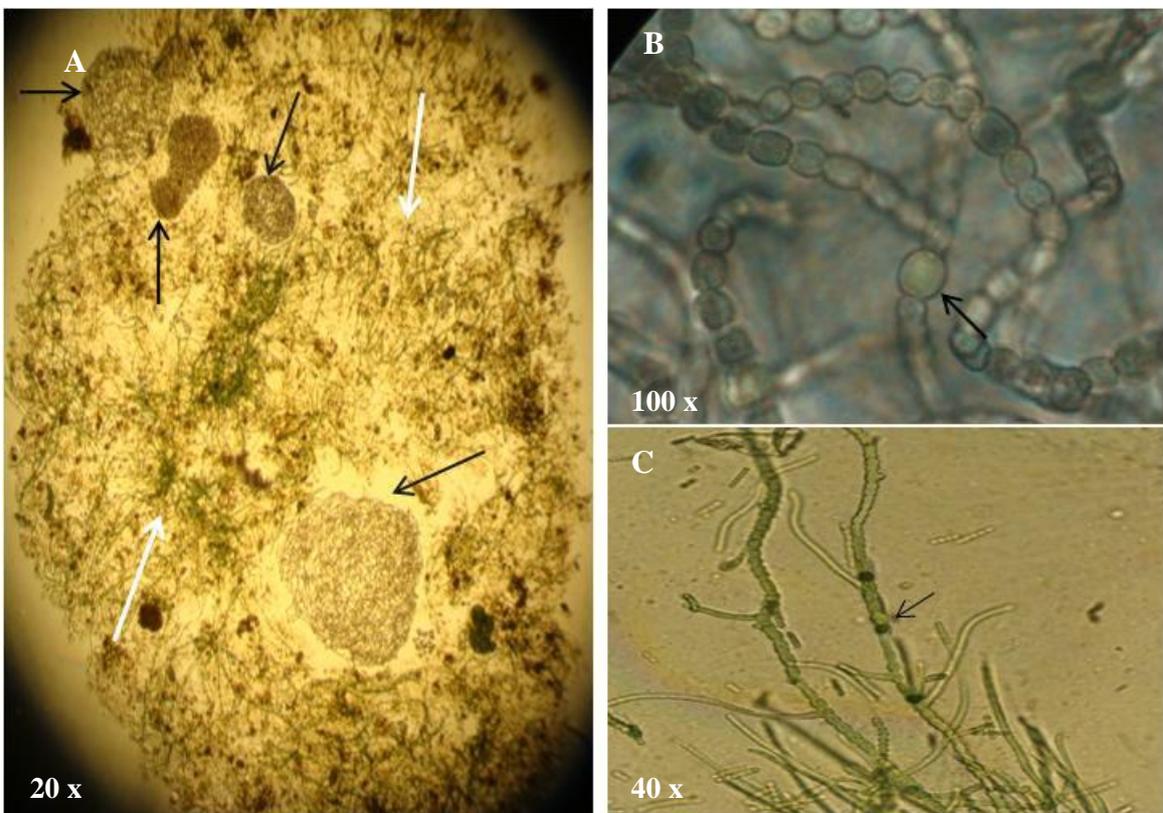


Figura 4. Cianobacterias encontradas en suelos con cultivos de papaya. A) Colonias de *Nostoc* sp. (flechas negras) y *Fischerella* sp.(flechas blancas). B) *Nostoc* sp. y C) *Fischerella* sp. Las flechas indican a los heterocitos.

Cuadro 7. Características fisicoquímicas de los suelos de cultivos de papaya, en los cuatro puntos muestreados (M₁: Planta y pasillo, M₂: Pasillo, M₃: Planta, M₄: Suelo sin cultivar) (medias de los resultados y su desviación estándar) (C.E= Conductividad eléctrica, CRA=Capacidad de retención de agua, CIC= Capacidad de intercambio catiónico, P= fósforo disponible).

Parámetro (unidades)	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄
pH	6.9±0.03	7.6±0.06	7.2±0.01	7.3±0.01
C.E (dS/m)	0.7±0.17	1.4±1.37	1.5±0.71	0.3±0.02
Densidad aparente (g/cm ³)	0.3±0.05	0.4±0.06	0.4±0.06	0.4±0.05
Densidad real	2.6±0.20	2.5±0.14	2.4±0.18	2.3±0.23
Espacio poroso(%)	84.8±2.82	83.9±2.40	83.7±2.14	84.8±2.82
Arcilla (%)	5.0±0.90	8.0±0.20	9.0±0.01	2.0±0.99
Limo (%)	7.0±3.67	13.0±2.30	22.0±7.97	4.0±2.32
Arena (%)	88.0±2.90	79.0±2.47	69.0±7.70	94.0±2.00
Textura	Areno franco	Areno franco	Franco arenoso	Arena
CRA (%)	40.3±2.08	57.0±3.61	61.0±2.64	38.7±2.52
CIC (CmolKg ⁻¹)	0.8±0.25	13.0±10.83	17.5±15.53	22.9±1.91
P disponible (mg/Kg de P)	0.8±0.05	3.0±0.20	1.5±0.13	1.1±0.09
NO ₃ ⁻ (mg/Kg)	0.1±0.02	0.2±0.02	0.05±0.13	0.07±0.01
NO ₂ ⁻ (mg/Kg)	2.7±0.27	5.1±0.69	1.3±0.55	2.4±0.62
Nitrógeno total (%)	0.07±0.05	0.19±0.07	0.14±0.05	0.55±0.09
Materia orgánica (%)	1.54±0.78	1.42±0.67	1.54±0.86	2.18±0.57
Presencia de cianobacterias	si	si	si	si

8.3 Aislamiento de cianobacterias fijadoras de nitrógeno

El aislamiento del consorcio de cianobacterias se logró con el conjunto de técnicas de: diluciones seriadas, lavado de filamentos, transferencia en bloque de agar invertido y deslizamiento y fototactismo. Se aislaron 2 géneros (Figura 5), los cuales presentaron formas diferentes de distribución de las colonias en placas de medio sólido.

8.4 Identificación morfológica de las cianobacterias obtenidas

El comportamiento del cultivo se examinó con base a su morfología, en diferentes estados de crecimiento, en medio sólido BG-11₀. La naturaleza de los filamentos, forma y tamaño de las células vegetativas, heterocitos y acinetos, se describieron de acuerdo a Allison (1937) y Holt *et al.* (1994), los géneros identificados fueron: *Nostoc* sp y *Fischerella* sp. A continuación se presentan las características de cada género encontrado:

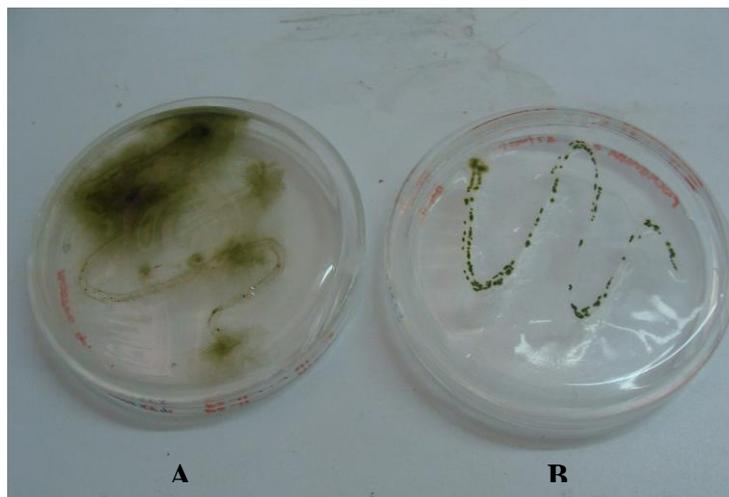


Figura 5. Crecimiento de colonias de los géneros de cianobacterias: A) *Nostoc* sp. y B) *Fischerella* sp.

Nostoc sp.

Clase: Cyanophyceae

Orden: Nostocales

Familia: Nostocaceae

Características: Colonias sobre el agar son de aspecto rugoso, viscoso y de color verde oliva a verde oscuro.

Tricomas: Filamentos ligeramente curvados de células esféricas, cilíndricas u ovoides. El diámetro del tricoma varía con la especie: 2-8µm. La desintegración de tricomas en células solitarias es comúnmente observada (Fig. 6). En los cultivos jóvenes se encontraron tricomas ligeramente rectos y en cultivos viejos los tricomas o filamentos se rompen.

Células: Las células vegetativas son de formas variadas: esféricas, barril y cilíndricas, midiendo 2.5-4 µm de ancho, 3.5-5 µm de largo. Las células jóvenes son usualmente en forma de barril, mientras que las células viejas son redondas u ovals.

Heterocitos: Son de forma casi redonda de 5-7 µm de diámetro. Se encuentran intercalados y terminales en las células vegetativas, usualmente se encuentran uno o tres por tricoma, pero ocasionalmente pueden ser hasta veinte. A partir del día 17 comienzan a desarrollar heterocitos.

Acinetos: Ligeramente ovals 5-7µm de longitud y 4.5-5 µm de ancho. Se observa contenido granular. Se aprecian a partir del día 25.

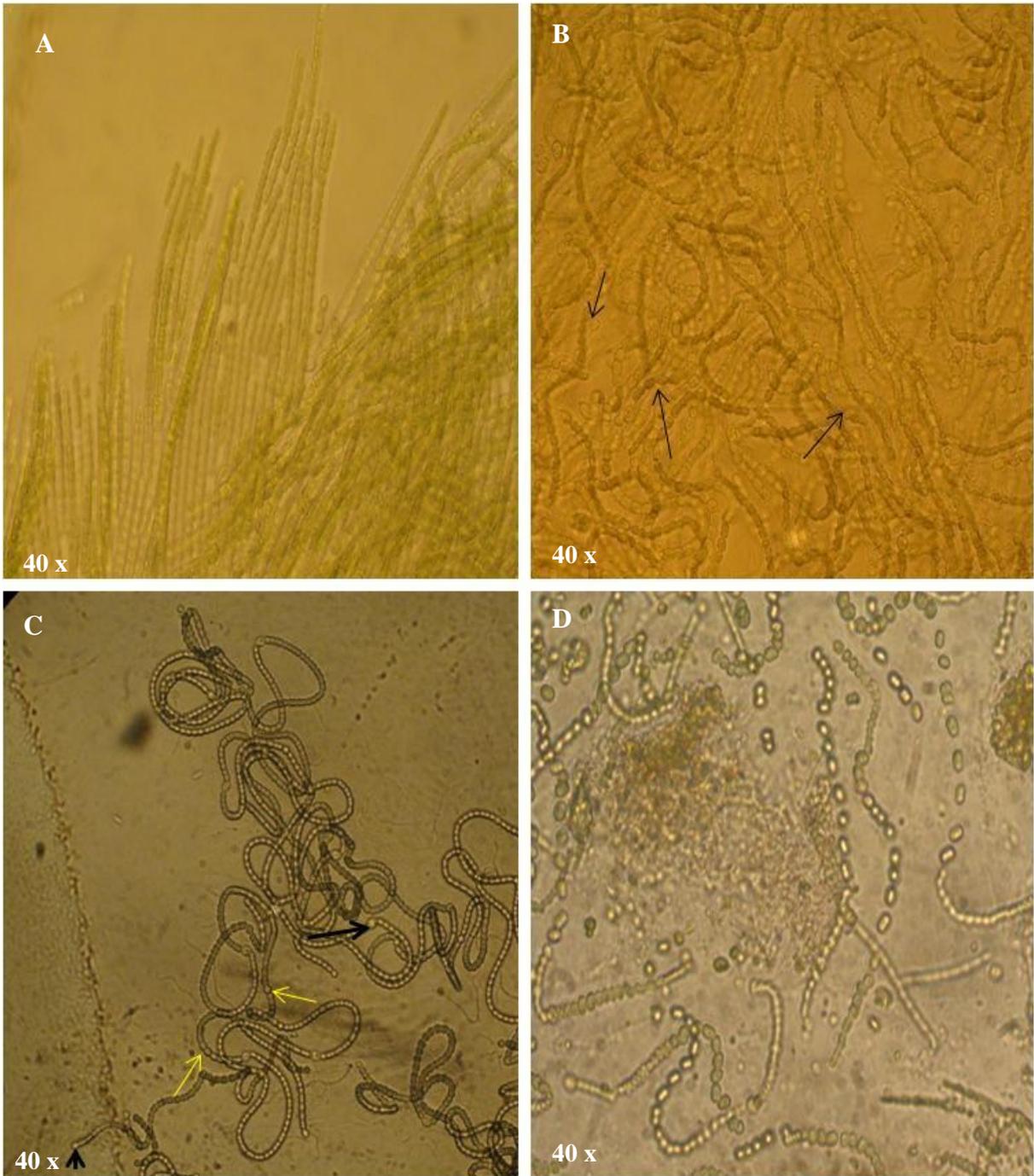


Figura 6. Características de las células de *Nostoc* sp. cultivadas en medio sólido BG-11₀ a diferentes edades (Imagen sin filtro). A) Tricomas jóvenes de 12 días de edad. B) Tricomas comenzando a desarrollar heterocitos (flechas negras) terminales e intercalados (17 días). C) Estado de crecimiento del organismo, desarrollo de acinetos (flechas amarillas) (25 días). D) Tricomas viejos, las células vegetativas comienzan a separarse (40 días).

Fischerella sp.

Clase: Cyanophyceae

Orden: Stigonematales

Familia: Stigonemataceae

Características: Presenta ramificaciones verdaderas, no son seriadas y están compuestas de células generalmente más largas que anchas. (Figura 7).

Tricomas: El tricoma primario del cual surgen las ramificaciones es, no aseriado, puede convertirse en multiseriado en partes, con divisiones en más de un plano.

Células: Las células de los ejes comienzan a alargarse a menudo a formas semiesféricas. En tricomas maduros las células se dividen a más de un plano para producir nuevos tricomas multiseriados con ramificaciones laterales no aseriados.

Heterocitos: Se desarrollan en las ramificaciones casi exclusivamente en posición intercalar, mientras que en el tricoma principal son predominantemente terminales o laterales.

Acinetos: Las células viejas de un eje principal pueden separarse cada una del material de cubierta y puede actuar como acinetos (pseudoacinetos). Los acinetos típicos de las cianobacterias (orden Nostocales), no son fácilmente reconocibles.

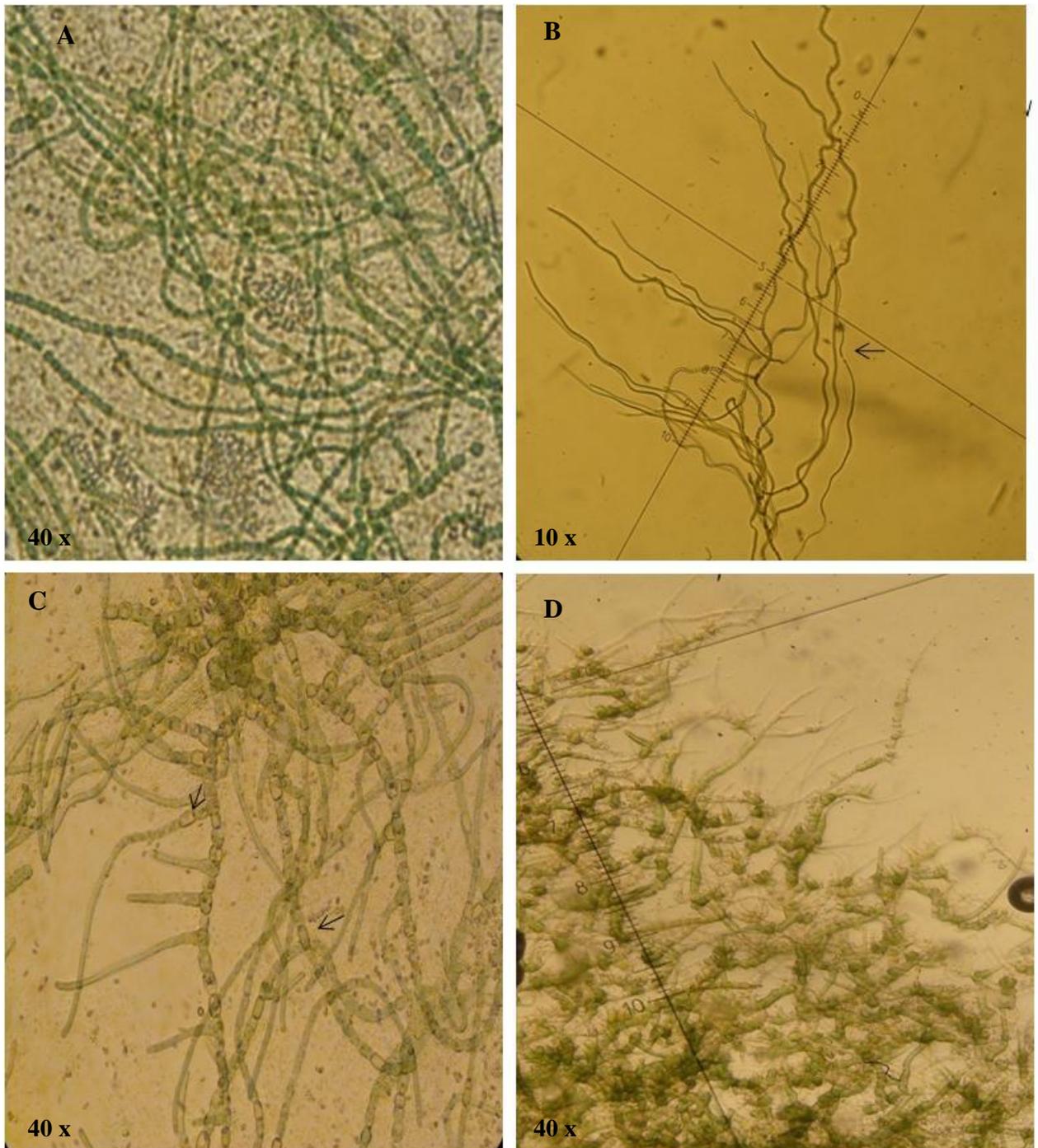


Figura 7. Características de las células de *Fischerella* sp. cultivadas en medio sólido BG-11₀ a diferentes edades (Imagen sin filtro). A) Tricomas jóvenes (12 días). B) Tricomas con ramificaciones desarrolladas, comienzan a aparecer los heterocitos (21 días). C) Estado de crecimiento de *Fischerella* (25 días). D) Tricomas viejos (40 días).

La limitación para la identificación hasta género se debió a que las cianobacterias exhiben un alto grado de complejidad morfológica, fisiológica y de desarrollo, tal y como lo describieron Prasanna *et al.* (2006), quienes con cepas del género *Anabaena*

presentan una variabilidad en las características de cultivo y bioquímicas entre ellas, aunque las condiciones de cultivo sean las mismas. Por otro lado, Li (1998) observó que algunas características morfológicas de *Anabaena* cambian y no siempre pueden ser expresadas en el cultivo.

Derivado de ésta complejidad la identificación morfológica no es suficiente, haciendo necesario el uso de otras técnicas como las bioquímicas y moleculares, sin embargo; aún con éstas técnicas la identificación sigue siendo compleja, en este sentido, Rippka *et al.* (2001) identificaron la cepa PCC 7120 de *Anabaena* usando técnicas moleculares, el resultado muestra un alto grado de similaridad de DNA con *Nostoc*.

8.5 Cinéticas de crecimiento

Se observaron diferencias en cuanto al tiempo que tomó a la cianobacteria para desarrollarse en medio líquido y sólido, en medio líquido con y sin nitrógeno le llevó 2 días, en cambio; en medio sólido con y sin nitrógeno se tardó 10 y 17 días respectivamente.

A continuación se describen los parámetros de crecimiento.

8.5.1 Cinética en medio sólido

8.5.1.1 Clorofila “a”

El consorcio de cianobacterias mostró su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, al crecer en medio libre de este elemento, sin embargo, existieron diferencias significativas entre los tratamientos ($F_{(5,24)}=3.46$, $p<0.05$) con y sin nitrógeno. Las cianobacterias en el medio de cultivo sin nitrógeno mostraron una producción de clorofila “a” 1.9 veces menor durante los primeros 17 días (Figura 8). Para el día 21, la concentración de éste pigmento empezó a aumentar y para el día 26 fue 1.5 veces mayor que las que contaban con nitrógeno, esta diferencia en la velocidad de crecimiento obedece al proceso de fijación de nitrógeno ya que; las cianobacterias primero deben fijarlo y después utilizarlo para sus actividades metabólicas (Lewitus y Caron, 1990), la difusión del aire en las cajas fue mínimo, por lo que las cianobacterias no contaban con el aire suficiente para fijar el nitrógeno necesario para su crecimiento.

8.5.1.2 Proteína Total

En cuanto a la producción de proteínas (Figura 9), existieron diferencias significativas en los tratamientos ($F_{(5, 24)} = 49.77, p < 0.05$). Las cianobacterias que se encontraban en medio de cultivo con nitrógeno presentaron 3.8 veces más proteínas que las que no contaban con este nutriente, esto, debido a la necesidad del nitrógeno en la síntesis de proteínas, por lo que las cianobacterias que no contaron con este elemento, tuvieron que fijarlo primero para después utilizarlo en su metabolismo, sin embargo, las condiciones de las cajas de Petri no permitieron la difusión del aire de manera adecuada, limitando la entrada de CO_2 y nitrógeno atmosférico el crecimiento de las cianobacterias. (Lagunas-García 2003). Durante los primeros 15 días del cultivo, se observó una producción alta de proteínas lo cual se ve reflejado en el crecimiento, sin embargo, existe una caída posterior y puede estar relacionado a que el nitrógeno ya que se requiere para el mantenimiento celular (fase estacionaria) y el resto se redirecciona hacia el metabolismo secundario para la producción de alcaloides utilizados por la cianobacteria como mecanismo de defensa (Muratake y Natsume, 1990; Park *et al.*, 1992; Hagmann y Jüttner, 1996; Papke *et al.*, 1997; Srivastava *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 1999).

8.5.2 Cinética en medio líquido

8.5.2.1 Absorbancia total

La capacidad de crecimiento del consorcio de cianobacterias mostró una versatilidad fisiológica para adaptarse a medios de cultivo carentes de nitrógeno, en donde su crecimiento a bajas concentraciones de nitrato es compensado por su propiedad fijadora de nitrógeno (Loreto *et al.*, 2003). Sin embargo, existieron diferencias significativas ($F_{(21, 86.70)} = 197.52, p < 0.05$), ya que el crecimiento de las cianobacterias fue mayor en medio de cultivo con nitrógeno (Figura 10). En ambos tratamientos, la fase exponencial inició en el segundo día, pero las cianobacterias sin fuente de nitrógeno alcanzaron la fase estacionaria al día 4, mientras que las que contaban con nitrógeno la alcanzaron hasta el día 22. Es importante señalar que el sistema de aireación no permitió una difusión homogénea, y el tamaño de la burbuja no fue el adecuado en los matraces por lo que las cianobacterias tendieron a sedimentarse. Los cultivos que contaron con nitrógeno en el medio de cultivo crecieron, mientras que; las que carecieron de este no crecieron adecuadamente, utilizando el nitrógeno fijado para mantener su metabolismo. Loreto *et al.*, 2003, cultivaron una cepa de *Anabaena* a diferentes concentraciones de NaNO_3 en cultivos discontinuos, encontraron los valores máximos de absorbancia a una concentración de 8mM de 0.62 ± 0.02 , mientras que para 0 mM fue de 0.29 ± 0.02 .

8.5.2.2 Peso celular seco

Por lo que respecta al crecimiento en biomasa, éste, se vio reflejado en el peso seco, en la Figura 11 se observa que después del día 8, el tratamiento con nitrógeno tuvo un incremento de 2.8 veces más, respecto a las que no contenían nitrógeno en el medio de cultivo ($F_{(7,32)} = 235.45, p < 0.05$), alcanzando la fase de muerte a partir del día 19. Este comportamiento se asocia con el contenido de proteínas y de clorofila, ya que está directamente relacionado a la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo. Arredondo *et al.* (2007), reportaron que el peso seco está relacionado principalmente con las proteínas, las cuales, representan más del 50% en peso seco de las cianobacterias. El pico que se observa en la línea correspondiente al cultivo sin nitrógeno posiblemente se debió a que, los filamentos de las cianobacterias forman conglomerados lo que dificultó la toma homogénea de muestra.

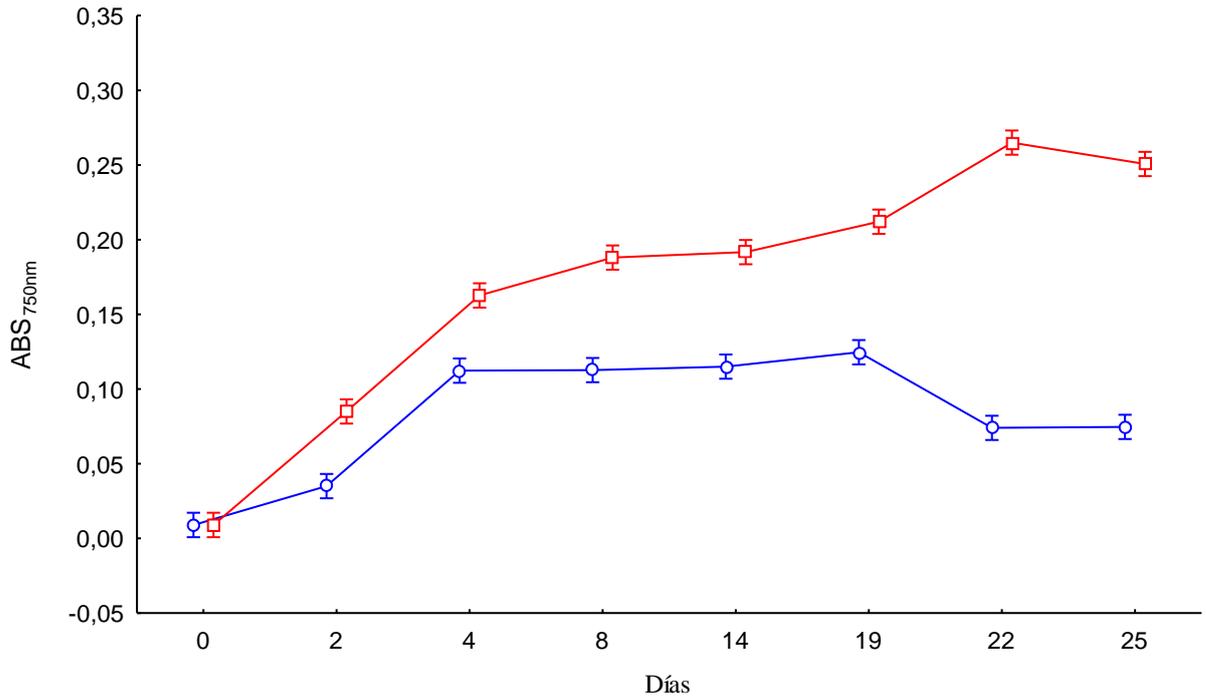


Figura 10. Curva de crecimiento por turbidez (DO 750 nm) del consorcio de cianobacterias, en medio líquido con (□) y sin nitrógeno (○).

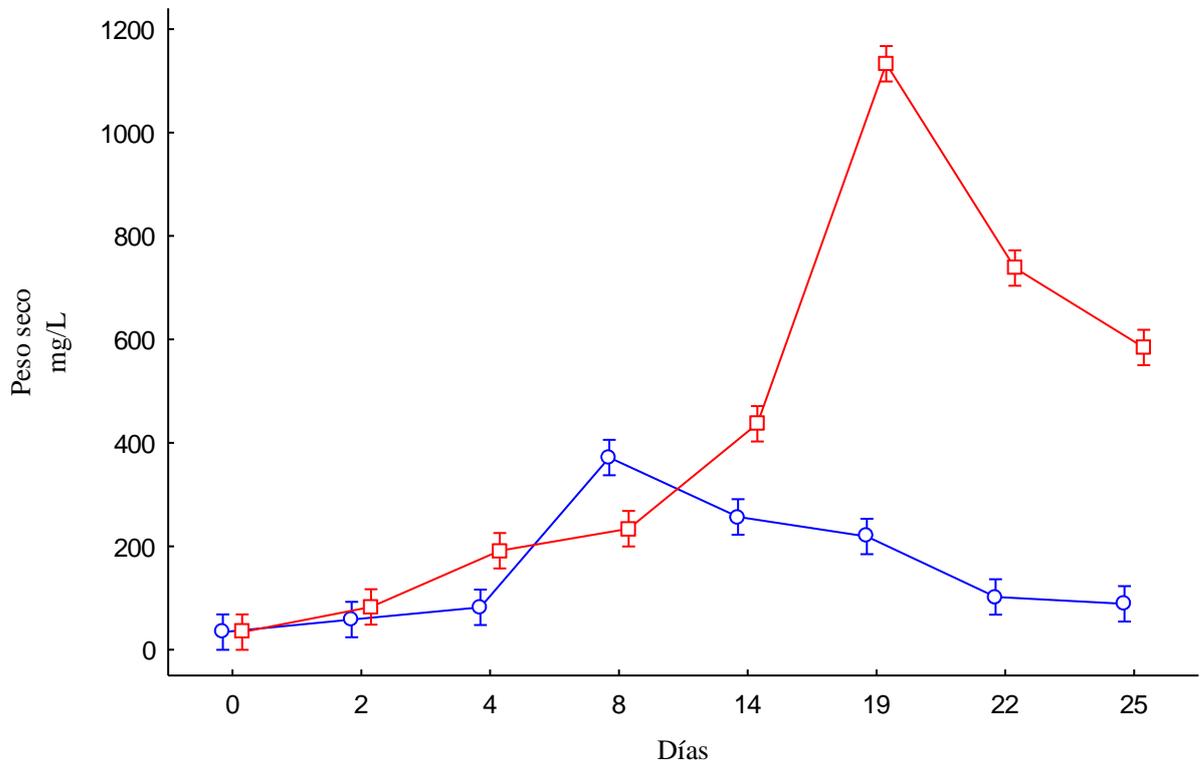


Figura 11. Peso seco (mg/L) del consorcio de cianobacterias, en medio líquido con (□) y sin nitrógeno (○).

8.5.2.3 Clorofila “a”

En la Figura 12 se aprecia una diferencia significativa ($F_{(7, 32)} = 575.33$, $p < 0.05$) entre los tratamientos con y sin nitrógeno, obteniéndose una producción de 8.3 veces más clorofila “a” en medio con nitrógeno. Esto demuestra que el contenido de clorofila “a” se ve influenciado por la presencia de nitrógeno en el medio, ya que la baja producción de este pigmento obedece a la deficiencia del elemento, el cual forma parte de la estructura de la clorofila. Debido a esto, las cianobacterias inician con el proceso de degradación, a fin de movilizar el nitrógeno hacia rutas metabólicas inherentes al crecimiento y síntesis de otras macromoléculas (Lewitus y Caron 1990). En trabajos previos con cianobacterias Loreto y Morales (2003), evaluaron la producción de clorofila “a” en *Anabaena* en cultivos semi continuos, ellos encontraron una producción de 7.07 $\mu\text{g/ml}$ (entre 21 y 27 días) de este pigmento con una tasa de renovación del volumen de 30 % y una concentración de 8 mM de NaNO_3 , un valor de producción 2.36 veces arriba del que se encontró en este estudio. Mientras que Prasanna *et al.* (2006), obtuvieron producciones de este pigmento de 0.11 a 3.4 $\mu\text{g/ml}$ en cepas de *Anabaena*, cultivadas en medio sin nitrógeno, en estado estacionario, con lo cual se aprecian valores similares a los te obtenidos en este estudio, con la diferencia que tales valores se alcanzaron en presencia de nitrógeno.

8.5.2.4 Proteína Total

Por lo que respecta a la síntesis de proteína total, se encontraron diferencias significativas ($F_{(7, 32)} = 7.85$, $p < 0.05$) entre los tratamientos, en el medio de cultivo con nitrógeno (Figura 13), la concentración de proteínas fue 3.8 veces más respecto a las que carecieron del nutriente. Esto se debió a que la concentración intracelular de proteínas depende directamente de la presencia de nitrógeno en el medio. En este sentido, Loreto *et al.* (2003) no detectaron contenido de proteínas en *Anabaena* en cultivo semi continuo con una tasa de renovación en volumen del 30% y una concentración de 8 mM de NaNO_3 . Mientras que en cultivos en lote, estos autores adicionaron 8 mM y 0 mM de NaNO_3 en el medio y reportaron una producción de proteínas de 563 ± 2 $\mu\text{g/ml}$ y 211 ± 23 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

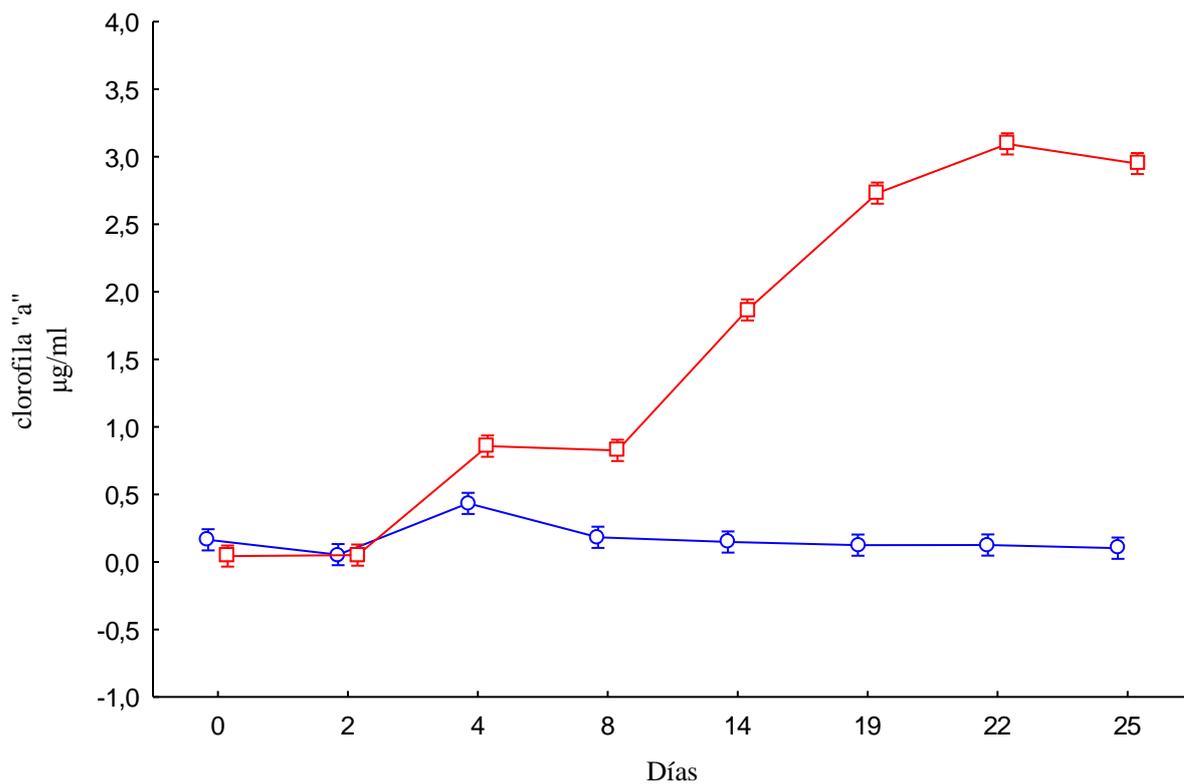


Figura 12. Contenido de clorofila a ($\mu\text{g/ml}$) del consorcio de cianobacterias, en medio líquido con (\square) y sin nitrógeno (\circ).

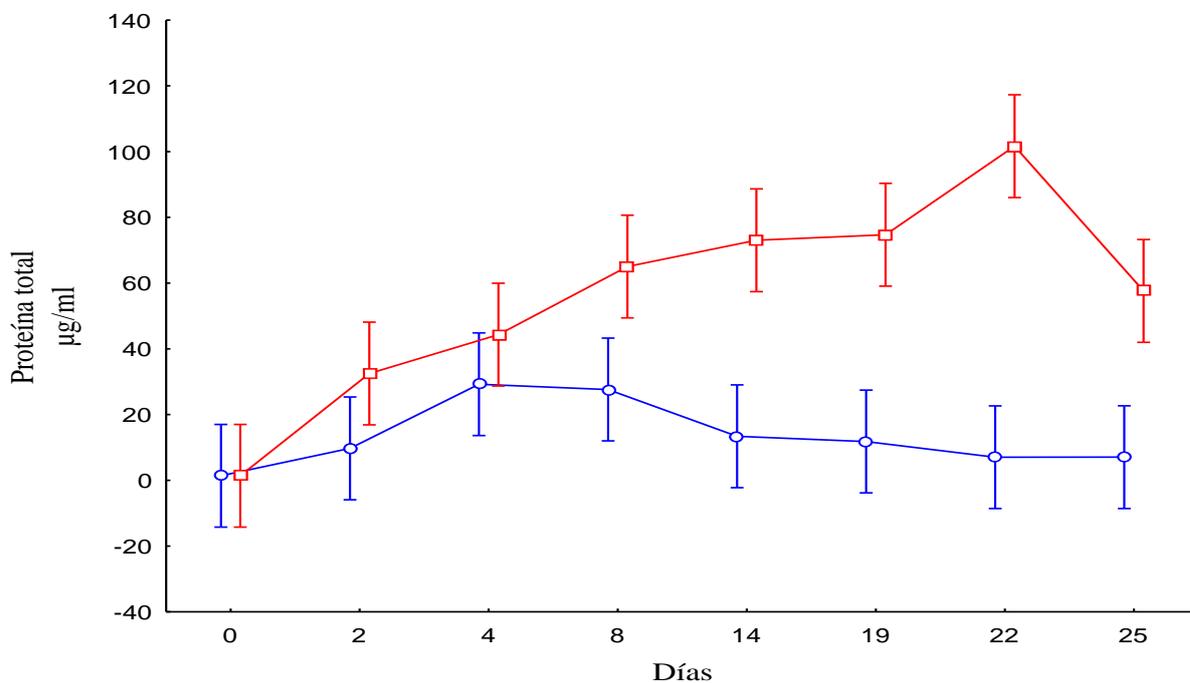


Figura 13. Contenido de proteínas ($\mu\text{g/ml}$) del consorcio de cianobacterias, en medio líquido con (\square) y sin nitrógeno (\circ).

8.5.2.5 Amonio disuelto

La liberación de amonio al medio mostró diferencias significativas ($F_{(7, 32)} = 73.82$, $p < 0.05$) entre los tratamientos (Figura 14), las cianobacterias con nitrógeno (15 mM de NO_3^-) liberaron 2.7 veces más amonio que el tratamiento sin nitrógeno (en todo el experimento), durante la cinética se observó una caída en la concentración de amonio (día 9) en cianobacterias con nitrógeno, esto pudo suceder por un error en la medición. Esto muestra que, la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo no inhibió la actividad de la nitrogenasa, ya que existió la reducción de nitrato a amonio, encontrándose por arriba de las cianobacterias cultivadas sin nitrógeno ($0.3 \mu\text{gml}^{-1}$). A este respecto, Ohmori y Hattori (1972), mostraron que en cultivos de *Anabaena cylindrica* Lemm las concentraciones por arriba de 2×10^{-2} M de nitrato, no inhiben la actividad de la nitrogenasa ni reprimen su formación. Posteriormente Spiller *et al.*, (1986), encontraron que en *Anabaena variabilis*, la síntesis de la nitrogenasa no fue sensible al nitrato en el medio a una concentración de 15 mM.

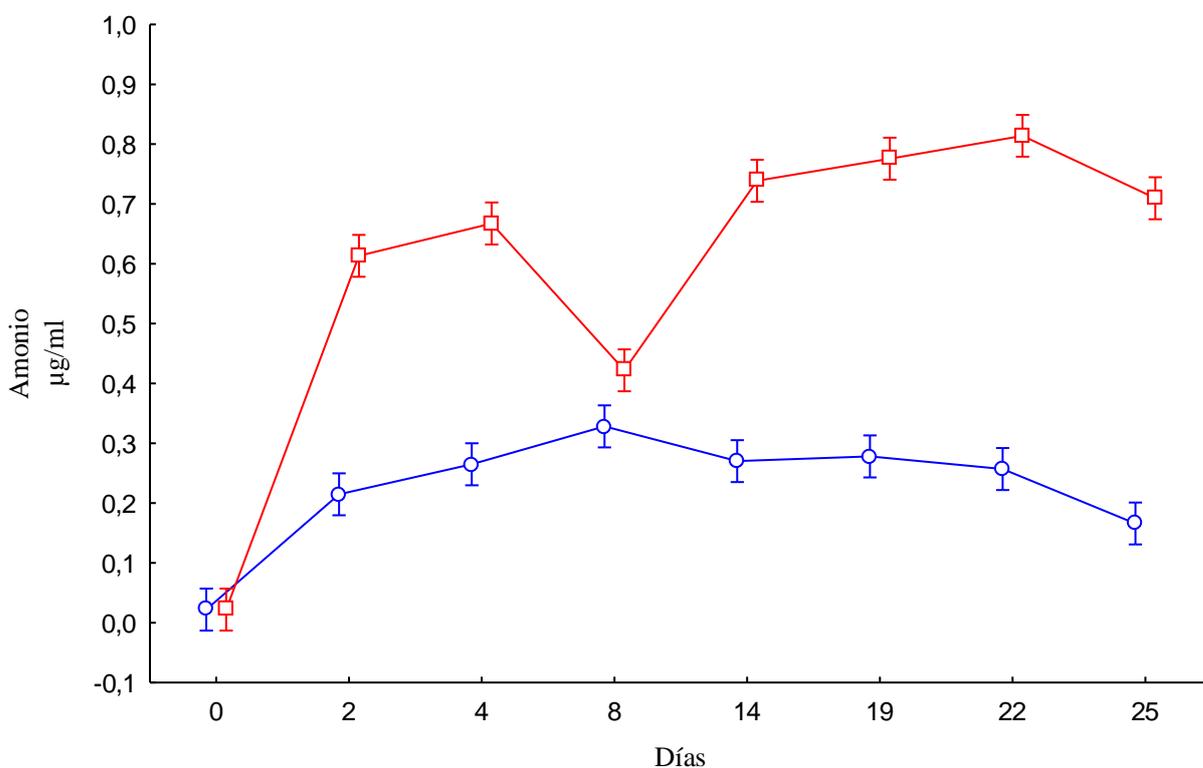


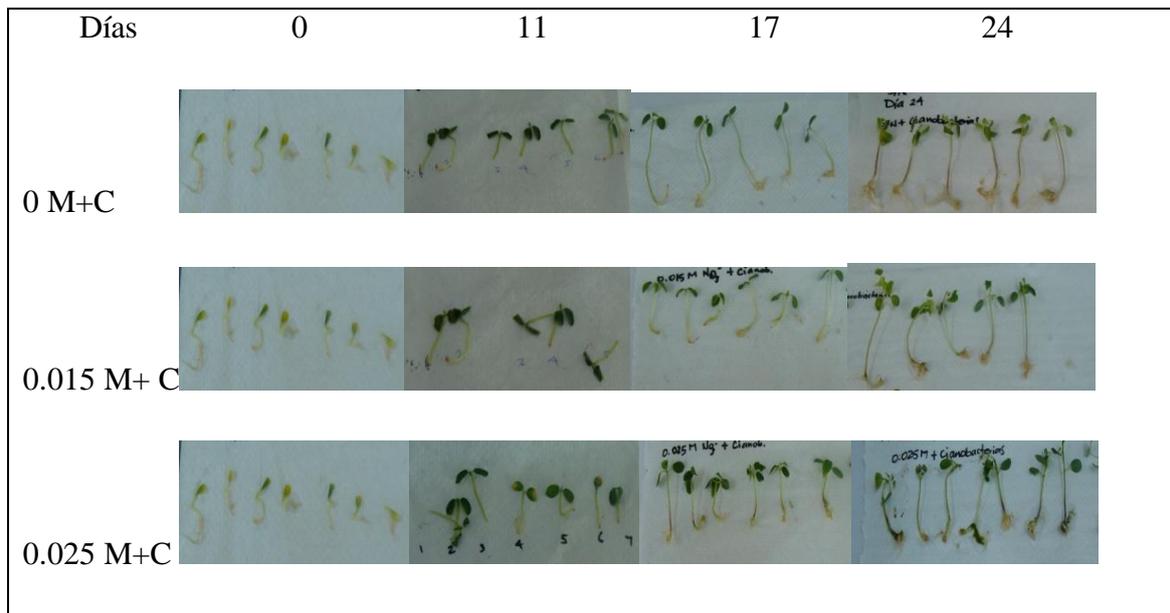
Figura 14. Liberación de amonio al medio de cultivo por el consorcio de cianobacterias, en medio líquido con (□) y sin nitrógeno (○).

8.6 Determinaciones de los parámetros fisiológicos de las plántulas en el co-cultivo

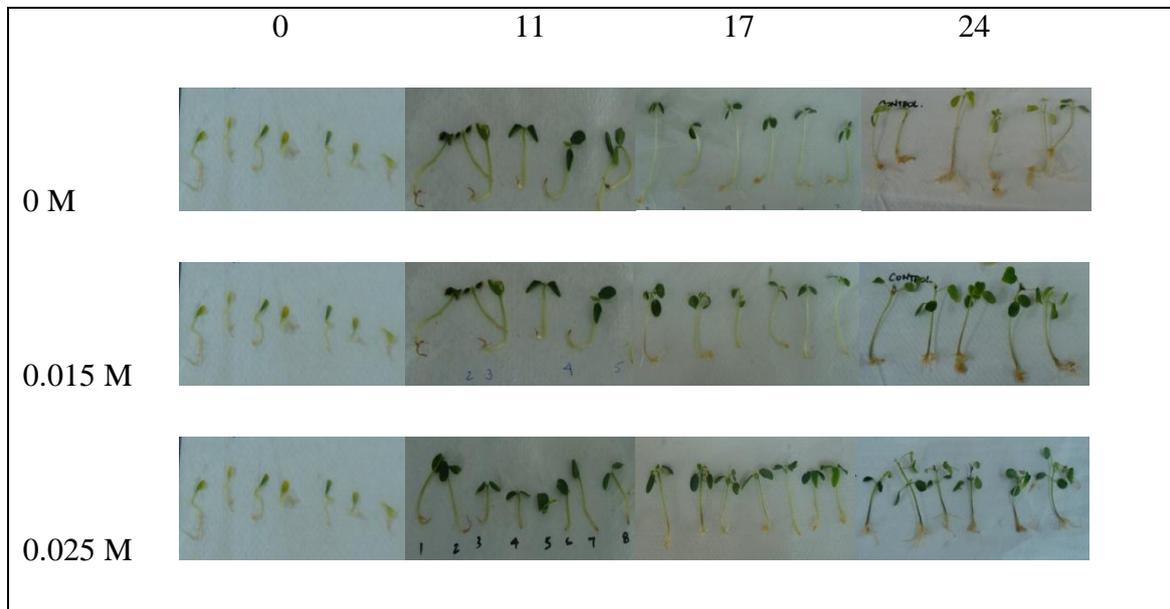
8.6.1 Longitud radicular

Las longitudes radiculares de las plántulas en los tratamientos sin nitrógeno ni cianobacterias (N_0C_0) y con cianobacterias (N_0C_1), presentaron diferencias significativas ($F_{(160, 410.13)}=61.84, p<0.05$) respecto a los demás tratamientos 0.015M de NO_3^- con cianobacterias (N_1C_1), 0.015M de NO_3^- , sin cianobacterias (N_1C_0), 0.025M de NO_3^- con cianobacterias (N_2C_1) y 0.025M de NO_3^- sin cianobacterias (N_2C_0) (Figura 16), estas diferencias se encontraron a partir del día 11. El tratamiento N_0C_0 alcanzó la longitud radicular 2.8 veces respecto a N_1C_0 y 3.8 veces a N_2C_0 . Por lo que respecta al tratamiento N_0C_1 , fue mayor 3.1 veces que el tratamiento N_1C_1 y 3.7 veces al tratamiento N_2C_1 . Sin embargo, entre los tratamientos N_0C_0 y N_0C_1 , N_1C_0 y N_1C_1 , N_2C_0 y N_2C_1 , no existió diferencia significativa ($p>0.05$) a lo largo del experimento (Fig. 15).

En trabajos similares Obreht *et al.* (1997), trabajaron co-cultivos con cepas de *Anabaena* y *Nostoc* en cultivos de maíz, trigo, frijol, arroz y caña de azúcar, encontraron que la plantación en medio libre de nitrógeno, llevó a un alargamiento radicular, como respuesta a la carencia de nutrientes, también mostraron que al inocular las plantas con la cepa 2S9B de *Nostoc* tuvieron disminuciones en la longitud radicular, lo cual se asoció como indicador de la liberación de compuestos de nitrógeno de la cianobacteria al medio.



(A)



(B)

Figura 15. Co-cultivo de plántulas de papaya con el consorcio de cianobacterias. (A) plántulas a diferentes concentraciones de nitrato e inoculadas con cianobacterias. (B) plántulas a diferentes concentraciones de nitrato sin presencia de cianobacterias

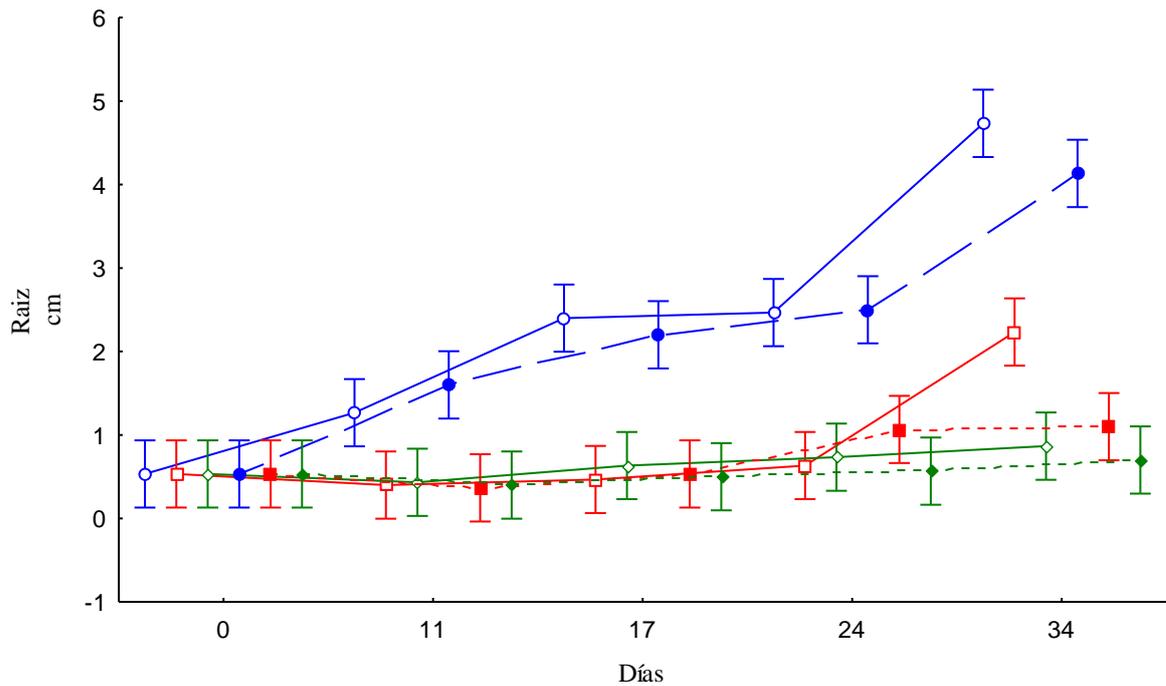


Figura 16. Longitud radicular a diferentes tratamientos: N₀C₀ (●), N₁C₀ (■), N₂C₀ (◆), N₀C₁ (○), N₁C₁ (□), N₂C₁ (◇).

8.6.2 Longitud del Tallo

Las longitudes de los tallos presentaron diferencias significativas ($F_{(160, 410.13)}=61.84$, $p<0.05$) durante los 34 días del experimento, los tratamientos N₀C₁ y N₀C₀ fueron los que alcanzaron mayor longitud en el tallo (Figura 17), seguidos por N₁C₁ y N₁C₀. Los tratamientos con mayor concentración de nitrógeno (N₂C₁ y N₂C₀) fueron los que mostraron longitudes menores. En este sentido, Obreht *et al.* (1993), trabajaron en co-cultivos de trigo inoculados con cepas de *Anabaena*, en medios libre de nitrógeno y con una concentración de 17 mM de nitrato. Observaron que las longitudes de tallos fueron menores cuando las plantas crecieron en ausencia de nitrógeno combinado y de la cianobacteria *Anabaena*, al evaluar la eficiencia de la inoculación con la cepa en cultivos libres de nitrógeno, no encontraron un incremento en la longitud del tallo. Sin embargo, cuando se inoculó con la cianobacteria en medio con nitrógeno, hubo un incremento significativo en la longitud de estos, comparado con el control (medio con nitrógeno, sin *Anabaena*). Posteriormente, Obreht *et al.* (1997), mostraron que en co-cultivos de frijol y arroz con *Anabaena*, existió un aumento en la longitud del tallo comparadas con las plantas que crecieron en ausencia de la cianobacteria y de nitrógeno en el medio.

En el presente trabajo, se observó que las plantas en el medio de cultivo sin nitrógeno alcanzaron las mayores longitudes del tallo, lo cual, es probable que sea debido a una respuesta al estrés; ya que la falta de nitrógeno ocasiona envejecimiento prematuro a la planta, por lo que acelera su crecimiento (Schulze *et al.*, 2002). Además que, la longitud del tallo no se reflejó en el peso seco como una medida de crecimiento; por lo que se puede relacionar con las condiciones de cultivo *in vitro*. El cual se ha descrito que puede causar alteraciones como la hiperhidricidad que es un trastorno fisiológico caracterizado por la alta retención de agua a causa de condiciones adversas para el cultivo (Fal *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2000), y en este trabajo además de lo anterior se suma la falta de nitratos en el medio.

Por otro lado, Spiller y Gunasekaran (1990), evaluaron la influencia de la cepa mutante *Anabaena variabilis* con plantas de trigo en cultivos hidropónicos, ellos concluyeron que existen dificultades de crecimiento de las plantas con la cianobacteria, por lo que es necesario un sistema que ofrezca alta humedad y buena aireación en la zona de la rizósfera, siendo el cultivo hidropónico el adecuado.

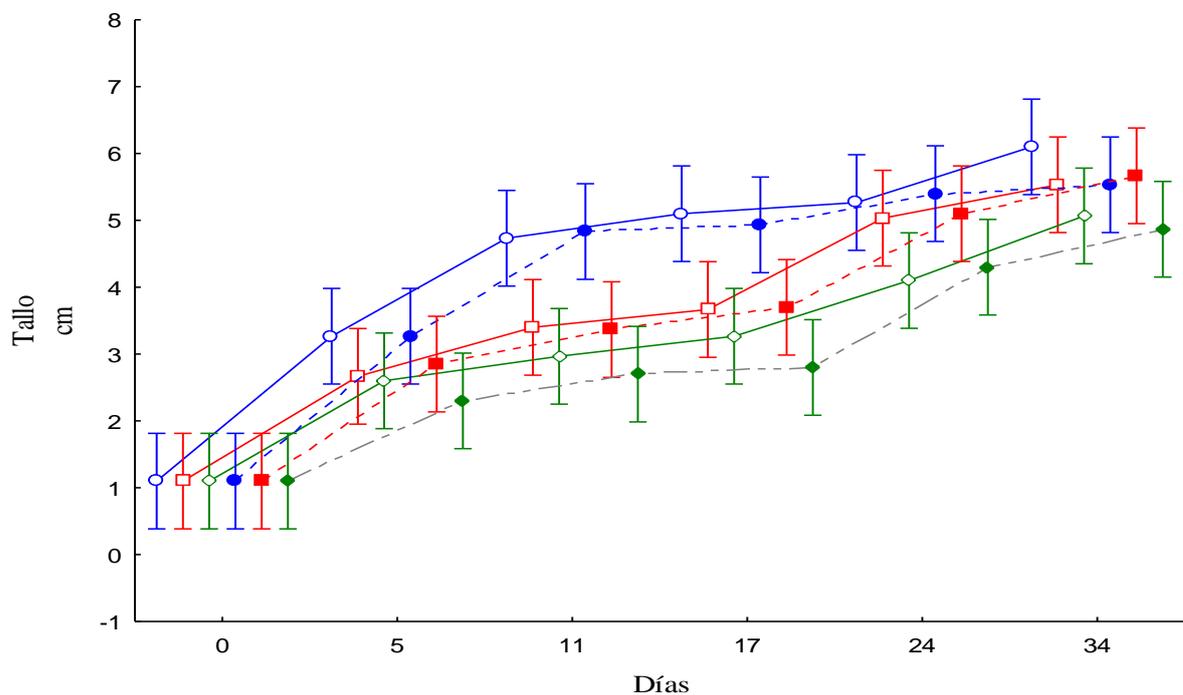


Figura 17. Longitud de tallos a diferentes tratamientos: N₀C₀ (●), (■), N₁C₀, N₂C₀ (◆), N₀C₁ (○), N₁C₁ (□), N₂C₁ (◇).

8.6.3 Peso seco

En este parámetro se encontraron diferencias significativas ($F(25, 72) = 1.72, p < 0.05$), los tratamientos con mayor peso seco fueron N_2C_1 y N_2C_0 , les siguieron los tratamientos N_0C_0 y N_0C_1 (Fig. 18), y finalmente se encontraron los tratamientos N_1C_1 y N_1C_0 . En estudios similares de co-cultivación con cianobacterias y diferentes cultivos Latorre *et al.* (1986) experimentaron con una cepa mutante de *Anabaena variabilis* y plantas de arroz, obteniendo un incremento en el crecimiento (reflejado en el peso seco) de 81 mg/planta, respecto a la cepa silvestre y de 91 mg respecto al control (planta sin inocular con la cianobacteria). Mientras que, la cepa silvestre solo se encontró 9.5 mg arriba del control. Al valorar la cepa mutante de *A. variabilis* en presencia de una fuente de nitrógeno (3 mM de nitrato), el incremento fue de 99 mg/planta respecto al control. Por lo que sugirieron que estos incrementos son a consecuencia de la producción de amonio por las cianobacterias.

En un estudio similar con las cepas *A. variabilis* mutante y salvaje, en co-cultivo hidropónico con trigo, Spiller y Gunasekaran (1990), observaron que la cepa salvaje utilizaba el amonio producido por la nitrogenasa para su propio crecimiento, mientras que la cepa mutante ayudó al crecimiento de las plantas de trigo.

En trabajos posteriores con *Nostoc* y *Anabaena* en cultivos de maíz, trigo, frijol, arroz y caña de azúcar, Obreht *et al.* (1997), encontraron que la presencia de estas cianobacterias en medio libre de nitrógeno aumentaban significativamente los valores de peso seco, frente a los cultivos sin nitrógeno ni cianobacterias.

8.6.4 Proteína total

En el contenido de proteínas se encontraron diferencias significativas ($F_{(20,60)} = 224.54, p < 0.05$). En la Figura 19 se observa que los tratamientos (N_1C_1) y (N_1C_0) fueron los que alcanzaron los valores más altos respecto a los otros tratamientos, seguidos por los tratamientos (N_2C_1) y (N_2C_0), mientras que los valores más bajos se observaron para los tratamientos (N_0C_1) y (N_0C_0). Lo anterior, se debe a que el nitrógeno es constituyente del grupo amino ($-NH_2$) en los aminoácidos, los cuales se encuentran en las proteínas vegetales.

En este sentido, Álvarez-González (2003), observó que el contenido de proteína en frutos de chile aumentaba cuando se inoculaba la cianobacteria *Scytonema ocellatum* a la planta, sugiriendo que la cianobacteria ejerce una influencia significativa sobre los

compuestos nitrogenados (NH_4^+ principalmente) con respecto al control, sobre todo cuando se aplica en etapa de plántula.

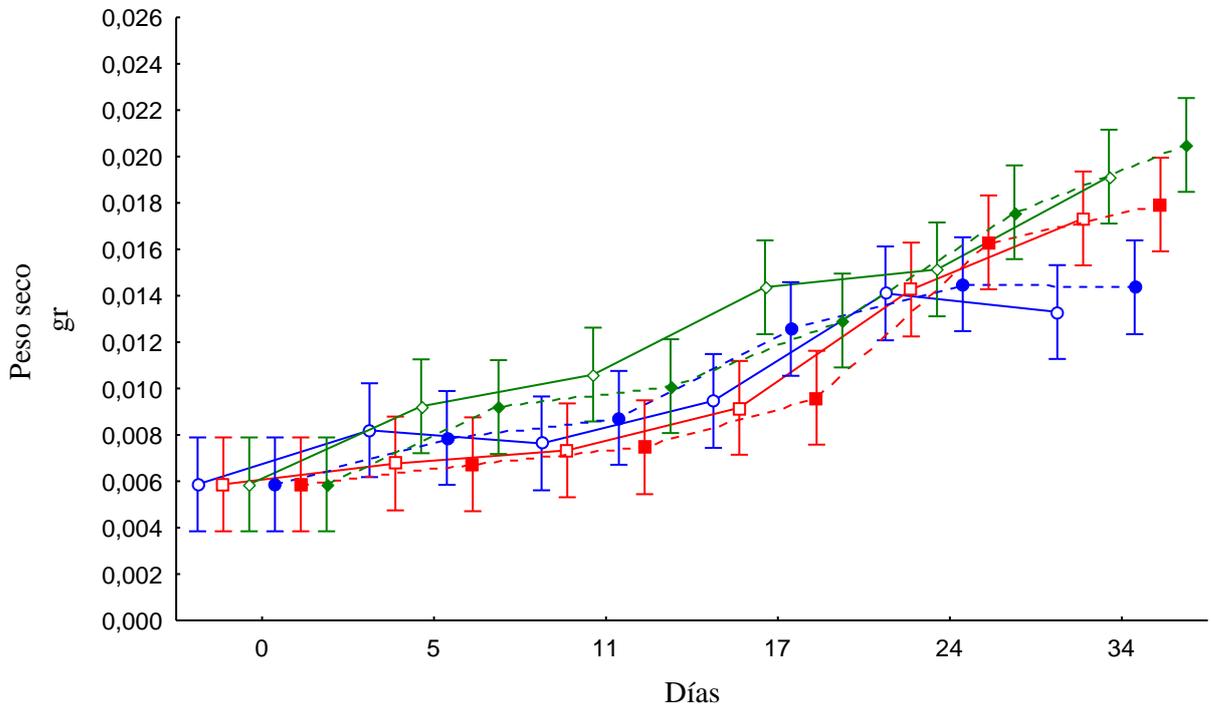


Figura 18. Peso seco de plántulas de papaya a diferentes tratamientos: N_0C_0 (●), N_1C_0 (■), N_2C_0 (◆), N_0C_1 (○), N_1C_1 (□), N_2C_1 (◇).

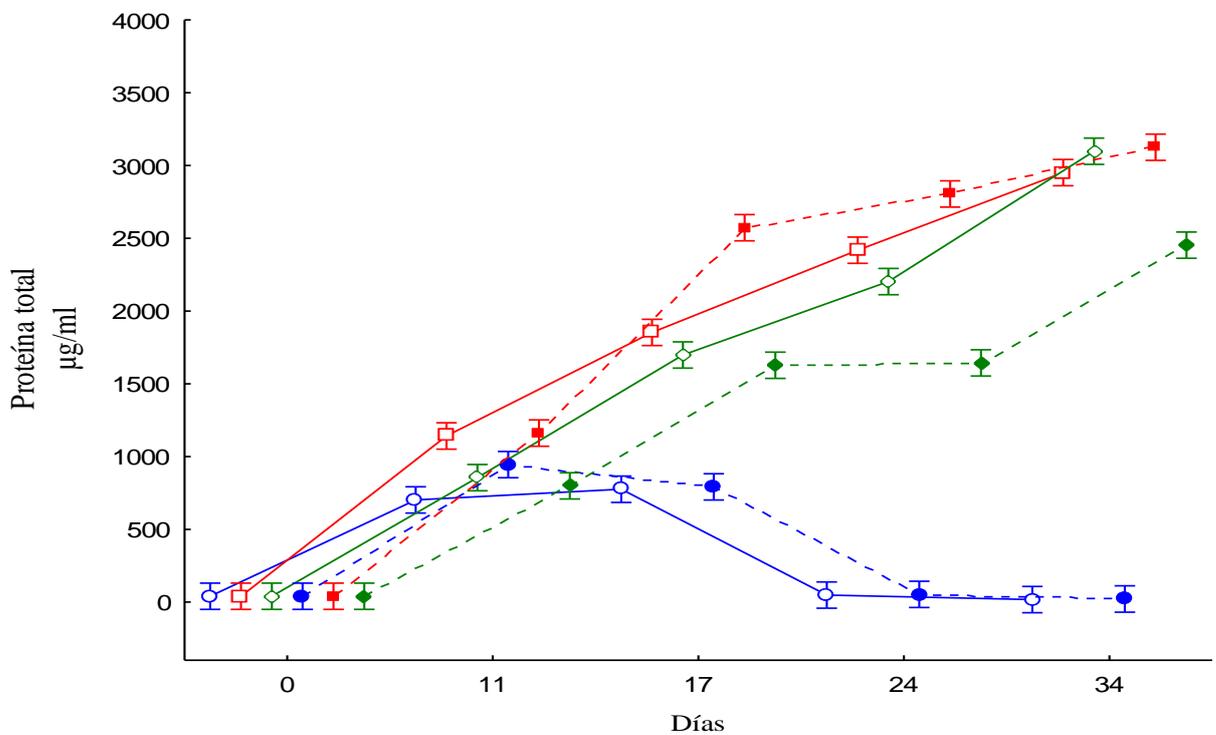


Figura 19. Valores de proteína total, a diferentes tratamientos: N_0C_0 (●), N_1C_0 (■), N_2C_0 (◆), N_0C_1 (○), N_1C_1 (□), N_2C_1 (◇).

8.6.5 Clorofila “a”, “b” y total

La concentración de este pigmento fue fluctuante durante el experimento (Figura 20), existiendo diferencias significativas en el contenido de clorofila “a” ($F_{(160, 410.13)}= 61.84$, $p<0.05$), los valores mayores se observaron en los tratamientos (N_2C_0) y (N_2C_1), siendo 2 veces mayor que los tratamientos (N_0C_0) y (N_0C_1) y 2.2 veces más que los tratamientos (N_1C_0) y (N_1C_1). Por lo que respecta al contenido de la clorofila “b” (Figura 21), también se encontraron diferencias significativas ($F_{(40,118)}=46.78$, $p<0.05$), los tratamientos N_2C_1 , N_1C_1 y N_2C_0 mostraron los valores mayores de este pigmento, siendo 1.8 veces más que N_1C_0 , 1.6 veces mayor que N_0C_0 y 2.7 veces más que N_0C_1 . En el contenido de clorofila total (Figura 22) existieron diferencias significativas ($F_{(75, 210.13)}= 113.83$, $p<0.05$) los valores mayores se encontraron en los tratamientos N_2C_1 y N_2C_0 los cuales fueron 2.1 veces más que los tratamientos N_1C_1 y N_1C_0 . Estos contenidos de clorofila se deben a la concentración de nitrógeno en el medio, ya que este es necesario para la biosíntesis de las porfirinas, las cuales son componentes estructurales de las clorofilas. En este sentido, Álvarez-González (2003), realizó una valoración agrícola con plantas de chile y la cianobacteria *Scytonema ocellatum*, no observó diferencias significativas en el contenido de clorofila total entre los tratamientos con la aplicación de dicha cianobacteria.

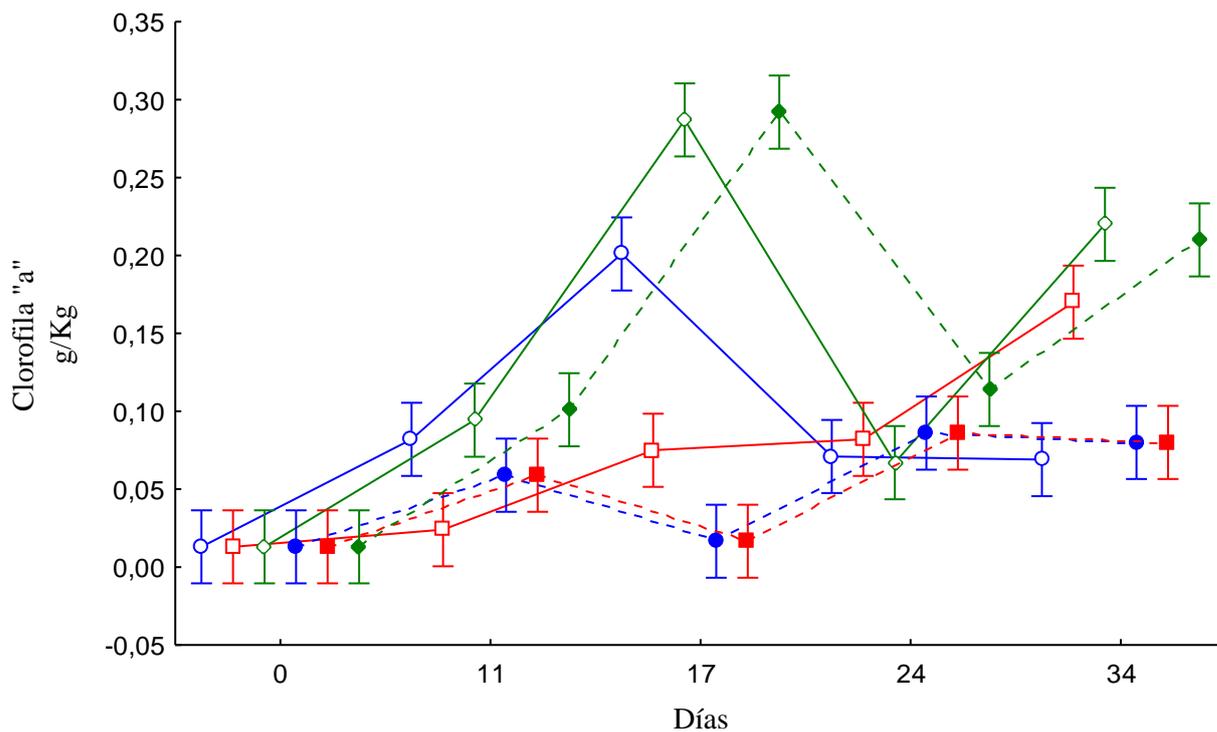


Figura 20. Valores de clorofila "a", a diferentes tratamientos: N₀C₀ (●), (■), N₁C₀, N₂C₀ (◆), N₀C₁ (○), N₁C₁ (□), N₂C₁ (◇).

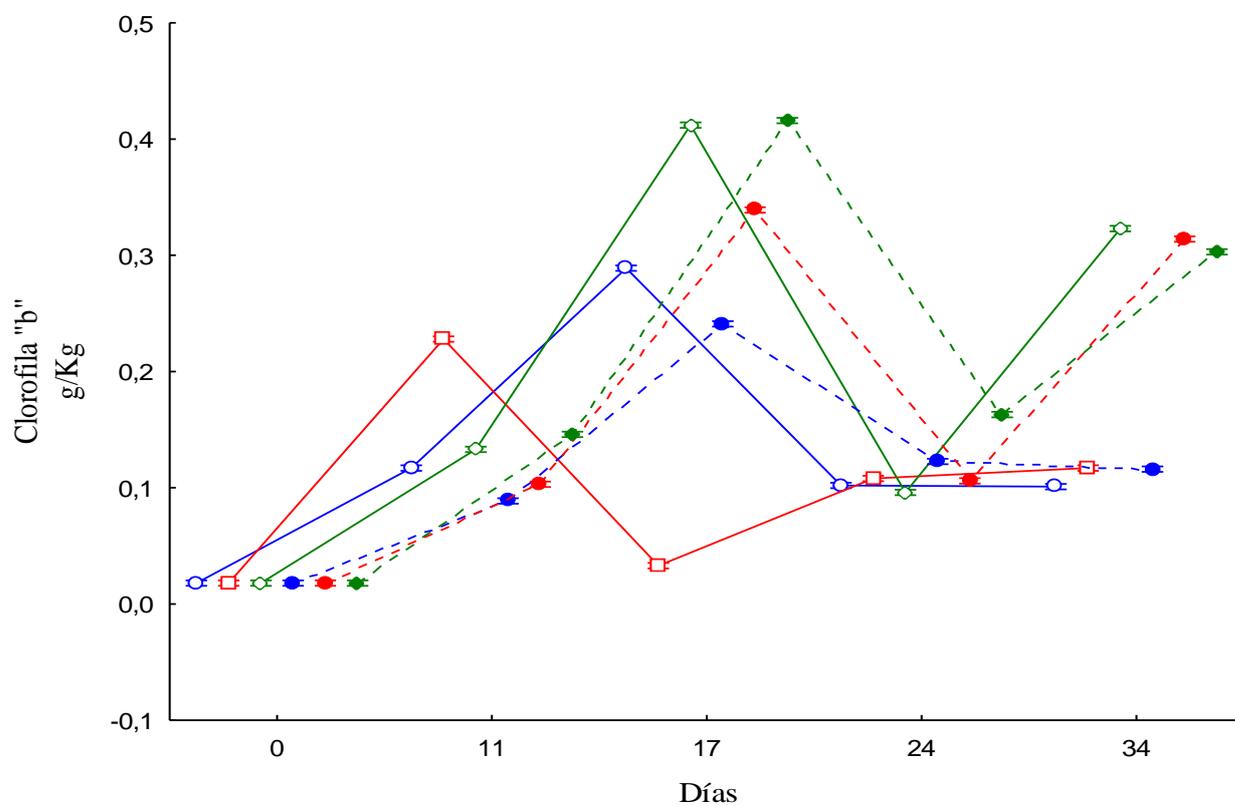


Figura 21. Valores de clorofila "b", a diferentes tratamientos: N₀C₀ (●), (■), N₁C₀, N₂C₀ (◆), N₀C₁ (○), N₁C₁ (□), N₂C₁ (◇).

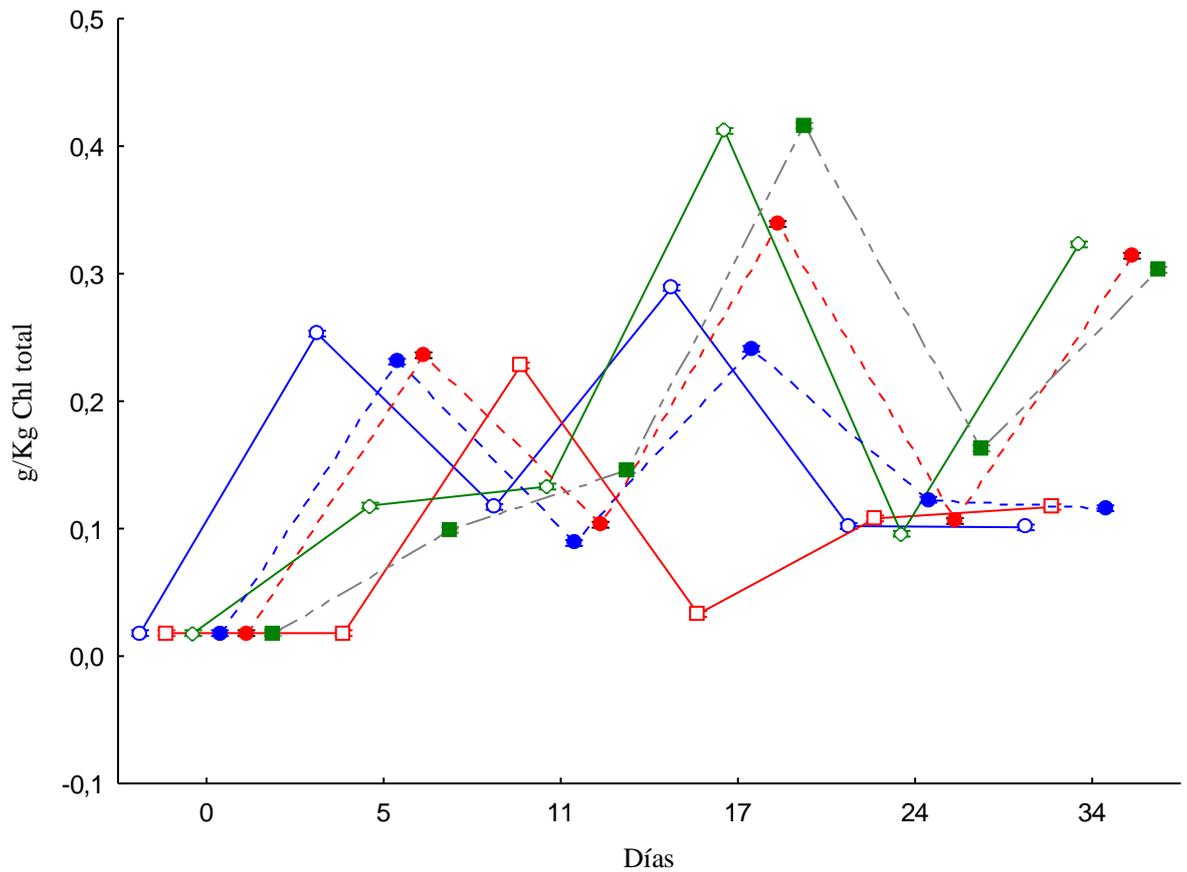


Figura 22. Valores de clorofila total, a diferentes tratamientos: N₀C₀ (●), (■), N₁C₀, N₂C₀ (◆), N₀C₁ (○), N₁C₁ (□), N₂C₁ (◇).

Con los resultados de este trabajo se constata que, las características fisicoquímicas del suelo la zona de Bajos del Arenal cultivados con papaya permiten la presencia de cianobacterias fijadoras de nitrógeno. Los géneros de cianobacterias fijadoras de nitrógeno presentes en ese momento son *Nostoc* sp y *Fischerella* sp, quienes, mostraron esta capacidad al crecer en un medio de cultivo selectivo (sin nitrógeno); además de cuantificar la liberación de amonio al medio, función característica en cianobacterias fijadoras de nitrógeno. Sin embargo, el consorcio alcanzó un crecimiento dos veces mayor cuando se cultivó en medio líquido con nitrógeno inorgánico. Cabe mencionar que, las condiciones de cultivo (luz, aireación, irradiación, temperatura) deben optimizarse para obtener mayor producción de biomasa cianobacteriana.

Por otra parte, los resultados obtenidos de la inoculación de plántulas de papaya con el consorcio de cianobacterias a una concentración de 83.33 ml/l no mostraron diferencias significativas respecto a los controles, lo que indica que aunque el consorcio esté liberando amonio al medio (hasta 0.8 µg/ml), éste no es suficiente para que tenga un

efecto positivo en el crecimiento de la plántula, por lo que es necesario realizar otras pruebas con concentraciones mayores del consorcio, además de evaluar el efecto que tendrá en el suelo con las plantas de papaya, ya que, es posible que el cultivo *in vitro* no ofrezca las condiciones óptimas para el desarrollo de la planta.

9. CONCLUSIONES

- 1) Las diferentes características físico-químicas de las muestras de suelo, son adecuadas para el crecimiento y desarrollo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno.
- 2) La complejidad morfológica, fisiológica y de crecimiento de las cianobacterias encontradas en los cultivos sólo permitieron hacer una identificación morfológica hasta género. Identificando: *Fischerella* sp. y *Nostoc* sp.
- 3) Las cianobacterias demostraron su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico al crecer en medios con y sin fuente de nitrógeno y tener una tasa de liberación de amonio de 0.3 µg/ml. Sin embargo, las cianobacterias que se encontraban en el medio sin nitrógeno tuvieron un crecimiento menor que las que sí contaban con este elemento.
- 4) Durante el co-cultivo con plántulas de papaya y el consorcio de cianobacterias, el mayor crecimiento fue en las plantas con la mayor concentración de nitrógeno.
- 5) El consorcio de cianobacterias no tuvo un efecto significativo en el crecimiento de las plántulas.

10. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación pueden ser mejorados y complementados si se toman en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Cambiar el sistema de aireación con el fin de evitar la sedimentación y la adherencia de las cianobacterias al matraz.
- Identificar mediante técnicas moleculares a los géneros encontrados (*Nostoc* sp. y *Fischerella* sp.) para tener la certeza de los géneros de cianobacterias identificados y llegar hasta especie.
- Separar y purificar el consorcio de *Nostoc* sp. y *Fischerella* sp., para evaluar la eficiencia en la fijación de nitrógeno de manera individual y su influencia en el desarrollo de plantas de papaya.
- Evaluar otros co-cultivos con plantas de papaya, variando las condiciones: edad de la planta, porcentaje del inóculo de cianobacterias e intensidad luminosa.
- Hacer pruebas de campo inoculando cianobacterias en cultivos de papaya a nivel invernadero y de campo.

- Allison, E.F., Hoover, S.R., Morris, H.J. 1937. Physiological studies with the nitrogen fixing alga, *Nostoc muscorum*. The Botanical Gazette, Chicago Journals. U.S.A. 98: 3 433-439.
- Álvarez-González, A. 2003. Optimización de la producción de biomasa de la cianobacteria *Scytonema ocellatum* cepa SLC-1097-22, evaluación de su capacidad como biofertilizante y su contribución en la retención de humedad en el suelo. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México.
- APHA, AWWA, WPCF. 1979. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 13 th ed. American Public Health Association. Washington, D.C., U.S.A.
- Arora, S.K. 1970. Effect of nitrogen compounds on the nitrogen metabolization during the growth of blue-green algae. *Riso*. 19:217.
- Arora, S.K. 1970. Effect of nitrogen compounds on the nitrogen metabolization during the growth of blue-green algae. *Riso*. 19:217.
- Arredondo-Vega, B., Cordero - Esquivel, B., Voltolina, D. 2007. Determinación de proteínas por métodos espectrofotométricos. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Capítulo 4. 31-34
- Andersen, R.A., Kawachi, M. 2005. Traditional microalgae isolation techniques. En: Andersen R.A. (ed.). *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press. E.U.A., 83-100.
- Antón D.J. y Díaz D.C. 2000. *Sequía en un mundo de agua*, Piriguazú Ediciones CIRA-UAEM, San José Toluca, 420 p.
- Azov, Y. 1982. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1300-1306.
- Baird Colin. 2001. *Química ambiental*. Reverté. España. 95p.
- Balandreau, J., Roger, P. 1996. Some comments about a better use of biological nitrogen fixation in rice cultivation. En Rahnan, M., Kumar, A., Van Hove, C., Begum, ZNT., Heulin, T., Hartmann, A (Eds.) *Biological nitrogen fixation associated with rice production*. Kluwer Academic Publishers, Dorchdrecht. 1:12

Banco Nacional de Algas de España. www.cbm.ulpgc.es/bangal.html

Bremner, J.M., Mulvaney, C.S. 1982. Nitrogen total. En: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.) Methods of soil analysis part 2, Chemical and microbiological properties Agronomy. Soc. Agron. 9: 595-624.

Castellanos J.Z., Uvalle-Bueno, J., Aguilar-Santelises, A. 2000. Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas. México, 66-20 pp.

Castellanos J.Z., Peña-Cabriales, J.J.1990. Los nitratos provenientes de la agricultura: una fuente de contaminación de los acuíferos. México. Terra 8:113-126.

Cantenzholz, R.W. 2001. Phylum BX. Cyanobacteria-oxygenic photosynthetic bacteria. En: Boone D.R., Castenzholz W.R. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second ed. Springer Berlin.1: 539-562.

Castro L., Morales L.A., Arangunen M. 2000. Fundamentos teóricos-prácticos sobre el cultivo y cosecha de la papaya *Carica papaya* (L). Cuba. Manual de producción. 1-9.

ESF. Europe Science Foundation. <http://www.esf.org/>.

Estrada, T. 1996. La contaminación por nitratos en los acuíferos del Norte y Centro de México. Tesis de licenciatura. Ingeniería Bioquímica. Tecnológico de Celaya. SEP. México.

Fay, P. 1981. Photosynthetic microorganisms. Nitrogen fixation, vol. I. Ecology. Clarendon Press, Oxford. 1-29.

Fay, P. 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. Microbiol. Rev. 56: 340-373.

Fenn, L.B. 1975. Ammonia volatilization from surface application of ammonium compounds on calcareous soils: III effect of mixing low and high loss ammonium compound. Soil Soc. Am. Proc. 39:366-368.

Fenn, L.B, Escárczaga R.1976. Ammonia volatilization from surface application of ammonium compounds on calcareous soils: V. Soil Water content and method of nitrogen application. Soil Soc. Am. J. 40:537-541.

- Fenn, L.B, Escárzaga R. 1977. Ammonia volatilization from surface application of ammonium compounds on calcareous soils: VI. Effects of initial soil water content and quantity of applied water. *Soil Soc. Am. J.* 41:358-362.
- Gallon, J. R. 1992. Reconciling the incompatible: N₂ fixation and O₂. *New Phytol.* 122: 571-609.
- Gantar, M., Kerby, NW., Rowell, P., Obreth, Z. 1991a. Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N₂-fixing cyanobacteria. I. A survey of soil cyanobacterial isolates forming association with roots. *New Phytol.* 118: 477-483.
- Gantar, M., Kerby, NW., Rowell, P., Obreth, Z. 1991 b. Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N₂-fixing cyanobacteria. II. An ultrastructural study. *New Phytol.* 118: 485-492.
- Gantar, M., Kerby, NW., Rowell, P. 1993. Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N₂-fixing cyanobacteria. III. The role of a hormogonia-promoting factor. *New Phytol.* 14: 505-513.
- Gantar M., Kerby NW., Rowell P., Obreth Z., Scrimgeour C. 1995. Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N₂-fixing cyanobacteria. IV. Dark nitrogenase activity and effect of cyanobacteria on natural ¹⁵ N abundance in the plants. *New Phytol.* 129: 337-343.
- Guillard, R.R.L. 1973. Methods for microflagellates and nanoplankton. En: Stein, J.R. (ed.), *Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements.*, Cambridge University Press, UK, 69-85.
- Goyal, S.K. 1987. Algal biofertilizers an appraisal. *Journal of Maharashtra University.* 12: 11-19.
- Hagmann, L., Jüttner F. 1996. Fischerellin A, a novel photosystem- II_ inhibiting allelochemical of the cyanobacterium *Fischerella muscicola* with antifungal and herbicidal activity. *Tetrahedron Lett.* 37: 6539-6542.
- Haselkorn, R. 1978. Heterocysts. *Annual Rev. Pi. Physiol.* 29: 319-344.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 9 th edition. Williams and Wilkins. USA. 645 pp.

INEGI.2008. www.inegi.gob.mx

Irrisarri, P., Gonnet S., Deambrosi E., Monza J. 2006. Cyanobacterial inoculation and nitrogen fertilization in rice. Springer Science.

Jiménez - Díaz J.A. 2002. Manual práctico para el cultivo de la papaya Hawaiana. Editorial Earth. 16-22.

Kangatharalingam, N., Priscu, J. C., and Pearl, H. W. 1992. Heterocyst envelope thickness, heterocyst frequency and nitrogenase activity in *Anabaena flos-aquae*: Influence of oxygen tension. J. Gen. Microb. 138:2673-2678.

Kannaiyan, S., Aruna, S. J., Kumari, M. P., Hall D.O. 1997. Immobilized cyanobacteria as a biofertilizer for rice crops. J. Appl. Phycol. 9: 167-174.

Kaushik, B.D. 1991. Cyanobacterial response of crops in saline irrigated with saline ground water. En: Shastree, N.K. (Ed.) Curr. Trends Limnol. 1: 105-106

Klute A. 1986. Water potential: Laboratory methods. In Klute, A., et al. (Eds.) Methods of soil analysis, Part 1, Physical and Mineralogical methods, Second Ed., ASA-SSSA Agronomy Series 9, pp. 635-662.

Latorre, C., Lee, JH., Spiller, H., Shanmugam, KT. 1986. Ammoniumion-excreting cyanobacterial mutant as a source of nitrogen for growth of rice: a feasibility study. Biotechnol. Lett 8:507-512.

Lagunas - García N. 2003. Bioprospección de compuestos activos de cianobacterias aisladas de estanques de cultivo de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Tesis de licenciatura. Universidad del Mar.

Leegood, R.C. 1993. Carbon dioxide concentrating mechanisms. Plant Biochem. and Molecular Biology. John Wiley and Sons, Ltd. Chichester, U.K. 45:369-392.

Lewitus, A., Caron, D. 1990. Relative effects of nitrogen and phosphorus depletion and light intensity on the pigmentation, chemical composition and volume of *Pyremonas salina* (Cryptophyceae). MEPS61: 171-181.

- Li, R., 1998. Taxonomic studies on planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria). Ph.D. Thesis, Tsukuba University, Tsukuba.
- López –Cortés, A., Maya- Delgado, Y., Troyo - Diéguez, E., Landa- Hernández, L. 2001. Cianobacterias criptobióticas: Una alternativa de agricultura orgánica. Programa de Agricultura en Zonas Aridas. Publicación de Transferencia y Divulgación No. 7. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Fundación Produce Baja California Sur, A.C. y CONACYT, pp. 28.
- López-Cortés A., Maya-Delgado Y. 2003. Cryptobiotic cianobacteria: an alternative in Organic Agriculture. *Algol. Stud.* 109:387-394.
- Loreto, C., Morales, E. 2003. Productividad de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en cultivos semicontínuos. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas.* 37:21-34.
- Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J., Morales, E. 2003. Producción de pigmentos y proteínas de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 en relación a la concentración de nitrógeno e irradiancia. *Gayana Bot.* 60: 83-89.
- Lowry, O., H. Rosebroug, A. Farr R. Randall. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Mahapatra, I.C., Mudholkar, N.J., Patnaik, H. 1971. Effect of N, P and K fertilizers on the prevalence of algae under field conditions. *Indian J. Agronomic.* 3:16-19.
- Muratake H., Mitsutaka, N. 1990. Synthetic studies of marine alkaloids hapalindoles. Part 1. Total synthesis of (\pm) hapalindoles J and M. *Tetrahedron.* 46: 6331-6342.
- Murua- González C., González- Moro B., Estavillo Aurre J. 2003. Nitrógeno, agricultura y medio ambiente. En la ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis. España. 13: 388-398.
- Ovando, C., Serrano, V., Vázquez, M. 2007. Manual para producir papaya maradol en la Costa de Oaxaca. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y pecuarias. Río grande, Oaxaca, México.

- Okuda, A., Yamaguchi, M. 1952. Algae and atmospheric nitrogen fixation in paddy soils. II. Relation between the growth of blue-green algae and physical or chemical properties of soil and effect of soil treatments and inoculate ion on the nitrogen fixation. Mem. Res. Inst. Food Sci. 4:1-11.
- Obreht, Z., Kerby, N., Gantar, M; Rowell, P. 1993. Effect of root-associated N₂ fixing cyanobacteria on the growth and nitrogen content of wheat (*Triticum vulgare* L.) seedlings. Biol. and fertility soils. 15:68-72.
- Obreht, Z; Tamas, I; Nenin, P; Drobac, A. 1997. Co-cultivation of N₂-fixing cyanobacteria and some agriculturally important plants in liquid and sand cultures. Appl. soil ecol. 6: 301-308.
- Ohmori, M., Hattori, A. 1972. Effect of nitrate on nitrogen-fixation by the blue-green alga *Anabaena cylindrical*. Ocean Research Institute, University of Tokyo Japan, 589-599.
- Pacheco J., Marin M., Cabrera A., Steinich B. y Escolero O. 2001. Nitrate temporal and spatial patterns in 12 water-supply wells, Yucatan, México. Environ. Geol. 40, 708-715.
- Papke, U., Gross E.M., Francke W. 1997. Isolation, identification and determination of the absolute configuration of fischerellin B. A new algicide from the freshwater cyanobacterium *Fischerella muscicola* (Thuret). Tetrahedron Lett. 38: 379-382.
- Park, A., Moore, R.E., Patterson G. 1992. Fischerindola L, a new isonitrile from the terrestrial blue- green alga *Fischerella muscicola*. Tetrahedron Lett. 33: 3257-3260.
- Prasanna, R., Kumar, R., Sood, A., Prasanna, B.M., Singh, P.K. 2006. Morphological, physiochemical and molecular characterization of *Anabaena* strains. In Microbiol. Res. India, 161: 187-202.
- Paerl, H, Pinckney, J. Steppe, F.T. 2000. Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. Institute of marine sciences, University of North Carolina. Environmental Microbiology.USA. 2: 11-26.
- Rachhpal, S., Nye, P.H. 1988. Processes controlling ammonia losses from fertilizer urea. En: Jenkinson D.S and K.A. Smith (eds.). Nitrogen efficiency in agricultural soils. 246-255.

- Rai, A. N. 1990. Cyanobacteria in symbiosis. En: Rai A. N. (ed.), Handbook of symbiotic cyanobacteria. CRC Press, Boca Raton, FL. pp 1-2.
- Rai, V., Tiwari, S.P., Rai, A.K. 2001. Effect of NaCl on nitrogen fixation of unadapted and NaCl-adapted *Azolla pinnata*-*Anabaena azollae*. *Aqua. Bot.*71:109-117.
- Reigosa, J. Pedrol N., Sánchez A 2004. La ecofisiología vegetal. Una ciencia de síntesis. España. 13:388-397
- Richards, L.A. 1993. Suelos salinos y sódicos. Diagnóstico y rehabilitación. Noriega editores. México. 2: 8-17.
- Richards, R.W., Rothschild J.M., Willis A.C., De Chazal Nola M., Kirk Kiaran., Saliba K.J., Smith G.D. 1999. Calothrix A and B, novel pentacyclic metabolites from calothrix cyanobacteria with potent activity against malaria parasites and human cancer cells. *Tetrahedron* 55: 13513-13520.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J.Gen. Microbiol.*111:1-61.
- Rippka, R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. In Abelson, J.N. & Simon, M.I. Methods in Enzimology Volume 167, Cyanobacteria, Packer, L. & Glazer, A.N. Academic Press, Inc. San Diego, USA.3-27.
- Rippka, R., Castenholz R.W., Iteman I., Herdman M. 2001. Form- genus I. *Anabaena* Bory. En: Boone, D.R., Castenholz W.R. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second ed. Springer, Berlin, 566-568.
- Roger, P. A., Kulkooriya S. A., Barraquio W. L., Watanabe I. 1981. Epiphytic nitrogen fixation in wetland rice. *Wet monsoonal ecosystems, Aust. Acad. Sci.* 62-66.
- Roger, P.A, Reynaud, P.1979. La biomasse algale dans les rizieres du Senegal: importance relative des Cyanophycees fixatrice de N₂. *Rev. Ecol. Biol. Soil.* 14: 519- 530.
- Roger, P.A., Santiago, S., Watanabe, I. 1986. Nitrogen fixing blue-green algae in rice soils of Northern Luzon (Philippines). In *Phil Agri.* 69: 589-598.

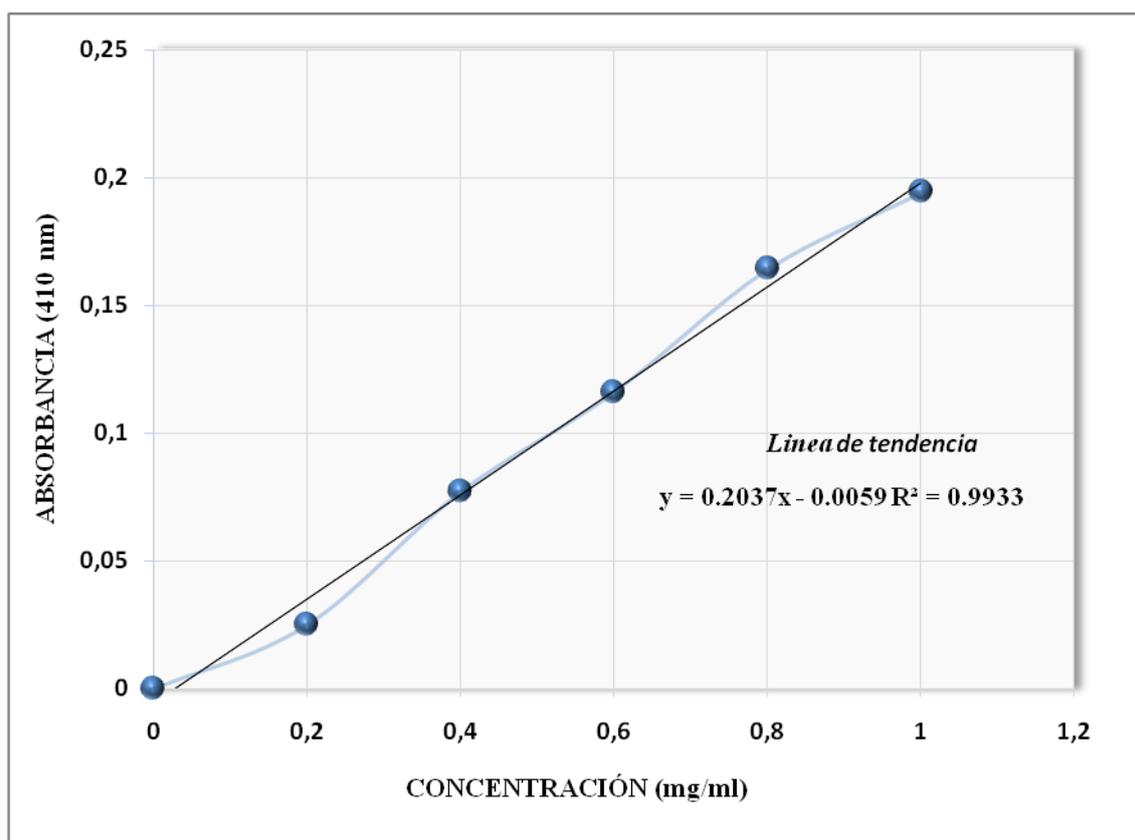
- Sinha, R. P., Hader, D.P. 1996. Photobiology and ecophysiology of rice field cyanobacteria. *Photochem. y Photobiol.* 64: 887-896.
- Singh, R. N. 1961. Role of blue-green algae in nitrogen economy of Indian agriculture. Indian Council of Ag ric. Res., New Delhi. 175 p.
- SIAP. 2010. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario agrícola de la República Mexicana versión electrónica. SAGARPA. México. www.siap.gob.mx/index. Fecha de consulta: 18/05/2010.
- Schulze,E., Beck, E., Müller, K. 2002. *Plant ecology*. Springer Berlin. Alemania. 324-325 pp.
- Stewart, W.D.P., Rowel, P., Ladha, J.K., Sampaio, M. J.A. 1979. Blue green algae (Cyanobacteria) some aspects related to their role as source of fixed nitrogen in paddy soils. Nitrogen and rice. Watanabe, I., Ed. International Rice Research Institute. (Philippines). 263-285 p.
- Soltani, N., Zarrini, G., Ghasemi, Y., Shokravi, Sh., Baftehchi, L. 2007. Characterization of a soil Cyanobacterium *Fischerella* sp. FS 18 under NaCl Stress. *J. of Biol. Sci.*. 6: 931-936.
- Spiller, H., Gunasekaran, M. 1990. Ammonia-excreting mutant of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* supports growth of wheat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 477-480.
- Spiller, H, Latorre, C, Hassan, M.E., Shanmugam, K.T. 1986. Isolation and Characterization of Nitrogenase-Derepressed Mutant Strains of Cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. of Bacteriol.* 2: 412-419.
- Spiller, H., Stallings, W., Woods, T. Gunasekaran M. 1993. Requiriments for direct association of ammonia-excreting *Anabaena variabilis mutant* (SA-1) with roots for maximal growth and yield of wheat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:557-566.
- Srivastava, A., Jüttner, F., Strasser R.J. 1998. Action of the allelochemical, fischerellin A, on photosystem II. *Biochem.Biophys. Act.* 1364:326-336.

- Subramanyan, R.L., Manna, G.B., Patnaik, S. 1965. Preliminary observations on the interaction of different rice types to inoculation of blue-green in relation to rice culture. Proc. Indian Acad. Sci. 1: 62-171.
- Torres - Ariño, A. 2001. Aislamiento y caracterización de cianobacterias marinas productoras de compuestos de interés biomédico. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, B.C., México.
- Vaishampayan, A., Sinha, R.P., Hader, D.P. 2001. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. Botanical rev. 67: 453-516.
- Venkataraman, G.S. 1979. Algal inoculation in rice fields. En: IRRI, Nitrogen and Rice. International Rice Research Institute, Los Banos, The Philippines. 311-324.
- Venkataraman, L.V. 1986. Blue-green algae as biofertilizer. En: Richmond A ed CRC handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Boca Raton, Florida.455-471.
- Venkataraman . 1993. Blue-green algae (cyanobacteria). In S. N. Tata, A. M. Wadhvani and M. S.Mehdi (eds.), Biological nitrogen fixation. Indian Council of Agric. Res., New Delhi. 45-76.
- Walkley, A; Black, I. 1934. An examination of the Degtjareff method and a proposed modification of the chromic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 37: 29-38.
- Walsby, A.E. 1985. The permeability of heterocysts to the gases nitrogen and oxygen. Proc. R. Soc. London Ser. 226: 345-367.
- Watanabe, A. 1959. Distribution of nitrogen fixing blue-green algae in various areas of South and East Asia. J. Gen. Appl. Microbiol. 5:21-29.
- Yúfera, P., Carrasco D. 1973. Química agrícola 1, Suelos y Fertilizantes. Ed. Alhambra. 1ra edición, España. 22-23.
- Zaccaro, M.C. 2000. Plant growth-promoting cyanobacteria. PGPR. Conference

12. ANEXOS

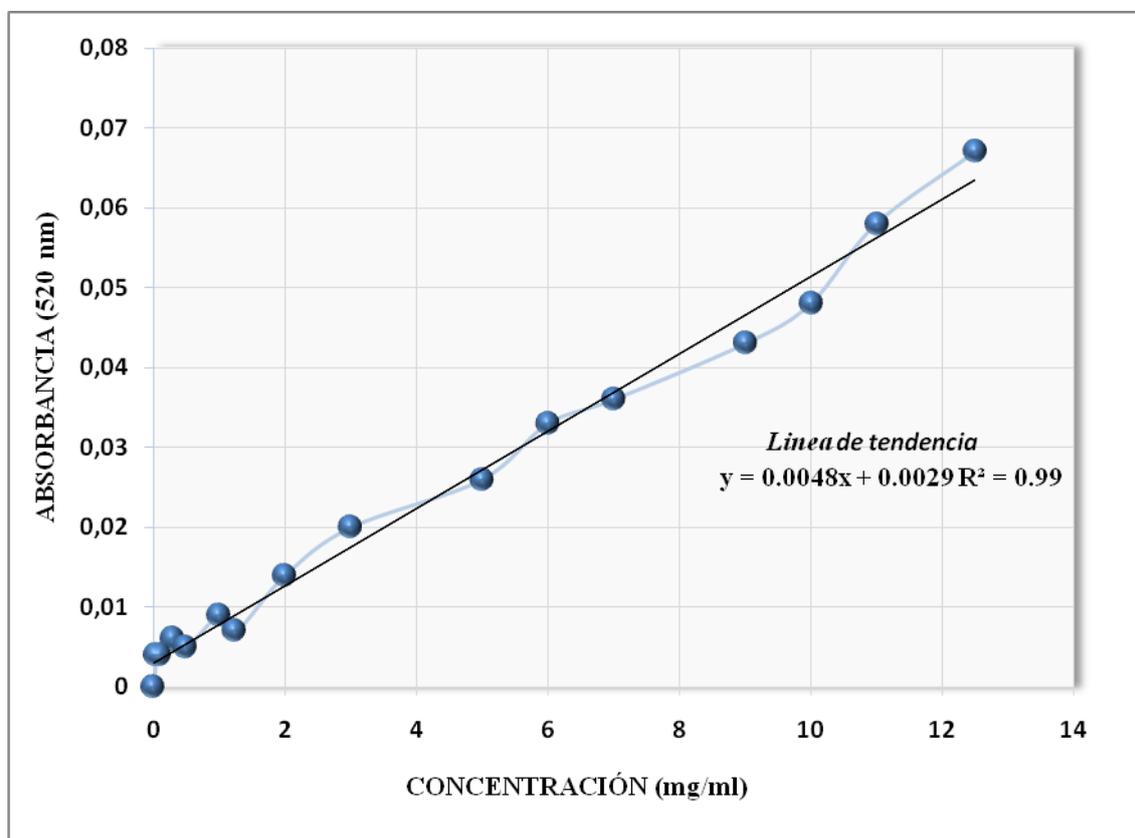
ANEXO A. CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRATOS

CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ABSORBANCIA (410 nm)
0	0
0.2	0.025
0.4	0.077
0.6	0.116
0.8	0.164
1	0.194



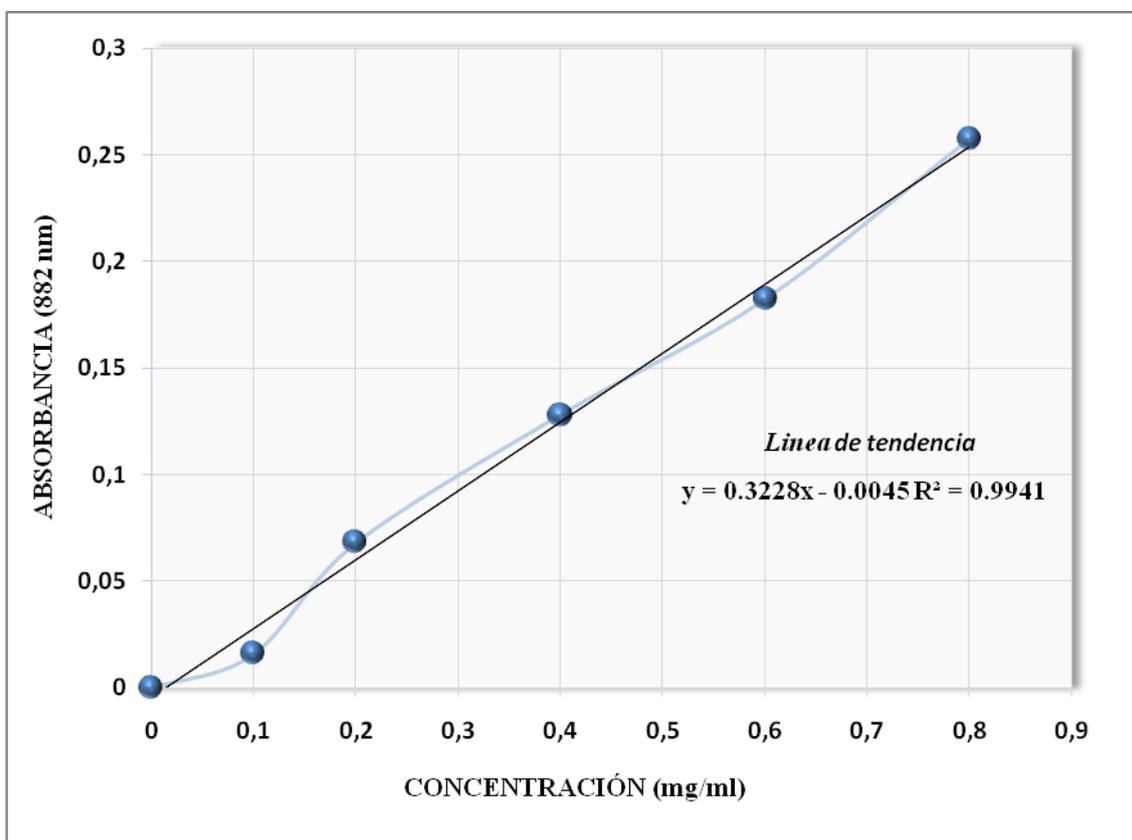
ANEXO B. CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITRITOS

CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ABSORBANCIA (520 nm)
0	0
0.05	0.004
0.1	0.004
0.3	0.006
0.5	0.005
1	0.009
1.25	0.007
2	0.014
3	0.02
5	0.026
6	0.033
7	0.036
9	0.043
10	0.048
11	0.058
12.5	0.067



ANEXO C. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA FÓSFORO

CONCENTRACIÓN mg/ml	ABSORBANCIA 882 nm
0	0
0.1	0.016
0.2	0.068
0.4	0.128
0.6	0.182
0.8	0.257



ANEXO D. FORMULACIÓN DE MEDIO BG-11₀ Ripka *et al* (1979).

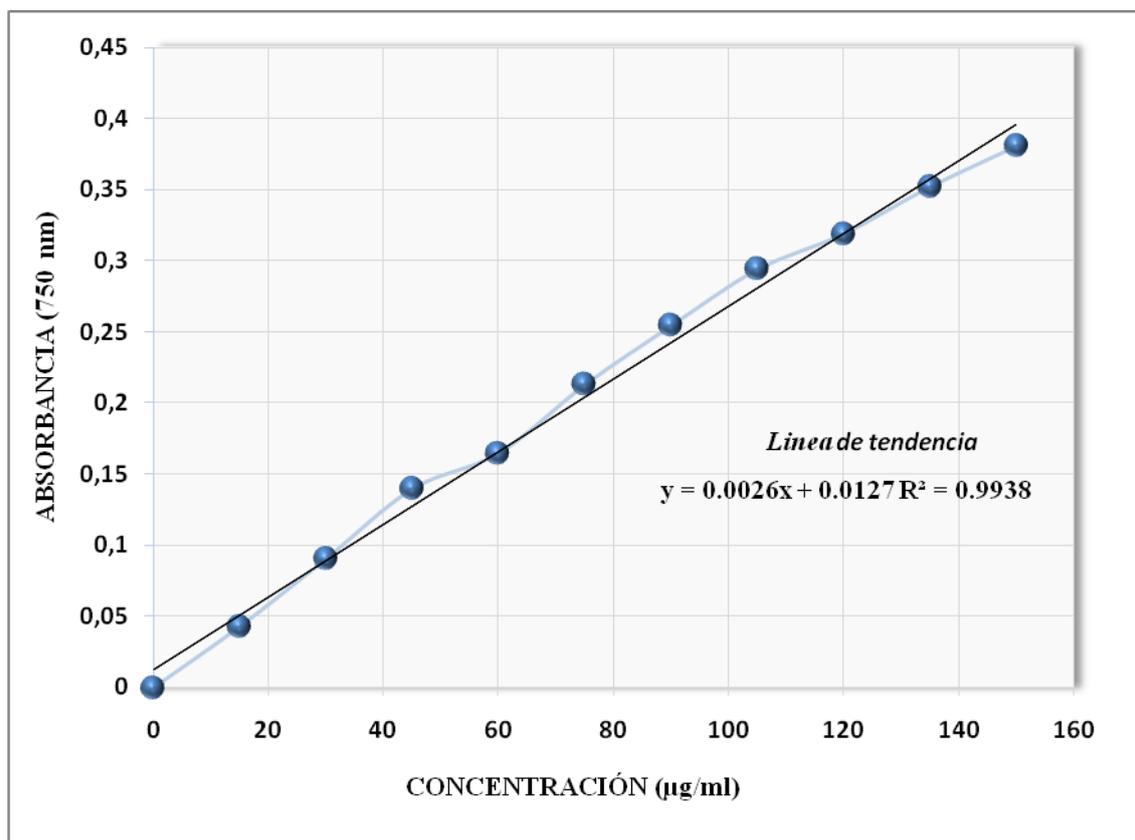
Compuesto	g/l
NaCl	2.3
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.04
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.075
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.036
HOC(COOH)(CH ₂ COOH) ₂	0.006
C ₆ H ₅ FeO ₇	0.006
(CH ₂ N(CH ₂ CO ₂ Na)CH ₂ CO ₂ H) ₂	0.001
Na ₂ CO ₃	0.02
Sol. Oligoelementos*	1 ml/l
Agua desionizada	1000 ml

* Formulación de la solución de oligoelementos

Compuesto	g/100 ml
H ₃ BO ₃	0.286
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.181
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.0222
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.0390
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0079
CoCl ₂	0.0247

ANEXO E. CURVA DE CALIBRACIÓN DE PROTEÍNAS

CONCENTRACIÓN BSA ($\mu\text{g/ml}$)	ABSORBANCIA (750nm)
0	0
15	0.043
30	0.0905
45	0.1395
60	0.1645
75	0.2125
90	0.254
105	0.2935
120	0.3185
135	0.3515
150	0.38



ANEXO F. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA AMONIO

CONCENTRACION $\mu\text{g/ml}$	ABSORBANCIA (630 nm)
0	0
0.2	0.056
0.4	0.122
0.6	0.1625
0.8	0.208
1	0.25175
2	0.404
3	0.47775
4	0.57175
5	0.65125

