

Efecto de las prácticas agrícolas sobre las poblaciones bacterianas del suelo en sistemas de cultivo en Chihuahua, México*

Effect of agricultural practices on soil bacterial populations in cropping systems in Chihuahua, Mexico

Lina Hernández-Flores^{1§}, J. Antonio Munive-Hernández², Engelberto Sandoval-Castro¹, Daniel Martínez-Carrera¹ y Ma. Carmen Villegas-Hernández³

¹Colegio de Postgraduados. Campus-Puebla. Carretera Federal México-Puebla km 125.5, Santiago Momoxpan, Municipio de San Pedro Cholula, Puebla. C. P. 72760. México Tel.: (52) 222-2852162. (engelber@colpos.mx), (dcarrera@colpos.mx). ²Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. C. P. 72570. Tel: 52 (222) 229 55 00 – 2555. (joseantonio.munive@correo.buap.mx). ³Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Prol. Carpio y Plan de Ayala S/N 11340 México D. F. (marycarmenvm@yahoo.com). [§]Autora para correspondencia: hlina@colpos.mx.

Resumen

La sustentabilidad en México es el mayor desafío que enfrenta el país ante un panorama de degradación ambiental poco alentador. El conocimiento y aplicación de opciones amigables con el medio ambiente resulta necesario para preservar y mantener los recursos naturales, siendo un factor clave para elevar la rentabilidad en la producción agrícola. En la naturaleza existe un número indeterminado de asociaciones entre poblaciones microbianas, éstas son influenciadas por factores del ambiente, físicos y químicos. En el suelo, en las raíces de las plantas, las relaciones microbianas determinan cual es la comunidad dominante o inhibida, así como aquellas que coexisten sin afectar (positiva o negativamente) a otras poblaciones. Los factores que determinan la actividad microbiana son importantes debido a la influencia que tienen en el mantenimiento de la fertilidad del suelo y la nutrición de los cultivos. Por lo anterior, se efectuó el estudio de las poblaciones bacterianas presentes en localidades con diferentes condiciones edafoclimáticas. Ello para evaluarla presencia de poblaciones bacterianas potencialmente benéficas para los cultivos de interés en la región. Inicialmente, se estimó la población bacteriana total, y la subpoblación con características del grupo rhizobia, en muestras obtenidas

Abstract

Sustainability is the biggest challenge faced by Mexico against a backdrop of bleak environmental degradation. It is necessary to acquire knowledge and to implement environment-friendly alternatives in order to preserve and maintain the natural resources of the country, a key factor in improving the profitability of agricultural production. In nature there is an unknown number of associations between microbial populations, which are influenced by environmental, physical and chemical factors. Microbial relationships determine the dominant or inhibited communities that exist in the soil, in the roots of the plants, and also those that coexist without affecting (positively or negatively) other populations. The factors determining microbial activity are important because of their influence in maintaining soil fertility and crop nutrition. Therefore, this work studied the bacterial populations present in locations with different soil and climatic conditions. This in order to evaluate the presence of bacterial populations potentially beneficial for the crops of interest in the region. Initially, the total bacterial population and the subpopulation with rhizobial group characteristics were estimated in samples from three localities of the state of Chihuahua in June 2007, from

* Recibido: julio de 2012
Aceptado: febrero de 2013

en tres localidades del estado de Chihuahua en junio de 2007, a partir de 11 muestras compuestas de suelos con actividad agrícola. Se evaluó la densidad de poblaciones bacterianas en niveles de 1×10^2 a 6.6×10^3 UFC g^{-1} , valores muy bajos para suelos con actividad agrícola, sugiriendo el efecto negativo de la aplicación de agroquímicos sobre las poblaciones microbianas del suelo.

Palabras clave: agricultura sustentable, biofertilizante, rizobia, suelo.

Introducción

Resulta de gran interés restaurar la microbiota de los suelos mediante estrategias que permitan mejorar su calidad en relación a la productividad agrícola y de una manera no contaminante. El uso indiscriminado de insumos agrícolas ha alterado significativamente los constituyentes orgánicos y vivos del suelo y, con ello, el equilibrio ecológico, modificando principalmente las actividades metabólicas de las diferentes poblaciones microbianas del agroecosistema. Barea *et al.* (2005) señalan que la disponibilidad de nutrientes en el suelo a través de las interacciones biológicas benéficas (sinérgicas) entre los diversos componentes que promueven los procesos ecológicos, debe ser entendida y manejada para el aprovechamiento sostenible de los suelos.

La presencia de microorganismos es un indicador que permite evaluar el beneficio de los sistemas de laboreo, así como, el mantenimiento de la fertilidad del suelo (Villarreal *et al.*, 2000). El porcentaje más alto de microorganismos se localiza en suelos con altos contenidos de materia orgánica siendo, la mayoría, bacterias que se agrupan como aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas.

La observación del daño ocasionado por el uso constante de agroquímicos en la agricultura donde efectuamos el estudio (Chihuahua) ha motivado el interés por mejorar el conocimiento y manejo de los cultivos, así como fomentar actividades cooperativas que se establecen en el suelo entre la microbiota y las plantas. Si bien la microfauna afecta el crecimiento de las plantas y las cadenas tróficas del suelo, es mayor el impacto de las asociaciones microbianas que interactúan entre sí, debido a que el suelo es un hábitat complejo donde un gran número de poblaciones microbianas interactúan con los diversos sustratos, estando muchas de

11 composite samples of agricultural soils. Bacterial population density was evaluated at levels from 1×10^2 to 6.6×10^3 UFC g^{-1} , very low values for agricultural soils, suggesting the negative effect of pesticide application on the microbial populations of the soil.

Key words: bio-fertilizer, rhizobia, soil, sustainable agriculture.

Introduction

It is of great interest to restore the microbiota of soils through strategies that allow to improve their quality with respect to agricultural productivity in a non-contaminating way. The indiscriminate use of agricultural inputs has significantly altered the organic and living constituents of the soil and thus the ecological balance, mainly by changing the metabolic activities of different microbial populations in the agroecosystem. Barea *et al.* (2005) indicate that the availability of soil nutrients through beneficial biological interactions (synergistic) between the various components that promote ecological processes must be understood and managed for using the soils in a sustainable way.

The presence of microorganisms is an indicator that allows to evaluate the benefit of tillage systems and the maintenance of soil fertility (Villarreal *et al.*, 2000). The highest percentage of microorganisms are located in soils with high organic matter content, most of it being bacteria grouped as aerobic, anaerobic and facultative anaerobic.

Observing the damage caused by the constant use of agrochemicals in agriculture in the region here we performed the study (Chihuahua) motivated the interest in improving the knowledge of crop management, and in promoting the cooperative activities that take place in the soil between microbiota and plants. While the microfauna affects plant growth and the trophic chains of the soil, the impact of microbial associations interacting with each other is greater, as the soil is a complex habitat where a large number of microbial populations interact with the various substrates, and many of these populations are associated with the roots of the plants in the rhizosphere (Reyes *et al.*, 2006). Microbial populations associated with the presence of root exudates are settled in the microenvironments of this area; they participate in the formation of rhizosphere microaggregates rich in microbial metabolites (Barea *et al.*, 2005; Caesar-Ton That *et al.*, 2007).

estas poblaciones asociadas a las raíces de las plantas en la zona rizosférica (Reyes *et al.*, 2006). En los microambientes de esta zona están asentadas poblaciones microbianas asociadas a la presencia de los exudados radicales y que participan en la formación de los microagregados rizosféricos ricos en metabolitos microbianos (Barea *et al.*, 2005; Caesar-Ton That *et al.*, 2007).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno no constituyen un grupo taxonómico homogéneo, la única característica que comparten es la presencia de la enzima nitrogenasa (Zehret *et al.*, 2003; Cerna *et al.*, 2009). Este grupo reviste gran importancia debido a las ventajas tanto ecológicas como económicas que puede proporcionar su adecuada aplicación (Daniel, 2004; Villegas y Munive, 2005; Urzúa 2005; Bhattacharjee *et al.*, 2009; Conget *et al.*, 2009; Weir, 2011).

Los fijadores de vida libre generan amonio para su propio uso y los fijadores de nitrógeno simbióticos, como rhizobia, fijan nitrógeno asociados a la planta hospedera y le proveen nitrógeno a cambio de carbono y de un hábitat de protección (Rueda-Puente *et al.*, 2009).

La interacción rhizobia-leguminosa es benéfica porque constituye una alternativa al uso de fertilizantes químicos y plaguicidas, estas poblaciones bacterianas son capaces de ejercer efectos específicos sobre el crecimiento vegetal, resultado la fijación simbiótica de nitrógeno.

Cultivos como alfalfa, cacahuete, algodón, nogal, papa, chile, durazno y manzano son recursos de gran importancia económica en las localidades de Ojinaga, Casas Grandes y Delicias, entre otras. Debido al manejo inapropiado de estos suelos, la continúa degradación de los mismos por los efectos climáticos y edáficos, así como la baja disponibilidad de N y de P principalmente, y los problemas de contaminación del suelo, agua y alimentos por el uso excesivo de agroquímicos existe la gestión agrícola en términos de sostenibilidad. La evaluación de las poblaciones bacterianas pertenecientes al grupo de rhizobia, representa una posible alternativa para el manejo sostenible de estos agroecosistemas, de allí la necesidad de realizar el aislamiento a partir de los suelos y cultivos de interés en Chihuahua, y seleccionarlos como biofertilizantes potenciales en relación a su efecto en la producción vegetal.

The nitrogen-fixing microorganisms are not a homogeneous taxonomic group, the only common feature being the presence of the enzyme nitrogenase (Zehret *et al.*, 2003; Cerna *et al.*, 2009). This group is of great importance due to the ecological and economic benefits that it can provide if properly applied (Daniel, 2004; Villegas and Munive, 2005; Urzua 2005; Bhattacharjee *et al.*, 2009; Conget *et al.*, 2009; Weir, 2011).

Free-living fixers generate ammonia for their own use, and symbiotic nitrogen fixers such as rhizobia fix nitrogen in association with the host plant, providing it with nitrogen in exchange for carbon and a protective habitat (Rueda-Puente *et al.* 2009).

The rhizobium-legume interaction is beneficial because it constitutes an alternative to the use of chemical fertilizers and pesticides; these bacterial populations are capable of exerting specific effects on plant growth as a result of the symbiotic fixation of nitrogen.

Crops such as alfalfa, peanut, cotton, pecan, potato, chili, peach and apple are economically important resources in the towns of Ojinaga, Casas Grandes and Delicias, among others. The improper management of these soils, their continued degradation as a result of climatic and edaphic effects, and the low availability of N and P, as well as the soil, water and food pollution problems caused by the excessive use of agrochemicals, are the reasons why sustainable farm management has been developed. The evaluation of bacterial populations belonging to the rhizobia group represents a possible alternative for the sustainable management of these agroecosystems; hence the need for isolating these populations from the soils and crops of interest in Chihuahua, and of selecting them as potential biofertilizers with respect to their effect on plant production.

Materials and methods

Soil sampling

The state of Chihuahua is located in northern Mexico between 25° 5' and 31° 47' N and 103° 11' and 109° 07' W. The prevailing weather conditions are a dry arid climate in 28% of the state surface, with an average annual rainfall

Materiales y métodos

Muestreo de suelo

El estado de Chihuahua se localiza en el norte de México entre 25° 5' y 31° 47' latitud norte, y 103° 11' y 109° 07' longitud oeste. Las condiciones climáticas predominantes son de tipo seco, clima seco árido en 28% de la superficie estatal, con una precipitación promedio anual menor a 300 mm y temperatura máxima de 40 °C; 46% del territorio estatal es semiárido con una precipitación promedio anual de 300 a 500 mm (CONAFOR, 2004; Núñez-López *et al.*, 2007).

En la región oeste del Estado predomina el clima templado, con régimen de lluvias durante el verano y precipitación promedio anual de 850 mm. El clima es cálido en la zona de las barrancas, con 600 mm de precipitación y una temperatura promedio que supera 18 °C durante el mes más frío (Figura 1) (CONAFOR, 2004; Núñez-López *et al.*, 2007).

Los muestreos se efectuaron con apoyo de algunos productores que expresaron su interés por el estudio de las poblaciones bacterianas como parte de una alternativa para mejorar las condiciones de sus cultivos ante los problemas que presentan (Figura 2). Se trató de abarcar las diferentes condiciones climatológicas presentes en el estado, así como, seleccionar los cultivos económicamente más importantes del estado.

of less than 300 mm and a maximum temperature of 40 °C; 46% of the state territory is semi-arid with an average annual rainfall of 300-500 mm (CONAFOR, 2004; Núñez-López *et al.*, 2007).

In the western region of the state the climate is temperate, with rainfall in summer and an average annual rainfall of 850 mm. The climate is warm in the ravines, with 600 mm of rainfall and an average temperature of over 18 °C during the coldest month (Figure 1) (CONAFOR, 2004; Núñez-López *et al.*, 2007).



Figura 1. Climas del estado de Chihuahua. ©2009 INEGI.
Figure 1. Chihuahua state climates. ©2009 INEGI.



Figura 2. Muestras de suelo de diferentes cultivos estudiados, y tipo de maquinaria utilizada en los lugares de muestreo en Chihuahua.

Figure 2. Soil samples from different crops studied, and type of machinery used in the sampling sites in Chihuahua.

Los sitios de muestreo se encuentran ubicados de acuerdo a las coordenadas mostradas en el Cuadro 1.

Sampling was carried out with support from some producers who expressed interest in the study of bacterial populations as part of an alternative to improve the

Cuadro 1. Ubicación de las localidades muestreadas en el estado de Chihuahua, México.

Table 1. Location of sampling sites in the state of Chihuahua, Mexico.

Localidad	Latitud norte		Longitud oeste		Altitud Metros	Temperatura °C (máx y min)
	Grados	Minutos	Grados	Minutos		
Casas Grandes	30	23	107	57	1 480	41.5 y -17.5 °C
Delicias	28	11	105	28	1 170	38 y -8 °C.
Ojinaga	29	34	104	24	800	44.9 y -14 °C

El sitio de muestreo se seleccionó al azar, tomando muestras de suelo a una profundidad de 15 cm en suelos con historial de cultivo de alfalfa, algodón, cacahuete, nogal, papa, chile, durazno y manzano. Las muestras de suelo fueron puestas a secar para su conservación en refrigeración hasta su uso.

conditions of their crops with respect to the present problems (Figure 2). It was attempted to cover the different climatological conditions present in the state, as well as selecting its most economically important crops.

De las muestras obtenidas se integraron 11 muestras compuestas de suelo de 8 cultivos para su evaluación (Cuadro 2 y 3).

The sampling sites are located according to the coordinates shown in Table 1.

Cuadro 2. Lugares de muestreo de suelo, y especie cultivada, en Chihuahua, México.

Table 2. Soil sampling sites and cultivated species, in Chihuahua, Mexico.

Municipio	Cultivo
Ojinaga	Alfalfa
	Algodón
	Cacahuete
Delicias	Cacahuete
	Alfalfa
	Papa
	Chile
Casas Grandes	Durazno
	Manzano
	Nogal
	Chile

The sampling site was selected at random, taking soil samples to a depth of 15 cm in soils with a history of alfalfa, cotton, peanut, pecan, potato, chili, peach and apple. The soil samples were left to dry for conserving them in refrigeration until use.

Of the samples obtained 11 soil composite samples were integrated from 8 crops for evaluation (Table 2 and 3).

Estimation of the bacterial population in soil samples

For estimating the total bacterial population and the rhizobial population, the number of colony forming units (CFU) of each composite soil samples was counted by decimal serial dilution and planted by the method of diffusion in Petri dishes (threefold). The culture media used were nutrient agar and TY (Alvarez-Solis and Anzueto-Martínez, 2004) the boxes were incubated at 28 °C for 5 days. Subsequently, the colonies present on each dilution were counted.

Cuadro 3. Características físicas y químicas de los suelos de las localidades muestreadas.

Table 3. Physical and chemical properties of soils from sampled localities.

Localidad	Cultivo	pH	Textura	MO (%)	P (ppm)	NO ₃ ⁻ (ppm)	NH ₄ ⁺ (ppm)
Ojinaga	Cacahuete	7.63	Franco arcillo-arenoso	0.59	21.52	62.47	10.30
Delicias	Alfalfa	7.6	Franco arcilloso	0.89	25.82	30.91	18.03
Delicias	Cacahuete	7.7	Franco arcilloso	0.59	13.99	7.73	6.44
Delicias	Chile	7.55	Franco arcillo-arenoso	0.59	27.98	73.42	11.59
Casas Grandes	Manzano	4.9	Arcilloso	3.35	45.86	199.64	41.21
Casas Grandes	Durazno	6.7	Franco arcillo-arenoso	0.59	29.08	45.08	36.06

Estimación de la población bacteriana en muestras de suelo
Para estimar la población bacteriana total y población de rhizobia, se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de cada una de las muestras compuestas de suelo mediante la técnica de dilución decimal seriada y siembra por el método de difusión en cajas petri (por triplicado). Los medios de cultivo utilizados fueron agar nutritivo y TY (Álvarez-Solís y Anzueto-Martínez, 2004), las cajas se incubaron a 28 °C, durante 5 días. Posteriormente, se efectuó el conteo de las colonias presentes en cada dilución.

Para la determinación de la población de rhizobia, las colonias se seleccionaron y purificaron con base en el criterio de morfología colonial característica de los rhizobia, particularmente aquellas de consistencia mucoide, aspecto húmedo, luz reflejada brillante, bordes enteros y contorno circular, así como la morfología microscópica correspondiente a bacilos Gram negativos. Igualmente, se tomo en cuenta la capacidad de absorber el colorante rojo congo del medio del cultivo, ya que algunas bacterias del grupo tienden a adsorber el colorante aplicado en el medio de cultivo. Las cepas se purificaron por resiembras consecutivas en agar TY, verificando al microscopio la pureza del cultivo mediante tinción de Gram, una vez obtenidos los cultivos puros se prepararon para conservación en glicerol a -20 °C.

Resultados y discusión

Las cepas aisladas de rhizobia presentaron un crecimiento rápido, entre 24 y 48 h. Algunas cepas mostraron baja o nula absorción del colorante rojo congo al ser incubadas en la oscuridad, formando colonias blancas y en ocasiones rosas; mientras que otras cepas absorbieron el colorante, formando colonias de color rojo oscuro. Sin embargo, algunas cepas son capaces de absorber el colorante fuertemente si la caja petri se expone a la luz por una o más horas, como por ejemplo, ciertas cepas de *Sinorhizobium meliloti* (Antoun, and Prévost, 2005) (Figura 3).

Las cepas de rhizobia aisladas de las diferentes regiones del estado de Chihuahua presentaron una muy baja tasa de supervivencia *in vitro*, obteniéndose una colección de únicamente 24 aislados provenientes de suelo de cultivos de alfalfa, cacahuete, algodón, papa, chile, durazno y manzano; provenientes de las tres localidades muestreadas. Como era de esperarse, las poblaciones más elevadas de este grupo

For the determination of the rhizobial population, the colonies were selected and purified on the basis of the colonial morphology characteristic of the rhizobia, particularly those of mucoid consistency, wet appearance, light reflection, whole edges and circular contour; the microscopic morphology corresponding to Gram-negative bacilli was also considered. Likewise, the capacity to absorb the Congo red dye from the culture medium was taken into account, as some bacteria of the group tend to adsorb the dye applied to the culture medium. Strains were purified by consecutive reseeded in TY agar, checking for culture purity by Gram stain under the microscope; once pure cultures were obtained, they were prepared for preservation in glycerol at -20 °C.

Results and discussion

The rhizobial isolates showed rapid growth, of between 24 and 48 h. Some strains showed low or no absorption of Congo red dye when incubated in the dark, forming white colonies and sometimes pink ones, while other strains absorbed the dye, forming dark red colonies. However, some strains are capable of strongly absorbing the dye if the petri dish is exposed to light for one or more hours as, for example, certain strains of *Sinorhizobium meliloti* (Antoun and Prévost, 2005) (Figure 3).



Figura 3. Aislados provenientes de suelo de alfalfa en medio TY.
Figure 3. Isolates from alfalfa soil in TY medium.

Rhizobial strains isolated from the different regions of the state of Chihuahua had a very low survival rate *in vitro*, yielding only a collection of 24 isolates from the soil of alfalfa, peanut, cotton, potato, chili, peach and apple crops from the

bacteriano se obtuvieron de muestras asociadas a cultivos de alfalfa y cacahuete (plantas leguminosas asociadas simbióticamente a estas bacterias fijadoras de nitrógeno).

Haciendo un análisis de la composición química de los suelos, se puede concluir que los suelos del estado de Chihuahua son pobres en materia orgánica. Aunque considerando otros parámetros como contenido de nitrógeno y fósforo, en el caso del suelo de Casas Grandes, estos suelos resultan ser los más ricos en estos elementos. Comparando los suelos de Delicias y Ojinaga, el suelo asociado al cultivo de cacahuete en Delicias, es el más pobre de todos.

El análisis de las poblaciones bacterianas, tanto totales como rizobiales, presentes en los diferentes cultivos en el estado de Chihuahua, se observa una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en las poblaciones bacterianas de los diferentes puntos de muestreo; es decir, entre las localidades de Ojinaga, Casas Grandes y Delicias. Observando diferencias en las poblaciones de los diferentes suelos de cultivo, más bien dependientes, ya sea del tipo de cultivo presente, o de las prácticas agrícolas que se desarrollan para cada cultivo. No depende del tipo de suelo, ya que este se repite en algunas zonas de muestreo, y la población bacteriana cambia con los sitios.

De manera general, se observaron las poblaciones bacterianas totales más elevadas tanto en suelos de cultivo de alfalfa en Ojinaga (4×10^5 UFC/gr), como en suelos de nogal de la localidad de Casas Grandes (3.8×10^5 UFC/gr); mientras que la población más pequeña se detectó en suelo de cultivo de papa, en la localidad de Delicias (4×10^3 UFC/gr) (Cuadro 4).

three localities sampled. As expected, larger populations of this bacterial group were obtained from samples associated with alfalfa and peanuts (legumes symbiotically associated with these nitrogen-fixing bacteria).

It can be concluded, based on an analysis of the chemical composition of the soil, that the soils of the state of Chihuahua are poor in organic matter. While considering other parameters such as nitrogen and phosphorus content in the case of the Casas Grandes soil, these soils were found to be the richest in these elements. Comparing the soils of Delicias and Ojinaga, the soil associated with peanut cultivation in Delicias was the poorest of all.

In the analysis of bacterial populations present in the different crops in the state of Chihuahua, both total and rhizobial, there was a significant difference ($p = 0.05$) in the bacterial populations from different sampling points; i.e., between the towns Ojinaga, Casas Grandes and Delicias. There were differences in the populations of different agricultural soils, rather dependent either on the type of crop or on the agricultural practices developed for each crop. It does not depend on the type of soil, as these are repeated in some sampling areas and the bacterial population changes with the sites.

In general, larger total bacterial populations were observed both in alfalfa soils in Ojinaga (4×10^5 UFC/g) and in pecan soils of the town of Casas Grandes (3.8×10^5 UFC/g), while the smallest population was detected in a potato growing soil in the town of Delicias (4×10^3 UFC/g) (Table 4).

Cuadro 4. Estimación de la población bacteriana presente en las muestras de suelo del estado de Chihuahua.
Table 4. Estimation of the bacterial population present in soil samples from the state of Chihuahua.

Localidad	Cultivo	Población bacteriana (UFC)	Población rizobia (UFC)
Ojinaga	Alfalfa	4×10^5 a	6×10^3 a
	Algodón	1.1×10^5 bc	5.3×10^3 a
	Cacahuete	2.4×10^5 ab	6.3×10^3 a
	Cacahuete	2.9×10^4 c	6.6×10^3 a
Delicias	Alfalfa	1.4×10^5 bc	5.6×10^3 a
	Papa	4×10^3 c	0.1×10^3 c
	Chile	2.2×10^4 c	0.9×10^3 bc
	Durazno	3.4×10^4 c	0.7×10^3 bc
Casas Grandes	Manzano	2.7×10^4 c	0.3×10^3 bc
	Nogal	3.8×10^5 a	6.3×10^3 a
	Chile	2.6×10^5 ab	1.6×10^3 b

Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencia estadísticas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Se llegan a presentar ciertas diferencias significativas en la población bacteriana total entre las localidades de estudio; debido a la aplicación intensiva de agroquímicos, y en parte al tipo de laboreo y labranza aplicados en cada comunidad, lo que lleva a un cambio drástico en las poblaciones, disminuyendo la diversidad presente en los suelos (Rengel y Marschner, 2005; Khan, 2005; Khan, 2006). En el caso de la localidad de Ojinaga, las características del suelo son similares en los diferentes cultivos (Cuadro 3), no observándose una diferencia significativa en las poblaciones bacterianas totales ni rizobiales presentes, lo que indica una prevalencia del efecto de las prácticas que se desarrollan en los diferentes cultivos de este lugar, por sobre el efecto que pueden causar el tipo de cultivo en sí.

Al efectuar el aislamiento de las colonias con características morfológicas relacionadas con el grupo rizobia, algunas presentaron baja tasa de supervivencia *in vitro*, obteniéndose una colección de 24 aislados bacterianos provenientes de suelo con cultivos de alfalfa 6 cepas, cacahuete 5 cepas, algodón 3 cepas, papa 1 cepa, chile 2 cepas, durazno 4 cepas y manzano 3 cepas.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno tienen ventaja sobre otras bacterias en condiciones donde el nitrógeno disponible es limitante o completamente deficiente; sin embargo, también se ha encontrado que los fertilizantes nitrogenados y las prácticas de cultivo tienen efectos negativos sobre estas poblaciones, evitando la interacción microorganismo-planta, y por consiguiente, bloqueando el proceso de fijación biológica de nitrógeno (Reis *et al.*, 2004). A pesar que la distribución de los microorganismos "fijadores de nitrógeno" no está completamente dictada por la disponibilidad de nitrógeno en el ambiente, sino que es aleatoria, y puede predecirse con base en las características del hábitat (Zehret *et al.*, 2003).

En el caso de las leguminosas, poseen la propiedad para mejorar la fertilidad de los suelos es debida a la capacidad que tienen estas de establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno con bacterias del grupo de los rizobia. Estas bacterias le proporcionan a las plantas una ventaja adaptativa, en condiciones donde el nitrógeno disponible es limitante o completamente deficiente, debido a la capacidad que tienen de transformar el nitrógeno atmosférico (inerte) en amoníaco (disponible para la mayoría de los seres vivos). Esta propiedad les permite su establecimiento en suelos con condiciones adversas, liberando al ambiente compuestos que pueden servir como nutrientes a la microflora del suelo, y permitiendo un mayor desarrollo de las poblaciones microbianas cerca de los sitios de desarrollo de estas plantas.

Some significant differences in the total bacterial population between study sites were present due to the intensive use of agrochemicals and partly to the type of tillage applied in each community, which leads to a drastic change in the populations, decreasing the diversity present in the soils (Rengel and Marschner, 2005; Khan, 2005; Khan, 2006). In the case of the town of Ojinaga, soil characteristics are similar among different crops (Table 3). No significant difference was observed in the total or rhizobial bacterial populations present, indicating a prevalence of the effect of the practices that are developed for the different crops in this area over the effect that could be caused by the crop type itself.

Upon isolation of the colonies with morphological characteristics related to the rhizobia group, some had a low survival rate *in vitro*, resulting in a collection of 24 bacterial isolates from alfalfa soil, 6 strains; peanut soil, 5 strains; cotton soil, 3 strains; potato soil, 1 strain; chili soil, 2 strains; peach soil, 4 strains; and apple soil, 3 strains.

Nitrogen fixing bacteria have an advantage over other bacteria in conditions where the available nitrogen is limiting or completely lacking; however, it was also found that nitrogen fertilizers and farming practices have negative effects on these populations, impeding the interaction between microorganisms and plants, and thus blocking the process of biological nitrogen fixation (Reis *et al.*, 2004). Although the distribution of "nitrogen-fixing" microorganisms is random and not completely dictated by the availability of nitrogen in the environment, it can be predicted based on the characteristics of each habitat (Zehret *et al.*, 2003).

In the case of legumes, they possess the property of improving soil fertility due to their ability to establish a nitrogen-fixing symbiosis with bacteria of the rhizobia group. These bacteria provide an adaptive advantage to the plants under conditions where the available nitrogen is limiting or completely lacking, due to their ability for transforming atmospheric nitrogen (inert) into ammonia (available for most living beings). This property allows them to establish themselves in soils with adverse conditions, releasing to the environment compounds that can serve as nutrients for the soil microbiota, and allowing further development of microbial populations near the sites of development of these plants.

The peanut soil is not subjected to the application of agrochemicals and is very poor in nutrients, which promotes the establishment of associations between microorganisms

El suelo con cultivo de cacahuete no es sometido a la aplicación de agroquímicos y es muy pobre en nutrientes, lo que favorece el establecimiento de asociaciones microorganismo- planta que permiten cubrir necesidades nutrimentales como asimilación de nitrógeno a través de la FBN. Por el contrario, el cultivo de papa es fertilizado químicamente, al incrementarse el contenido de N y P en el suelo, las asociaciones simbióticas o endofíticas son desfavorecidas, ocasionando inclusive la desaparición de las poblaciones bacterianas en el suelo.

Recordemos que la papa ocupa el segundo lugar en producción hortícola, y aunque el cultivo de papa representa menos de 0.5% de la superficie agrícola del país, consume casi 20% del total de fungicidas agrícolas empleados, por lo que ocupa el primer lugar en el uso de insumos y agroquímicos que ocasionan problemas ambientales (Romero-Lima *et al.*, 2000) y con ello la reducción de la población microbiana total y, en particular, del grupo rhizobia.

En el caso de las poblaciones de rhizobia, no se encontraron presentes cultivos de leguminosas en esta zona; sin embargo, las poblaciones de rhizobia en los suelos de cultivo de nogal presentaron valores muy elevados, lo que nos permitiría en un futuro establecer cultivos de leguminosas en esta zona, y con ello, mejorar las condiciones del suelo.

La inclinación de los productores a aplicar grandes cantidades de fertilizantes químicos, para asegurar altos rendimientos en la producción agrícola, es una iniciativa que puede ser sana desde el punto de vista económico pero no deseable desde el punto de vista ambiental, debido a que gran parte del fertilizante aplicado no es absorbido completamente por la planta (FAO, 2004; Mendoza *et al.*, 2005; Salazar *et al.*, 2009; Peña *et al.*, 2010; Ledesma *et al.*, 2010; Tapia *et al.*, 2010), el resto se pierde por lixiviación y evaporación, afectando la calidad del agua mediante la percolación y escorrentía de nitratos y fosfatos y la calidad del aire por emisión de óxido nitroso, además de la degradación de los suelos por las prácticas de labranza intensiva que se aplican provocando erosión además de la pérdida de nutrimentos, materia orgánica y sobre todo reducción de las poblaciones bacterianas (Hernández- Rodríguez *et al.*, 2010).

En este estudio la estimación de población bacteriana presente bajo aplicación de agroquímicos refleja que ésta se ve afectada en su sobrevivencia, ya que Reis *et al.* (2004) destacaron como condicionante de la mayor o menor abundancia de microorganismos benéficos en el suelo, el

and plants which allow the latter to cover nutritional needs such as nitrogen assimilation through the FBN. By contrast, the potato crop is fertilized chemically; when the content of N and P increases in the soil, symbiotic or endophytic associations are hindered, even causing the disappearance of bacterial populations in the soil.

The potato occupies the second place in horticultural production, and that although potato cultivation represents less than 0.5% of the country's arable land, it consumes nearly 20% of all agricultural fungicides, so that it ranks first in the use of inputs and agrochemicals that cause environmental problems (Romero-Lima *et al.*, 2000), reducing the total microbial population and, in particular that of the group rhizobia.

No pulse crops were found in this area; however, the rhizobial populations in pecan crop soils had very high values, which would allow us to establish legume crops in this area in the future, and thus improve soil conditions.

The inclination of farmers to apply large amounts of chemical fertilizers for ensuring high yields of agricultural production is something that can be healthy from the economic point of view but undesirable from an environmental standpoint because a large part of the fertilizers applied is not completely absorbed by the plant (FAO, 2004, Mendoza *et al.*, 2005; Salazar *et al.*, 2009, Peña *et al.*, 2010; Ledesma *et al.*, 2010; Tapia *et al.*, 2010) and is lost through leaching and evaporation, affecting water quality through percolation and the runoff of nitrates and phosphates; it affects also air quality by the emission of nitrous oxide, in addition to the degradation suffered by the soils due to intensive tillage practices, which cause erosion and loss of nutrients and organic matter, and, above all, a decrease of the bacterial populations (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2010).

In this study, the estimation of the bacterial population present under the application of agrochemicals indicates that these products affect the capacity of bacteria to survive, as Reis *et al.* (2004) noted that a condition for the greater or lesser abundance of beneficial microorganisms in the soil is the type of crop management and the time of sampling combined with the type of host plant, due to the composition of root exudates and the C/N relationship of the rhizosphere. Another factor in the detection of microorganisms is the medium used to evaluate these populations, since any change of moisture, organic matter or soil pH can exert an influence.

manejo del cultivo y la época del muestreo combinado con el tipo de planta hospedera, debido a la composición de los exudados radiculares y la relación C/N de la rizósfera. Otro factor en la detección de microorganismos es el medio de cultivo utilizado para evaluar estas poblaciones, ya que cualquier modificación de la humedad, materia orgánica o el pH del suelo, puede influir.

La evaluación de la degradación del suelo radica en que algunos aspectos son reversibles a largo plazo, como la declinación de materia orgánica, la erosión, así como la reducción y efectividad de la población del grupo rizobia. Por lo que es de importancia que en los sectores agropecuarios y hasta el ambiental demanden un balance en la fertilidad, la conservación de la calidad ambiental y la protección de la salud humana, debido a que la falta de un diagnóstico en los suelos de los cultivos en estudio conlleva a errores en la selección y uso de agroquímicos (Baysalet *al.*, 2008; Ngugiet *al.*, 2008; Liuet *al.*, 2010).

Es importante promover el uso de plantas leguminosas como parte de una estrategia de rehabilitación de las localidades de estudio. Ello obedece a los problemas que se presentan en cuanto al deterioro del suelo y al daño que han sufrido las poblaciones bacterianas benéficas, ya que la utilidad de las leguminosas comprende también la actividad de fitorremediación. Los suelos degradados se vuelven económicamente inservibles y no viables, se ha reportado que algunas leguminosas como: *Acacia spirorbis*, *Acacia mangium*, *Cajanuscajan*, *Leucaena leucocephala*, etc., tienen la capacidad de controlar la erosión debido a la arquitectura de su raíz (Dasharath y Van den Bosch, 2004), inclusive en el área de suelos degradados por minería y actividades industriales (Fournier *et al.*, 2008).

La búsqueda de soluciones a los procesos de degradación de los suelos agrícolas, o bien a la recuperación de suelos agrícolas que se encuentran en zonas desérticas, como lo es el estado de Chihuahua, no solamente debemos enfocarnos en el empleo de plantas leguminosas. Existen, afortunadamente, una gran variedad de herramientas biológicas de las cuales podemos hacer uso para solucionar estos problemas agrícolas en estas regiones del país. Se tienen las llamadas plantas actinorrhizas (asociadas a actinomicetos fijadores de nitrógeno), la micorriza (asociación planta-hongo, porciona mayor superficie de contacto de la planta con el suelo), y bacterias no fijadoras de nitrógeno pero estimuladoras del crecimiento vegetal mediante la producción de hormonas vegetales o que funcionan como biocontrol de patógenos (Toledo *et al.*, 2008; Pohy Harwood, 2010; Degering *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011).

Some aspects of soil degradation are reversible in the long term, such as the decline in organic matter, erosion, and the reduction and loss of effectiveness of the rhizobial population. Thus, it is important that the agricultural and environmental sectors demand a balanced fertility, the conservation of environmental quality and protection of human health, as the lack of a diagnosis of the crop soils under consideration leads to errors in the selection and use of agrochemicals (Baysal *et al.*, 2008; Ngugiet *et al.*, 2008; Liuet *et al.*, 2010).

It is important to promote the use of leguminous plants as part of a rehabilitation strategy of the studied locations. This is due to the problems that arise with regard to soil deterioration and the damage sustained by beneficial bacterial populations, since the usefulness of legumes includes also their phytoremediation activity. Degraded soils become inoperable and economically unviable. It has been reported that some legumes such as *Acacia spirorbis*, *Acacia mangium*, *Cajanuscajan*, *Leucaena leucocephala*, etc., have the ability to control erosion due to the architecture of their root (Dasharath and Van den Bosch, 2004), even in soils degraded by mining and industrial activities (Fournier *et al.*, 2008).

The search for solutions to the degradation processes of agricultural soils, or to the recovery of agricultural soils found in desert areas, such as the state of Chihuahua, must not be focused on the use of leguminous plants only. There are, fortunately, a variety of biological tools that can be used in these regions of the country to solve these agricultural problems. There are the so called actinorrhizal plants (associated with nitrogen-fixing actinomycetes), the mycorrhiza (a plant-fungus association which provides more surface contact with the soil), and nitrogen-fixing bacteria that stimulate plant growth by producing plant hormones, and that can also serve as a biological control of plant pathogens (Toledo *et al.*, 2008; Pohy Harwood, 2010; Degering *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2011).

Studies reported by Doran (1980) show that differences in soil microbial populations are related to changes in water content, organic carbon levels, nitrogen and soil pH, all very important for the survival of microbial populations. However, current techniques of molecular biology allow detection and quantification of soil microorganisms, both viable and non-culturable, letting us reach an approximation of the population present in a particular soil (Patra *et al.*, 2006; Wertz *et al.*, 2006).

Estudios reportados por Doran (1980), muestran que las diferencias en las poblaciones microbianas del suelo están relacionadas con los cambios en el contenido del agua, niveles de carbono orgánico, nitrógeno y pH del suelo, importantes para la supervivencia de la población microbiana. Sin embargo, las técnicas actuales de biología molecular permiten la detección y cuantificación de los microorganismos del suelo, tanto viables, como no cultivables, y permitimos una aproximación de la población presente en un suelo determinado (Patra *et al.*, 2006; Wertz *et al.*, 2006).

Conclusiones

El análisis de las poblaciones bacterianas en muestras de suelo, en tres localidades del estado de Chihuahua, reflejó el efecto de las diferentes prácticas agrícolas, incluida la aplicación de fertilizante químico, observando una mayor población bacteriana en suelos con cultivo de alfalfa de Ojinaga y de nogal de la localidad de Casas Grandes, mientras que la menor población se detectó en suelo dedicado al cultivo de papa bajo aplicación de agroquímicos.

En la localidad de Ojinaga, se detectó que el uso de agroquímicos y el tipo de labranza es más intensivo, y en consecuencia las poblaciones bacterianas son menores. En cuanto a la población del grupo rizobia, el número de UFC fue mayor en el suelo con el cultivo de cacahuate de la localidad de Delicias y menor en el suelo con el cultivo de papa de esta misma localidad.

La baja estabilidad de algunos de los aislados para su mantenimiento en cultivo puro impide evaluar plenamente la diversidad bacteriana disponible en los suelos de cultivo y limita su estudio, considerando que para asegurar la sustentabilidad de los sistemas agrícolas de la región la implementación de cultivos adecuados y el estudio de bacterias capaces de sobrevivir bajo condiciones edafoclimáticas adversas, debido a que en Chihuahua, se ha observado que el exceso de agroquímicos en la producción de cultivos agrícolas, ocasionando una ecología no saludable, por lo que la utilización de los recursos microbiológicos del suelo en los sistemas agrícolas es una alternativa eficiente para reducir el uso de fertilizantes químicos en los sistemas de producción, de manera que se permita el mantenimiento de la estructura física y química del suelo así como de su balance biológico.

Conclusions

The analysis of bacterial populations in soil samples from three locations in the state of Chihuahua reflected the effect of different agricultural practices, including the application of chemical fertilizers; larger bacterial populations were found in alfalfa soils in Ojinaga and in pecan soils in Casas Grandes, while the smaller populations were detected on soils dedicated to the cultivation of potatoes with agrochemicals.

It was found that in the town of Ojinaga the use of agrochemicals and the type of farming is more intensive, and therefore bacterial populations are lower. As for the rhizobial population, the number of CFU was higher in the soil with peanut crop in the town of Delicias and lower in the soil with potato crop in the same location.

The low stability of some isolates regarding their maintenance in pure culture prevents a full assessment of the bacterial diversity available in agricultural soils and limits their study, considering that to ensure the sustainability of agricultural systems in the region it is necessary to cultivate appropriate crops and to study the bacteria that are able to survive under adverse soil and climatic conditions. It has been observed that the excessive use of agrochemicals in the production of agricultural crops in Chihuahua produces ecological damages. In this regard, the utilization of the microbiological resources of the soil in agricultural systems is an efficient alternative for reducing the use of chemical fertilizers in production systems, allowing the maintenance of the physical and chemical structure of the soil and of its biological balance.

End of the English version



Literatura citada

- Álvarez-Solís, J. D. y Anzueto-Martínez, M de J. 2004. Actividad microbiana del suelo bajo diferentes sistemas de producción de maíz en los altos de Chiapas, México. *Agrociencia* 38:13-22.
- Antoun, H. and Prevost, D. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. *In*: Siddiqui, Z. A. (Ed.) *PGPR: Biocontrol Biofertilization*. Springer, N. Y. 1-38 p.

- Barea, J. M.; Pozo, R. Azcón, M. P. and Azcón-Aguilar, C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56(417):1761-1778.
- Baysal, O. and ÇalışkanyÖ, Y. M. 2008. An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 73(1-3):25-32.
- Bhattacharjee, R. B.; Singh, A. and Mukhopadhyay, S. N. 2009. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects y challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:199-209.
- Caesar-Ton That, T. C.; Caesar, A. J.; Gaskin, J. F.; Sainju, U. M. and Busscher, W. J. 2007. Taxonomic diversity of predominant cultivable bacteria associated with microaggregates from two different agroecosystems their ability to aggregate soil in vitro. *Appl. Soil Ecol.* 36(1):10-21.
- Cerna, B. E.; Rejmankova, J.; Snyder. M. and Santruckova, H. 2009. Heterotrophic nitrogen fixation in oligotrophic tropical marshes: changes after phosphorus addition. *Hydrobiologia*, 627:55-65.
- Cong, P. T.; Dang-Dung, T.; Minh-Hien, T.; Thanh-Hien, N.; Choudhury-Abu, T. M. A.; Kecske, M. L. and Kennedy, I. R. 2009. Inoculant plant growth-promoting microorganisms enhance utilization of urea-N y grain yield of paddy rice in southern Vietnam. *European J. Soil Biol.* 45:52-61.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). 2004. Estadísticas semanales de incendios forestales en Chihuahua 1990-2004. Gerencia Región VI Río Bravo. Chihuahua, Chihuahua.
- Daniel, G. J. 2004. Infection y invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 280-300.
- Dasharath, P. L. and Van den Bosch, K. A. 2004. Grafting between model legumes demonstrates roles for roots y shoots in determining nodule type y host/rhizobia specificity. *J. Exp. Bot.* 56:1643-1650.
- Degering, C.; Eggert, T.; Puls, M.; Bongaerts, J.; Evers, S.; Maurer, S. K. and Jaeger, K. E. 2010. Optimization of protease secretion in *Bacillus subtilis* y *bacillus licheniformis* by screening of homologous y heterologous signal peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(19):6370-6376.
- Doran, J. W. 1980. Soil microbial y biochemical changes associates with reduce tillage. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44:765-771.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) Roma, 2004. Uso de fertilizantes por cultivo en Argentina. Primera edición. 49 p.
- Fournier, J.; Timmers, A. C. J.; Sieberer, B. J.; Jauneau, A.; Chabaud, M. and Barker, D. G. 2008. Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* Dynamic interplay with associated Rhizobial colonization. *Plantphysiology* 148:1985-1995.
- Hernández- Rodríguez, O. A.; Ojeda-Barrios, D. L.; López-Díaz, J. C. y Arras-Vota, A. M. 2010. Abonos orgánicos y su efecto en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. *Tecnociencia Chihuahua.* 4(1):1-6.
- Khan, A. G. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J. Trace Elements in Medicine Biol.* 18:355-364.
- Khan, A. G. 2006. Mycorrhizo remediation an enhanced form of phytoremediation. *J. Zhejiang University Science B.* 7(7):503-514.
- Ledesma, R. L.; Solís, M. E.; Suaste, F. Ma. del P. y Rodríguez, G. Ma. F. 2010. Relación de métodos de labranza, siembra, riego y dosis de nitrógeno con el rendimiento de trigo. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 1(1):55-63.
- Liu, B.; Huang, L.; Buchenauery, H. and Kang, Z. 2010. Isolation y partial characterization of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis*. *Pesticide Biochem. Physiol.* 98(2):305-311.
- Mendoza, M. F.; Inzunza, I. M. A.; Moran, M. R.; Sánchez, C. I.; Catalán, V. E. A. y Villa, C. M. 2005. Respuesta de la sandía al acolchado plástico, fertilización, siembra directa y trasplante. *Rev. Fitotec. Mex.* 28(4):351-357.
- Ngugi, H. K.; Dedej, S.; Delaplane, K. S.; Savelley, A. T. and Scherm, H. 2005. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. *Biol. Control* 33(1):32-38.
- Núñez- López, D.; Muñoz-Robles, C. A.; Reyes-Gómez, V. M.; Velasco- Velasco, I. and Gadsden-Esparza, H. 2007. Characterization of drought at different time scales in Chihuahua, México. *Agrociencia* 41(3):253-262.

- Patra, A. K.; Abbadie, L.; Clays-Josserand, A.; Degrange, V.; Grayston, S. J. and Guillaumeud, N. 2006. Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. *Environ. Microbiol.* 18:1005-1016.
- Peña, R. A.; González, C. F. y Robles, E. F. 2010. Manejo agronómico para incrementar el rendimiento de grano y forraje en híbridos tardíos de maíz. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 1(1):27-35.
- Reis, F.; Silva, M.; Teixeira, K.; Urquiag, L e Reis, V. 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* asociados a *Brachiariaspem* diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *R. Bras. Cie. Sol.* 28:103-113.
- Rengel, Z, and Marschner, P. 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytol* 168:305-312.
- Reyes, I.; Valery, A. and Valduz, S. 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *Plant Soil.* 287(1-2):69-75.
- Romero-Lima, M. del R.; Trinidad-Santos, A.; García-Espinosa, R.; y Ferrera- Cerrato, R. 2000. Producción de papa y biomasa microbiana en suelo con abonos orgánicos y minerales. *Agrociencia.* 34(3): 261-269.
- Rueda- Puente, O. E.; Murillo- Amador, B.; García-Hernández, J. L.; Barrón- Hoyos, J. M.; Precio-Rangel, P.; Tarazón-Herrera, M. A. 2009. Capítulo XII: las bacterias promotoras del crecimiento vegetal como biofertilizantes en ambientes áridos-salinos. *In: agricultura orgánica.* Orona, C. I.; Salazar S. E.; Fortis, H. M.; Trejo, E. H.; Vázquez, V. C.; López, M. J. D.; Figueroa, V. R.; Zúñiga, T. R.; Preciado, R. P. y Chavarría, G. J. A. Gómez Palacio, Durango, México. (ISBN:978-607-00-1646-7). 259-275 pp.
- Salazar-García, S.; Cossio-Vargas, L. E. y González-Durán, I. J. L. 2009. La fertilización de sitio específico mejoró la productividad del aguacate 'hass' en huertos sin riego. *Agric. Téc. Méx.* 35(4):436-445.
- Tate III, R. L. 1995. *Soil microbiology.* John Wiley y Sons, New Cork, USA.
- Toledo, F. L.; González- López, J. and Calvo, C. 2008. Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenesfaecalis* y *Enterobacter* species in liquid culture. *Biores. Technol.* 99(17):8470-8475.
- Urzúa, H. 2005. Beneficios de la fijación simbiótica de N₂ en Chile. *Cien. Inv. Agr.* 32(2):133-150.
- Villarreal, A. A.; Corlay, Ch. L.; Robledo, S. E.; Álvarez, S. M. E.; Vargas, H. M. y Pérez, N. J. 2000. Poblaciones microbianas del suelo en la conversión a labranza de conservación. La edafología y sus perspectivas al siglo XXI. R. 429-43 pp.
- Villegas, M. C. y Munive, A. 2005. Taxonomía y genética de la nodulación de los rhizobia, el grupo más importante de fijadores simbióticos de nitrógeno. *Biótica.* 2(1):55-106.
- Wertz, S.; Degrange, V.; Prosser, J. I.; Poly, F.; Commeaux, C.; Freitag, T.; Guillaumeud, N. and Le Roux, X. 2006. Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environ. Microbiol.* 8(12):2162-2169.
- Weir, B. S. 2011. The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website. 445 <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>. Last updated.
- Yang, X. P.; Wang, S. M.; Zhang, D. W. and Zhou, L. X. 2011. Isolation y nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying- denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1 *Biores. Technol.* 854-862.
- Zehr, J. P.; Jenkins, B. D.; Short, S. M. and Steward, G. F. 2003. Nitrogenase gene diversity y microbial community structure: across-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5:539-554.