



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN  
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA**

## **FIJACIÓN DE NITRÓGENO Y DIÓXIDO DE CARBONO CON EL SIMBIOSISTEMA AZOLLA-ANABAENA**

**ANTONIO ELVIRA ESPINOSA**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

2014

La presente tesis titulada: **FIJACIÓN DE NITRÓGENO Y DIÓXIDO DE CARBONO CON EL SIMBIOSISTEMA AZOLLA-ANABAENA**, realizada por el alumno: **ANTONIO ELVIRA ESPINOSA** bajo la dirección del Consejo particular indicado, ha sido aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

EDAFOLOGÍA

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:

  
\_\_\_\_\_  
DR. ROBERTO QUINTERO LIZAOLA

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. ANTONIO TRINIDAD SANTOS

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. GABRIEL LEYVA RUELAS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2014.

## *AGRADECIMIENTOS*

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de maestría.*

*Al Postgrado Edafología por brindarme la oportunidad de superarme profesionalmente.*

*A los integrantes de mi consejo particular: Dr. Roberto Quintero Lizaola, Dr. Antonio Trinidad Santos y Dr. Gabriel Leyva Ruelas. Por su confianza, enseñanza, apoyo y orientación durante el desarrollo de esta investigación, muchas gracias.*

*A todos los profesores de esta honorable institución, que contribuyeron a mi formación profesional.*

## *DEDICATORIAS*

*A mis padres:*

*Antonio Elvira Eugenio y Refugio Espinosa De Gante*

*Quienes con sacrificio, dedicación y paciencia han hecho posible mi desarrollo personal y  
formación profesional*

*A mis amigos y compañeros del Colegio de Postgraduados por compartir tan agradables  
momentos*

## CONTENIDO

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| LISTA DE CUADROS.....  | ii            |
| LISTA DE FIGURAS.....  | iii           |
| RESUMEN.....   | iv            |
| <b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>   | <b>1</b>      |
| 1.1. Objetivo General.....   | 2             |
| 1.2. Objetivo Particular.....  | 2             |
| 1.3. Hipótesis.....  | 2             |
| <b>CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>  | <b>3</b>      |
| 2.1. Historia de <i>Azolla</i> .....   | 3             |
| 2.2. Importancia de <i>Azolla-anabaena</i> .....   | 3             |
| 2.3. Simbiosistema <i>Azolla-anabaena</i> .....  | 4             |
| 2.4. Clasificación taxonómica.....   | 5             |
| 2.5. Reproducción de <i>Azolla</i> spp.....  | 6             |
| 2.6. Crecimiento en plantas.....   | 7             |
| 2.7. Tasa de crecimiento relativo.....   | 8             |
| 2.8. Luz.....  | 9             |
| 2.9. Fijación de nitrógeno en <i>Azolla</i> .....  | 9             |
| 2.10. Actividad de la nitrogenasa.....   | 10            |
| 2.11. Evento <i>Azolla</i> .....   | 11            |
| 2.12. Antecedentes de CO <sub>2</sub> en la atmosfera.....   | 14            |
| <b>CAPÍTULO III. TASAS DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE<br/>DUPLICACIÓN DE 17 ECOTIPOS DE AZOLLA<br/>COLECTADAS EN MÉXICO.....</b> | <b>17</b>     |
| RESUMEN.....   | 17            |
| SUMMARY.....   | 17            |
| 3.1. Introducción.....   | 18            |
| 3.2. Materiales y Métodos.....   | 10            |
| 3.3. Resultados y Discusión.....   | 23            |
| 3.4. Conclusiones.....   | 25            |
| <b>CAPÍTULO IV. FIJACION DE NITRÓGENO Y DIÓXIDO DE<br/>CARBONO EN CUATRO ESPECIES DE AZOLLA.....</b>                         | <b>26</b>     |
| RESUMEN.....   | 26            |
| SUMMARY.....   | 27            |
| 4.1. Introducción.....   | 28            |
| 4.2. Materiales y Métodos.....   | 30            |
| 4.3. Resultados y Discusión.....   | 34            |
| 4.4. Conclusiones.....   | 37            |
| 4.5. Literatura Citada.....  | 38            |
| 4.6. Anexos.....   | 45            |

## LISTA DE CUADROS

| <b>Cuadro</b> |  | <b>Página</b> |
|---------------|--|---------------|
| Cuadro 1      | Clasificación de <i>Azolla</i> , lugar de colecta, altitud y número de assección en el IRRI de los 17 Ecotipos.....  | 20            |
| Cuadro 2      | Solución nutritiva Yoshida.....  | 31            |
| Cuadro 3      | Distribución de los tratamientos.....  | 32            |
| Cuadro 4      | Biomasa, tiempo de duplicación, tasa media de crecimiento relativo y actividad de la nitrogenasa en especies de <i>Azolla</i> spp. Después de un crecimiento de 14 días..... | 34            |

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figura</b> |   | <b>Página</b> |
|---------------|---|---------------|
| Figura 1      | Morfología de <i>Azolla</i> y esporocarpos (corte longitudinal). 1. Tallo; 2. Ápice del tallo; 3 Colonia apical de <i>Anabaena</i> sin heterocistos; 4. Otras bacterias; 5. Primordio foliar; 6. Hoja joven, 7. Filamento pluricelular ramificado; 8. Filamento simple bicelular; 9. Lóbulo hoja superior. 10. Lóbulo hoja inferior; 11. Cavidad de la hoja; 12. Megaesporocarpo; 13. Indusia; 14. Esporocarpo; 15. Microsporangia; 16. Microesporocarpo; 17. Microesporangio; 18. Acinetes de <i>Anabaena</i> ; 19. Células vegetativas de <i>Anabaena</i> ; 20. Heterocisto (Modificado de Van-Hove, 1989)..... | 7             |
| Figura 2      | ACEX core recovery. Close up of laminated sediment (courtesy of M. Collinson) and image of fossil content, showing <i>Azolla</i> microspore massulae, chrysophyte cysts, dinoflagellates and ebridians.....   | 13            |
| Figura 3      | Mediciones desde 1958 en Mauna Loa, Hawaii. (Adaptado de Barnolaet <i>al.</i> , 1994; Neftel <i>et al.</i> , 1994; Keeling y Whorf, 1994.....   | 15            |
| Figura 4      | Cantidad de CO <sub>2</sub> secuestrado por diferentes organismos vegetales   | 16            |
| Figura 5      | Distribución geográfica de los 17 ecotipos colectados en la república Mexicana.....   | 21            |
| Figura 6      | TMCA (A), TMCC (B), TMCR (C) TD (D), Ecotipo Jiutepec con TMCA y temperatura (E) Ecotipo Jiutepec con TMCC y temperatura (t) (F), Ecotipo Jiutepec con TMCR + t (G) y Ecotipo Jiutepec con TD + t (H).....  | 24            |
| Figura 7      | Nitrógeno total de las cuatro especies de <i>Azolla</i> .....   | 35            |
| Figura 8      |   |               |

# FIJACIÓN DE NITRÓGENO Y DIÓXIDO DE CARBONO CON EL SIMBIOSISTEMA AZOLLA-ANABAENA

Antonio Elvira Espinosa, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2014.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, donde se sometió a estudio al helecho flotante de agua dulce *Azolla-anabaena* a una serie de variables. Este labor se dividió en dos partes ya que se sometió a estudio a 17 ecotipos de *Azolla*, así como cuatro especies de *Azolla*. En la primera parte los 17 ecotipos colectadas en México, se analizó el incremento de la biomasa bajo las mismas condiciones durante 26 días en un periodo de un año, para la cual se utilizaron los siguientes parámetros para medir el aumento de la biomasa con tasa media de crecimiento absoluto (TMCA), tasa media de crecimiento del cultivo (TMCC), tasa media de crecimiento relativo (TMCR) y tiempo de duplicación (TD). La TMCA y TMCC fue mejor en el ecotipo Jiutepec (JI), con  $1.2 \text{ g días}^{-1}$  y  $76 \text{ gm}^{-2}\text{día}^{-1}$  respectivamente y para TMCR y TD, el ecotipo más sobresaliente fue Chignahuapan (CH), con  $0.175 \text{ g g}^{-1} \text{ día}^{-1}$  y 3 días en el TD, el rango fue desde 3 días hasta 6 días. En la segunda parte se analizaron *A. filiculoides*, *A. microphylla*, *A. mexicana* y *A. caroliniana* para lo cual se utilizaron las siguientes variables, la determinación de biomasa fresca y seca, la tasa de crecimiento relativo (TCR), Tiempo de duplicación (TD), reducción de acetileno, tasa de fijación de nitrógeno total y reducción de dióxido de carbono, durante un periodo de 14 días, *A. microphylla* fue la más representativa ya que su peso fresco fue de 5.86 g y su tiempo de duplicación fue el de menor días, de 5.4 días con una TMCR de  $0.13 \text{ g g}^{-1} \text{ día}^{-1}$  y una fijación de nitrógeno total de  $0.728 \text{ nmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , a comparación con la especie que tuvo un



menor desempeño *A. mexicana*, la reproducción de la biomasa fue de 4.29 g su tiempo de duplicación fue de mayor de 6.6 días, su tasa media de crecimiento del cultivo de  $0.10 \text{ g g}^{-1} \text{ día}^{-1}$  y su porcentaje de acumulación de nitrógeno fue de  $0.609 \text{ nmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

*Azolla* es un helecho de agua dulce única, es una de las plantas de rápido crecimiento en el planeta debido a su relación simbiótica con una cianobacteria. Esta fija naturalmente el nitrógeno atmosférico para fertilizar *Azolla*, y *Azolla* ofrece una casa llena de nitrógeno para *Anabaena* dentro de sus cavidades de las hojas o frondas. Esto le permite que el helecho pueda tener una duplicación de su biomasa de dos a cuatro días en libre flotación sobre aguas superficiales.

Esto es capaz debido a que *Azolla* tiene un beneficio relacionado con la simbiosis permanente con *Anabaena azollae* una cianobacteria (alga azul-verde). Cada simbiote da algo a la otra en esta simbiosis permanente. Como el oxígeno es nocivo para las cianobacterias, *Azolla* ofrece un ambiente libre de oxígeno para *Anabaena* dentro de sus frondas. A cambio, *Anabaena* secuestra nitrógeno directamente de la atmósfera que luego se convierte en disponible para su crecimiento de *Azolla*,

Por su rápido crecimiento hace que *Azolla* sea un secuestro potencialmente importante del dióxido de carbono del gas de efecto invernadero que se convierte directamente en su biomasa. Esto proporciona dondequiera una alternativa local sustentable para la alimentación del ganado, y utilización como biofertilizantes. *Azolla* es un potencial notable para ayudarnos a combatir las amenazas relacionadas al cambio climático por acción antropogénica.

Así como su capacidad de multiplicación, la tasa de descomposición de la biomasa que es relativamente rápida y su disponibilidad de su nitrógeno al pie cultivo hace que sea agrónomicamente también sea excepcional. *Azolla* es ecológico, ya que nunca conduce a la contaminación del medio ambiente.

Tales sistemas biológicos son capaces de proporcionar 1,5-2,0 millones de toneladas de nitrógeno para la producción de cultivos en la India, mientras que, al menos, desde 3,3 hasta 4,4 millones de toneladas de urea estarán obligados a dar cantidades similares de nitrógeno (Raja *et al.*, 2012).

En este contexto el desafío, entonces, es trabajar con *Azolla* y utilizar sus propiedades notables como los tiempos de crecimiento así como su potencial de fijación de nitrógeno y dióxido de carbono para enfrentar problemáticas de calentamiento global y problemas de alimentación por falta de biomasa para alimentación de animal.

### **1.1. Objetivo General**

Evaluar la eficiencia de fijación de Nitrógeno y dióxido de carbono en el Simbiosistema de *Azolla-anabaena* de cuatro especies.

### **1.2. Objetivo Particular**

Evaluar la capacidad de tasa media de crecimiento absoluto, relativo y de cultivo así como el tiempo de duplicación de 17 ecotipos colectados en México.

### **1.3. HIPÓTESIS**

La fijación de Nitrógeno y dióxido de carbono es diferente en cada especie y tasas de crecimiento de 17 ecotipos de *Azolla*.

## **CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Historia de Azolla**

Los más antiguos Azolla fósiles son más de 70 millones de años, lo que representa los restos de plantas que vivieron durante el Período Cretácico Tardío, cuando los dinosaurios vagaban por la tierra. Se encuentran en los sedimentos que fueron depositados en cuerpos de agua dulce reposo, tales como lagos, estanques y ríos lentos, idénticas a las que utilizan las modernas Azolla (Sessa *et al.*, 2014). El uso de Azolla es muy popular entre los campesinos de Vietnam y China. De hecho los informes iniciales de Azolla la mencionan como una fuente de nitrógeno barata, utilizada por los agricultores chinos, había varios registros en la utilización de Azolla como abono a principios del XVII Siglo en China y Vietnam, fue descrita como una mini fábrica de fertilizante nitrogenado en los campos de arroz, esto fue escrito en el libro escrito por Jia Ssu Hsieh en 540 A.D (Singh, 1995).

### **2.2. Importancia de *Azolla-anabaena***

Azolla crece bien en los campos de arroz donde el agua está estancada en las parcelas. Hay informes que aumenta de 14 - 40% en la producción de los arrozales, aumento el rendimiento de paja, número de panículas y número de granos debido a la aplicación de *Azolla* (Singh, 1987). Los arrozales tienen un papel positivo en el aumento de la fertilidad del suelo y mejora la salud biológica, las población de bacterias, hongos y actinomicetos y ureasa alta y actividades de deshidrogenasa observó debido a componentes orgánicos por la utilización de *Azolla* en los arrozales (Krishnakumar, 2005). La actividad enzimática del suelo se considera como un índice de la actividad microbiana y la fertilidad

del suelo. Los resultados destacó el papel de entrada biológica de *Azolla* en el mantenimiento de las condiciones ecológicas y el suelo para mantener la productividad de los cultivos (Singh, 2007).

*Azolla* tiene muchos usos multidimensionales y recientemente también ha cobrado importancia como alimento para aves de corral y forraje. Tiene muchos usos tales como el uso como alimentación de la alimentación humana, animal, medicina, producción de biogás, combustible de hidrógeno, purificador de agua, control de malezas, reducción de la volatilización de amoníaco y porque de los usos múltiples facetas ha sido acertadamente referido como "verde oro mío" (Wanger, 1997).

Es considerado actualmente como un abono verde entre otros países como Filipinas, China, India, Vietnam, Tailandia e Indonesia (Tovar, 1993); sin embargo en nuestro país poco o nada se ha hecho para incorporarla en las prácticas agrícolas, más aun tomando en cuenta el creciente costo de los fertilizantes nitrogenados y la necesidad de aplicar una agricultura orgánica. Una recuperación de cociente de la salida de 2.07 con incorporación de *Azolla* fresca 7,5 toneladas por hectárea junto con 90 kg de nitrógeno por hectárea fue divulgado (Alexander, 1988).

### **2.3. Simbiosistema *Azolla-anabaena***

*Azolla* es uno de los simbiosistemas más importantes en los ambientes acuáticos con funciones de importancia ecológica, económica y agronómica (COSEWIC, 2008).

*Azolla* es un helecho acuático flotante que vive en muchos cuerpos de agua dulce, y consiste en un esporofito corto y ramificado que posee raíces cortas y simples de 0.5 a 2.5 cm de largo que cuelgan hacia abajo en el agua. La *Azolla* flota en la superficie del agua por sus numerosas frondas (hojas) pequeñas, alternas, bilobuladas y que se superponen

estrechamente unas a otras. En cada fronda, el lóbulo superior contiene clorofila mientras que el lóbulo inferior es incoloro (Carrapico, 2001; 2006)

*Azolla* alberga a la cianobacteria *Anabaena azollae* como simbiote en el lóbulo de su hoja dorsal, cuyo beneficio se fundamenta en su capacidad para reducir el nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) a formas inorgánicas asimilables para la planta (NH<sub>4</sub>) (Quintero, 1995; Grilliy Forni, 1999).

En esta simbiosis se da un intercambio de metabolitos (compuestos nitrogenados) que produce la cianobacteria y fotosintatos de la *Azolla* (Carrapico, 2001; 2006).

El desarrollo del simbiosistema *Azolla*-*Anabaena* está dado por varios factores como la radiación (575  $\mu\text{m m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ ), la temperatura (15° y 18° C), el pH (4.5 y 7.5), la conductividad eléctrica (>0.33 mmhos  $\text{cm}^{-1}$ ). El principal elemento en la nutrición de *Azolla* es el fósforo (2 y 4 mg L<sup>-1</sup>) y sus requerimientos varían entre los eco tipos del helecho (Ferentinos *et al.*, 2002; Espinoza y Gutiérrez, 2004).

#### **2.4. Clasificación taxonómica**

El género *Azolla* pertenece a la familia *Azollaceae*, sobre la base de sus órganos reproductivos se divide en los subgéneros *Azolla* y *Rhizosperma* y seis especies (Mosquera y Calderón, 2002; Carrapico, 2005). Las especies que pertenecen a subgénero *Azolla* son *A. filiculoides*, *A. caroliniana*, *A. microphylla* y *A. mexicana*, mientras que las pertenecientes al subgénero *Rhizosperma* son *A. pinnata* y *A. nilotica* (Evrard y Van-Hove, 2004).

El número cromosómico básico en todas las especies de la sección, así como la sección *Rhisosperma* es n = 22 excepto en *A. nilotica* donde n = 26. El es difícil asignación taxonómica de *Azolla* porque muchas adhesiones hacer Esporocarpos de forma no bajo condiciones de cultivo. Identificación precisa de los miembros de la sección *Azolla* es

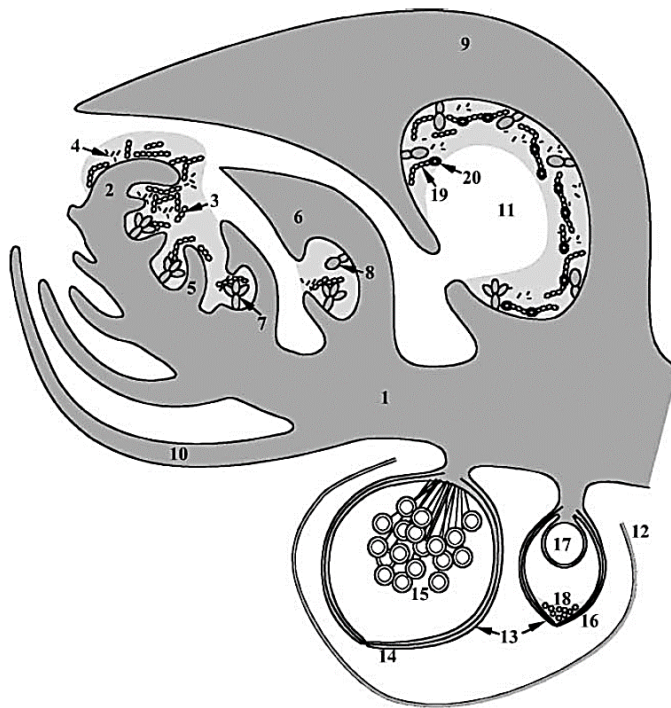
engorrosa debido a semejanza de caracteres vegetativos. Sin embargo, es comparativamente fácil de Rhizosperma porque los miembros son distintos unas de otras en este grupo (Perkins, 1985).

## **2.5. Reproducción de *Azolla* spp.**

La reproducción de *Azolla* puede ser de dos tipos: una asexual o vegetativa y otra sexual. La vegetativa se da por la fragmentación de ramas laterales que se separan del tallo principal, por lo cual se formará una nueva planta (Espinoza y Gutiérrez, 2003).

La reproducción sexual se da por dos tipos de espora (gametocitos macho y hembra) que se desarrollan dentro de un esporocarpo localizado en el envés de las hojas. Las esporas macho (microesporas) son verdosas o rojizas, tienen 2 mm de diámetro, y contienen numerosos esporangios macho con un solo anteridio que producirá ocho espermios nadantes. Las microesporas son extremadamente diminutas y tienden a formar pequeñas masas llamadas másulas. La microespora presenta un gloquidio que le permite adherirse y fertilizar a las megasporas femeninas (Carrapico, 2006).

*Azolla* alberga a la cianobacteria *Anabaena azollae* como simbiote en el lóbulo de su hoja dorsal, cuyo beneficio se fundamenta en su capacidad para reducir el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) a formas inorgánicas asimilables para la planta ( $NH_3$ ) (Quintero, 1995). En esta simbiosis se da un intercambio de metabolitos (compuestos nitrogenados) que produce la cianobacteria y fotosintatos de la *Azolla* (Carrapico, 2006).



**Figura 1.** Morfología de *Azolla* y esporocarpos (corte longitudinal). 1. Tallo; 2. Ápice del tallo; 3. Colonia apical de *Anabaena* sin heterocistos; 4. Otras bacterias; 5. Primordio foliar; 6. Hoja joven, 7. Filamento pluricelular ramificado; 8. Filamento simple bicelular; 9. Lóbulo hoja superior. 10. Lóbulo hoja inferior; 11. Cavidad de la hoja; 12. Megaesporocarpo; 13. Indusia; 14. Esporocarpo; 15. Microsporangia; 16. Microesporocarpo; 17. Microesporangio; 18. Acinetes de *Anabaena*; 19. Células vegetativas de *Anabaena*; 20. Heterocisto (Modificado de Van-Hove, 1989).

## 2.6. Crecimiento en plantas

Gardner *et ál.*, (1985) definen el crecimiento como un incremento irreversible en el tamaño de las plantas el cual a menudo es acompañado por cambios en la forma. Otros autores indican que el crecimiento es un aumento constante en el tamaño de un organismo, acompañado de procesos como la morfogénesis y la diferenciación celular (Mohr (1995) define que el crecimiento de los diferentes órganos de las plantas, es un proceso fisiológico complejo, que depende



directamente de la fotosíntesis, la respiración, la división celular, la elongación, la diferenciación, entre otros, y que además está influenciada por factores como temperatura, intensidad de luz, densidad de población, calidad de la semilla, disponibilidad de agua y de nutrientes. Un primer nivel de estudio, el crecimiento de las plantas, se centra en el aumento de materia seca en el tiempo (Goudriaan y Van Laar 1995).

El análisis de crecimiento es una aproximación cuantitativa, que usa datos simples y básicos, para la descripción e interpretación de las plantas que crecen bajo ambiente natural, seminatural o controlado. El análisis matemático de crecimiento usa medidas directas tales como masa seca total de la planta, área foliar total y tiempo; y medidas derivadas como son la tasa de crecimiento relativo (TCR), la tasa de crecimiento del cultivo (TCC), la tasa de crecimiento absoluto (TCA), tiempo de duplicación (TD), duración del área foliar (DAF), relación del área foliar (RAF), y el índice del área foliar (IAF) que pueden ser obtenidas a partir de las medidas directas (Gardner, 2003).

## **2.7. Tasa de crecimiento relativo**

Como plantas acuáticas de flotación libre, que se reproduce vegetativamente por fragmentación, Azolla tiene la capacidad de mantener una tasa de crecimiento exponencial bajo condiciones óptimas, ya que se pudieron obtener tasas de crecimiento relativo (TCR) de 0.355 a 0.390 g/g/día utilizando cuatro especies esterilizados en la superficie (Peters *et al.*, 1980). En experimentos de fitotrón, se lograron tasas máximas de crecimiento relativo

de 0.245 a 0.277 g/g/día en régimen de temperatura de 25/15°C a 35/25°C a 500 – 1000  $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ .

## **2.8. Luz**

La intensidad de luz afecta el foto periodo, afecta la tasa de crecimiento y fijación de nitrógeno. Según los investigadores, la cantidad de energía solar requiere la Azolla para un buen desarrollo es de 20 mil a 50 000 lux (Venkataraman 1980).

Quintero *et al.*, (2000), indica que a mayor régimen de horas luz se obtiene una mayor tasa relativa de crecimiento, así, como valores más altos de contenido de clorofila y fijación de nitrógeno.

## **2.9. Fijación de Nitrógeno en *Azolla***

La tasa de fijación de nitrógeno se puede estimar a partir de la tasa de crecimiento relativo y del contenido de nitrógeno del helecho. Este proceso de fijación de  $\text{N}_2$  se desarrolla en forma paralela al crecimiento de la planta. A medida que las hojas se desarrollan, la tasa de fijación aumenta. La capacidad de fijar nitrógeno atmosférico por parte del simbiosistema *Azolla-Anabaena*, es del orden de  $3 \text{ kg ha}^{-1}$  de N por día, que varía con la especie, por ejemplo, su aplicación en terrenos cultivados con arroz se han encontrado tasas de fijación de nitrógeno entre  $62\text{-}125 \text{ kg ha}^{-1}$  (Becking, 1986; Mayz-Figueroa, 2004).

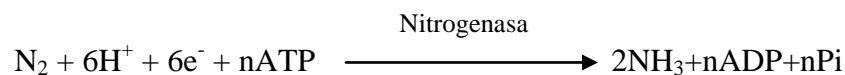
El uso de *Azolla-Anabaena* en México se encuentra en fase de investigación, sin embargo, algunos trabajos (Quintero, 1995; Quintero y Ferrera-Cerrato, 2000) señalan que este simbiosistema representa una de las alternativas con gran potencial para disminuir la dependencia de los fertilizantes nitrogenados.

## 2.10. Actividad de la nitrogenasa

El Nitrógeno (N) es un elemento necesario en la composición de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, siendo así una molécula esencial para el crecimiento de todos los organismos.

En la atmósfera el N ocupa aproximadamente el 80%, existiendo en la forma  $N\equiv N$ ; sin embargo, el  $N_2$ , debido al triple enlace entre los dos átomos de nitrógeno, que hace a la molécula casi inerte, no puede ser aprovechado por la mayoría de las formas vivientes, sino sólo por un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados, que incluyen algas, bacterias cianobacterias y actinomicetos. Para ser utilizado en el crecimiento, este debe ser primero reducido y luego “fijado” (combinado) en la forma de iones amonio ( $NH_4^+$ ) o nitrato ( $NO_3^-$ ). El proceso a través del cual esos microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma utilizable es conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN por sus siglas en español). El proceso puede ser llevado a cabo por los microorganismos en vida libre o en simbiosis con plantas, y el mismo no sólo permite usar el nitrógeno atmosférico sino también revertir o reducir la degradación del suelo (Allan y Graham, 2002; Parsons, 2004).

Las Cianobacterias *Anabaena azollae*, poseen un sistema multienzimático llamada nitrogenasa, el cual puede romper las moléculas de dinitrógeno muy estables y reducirlas a dos moléculas de amoníaco con la ayuda de las fuentes apropiadas de energía y electrones. La reacción es la siguiente;



La nitrogenasa es extremadamente sensitiva al oxígeno, causándole rápida inactivación. Se ha protegido al sistema multienzimático nitrogenasa del oxígeno con la especialización de ciertas células llamadas heterocistos, que poseen una pared compleja que priva al fotosistema productor de oxígeno (Van Hove *et al.*, 1982; Quintero y Ferrera-Cerrato, 2000).

### **2.11. Evento Azolla**

El evento Azolla fue un enfriamiento global que tuvo lugar hace 48,5 millones de años, a mediados del período Eoceno, a causa del crecimiento descontrolado del helecho flotante de agua dulce Azolla, que cubrió la superficie del océano Ártico durante 800.000 años.

El almacenamiento de estos vegetales en las capas sedimentarias del fondo oceánico provocó que la cantidad de dióxido de carbono de la atmósfera terrestre disminuyera drásticamente, contribuyendo así a incrementar un enfriamiento global que ya había comenzado tímidamente algunos millones de años atrás.

La intensidad de luz y el fotoperiodo desempeñan un papel importante en el crecimiento de la planta, por lo que ésta pudo haber crecido a un ritmo realmente elevado en las condiciones de inicios del Eoceno, como el clima relativamente cálido y las veinte horas de luz solar de las que gozaba en los polos geográficos, pudiendo llegar a duplicar su biomasa en apenas un par de días (Brinkhuis, 2006).

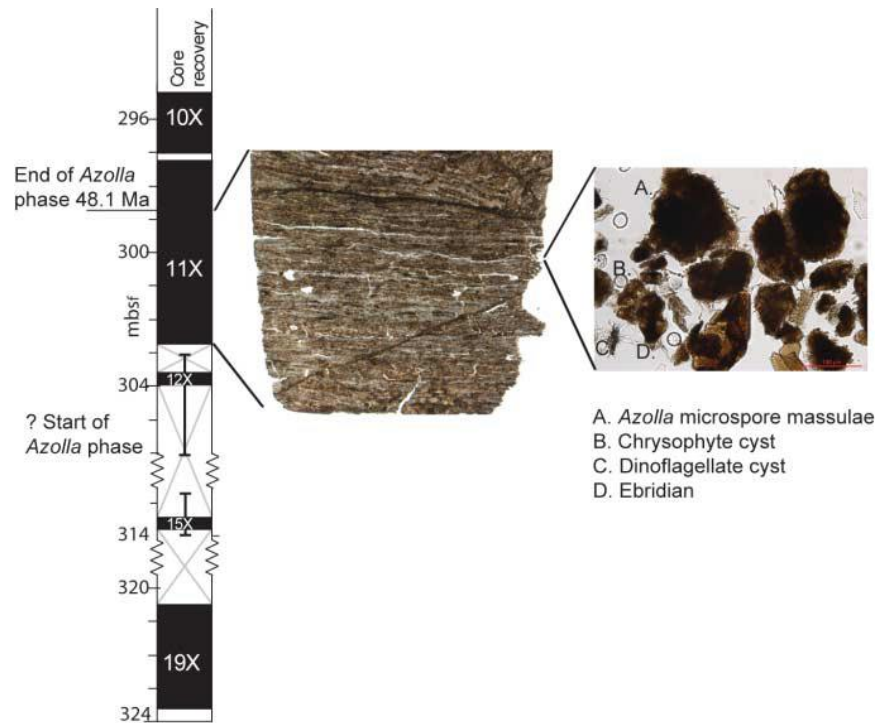
Durante el Eoceno, la configuración del planeta estaba dispuesta de tal manera que el Ártico se encontraba casi totalmente aislado de los demás océanos, por lo que estas corrientes eran prácticamente inexistentes, y el océano formaba una columna de agua estratificada similar a como ocurre hoy en día con el Mar Negro (Stein, 2006).

Las altas temperaturas y los intensos vientos fomentaron el aumento de la evaporación, lo cual elevó la densidad del océano, pero a su vez, las abundantes precipitaciones, provocadas en parte por la gran diferencia de temperatura con los mares adyacentes, (Brinkhuis, 2006), suministraron grandes cantidades de agua dulce menos densa, dando lugar a multitud de ríos que desembocaban en el océano y provocando una enorme reducción en la salinidad (Gleason, 2007a). Esto provocó la formación de una capa de agua dulce de menor densidad sobre la superficie oceánica (Gleason, 2007b).

Como *Azolla* necesita pocos centímetros de agua dulce para poder sobrevivir, el helecho colonizó con rapidez la superficie del océano Ártico. Además, la espesa capa de *Azolla* que se formó dificultó el intercambio de gases entre la superficie oceánica y la atmósfera, provocando una importante falta de oxígeno en las profundidades. Estas condiciones anóxicas reducen la concentración de compuestos férricos, lo que junto con los bajos niveles de sulfatos que poseía el océano Ártico se traduce en una mayor disponibilidad de fósforo (Smolders, 1993), el elemento que limita el crecimiento del helecho *Azolla* (pues las concentraciones de dióxido de carbono y nitrógeno atmosférico eran muy elevadas (Pearson, 2000), la bacteria simbiótica le proporciona nitrógeno fijado). Esto, unido a que los ríos que desembocaban en el océano Ártico eran ricos en minerales, entre ellos el fósforo, hizo que las condiciones de crecimiento para *Azolla* mejoraron todavía más.

El carbono fue atrapado y retenido bajo el fondo oceánico, quedando las plantas sepultadas y posteriormente fosilizadas. Esto fue precisamente lo que ocurrió. Las columnas de agua estratificadas que se formaron en el océano Ártico provocaron que cerca del fondo oceánico los niveles de oxígeno escasearan (Gleason, 2007a).

Esta anoxia dificultó la actuación de los organismos encargados de descomponer la materia orgánica, lo que permitió que la planta pudiera quedar enterrada bajo la capa de sedimentos antes de su descomposición, formando parte así del registro fósil y enterrando el carbono bajo el suelo oceánico (Speelman, 2009).



**Figura 2.** ACEX core recovery. Close up of laminated sediment (courtesy of M. Collinson) and image of fossil content, showing *Azolla* microspore massulae, chrysophyte cysts, dinoflagellates and ebridians.

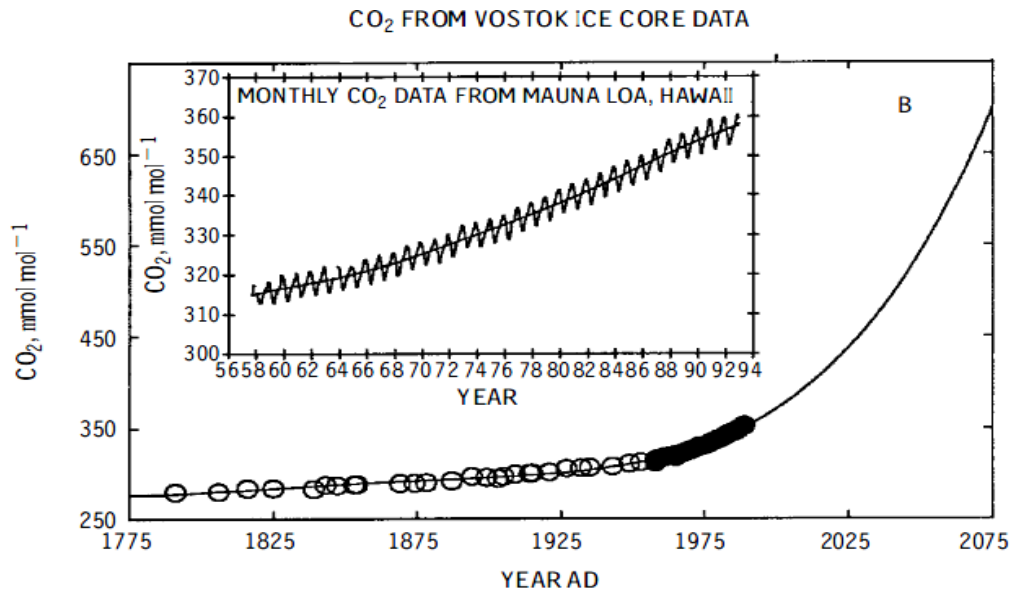
El subsuelo del océano Ártico alberga una capa de sedimentos de al menos ocho metros de espesor dispuesta en estratos alternos y bien diferenciados. La capa de rocas silíceo-clásticas representa el depósito sedimentario de los organismos planctónicos, la cual se alterna con unas finas capas muy comprimidas de apenas unos milímetros que contienen material fosilizado de *Azolla* correspondiente al Eoceno medio, como se muestra en la

figura anterior (Brinkhuis, 2006 y Waddell, 2006). Este patrón no sólo se ha encontrado en el Ártico, sino también en todos los mares nórdicos (Bujak, 1994).

## **2.12. Antecedentes de CO<sub>2</sub> en la atmosfera:**

Las concentraciones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en la atmósfera terrestre han variado a lo largo del tiempo geológico (Figura 3). Análisis de las burbujas de aire atrapado en el hielo núcleos de la Antártida y Groenlandia muestran las concentraciones de CO<sub>2</sub> y metano de la atmósfera hace 160.000 años antes del presente (Barnola *et al.*, 1987; Lorius *et al.*, 1990). Cambios de contenido de Deuterio dentro de los cristales de hielo se han utilizado para establecer las variaciones de temperatura durante este mismo período de tiempo (Jouzel *et al.*, 1987). Concentración de CO<sub>2</sub> fue tan bajo de 180 a 200 mmol mol<sup>-1</sup> durante los períodos de 13.000 a 30.000 y de 140.000 a 160.000 años antes de presentan durante las partes más frías de las dos últimas glaciaciones (Barnola *et al.*, 1987).

Las concentraciones de dióxido de carbono se elevó a unos 270 mmol mol<sup>-1</sup> durante el último período interglaciar (116.000 a 140.000 años antes del presente) y el actual período interglaciar (comenzando alrededor de 13.000 años antes del presente) como se muestra en la figura 3. Datos desde 1958 muestran que el CO<sub>2</sub> ha aumentado a 315 mmol mol<sup>-1</sup> a 355 mmol mol<sup>-1</sup> para finales de la década de los 80 (Keeling *et al.*, 1989). La tasa de aumento de CO<sub>2</sub> en la atmósfera es aproximadamente 0,5% por año, lo que significa que el cambio de la actual concentración de CO<sub>2</sub> se está acelerando.



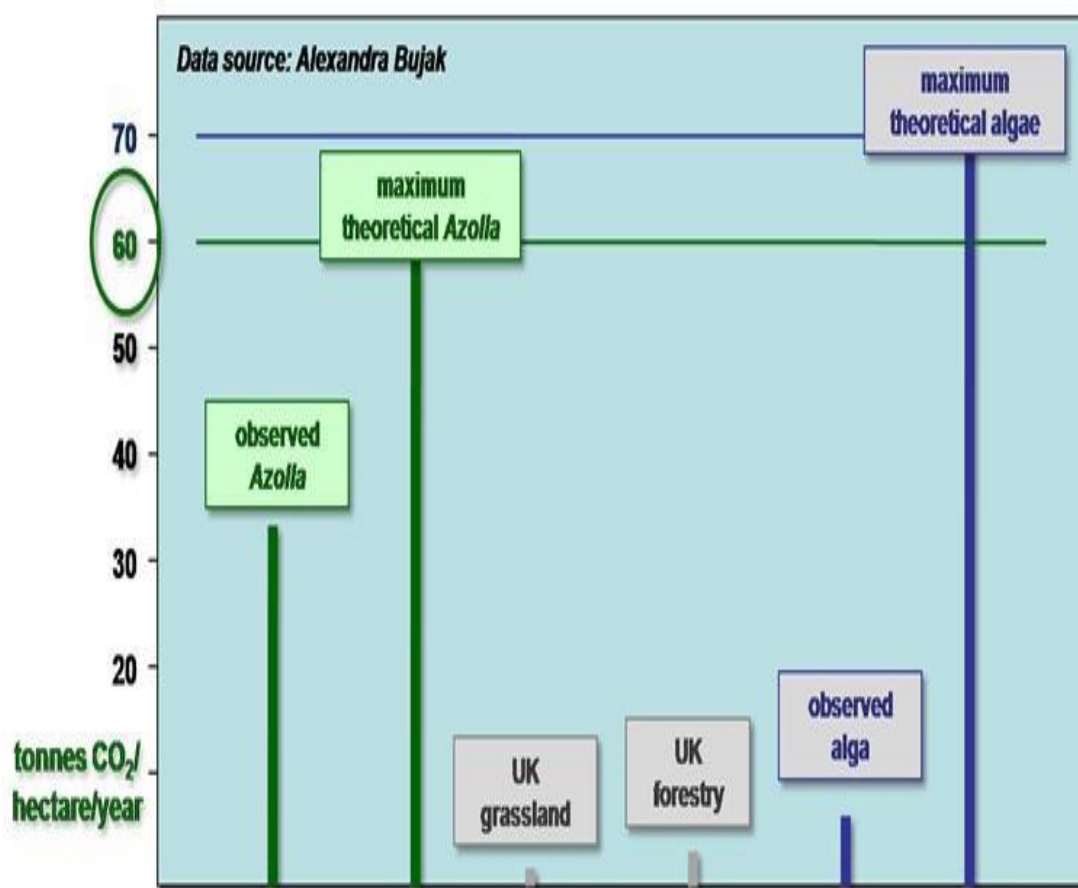
**Figura 3.** Mediciones desde 1958 en Mauna Loa, Hawaii. (Adaptado de Barnola *et al.*, 1994; Neftel *et al.*, 1994; Keeling y Whorf, 1994).

El efecto que causa el Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) en la atmósfera es que absorbe fotones infrarrojos y remite en todas direcciones, incluyendo hacia la superficie de la Tierra. Esta radiación adicional que regresa hace que la temperatura de la superficie-aire sobre 33°C más caliente de lo que sería en ausencia de tal radiación. El vapor de agua es el más eficaz Gas "invernadero"; El CO<sub>2</sub> es el próximo (Finlayson-Pitts y Pitts, 2000).

La combustión de combustibles fósiles agrega CO<sub>2</sub> a la atmósfera, y se reconoció que esta adicional fuente podría estar contribuyendo CO<sub>2</sub> más rápido que los océanos y la biosfera terrestre podría quitar ella. Si esto fuera así, el CO<sub>2</sub> se acumula en la atmósfera, lo que lleva a un aumento cantidad de radiación remitida a la superficie terrestre.



Se ha hecho compara con el valor teórico de captura de carbono, que ha servido como referencia para otros estudios en otra región del mundo con esta especie de helecho, en que se incluye el comportamiento de otros organismos vegetales referente a la captura de CO<sub>2</sub>.



**Figura 4.** Cantidad de CO<sub>2</sub> secuestrado por diferentes organismos vegetales (Bujak, 2013).

### CAPÍTULO III. TASAS DE CRECIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACIÓN DE 17 ECOTIPOS DE *Azolla*. COLECTADAS EN MÉXICO

#### RESUMEN

La presente investigación se realizó en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, donde se sometió a diecisiete ecotipos de *Azolla* colectados en la República Mexicana para observar el incremento de la biomasa bajo las mismas condiciones, para lo cual se utilizaron los siguientes parámetros para medir el aumento de la biomasa, tasa media de crecimiento absoluto (TMCA), tasa media de crecimiento del cultivo (TMCC), tasa media de crecimiento relativo (TMCR) y tiempo de duplicación (TD) la cual se inició pesando un gramo de *Azolla* de cada ecotipo y dejando multiplicarse por un periodo de 26 días, después de colecto la biomasa, se pesó y enseguida se metió a la estufa para obtener un peso constante. El incremento de la biomasa, en cuanto a la TMCA y TMCC fue mejor en el ecotipo Jiutepec (JI), con  $1.2 \text{ g días}^{-1}$  y  $76 \text{ gm}^{-2}\text{día}^{-1}$  respectivamente y para TMCR y TD, el ecotipo más sobresaliente fue Chignahuapan (CH), con  $0.175 \text{ g g}^{-1}\text{día}^{-1}$  y 3 días en el TD, el rango fue desde 3 días hasta 6 días.

**Palabras clave:** *Biomasa, Simbiosistema, Tiempo de duplicación.*

#### SUMMARY

This research was conducted at the premises of the Graduate College, where he underwent seventeen ecotypes of *Azolla* collected in Mexico to observe the increase in biomass under the same conditions, for which the following parameters were used to measure the increase biomass, mean absolute growth rate (MACT), average crop growth

rate (TMCC), mean relative growth rate (TMCR) and doubling time (DT) which began weighing one gram of *Azolla* each ecotype and leaving multiplied by a period of 26 days, after I collect biomass, weighed and immediately put me on the range to constant weight. The biomass increase, as to the TMCC TMCA and was better in the ecotype Jiutepec (JI), with 1.2 g-1 and 76 days gm-2day-1 respectively and TMCR and TD, the most striking was Chignahuapan ecotype (CH) with 0.175 g g-1 day-1 and 3 days at the TD, the range was from 3 days to 6 days.

***Index words:*** Biomass, Simbiosistema, Doubling time.

### 3.1. INTRODUCCIÓN

*Azolla* Lam. es un helecho flotante de agua dulce, que en la actualidad se encuentra en climas templados y tropicales alrededor de todo el mundo, este helecho es utilizado principalmente en agriculturas tropicales como biofertilizante en los arrozales, como es el caso del sudeste de Asia (IRRI, 1992), también es empleado para la alimentación de animales de corral, como aves, vacas, cerdos y peces, así como para mejorar las condiciones de suelo pobres de nutrientes (Kiguli, 2000).

Debido al alto contenido de proteína de *Azolla* que puede ir desde 13 a 30 % dependiendo la especie, junto con su alta palatabilidad y su facilidad de suministro, hace ideal para alimentación animal (Quintero, 2000). Por hectárea de *Azolla* es capaz de producir de 1 a 2 toneladas de forraje fresco por día, equivalente a 10 – 30 Kg de proteína por día, por su alta capacidad de crecer en forma simbiótica con la cianobacteria *Anabaena azollae* (Peters, *et al.*, 1989). El hospedero *Azolla*, este contiene los pigmentos fotosintéticos clorofila a, clorofila b y carotenoides asociados a los cloroplastos; mientras

que los filamentos de *Anabaena* presentan clorofila a, ficobiliproteínas y carotenoides (Mosquera y Calderón, 2002). La suma de estos pigmentos fotosintéticos principales y accesiones, permite al organismo simbiótico aprovechar más la energía luminosa. Esta característica es una de las responsables del rápido crecimiento y la acumulación de biomasa en poco tiempo.

Este helecho puede tener un tiempo de duplicación de aproximadamente de cinco días, bajo condiciones favorables como radiación, temperatura, pH, conductividad eléctrica, porcentajes bajos de nitrógeno y altos en fósforo, por lo general es el elemento que obstaculiza su crecimiento. Peters (1980), menciona que como planta acuática de flotación libre, se reproduce vegetativamente por fragmentación y tiene la capacidad de mantener una tasa de crecimiento exponencial y TMCR de 0.355 a 0.390 g g día<sup>-1</sup>. Productividad de la biomasa depende del tiempo de duplicación así como la tasa de crecimiento absoluto, tasa de crecimiento del cultivo y tasa de crecimiento relativo y para su eficiencia biofertilizante.

Por otro lado la cianobacteria tiene la facultad de fijar nitrógeno para sí misma y para el helecho, mientras que *Azolla* le proporciona protección y una fuente segura de carbono (Wagner, 1997). La fijación de nitrógeno atmosférico, puede llegar a 0.25 kilogramos de nitrógeno por m<sup>2</sup> día<sup>-1</sup> (91.25 kg año<sup>-1</sup>), lo cual implica una reducción anual de 1,5 kg m<sup>2</sup> de carbono (Belnap, 2002).

En este contexto se enmarca la utilización y potenciación del helecho acuático *Azolla* como biofertilizante en la agricultura para conservar y mejorar la fertilidad del suelo, así como para alimentación animal debido al incremento desmedido de la población mundial y la escasez más frecuente de combustibles fósiles para fabricar fertilizantes nitrogenados hacen necesario voltear nuestra mirada hacia estas alternativas biológicas de

bajo costo y nada contaminantes por ello es necesario investigar más sobre el helecho que nos permita aprovechar los ecotipos que se encuentran en nuestro país y aprovecharlos eficientemente de acuerdo al uso que se les pretenda dar con fines productivos ya sean agrícolas o pecuarios.

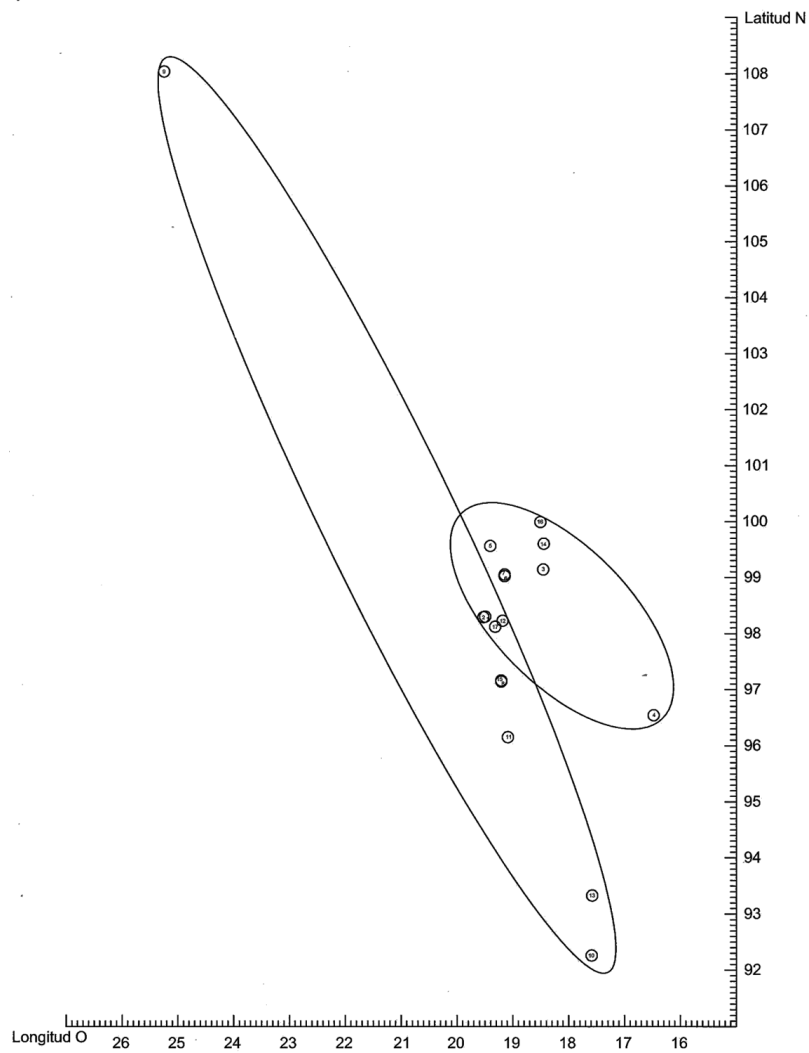
### 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación fue realizado en las instalaciones del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo en el Postgrado de Edafología. Los 17 ecotipos de *Azolla* (cuadro 1), provinieron de la colección de Germoplasma (*Azollatum* Alfredo Echegary Aleman), con réplica de la colección de Germoplasmas de biofertilizantes en IRRI (International Rice Research Institute), en los Baños-Manila Filipinas.

**Cuadro 1: Clasificación de *Azolla*, lugar de colecta, altitud y número de assección en el IRRI de los 17 Ecotipos.**

| Especie     | Lugar de colecta  | Latitud Norte | Longitud oeste | Altitud (m) | No. Colecta IRRI |
|-------------|-------------------|---------------|----------------|-------------|------------------|
| FI          | Chignaguapan (CH) | 19°50'16"     | 98°00'57"      | 2320        | -                |
|             | Tecomulco (HI)    | 19°53'20"     | 98°29'54"      | 2520        | 1510             |
|             | Atlacamulco (MO)  | 18°46'28"     | 99°14'47"      | 1350        | -                |
|             | Zimatlan (OA)     | 16°48'50"     | 96°54'12"      | 1500        | 8028             |
|             | Toshi (TO)        | 19°51'44"     | 99°56'20"      | 2550        | -                |
|             | Tláhuac (TL)      | 19°15'25"     | 99°02'38"      | 2240        | -                |
|             | Xochimilco (XO)   | 19°15'10"     | 99°05'10"      | 2240        | 8032             |
| CA/ME       | Cerro gordo (JA)  | 19.22'29"     | 96°14'45"      | 635         | 8027             |
|             | Guamúchil (SI)    | 25°26'00"     | 108°04'32"     | 50          | 4506             |
|             | Mazatiupan (TA)   | 17°59'30"     | 92°26'54"      | 10          | 4139             |
|             | Altamirano (VEJ)  | 19°09'50"     | 96°15'45"      | 18          | 3511             |
|             | Texmelucan (TE)   | 19°17'30"     | 98°25'45"      | 2300        | 8030             |
| TI- FI      | Cardenas (CE)     | 17°58'35"     | 93°23'12"      | 30          | -                |
| TI- CA/ME   | Ticuman (TI)      | 18°45'59"     | 99°06'47"      | 970         | -                |
| TI-CA/ME    | Veracruz (VEII)   | 19°21'55"     | 97°16'10"      | 18          | 8026             |
| TI-FI       | Jiutepec (JI)     | 18°51'21"     | 99°09'36"      | 1296        | -                |
| TI-CA/ME-FI | Atlangatepec (AT) | 19°33'0.5"    | 98°10'32"      | 2500        | -                |

La colecta de *Azolla* fue hecha desde Huamúchil, Sinaloa hasta Cárdenas Tabasco, encontrando tres especies, siete *Azolla filiculoides* (FI), cinco mezclas de *Azolla carolinina* y *Azolla mexicana* (CA/ME), la clasificación y número de 13 Ecotipos (Cuadro, 1) fueron obtenidas desde el International Rice Research Institute (IRRI), el resto fue identificada tentativamente (IT) por su latitud, longitud y altitud figura 4.



**Figura 5.** Distribución geográfica de los 17 ecotipos colectados en la republica Mexicana.

El trabajo de investigación, se realizó con un diseño de bloques completamente al azar, con tres repeticiones por cada tratamiento, con un total de 51 unidades experimentales, el establecimiento se inició pesando 1g de *Azolla* fresca de cada uno de los ecotipos y posteriormente se colocó en recipientes de plástico (15 × 10.4 × 5 cm) con una área de 0.01566m<sup>2</sup> conteniendo solución nutritiva Yoshida (solución nutritiva sin nitrógeno SN). La SN fue removida cada tres días para evitar la proliferación de algas que impiden el crecimiento de helecho, después de los 26 días. El incremento del peso fresco de la biomasa fue tomado cada veintiséis días después de la siembra para lo cual se utilizó una malla plástica para el filtrado del material. Luego las fondas de *Azolla* eran lavadas con agua de chorro y posteriormente con agua destilada, secadas al aire por media hora, en seguida la muestra fue secada en una estufa a 90°C hasta alcanzar el peso constante, por diferencia de peso se determinó el contenido de humedad de las muestras.

Las variables que se tomaron fueron para determinar el crecimiento de la biomasa fueron, Tasa media de crecimiento absoluto (TMCA), Tasa media de crecimiento del cultivo (TMCC), Tasa media de crecimiento relativo (TMCR) y tiempo de duplicación, donde P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> son el peso inicial y final, respectivamente, y T es el tiempo de la colecta.

$$TMCA = \frac{P_2 - P_1}{T} = \text{gdía}^{-1}$$

$$TMCC = \frac{P_2 - P_1}{\text{Área}} = \text{gm}^2 \text{día}^{-1}$$

$$TMCR = \frac{\log_{(e)}(P_2) - \log_{(e)}(P_1)}{T} = \text{gdía}^{-1}$$

$$TD = \frac{\ln_2}{TMCR} = \text{días}$$

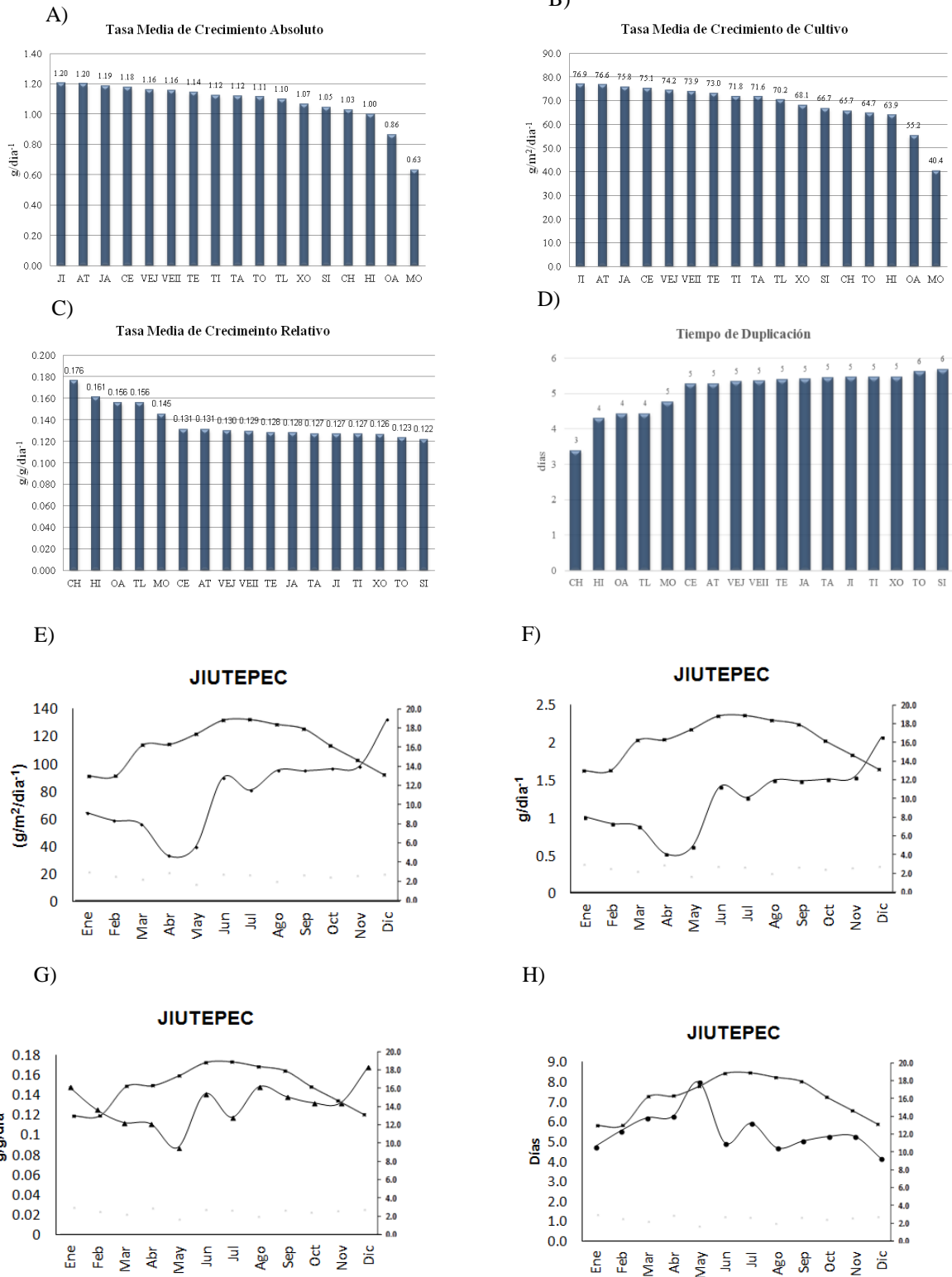
Se realizaron análisis de varianza y las comparaciones de medias con DMS ( $\alpha=0.05$ ) utilizando el Sistema de Análisis Estadístico (SAS, versión 1998). Los análisis estadísticos se procesaron con el Sistema de Análisis Estadístico (SAS)

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El crecimiento que se observó en cada uno de los ecotipos no fue limitado por las condiciones distintas a los lugares de orígenes, como lo menciona Payawal y De Macale que es importancia de conocer las diferencias entre las accesiones de la especie de *Azolla*. De acuerdo a estos autores las condiciones donde se desarrolla la especie puede limitar su capacidad de ser usado como biofertilizante, ya que puede afectar su capacidad de producir biomasa y su fijación biológica de nitrógeno. En general, todos los ecotipos de *Azolla* utilizadas en el experimento presentaron un crecimiento satisfactorio en el medio de cultivo utilizado, sin embargo si se presentaron diferencias significativas entra cada uno de ello.

Desde el punto de vista de aumento de peso por unidad de tiempo, la TMCA incremento su biomasa por día, encontrando que los ecotipos JI, AT, y JA, fueron los más sobresalientes de los diecisiete, obteniendo valores de  $1.2 \text{ g día}^{-1}$ , al igual que la TMCC, en cuanto en crecimiento que te tuvo en un metro cuadrado por día, consiguiendo  $76 \text{ gm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ , Estos resultados sugieren que estos ecotipos son altamente eficiente en la producción de biomasa en corto tiempo requiriendo una baja cantidad de nitrógeno. De acuerdo a Quintero y Ferrera-Cerrato (1992), se perfilan como una fuente importante de materia orgánica para el suelo debido a su rápida multiplicación, utilizando nitrógeno atmosférico como fuente de N.





**Figura 6:** TMCA (A), TMCC (B), TMCR (C) TD (D), Ecotipo Jutepec con TMCA y temperatura (E) Ecotipo Jutepec con TMCC y temperatura (t) (F), Ecotipo Jutepec con TMCR + t (G) y Ecotipo Jutepec con TD + t (H).

La TMCR, donde el crecimiento es de cada gramo cuantos gramos crece por día, se obtuvo en el ecotipo CH valores de  $0.175 \text{ gg}^{-1}\text{día}^{-1}$ . En regiones central costera del Estado de Veracruz, Pérez (1986); Quintero (1988), obtuvo la máxima tasa relativa de crecimiento medio de una combinación de  $50 \text{ kg de P}_2\text{O}_5\text{ha}^{-1}$  y 100% de radiación solar ( $0.120 \text{ gg}^{-1}\text{día}^{-1}$ ).

Mientras que el tiempo de duplicación se obtuvieron rangos desde tres días hasta seis días, lo que es el doble de tiempo de multiplicación. Espinoza (2003), encontró tiempos de duplicación que van de 2.8 hasta 4.8 días, en accesiones de *Azolla filiculoides* colectadas en Venezuela.

### **3.4. CONCLUSIONES**

Los resultados de este estudio muestran que los ecotipos colectados en la República Mexicana, presentaron diferencias en cuanto a las tasas de crecimiento y tiempo de duplicación.

Los ecotipos Jiutepec, Atlangatepec y Cerro Gordo presentaron una similitud en cuanto a la tasa media de crecimiento absoluto y tasa media de crecimiento del cultivo, a diferencia de los ecotipos Chignahuapan, Tecocomulco y Zimatlan, fueron semejantes en la tasa media de crecimiento relativo y tiempo de duplicación.

## CAPÍTULO IV. FIJACION DE NITRÓGENO Y DIÓXIDO DE CARBONO EN CUATRO ESPECIES DE AZOLLA

### RESUMEN

La presente investigación se realizó en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, donde se evaluaron cuatro especies de *Azolla*, *A. filiculoides*, *A. microphylla*, *A. mexicana* y *A. caroliniana*, bajo las mismas condiciones climáticas y de solución nutritiva, para lo cual se utilizaron las siguientes variables, la determinación de biomasa fresca y seca, la tasa de crecimiento relativo (TCR), Tiempo de duplicación (TD), reducción de acetileno, tasa de fijación de nitrógeno total y reducción de dióxido de carbono, la cual se inició pesando un gramo de *Azolla* de cada especie y dejando multiplicarse por un periodo de 14 días, después de colecto la biomasa, se pesó y enseguida se metió a la estufa para obtener un peso constante para observar el incremento de la biomasa. La especie que se obtuvieron mejores resultados fue *A. microphylla* ya que su biomasa en peso fresco fue de 5.86 g y su tiempo de multiplicación fue el de menor días, de 5.4 días con una tasa media de crecimiento relativo de  $0.13 \text{ g g}^{-1} \text{ día}^{-1}$  y una fijación de nitrógeno total de  $0.728 \text{ nmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , a comparación con la especie que tuvo un menor desempeño *A. mexicana*, la reproducción de la biomasa fue de 4.29 g su tiempo de duplicación fue de mayor de 6.6 días, su tasa media de crecimiento del cultivo de  $0.10 \text{ g g}^{-1} \text{ día}^{-1}$  y su porcentaje de acumulación de nitrógeno fue de  $0.609 \text{ nmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . la especie *Azolla microphylla* fue la más sobresaliente de las cuatro especies la cual se puede considerar como una alternativa sustentable para la utilización como alimento para ganado y un biofertilizantes así como un potencial mitigador de dióxido de carbono.

**Palabras clave:** Reduccion de acetileno, Nitrogenio total, Dióxido de carbono.

## SUMMARY

This research was conducted at the premises of the Graduate College, where four species of Azolla, *A. filiculoides*, *A. microphylla*, Mexican *A.* and *A. caroliniana* were evaluated under the same climatic conditions and nutrient solution, for which the following variables were used, the determination of fresh and dry biomass, relative growth rate (RGR), doubling time (TD), acetylene reduction, fixation rate of total nitrogen and carbon dioxide reduction, which is began weighing one gram of Azolla of each species and leaving multiplied by a period of 14 days, after I collect biomass, weighed and immediately put me on the range to obtain a constant to observe the increase in biomass weight. The species that better results are obtained was *A. microphylla* as fresh weight biomass was 5.86 g and doubling time was less days, 5.4 days with a mean relative growth rate of 0.13 g g<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> and total nitrogen fixation 0.728 nmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, compared with the species had lower scores Mexican *A. replica* biomass was 4.29 g its doubling time was increased from 6.6 days their average growth rate of 0.10 g cultivation g<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> and nitrogen accumulation rate was 0.609 nmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. *Azolla microphylla* species was the most important of the four species which can be considered as a sustainable alternative for use as cattle feed and biofertilizers as a mitigating potential of carbon dioxide.

***Index words:*** *Acetylene reduction, Total Nitrogen, Carbon Dioxide.*

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha acentuado tres problemas que no solo enfrentan nuestro país sino el planeta: a) la crisis energética, b) la alimentación básica y c) la contaminación ambiental. Combustión de hidrocarburos contribuye a la atmósfera aproximadamente 6 Gt C por año en el planeta (IPCC 2007). Contribuyendo a que la temperatura del planeta va ascendiendo gradualmente debido a la presencia creciente en el aire de gases que atrapan la radiación infrarroja emitida por la Tierra y la remiten de nuevo a la superficie terrestre calentando la misma.

La atmósfera está compuesta por nitrógeno (78,1%), oxígeno (20,9%) y argón (0,93%), son gases minoritarios en su composición como el dióxido de carbono (0,035%: 350 ppm), el ozono y otros los que desarrollan esta actividad radiactiva. Además, la atmósfera contiene vapor de agua (1%: 10.000 ppm) que también es un gas radiactivamente activo, siendo con diferencia el gas natural invernadero más importante. El dióxido de carbono ocupa el segundo lugar en importancia.

Actualmente el CO<sub>2</sub> presente en la atmósfera está creciendo de modo no natural por las actividades humanas, principalmente por la combustión de carbón, petróleo y gas natural que está liberando el carbono almacenado en estos combustibles fósiles y la deforestación de la selva pluvial que libera el carbono almacenado en los árboles.

La concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico se ha incrementado desde la época preindustrial (año 1.750) desde un valor de 280 ppm a 379 ppm en 2005. Actualmente. Modelos de Circulación General (GCM) han pronosticado un aumento de la temperatura mundial de 2,8 a 5,2 ° C para una duplicación del CO<sub>2</sub>. Se requerirá un esfuerzo masivo y colectivo para reducir la producción de CO<sub>2</sub> y desarrollar nuevas tecnologías para reducirlo.

La producción de biomasa a partir de energía de renovable vía fotosíntesis aparece una alternativa atractiva para la mitigación de CO<sub>2</sub>, aunque carbono captura de biocombustibles será verdaderamente eficaz sólo cuando permite la reducción de reserva de fósil consumo mediante el reciclaje de carbono de la atmósfera (Packer 2009).

Azolla es un helecho flotante de agua dulce, que en la actualidad se encuentra en climas templados y tropicales alrededor de todo el mundo. Se trata de una de las plantas que crecen con mayor rapidez, y que forma una relación simbiótica con la cianobacteria *Anabaena azollae* (Peters, *et al.*, 1989). La cianobacteria es capaz de fijar nitrógeno para sí misma y para el helecho, mientras que *Azolla* le proporciona protección y una fuente segura de carbono (Wagner, 1997). Las cianobacterias pueden crecer en ambientes extremos, mayoría de las especies necesita macros nutrientes y muchos son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico. Son la única fuente de fijación de carbono en los áridos desiertos donde sobreviven largos períodos de desecación y ayuda estabilizar dunas de arena (Bhatnagar *et al.*, 2008). Su supervivencia en ambientes fluctuantes de estrés como desiertos y aguas residuales indica su rango de adaptabilidad. (Prasanna *et al.*, 2008). Algunas especies de algas pueden tolerar altas concentraciones de CO<sub>2</sub> ambientales y son eficientes en la captura de CO<sub>2</sub> de humos y gases que contienen 5-15% CO<sub>2</sub> (Hsueh *et al.* 2007).

*Azolla* puede llegar a utilizar 0,25 kilogramos de nitrógeno por m<sup>2</sup> cada año, lo cual implica una reducción anual de 1,5 kilogramos por m<sup>2</sup> de carbono (Belnap, 2002). Esta capacidad de utilización del nitrógeno atmosférico indica que el único límite para su crecimiento es el fósforo, pues los tres elementos esenciales para la síntesis de proteínas son el carbono, el nitrógeno, y el fósforo.

A pesar de su importancia reconocida a nivel mundial en el sustento de la fertilidad en el arroz a base de sistemas de cultivo, las cianobacterias no ha sido aprovechado por su potencial como sumideros de gases de efecto invernadero (Prasanna *et al.*, 2008). Algunas especies pueden tolerar ambientes con altas concentraciones  $\text{CO}_2$  y su eficiencia en la captura de  $\text{CO}_2$  5-15% (Hsueh *et al.*, 2007). Por lo tanto, se esperaba que el helecho *Azolla* puedan ser candidatos potentes para reciclar el  $\text{CO}_2$  atmosférico.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Estudiar la fijación de nitrógeno y dióxido de carbono atmosférico en el crecimiento de *Azolla* fue el trabajo de investigación que se en las instalaciones del Colegio de Postgraduados Campus Montecillos en el área de compostaje. Durante el desarrollo del proyecto se utilizara cuatro especies de *Azolla* (*A. Caroliniana*, *A. Filiculoides*, *A. Microphyla*, *A. Mexicana*) las especies de *azolla* provendrán de la colección de Germoplasma Microbiano de la sección de Microbiología del Colegio de Postgraduados (Azollatum Alfredo Echegaray Aleman). Así como de IRRI (International Rice Research Institute), en los Baños-Manila Filipinas, donde de evaluaron cada especie las siguientes variables:

- Determinación de biomasa fresca y seca.
- Tasa de crecimiento relativo (TCR).
- Tiempo de duplicación.
- Reducción de acetileno.

- Tasa de fijación de nitrógeno total por someterán a una digestión semi-microkjeldahl (Bremmer, 1965b).
- Reducción de dióxido de carbono.

En la primera etapa el experimento se instaló en frascos de vidrio transparentes herméticos con una capacidad de un litro y una área de 57 cm<sup>2</sup>, el cual contenía 80 ml de solución nutritiva Yoshida (solución nutritiva sin nitrógeno SN). Los frascos con las diferentes especies se inocularon con 1g de *Azolla*. Durante el cubrimiento de la superficie del frasco no se sellaba herméticamente para que hubiera intercambio gaseoso, la SN fue removida cada tres días para evitar la proliferación de algas que impiden el crecimiento de helecho, pero el nivel de la solución nutritiva se mantuvo constante con adiciones periódicas así como el pH se mantuvo en 5.5 y una temperatura constante de 29 °C.

**Cuadro 2. Solución nutritiva Yoshida (Yoshida *et al.*, 1971).**

| Macronutrientes*                 | mM   | g 1000 mL <sup>-1</sup> | Micronutrientes**   | μM    | g 100 mL <sup>-1</sup> |
|----------------------------------|------|-------------------------|---|-------|------------------------|
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>  | 1.43 |                         | FeCl <sub>3</sub>   | 35.6  | 7.70                   |
| CaCl <sub>2</sub>                | 1.00 | 88.60                   | MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O                             | 9.5   | 1.5                    |
| MgSO <sub>4</sub>                | 1.64 | 324.0                   | CuSO <sub>4</sub>   | 2.0   | 0.031                  |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | 1.32 | 71.40                   | (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> | 0.075 | 0.074                  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0.32 | 40.30                   | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                                  | 1.9   | 0.934                  |
| Ácido Cítrico                    |      | 11.90                   | ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                             |       | 0.035                  |

\*Se emplean 6.25 mL de c/u por cada 5 L.

\*\*Aforar todas las soluciones a 1 L con ácido sulfúrico.

Los tratamientos se distribuyeron con base en un diseño experimental de bloques completamente al azar y con tres repeticiones, teniendo un total de 12 unidades experimentales como se muestra en el cuadro 2.



**Cuadro 3: Distribución de los tratamientos.**

| TRATAMIENTOS |    |    |    |    |
|--------------|----|----|----|----|
| <b>B I</b>   | T1 | T3 | T2 | T4 |
| <b>B II</b>  | T2 | T1 | T4 | T3 |
| <b>B III</b> | T4 | T1 | T3 | T2 |

Una vez cubierto la superficie total (16 días), los frascos se sellaron herméticamente con un tapón de hule y a presión para evitar el escape del acetileno; en seguida con la ayuda de una jeringa se extrajo el 10% de la atmosfera libre de cada recipiente, para posteriormente inyectarse acetileno comercial en la misma cantidad extraída. Los frascos así preparados se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Al termino de la incubación se extrajo una muestra de 5 cm<sup>3</sup> de su atmosfera disponible en tubos al vacío; las muestras se corrieron en un cromatografo de gases de Varian Modelo 1440, con detector de ionización de flama de hidrogeno y una columna de acero inoxidable de 2 m de largo y 1/8 de pulgada de diámetro, empacado por Porapak N, para determinar la cantidad de etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) producido (Quintero y Ferrera-Cerrato, 1987).

Los frascos destapados habiendo concluido la determinación de acetileno se cosecho *Azolla* para determinar biomasa fresca y seca, tomando la biomasa y lavándola con agua de chorro y posteriormente con agua destilada, secada al aire por media hora y enseguida pasada en una bascula granataria para obtener el peso fresco, posteriormente las muestras se colocaron a secar en una estufa de aire forzado a 70 °C por 72 horas, para evaluar el peso seco y así poder hacer los cálculos para determinar la tasa media de crecimiento relativo (TMCR) y tiempo de duplicación (TD), donde P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> son el peso

inicial y final, respectivamente, T es el tiempo de la colecta,  $\log_{(e)}$  es igual al logaritmo natural del peso seco inicial y final y  $\ln_2$  es logaritmo al cuadrado, para calcular estas variables se necesitan utilizar las formulas.

Tasa Media de Crecimiento Relativo

$$TMCR = \frac{\log_{(e)}(P_2) - \log_{(e)}(P_1)}{T} = \text{gdía}^{-1}$$

Tiempo de Duplicación

$$TD = \frac{\ln_2}{TMCR} = \text{días}$$

Las especies de *Azolla* una vez secadas se molieron manualmente en un mortero de porcelana se prosiguió hacer la determinación de nitrógeno total para el cual las muestras se sometieron a una digestión semi-microkjeldahl, modificada para incluir nitratos. Esta técnica utiliza sulfato de cobre y selenio como catalizador y la destilación de amonio en el digerido se hace por arrastre de vapor (Bremner, 1965b).

En la segunda etapa se volverá a inocular 1 g en los frascos herméticos de vidrio transparente, con la misma solución nutritiva Yoshida, con las mismas condiciones de pH y temperatura pero estos frascos se mantendrán cerrados y se le hará cuatro mediciones de cuanto redujo la concentración de dióxido de carbono, en cada muestra se extraerá 5 cm<sup>2</sup> de su atmosfera y puesto en tubos de vidrio al vacío (Vacutainer). Para cuantificar el dióxido de carbono se utilizara el Espectrómetro de doble haz infrarrojo, primero se debe se purgan con un gas inerte o seco, libre de CO<sub>2</sub> del aire, para reducir la absorción de fondo causada por el vapor de agua y el CO<sub>2</sub>. Después se obtiene el de fondo, mediante transformadas de Fourier del interferograma del fondo (disolvente, agua del ambiente y dióxido de carbono). A continuación se obtiene el espectro de una muestra. Finalmente, se calcula la relación entre el espectro de la muestra, con un haz sencillo y el espectro de

fondo y se elabora un grafico de absorbancia o transmitancia contra la longitud de onda o numero de onda.

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar, con 12 tratamientos y tres repeticiones para cada uno y se sometió a un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ; SAS Institute Inc., 2002).

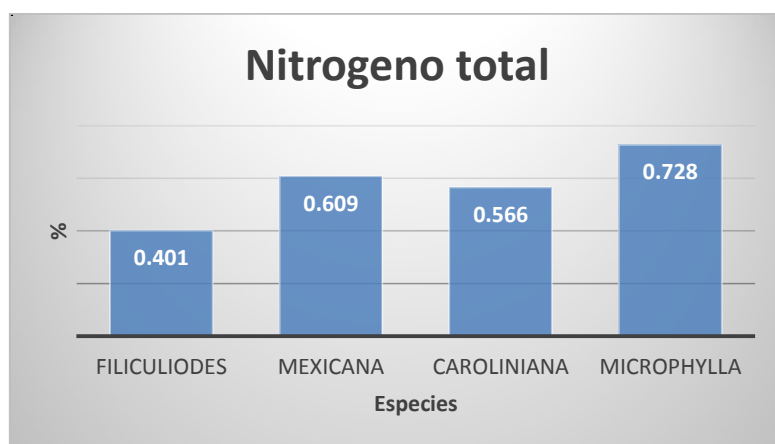
### 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Biomasa fresca de *Azolla* spp fue cosechado y pesó después de 14 días (cuadro 3). *A. microphylla* produjo más biomasa significativamente que todos los demás especies estudiadas. Demostró menor tiempo de duplicación de 5,4 días bajo condiciones de temperatura controlada. La biomasa producida y el tiempo de duplicación en *A. filiculoides*, *A. mexicana* y *A. caroliniana* no difirieron significativamente bajo las mismas condiciones, *Azolla mexicana* demostró la productividad de la biomasa pobre y largo tiempo de duplicación.

**Cuadro 4.** Biomasa, tiempo de duplicación, tasa media de crecimiento relativo y actividad de la nitrogenasa en especies de *Azolla* spp. Después de un crecimiento de 14 días.

| <i>Azolla</i> spp      | Biomasa en peso fresco (g) | Tiempo de duplicación (Días) | TMCR (g g dia <sup>-1</sup> ) | Nitrogenasa nmol (g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) |
|------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|---|
| <i>A. Filiculoides</i> | 4.65                       | 6.3                          | 0.11                          | 240   |
| <i>A. Microphylla</i>  | 5.86                       | 5.4                          | 0.13                          | 336   |
| <i>A. Mexicana</i>     | 4.29                       | 6.6                          | 0.10                          | 327   |
| <i>A. caroliniana</i>  | 4.89                       | 6.1                          | 0.11                          | 445   |

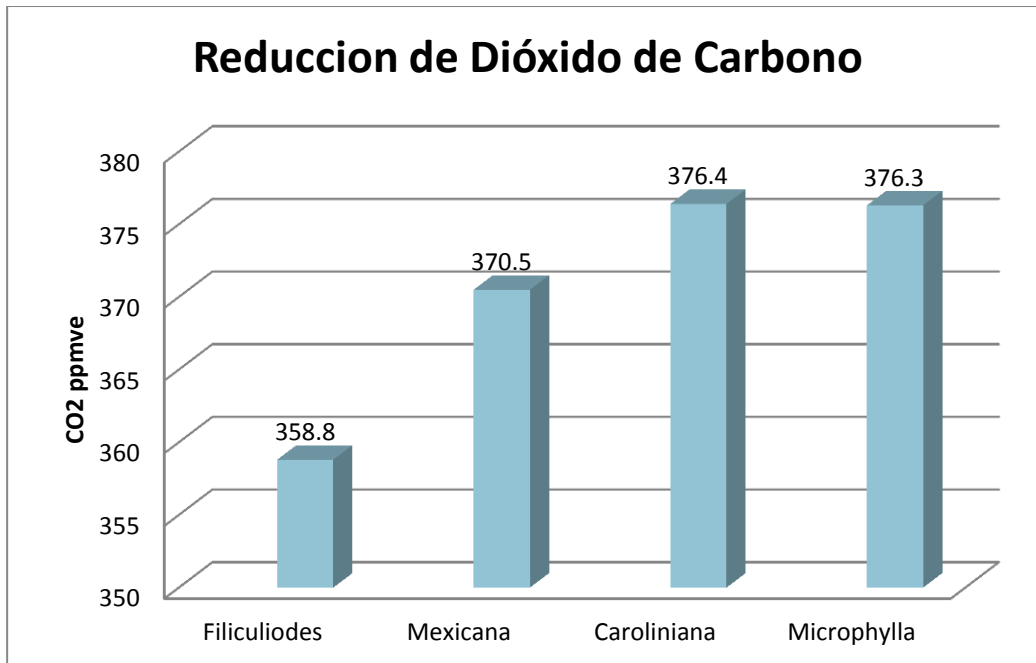
Todas las especies probadas mostraron actividad nitrogenasa buena. *A. caroliniana* demostró la mayor actividad (445nmol g biomasa fresca en 1 h seguido por *A. microphylla* (336 nmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) y *A. mexicana* (327 nmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Gopaldaswamy y Kannaiyan también informó el tiempo de duplicación de 5,8 días el IRRI para *A. microphylla*. Mientras que Quintero (1988), obtuvo la máxima tasa relativa de crecimiento medio de una combinación de 50 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>ha<sup>-1</sup> y 100% de radiación solar (0.120 gg<sup>-1</sup>día<sup>1</sup>).



**Figura 7.** Nitrógeno total de las cuatro especies de *Azolla*.

El tratamiento con mayor porcentaje de nitrógeno fue de 0.728 %, teniendo una relación directa con el peso de la biomasa fresca así como seca, el tiempo de duplicación y la tasa media de crecimiento relativo, Quintero (1988), menciona haber encontrado porcentajes de nitrógeno en la biomasa fresca a los 160 días de 4.02 % en *A. filiculoides*, 3.70% en *A. microphylla*, 4.36% en *A. caroliniana*.

El tratamiento con mayor porcentaje de reducción de dióxido de carbono fue *A. microphylla*, reduciendo un 8% del volumen de concentración de CO<sub>2</sub>, enseguida *A. caroliniana*, que redujo un 5% de la concentración de su atmósfera, continúa *A. mexicana* con 4% y *Filiculiodes* con un 3.5%.



La captura del Dióxido de carbono por *Anabaena azollae* asciende a 26.10 tCO<sub>2</sub>.ha<sup>-1</sup>.año<sup>-1</sup>, Se estima de acuerdo a la velocidad de fijación de 1.45 gCO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.d (Ruiz, 2011).

Otros autores mencionan que el contenido de carbono en *Azolla* spp dentro del helecho comprende alrededor del 44 % (Bhuvaneshwari & Ajay, 2013).

#### 4.4. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que las especies de *Azolla* tuvieron una diferencia significativa entre cada una de ellas.

La especie *A. microphylla* fue la más sobresaliente de las cuatro especies, en cuanto a la reproducción de biomasa, el menor tiempo de duplicación y fijación de nitrógeno así como fijación de dióxido de carbono. Esta especie es un potencial para la alimentación de ganado y la utilización de biofertilizante por su gran capacidad de fijación de nitrógeno y una alternativa sustentable para la captura carbono y posible mitigación al cambio climático

## LITERATURA CITADA

- Alexander, M. (1988). *“Introduction to soil microbiology”*, John Wiley & Sons, New York, 47, 239.
- Allan, D. and Graham. P. 2002. Symbiotic Nitrogen Fixation, other N<sub>2</sub>-fixing symbiosis, Soil Biology and Fertility Water, and Climate. University of Minnesota.
- Azolla Utilization - Proceedings of the Work shop on Azolla Use. International Rice Research Institute, 1987
- Barnola, J. M., D. Raynaud, Y. S. Korotkevich and Lorius, C. (1987). Vostok ice core provides 160,000-year record of atmospheric CO<sub>2</sub>. *Nature* 329:408-414.
- Becking, J.H., 1986. “Nitrogen fixation by the Azolla-Anabaena symbiosis. Proceeding of International Atomic Energy Agency. The role of isotopes in studies on nitrogen fixation and nitrogen cycling by blue-green algae and the Azolla-Anabaena azollae association”, IAEA, TECDOC 325. Vienna, Austria, 53-61.
- Belnap, J. 2002. Nitrogen fixation in biological soil crusts from southeast Biology and Fertility of Soils Utah, USA. 35 (2): pp. 128-135.
- Bhatnagar, A., M.B. Makandar, M.K. Garg, and M. Bhatnagar. 2008. Community structure and diversity of cyanobacteria and green algae in Thar desert of India. *J. Arid Environ.* 72: 73-83.
- Bremner, J.M. 1965 b. Total nitrogen. In: C.A. Black (ed.) *Methods of soils analysis. Part 2.* Amer. Soc. Of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA.
- Brinkhuis, H.; Schouten, S.; Collinson, M.E.; Sluijs, A.; Sinninghe Damsté, J.S.; Dickens, G.R.; Huber, M.; Cronin, T.M.; Onodera, J.; Takahashi, K.; Oros (2006). “Episodic fresh surface waters in the Eocene Arctic Ocean”. *Nature* 441: pp. 606-609.
- Bujak, J. y Mudge, D. (1994). “A high-resolution North Sea Eocene dinocyst zonation”. *Journal of the Geological Society* 151 (3): pp. 449-462.
- BHUVANESHWARI K. and AJAY K. 2013. Agronomic potential of the association Azolla – Anabaena, *Science Research Reporter* 3 (1): 78-82, April 2013, Varanasi India.

- Carrapico, F., 2006. "Is the Azolla-Anabena symbiosis a co-evolution case". *General Botany: Traditions and Perspectives*, A. Sitnykov, Materials of the International Conference, Published by the Kazan University, Russia, vol. 1, 193-195.
- Carrapico, F., 2001. "The Azolla-Anabaena-bacteria system as a natural micro-cosm". Proceeding of *SPIE*, vol. 4495, 261-265.
- Carrapico, F., A.L. Pereira, 2005. "How evolved is the Azolla-Anabaena symbiotic system". Book of Abstracts of the XVII International Botanical Congress, Vienna, 132 pp.
- COSEWIC, 2008. "Assessment and update status report on the Mexican Mosquito-fern *Azolla mexicana* in Canada". Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa, 35 pp. ([www.sararegistry.gc.ca/status/status\\_e.cfm](http://www.sararegistry.gc.ca/status/status_e.cfm)).
- DP. Singh, PK., (1995). "Singh Influence of rate and time of *A. caroliniana* inoculation and its growth and N<sub>2</sub> fixation and yield of rice (*Oryza sativa*)", *Ind. J. Agric. Sci.*, 65, 10.
- Espinoza Y. y Gutiérrez R. 2003. Variabilidad intraespecífica de *Azolla filiculoides*, colectadas en la zona centro-occidental de Venezuela. Instituto de Investigaciones en Recursos Agroecológicos.
- Espinoza, Y., R. Gutiérrez, 2004. "Caracterización morfo-anatómica y agronómica de accesiones de *Azolla* en Venezuela", en *Revista de la Facultad de Agronomía*, vol. 23, 135-150.
- Evrard, C., C. Van-Hove, 2004 "Taxonomical of the American *Azolla* species (Azollaceae)", in *A Critical Reviews in System Geography Plants*, vol. 74, 301-318.
- Ferrentinos, L., H.J. Smith, Valenzuela, 2004. "*Azolla*", en *Sustainable agriculture green manure crops*, Cooperative Extension Service, University of Hawaii, SA-GM-2, 3 p.
- Gardner, F. Pearce, R. y Mitchell, RL. 1985. *Fisiología de las plantas cultivadas*, Iowa State University Press. Ames, EE. UU. 66. p.
- Gopalaswamy C, Kannaiyan S. Biomass production, nitrogen fixation and biochemical characterization of *Azolla* hybrids. *Indian Journal of Microbiology* 1998;38:81-4.



- Gleason, J. D.; Thomas, D. J.; Moore, T. C.; Waddell, L. M.; Blum, J. D.; Haley, B. A. (2007a). "Reconstruction of the Eocene Arctic Ocean Using Ichthyolith Isotope Analyses". American Geophysical Union 88 (52).
- Gleason J.D.; Thomas D.T.; Moore T.C.; Blum J.D.; Owen R.M. (2007b). "Water column structure of the Eocene Arctic Ocean from Nd-Sr isotope proxies in fossil fish debris" Goldschmidt Conference Abstracts.
- Goudriaan, J., and H.H. van Laar. 1995. Modeling potential crop growth processes. 238 p. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Grilli, C.M., C. Forni, 1999. "The hard life of prokaryotes in the leaf cavities of *Azolla*", in J. Seckbach (ed.), Enigmatic microorganisms and life in extreme environments, 629-639.
- Hsueh, H.T., H. Chu, and S.T. Yu. 2007. A batch study on the bio-fixation of carbon dioxide in the absorbed solution from a chemical wet scrubber by hot spring and marine algae. Chemosphere 66: 878-886.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 2007. Climate Change Synthesis Report. United Nations, New York.
- International Rice Research Institute, 1992, Biofertilizer Germplasm Collections at IRRI, Los baños, Manila, Philippines. 74p.
- Jouzel, J., C. Lorius, J.R. Petit, C. Genthon, N.I. Barkov, V.M. Kotlyakov and V.M. Petrov. (1987). Vostok ice core: a continuous isotope temperature record over the last climatic cycle (160,000 years). Nature 329:403-407.
- Keeling, C.D., R.B. Bacastow, A.F. Carter, S.C. Piper, T.P. Whorf, M. Heinmann, W.G. Mook and H. Roeloffzen. (1989). A three dimensional model of atmospheric CO<sub>2</sub> transport based on observed winds: Analysis of observational data. In: D.H. Peterson (ed.), Aspects of Climate Variability in the Pacific and the Western Americas. Geophysical Monograph 55:165-235. Amer. Geophys. Union, Washington, DC.
- Keeling, C.D. and T.P. Whorf. (1994). Atmospheric CO<sub>2</sub> records from sites in the SIO air sampling network. pp. 16-26. In: T.A. Boden, D.P. Kaiser, R.J. Sepanski and F.W. Stoss (eds.), *Trends '93: A Compendium of Data on Global Climate Change*. ORNL-CDIAC-65. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, USA.

- Kiguli LN. The utilization of *Azolla filiculoides* Lam. as a biofertilizers under dry land conditions. MSc thesis, Rhodes University, 2000.
- Krishnakumar, S. Saravanan, A. Natarajan, SK. Veerbadaran, V. Mani, S. (2005). Microbial population and enzymatic activity as influenced by organic farming, Res. J. Agric & Biol Sci., 1, 85.
- Lichtenthaler, H.K., 1987, "Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes". Douce, R., L., Packer (eds.), *Methods of Enzymology*. Academic Press Inc., New York. vol. 148, 350-382.
- Lorius, C., J. Jouzel, D. Raynaud, J. Hansen and H. Le Treut. (1990). The ice-core record: Climate sensitivity and future greenhouse warming. *Nature* 347:139-145.
- Mayz-Figueroa, J., 2004. "Fijación biológica de nitrógeno", en Revista Científica UDO Agrícola, vol. 4, 1-20.
- Mohr H, Schopfer P. 1995. *Plant physiology*. 629pp. Berlin: Springer-Verlag. DM 98 (hardback).
- Mosquera, L.J., R.A. Calderón. 2002. "Evaluación de parámetros bioquímicos y morfogenéticos en la simbiosis *Azolla filiculoides*-*Anabaena azollae* como respuesta a la interacción de la calidad de luz y dos niveles de nitrógeno", en *Ecología aplicada*, vol.1, 89-94.
- Neftel, A., H. Friedli, E. Moor, H. Löttscher, H. Oeschger, U. Siegenthaler and B. Stauffer. (1994). Historical CO<sub>2</sub> record from the Siple Station ice core. pp. 11-14. In: T.A. Boden, D.P. Kaiser, R.J. Sepanski and F.W. Stoss (eds.), *Trends '93: A Compendium of Data on Global Climate Change*. ORNL-CDIAC-65. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge TN, USA.
- Packer, M. 2009. Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for Downloaded by [Colegio de Posgraduados] at 14:06 19 September 2012 greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. Energy Policy.

- Parsons, R. 2004. Plant Microbe Metabolism. Disponible en:  
<http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC19/CC19fijacion.html> (Última Octubre de 2012).
- Payawal, P. C. y M. A. De Macale. (1990). Population growth of selected *Azolla* hybrids grown on lahar-contaminated soil. *The Phil. Agri.* 74. 4:499-501
- Pearson P.N.; Palmer, M.R. (2000). "Atmospheric carbon dioxide concentrations over the past 60 million years". *Nature* 406 (6797): pp. 695-699.
- Perkins, S. K. Peters, G. A. Lumpkin, T. A. Calvert H. E. (1985), Scanning electron microscopy of purine architecture as a taxonomic tool in the genus *Azolla* Lamark. *Scann., Elec.Micro.*, 4, 1719.
- Peters, G A., B. C. Mayne, T. B. Ray y R. E. Toia Jr. "Azolla anabaena association: morphological and physiological studies", W. E. Newton and H. H. Orne-Johnson (eds.), Nitrogen fixation. Vol. 2, Iniv. Park Press, Baltimore, 1980a, pp. 293-309.
- Peters, G. A., R. E. Toia Jr., W. R. Evans, D. K. Christ, B. C. Mayne y R. E. Poole. "Characterization and comparisons of five N<sub>2</sub>-fixing *Azolla* anabaena association. I. Optimazation on growth conditions for biomass increase and N content in a controlled environmental", *Plant cell Env.* 3:261-269, 1980b.
- Peters, G. A. y Meeks, J. C. (1989). "The *Azolla*-*Anabaena* Symbiosis: Basic Biology". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: pp. 193-210. doi :10.1146.
- Prasanna, R., P. Jaiswal and B.D. Kaushik. 2008. Cyanobacteria as potential options for environmental sustainability- promises and challenges. *Indian J. Microbiol.* 48: 89-94.
- Quintero, L. R. 1988, Evaluacion de uso de biofertilizante *Azolla*, en Arroz (*Oriza sativa* L.) bajo condiciones de invernadero. Colegio de Postgraduados. México. p. 226.
- Quintero, L. R. y R. Ferrera-Cerrato. 1992. *Azollatum* "Alfredo Echegaray Alemán". En: J. L. Tovar y R. Quintero (eds). *La investigación edafológica en México. Memorias del XXV Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo.* p 242.

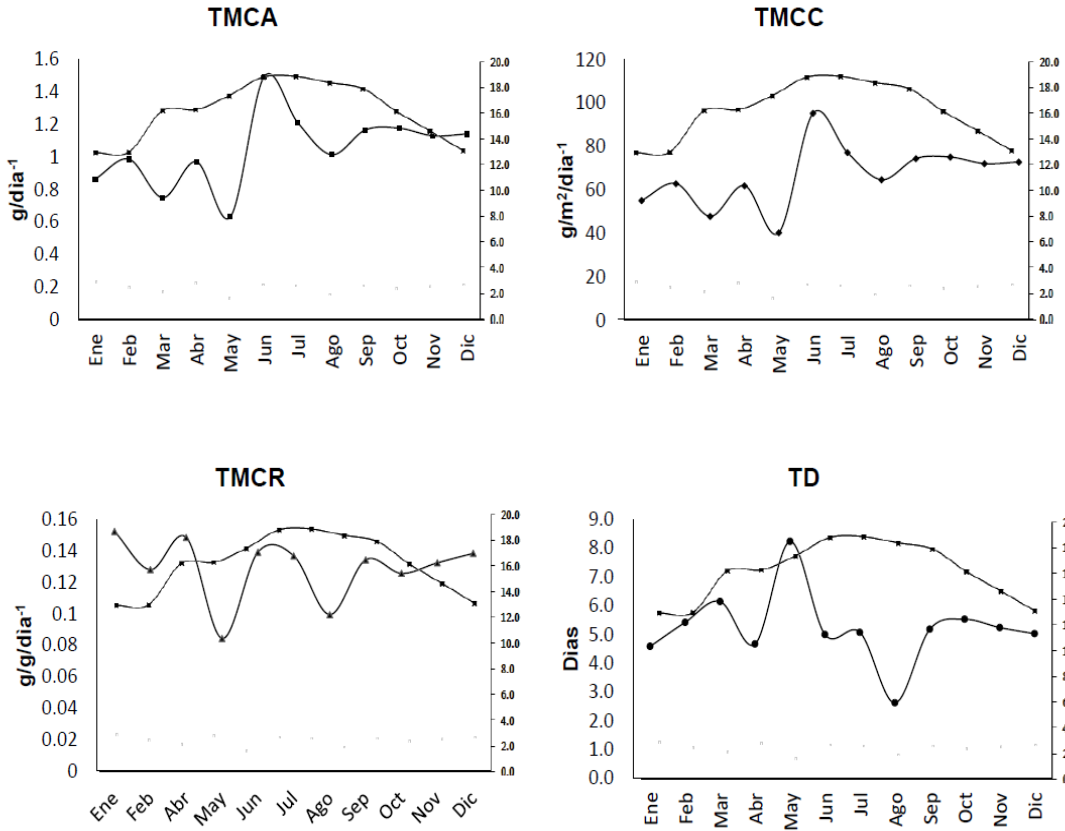
- Quintero, L.R., 1995. “*El sistema simbiótico fijador de nitrógeno Azolla-Anabaena*”, en Ferrera-Cerrato, R., J. Pérez (Ed.), *Agromicrobiología element útil en la agricultura sostenible*, Colegio de Postgraduados, México, 127-147.
- Quintero, L.R., R. Ferrera-Cerrato, 2000. “*Azolla helecho fijador de nitrógeno y su potencial en México*”, en J. J. Peña Cabriales (Ed.), *La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: El aporte de las técnicas isotópicas*, Irapuato, México.
- Raja, W. Preeti, R. Suchit A. John, P. Ramteke, W. (2012). “*Azolla-Anabaena Association and Its Significance In Supportable Agriculture*” Sam Higginbottom Institute of Agriculture, Technology and Sciences, Department of Biological Sciences, Allahabad, India. *J. Biol. & Chem.*, 2012, 40 (1), 1–6.
- RUIZ A., 2011. “Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de una agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente”, Abril 2011, Universidad Politécnica de Valencia.
- Sessa, E. B. Banks, J. A. Barker, M. S. Der, J. P. Duffy, A. M. Graham, S. W. Hasebe, M. Langdale, J. Li F. W. Marchant, D. B. Pryer, K. M. Rothfels, C. J. Roux, S. J. Salmi, M. L. Sigel, E. M. Soltis, D. E. Soltis, P. S. Stevenson, D. W. and Wolf, P. G. (2014). “*Between Two Fern Genomes*” Department of Biology, University of Florida, *GigaScience* 2014, 3:15
- Singh, A. L. PK. (1987). “Singh Influence of *Azolla* management on the growth, yield of rice and soil fertility, I. *Azolla* growth, Nitrogen fixation and growth on yield of rice”, *Plant Soil*, 102, 41.
- Singh, YV. Singh, BV. Pabbi, S. Singh, PK. (2007). “Impact of organic farming on yield and quality of basmati rice and soil properties”, <http://orgprints.org>.
- Smolders, A. y Roelofs, J.G.M. (1993). “Sulphate-mediated iron limitation and eutrophication in aquatic ecosystems”. *American Geophysical Union* 43 (3-4): pp. 247-253.
- Speelman, E. N.; van Kempen, M. M. L.; Barke, J.; Brinkhuis, H.; Reichart, G. J.; Smolders, A. J. P.; Roelofs, J. G. M.; Sangiorgi, F.; De Leeuw, J. W.; Lotter, A. F. y Sinninghe Damsté, J. S. (2009). “The Eocene Arctic *Azolla* bloom: environmental conditions, productivity and carbon drawdown”. *Geobiology* 7 (2): pp. 155-170.

- Stein, R.; Weller, P.; Meyer, H. (2006). "The Paleocene-Eocene "Greenhouse" Arctic Ocean paleoenvironment: Implications from organic-carbon and biomarker records (IODP-ACEX Expedition 302)". Geophysical Research Abstracts 8 (06718).
- Tovar D.T. 1993. Capacidad de Fijación de Nitrógeno de los Ficobiontes aislados de líquenes del género *Leptogium* S.Gray. Revista de Química (Lima – Perú). 7(2): 137 –154.
- Van Hove, C., H.F. Diara, H.F. Y P. Godard. 1982. *Azolla* in West Africa, Project. WARDA. Balgique.
- Venkataraman GS and Kaushik BD (1980). Save on N-fertilizers by the use of algae on rice fields. Ind. Fmg, Spl. Issue no. I, IARI, 75 years in the service of nation. 30: 27-30.
- Waddell, L.M.; Moore, T.C. (2006). "Salinity of the Early and Middle Eocene Arctic Ocean From Oxygen Isotope Analysis of Fish Bone Carbonate". American Geophysical Union 87 (52).
- Wagner, G. M. (1997). "*Azolla: a review of its biology and utilization*". The Botanical Review 63: pp. 1-26.

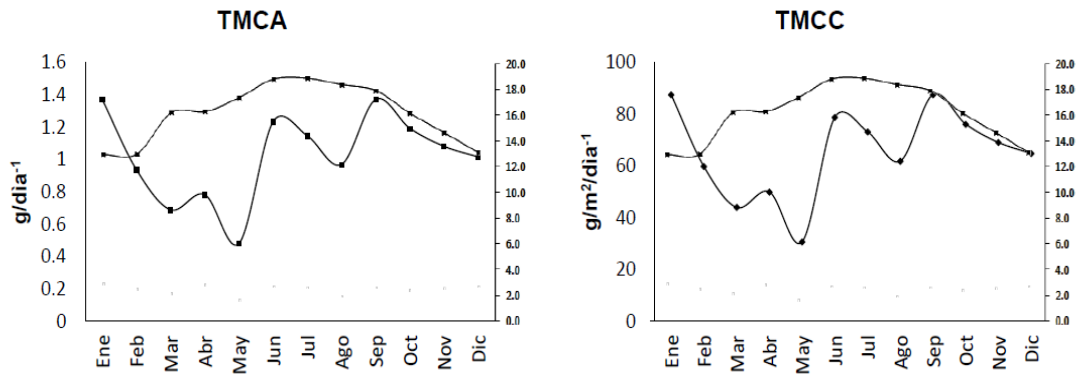
4.6. ANEXOS

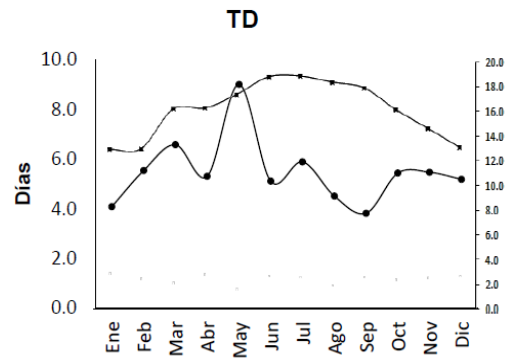
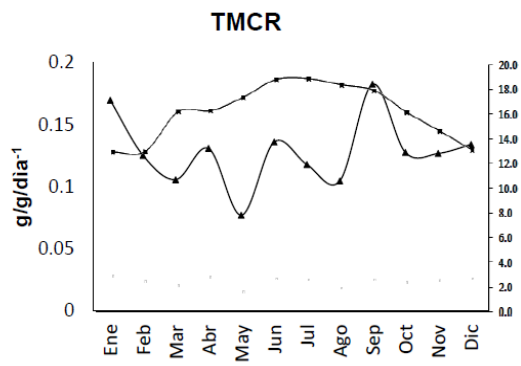
*A. filiculoides*

CHIGNAHUAPAN (CH)

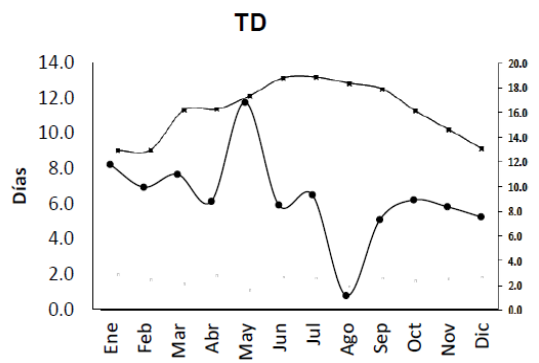
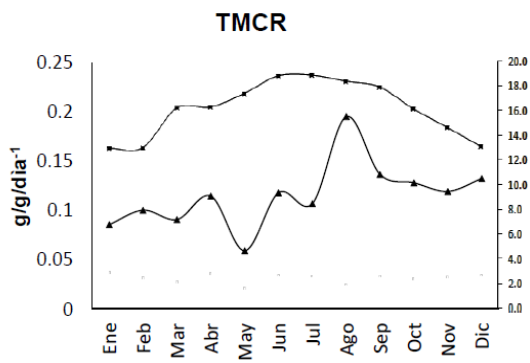
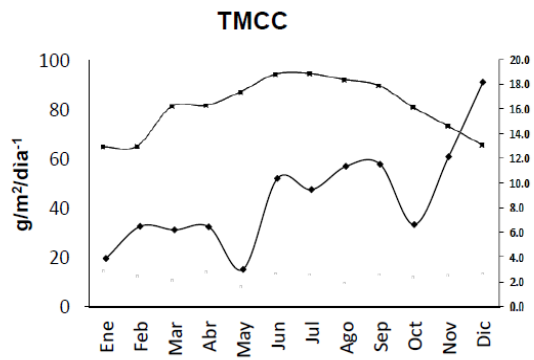
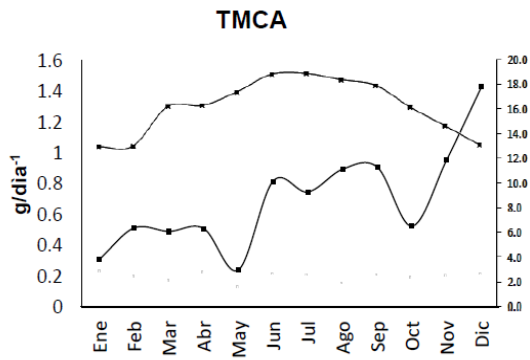


LAGUNA DE TECOCOMULCO (HI)

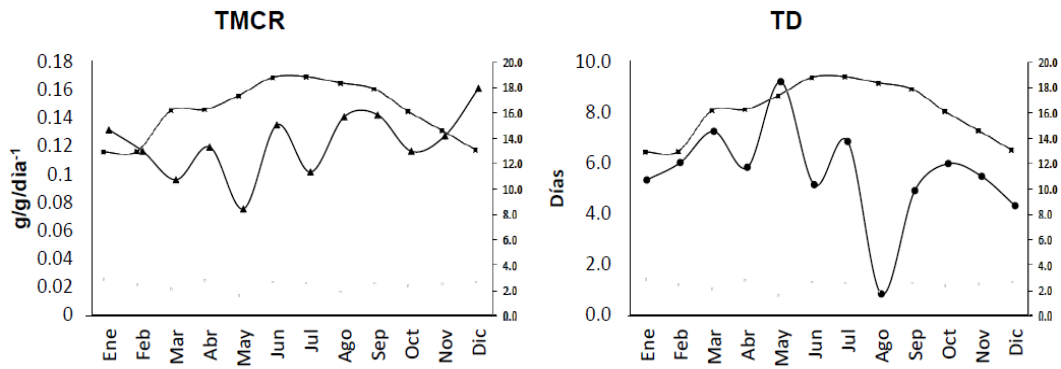
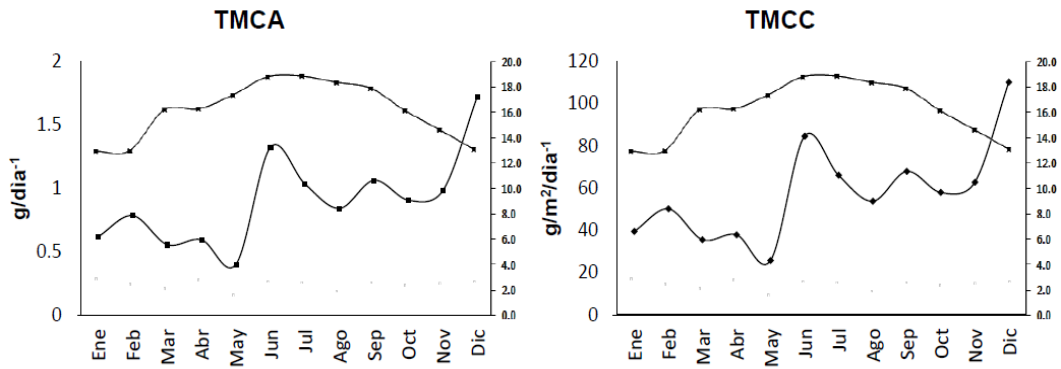




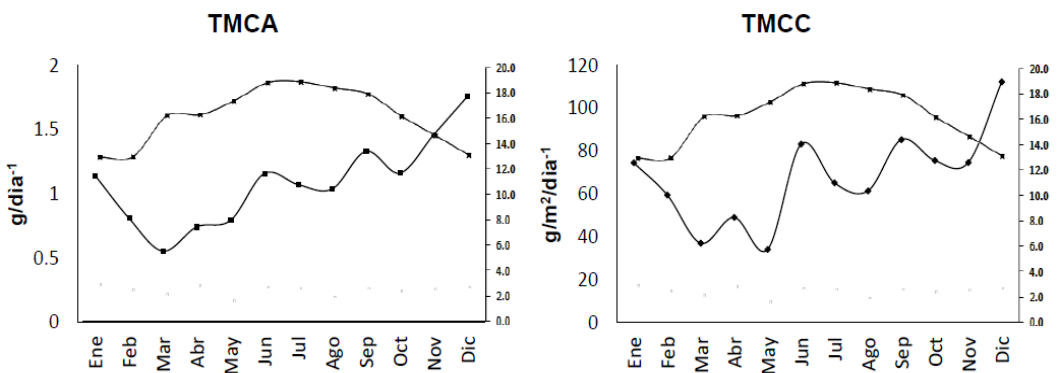
## ATLACOMULCO (MO)



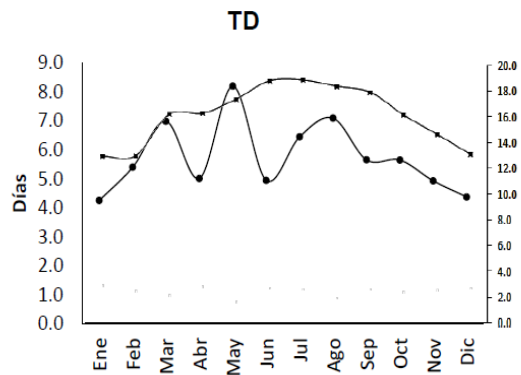
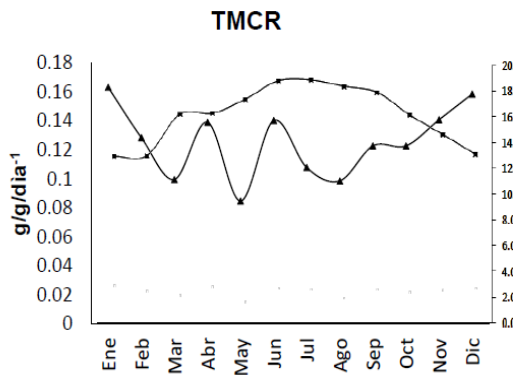
### ZIMATLÁN (OA)



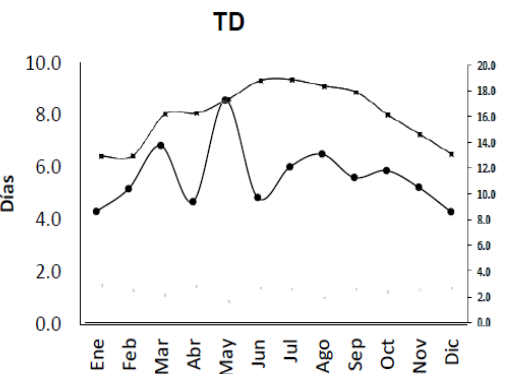
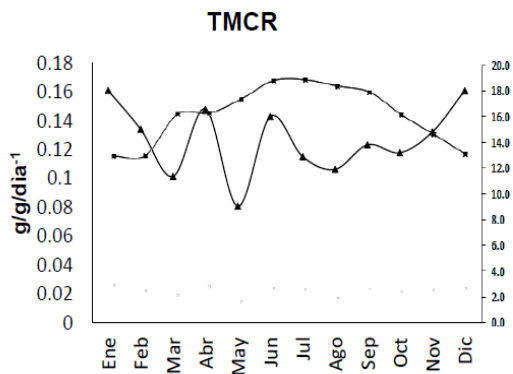
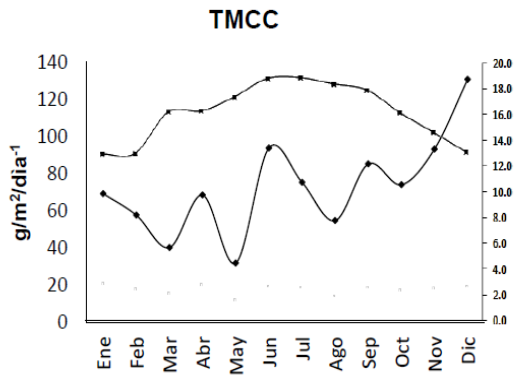
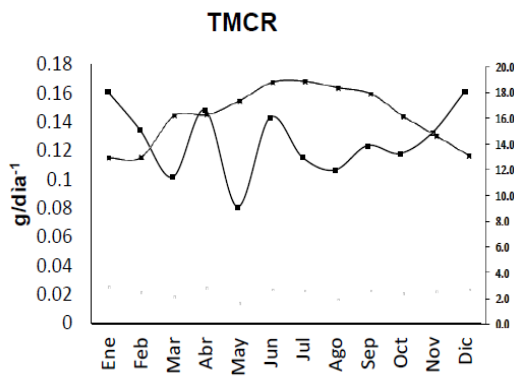
### SAN JOSE TOSHI (TO)



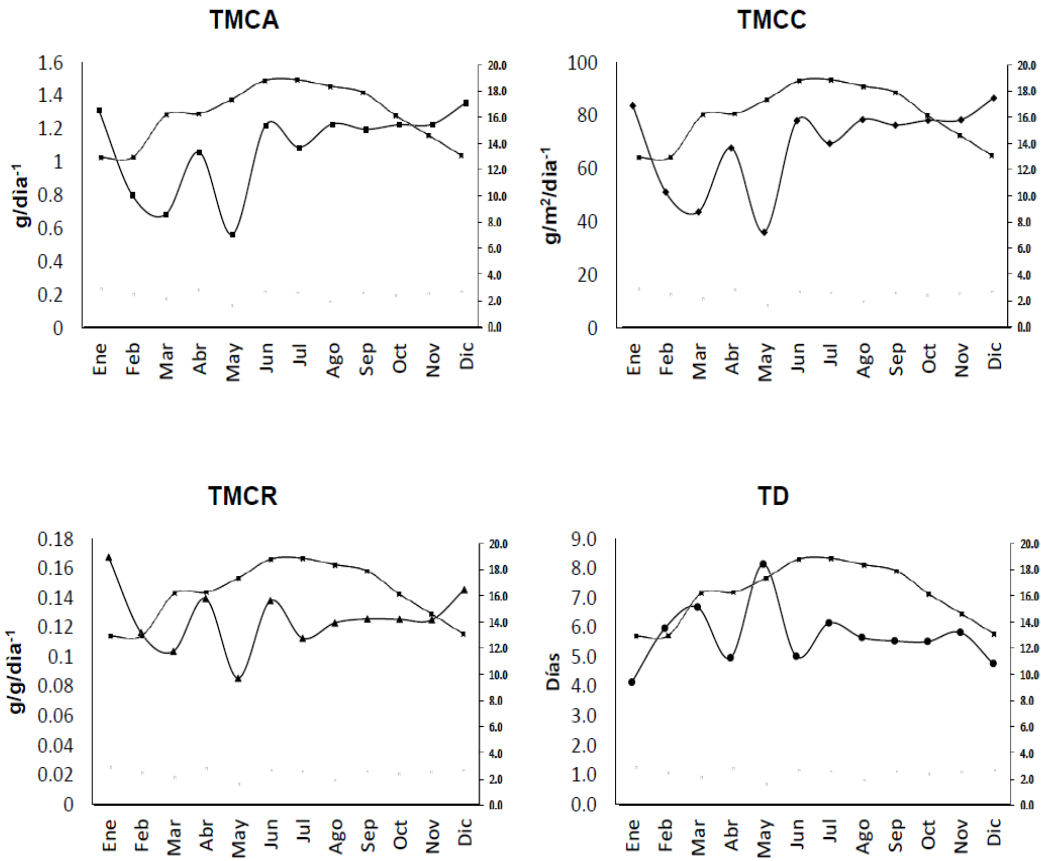




## TLAHUAC (TL)

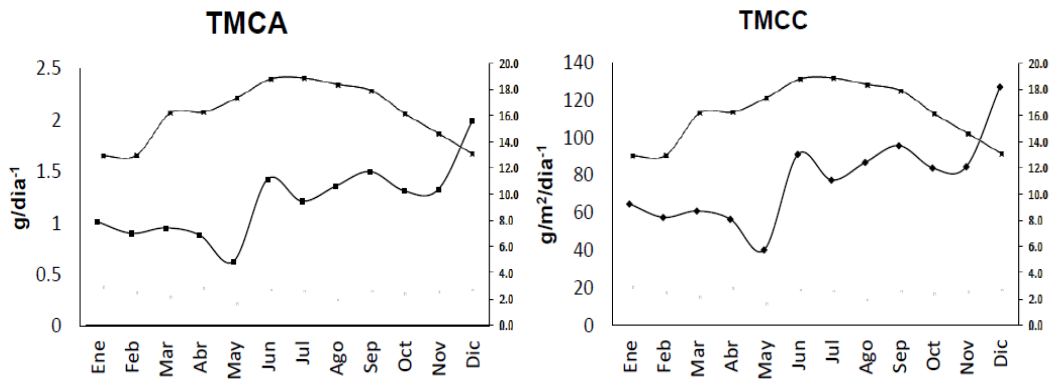


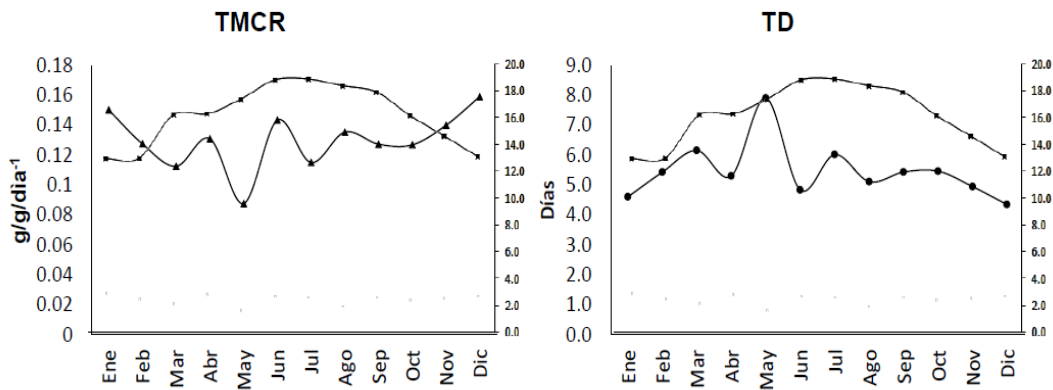
### XOCHIMILCO (XO)



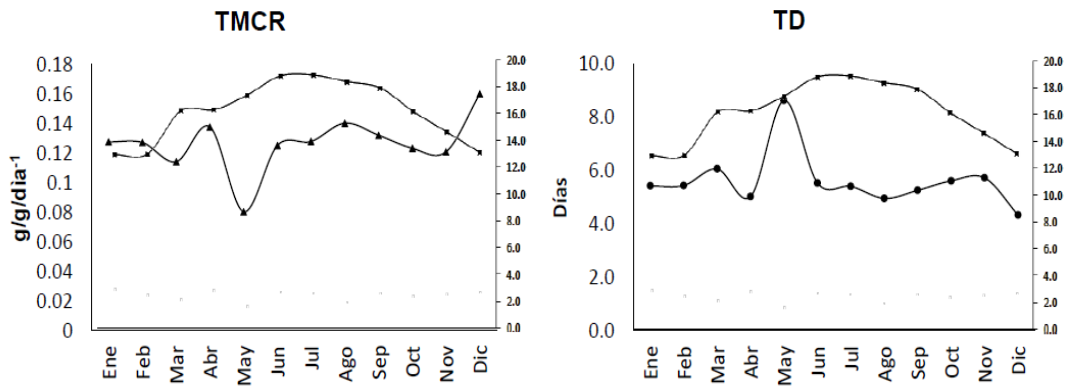
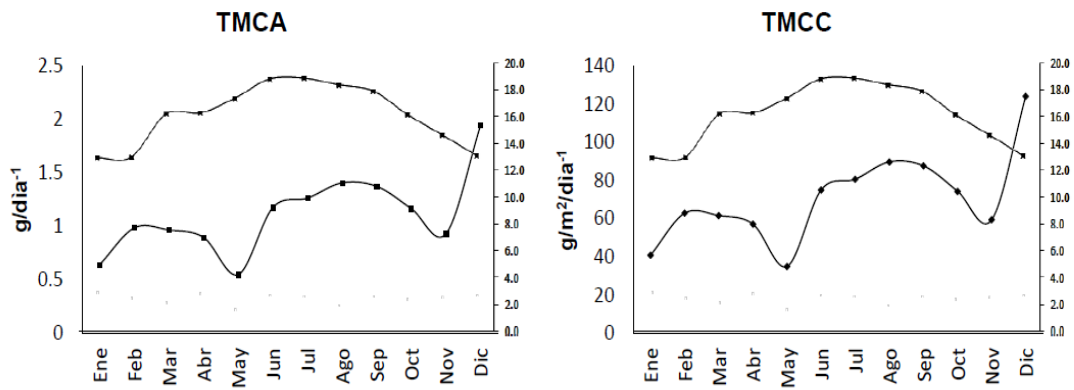
*A. caroliniana* / *A. mexicana*

### CERRÓ GORDO (JA)

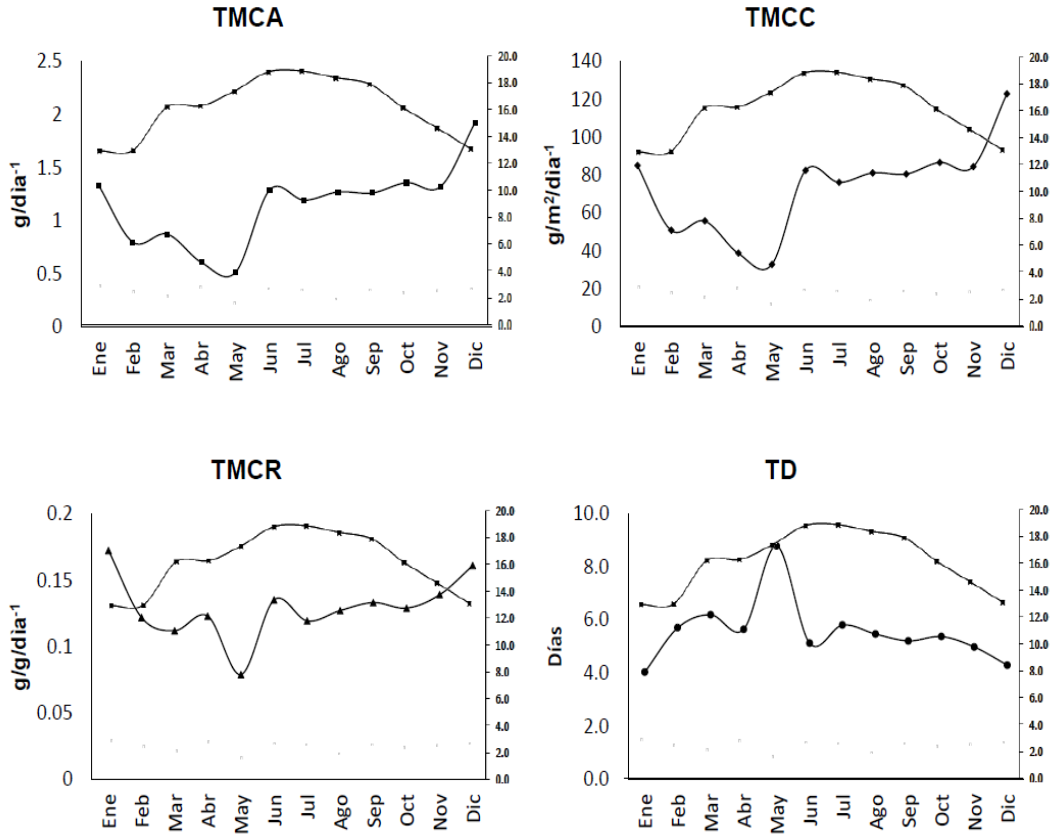




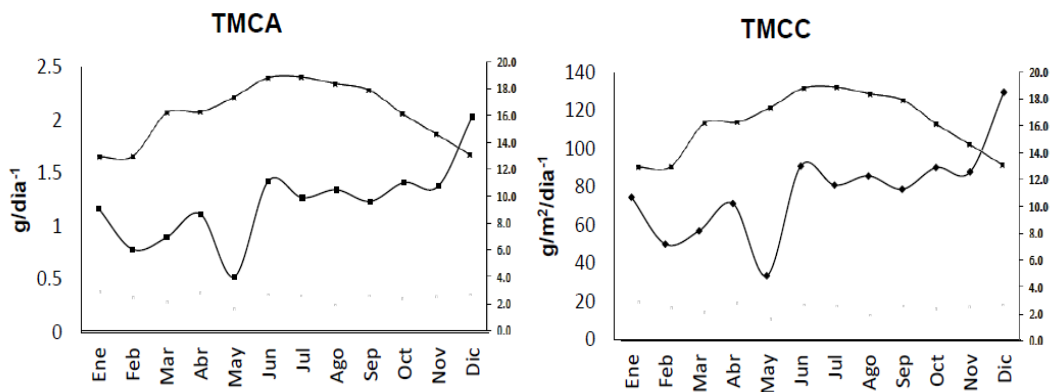
**GUAMÚCHIS (SI) CA/ME**

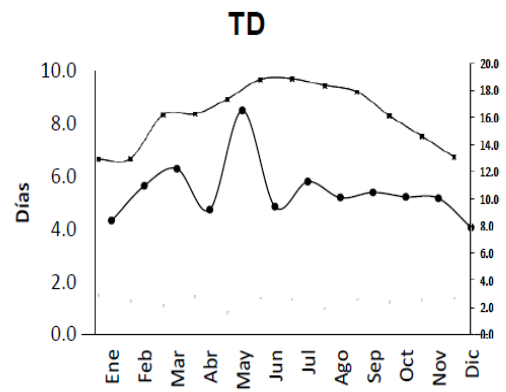
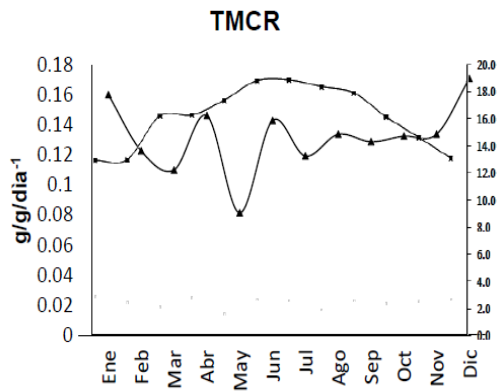


### MAZATIUPAN (TA) CA/ME

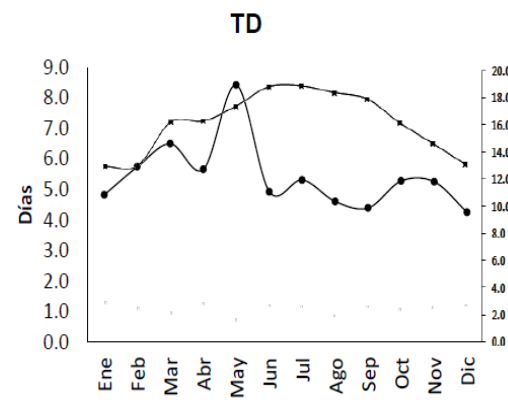
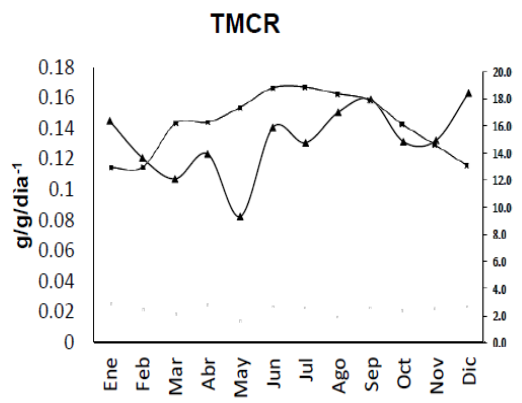
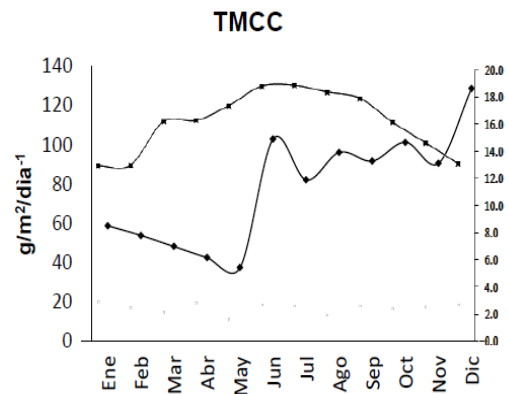
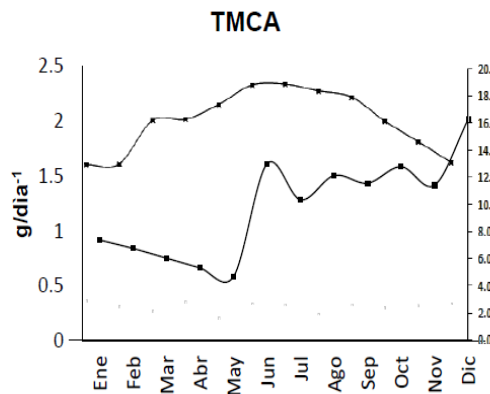


### TEXMELUCAN (TE) CA/ME

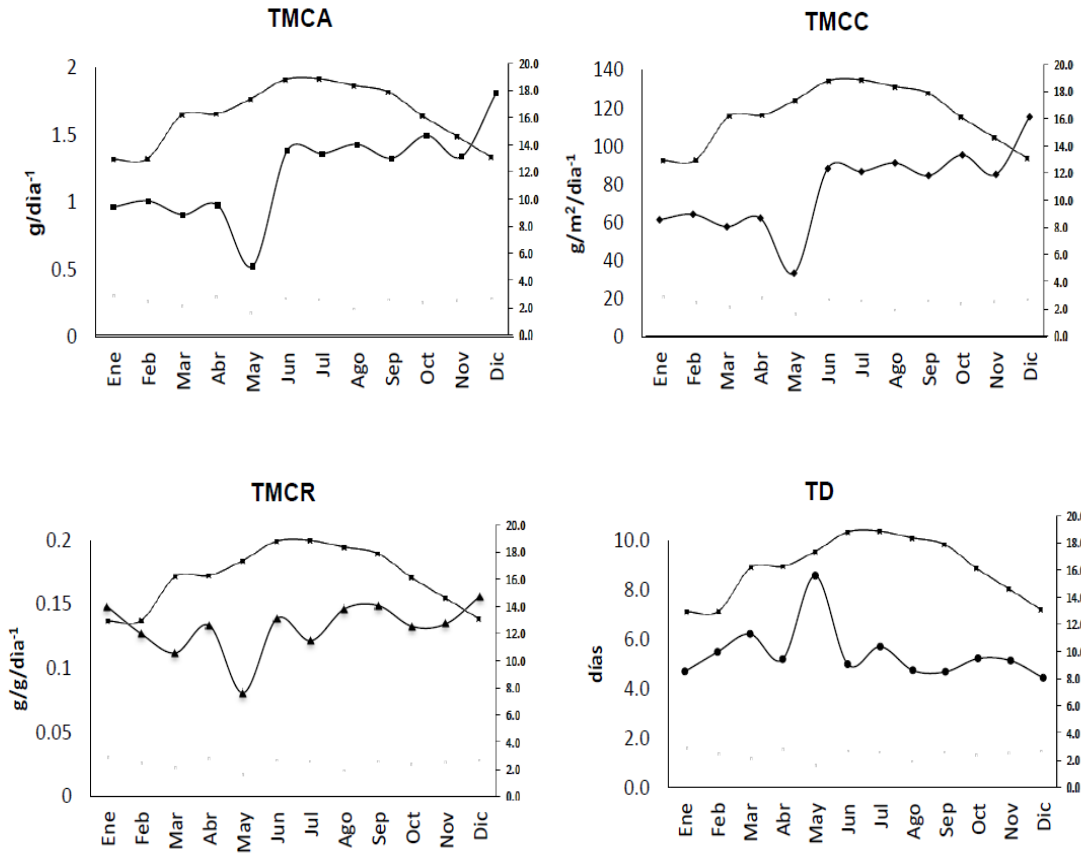




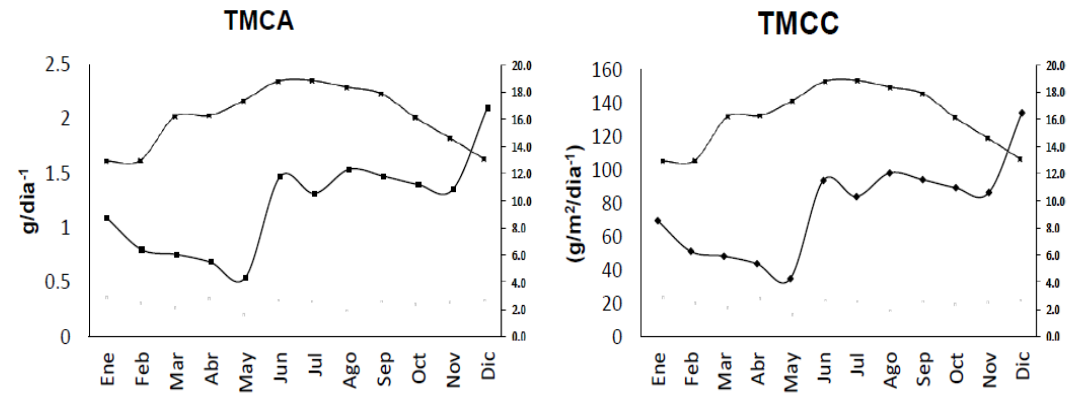
## ALTAMIRANO (VEJ) C/ME

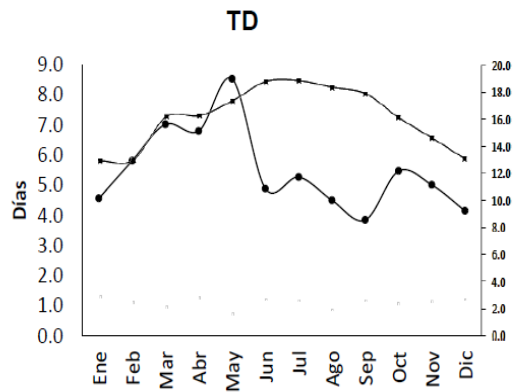
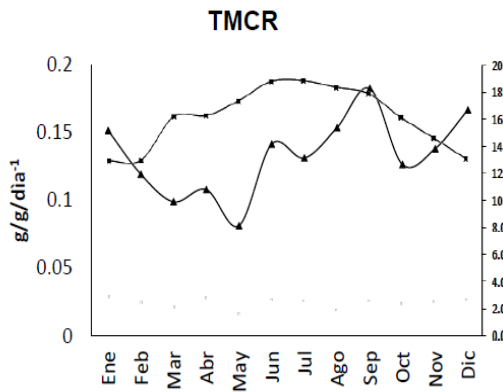


## ATLANGATEPEC (AT). SIN

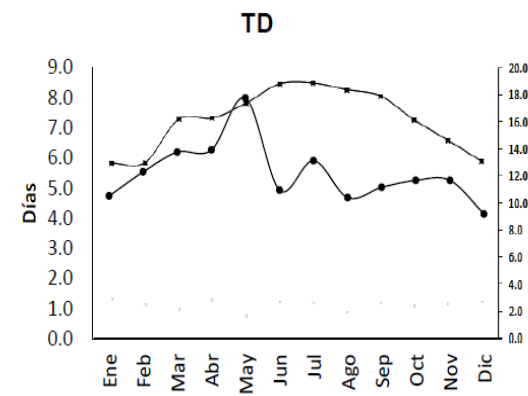
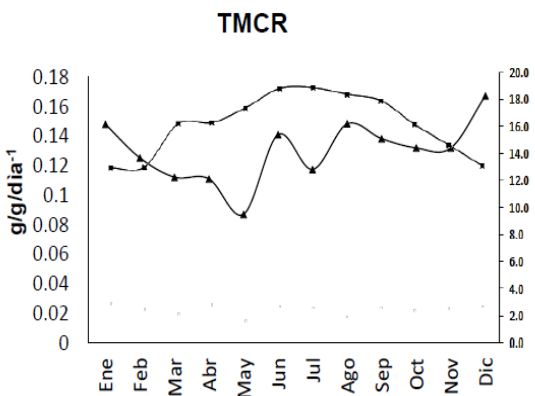
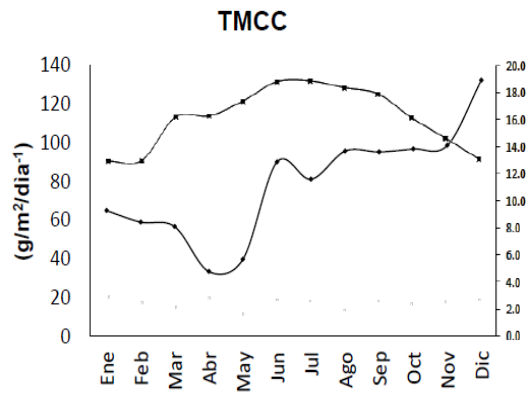
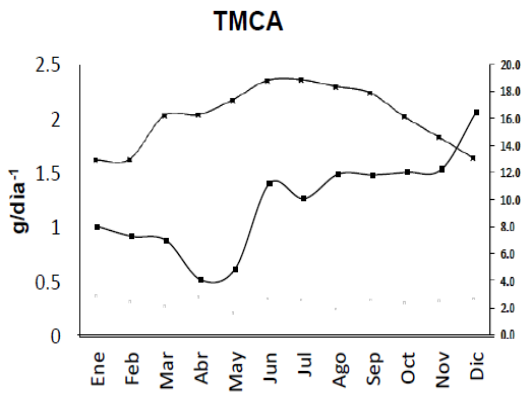


## CARDENAS (CE) SIN

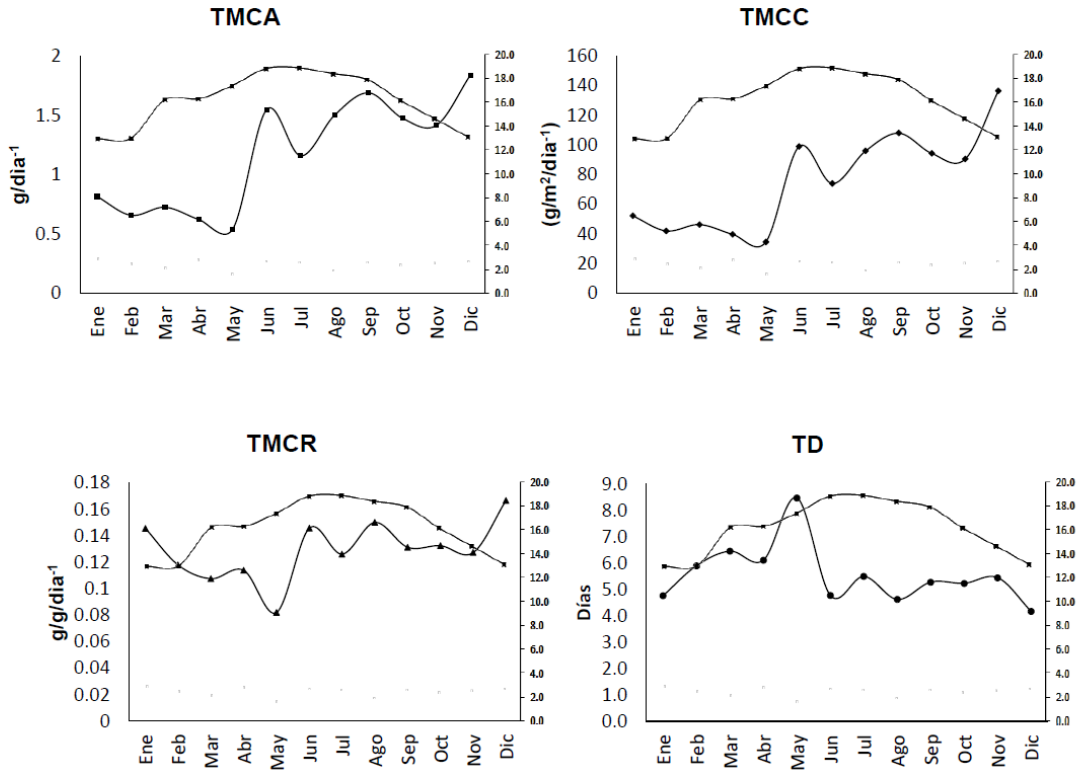




## JIUTEPEC (JI) SIN



### TICUMAN (TI) SIN



### VERACRUZ (VEII) SIN

