

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

NOMBRE DEL PROYECTO:

VIABILIDAD DE *Sinorhizobium mexicanum* EN  
BAGAZO DE CAÑA-PERLITA COMO SOPORTE SÓLIDO

QUE PRESENTA:

LUIS ALBERTO GUTIÉRREZ MOLINA

ASESORA:

M. EN C. LUCIA MARÍA CRISTINA VENTURA CANSECO

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS; MÉXICO

AGOSTO 2016

## Resumen

La cepa *Sinorhizobium mexicanum* ITTG R7, fue cultivada empleando caldo YEM bajo las condiciones de 120 rpm, 28°C y cosechada en fase logarítmica (12 h) y en fase estacionaria (25 h). La biomasa cosechada fue inoculada respectivamente en el soporte estéril a base de una mezcla de bagazo de caña- Perlita (B-P) en relación 4:1 (w/w). Las unidades experimentales fueron almacenadas a temperatura ambiente (28°C). Durante el almacenamiento fue determinada la viabilidad celular, pH, porcentaje de humedad y la capacidad de retención de agua (CRA) del biofertilizante a los 14, 30, 60, 90 y 120 días de almacenamiento a temperatura ambiente (28 °C) en bolsas autoclavables selladas. La capacidad infectiva de los biofertilizantes fue evaluada a los 30, 60, 90 y 120 días de almacenamiento, inoculando con estas semillas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en el cual se determinó el número de nódulos y parámetros morfométricos (longitud, No. hojas, diámetro del tallo y clorofila) de la planta. Los resultados indicaron que el soporte Bagazo de caña-Perlita logró mantener y desarrollar la concentración celular ( $1 \times 10^{10}$  ufc/g) durante los 120 días de almacenamiento en ambos estados fisiológicos de la cepa, siendo el estado fisiológico logarítmico donde se encontró 57 % más sobrevivencia, así mismo presentaron un incremento significativo ( $p \leq 0.05$ ) en el número de nódulos/planta después de los 60 días de almacenamiento. El almacenamiento de los biofertilizantes a 28 ° C no afectó significativamente los parámetros fisicoquímicos del soporte.

# Índice

<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Caracterización del área de trabajo</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Problemas a resolver</b> .....	<b>4</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>5</b>
<b>5. Justificación</b> .....	<b>6</b>
<b>6. Marco teórico</b> .....	<b>7</b>
6.1 Biofertilizantes .....	7
6.1.1 Beneficios de los biofertilizantes en la agricultura.....	8
6.1.2 Mecanismo de acción de los biofertilizantes .....	8
6.2 El nitrógeno y la simbiosis .....	9
6.2.1 Fijación Biológica del N <sub>2</sub> (FBN) .....	11
6.2.2 La FBN y la nitrogenasa .....	12
6.2.3 Simbiosis.....	13
6.2.4 Adhesión a la superficie radical y colonización .....	15
6.2.5 El diálogo molecular: reconocimiento Simbiótico .....	15
6.2.5.1 Flavonoides .....	16
6.2.5.2 Factores Nod.....	17
6.2.6 La invasión de la raíz.....	18
6.2.7 Organogénesis e invasión del nódulo .....	20
6.3 Manejo y calidad de los acarreadores microbianos .....	22
6.3.1 Los soportes.....	22
6.3.2 Características de los soportes.....	22
6.3.3 Soportes sólidos y sus diferentes presentaciones .....	23
6.3.3.1 Bagazo y perlita.....	27
6.3.4 Factores que afectan a un inoculante .....	28
6.3.5 Efectividad de las cepas de microorganismos .....	29
6.3.6 Calidad de los soportes .....	29
6.3.7 Material de empaque confiable.....	30
6.3.8 Calidad adhesiva de los biofertilizantes .....	31
6.3.9 Condiciones de almacenamiento del producto .....	31
6.3.10 Población efectiva mínima de microorganismos .....	31
6.3.11 Regulación y control de la calidad de biofertilizantes en México.....	32
6.4 Uso de microorganismos como biofertilizantes.....	35

6.4.1 Los rizobios .....	35
6.4.2 Descripción microscópica y macroscópica .....	36
6.4.3 Metabolismo .....	36
6.5 Inoculantes rizobianos.....	37
6.5.1 Calidad en inoculantes rizobianos .....	38
6.5.2 Ventajas de la fertilización con rizobios .....	38
6.6 El cultivo del frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) en México.....	39
6.6.1 Importancia.....	39
6.6.2 Taxonomía .....	39
6.6.3 Fijación biológica del nitrógeno en el frijol .....	40
<b>7. Materiales y métodos .....</b>	<b>41</b>
7.1 Localización del área de estudio .....	41
7.2 Cepa de estudio .....	41
7.3 Reactivación del inóculo.....	41
7.4 Desarrollo del inóculo .....	42
7.5 Cultivo de <i>S. mexicanum</i> .....	42
7.6 Preparación del soporte sólido .....	43
7.7 Caracterización del soporte .....	43
7.8 Elaboración de biofertilizantes .....	45
7.9 Maduración de los biofertilizantes.....	45
7.10 Evaluación de la sobrevivencia celular y caracterización fisicoquímica durante el almacenamiento de los biofertilizantes .....	45
7.11 Diseño experimental.....	46
7.12 Evaluación de la capacidad infectiva .....	46
7.13 Evaluación de los parámetros morfométricos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	47
<b>8. Resultados y Discusiones .....</b>	<b>48</b>
8.1 Estandarización del inóculo .....	48
8.2 Característica Físico química del Soporte .....	49
8.3 Evaluación de la sobrevivencia celular durante el almacenamiento del biofertilizante .....	50
8.4 Capacidad infectiva de los inoculantes.....	56
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>64</b>
<b>10. Fuentes de información .....</b>	<b>65</b>



## 1. Introducción

En suelos agrícolas, el elemento más limitante en el desarrollo de las leguminosas es el nitrógeno (Franco y Dobereiner, 1994), para solucionar este problema los productores del sector agropecuario utilizan indiscriminadamente fertilizantes de síntesis química con el objetivo de mejorar la calidad de sus cultivos o del forraje (Marín *et al.*, 2003), sin embargo ésta es costosa y poco amigable con el medio ambiente, provocando así contaminación de aguas subterráneas, eutroficación, erosión y en general, cambios en la estructura físico-química del suelo además de una drástica disminución en la biota del suelo (Justic *et al.*, 1995; Rabalais *et al.*, 1996, Tejada *et al.*, 2005).

Dentro del concepto de agricultura sostenible surgen tecnologías limpias como es la biofertilización con bacterias diazótroficas, es decir fijadoras de nitrógeno, esta práctica se considera como una alternativa segura, efectiva y sobre todo económica para asegurar y recuperar la productividad de los suelos; se ha demostrado que microorganismos fijadores de nitrógeno pueden desempeñar otras funciones o beneficios como la síntesis de fitohormonas o la solubilización de fósforo, que contribuyen así con el aumento del rendimiento en los cultivos (Mahecha, 2002; Sylvia *et al.*, 2005).

De acuerdo con Vessey (2003) los biofertilizantes son aquellos preparados que incluyen microorganismos que promuevan el crecimiento de las plantas incrementando el suministro o la disponibilidad de nutrientes primarios a la planta hospedera, ya sea favoreciendo el reabasteciendo de los nutrientes del suelo (por ejemplo, a través de la fijación biológica de nitrógeno), aumentando la disponibilidad de estos nutrientes (por ejemplo mediante la solubilización de fosfatos) o bien ampliando el acceso físico de las plantas a estos nutrientes (por ejemplo, incrementando el volumen o modificando la estructura de las raíces).

Las rizobacterias son los microorganismos más comúnmente aplicadas como inoculantes en la agricultura en la cual se incluyen a las bacterias diazotróficas y las bacterias solubilizadoras de fosfatos, Dentro de las rizobacterias tenemos a una cepa nativa de la región, *Sinorhizobium mexicanum* que fue aislada a partir de nódulos de *Acacia angustissima* (Rincón, 2001), identificada como nueva especie (Lloret *et al.*, 2006), esta

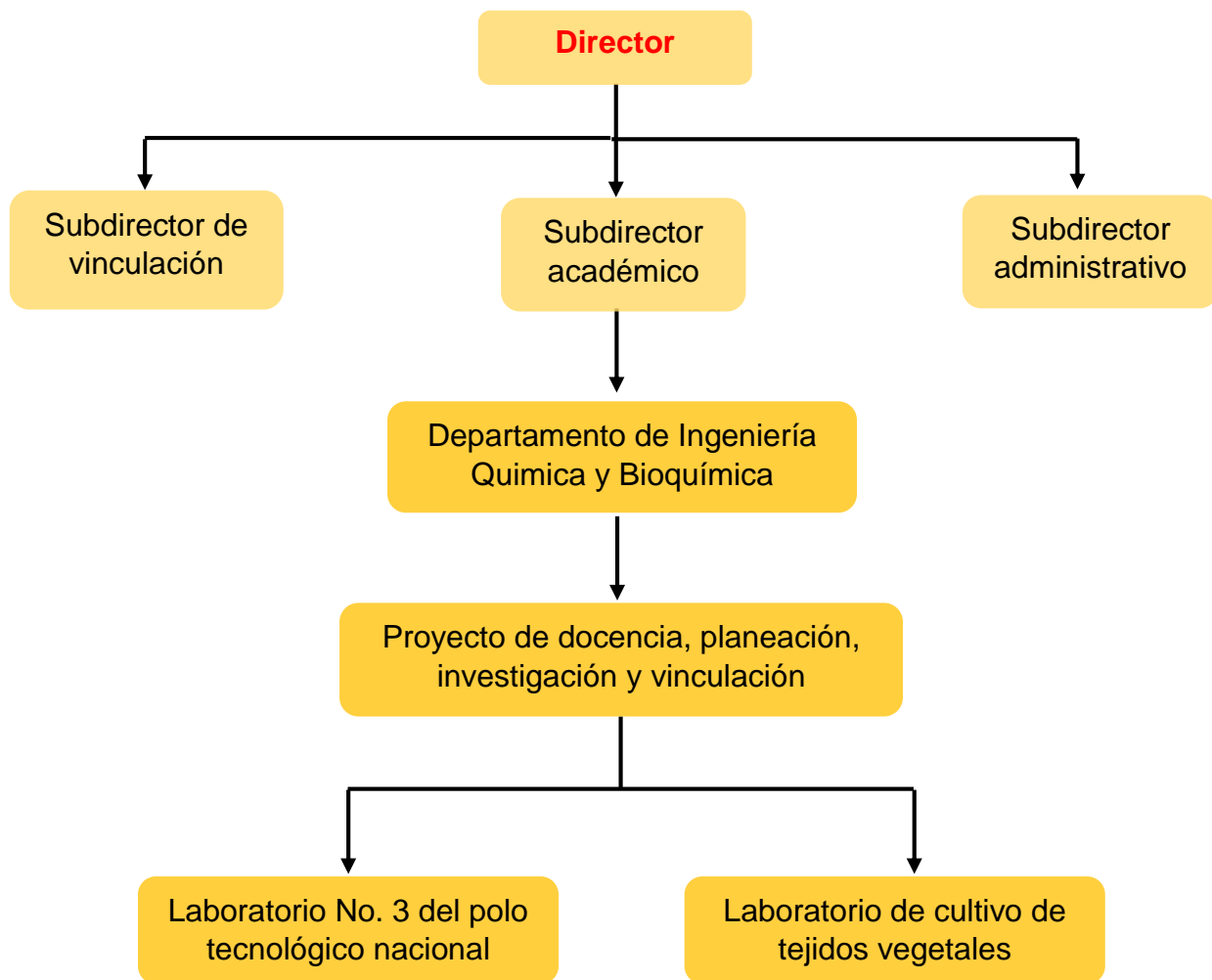
cepa tiene la capacidad de crecer en altas densidades celulares alrededor de  $4.73 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> empleando caldo YEM (Castillo, 2012).

Por otro parte su aplicación como biofertilizante ha demostrado tener efectos significativos en altura y peso de leguminosas (Rincón, 2001) y poseer significativa capacidad de fijación de N<sub>2</sub>, además de tener la capacidad para tolerar altas concentraciones de aluminio y bajo estas condiciones poder establecer simbiosis con *Acaciella angustissima* (Rincón et al., 2011).

Entre los soportes que pueden sostener altas concentraciones de *rizobios*, la turba es la más empleada debido a su alta capacidad de retención de agua que permite mantener la actividad biológica de las especies pero no está universalmente disponible. De forma alterna, diferentes materiales tales como sub-productos industriales, arcillas, perlita y residuos agroindustriales han sido evaluados como medios de cultivo para el crecimiento de los rizobios. En este orden de ideas el punto central de esta investigación fue evaluar la sobrevivencia y la capacidad simbiótica de *Sinorhizobium mexicanum* utilizando como soporte una mezcla de bagazo de caña – perlita.

## 2. Caracterización del área de trabajo

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio No. 3 de Microbiología; laboratorio que está ubicado en el Polo Tecnológico Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas en Biocombustible, por otra parte también se ocupó el laboratorio de cultivos de tejidos vegetales ubicado en el edificio Z. Todas las determinaciones y análisis se realizaron en las instalaciones anteriormente mencionadas, ubicadas en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.



**Figura 2.1.** Organigrama institucional del instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez



### 3. Problemas a resolver

- I. Las demandas nutrimentales del maíz, frijol y soya en ( $N_2$ ) son altas. En la actualidad el  $N_2$  se importa por fertilizantes químicos y se encarecen los costos del cultivo y cuando se aplica puede generar contaminación de mantos freáticos por nitratos. Con la formulación de un inoculante rizobiano a base de una cepa endémica de la región (*Sinorhizobium mexicanum*) se puede reducir en dos terceras partes la dosis de  $N_2$ ; además de favorecer el balance microbiológico de la rizósfera, se reducen los costos de producción, se incrementa el rendimiento y se reduce la contaminación.
  
- II. Los inoculantes rizobianos están limitados debido a que los sustratos convencionalmente empleados como soportes son recursos no renovables e inaccesibles; Ante esta situación se propone la utilización de Bagazo de caña- Perlita como soporte debido a su alta capacidad de retención de agua y alto contenido de materia orgánica.
  
- III. El bagazo de caña y perlita son residuos orgánicos económicos y accesibles de obtener. Con el empleo de bagazo de caña- Perlita como soporte para *Sinorhizobium mexicanum*, propone disminuir los costos del proceso de producción del biofertilizante y de esta manera el producto se hace más rentable y fácil de obtener para el productor, con esto se pretende disminuir el consumo de fertilizantes químicos.

## 4. Objetivos

### Objetivo general

Evaluar la sobrevivencia y capacidad simbiótica de *Sinorhizobium mexicanum* ITTG R7 durante su almacenamiento, empleando bagazo de caña- perlita como soporte sólido

### Objetivos específicos

1.- Determinar la viabilidad de *S. mexicanum* ITTG R7 inoculada en fase logarítmica y estacionaria, en el soporte de bagazo de caña – perlita, almacenado a temperatura ambiente

2.- Determinar los parámetros fisicoquímicos, pH, CRA y humedad durante el almacenamiento a temperatura ambiente de los biofertilizantes

3.- Evaluar el efecto de los biofertilizantes a diferentes tiempos de almacenamiento sobre la nodulación, contenido de nitrógeno y parámetros morfométricos de plántulas de *Phaseolus vulgaris* L.

## 5. Justificación

En los últimos años debido al impacto negativo de los fertilizantes en la agricultura, en el ambiente y a los altos costos de producción se ha venido planteando el concepto de agricultura sostenible, definida como la manera de cultivar el suelo conservando al máximo la calidad medioambiental, permitiendo ingresos adecuados a los agricultores y, generando suficientes alimentos a los consumidores, con el fin último de preservar y regenerar los recursos naturales y producir alimentos sanos y seguros (Benbrook, 1999).

Para poder implementar este tipo de agricultura sostenible es necesario hallar novedosas soluciones que faciliten el crecimiento de las plantas, tratando de aliviar la carga impuesta a nuestro medio ambiente. Una de las opciones que se plantean dentro de los lineamientos de la agricultura sostenible, es el uso de biofertilizantes como una manera de disminuir la aplicación de fertilizantes de síntesis química (Bonilla *et al.* 2000). Los biofertilizantes mantienen al ambiente del suelo rico en todo tipo de micro y macro nutrientes a través de la fijación de nitrógeno, fosfato y potasio solubilización o mineralización, la liberación de sustancias que regulan el crecimiento de las plantas (Sinha *et al.*, 2014). Dentro de este contexto en los últimos años se han venido produciendo biofertilizantes a base de microorganismos simbióticos principalmente de la familia de las Rhizobiaceas. En referencia a lo anterior se ha propuesto la formulación de un biofertilizante a partir de *S. mexicanum* ITTG R7, este microorganismo fue aislado de la familia Rhizobiaceas, se caracteriza por lograr un 20% sobrevivencia en soporte bagazo de caña-perlita durante un periodo de 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente, valor mínimo que sugiere Lupwayi, *et al.*, (2000), para ser un inoculante de calidad, Por lo que el presente trabajo propone evaluar la capacidad de sobrevivencia y mantenimiento de la concentración celular sobre las recomendaciones de calidad, asimismo evitar la pérdida de humedad empleando a la cepa nativa del estado de Chiapas ITTG R7, en el soporte bagazo de caña-perlita el cual es un soporte accesible que permitirá una viabilidad aceptable en un tiempo mayor de 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, evaluando también el número de nódulos/planta para determinar su capacidad infectiva sobre plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

## **6. Marco teórico**

### **6.1 Biofertilizantes**

Los biofertilizantes, también conocidos como bioinoculantes, inoculantes microbianos o inoculantes del suelo, son productos agrobiotecnológicos que contienen microorganismos vivos o latentes (bacterias u hongos, solos o combinados) y que son agregados a los cultivos agrícolas para estimular su crecimiento y productividad.

Las raíces del término biofertilizante provienen de las palabras biológicas y fertilizantes, por lo que este vocablo hace referencia a un fertilizante biológico. En este contexto, un biofertilizante contiene microorganismos vivos que mejoran el estatus nutricional de las plantas, mientras que productos orgánicos como estiércol, residuos de cosechas, composta y vermicomposta que también son agregados al suelo para favorecer su nutrición no son considerados como biofertilizantes sino como fertilizantes orgánicos. Debido a la novedad de esta tecnología en nuestro país y al gran impulso que desde el año 2000 el gobierno mexicano ha otorgado para la utilización y difusión de los biofertilizantes muchas compañías intentan actualmente que sus productos sean catalogados como tales cuando no reúnen el requisito de poseer microorganismos vivos (latentes). Aunque debido a su naturaleza, estos productos orgánicos poseen microorganismos vivos, éstos no son cultivados de manera controlada y axénica para la formulación del producto y por lo tanto la composición exacta de los microorganismos presentes es desconocida y variable. Igualmente, estos productos pueden contener, en el peor de los casos, microorganismos patogénicos no solamente para las plantas sino para los animales y los propios humanos.

Aunque el término biofertilizante se empleó inicialmente para facilitar el registro de cepas con fines comerciales, algunos autores mencionan que el término debería ser eliminado ya que sólo algunos microorganismos cumplen estrictamente con la función de incorporar nuevos nutrientes a los ecosistemas, básicamente los microorganismos fijadores de nitrógeno (Bashan, 1998).

### **6.1.1 Beneficios de los biofertilizantes en la agricultura**

Los beneficios del uso de los biofertilizantes en la agricultura incluyen:

- Aumento de la capacidad de las plantas para absorber agua y nutrientes del suelo.
- Reducción de los requerimientos de irrigación y fertilización en los cultivos.
- Aumento del crecimiento y establecimiento de las plántulas.
- Aumento del vigor de las plántulas y plantas adultas.
- Biocontrol de fitopatógenos.
- Reducción de los tiempos de cosecha (en algunos casos entre 7 y 9 días; Dibut y Martínez, 2004) y extensión de los tiempos de producción.
- Incremento del rendimiento de los cultivos, tanto en campo como en invernadero.
- Reducción de la contaminación ambiental a través de la disminución del uso de pesticidas y fertilizantes químicos.

### **6.1.2 Mecanismo de acción de los biofertilizantes**

Los mecanismos que explican las respuestas a la inoculación con microorganismos en el desarrollo y la productividad de los cultivos pueden ser directos o indirectos.

#### Mecanismos directos

Mediante estos mecanismos los biofertilizantes mejoran el crecimiento de las plantas favoreciendo su nutrición, ya sea aumentando la disponibilidad o absorción de nutrientes y agua, liberando hormonas estimuladoras del crecimiento vegetal o bien alterando la estructura y la superficie de absorción de las raíces.

Dentro los mecanismos directos podemos citar los siguientes procesos:

*Fijación biológica de nitrógeno (FBN), síntesis de hormonas, regulación de los niveles de etileno, producción de sideróforos, solubilización de fosfatos, solubilización de azufre y la producción de compuestos volátiles.*

### Mecanismos indirectos

La promoción indirecta del crecimiento de plantas ocurre cuando los biofertilizantes previenen, disminuyen o eliminan uno o más organismos fitopatógenos a través de su control biológico (Hernández y Charlloux, 2001) a través de los siguientes mecanismos:

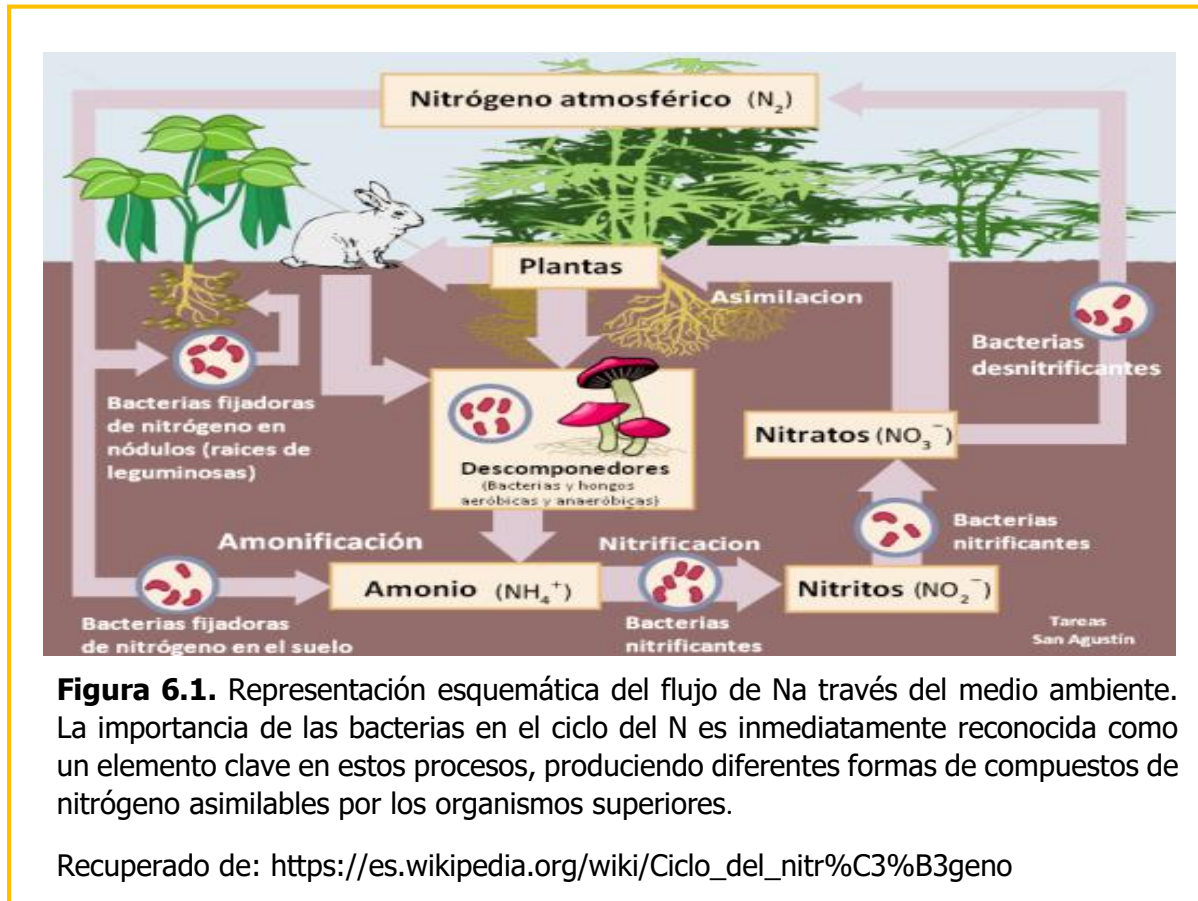
Competencia por espacio y nutrientes, producción de sideróforos, síntesis de antibióticos e inducción de resistencia a patógenos.

## **6.2 El nitrógeno y la simbiosis**

Uno de los componentes clave en el desarrollo y crecimiento de todos los organismos es el N. Este elemento forma parte de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas, esenciales para el desarrollo de la vida. El mayor reservorio de N se encuentra en la atmósfera en forma de  $N_2$ , constituyendo un 79 % de su composición gaseosa. Sin embargo, el  $N_2$  es inerte desde el punto de vista químico y la mayoría de los organismos multicelulares son incapaces de acceder a él de forma directa para utilizarlo en sus procesos metabólicos.

El ciclo del N hace referencia a dos grandes procesos que permiten el reciclaje constante del N en la Tierra (Fig. 6.1). Estos procesos son: la fijación de  $N_2$  atmosférico, que permite incorporar este elemento a la biósfera para su utilización por los organismos vivos, y la desnitrificación, que permite devolver el N a la atmósfera. A su vez, la fijación de  $N_2$  comprende la conversión del mismo a formas reducidas del N, principalmente a  $NH_3$ , su oxidación, principalmente a nitratos ( $NO_3^-$ ), y la asimilación de ambos compuestos por los organismos vivos. Las formas oxidadas del N,  $NO_3^-$  o nitritos ( $NO_2^-$ ), son las más utilizadas por los vegetales para incorporar este elemento. La primera etapa del ciclo y la más

interesante desde el punto de vista de la incorporación de N a los organismos para el desarrollo de la vida, es la de la fijación de  $N_2$ .



**Figura 6.1.** Representación esquemática del flujo de Na través del medio ambiente. La importancia de las bacterias en el ciclo del N es inmediatamente reconocida como un elemento clave en estos procesos, produciendo diferentes formas de compuestos de nitrógeno asimilables por los organismos superiores.

Recuperado de: [https://es.wikipedia.org/wiki/Ciclo\\_del\\_nitr%C3%B3geno](https://es.wikipedia.org/wiki/Ciclo_del_nitr%C3%B3geno)

Este proceso puede ser llevado a cabo de tres maneras independientes: 1. Combustión o también denominada fijación espontánea, la cual ocurre mediante la actividad natural de descargas eléctricas sobre el  $N_2$  de la atmosfera (Socolow, 1999); 2. Fijación industrial, Este proceso es utilizado para obtener amoníaco en formas industriales, y también para la producción de fertilizantes nitrogenados; 3. Fijación biológica de  $N_2$  (FBN), es la asociada a la capacidad metabólica de algunos procariontes, denominados diazótrofos, que logran fijar  $N_2$  mediante su reducción a  $NH_3$ , la FBN es un factor importante para la productividad agropecuaria (Peoples & Craswell 1992).

### 6.2.1 Fijación Biológica del N<sub>2</sub> (FBN)

La FBN es realizada por miembros de los dominios Arquea y Bacteria. En Arquea la FBN solo ocurre en el reino Euryarchaeota, en sus divisiones Methanosarcinales, Methanobacteriales, Halobacteriales y Methanococcales. En cambio, en Bacteria ocurre en seis de los más de 50 phyla descritos hasta el momento (Lloret & Martínez-Romero 2005). Entre ellos se encuentran las bacterias verdes del azufre, las cianobacterias, las Gram-positivas de alto y bajo contenido G+C, las Spirochaetes, los Firmicutes y las Proteobacteria, siendo esta última la división bacteriana la más abundante y a la cual pertenecen los rizobios. Como mencionamos más arriba, dependiendo de la forma en que llevan a cabo la FBN, podemos distinguir a los diazotrófos en dos grupos:

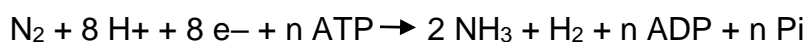
- FBN en vida libre: como lo indica su nombre, hace referencia a la capacidad de algunos procariontes de realizar la FBN sin necesidad de asociarse a un organismo vivo de otra especie
- FBN en simbiosis: este caso hace referencia a que el microorganismo lleva a cabo la FBN asociado a una planta. Dentro de este tipo de asociación podemos distinguir tres grupos de interacciones:
  - ✓ Los heterocistos de las cianobacterias, que ocupan tejidos de hepáticas, helechos, cícadadas y dicotiledóneas.
  - ✓ Los actinomicetos, representados por *Frankia*, que realizan simbiosis con plantas de varias familias no leguminosas que incluyen a los géneros *Alnus* y *Prusia*.
  - ✓ Los que realizan simbiosis con muchas leguminosas y excepcionalmente con una no leguminosa, *Parisponia*, miembro de la familia Ulmaceae. A estos diazotrófos se los denomina en su conjunto como rizobios.



## 6.2.2 La FBN y la nitrogenasa

Independientemente de las agrupaciones que realicemos, todos los organismos capaces de realizar la FBN lo hacen gracias al complejo enzimático de la nitrogenasa (Raymond et al. 2004). Esta enzima presenta la peculiaridad de ser inactiva en presencia de O<sub>2</sub>. Se cree que las primeras nitrogenasas debieron haberse originado antes de que la condición reductora de la atmósfera primitiva cambie a su forma oxigénica actual por la acumulación de O<sub>2</sub> como producto final de la fotosíntesis. A su vez, la nitrogenasa pudo originalmente ser parte de algún proceso respiratorio análogo a la reducción de sulfatos que se observa en bacterias reductoras de sulfato. En ese ambiente reductor, también era necesario gastar ATP para asegurar la expulsión de hidrógeno (H<sub>2</sub>), por lo que es probable que la nitrogenasa también surgiera como un mecanismo de disipación del poder reductor. Dado que las primeras plantas terrestres aparecieron aproximadamente hace 400 millones de años, posiblemente la FBN en simbiosis con plantas apareció mucho tiempo después de los primeros diazotrófos, como una forma de protección de la atmósfera oxigénica (Lloret & Martínez-Romero 2005).

La reacción catalizada por la nitrogenasa para la reducción de N<sub>2</sub> en NH<sub>3</sub> es:



Donde Pi significa fosfato inorgánico, e<sup>-</sup> electrones y n el número de moles.

El consumo de ATP va a depender de las condiciones del flujo de protones, así,  $n \geq 16$ . Cuanto más limitantes sean las condiciones del flujo de protones ese gasto de ATP aumentará (Halbleib & Ludden 2000).

Cuando mencionamos la nitrogenasa, en realidad estamos haciendo referencia a un complejo multienzimático, formado por la dinitrogenasa reductasa o proteína Fe y la dinitrogenasa o proteína FeMo. Ambas son metaloproteínas con centros redox Fe-S, pero en el caso de la dinitrogenasa la presencia adicional del cofactor Mo, hace que la enzima

sea desnaturalizada en presencia de O<sub>2</sub>, por lo tanto el complejo nitrogenasa se inactiva, no logrando la reducción de N<sub>2</sub> (Shaw & Brill 1977). Es por ello que se cree que los diazotrófos desarrollaron diversas estrategias a lo largo de su evolución para proteger a la nitrogenasa del O<sub>2</sub>. Los rizobios realizan simbiosis con leguminosas, asociándose de forma estrecha con las raíces de la planta dentro de una estructura muy especializada llamada nódulo (Young 1992). En la simbiosis rizobio-leguminosa, la planta es la encargada de proteger a la nitrogenasa, ya que por un lado el nódulo posee una capa celular exterior que lo envuelve formando una barrera de protección a la difusión del O<sub>2</sub> de la atmósfera del suelo ( Davis 1984, , Jones et al. 2007) y por otro lado, dentro del nódulo se produce una proteína llamada leghemoglobina –por su homología a la hemoglobina animal (Kundu et al. 2003) la cual es capaz de unir y transportar O<sub>2</sub> con gran afinidad, reduciendo su concentración dentro del nódulo unas 10<sup>4</sup> – 10<sup>5</sup> veces (Jones et al. 2007, Downie 2005).

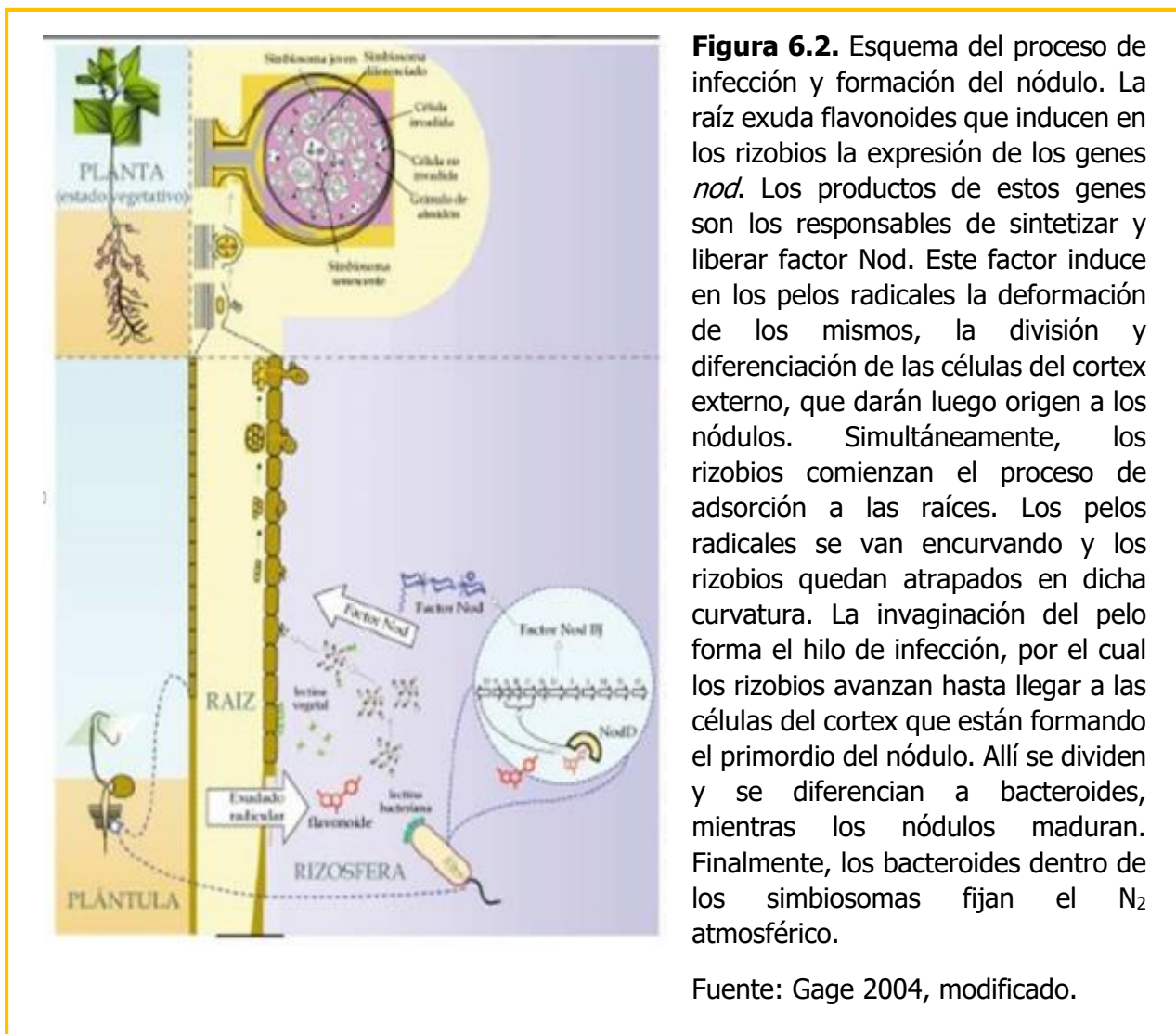
### **6.2.3 Simbiosis**

En el caso particular de la simbiosis rhizobium-leguminosa, ambos simbiosiontes pueden vivir de forma independiente, pero cuando se asocian, ambos se ven favorecidos, de ahí que se trate de una simbiosis mutualista. Sin embargo, en suelos ricos en N la leguminosa no forma nódulos (Gibson & Harper 1985). Este hecho no ha de sorprender si recordamos el gasto energético necesario para que la nitrogenasa pueda catalizar la fijación de N<sub>2</sub>. Cuando hay suficiente N disponible en el suelo, la planta, por razones de economía energética, privilegia la incorporación del N edáfico por sobre el derivado de la atmósfera (Peticari et al. 2007). De esta forma, el establecimiento de una simbiosis efectiva requiere que exista una deficiencia de N en el suelo, al menos en el ambiente de cercanía a la raíz, y que se produzca una serie de eventos concatenados que consisten en la percepción de señales, su transducción y la respuesta. Estos procesos finalizan con la formación del nódulo, un nuevo órgano en las raíces de la leguminosa, en donde el rhizobium se va a diferenciar a la forma capaz de fijar N<sub>2</sub>. Como es de esperarse, este proceso de desarrollo y diferenciación necesita un control preciso en tiempo y espacio, el cual está gobernado

en gran parte por una serie de genes regulatorios implicados en el desarrollo de la simbiosis (Schlaman et al. 1998).

El proceso y las etapas previas a la simbiosis han sido muy bien caracterizados y se lo puede dividir en cinco acontecimientos principales: (Fig. 6.2)

- Adhesión de los rizobios a la superficie de las raíces y colonización.
- Reconocimiento del par simbiótico.
- Invasión de la raíz.
- Organogénesis del nódulo.
- Diferenciación de las bacterias a bacteroides y fijación de N<sub>2</sub>.



#### **6.2.4 Adhesión a la superficie radical y colonización**

La rizósfera, espacio contiguo a las raíces, es un microhábitat rico en nutrientes con respecto al suelo circundante. Este microhábitat puede ser colonizado por diversos microorganismos que generalmente forman biopelículas sobre la superficie de la raíz. En tal sentido, la mayoría de las bacterias edáficas, incluido rhizobium, poseen diversos mecanismos de adhesión a las raíces. Cabe hacer hincapié, en que la mayoría de esas bacterias edáficas comparten algunos mecanismos de adhesión con los rhizobium, con lo cual pueden interferir con la unión de los mismos a sitios de infección sobre la raíz, y así impedir su posterior entrada a la leguminosa (Nelson 2004).

Durante el proceso de adhesión no solo actúan moléculas secretadas por parte de la planta, sino también por parte del microsimbionte. Por el lado de la planta, se ha puesto de manifiesto el rol de ciertas macromoléculas, entre ellas las lectinas, (glico) proteínas capaces de unir selectivamente ciertos carbohidratos, y que suelen acumularse en las puntas de los pelos radicales (Dazzo & Hubbell 1975). Por su parte, los microsimbiontes secretan moléculas denominadas conjuntamente como adhesinas, que incluyen polisacáridos de superficie, aglutininas, fimbrias, fibrillas de celulosa y hasta algunos autores han propuesto que los flagelos podrían tener un rol como adhesinas (Croes et al. 1993, Merino et al. 2006).

#### **6.2.5 El diálogo molecular: reconocimiento Simbiótico**

Si bien el diálogo molecular entre simbiote y hospedante no está diferenciado temporalmente, podemos proponer que éste comienza con la secreción de moléculas fenólicas, llamadas flavonoides, en el exudado radical de la leguminosa (Perret et al. 2000). Estas moléculas van a disparar la activación específica de factores transcripcionales que controlan la expresión de los genes de nodulación en los rizobios, denominados *nod*, *noe* y *nol*. Cada uno de estos genes se hallan ubicados en operón (Perret et al. 2000) y codifican las proteínas que van a catalizar la síntesis de un quitoolipooligosacárido denominado factor Nod, el cual es clave en el desarrollo del nódulo (Mergaert et al. 1997). Esta molécula es secretada por los rizobios y constituye una señal

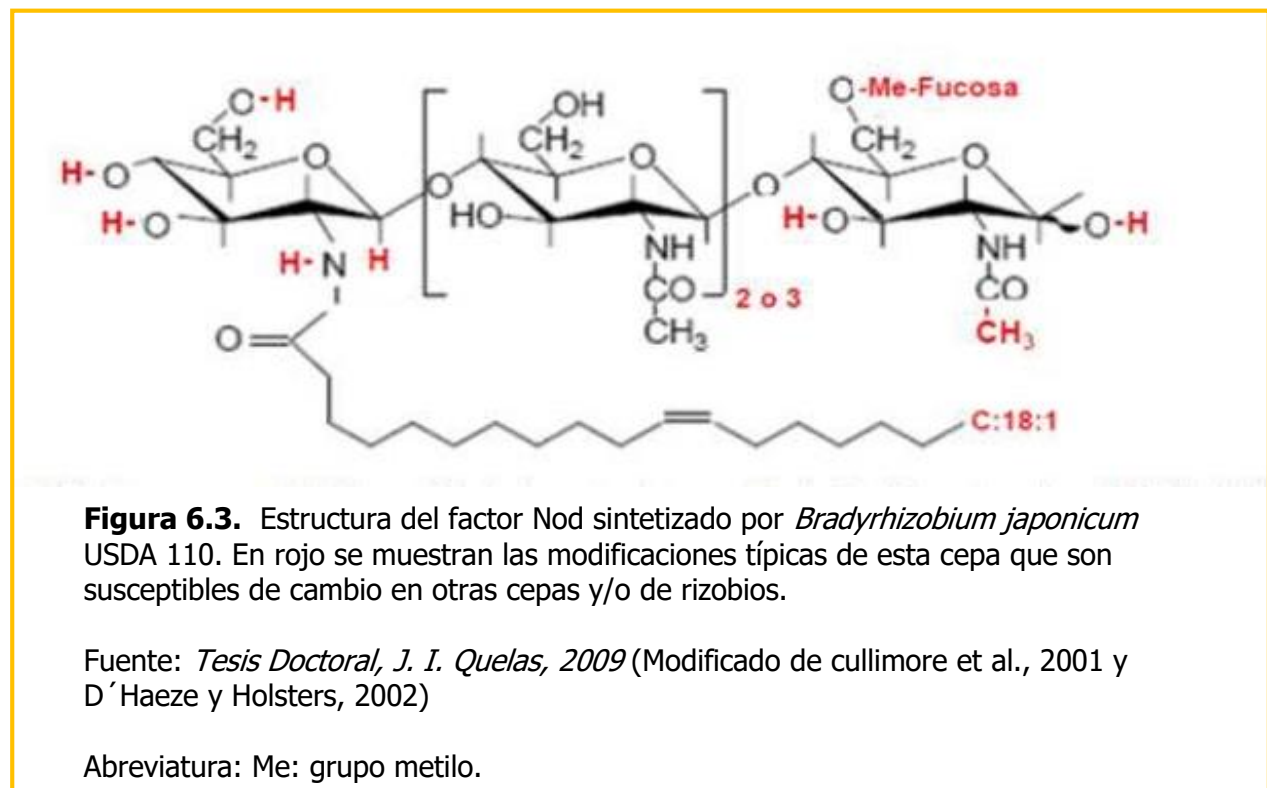
para la planta, induciendo el inicio de la simbiosis a varios niveles. Entre los procesos que responden a la presencia del factor Nod se encuentran la deformación y enrollado del pelo radical mediante la reorganización de su citoesqueleto, y el inicio de la actividad mitogénica en las células (sub)corticales de la raíz para dar origen al primordio del nódulo (Brencic & Winans 2005). Estas conclusiones fueron obtenidas a partir de estudios realizados con rizobios mutantes incapaces de sintetizar factores Nod, frente a los cuales los pelos radicales no manifiestan reacción alguna (Rélis et al. 1993), y experimentos con plantas inoculadas con factor Nod purificado, las que, en respuesta, desarrollan nódulos en ausencia de rizobios. De esta manera, podemos observar que los flavonoides, en conjunto con los factores Nod, constituyen las primeras moléculas-señal intercambiadas por ambos simbiosis, dado que los flavonoides y los factores Nod son las moléculas más estudiadas y caracterizadas, a continuación haremos un breve resumen de sus propiedades más relevantes.

#### **6.2.5.1 Flavonoides**

Todos los flavonoides consisten en dos anillos de benceno unidos por un heterociclo de pirano o piranona. Las sustituciones específicas en los anillos de esa estructura básica dan como resultado calchonas, flavonas, flavononas, flavonoles e isoflavonoides entre otros. En particular, los isoflavonoides producidos por soja, daidzeína y genisteína, son inductores específicos de los genes nod en *B. japonicum* (Subramanian et al. 2006) e inhiben la expresión de los genes nod en *E. meliloti*, cuyos genes nod son inducidos por luteolina. En base a este tipo de observaciones se ha sugerido que cada planta produce una mezcla distinta de estas moléculas, la cual es específica para su simbiote. A su vez la cantidad, aunque siempre del orden nanomolar a micromolar, y el espectro de flavonoides pueden variar con la edad y el estado fisiológico de la leguminosa (Shaw et al. 2006). Curiosamente, este tipo de moléculas también actúan como señales en las respuestas de defensa de la planta frente a patógenos, lo cual está de acuerdo con la idea de que durante su evolución, la simbiosis rizobio-leguminosa habría reclutado sistemas de transducción de señales de respuestas a patógenos, y hoy sería una patogénesis atenuada (Perret et al. 2000, 2004, Brennic & Winans 2005).

### 6.2.5.2 Factores Nod

La estructura básica del factor Nod está constituida por un tetra o pentasacárido de N-acetil-β-D-glucosamina sustituido en el C2 de su extremo no reductor por una cadena de ácido graso insaturado. Además puede contener otros sustituyentes, tanto en su extremo reductor como en su extremo no reductor (Mergaert et al. 1997, Brenic & Winans 2005). Diferentes especies de rizobacterias sintetizan diferentes tipos de factor Nod, los cuales son distinguibles por el grado de saturación de su cadena de ácido graso y los sustituyentes que presentan en sus extremos (Mergaert et al. 1997). En la Fig. 6.3 se muestra el factor Nod sintetizado por *B. japonicum* USDA 110. De la mano de estos resultados, en un principio se propuso, de forma análoga a lo observado con los flavonoides, que los factores Nod también poseerían especificidad simbiótica (Sanjuán et al. 1992). De manera adicional, también se ha observado que rizobios pertenecientes al mismo género, capaces de nodular la misma especie, presentan distintas sustituciones en la estructura base del factor Nod (Broughton et al. 2000).



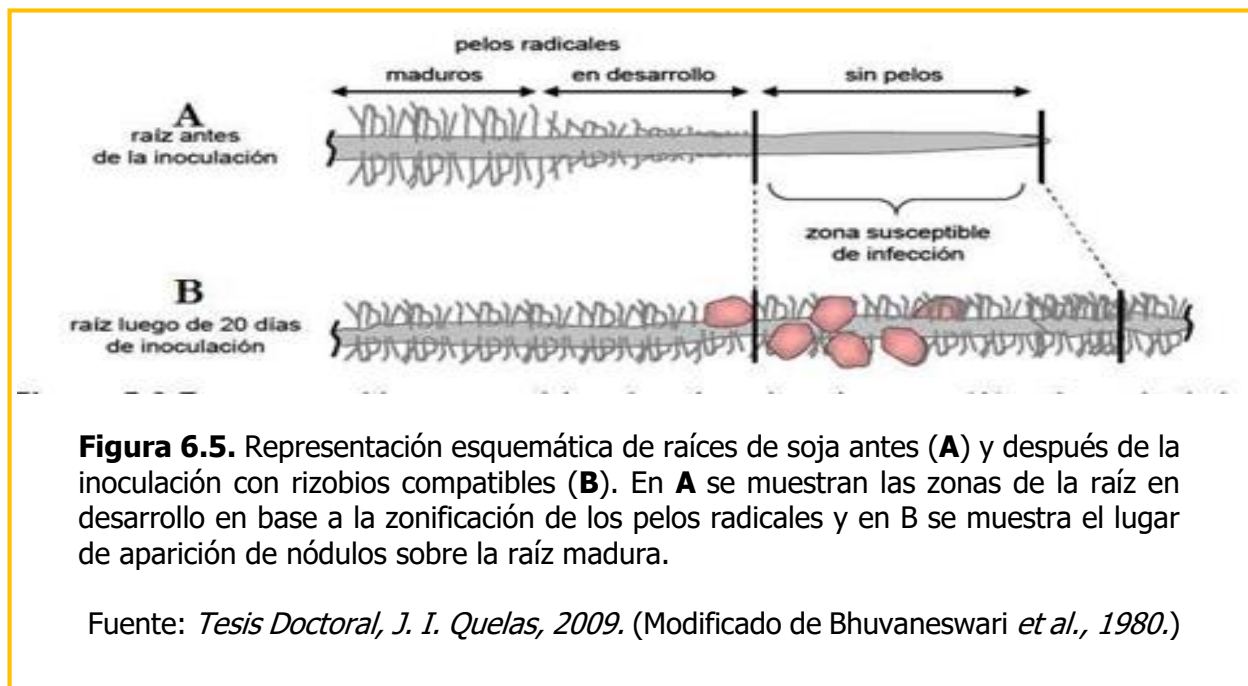
La biosíntesis y secreción del factor Nod son procesos complejos, que están codificados en varios genes, conocidos como genes de nodulación. Los genes de nodulación comunes nodABC codifican la biosíntesis y el ensamblaje de las unidades de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina y la unión de la cadena de ácido graso –presentes en todas las especies de bradyrhizobios, mesorrizobios y rizobios– mientras que los genes de nodulación específicos, nol y noe codifican las enzimas que catalizan la “decoración” del factor Nod con diferentes sustituyentes en sus extremos (Masson-Boivin et al. 2009).

### **6.2.6 La invasión de la raíz**

A partir del trabajo de Fåhræus (1957) se conocen las etapas de la infección de las raíces de las principales especies de leguminosas, entre las que se encuentra la soja, frijol entre otras leguminosas. Fåhræus observó que los pelos radicales muestran una deformación denominada “enrulado del pelo radical”, que atrapa a las bacterias simbióticas en la curvatura interior. Estas bacterias posteriormente penetran a la raíz formando un canal característico llamado hilo de infección, que se desarrolla longitudinalmente en dirección a las células (sub)corticales de la raíz. El hilo de infección se forma por una invaginación de la pared celular del pelo radical que engloba a las bacterias, las que de esta manera, avanzan permaneciendo siempre en el espacio exterior de la célula vegetal (Gage 2004). En otras especies de leguminosas, las bacterias penetran por hendiduras dejadas por raíces laterales emergentes, en un proceso que se conoce como “crack entry” (Boogerd & Van Rossum 1997).

Posteriormente a los trabajos iniciales de Bhuvaneshwari et al. (1980) realizaron mapas de las zonas radicales donde se van formando los nódulos a medida que la raíz crece y se desarrolla, y a partir de esa información, determinaron qué zonas de la raíz son infectables y durante cuánto tiempo. Así, distinguieron tres zonas de la raíz, diferentes en cuanto a su arquitectura y a su crecimiento (Fig. 6.4): la primera de ellas, a continuación del hipocótilo, es la zona de pelos maduros, la siguiente es la zona de pelos radicales en desarrollo y la tercera, llegando al ápice, es la denominada zona apical, donde se encuentran los pelos radicales emergentes (Bhuvaneshwari et al. 1980, Gage 2004).

Además propusieron que la infección de una zona particular de la raíz de soja debe ocurrir dentro de las seis horas de la inoculación, ya que luego de ese tiempo, los pelos radicales de esa zona maduraron y ya no son más infectables (Bhuvanewari *et al.* 1980). (Figs. 6.4 y 6.5)





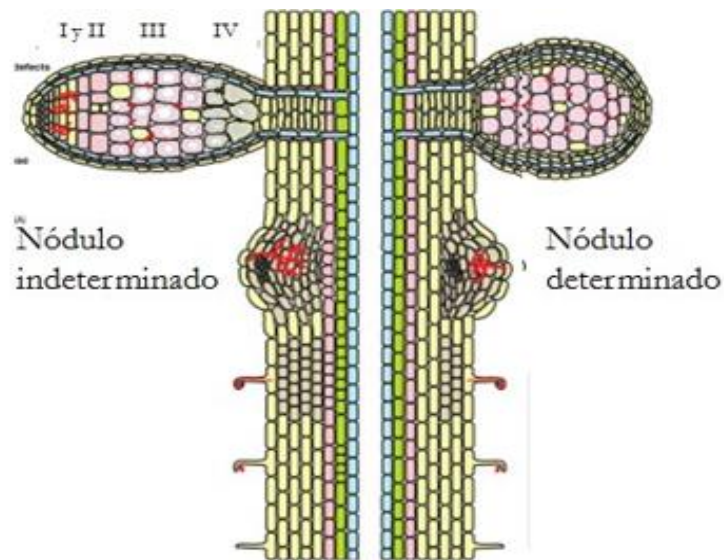
### 6.2.7 Organogénesis e invasión del nódulo

En la etapa final del hilo de infección, los Rizobios alcanzan la corteza interior de la raíz, donde se observa que las bacterias son internalizadas por las células vegetales corticales. Esta internalización ocurre por medio de una endocitosis, en donde una o unas pocas bacterias quedan englobadas por la membrana vegetal oriunda del hilo de infección formando una vesícula que ingresa al citoplasma de la célula infectada. Una vez endocitadas, estas vesículas constituyen el denominado simbiosoma, y la membrana que las rodea se denomina membrana peribacterial, MPB. (Ribeiro *et al*; 2009). Durante el proceso de infección y formación de los simbiosomas, el primordio del nódulo se va desarrollando y comienza a poblarse de células infectadas. En paralelo, los rizobios comienzan una diferenciación que va a concluir con su transformación en bacteroide, el cual puede comenzar a fijar N<sub>2</sub>. Dependiendo del genotipo de la leguminosa, el primordio del nódulo se puede formar en alguna de las tres capas de células de la corteza radical. Si se desarrollan en la corteza media o externa, dan lugar a los denominados nódulos determinados, en cambio sí lo hacen en la corteza interna, se forman los denominados nódulos indeterminados (Patriarca *et al*. 2004).

Los nódulos determinados poseen un aspecto esferoide y albergan las células más jóvenes en la periferia, mientras que hacia el centro se encuentran las células maduras y luego las senescentes. Por lo tanto, la actividad fijadora de N<sub>2</sub> es mayor en las capas intermedias y menor en el centro. Estos nódulos son típicos de las leguminosas de origen tropical, entre las cuales se encuentran *G. max* (soja), *L. japonicus*, *P. vulgaris* (poroto) y especies de Vicia (Popp & Ott 2011). (Fig. 6.6)

Por su parte, los nódulos indeterminados poseen forma alargada, debido a que en su extremo apical mantienen un meristemo que es fuente permanente de nuevas células nodulares. Esto los distingue de los nódulos determinados, en los cuales no hay células meristemáticas. En un corte histológico longitudinal se pueden diferenciar cuatro zonas: la zona de infección (zona I), donde se encuentran las células jóvenes, una zona intermedia (Zona II), una zona de fijación (zona III), con células maduras, y la zona de

senescencia (zona IV), que sería equivalente a la zona central de los nódulos determinados. La zona I puede ser infectada continuamente por rizobios que ya se encuentran dentro del nódulo. Las leguminosas originarias de zonas templadas como *M. sativa* (alfalfa), *P. sativum* (arveja) y *Trifolium* (trébol), forman nódulos de este tipo (Fig. 6.6).



**Figura 6.6.** Representación esquemática del desarrollo y arquitectura general de un nódulo determinado (derecha) e indeterminado (izquierda). En el nódulo indeterminado, se diferencian cuatro zonas: I zona de crecimiento. II zona intermedia, III zona de fijación y IV zona de senescencia.

El nódulo determinado solo presenta zona de fijación.

Fuente: *Popp y Ott* (2011) - modificado

### **6.3 Manejo y calidad de los acarreadores microbianos**

El proceso de formulación de un biofertilizante comprende toda la serie de procedimientos y tecnologías posteriores a la multiplicación de los microorganismos promotores de crecimiento, enfocados a su preservación en una presentación comercialmente aceptable que permita mantener una viabilidad máxima del producto durante el mayor tiempo posible. En la práctica, la elección de la formulación adecuada de un biofertilizante determinará su éxito (Fages, 1992). Un inoculante está integrado por una o más cepas de bacterias u hongos en un material que le sirve de soporte y protección (acarreador). Una de las principales funciones de los acarreadores en una formulación es prevenir la pérdida gradual de la viabilidad de los microorganismos a introducir a los cultivos.

#### **6.3.1 Los soportes**

Se entiende como soportes u acarreadores a las sustancias que permiten proveer un medio adecuado para la supervivencia de los rizobios en condiciones infectivas durante un tiempo prolongado, es decir desde que salen del biorreactor y se comercializan hasta que son utilizados en la biofertilización del cultivo de leguminosas. Los soportes disponibles en el mercado se dividen en soportes líquidos, ya sean acuosos u oleosos y en soportes sólidos, como turba, dolomita, o vermiculita. El uso de estos soportes da origen así a los inoculantes líquidos, oleosos o granulados (Peticari et al.1994).

#### **6.3.2 Características de los soportes**

Los soportes deberán aumentar la eficiencia de unión de los rizobios a las semillas o a la dispersión del inoculante en el suelo. En tal sentido, el primer inoculante patentado contenía gelatina como soporte (Smith 1995). Además de las características mencionadas, los soportes deben poseer, entre otras:

- Alta capacidad de retención de agua.
- Uniformidad física y química.
- Biodegradabilidad e inocuidad ambiental.
- Carencia de reactividad biológica (en lo posible, esterilidad).
- Capacidad para admitir suplementos de nutrientes y aditivos.
- Facilidad de manejo, tanto durante la fabricación, como en la administración del inoculante.
- Facilidad de obtención.
- Bajo costo.

Una vez procesados, deben agregarse los rizobios de forma tal que se distribuyan de manera uniforme en la mezcla.

### **6.3.3 Soportes sólidos y sus diferentes presentaciones**

Conforme a Bashan (1998) la presentación sólida de los inoculantes microbianos incluye:

- a) Polvos. Esta forma de aplicación es la más empleada y constituye el medio más adecuado para inocular las semillas antes de ser sembradas. Entre más pequeño sea el tamaño de la partícula del acarreador mejor será la adherencia a la semilla y menor la probabilidad de atasco de las sembradoras. Los acarreadores con tamaños de partícula más pequeños tienen una mayor área de contacto, lo que les confiere una mayor resistencia a la desecación debido al incremento de la cobertura celular (Dandurand et al., 1994). El tamaño de las partículas puede variar de 0.075 a 0.25 mm y la cantidad de biofertilizante usado es usualmente de 200 a 300 g por hectárea. En garbanzo, Vidhyasekaran y Muthamilan (1995) utilizaron exitosamente *Pseudomonas fluorescens* como recubrimiento de semillas (preparaciones de talco a razón de 100 g por cada 25 kg de semilla) para el control del marchitamiento de este cultivo.

- b) Granular. Estos inoculantes se aplican directamente en los surcos junto con las semillas. El tamaño de las partículas fluctúa entre 0.35 y 1.18 mm. Los inoculantes basados en *Rhizobium* se emplean a razón de 5 a 30 kg/ha. Las perlas de alginato son otra forma sintética de inoculantes granulares; el tamaño de partícula de esta presentación puede variar entre 1 y 3 mm de diámetro. El soporte empleado en algunas formulaciones de micorrizas puede ser clasificado como granular; de esta presentación se recomiendan dosis 1 a 2 kg de micorriza por ha en función de la cantidad del inóculo efectivo contenido.

Cabe mencionar que en las formulaciones sólidas, la fase de deshidratación es la más crítica, especialmente para bacterias que no forman esporas. La cantidad y efectividad de los microorganismos en el producto final formulado es afectada por diferentes factores entre los que se encuentran la genética y fisiología de los propios microorganismos, la composición del medio utilizado para su multiplicación (Schisler y Slininger, 1997), la fase de crecimiento considerada para la cosecha del microorganismo, el material utilizado como acarreador (naturaleza, tamaño de partículas y presencia de microorganismos contaminantes u otros factores inhibitorios del crecimiento o viabilidad de la bacteria) y la tecnología empleada para el secado y preservación de las bacterias (adición de nutrientes y conservadores) .

Las materias primas utilizadas en la mayoría de los acarreadores sólidos comerciales son baratas y naturalmente abundantes (tabla 6.1). Se pueden emplear sustratos orgánicos o inorgánicos, por ejemplo turba, césped, talco, lignita, vermiculita, zeolita o alginato. Para bacterias promotoras de crecimiento comúnmente se emplean como acarreadores extracto de algas marinas (*Ascophyllum nodosum*) o yuca (*Yucca schidigera*) y turba finamente molida con carbonato de calcio para neutralizar la acidez de este sustrato. La turba es un acarreador ideal ya que aporta nutrientes a los microorganismos y posee una gran superficie específica, así como un alto poder de retención de humedad y capacidad de amortiguamiento, lo que proporciona a los microorganismos protección ante condiciones ambientales adversas. Sin embargo, la turba es extremadamente difícil de

desinfectar y su proceso de esterilización puede causar la liberación de compuestos tóxicos a los microorganismos. Por esta razón se admite cierto grado de contaminación en la formulación de biofertilizantes que emplean turba como acarreador. Por otro lado, la turba posee una composición orgánica compleja lo que genera una gran variabilidad en su constitución de modo tal que algunos materiales de este tipo pueden incluso resultar tóxicos para algunos cultivos (Bashan et al., 2007). También se pueden emplear medios de cultivo líquidos, sin embargo, la vida de anaquel de una presentación líquida suele ser más corta que una sólida.

**Tabla 6.1.** Viabilidad de algunas bacterias formuladas en diferentes acarreadores sólidos.

<b>Vehículo</b>	<b>Bacteria (cepa)</b>	<b>Contenido iniciales/finales</b> (Tiempo y temperatura de almacenamiento)	<b>Referencias</b>
Aserrín-carbón	<i>Bacillus subtilis</i> BN1	$7.8 \times 10^7$ - $6.2 \times 10^6$ (6 meses)	Singh <i>et al.</i> (2008)
Cápsulas de alginato	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomonas corrugata</i>	$1 \times 10^5$ - $1 \times 10^3$ $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^3$ (6 meses, 4°C)	Trivedi <i>et al.</i> (2005)
Cápsulas de alginato	<i>Azospirillum brasilense</i>	$1 \times 10^9$ - $1 \times 10^8$ (6 meses, 25 °C)	Ivanova <i>et al.</i> (2005)
Carbón	<i>Rhizobium</i> sp. <i>Azotobacter chroococcum</i> <i>Azospirillum lipoferum</i> <i>Bacillus megaterium</i>	$1 \times 10^9$ - $1 \times 10^9$ $1 \times 10^9$ - $1 \times 10^9$ $1 \times 10^9$ - $1 \times 10^9$ $1 \times 10^{10}$ - $1 \times 10^{10}$ (1 mes)	Suneja <i>et al.</i> (2007)
Cenizas-lignita	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$34 \times 10^7$ - $4 \times 10^7$ (6 mese, 28°C)	Jayaraj <i>et al.</i> (2007)
Estiércol	<i>Pseudomonas fluorensceus</i>	$30 \times 10^7$ - $0.1 \times 10^7$ (8 meses)	Vidhyasekaran y Muthamilan (1995)
Kaolinita	<i>Pseudomonas fluorensceus</i>	$30 \times 10^7$ - $2.8 \times 10^7$ (4 meses)	Vidhyasekaran y Muthamilan (1995)

Lignita	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30 x 10 <sup>7</sup> - 5.3 x 10 <sup>7</sup> (4 meses)	Vidhyasekaran y Muthamilan (1995)
Perlita	<i>Bradyrhizobium CB1909</i>	1 x 10 <sup>9</sup> - 1 x 10 <sup>9</sup> (6 meses)	Khavazi <i>et al.</i> (2007)
Residuos de corcho	<i>Bradyrhizobium CB1909</i> <i>Sinorhizobium fredii</i>	1 x 10 <sup>10</sup> - 1 x 10 <sup>9</sup> 1 x 10 <sup>10</sup> - 1 x 10 <sup>9</sup> (12 meses, 25 °C)	Albareda <i>et al.</i> (2008)
Residuos de corcho	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Mesorhizobium ciceri</i>	1 x 10 <sup>8</sup> - 1 x 10 <sup>9</sup> 1 x 10 <sup>8</sup> - 1 x 10 <sup>9</sup> (12 meses)	Ferreira y Castro (2005)
Suelo	<i>Azospirillum brasilense</i> <i>Azotobacter chroococcum</i>	2x 10 <sup>3</sup> - 1 x 10 <sup>3</sup> 2 x 10 <sup>3</sup> - 1 x 10 <sup>3</sup> (3 meses, 35 °C)	Gaind y Gaur (2004)
Suelo-ceniza 1:1	<i>Pseudomonas striata</i> <i>Bacillus circulans</i>	2x 10 <sup>3</sup> - 1 x 10 <sup>2</sup> 2 x 10 <sup>3</sup> - 1 x 10 <sup>2</sup> (3 meses, 35 °C)	Gaind y Gaur (2004)
Talco	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Cepas P7NF Y TL3)	1 x 10 <sup>9</sup> - 1 x 10 <sup>8</sup> (12 meses)	Caesar y Burr (1991)
Talco	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Cepa Pf1)	37.5 x 10 <sup>7</sup> - 1.3 x 10 <sup>7</sup> (8 meses)	Vidhyasekaran y Muthamilan (1995)
Talco	<i>Bacillus subtilis</i>	1 x 10 <sup>8</sup> - 1 x 10 <sup>6</sup> (45 días)	Amer y Utkhede (2000)
Talco	<i>Pseudomonas putida</i>	1 x 10 <sup>9</sup> - 1 x 10 <sup>3</sup> (45 días)	Amer y Utkhede (2000)
Turba	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3.5 x 10 <sup>7</sup> - 0.7 x 10 <sup>7</sup> (8 meses)	Vidhyasekaran y Muthamilan (1995)
Turba	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1 x 10 <sup>7</sup> - 1 x 10 <sup>8</sup> (6 meses, 25-30 °C)	Tittabutr <i>et al.</i> (2007)
Turba suplementada con quitina	<i>Bacillus subtilis</i>	1x 10 <sup>5</sup> - 1 x 10 <sup>10</sup> (6 meses)	Manjula y Podile (2001)
Vermiculita	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30 x 10 <sup>7</sup> - 0.1 x 10 <sup>7</sup> (8 meses)	Vidhyasekaran y Muthamilan (1995)

### 6.3.3.1 Bagazo y perlita

Como se mencionó anteriormente la turba es un acarreador ideal debido a sus aportes nutrimentales a los microorganismos, sin embargo, es extremadamente difícil de esterilizar y además su composición orgánica compleja puede resultar tóxica para algunos cultivos (Bashan et al., 2007). Por otra parte algunos países carecen de depósitos de turba naturales (Graham, Bennett, & Paau, 1987) o las minas de turba se encuentran en los ecosistemas de humedales preservados, por lo que está prohibida su extracción (Albareda et al., 2008; Daza et al., 2000). Dada la limitada disponibilidad de las reservas mundiales de turba, surge la necesidad de explorar fuentes alternativas de soportes que cumplan con los requerimientos básicos como lo es sobrevivencia celular; una de las alternativas recientes es propuesta por Khavazi et al., (2007), ellos proponen generar un soporte constituido por un 75% de bagazo de caña y un 25% de perlita.

Khavazi et al., (2007), analizaron de manera individual la composición de bagazo de caña, encontraron que está compuesto de 0.42% de N, 0.04% de P, 0.16% de K, 2370 mg Kg<sup>-1</sup> de Fe, 44 mg Kg<sup>-1</sup> de Mn, 5 mg Kg<sup>-1</sup> de Cu, 26 mg Kg<sup>-1</sup> de Zn, un pH de 7.34, materia orgánica 53%, capacidad de retención de agua 200%. Asimismo evaluaron a perlita que contiene (%) 70–80 SiO<sub>2</sub>, 12–16 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 2–5 Na<sub>2</sub>O, 2–5 K<sub>2</sub>O, 0–1 MgO, 0–1 FeO<sub>3</sub>, 0–1.5 S y SO<sub>3</sub>, un de pH: 6-6.7, 0.1% de materia orgánica, capacidad de retención de agua 400% (Khavazi et al., 2007).

Empleando *Bradyrhizobium japonicum*, la combinación bagazo de caña-perlita mantuvo la concentración celular por arriba de 9.5X10<sup>9</sup> cel g<sup>-1</sup> durante 6 meses almacenado a 4 °C, esto debido a que ambos soportes tienen una alta capacidad de retención de humedad, material orgánico, elementos esenciales y alto contenido nutricional, que según Smith (1992), son características básicas que un buen soporte debe tener.



#### 6.3.4 Factores que afectan a un inoculante

De acuerdo con Bashan (1998) los factores que afectan la formulación de un buen inoculante incluyen:

- a) Características físicas y químicas. Además de poseer una uniformidad química y física, los soportes de los inoculantes deben ser casi estériles o fácilmente esterilizables. En este punto es importante considerar que el empleo de un acarreador estéril puede incrementar los costos de producción de 5 a 10 veces (Smith, 1995). La calidad del acarreador debe ser consistente, tener alta capacidad de retención de agua y debe asegurar una retención máxima de microorganismos.
- b) Cualidades de fabricación. El acarreador debe ser de fácil manejo para la industria, permitiendo la adición de nutrientes y otros aditivos, así como un fácil ajuste del pH.
- c) Cualidades de manejo para el agricultor. Un buen inoculante debe ser de fácil manejo y aplicación (la principal preocupación del productor), que proporcione una liberación rápida y controlada del microorganismo en el suelo y que pueda ser aplicado con maquinaria agrícola estándar. Su almacenamiento debe ser realizado preferentemente a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. El tamaño de las partículas del acarreador debe permitir su fácil adherencia a la semilla o su solubilización en agua, sin que ocasionen un bloqueo de las sembradoras o los sistemas de riego.
- d) Cualidades ambientales. El inoculante no debe ser tóxico, debe ser biodegradable y no contaminante, y presentar un riesgo mínimo de dispersión en la atmósfera o aguas profundas.
- e) Cualidades de almacenamiento. El inoculante debe tener suficiente vida de anaquel (uno o dos años a temperatura ambiente muchas veces es necesario para su aceptación en los sistemas de producción agrícola).

### **6.3.5 Efectividad de las cepas de microorganismos**

Algunas de las características importantes en una cepa promotora de crecimiento eficiente incluyen (Inifap, 2012):

- Fuerte promoción del crecimiento de las plantas.
- Antagonismo contra diversos organismos fitopatógenos.
- Capacidad de movimiento.
- Capacidad de sinergismo con otros microorganismos.
- Resistencia a pesticidas.
- Capacidad competitiva.
- Presencia de múltiples mecanismos de promoción de crecimiento.

Es importante definir la actividad que se busca promover a través del uso de un microorganismo determinado, ya que si lo que se desea es, por ejemplo, incrementar o hacer eficiente la tasa de asimilación de nutrientes en las plantas se requerirá de una cepa, o de un consorcio de microorganismos que estimulen este proceso.

### **6.3.6 Calidad de los soportes**

La finalidad de un soporte o acarreador es mantener la viabilidad de los microorganismos (Heijnen et al., 1993). Como se mencionó previamente existen grandes diferencias en la capacidad de los soportes usados en la formulación de los biofertilizantes para maximizar la retención de microorganismos y viabilidad a través del tiempo (Tabla 6.1).

Algunas características deseables en un soporte incluyen (Inifap, 2012):

- Ausencia de organismos patogénicos o contaminantes en los soportes.
- Contenido de la dosis adecuada y efectiva de microorganismos.
- Tamaño de partículas adecuado al uso que se pretende dar al producto.

- Inclusión de nutrimentos u otros aditivos que prolonguen la viabilidad de los microorganismos. Comúnmente se adiciona un extracto para que la bacteria mantenga sus funciones vitales básicas, ya que éstas disminuyen a un mínimo cuando entran en un estado de latencia en las formulaciones sólidas. Los componentes de los medios de crecimiento pueden incluir triptona, hidrolizado de caseína, extracto de levadura, maltodextrina y diversos azúcares.

### **6.3.7 Material de empaque confiable**

Para el empaqueo de biofertilizantes en presentación sólida comúnmente se emplean bolsas resistentes, pero manejables, de polietileno de baja o alta densidad (o polipropileno), de dimensiones 8 x 16 cm o 30 x 40 cm y oscuras u opacas para evitar que los microorganismos sean dañados por la luz (Inifap, 2012).

En México, el etiquetado de los recipientes deberá ajustarse a la NOM182-SSA1-1998 (Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, 2000) y deberá contener información básica que incluye lote, fecha de elaboración, contenido neto, caducidad, género y especie del o los microorganismos utilizados en la formulación del producto (y si es que estos han sido modificados genéticamente), registro sanitario, cultivos recomendados para el empleo del inoculante, dosis e instrucciones para su empleo, forma de acción de los microorganismos, beneficios obtenidos mediante el uso del producto y cantidad de microorganismos en UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo o mililitro que den lugar al desarrollo de colonias en un lapso de 72 horas a 37°C en medios específicos.

### **6.3.8 Calidad adhesiva de los biofertilizantes**

En la formulación del biofertilizante deberá considerarse la utilización de un agente adhesivo que favorezca la unión de los microorganismos a la semilla, suelo o superficie de la planta y de este modo aumentar los porcentajes de colonización. Algunos de los más empleados son sacarosa (azúcar de mesa), gomas arábica, polietilenglicol, metilcelulosa o carboximetil celulosa (Inifap, 2012).

### **6.3.9 Condiciones de almacenamiento del producto**

Se refiere a las condiciones ambientales y técnicas óptimas para el almacenamiento de los biofertilizantes. Normalmente, el almacenamiento a 20-25°C se considera satisfactorio, mientras que temperaturas cercanas al punto de congelación pueden ser dañinas. Los inoculantes bacterianos se pueden almacenar entre 4 y 20°C durante 6 meses o más, pero pueden perder su efectividad en pocas horas a 40°C o temperaturas superiores (Inifap, 2012).

### **6.3.10 Población efectiva mínima de microorganismos**

Se refiere a la cantidad de microorganismo necesaria para que un biofertilizante ejerza un efecto significativo sobre el crecimiento o sanidad de las plantas (Tabla 6.2). Depende tanto de la cantidad total del biofertilizante a ser aplicada como de la concentración del producto.

La variable más comúnmente utilizada para la determinación de la concentración de los biofertilizantes bacterianos es el número de unidades formadoras de colonias o UFC. La mayoría de los productos comerciales basados en bacterias refieren en su etiquetado valores de fluctúan entre  $1.6$  a  $2 \times 10^7$  UFC/g, concentraciones que se asumen aceptables en un biofertilizante. Particularmente en el caso de *Azospirillum* se recomiendan concentraciones que oscilan entre  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{11}$  UFC por mililitro o gramo de biofertilizante formulado (Okon y Labandera-González, 1994).

**Tabla 6.2.** Cargas microbianas experimentales empleadas en algunos cultivos.

Recomendación	Cultivo	Bacteria	Referencias
04 ml por planta de una suspensión ( $1 \times 10^7$ UFC/mL)	Arroz	<i>Azospirillum brasilense</i>	Cúra <i>et al.</i> (2005)
$1 \times 10^6$ UFC/semilla	Cebada	<i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas auroginosa</i>	Germida y Walley (1996)
$1 \times 10^4$ UFC/semilla. 50 g de semilla se mezclan con 0.5 g de inoculante a una concentración de $2.5 \times 10^9$ UFC/g	Lenteja negra	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Díaz-Vargas <i>et al.</i> (2001)
$1 \times 10^6$ UFC/semilla. La cantidad de inoculante solido es equivalente al peso de la semilla.	Soya	<i>Rhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i>	Albareda <i>et al.</i> (2008)
Se aplica 1 mL de suspensión bacteriana ( $1 \times 10^7$ UFC/mL) por semilla al momento de la siembra.	Tabaco	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus pumilus SE34</i> <i>Bacillus pumilus t4</i>	Zhang <i>et al.</i> (2004)
Se aplican $2.7 \times 10^7$ UFC/semilla. Él inoculo ésta contenido en 200 microcápsulas de alginato que se mezclan manualmente con la semilla.	Tomate	<i>Azospirillum brasilense</i>	Bashan <i>et al.</i> (2002)

### 6.3.11 Regulación y control de la calidad de biofertilizantes en México

La reglamentación oficial del uso de biofertilizantes implica la creación de normas que rijan su registro, el establecimiento de estándares de calidad y el monitoreo de la calidad de estos productos en las fábricas y en los anaqueles de los distribuidores. Como ejemplo de normatividad de biofertilizantes bacterianos, se muestra a continuación los parámetros calidad considerados por la India (Indian Standards), uno de los países con mayor tradición en el uso biofertilizantes, y que son regulados por su Ministerio de Agricultura ([http://ncof.dacnet.nic.in/quality\\_standards.htm](http://ncof.dacnet.nic.in/quality_standards.htm)):

Normatividad para *Rhizobium* (IS: 8268-2001):

- ✓ Conteo de células 107/g de sustrato hasta seis meses después de su fabricación.
- ✓ Ausencia de contaminación a una dilución de 105. pH 6.5-7.5.
- ✓ Tamaño de partícula del sustrato sólido entre 150-212 micrómetros.

Normatividad para *Azotobacter* (IS: 9138-2002):

- ✓ Conteo de células 107/g de sustrato hasta seis meses después de su elaboración.
- ✓ Ausencia de contaminación a una dilución de 105. pH 6.4-7.5.
- ✓ Tamaño de partícula del sustrato sólido entre 150-212 micrómetros

Normatividad para *Azospirillum* (IS: 14806:2000):

- ✓ Conteo de células 107/g de sustrato.
- ✓ Ausencia de contaminación a una dilución de 105.
- ✓ Presencia de una película blanca. pH 6.4-7.5.
- ✓ Tamaño de partícula del sustrato sólido de 100 micrómetros.

Aunque en la mayoría de los países que actualmente emplean biofertilizantes en sus sistemas de producción agrícola se cuenta con una reglamentación oficial para el registro de biofertilizantes, existen deficiencias, omisiones o ambigüedades que dificultan su regulación.

En países Latinoamericanos como Bolivia, Venezuela, Perú y México el establecimiento de estándares y el monitoreo de la calidad de estos productos en las fábricas y los anaqueles de los distribuidores representa un grave problema (Abela y Valenzuela, 2007), mientras que Colombia, a pesar de poseer una normatividad de calidad, adolece de un proceso de monitoreo adecuado de biofertilizantes.

Dentro de los países más avanzados en cuanto a la legislación y reglamentación del uso de biofertilizantes se encuentran Brasil, Uruguay, Canadá, Argentina, Cuba, Francia y Australia (Bashan, 1998). Sin embargo, aún en estos países existen ciertas lagunas en la legislación que requieren ser solventadas.

En México, el registro de biofertilizantes es actualmente controlado por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), la cual define un inoculante como un producto elaborado a base de microorganismos que se aplican al suelo o a la semilla con el fin de aprovechar los nutrimentos contenidos en asociación con el vegetal o su rizósfera (Norma Oficial Mexicana NOM-182-SSA1-1998, Etiquetado de Nutrientes Vegetales; Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, 2000). El registro de inoculantes ante COFEPRIS precisa, entre otros requisitos, de la realización de pruebas de efectividad biológica, el análisis de laboratorio del producto a comercializar y la presentación de una licencia sanitaria por el laboratorio que formulará el biofertilizante.

Ante el resurgimiento de los biofertilizantes como una alternativa viable para incrementar la productividad agrícola y la consecuente aparición en México de un gran número de productos que no reúnen los requisitos mínimos de calidad, el Gobierno Federal de México, a través de SAGARPA e INIFAP, ha emprendido una iniciativa formal para reglamentar y fiscalizar la fabricación de biofertilizantes en México; se espera tener la primer propuesta estructurada en años posteriores.

## 6.4 Uso de microorganismos como biofertilizantes

Los microorganismos poseen una gran diversidad de mecanismos a través de los cuales promueven el crecimiento de las plantas. En función de estos mecanismos se reconocen tres grandes grupos de microorganismos promotores del crecimiento vegetal:

- a) Microorganismos que incorporan nitrógeno al sistema planta-suelo mediante la fijación biológica de nitrógeno.

Los fijadores de nitrógeno más eficientes son bacterias que pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium* (Bloemberg y Lugtenberg, 2001).

- b) Microorganismos que incrementan la captación de nutrientes y agua.

En esta categoría se pueden mencionar a las micorrizas que juegan un importante papel en absorción de agua, fósforo, zinc, azufre y cobre.

- c) Microorganismos que aumentan la disponibilidad de nutrientes que se encuentran en el suelo en formas no asimilables.

En esta categoría se incluyen microorganismos que solubilizan fósforo mediante la producción de fosfatasas o ácidos orgánicos (Ej. *Bacillus megaterium* o *Pseudomonas fluorescens*).

### 6.4.1 Los rizobios

Con base en las secuencias de genes de 16S rRNA, todos los rizobios son miembros del phylum Proteobacteria, pero en diferentes clases y ordenes. La mayor parte de los rizobios son del orden VI, Rhizobiales, de la clase I,  $\alpha$ -proteobacteria. En este orden, géneros *Rhizobium*, *AlloRhizobium* y *Sinorhizobium* se incluyen en la familia Rhizobiaceae (Wang y Romero, 2004). Los rizobios tienen la capacidad de fijar nitrógeno al asociarse con plantas leguminosas como el frijol, el chícharo, el cacahuate, el haba, la soya, la alfalfa u otras. Estos microorganismos entran en las raíces y provocan que en estas se formen unas estructuras llamadas nódulos (Martínez *et al.*, 2013).



### 6.4.2 Descripción microscópica y macroscópica

Bacilos de 0.5-1.0 X 1.2-3.0  $\mu\text{m}$ . No esporoformados. Gram negativo. Móvil por flagelos peritricos, generalmente entre 1 y 6. Las fimbrias han sido descritas en algunas cepas (Kuykendall et al., 2005). Las colonias son usualmente blancas o beige, circulares convexas, semitraslúcidas u opacas, a veces mucoides, usualmente de 2-4 mm de diámetro dentro de 3-5 días de incubación en –LMA- (Levadura – Manitol – Sales – Agar). El crecimiento en un medio de carbohidratos es usualmente acompañado por abundante cantidad de exopolisacáridos extracelulares. Pronunciada turbidez se desarrolla de 2 a 3 días en caldo aireado o agitado (Kuykendall et al., 2005).

### 6.4.3 Metabolismo

Aeróbicos, poseen un metabolismo tipo respiratorio con oxígeno como aceptor de terminal electrones. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 25 y 30°C; algunas especies pueden crecer a temperaturas de 40°C. El p H óptimo de crecimiento está entre 6.0 y 7.0, sin embargo pueden entre valores de 4.0 a 10.0. El tiempo de generación de las cepas de *Rhizobium* está entre 1.5-5.0 horas. (Kuykendall et al., 2005).

Es quimiorganoheterótrofo, utiliza un amplio rango de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos como única fuente de carbono, sin formación de gas. No son capaces de metabolizar la celulosa y el almidón. Producen una reacción acídica en medio mineral que contenga sales y manitol u otros carbohidratos. Las sales de amonio, de nitrato y la mayoría de los aminoácidos pueden servir como fuente de nitrógeno. Algunas cepas requieren factores de crecimiento como biotina, pantotenato o ácido nicotínico. La peptona es pobremente utilizada mientras que la caseína, el almidón, la quitina y el agar no son hidrolizadas (Kuykendall et al., 2005).

Los principales mecanismos para el catabolismo de la glucosa son la vía de Entner-Doudoroff y el ciclo de las pentosas fosfato. Es poco probable que la vía de Embden-Meyerhof-Parnas opere en *Rhizobium sp.*, debido a que la actividad de las enzimas

fructosa-1,6 difosfato aldolasa y 6-fosfofructoquinasa son bajas. Los polioles son sustratos para una deshidrogenasa inducible que convierte manitol en frutosa o xilulosa. La L-arabinosa es metabolizada a  $\alpha$ -cetoglutarato. El ciclo de los ácidos tricarbóxicos es operativo, y las enzimas del bypass glioxalato están presentes. La piruvato carboxilasa es una importante enzima anaplerótica. El ácido glucorónico y glucárico son metabolizados vía el ácido 2-ceto-3-deoxi-d-glucárico a  $\alpha$ -cetoglutarato (Kuykendall et al., 2005).

## **6.5 Inoculantes rizobianos**

Los inoculantes rizobianos son formulaciones comerciales que contienen rizobios, para ser aplicados a la semilla o al suelo durante la plantación. Está estimado que aproximadamente 2.000 toneladas de inoculantes son producidas anualmente en el mundo, una cantidad suficiente para inocular 20 millones de hectáreas de leguminosas. La gran mayoría, casi el 50%, son producidos en los Estados Unidos de América. (Rebah et al., 2007).

Los inoculantes rizobianos son preparados por la adición del medio de cultivo previa multiplicación de los microorganismos, así conteniendo una gran población de rizobios, a un soporte en polvo seguido por un periodo de maduración para asegurar la multiplicación o adaptación de las células. De este modo, la producción de una gran cantidad de rizobios en un medio líquido constituye el primer paso en la producción de inoculantes en polvo para leguminosas. La economía de este proceso está gobernada por el costo y la disponibilidad de una fuente de carbono apropiada. El medio estándar que incluye manitol como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y sales minerales, ha sido empleado para la producción a escala de laboratorio, pero este uso es limitado a escala industrial debido a su alto costo debido a que es un medio de cultivo en el que se emplean reactivos químicos de tipo analítico.

### **6.5.1 Calidad en inoculantes rizobianos**

Los inoculantes comerciales han sido usados por más de un siglo, y ellos han contribuido al incremento de la productividad de los cultivos. Un buen inoculante debe ser preparado con una cepa de rizobio seleccionada por la alta eficiencia en la FBN y la habilidad competitiva para la nodulación. Las cepas deben sobrevivir en la formulación del inoculante, manteniendo sus propiedades durante el almacenamiento, y tolerando factores de estrés tales como la acidez, la desecación, las altas temperaturas y los plaguicidas agroquímicos empleados en los cultivos. El factor más importante en la calidad de un inoculante es un alto número de rizobios vivos ( $> 2 \times 10^9$  ufc/g) y ninguna o una mínima contaminación por microorganismos no antagonistas de los rizobios o patógenos para plantas y humanos (Rebah *et al.*, 2007).

### **6.5.2 Ventajas de la fertilización con rizobios**

La simbiosis leguminosa-rizobio juega un rol importante en agricultura, debido a que ofrece la habilidad de convertir nitrógeno molecular atmosférico en formas disponibles para la planta, proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno, además en algunos tipos de cultivo puede asegurar hasta el 100% de la fertilización nitrogenada. La mayoría de las investigaciones para optimizar la fijación simbiótica de nitrógeno y para incrementar el uso de leguminosas en sistemas de cultivos ha sido en parte estimulado por el incremento en el precio de los fertilizantes y por los aspectos ambientales implicados detrás de la aplicación de este tipo de fertilizantes, por lo tanto también contribuye a la preservación del medio ambiente que ha sido afectado por la utilización de fertilizantes químicos de síntesis. Además, este tipo de bioinoculantes conllevan un beneficio adicional que es la producción de factores de crecimiento vegetal, la solubilización de fósforo, actividad ACC deaminasa, entre otras (Rebah *et al.*, 2007).

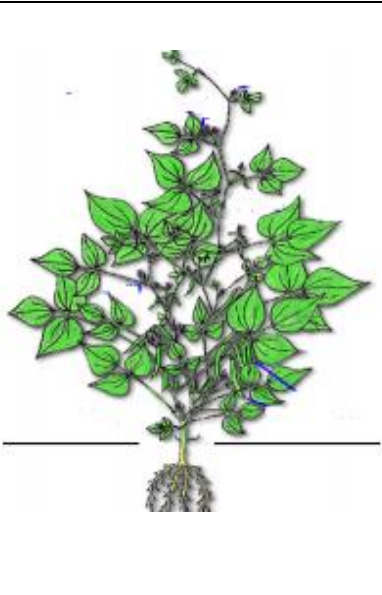
## 6.6 El cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México

### 6.6.1 Importancia

Nuestro país es considerado como uno de los centros de origen de diversos tipos de frijol, siendo la especie más importante *Phaseolus vulgaris* L. (Delgado-Salinas, 2012). El frijol en México se considera un producto estratégico en el desarrollo rural y social del país, ya que representa toda una tradición productiva y de consumo, cumpliendo diversas funciones tanto de carácter alimentario como para el desarrollo socioeconómico. A lo largo de la historia, se ha convertido no sólo en un alimento tradicional, sino también en un elemento de identificación cultural, comparable con otros productos como el maíz y el chile, que son básicos para explicar la dieta alimentaria de la población mexicana (Secretaría de Economía, 2012).

### 6.6.2 Taxonomía

El frijol es una planta dicotiledónea anual, perteneciente a la familia de las leguminosa, muy apreciada por el alto valor nutritivo de su semilla, a continuación se muestra la taxonomía del objeto de estudio (Figura 6.7).

	<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
	<b>Sub Reino</b>	<i>Tracheobionta</i>
	<b>División</b>	<i>Magnliophyta</i>
	<b>Clase</b>	<i>Magnolipsida</i>
	<b>Sub clase</b>	<i>Rosidae</i>
	<b>Orden</b>	<i>Fabeles</i>
	<b>Familia</b>	<i>Fabaceae</i>
	<b>Sub familia</b>	<i>Faboideae</i>
	<b>Sub tribu</b>	<i>Phaseolinae</i>
	<b>Género</b>	<i>Phaseolus.</i> , 1753
	<b>Especie</b>	<i>Vulgaris</i> L.

**Figura 6. 7.** Taxonomía de *Phaseolus vulgaris* L.

### **6.6.3 Fijación biológica del nitrógeno en el frijol**

México es reconocido como centro de origen y domesticación del frijol y por consecuencia cuenta con una amplia diversidad de genotipos. En comparación con otras leguminosas de grano, el frijol se ha considerado como una planta pobre en la fijación de nitrógeno, lo cual podría ser debido a la baja eficiencia relativa de su simbiosis (Hungria y Nevesque, 1986), simbiosis que depende del tipo de cultivar de frijol. De este modo, se ha reconocido que los genotipos de hábito trepador presentan una mayor capacidad de FBN (Graham y Rosas. 1977). Miranda (1967), demostró que para la evaluación de la fijación biológica del nitrógeno en el objeto de estudio es necesario medir los parámetros morfométricos de la planta y así mismo evaluar la fijación biológica que esta haya realizado.

## **7. Materiales y métodos**

### **7.1 Localización del área de estudio**

Los experimentos de actividad biológica y las técnicas analíticas para determinación del crecimiento celular, se llevaron a cabo en el Laboratorio No. 3 de Microbiología; laboratorio ubicado en el Polo Tecnológico Nacional para el Desarrollo de Investigación y Pruebas Analíticas en Biocombustible. Todas las determinaciones y análisis se realizaron en las instalaciones anteriormente mencionadas, ubicadas en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

### **7.2 Cepa de estudio**

El microorganismo empleado en este trabajo fue *Sinorhizobium mexicanum* ITTG R7 aislada de *Acaciella angustissima* colectada en el parque nacional del Cañón del sumidero en Chiapas, México (Rincón, et al., 2001; Lloret, et al., 2007). La cepa utilizada se obtuvo mediante la reactivación de esta misma utilizando medio YEM (Extracto de Levadura y Manitol) (J.T. Baker®).

### **7.3 Reactivación del inóculo**

La cepa se reactivó a partir de una colonia proveniente de un cultivo en caja de Petri con agar PY Ca<sup>2+</sup> incubada a 28 °C por 48 h, la bacteria proviene de este medio debido a que contiene calcio el cual ayuda a estabilizar la pared celular bacteriana, además de que le proporciona la suficiente nutrición para poder construir sus monómeros (Madigan et al., 2002). Posteriormente la colonia se resembró por estría cruzada en cajas Petri con agar YEM y fue incubado a 28 °C por 48 h. Una asada del cultivo fue agregada a un matraz de 500 mL que contenía 200 mL de caldo YEM e incubado por un periodo de 24 h, temperatura de 28°C y 120 rpm en un agitador orbital para posteriormente tomar 1 mL del caldo e inocular en tubos de 16 X 150 mm que contenían 9 mL de caldo YEM los cuales fueron incubados por 24 h a 120 rpm y 28 °C. Concluida la incubación los tubos fueron almacenados en refrigeración a 5 °C hasta su uso. Para confirmar la pureza de la

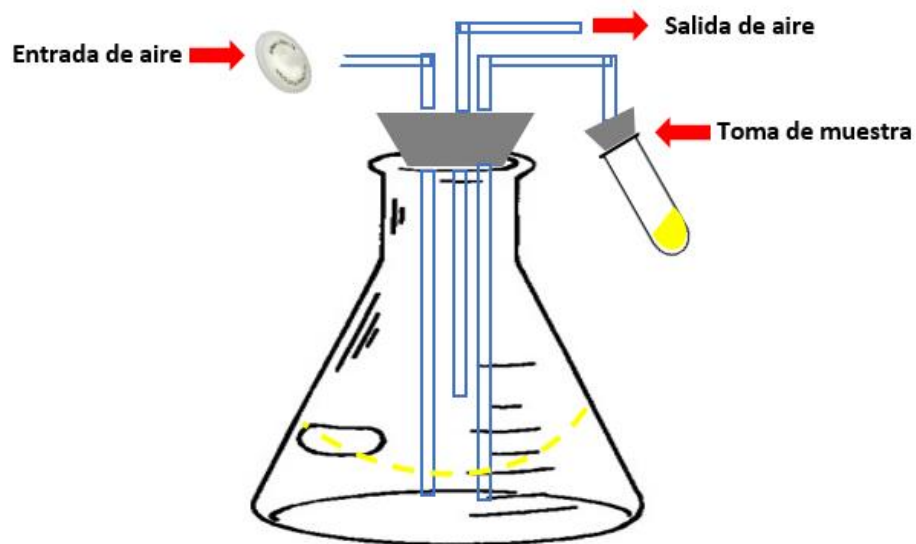
cepa se realizó tinción de Gram.

#### 7.4 Desarrollo del inóculo

El inóculo se desarrolló en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de caldo YEM; un tubo de 16 x 150 mm proveniente de la sección 7.3 fue vaciado al matraz, para que posteriormente este fuese incubado a 120 rpm, 28 °C por 24 h (Ventura et al., 2009).

#### 7.5 Cultivo de *S. mexicanum*

El cultivo de *S. mexicanum* se realizó en matraces de 2 L, conteniendo 800 mL de caldo YEM a pH  $6.7 \pm 0.2$ ; cada matraz fue inoculado con 10% v/v del inóculo proveniente de la sección 7.4. El matraz de cultivo fue mezclado con aire estéril a un flujo de  $2 \text{ L min}^{-1}$  utilizando un filtro de  $0.3 \mu\text{m}$  (6523-500 Whatman®) empleando una bomba marca Resun® modelo AIR PUMP AC-9908. Las muestras fueron tomadas a través de uno de los tres tubos de vidrio que tenía el diseño del matraz (figura 7.1).



**Figura 7.1.** Diseño del matraz de cultivo *S. mexicanum*

La cinética de crecimiento se monitoreo cada 3 h durante 51 h, en cada monitoreo se tomó una alícuota de 10 mL que sirvió para cuantificar biomasa con la finalidad de identificar las diferentes etapas de crecimiento celular (Somasegaran & Hoben, 1985), cada muestra de caldo fue sembrada en cajas de Petri con agar YEM (previa dilución en serie), las cajas fueron incubadas a 28 °C durante 48 h; simultáneamente las muestras de caldo fueron analizadas en espectrofotómetro marca COLE PARMER modelo UV-2100 leyendo a una longitud de onda de 600 nm con el fin de medir la densidad óptica (DO), los parámetros cinéticos determinados para el microorganismo fueron los tiempos de duplicación (td) y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ).

## **7.6 Preparación del soporte sólido**

Bagazo de caña-perlita, el bagazo de caña *Saccharum officinarum* L. CT702086, de la zafra cosechada en enero de 2016 fue obtenido del ingenio azucarero grupo Zucarmex® del municipio Pujilic, Chiapas, la perlita empleada fue perlita mineral expandida marca “Perlita de la Laguna” variedad Multipert, ambos fueron molidos empleando una maquinaria agrícola (molino-picadora) hasta alcanzar un tamaño de partícula malla 100 (0.149 mm). Se mezcló la combinación bagazo de caña-Perlita (B-P) en una relación de 4:1 (w/w), de esta mezcla se colocaron 25 g en bolsas autoclavables marca SARSTEDT de 200 X 300 mm, se le agregó la proporción de caldo YEM a cada bolsa hasta alcanzar un CRA (capacidad de retención de agua) de 6 g H<sub>2</sub>O/g B-P dicho valor representa el 40% de CRA del soporte y posteriormente se mezcló vigorosamente hasta la total retención del líquido, las bolsas fueron cerradas con clips y esterilizadas a 121 °C y 15 lb pulg<sup>-2</sup> por 40 min (Khavazi et al., 2007).

## **7.7 Caracterización del soporte**

La caracterización del bagazo de caña y perlita consistió en determinar los siguientes parámetros: pH, la capacidad de retención de agua (CRA), porcentaje de humedad y la friabilidad.



Para evaluar el pH se disolvieron 10 g del soporte en 90 mL de agua destilada en agitación por 20 min (Estrada, 2008), la lectura se realizó con un potenciómetro marca HACH COMPANY.

Para evaluar la CRA se recolectó muestra del soporte (bagazo de caña-perlita) previamente molido y tamizado. Se pesaron 25 g del soporte y se colocó en un embudo con papel filtro Whatman de baja porosidad N° 42. Se adicionaron 100 mL de agua destilada. Posteriormente se tapó el embudo con papel aluminio para evitar la evaporación y se pesó el papel filtro con el soporte después de 24 horas, después se llevó a peso constante a 105 °C, para determinar la cantidad de agua retenida se utilizó la siguiente ecuación:

Donde:

Peso drenado: peso en g después de 24 h

Peso papel filtro: g

Peso suelo anhidrido: g de suelo seco a 105 °C

Factor de corrección: (peso g de papel filtro) / (peso g de papel filtro seco)

Para ajustar el C.R.A al 40%, se empleó la siguiente ecuación:

C.R.A al 40 %=[(g suelo seco) ((g H<sub>2</sub>O)/ (g Suelo seco)) (0.40) ]-(% humedad)

La friabilidad se determinó agregando 0.5 mL de agua destilada por gramo de soporte sólido, se mezcló vigorosamente, haciendo esto repetidas veces hasta que el material perdió su característica de polvo y se forman grumos, los resultado se reportaron en mililitros de agua por gramo de bagazo (mL/g) (Somasegaran & Hoben, 1985).

La humedad se determinó tomando una muestra aproximada de 2 g del soporte previamente homogenizado la cual fue extendida en forma de cama fina sobre un platillo de aluminio para que posteriormente se midiera la cantidad de agua de la muestra con

ayuda de una termo balanza marca Ohaus® MB 27 a una temperatura de 80 °C.

### **7.8 Elaboración de biofertilizantes**

Una vez que los soportes fueron preparados como se describió en la sección 6, estos fueron inoculados con los respectivos caldos microbianos, la edad del cultivo empleado como inóculo (sección 5) fueron la fase log (12 h) y estacionaria (25 h). Las bolsas fueron inoculadas con el caldo que contenía las células (en fase log o estacionaria) en una relación de 1 mL g<sup>-1</sup> de soporte, cada bolsa se mezcló manualmente hasta homogenizar el contenido, asegurando la absorción del caldo microbiano en el soporte, las bolsas fueron entonces cerradas con una selladora PLASTIC FILM SEALER modelo FR-200, se procuró dejar un espacio de cabeza entre 10 y 15 cm permitiendo así la presencia de aire (Castillo, 2012; Khavazi et al., 2007).

### **7.9 Maduración de los biofertilizantes**

Antes de iniciar el monitoreo de la sobrevivencia en las unidades experimentales, los biofertilizantes pasaron por un periodo de maduración, almacenándolos a temperatura (28 ± 2°C) durante 2 semanas (Castillo, 2012; Khavazi et al., 2007; Somasegaran & Hoben, 1985). Por lo que el primer monitoreo para evaluar la sobrevivencia de los microorganismos fue realizado a las dos semanas de su elaboración.

### **7.10 Evaluación de la sobrevivencia celular y caracterización fisicoquímica durante el almacenamiento de los biofertilizantes**

Las unidades experimentales almacenadas a temperatura ambiente (aproximadamente 28°C), fueron monitoreadas a los 0, 14, 30, 60, 90, 120 y 150 días después de su elaboración. La evaluación de la sobrevivencia se realizó por dilución seriada y cuenta en placa en el medio YEM (Fernandes et al., 2009; Khavazi et al., 2007; Lupwayi et al., 2000).

Así mismo a los biofertilizantes sólidos se les evaluó humedad y pH, empleando técnicas descritas en el apartado 7.7.

### **7.11 Diseño experimental**

Se evaluó la cepa *Sinorhizobium mexicanum* ITTG R7 a diferente edad de cultivo e inoculada sobre el soporte bagazo-perlita, por lo que se decidió utilizar un diseño factorial de 2x1 con dos repeticiones generando un total de 9 unidades experimentales por monitoreo

Todos los experimentos y determinaciones analíticas se realizaron por triplicado. El estadístico de prueba para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos se hizo mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido por un análisis de mínima diferencia significativa (LSD) de las pruebas. La diferencia se consideró estadísticamente significativa cuando  $P < 0.05$ , el programa para el análisis estadístico de los datos empleado será STATGRAPHICS Centurion XV.II.

### **7.12 Evaluación de la capacidad infectiva**

Las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) fueron inoculadas respectivamente con los biofertilizantes a diferentes periodos de almacenamiento, antes de la inoculación de las semillas con el biofertilizante, éstas fueron desinfectadas en base al protocolo citado por Castillo (2012), para la aplicación de los biofertilizantes sólidos fue necesario previamente aplicar goma arábica al 40% como adhesivo en una relación de 2.5 mL por cada 100 g de semilla (Daza et al., 2000; Somasegaran & Hoben, 1985), las semillas fueron inoculadas en una relación de 100 g de semillas (desinfectadas) con 8 g del inoculante (Somasegaran & Hoben, 1985), se sembraron tres semillas en macetas constituidas por vasos desechables de poliestireno #8 a una profundidad aproximada de 4 cm empleando como sustrato vermiculita marca SUNSHINE, la cual fue previamente esterilizada a 121 °C y 15 lb pulg<sup>-2</sup> por 15 min. Cuando en el vaso emergieron 3 plántulas una de ellas fue sacrificada para permitir un mayor crecimiento radicular quedando finalmente 2 plantas por maceta (Rincón, 2001), las plántulas se dejaron desarrollar por un periodo de 30 días en una

cámara bioclimática a 28 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 horas oscuridad (Chao & Alexander, 1984), las plántulas fueron regadas cada tercer día con solución nutritiva Fahraeus libre de nitrógeno; el volumen de riego fue establecido en función del 40% de la CRA de la vermiculita (Castillo, 2012; Rincón, 2001). Al concluir el periodo de crecimiento las plántulas fueron retiradas cuidadosamente de las macetas y se realizó el conteo de nódulos por planta de los cuales únicamente fueron considerados aquellos nódulos enteros, completos y de color café o rojos (Galiana et al., 1998), el número de nódulos por plantas representó la capacidad de infectividad del biofertilizante (Vincent, 1970).

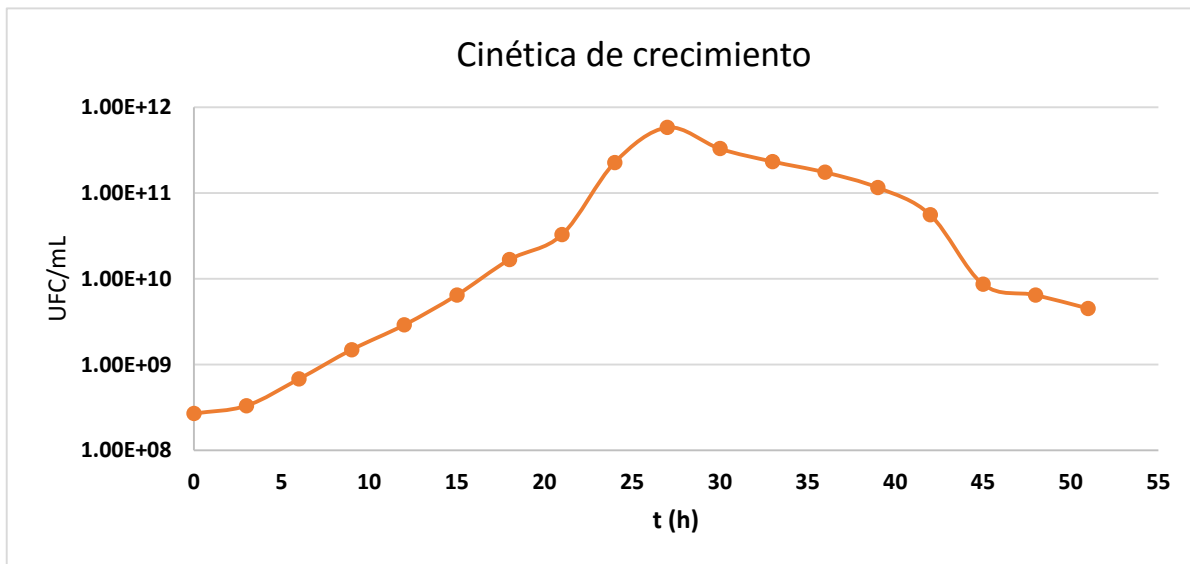
### **7.13 Evaluación de los parámetros morfométricos de *Phaseolus vulgaris* L.**

Se realizaron mediciones de parámetros morfométricos: clorofila, longitud y peso seco de la planta, número de hojas y diámetro de los tallos (Reyes et al., 2014). La clorofila fue medida con un clorofilómetro marca CHLOROPHYLL METER modelo SPAD-502. Para la longitud se empleó un flexómetro marca PRETUL modelo PRO-3MEC y para el peso una balanza RADWAG modelo AS220-C2 y para el diámetro de los tallos se empleó un vernier marca SURTEK modelo SRAINLESS HARDENED.

## 8. Resultados y Discusiones

### 8.1 Estandarización del inóculo

Se obtuvo la cinética de crecimiento de la cepa de interés ITTG R7 (Figura 8.1). La curva fue realizada durante 51 horas, en donde se consideró como inicio de fase exponencial a la hora 12 donde se encontró un valor de biomasa de  $1.02 \times 10^9$  ufc/mL, por otra parte el inicio de la fase estacionaria se tomó en el tiempo 25 h el cual representa un valor de  $2.1 \times 10^9$  ufc/mL



**Figura 8.1.** Crecimiento de la cepa *Sinorhizobium mexicanum* ITTG R7

Por otra lado es importante mencionar que la cepa alcanzó una alta densidad celular (alrededor de  $2 \times 10^9$  ufc/mL) al inicio de la fase estacionaria, lo cual representa una concentración superior a la mínima requerida para la producción de inoculantes rizobianos (Lupwayi, *et al.*, 2000).

Según Watson, *et al.*, (2011), los rizobios son organismos heterótrofos exigentes en minerales, fuentes de carbono y proteínas, por tal razón cabe mencionar que el medio de cultivo YEM empleado para el crecimiento de esta cepa fue de gran relevancia debido a

que representa una fuente importante de compuestos nitrogenados, fuentes de carbono, cofactores enzimáticos, vitaminas, aminoácidos y algunos minerales, lo cual permite suplir la deficiencia que puedan tener los rizobios en cuanto a la producción de este tipo de compuestos, los cuales pueden resultar esenciales para el crecimiento de la misma (Medigan *et al.*, 2002).

## 8.2 Característica físico química del Soporte

En la tabla 8.1 se muestran las características del soporte empleado en la elaboración de los biofertilizantes.

**Tabla 8.1.** Caracterización fisicoquímica del soporte empleado en la elaboración del biofertilizante.

Propiedades fisicoquímicas				
Soporte	pH	CRA g H <sub>2</sub> O/g b-p	Friabilidad (mL g <sup>-1</sup> )	Humedad
B-P	7.31	6.16	Máximo 2	48.74

Cabe mencionar que el valor de pH del B-P (7.31) es un valor muy deseable debido a que el crecimiento óptimo de los rizobios oscila entre 6 y 7 (Kuykendall *et al.*, 2005). Según Khavazi, *et al.*, (2007) un pH de 7.34 es reportado en este tipo de formulación B-P.

Por otro lado el valor de la capacidad de retención de agua (6.16 g H<sub>2</sub>O/g b-p) obtenido fue un valor bastante favorable, similar resultado fue reportado por Castillo (2012), al trabajar con la misma formulación de soporte, obteniendo un valor de (5.12 g H<sub>2</sub>O/g b-p), es importante mencionar que una alta capacidad de retención de agua favorece el metabolismo de los microorganismos que contiene el soporte, el cual a su vez está íntimamente ligado con la humedad del soporte. La capacidad de retención de agua que presentó la formulación bagazo perlita es alta y muy deseable, esto probablemente se

debe a que el CRA de bagazo de caña y perlita es de 2 y 4 (g H<sub>2</sub>O/g) (Khavazi, *et al.*, 2007), por lo cual en la formulación se explicaría la alta capacidad de retención de agua.

Observamos también que el valor máximo de la friabilidad es de 2 mL g<sup>-1</sup>, esto indica que el volumen máximo del líquido que es capaz de retener el B-P sin perder su característica de polvo es de 2 mL, valor que favorece al soporte debido a que se tiene la seguridad de que no se formaran aglomerados, según Somasegaran & Hoben (1985), los aglomerados disminuyen la cantidad de inoculante en la semilla, lo que repercute a un menor número de células fijadoras de nitrógeno y esto a limita la cantidad de nódulos formados en la radícula.

### 8.3 Evaluación de la sobrevivencia celular durante el almacenamiento del biofertilizante

La sobrevivencia alcanzada por la cepa al ser utilizada en diferentes edades del cultivo en el soporte B-P se presentan en la tabla 8.2 y 8.3, determinados durante 120 días de almacenamiento del biofertilizante a temperatura ambiente (28°C ±1).

**Tabla 8.2.** Viabilidad de *S. mexicanum* inoculado en B-P/Fase log

Días de almacenamiento	Viabilidad ufc/g
0	9.11E+08 <sup>a</sup>
14	2.33E+09 <sup>a</sup>
30	2.86E+09 <sup>a</sup>
60	5.64E+10 <sup>d</sup>
90	4.15E+10 <sup>c</sup>
120	2.45E+10 <sup>b</sup>

\*Medias con las mismas letras, son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de LSD ( $p \leq 0.05$ )

En la tabla 8.2, se observa que la población inicial de rizobios inoculados en fase logarítmica presente en los biofertilizantes fue de  $9.11 \times 10^8$  ufc/g de B-P, al evaluar la población a través del tiempo se observó un ascenso de densidad celular de la cepa *S. mexicanum*, donde la población microbiana de rizobios tuvo una tendencia a incrementar en su crecimiento durante los primeros 60 días evaluados en el soporte B-P.

Cabe destacar que entre los 90 y 120 días de almacenamiento de los biofertilizantes, la población microbiana presenta un descenso paulatino el cual expone un valor de  $2.45 \times 10^{10}$  ufc/g de B-P a los 120 días de su almacenamiento, a pesar que se presenta diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ), se mantiene el estándar de calidad que requiere un inoculante rizobiano ( $> 2 \times 10^9$  ufc/g) (Rebah *et al.*, 2007).

**Tabla 8.3.** Viabilidad de *S. mexicanum* inoculado en B-P/ fase Estacionaria

Días de almacenamiento	Viabilidad ufc/g
0	1.91E+09 <sup>a</sup>
14	2.80E+09 <sup>a</sup>
30	3.08E+09 <sup>a</sup>
60	2.86E+10 <sup>c</sup>
90	3.12E+10 <sup>c</sup>
120	1.42E+10 <sup>b</sup>

**\*Medias con las mismas letras, son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de LSD ( $p \leq 0.05$ )**

En la tabla 8.3 se observa que la población inicial de *S. mexicanum* en fase estacionaria presente en los biofertilizantes fue de  $1.91 \times 10^9$  ufc/g de B-P, de igual manera podemos observar un aumento de la densidad celular durante el almacenamiento, Según la prueba de comparación de muestras múltiples de Tukey con 95% de confianza, existe diferencia estadística significativa en el aumento del crecimiento celular a partir de los 60 días de almacenamiento, este resultado es favorable ya que a los 120 días de almacenamiento el crecimiento celular refleja un valor de  $1.42 \times 10^{10}$  ufc/g de B-P, dicho valor está por encima de las concentraciones mínimas requeridas ( $> 2 \times 10^9$  ufc/g) (Rebah *et al.*, 2007).



En general observamos que la cepa *S. mexicanum* inoculada en los soportes Bagazo de caña-Perlita en ambas edades del cultivo (fase logarítmica y fase estacionaria) presentan un incremento en la densidad celular durante su almacenamiento, esto se puede deber a varios factores relevantes, tales como la alta capacidad de retención de agua, alto contenido de nutrientes y el contenido de materia orgánica que sirve como fuente de carbono y aminoácidos para el metabolismo de los rizobios (Khavazi et al., 2007). Cabe mencionar que los factores mencionados son características básica que un buen soporte debe mantener (Smith, 2000).

Es importante mencionar el método de esterilización aplicado en los soportes de bagazo de caña- perlita fue otro factor de gran importancia ya que mantuvo al soporte libre de contaminantes, Según Heijnen *et al.*, (1993), un buen acarreador tiene como finalidad mantener la viabilidad de los microorganismos, y para que esto sea posible es importante mantener al soporte libre de organismos contaminantes.

Por otra parte es importante mencionar que la viabilidad de la cepa en el soporte bagazo de caña- perlita se mantuvo a una temperatura de  $28^{\circ}\text{C}\pm 1$ , temperatura que contribuyó a mantener el crecimiento de los rizobios (Kuykendall *et al.*, 2005).

A continuación se muestra la caracterización Físicoquímica (tabla 8.4 y 8.5) del soporte B-P, en ambas edades del cultivo (logarítmica y estacionaria) de la cepa *S. mexicanum* durante su almacenamiento.

**Tabla 8.4.** Monitoreo Físicoquímico del soporte B-P inoculado con *S. mexicanum* en fase Logarítmica

Almacenamiento (días)	pH	CRA	Humedad
0	7.43 <sup>a</sup>	6.31 <sup>a</sup>	65.60 <sup>a</sup>
14	7.39 <sup>a</sup>	6.27 <sup>ab</sup>	65.39 <sup>a</sup>
30	7.37 <sup>a</sup>	6.31 <sup>a</sup>	65.34 <sup>a</sup>
60	7.38 <sup>a</sup>	6.28 <sup>a</sup>	64.56 <sup>a</sup>
90	7.24 <sup>b</sup>	6.23 <sup>b</sup>	64.73 <sup>a</sup>
120	7.06 <sup>c</sup>	6.15 <sup>c</sup>	60.76 <sup>b</sup>

\*Medias con las mismas letras, son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de LSD ( $p\leq 0.05$ )

En el monitoreo fisicoquímico del soporte B-P inoculado con *S. mexicanum* en fase logarítmica (tabla 8.4), observamos que en los tres primeros monitoreos (días 0, 14 y 30) de la determinación de los parámetros fisicoquímicos se nota un paulatino descenso de tales valores mas no hubo diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ), sin embargo, para monitoreos posteriores (días 60,90 y 120) se presentó diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla 8.5.** Monitoreo Fisicoquímico del soporte B-P inoculado con *S. mexicanum* en fase Estacionaria

Almacenamiento (días)	pH	CRA	Humedad
0	7.48 <sup>a</sup>	6.32 <sup>a</sup>	66.28 <sup>ab</sup>
14	7.39 <sup>b</sup>	6.27 <sup>ab</sup>	66.96 <sup>a</sup>
30	7.32 <sup>c</sup>	6.31 <sup>a</sup>	65.95 <sup>ab</sup>
60	7.29 <sup>c</sup>	6.22 <sup>b</sup>	64.836 <sup>b</sup>
90	7.09 <sup>d</sup>	6.23 <sup>b</sup>	64.96 <sup>b</sup>
120	7.16 <sup>e</sup>	6.15 <sup>c</sup>	61.56 <sup>c</sup>

**\*Medias con las mismas letras, son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de LSD ( $p \leq 0.05$ )**

Por otra parte el monitoreo del soporte B-P inoculado con *S. mexicanum* en fase estacionaria (tabla 8.5), de igual manera podemos observar que con el paso del tiempo y almacenamiento de los soportes B-P, los valores de los parámetros fisicoquímicos van disminuyendo, Según la prueba de comparación de muestras multiples de Tukey con 95% de confianza, existe diferencia estadística significativa en la disminución de los valores de pH, CRA y humedad.

En general podemos observar que en ambos soportes inoculados a diferente edad de cultivo (tabla 8.4 y 8.5) se presenta una disminución paulatina de pH, CRA y humedad con respecto a su valor inicial, pero no causa amenaza alguna en la viabilidad de la cepa puesto que a los 90 días no se pierde más del 5 % de su valor inicial y esto como consecuencia mantenga las condiciones favorables para que la cepa se mantenga viable.

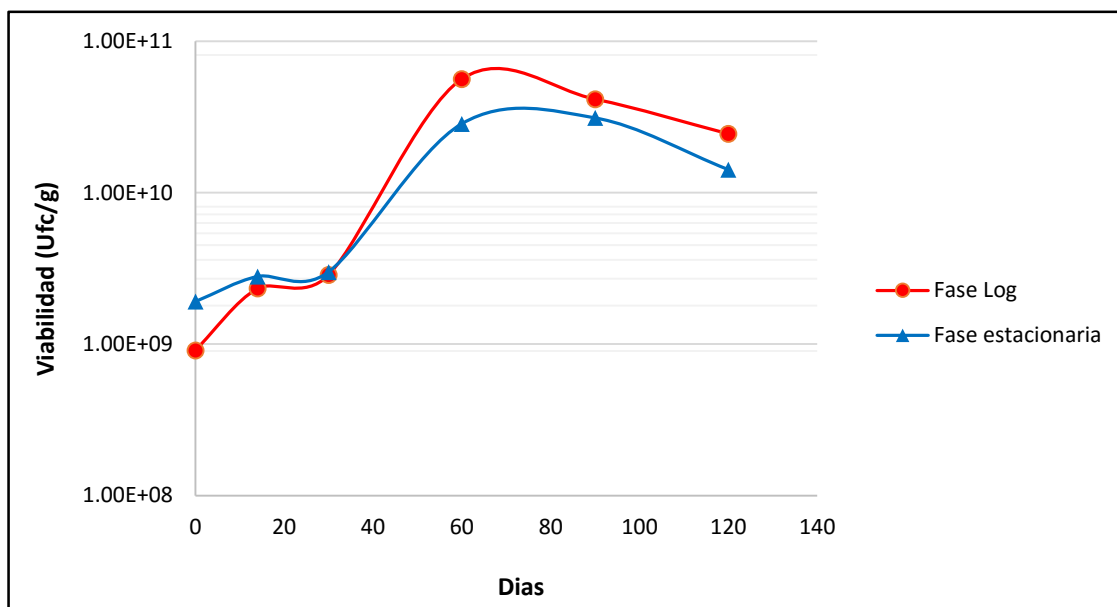
Con respecto al pH aunque se haya presentado diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ), esto no generó ningún efecto en la sobrevivencia de la cepa, debido a que el pH del soporte B-P oscila en un rango cercano al pH neutro (6-7) (Kuykendall *et al.*, 2005).

Por otro lado, Castillo (2012) reporta que la CRA (capacidad de retención de agua) con la que el trabajó en su investigación usando como acarreador a B-P, presentó un valor de 5.125 g H<sub>2</sub>O/g B-P. En esta investigación se trabajó con un CRA por arriba de 6 g H<sub>2</sub>O/g B-P lo que representa una alta capacidad de retención de agua lo cual implica un adecuado incremento en la actividad de agua que protege a la célula, si el soporte no puede conservar esta propiedad seguramente la sobrevivencia de los rizobios se verá comprometida (Somasegaran & hoben, 1985).

Otro factor importante que se mantuvo en el soporte fue la humedad ya que al igual que la CRA, la humedad mantiene un ambiente favorable entre las partículas del soporte y microorganismo en cuestión. Cabe destacar que la humedad que presentaron los soportes de B-P se mantuvo en un rango de entre 64 a 66 %, por lo que la humedad no varió mucho y se mantuvo, probablemente esto se deba gracias al tamaño de partícula con el que se trabajó el soporte B-P (0.149 mm) puesto que entre menor sea el tamaño de partícula los microorganismos tendrán mayor área de contacto con las partículas del soporte, lo que les confiere una mayor resistencia a la desecación debido al incremento de la cobertura celular ( Dadurand *et al.*, 1994).

Finalmente podemos decir que la evaluación fisicoquímica del soporte B-P, mantuvo durante el almacenamiento características de gran relevancia debido a que estas características determinadas pueden explicar la estabilidad y crecimiento de los microorganismo en el soporte B-P.

Con la finalidad de evidenciar el comportamiento de la sobrevivencia celular de la cepa *Sinorhizobium mexicanum* inoculada en ambos estados fisiológicos (logarítmica y estacionaria) sobre el soporte B-P, en la figura 8.2 se puede observar el comportamiento de la cepa a lo largo del almacenamiento.



**Figura 8.2.** Viabilidad de la cepa *Sinorhizobium mexicanum* ITTG R7 en Bagazo-perlita

Como podemos observar en la figura 8.2, en ambas fases del estado fisiológico de la cepa se presenta un incremento exponencial durante los 30 y 60 días de almacenamiento, esto se debe probablemente a que en la formulación del soporte B-P se adicionó medio YEM previo a la inoculación de los microorganismos, según Barnes y Moore (1997) mencionan que la adición de nutrientes al soporte incrementa la supervivencia de los microorganismos durante el proceso de almacenamiento. Al disminuir dicha concentración de nutrientes (90 -120 días) observamos que la concentración celular empieza a disminuir; Sin embargo ambas graficas muestran que a los 120 días de almacenamiento los biofertilizantes contienen concentraciones entre  $1.42 \times 10^{10}$  y  $2.45 \times 10^{10}$ , concentraciones muy superiores a lo mínimo requerido ( $> 2 \times 10^9$  ufc/g) (Rebah et al., 2007), por lo que desde este punto de vista los biofertilizantes cumplen con dicho parámetro de calidad.

Se puede observar claramente que la cepa inoculada en fase log sobre el soporte B-P presenta un mayor crecimiento en comparación a la cepa sembrada en fase estacionaria, esto se debe principalmente a las características que presenta fase del crecimiento del cultivo bacteriano (Mc Meekin y Ross, 2002).

La cepa *S. mexicanum* que fue inoculada en fase logarítmica sobre el soporte B-P presentó mayor sobrevivencia debido a que los microorganismos en esta fase seguían creciendo dividiéndose hasta el nivel máximo posible en función de su potencial genético, tipo de medio y las condiciones en la que crecía ( Madigan et al., 1997).

Por otra parte la cepa *S. mexicanum* que se encontraba en fase estacionaria, presenta un agotamiento de los nutrientes disponibles que se encontraban en el medio YEM, como consecuencia se presenta una disminución en la velocidad de crecimiento (Madigan et al., 1997), lo cual hacía más difícil adaptarse al soporte (ambiente) en el que se inoculó.

A pesar de los comportamientos de viabilidad durante todo el tiempo de almacenamiento las unidades experimentales contenían concentraciones superiores a  $2 \times 10^9$  Ufc/g, lo cual asegura la calidad del biofertilizante.

#### **8.4 Capacidad infectiva de los inoculantes**

En las tablas 8.6 y 8.7 se presentan los resultados de la capacidad infectiva (nódulo/planta) y la cantidad de clorofila presentada en las hojas de *P. Vulgaris* en relación al biofertilizante empleado, durante 120 días de su almacenamiento. El periodo de crecimiento de las plántulas fue de 30 días, por lo que las plantas apenas estaban iniciando el estado fenológico de floración, y la efectividad simbiótica se determinó indirectamente midiendo los parámetros morfométricos (tablas 8.8 y 8.9).

**Tabla 8.6.** Capacidad infectiva y contenido de clorofila en *P. vulgaris* biofertilizado con B-P/Fase log

Tiempo de almacenamiento (Días)	No. de nódulos	Clorofila (SPAD)
30	28 <sup>a</sup>	36 <sup>ab</sup>
60	41 <sup>c</sup>	37 <sup>b</sup>
90	33 <sup>ab</sup>	34 <sup>a</sup>
120	37 <sup>bc</sup>	36 <sup>ab</sup>

\*Medias con las mismas letras, son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de LSD ( $p \leq 0.05$ )

En la tabla 8.6, podemos observar que *P. vulgaris* biofertilizada con la cepa en fase logarítmica presenta diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ), en cuanto a la formación de nódulos durante el periodo de almacenamiento, por otro lado la cantidad de clorofila aunque existe leve diferencia de cantidad no existe diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabla 8.7.** Capacidad infectiva y contenido de clorofila en *P. vulgaris* biofertilizado con B-P/Fase estacionaria

Tiempo de almacenamiento (Días)	No. de nódulos	Clorofila (SPAD)
30	20 <sup>a</sup>	34.67 <sup>a</sup>
60	31 <sup>bc</sup>	35.80 <sup>a</sup>
90	28 <sup>b</sup>	33.68 <sup>a</sup>
120	34 <sup>c</sup>	35.43 <sup>a</sup>

\*Medias con las mismas letras, son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de LSD ( $p \leq 0.05$ )

En base a la capacidad infectiva del biofertilizante B-P/Fase estacionaria sobre *P. vulgaris* (tabla 8.7) se puede observar que existe diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) en cuanto a la formación de nódulos/planta, en cambio en el contenido de clorofila no existe diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ).

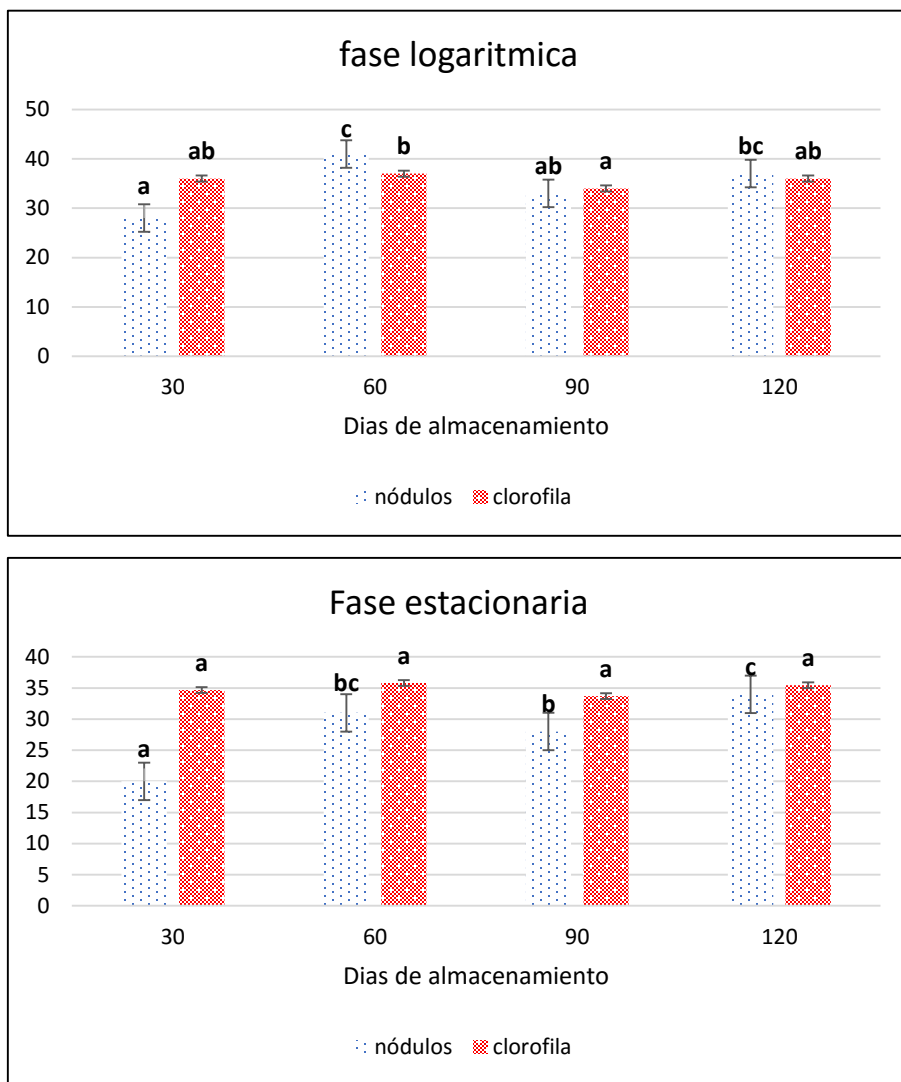
En general se observa que ninguno de los biofertilizantes inoculados con diferente estado fisiológico de la cepa (logarítmica y estacionaria) perdió su capacidad infectividad durante los 120 días de almacenamiento, sin embargo, es importante observar que *P. vulgaris* presentó un incremento en el conteo de nódulos por planta al ser esta biofertilizada con biofertilizantes almacenadas entre los 60 y 120 días.

El mayor conteo de nódulos (41 nódulos /planta) se observó en las plántulas biofertilizadas con B-P /fase log almacenado durante 60 días (Figura 8.3), esto se debe principalmente a que la concentración de rizobios a los 60 días presentó una concentración de  $5.64 \times 10^{10}$  ufc/ g en B-P/ Fase log, un aspecto muy importante en la nodulación es el número de rizobios por gramo con el cual se biofertilizan las semillas ( Drevon *et al.*, 2001 ; Ballard *et al.*, 2004). En cuanto al biofertilizante B-P/ Fase estacionaria a los 60 días de almacenamiento se generó un menor número de nódulos (31 nódulos/planta) (figura 8.3), por lo que se observa que existe una diferencia importante entre los nódulos formados debido al estado fisiológico en la cual se encontraba la cepa. Bhuvaneswari, *et. al.* (1983), demostró que existe una diferencia importante en el estado fisiológico con respecto a diferentes cepas de *Bradyrhizobium* en cuanto a la infectividad, ya que algunas incrementaban su capacidad infectiva en la fase de crecimiento logarítmica, otras en la fase estacionaria o de muerte.

Es importante mencionar que la formación de nódulos por planta disminuye entre los 90 y 120 días de almacenamiento en ambos estados fisiológicos de la cepa, sin embargo, no existe diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ), La reducción de nódulos se explica por el declive en la viabilidad celular de dicha cepa en el soporte. Entonces se observa la concentración celular en los biofertilizantes está ligado íntimamente en el efecto de números de nódulos formados por plantas.

Por otra parte Castillo (2012) ha reportado que la nodulación de *P. vulgaris* biofertilizada con un acarreador sólido a base de Bagazo de caña -perlita a 120 días de almacenamiento, se presenta un valor de 15 nódulos por planta estudiados a 30 días después de la siembra, sin embargo en nuestro estudio observamos que se tuvo más de

30 nódulos por planta, este resultado interesante probablemente se deba al estado fisiológico de la cepa y su biomasa en el que se encontraba *S. mexicanum* en nuestro estudio.



**Figura 8.3.** Nódulos por planta y análisis de clorofila en *P. vulgaris* en relación al soporte B-P. Medias con la misma letra, son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de LSD ( $p \leq 0.05$ ).



De la figura 8.3 podemos observar que existe una relación en cuanto al número de nódulos con respecto a la cantidad de clorofila, esto se debe a que en las semillas biofertilizadas se presentó la fijación de nitrógeno lo cual se ve evidenciado en la cantidad de clorofila, en este sentido el nitrógeno forma parte de la estructura de la clorofila. Por lo tanto se ve afectada, en alguna medida la disponibilidad de nitrógeno, se verá afectada el contenido de clorofila (Villalobos, 2001)

A continuación se muestra la evaluación de los parámetros morfométricos (tabla 8.8) de *P. vulgaris* biofertilizada con el soporte B-P en ambas fases de estado fisiológico de la cepa.

**Tabla 8.8.** Parámetros morfométricos de *P. vulgaris* biofertilizado con B-P/Fase logarítmica

Almacenamiento (días)	Altura (cm)	Diámetro tallo (mm)	No. hojas
30	14.63 <sup>b</sup>	2.23 <sup>a</sup>	15 <sup>b</sup>
60	17.28 <sup>c</sup>	2.17 <sup>a</sup>	16 <sup>b</sup>
90	9.77 <sup>a</sup>	2.13 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
120	15.78 <sup>bc</sup>	2.20 <sup>a</sup>	16 <sup>b</sup>
Control	6.38	1.79	10

\*Medias con las mismas letras, son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de LSD ( $p \leq 0.05$ )

Según la prueba de comparación de muestras múltiples de Tukey con 95% de confianza, existe diferencia estadística significativa con respecto a la medición de los parámetros morfométricos determinados en *P. vulgaris* biofertilizada con el soporte B-P en fase logarítmica, entre los 60 y 120 días de almacenamiento se presentó la mejor medición de los parámetros (altura de planta, diámetro de tallo y No. hojas).

**Tabla 8.9.**Parámetros morfométricos de *P. vulgaris* biofertilizado con B-P/Fase Estacionaria

Almacenamiento (días)	Altura (cm)	Diámetro tallo (mm)	No. hojas
30	11.22 <sup>a</sup>	2.19 <sup>a</sup>	15 <sup>b</sup>
60	15.07 <sup>b</sup>	2.13 <sup>a</sup>	15 <sup>b</sup>
90	10.25 <sup>a</sup>	2.25 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>
120	14.61 <sup>b</sup>	2.22 <sup>a</sup>	14 <sup>b</sup>
Control	6.38	1.79	10

\*Medias con las mismas letras, son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de LSD ( $p \leq 0.05$ )

Los parámetros morfométricos determinados en *P. vulgaris* biofertilizada con el soporte B-P en fase estacionaria, presentan diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a la medición de los parámetros morfométricos, al igual que la biofertilización en la fase logarítmica, se encuentra que entre los 60 y 120 días en la biofertilización de plántulas en fase estacionaria se presentó la mejor medición de los parámetros (altura de planta, diámetro de tallo y No. hojas).

Cabe mencionar que las plántulas inoculadas con los biofertilizantes a 90 días de almacenamiento para ambos estados fisiológicos se observa que no se encuentra una influencia de resultados de medición de parámetros morfométricos a comparación de la medición a los 60 y 120 días, esto probablemente indique que no todos los nódulos (90 días) fijaron nitrógeno, según Popp & Ott (2011) no todos los nódulos presentes en las leguminosas tienen actividad fijadora de  $N_2$ , esto se debe principalmente al crecimiento y la organización histológica de las células dentro del nódulo y por ende algunos nódulos son determinados (fijan  $N_2$ ) y otros nódulos son indeterminados (No tienen la suficiente capacidad de fijar  $N_2$ ).

A continuación en la tabla 8.10 se muestra el análisis estadístico en cuanto a la comparación del número de nódulos y clorofila en *P. vulgaris* biofertilizada en ambos estados fisiológicos de la cepa *S. mexicanum*.

**Tabla 8.10.** Capacidad infectiva y contenido de clorofila en *P. vulgaris* biofertilizada con B-P en ambos estados fisiológicos de *S. mexicanum*

Días	No. de nódulos	Clorofila (SPAD)
30 fase log	20 <sup>a</sup>	36 <sup>a</sup>
30 fase estacionaria	28 <sup>b</sup>	34.67 <sup>a</sup>
60 fase log	31 <sup>a</sup>	37 <sup>a</sup>
60 fase estacionaria	41 <sup>b</sup>	35.80 <sup>a</sup>
90 fase log	33 <sup>a</sup>	34 <sup>a</sup>
90 fase estacionaria	28 <sup>a</sup>	33.68 <sup>a</sup>
120 fase log	34 <sup>a</sup>	36 <sup>a</sup>
120 fase estacionaria	37 <sup>a</sup>	35.43 <sup>a</sup>

**\*Medias con las mismas letras, son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de LSD ( $p \leq 0.05$ )**

Según la prueba de comparación de muestras múltiples de Tukey con 95% de confianza, existe diferencia estadística significativa con respecto a la formación de nódulos entre fases a los 30 y 60 días de almacenamiento de los acarreadores sólidos, esto probablemente se deba al estado fisiológico de crecimiento de la bacteria, sin embargo en la tabla 8.10 observamos que no se observa diferencia estadística significativa con respecto a la clorofila en ninguno de los monitoreos realizados.

En la tabla 8.11 se muestra el análisis estadístico de los parámetros morfométricos de *P. vulgaris* biofertilizada en ambas fases de estado fisiológico de *S. mexicanum*.

**Tabla 8.11.** Parámetros morfométricos de *P. vulgaris* biofertilizados con *S. mexicanum* en ambas edades de estado fisiológico.

(Días)	Altura (cm)	Diámetro tallo (mm)	No. hojas
30 fase log	14.63 <sup>b</sup>	2.23 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>
30 fase estacionaria	11.22 <sup>a</sup>	2.19 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>
60 fase log	17.28 <sup>b</sup>	2.17 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>
60 fase estacionaria	15.07 <sup>a</sup>	2.13 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>
90 fase log	9.77 <sup>a</sup>	2.13 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
90 fase estacionaria	10.25 <sup>a</sup>	2.25 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>
120 fase log	15.78 <sup>b</sup>	2.20 <sup>a</sup>	16 <sup>b</sup>
120 fase estacionaria	14.61 <sup>a</sup>	2.22 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>
Control	6.38	1.79	10

\*Medias con las mismas letras, son estadísticamente iguales, de acuerdo a la prueba de LSD ( $p \leq 0.05$ )

Según la prueba de comparación de muestras múltiples de Tukey con 95% de confianza, no existe diferencia estadística significativa en su totalidad con respecto a la medición de parámetros morfométricos entre fases realizados a *P. vulgaris*

De manera general podemos observar que las plantas que fueron biofertilizadas con B-P en ambos estados fisiológicos con la cepa *S. mexicanum* presentan una mayor altura (cm), mayor diámetro del tallo (mm) y mayor número de hojas que las plantas que no fueron biofertilizadas (control) las cuales no presentan una influencia en el valor de la medición de parámetros morfométricos. En este sentido se puede apreciar la efectividad que presenta *S. mexicanum* en cuanto a la mejora del crecimiento de las plántulas de *P. vulgaris*. El comportamiento anterior evidencia una actividad simbiótica activa, puesto que indica que los nódulos encontrados en las plantas se encontraban activos, en este sentido se atribuye que *S. mexicanum* aportó  $N_2$  en forma de amonio a *P. vulgaris* (Lodwig y Poole, 2003). Según, Stewart y Porter (1969) el nitrógeno es un elemento esencial requerido para un crecimiento vigoroso de las plantas debido a que el nitrógeno en parte de muchos compuesto de las plantas tales como los aminoácidos, amidas, proteínas y alcaloides.

## 9. Conclusiones

1. El soporte sólido a base de Bagazo de caña-Perlita permitió el desarrollo y estabilidad de crecimiento celular de *Sinorhizobium mexicanum* ITTG-R7 en ambas fases de su estado fisiológico (logarítmica y estacionaria) a concentraciones satisfactorias superiores a la requeridas por los inoculantes rizobianos ( $2 \times 10^9$  ufc/g) durante 120 días de almacenamiento a temperatura ambiente.
2. La evaluación de los parámetros fisicoquímicos del soporte Bagazo de caña-Perlita, presentó una disminución paulatina de pH, CRA y humedad con respecto a su valor inicial, pero no causó efecto alguno en la viabilidad de la cepa puesto que a los 120 días no se pierde más del 5 % de su valor inicial y esto como consecuencia mantiene las condiciones favorables para que *Sinorhizobium mexicanum* se mantenga viable.
3. Los nódulos formados en las raíces de *Phaseolus vulgaris* L. biofertilizadas en ambas fases de su estado fisiológico de la cepa *S. mexicanum* , fueron más atractivos con respecto al número de nódulos/planta cuando éstas fueron biofertilizadas después de los 60 días de almacenamiento del soporte sólido Bagazo de caña-Perlita, encontrándose más de 30 nódulos por planta , en este mismo sentido se obtuvieron parámetros morfométricos de las plantas más altos cuando estas habían sido biofertilizadas con el soportes sólidos B-P después de 60 días de su almacenamiento.

## 10. Fuentes de información

Abela, J.E. y Valenzuela, R. 2007. Situación de los Cultivos Leguminosos y los Biofertilizantes en Bolivia. In: Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial. Izaguirre-Mayoral, M.L. Labandera, C. y Sanjuan, J. (eds). Denad Internacional, S.A. Montevideo, Uruguay.

Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Camacho, M. and Temprano, F.J. 2008. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. *Soil Biol. Biochem.* 40:2771-2779.

Amer, G.A. and Utkhede, R.S. 2000. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Can. J. Microbiol.* 46:809-816.

Barnes, S. and Moore, D. 1997. The effect of fatty, organic, or phenolic acids on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride*. *Mycol. Res.* 10:662-666.

Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16:729-770.

Bashan, Y., de Bashan, L.E., Hernández, J.P., Puente, M.E., Bacilio, M. and Leyva, L.A. 2007. Inoculantes microbianos sintéticos: ¿son el futuro?. In: La Biofertilización como Tecnología Sostenible. Díaz-Franco, A. y Mayek-Pérez, N. (eds). Plaza y Valdés. México.

Bashan, Y., Hernandez, J.P., Leyva, L.A. and Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth promoting bacteria.

Benbrook, C. World Food System Challenges and Opportunities: GMOs, Biodiversity, and lessons from Americas Heartland. In; World Food System Challenges and Opportunities. <http://www.pmac.net/IWFS.pdf>, 1999.

Bhuvaneswari T V., Turgeon BG & Bauer W. D. (1980) Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr.) by *Rhizobium japonicum* I. Localization of infective root cells. *Plant Physiol.* 66: 1027– 1031.

Bhuvaneswari, T. V, Mills, K. K., Crist, D. K., Evans, W. R., & Bauer, W. D. (1983). Effects of culture age on symbiotic infectivity of *Rhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 153, 443–451. *Biotechnol* **91**, 257-268.

Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:343350.

Bonilla, R; Novo, R; Venegas, N; Givis, A; Martínez, M.; Parra D; Vanegas, O. (2000). Generación de tecnologías para la utilización de fijación no simbiótica de nitrógeno como alternativa de fertilización. *Corpoica – Regional 3.* 40p.

Boogerd F. & Van Rossum D (1997) Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiol Rev.* 21: 5–27.

Brencic A & Winans S (2005) Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69: 155–194.

Broughton JW, Jabbour S & Perret X (2000) MINIREVIEW Keys to Symbiotic Harmony. *Journal of bacteriology* 182: 5641–5652.

Caesar, A.J. and Burr, T.J. 1991. Effect of conditioning, betaine and sucrose on survival of rhizobacteria in powder formulations. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:168-172.

Castillo Suárez, L. A. (2012). Producción de biofertilizantes empleando bacterias rizobianas diazótroficas nativas del estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México: Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

Chao, W.-L., & Alexander, M. (1984). Mineral soils as carriers for Rhizobium inoculants. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(1), 94–97.

Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario. 2000. Norma Oficial Mexicana NOM-182-SSA1-1998, Etiquetado de Nutrientes Vegetales. [www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/182ssa18.html](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/182ssa18.html)

Croes C, Moens S, Bastelare J, Vanderlayen J & Michael J (1993) The polar flagellum mediates Azospirillum brasilense adsorption to wheat roots. *Journal of General Microbiology*.

Curá, J.A., Rinaudo, C.M., Gaetano, A.M. y Ghiglione, H. 2005. Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en cultivo de arroz durante las primeras etapas del desarrollo. *Rev. Foro Arroceros Lat.* 11:10-13.

Dandurand, L.M., Morra, M.J., Chaverra, M.H. and Orser, C.S. 1994. Survival of *Pseudomonas* spp in air dried mineral powders. *Soil. Biol. Biochem.* 26: 1423-1430.

Davis, L. C. (1984). Diffusion of Gases through Plant Tissues '. *Plant Physiol*, 76, 854–857.

Daza, A., Santamaria, C., Rodriguez-Navarro, D. N., Camacho, M., Orive, R., & Temprano, F. (2000). Perlite as a carrier for bacterial inoculants. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(4), 567–572.

Dazzo FB & Hubbell DH (1975) Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the Rhizobium-clover association. *Appl Microbiol.* 30(6): 1017–1033.

Delgado-Salinas, A. La historia natural del frijol (*Phaseolus*). 7-17. En: *El Frijol – Un Regalo de México al Mundo*. Fundación Herdez. México D.F, México. 2012:108.



Díaz-Vargas, P., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suárez, J.J. y Alcántar González, G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra* 19: 227-235.

Dibut, A.B. y Martínez, VR. 2004. Biofertilizantes y Bioestimuladores. Métodos de inoculación. In: Manual sobre Agricultura Orgánica Sostenible. FAO.

Downie J (2005) Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol.* 15(6): 196–198.

Drevon, J. J., Abdelly, C., Amarger, N., Aouani, E. A., Aurag, J., Gherbi, H., Jebara, M., Lluch, C., Payre, H., Schump, O., Soussi, M., Sifi, B. y Trabelsi., M. (2001). An interdisciplinary research strategy to improve symbiotic nitrogen fixation and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in salinised areas of the Mediterranean basin. *J*

Estrada Bonilla, G. A. (2008). Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: efectos sobre la humedad y el pH del producto. Bogotá: Tesis: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias en la carrera de microbiología industrial.

Fabra A, Taurian T & Angelini J (2007) Los Rizobios: Taxonomía, Actividad Promotora del Crecimiento Vegetal y Mecanismos de infección en leguminosas. De la biología del Suelos a la Agricultura, (Thuar, A, Cassan, F, & Olmedo, C, eds), pp. 81– 93.

Fages, J. 1992. An industrial view of Azospirillum inoculants: formulation and application technology. *Symbiosis* 13:15-26.

Fernandes Júnior, P. I., Rohr, T. G., De Oliveira, P. J., Xavier, G. R., & Rumjanek, N. G. (2009). Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Vol. 44, 1184–1190.

Ferreira, M.E. and Castro, V.I. 2005. Residues of the cork industry as carriers for the production of legume inoculants. *Silva Lusitana* 13:159-167.

Franco, A. y Dobereiner, J. 1994. La biología y sustentabilidad de suelos agrícolas. *Summa Phytopathologica*. 20: 68 -74.

Gage DJ (2004) Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. 68: 280–300.

Gaind, S. and Gaur, A.C. 2004. Evaluation of fly ash as a carrier for diazotrophs and phosphobacteria. *Bioresource Technol*. 95:187-190.

Germida, J.J. and Walley, F.L. 1996. Plant growth-promoting rhizobacteria alter rooting patterns and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of fieldgrown spring wheat. *Biol. Fertil. Soils* 23:113-120.

Gibson A & Harper J. (1985) Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci*. 25: 497–501.

Graham, P H. y Rosas, J.C. 1977. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. *J. Agric. Sci. Camb.* 88 :503-508.

Graham, W. L., Bennett, M. L., & Paau, A. S. (1987). Production of bacterial inoculants by direct fermentation on nutrient-supplemented vermiculite. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 53, 2138–2141.

Halbleib CM & Ludden PW (2000) *Recent Advances in Nutritional Sciences*. 1081 – 1084.

Heijnen, C.E., Hok-A-Hin, C.H. and Van Elsas, J.D. 1993. Root colonization by *Pseudomonas* introduced into bentonite amended soil. *Soil Biol. Biochem*. 25:239-246.

Hernández, D.M. y Charlloux, M.L. 2001. La nutrición mineral y biofertilización en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Temas Ciencia Technol*. 5:11-27.

Hungxia, M. y Neves M.C.P. 1987. cultivar and Rhizobium strain effect on nitrogen fixation and transpon in Phaseolus vulgaris L. Plant soil 103:111-121.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias 2012. *Manejo del biofertilizante*. In: Aguado-Santacruz, G.A. (ed). *Introducción al Uso y Manejo de los Biofertilizantes en la Agricultura*. INIFAP/SAGARPA. México, pp. (130-142).

Ivanova, E., Teunou, E. and Poncelet, D. 2005. Alginate based macrocapsules as inoculants carriers for production of nitrogen fixing biofertilizers. In: Proceedings of the Balkan Scientific Conference of Biology. Gruev, B., Nikolova, M. and Donev, A. (eds). Plovdiv, Bulgaria.

Jayaraj, J., Parthasarathi, T. and Radhakrishnan, N.V. 2007. Characterization of a Pseudomonas fluorescens strain from tomato rhizosphere and its use for integrated management of tomato damping-off. BioControl 52:683-702.

Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME & Walker GC (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. Nature reviews. Microbiology 5: 619–633.

Justic, D., Rabalais, N.N., Turner, R.E., Dortch, Q. 1995. Changes in nutrient structure of river-dominated coastal waters: Stoichiometric nutrient balance and its consequences. Estuarine Coastal Shelf Sci. 40:339–356.

Khavazi, K., Rejali, F., Seguin, P. and Miransari, M. 2007. Effects of carrier, sterilisation method, and incubation on survival of Bradyrhizobium japonicum in soybean (Glycine max L.) inoculants. Enzyme Microb. Tech. 41:780-784.

Kundu S, 3rd Trent JT & Hargrove MS (2003) Plants, humans and hemoglobins. Trends. Plant. Sci. 8: 387–393.

Kuykendall, D. 2005. Bradyrhizobium. Jordan, 1982, 137VP. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Editorial Springer US. p. 325-340

Lloret, L., & Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de Rhizobium. Revista Latinoamericana de Microbiología, 47, 43–60.

Lloret, L., Ormeño-Orrillo, E., Rincón, R., Martínez-Romero, J., Rogel-Hernández, M. A., & Martínez-Romero, E. (2007). Ensifer mexicanus sp. nov. a new species nodulating Acacia angustissima (Mill.) Kuntze in Mexico. Systematic and Applied Microbiology, 30(4), 280–90. doi:10.1016/j.syapm.2006.12.002

Lodeiro A. R., Lopez-Garcia SL, Vazquez T & Favelukes G (2000) Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of bradyrhizobium japonicum by its pretreatment with soybean seed lectin". FEMS microbiology letters 191: 157–158.

Lodwig, E. y Poole, P. (2003). Metabolism of Rhizobium bacteroids. Crit Rev Plant Sci 22, 37-38.

Lupwayi, N. Z., Olsen, P. E., Sande, E. S., Keyse, H. H., Collins, M. M., Singleton, P. W., & Rice, W. A. (2000). Inoculant quality and its evaluation. Field Crops Research, Vol. 65, 259–270.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (1997). Brock Biology of Microorganisms. Ed. Prentice Hall International, Inc. pp. 149 – 177.

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2002. Brock. Biología de los microorganismos. Décima Edición. Ed. Pearson.

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2002. *Brock. Biología de los microorganismos*. Décima Edición. Ed. Pearson.

Mahecha, L. 2002. El silvopastoreo: una alternativa de producción que disminuye el impacto ambiental de la ganadería bovina. *Revista Colombiana de Ciencia Pecuaria*. 15(2): 226-231.

Maillet F, Debelle F & Denarie J (1990) Role of the nodD and syrM genes in the activation of the regulatory gene nodD3 and of the common and host-specific nod genes of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 4: :1975–1984.

Manjula, K. and Podile, A.R. 2001. Chitin-supplemented formulations improve biocontrol and plant growth promoting efficiency of *Bacillus subtilis* AF 1. *Can. J. Microbiol.* 47:618-625.

Marín, V. A.; Baldani, V.L., dos Santos, R.; Baldani, I. J. 2003. Fijación biológica de nitrógeno; bacterias fijadoras de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria. 44 p. (Comunicado Técnico).

Martínez Romero, E., López Guerrero, M. G., Ormeño Orrillo, E., & Moles, A. C. (2013). Manual teórico-práctico Los Biofertilizantes y su uso en la Agricultura. D.F., México: Prado.

Masson-Boivin C, Giraud E, Perret Xavier & Batut J (2009) Establishing nitrogenfixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in microbiology* 17.

McMeekin, T. A. and Ross, T. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology* 78:133 – 153.

Mergaert P, Montagnu M & Holsters M (1997) MicroReview Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Molecular microbiology* 25: 811–817.

Merino S, Shaw JG & Tomás JM (2006) Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS microbiology letters* 263: 127–135.

- Miranda, C. 1967. Origen del *Phaseolus vulgaris* (frijol común). *Agrociencia*. 2 :99-109.
- Nelson L (2004) Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for New Inoculants. *Plant management network*. 20: 234–342.
- Okon, Y. and Labandera-González, C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26:1591-1601.
- Parker CA & Scutt. PB (1960) The effect of oxygen on nitrogen fixation by *Azotobacter*. *Biochim. Biophys.* 38: 230–238.
- Patriarca E, Taté R, Ferraioli S & Iaccarino M (2004) Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol.* 234:: 201–62.
- Peoples MB & Craswell ET (1992) Biological nitrogen fijación: Investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant Soil* 141: 13–39.
- Perret X, Staehelin C & Broughton WJ (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 64: 180–201.
- Perticari , J.C. Pacheco Basurco, G. Benintende (1994) Interacción entre diferentes inoculantes y temperaturas de almacenamiento sobre semilla preinoculada de soja. Reunión Latinoamericana de Rizobiología- La Habana, Cuba.
- Perticari A., Puente M, Echegaray R & Piccinetti C. (2007) Uso eficiente de los inoculantes y de la fijación biológica de nitrógeno. *De la biología del Suelos a la Agricultura*, (Thuar, AM, Cassan, f. D, & Olmedo, CA, eds), pp. 277–291. Río Cuarto.
- Popp C & Ott T (2011) Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current opinion in plant biology* 14: 458–467.

Rabalais, N.N., Wisman, W.J., Turner, R.E., Justic, D., Gupta, B., Dortch, Q. 1996. Nutrient changes in the Mississippi River and system responses on the adjacent continental shelf. *Estuaries* 19:386–407.

Raymond J., Siefert J.L., Staples C.R. & Blankenship R.E. (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* 21: 541–554.

Rebah, F, Prévost, D., Yezza, A., Tyagi, R. 2007. Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology*. 98: 3535-3546.

Rélic B, Talmont F, Kopcinska J, Golinowski W, Promé C & Broughton W (1993) Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 6.: 764–774.

Ribeiro RA, Gomes Barcellos F, Gomes Thompson F & Hungria M. (2009) Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Research in microbiology* 160: 297–306.

Rincón Rosales, R. (2001). Biofertilización del timbre (*A. agustissima*) bajo condiciones de invernadero. Tuxtla Gutiérrez: UNACH: Tesis de Maestría en Biotecnología.

Rincón-Rosales, R., Ruíz-Valdiviezo, V. M., Montes-Molina, J. a, Gutiérrez-Miceli, F. a, & Dendooven, L. (2011). Aluminium tolerance in the tropical leguminous N<sub>2</sub>-fixing shrub *Acaciella angustissima* (Mill.) Britton & Rose inoculated with *Sinorhizobium mexicanum*. *Gayana. Botánica*, 68(2), 188–195. doi:10.4067/S0717-66432011000200009.

Sanjuán J, Carlson RW, Spaink H, Bhat U, Barbour, Glushka & Stacey G (1992) A 2-Omethylfucose moiety is present in the lipo-oligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 89: 8789–8793.

Schisler, D.A. and Slininger, P.J. 1997. Microbial selection strategies that enhance the likelihood of developing commercial biological control products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:172-179.

Schlaman H, Phillips D & Kondorosi E (1998) Genetic organisation and regulation of the nodulation genes. *The Rhizobiaceae.*, (Kluwer Academic Publishers, D, ed), pp. 361–386. The Netherlands.

Secretaria de Economía (SE). Análisis de la cadena de valor del frijol. Dirección General de Industrias Básicas. 2012.

Shaw LJ, Morris P & Hooker J (2006) Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental microbiology* 8: 1867 – 1880.

Shaw VK & Brill WJ (1977) Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3249–3253.

Sinha, R. K., Valani, D., Chauhan, K., & Agarwal, S. (2014). Embarking on a second green revolution for sustainable agriculture by vermiculture biotechnology using earthworms: reviving the dreams of Sir Charles Darwin. *Int J Agric Health Saf*, 1, 50–64.

Smit G, Swart S, Lugtenberg BJ & Kijne JW (1992) Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Molecular microbiology* 6: 2897–2903. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1479881>.

Smith, R. S. (1992). Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 485–492.

Smith, R.S. 1995. Inoculant formulations and applications to meet changing needs. In: *Nitrogen fixation: fundamentals and applications*. Tikhonovich, I.A., Provorov, N.A., Romanov, V.I. and Newton W.E. (eds). Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands.



Socolow RH (1999) Nitrogen management and the future of food: lessons from the management of energy and carbon. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 6001-6008. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 6001–6008.

Somasegaran, P., & Hoben, H. J. (1985). Methods in legume-Rhizobium technology. Hawaii: United States Agency for International Development (USAID).

Stewart, B.A y Porter, L. K. (1969). Nitrogen relation ship in wheat (*Triticum aestivum* L.), corn (*Zea mays*), and beans (*Phaseolus vulgaris*). Agronomy Journal 61:267-271.

Subramanian S, Stacey Gary & Yu O (2006) Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. The Plant Journal: for cell and molecular biology 48: 261–273.

Suneja, P., Dudeja, S.S. and Narula, N. 2007. Development of multiple coinoculants of different biofertilizers and their interaction with plants. Arch. Agron. Soil Sci. 53:221-223.

Sylvia, D., Hartel, P., Fuhrmann, J., Zuberer, D. 2005. Principles and Applications of Soil Microbiology. Segunda Edición. Editorial Prentice Hall. New Jersey, E.E.U.U. 644 p.

Tejada, M., Benitez, C. González, J. 2005. Effects of Application of Two Organomineral Fertilizers on Nutrient Leaching Losses and Wheat Crop. Agron. J. 97:960–967.

Tittabutr, P., Waraporn, P., Neung, T., Singleton, P.W. and Boonkerd, N. 2007. Growth, survival and field performance of *Bradyrhizobial* liquid inoculant formulations with polymeric additives. ScienceAsia 33:69-77.

Trivedi, P., Pandey, A. and Palni, L.M.S. 2005. Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. World J. Microbiol. Biotechnol. 21:941-945.

Ventura, Canseco, María Lucia, Mendoza, Wilbert Hernández, y Rosales, Reiner Rincón. Producción de inoculantes rhizobianos en un fermentador air-lift. *Experiencias con biofertilizantes en cultivos de importancia del estado de Chiapas*, 2009: 119-136.

Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571-586.

Vidhyasekaran, P. and Muthamilan, M. 1995. Development of formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Dis.* 79:782790.

Wang, T., Romero, J. 2004. Taxonomía de *Rhizobium*. [http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_12/Capitulo12.pdf](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_12/Capitulo12.pdf).

Watson, R J, R Heys, T Matin, and M Savard. “*Sinorhizobium meliloti* cells require biotin and either cobal or methionine for growth. *American Society for Microbiology*, 2001: Vol. 67 p 3767-3770.

Zhang, S., Reddy, M.S. and Kloepper, J.W. 2004. Tobacco growth enhancement and blue mold disease protection by rhizobacteria: relationship between plant growth promotion and systemic protection by PGPR strain 90-166. *Plant Soil* 262:277-288.