Agradecimientos

A Dios, a quien tengo siempre presente, por otorgarme el mayor don: la vida.

A mi familia, por su contribución y apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida y más aún en este momento de gran importancia, son mi motivación para caminar siempre hacia adelante con fe en el futuro y para no rendirme ante las adversidades.

A mi amiga Ceci con quien compartí este trabajo, por su apoyo, su compañía y su amistad incondicional a lo largo de estos años.

A Jorge Martín por ser mi mejor mitad, mi confidente, mi apoyo y con quien he compartido hermosos momentos.

A la mi asesora, la M. C. Lucía María Cristina Ventura Canseco por todo su conocimiento compartido, sus asesorías y el tiempo que me brindó como maestra y como persona.

A mis revisores, el Dr. Reiner Rincón Rosales y el Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli, por su apoyo, sus consejos y sugerencias a lo largo del proyecto.

A la Dirección General de Educación Superior Tecnológica (DGEST) por el apoyo económico otorgado para la realización del proyecto.

A todos los maestros que tuve la fortuna de conocer durante la carrera, por todas sus enseñanzas. Son parte fundamental de mi formación profesional y personal.

A mis amigos y compañeros de generación, con quienes compartí este largo y maravilloso camino, que me hizo aprender y madurar.

A todas las personas que forman parte de mi vida y a las que han pasado por ella por que han contribuido a formar la persona que ahora soy y me han permitido llegar a este momento.

Infinitamente, gracias.

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

SEP

TRABAJO PROFESIONAL

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA BIOQUÍMICA

QUE PRESENTA:

ELLERY ANAHI ESCOBAR AVENDAÑO

CON EL TEMA:

"EVALUACIÓN DE BIOFERTILIZANTES A BASE DE *Rhizobium* sp. EN CULTIVOS DE ZACATE LIMÓN (*Cymbopogon citratus* L.)"

MEDIANTE:

OPCIÓN III
(PROYECTO DE INVESTIGACIÓN)

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS **FEBRERO 2013**

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

DIRECCIÓN
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas 11 de diciembre 2012

OFICIO NUM. DEP-CT-242/2012

C. **ELLERY ANAHÍ ESCOBAR AVENDAÑO**
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.
P R E S E N T E.

Habiendo recibido la comunicación de su trabajo profesional por parte de los CC. M. En C. LUCIA MARIA CRISTINA VENTURA CANSECO, DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI y DR. REINER RINCÓN ROSALES, en el sentido que se encuentra satisfactorio el contenido del mismo como prueba escrita, **AUTORIZO** a Usted a que se proceda a la impresión del mencionado Trabajo denominado:

"EVALUACIÓN DE BIOFERTILIZANTES A BASE DE Rhizobium sp. EN CULTIVOS DE ZACATE LIMÓN (Cymbopogon citratus)"

Registrado mediante la opción:
III (PROYECTO DE INVESTIGACIÓN)

A T E N T A M E N T E
"CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON SENTIDO HUMANO"

Vo. Bo.

ING. ROBERTO CIFUENTES VILLAFUERTE
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

M. en C. JOSÉ LUIS MÉNDEZ NAVARRO
DIRECTOR

C.c.p.- Departamento de Servicios Escolares
C.c.p.- Expediente
I'JLMN/I'RCV/L'ORC

Secretaría de Educ. Pública
Instituto Tecnológico
de Tuxtla Gutiérrez
División de Est. Profesionales

Carretera Panamericana Km 1080, C.P. 29050, Apartado Postal 599
Teléfonos: (961) 61 5-03-80 (961) 61 5-04-61 Fax: (961) 61 5-16-87
http://www.ittg.edu.mx

Alcance del Sistema: Proceso Educativo

Contenido

Índice de cuadros, gráficas y figuras i
Resumen iv
Capítulo I 1
Introducción 1
Capítulo II 4
Análisis de fundamentos 4
2.1. Biofertilizantes 4
2.1.1. Inoculantes rizobianos 6
2.1.2. Fijación biológica del nitrógeno 8
2.1.3. Género *Rhizobium* 9
2.1.3.1. Descripción microscópica y macroscópica 9
2.1.3.2. Metabolismo 9
2.1.3.3. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa 10
2.2. Soportes 14
2.2.1. Sólidos 18
2.2.1.1. Turba 18
2.2.1.2. Bagazo de caña 19
2.2.1.3. Perlita 20
2.2.2. Líquidos 21
2.2.2.1. Extracto de Levadura y Manitol (YEM) 22
2.2.2.2. Almidón 22
2.2.2.3. Carboximetil celulosa 23
2.3. Zacate limón (*Cymbopogon citratus* L.) 23
2.3.1. Descripción botánica 23
2.3.2. Clasificación taxonómica 24
2.3.3. Generalidades 24
2.3.4. Origen y distribución 25
2.3.5. Clima 25
2.3.6. Fenología 26
2.3.7. Plantación, fecha y distancia 26
2.3.8. Fertilización 27

2.3.9. Aceite esencial de zacate limón (*Cymbopogon citratus* L.) 28
2.3.9.1. Factores que afectan el rendimiento y composición de aceite esencial 28
2.4. *Rhizobium* como endófitos y como rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas no leguminosas 29
2.4.1. Rizobacterias endofíticas 29
2.4.2. Empleo de *Rhizobium* como bacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) 32
2.5. Mecanismo de entrada de bacterias endofíticas en tejidos de plantas 36
2.5.1. Precolonización 36
2.5.1.1. Movimiento 36
2.5.1.2. Unión 36
2.5.1.3. Reconocimiento 37
2.5.1.4. Penetración 37
Capítulo III 39
Procedimiento o método 39
3.1. Conservación de las cepas 39
3.2. Estandarización del inóculo 40
3.3. Determinación de parámetros cinéticos 40
3.4. Obtención de los soportes 41
3.5. Caracterización fisicoquímica de los soportes 41
3.5.1. Sólidos 41
3.5.1.1. pH 42
3.5.1.2. Capacidad de retención de agua 42
3.5.1.3. Humedad 43
3.5.1.4. Prueba de friabilidad 43
3.5.2. Líquidos 43
3.5.2.1. pH 43
3.5.2.2. Densidad 43
3.5.2.3. Viscosidad 44
3.6. Elaboración de biofertilizantes 44
3.6.1. Medio YEM (Extracto de Levadura y Manitol), adicionado con Manitol 44
3.6.2. Turba 45
3.6.3. Carboximetil celulosa con almidón 45
3.6.4. Bagazo de caña con perlita 46

3.7. Monitoreo de los biofertilizantes durante su almacenamiento 46
3.7.1. Sobrevivencia celular 47
3.8. Evaluación de biofertilizantes en cultivos de zacate limón (*Cymbopogon citratus* L.) 48
3.8.1. Evaluación de las variables de respuesta 49
3.8.2. Cuantificación de nitrógeno total en la planta (Kit HANNA modelo C213) 50
3.8.2.1. Nitritos 51
3.8.2.2. Nitratos 51
3.8.2.3. Amoniaco 52
Capítulo IV 54
Análisis de resultados 54
4.1. Estandarización del inóculo 54
4.2. Parámetros cinéticos obtenidos 56
4.3. Caracterización fisicoquímica de los soportes 57
4.4. Elaboración de biofertilizantes 59
4.5. Monitoreo de los biofertilizantes durante su almacenamiento 60
4.5.1. Parámetros fisicoquímicos 60
4.5.1.1. Soportes sólidos 60
4.5.1.2. Soportes líquidos 62
4.5.2. Sobrevivencia celular 66
4.6. Efectividad de los biofertilizantes sobre cultivos de zacate limón (*Cymbopogon citratus* L.) 73
Capítulo V 77
Conclusiones y recomendaciones 77
Capítulo VI 79
Bibliografía 79
Capítulo VII 95
Anexos 95
1. Composición de la solución fahraeus 95
2. Curvas patrón de *Rhizobium etli* CFN 42 y *Rhizobium* sp. LBP2 96
2.1. Curva patrón de la cepa CFN 42 96
2.2. Curva patrón de la cepa LBP2 96

Índice de cuadros, gráficas y figuras

Cuadro 2.1. Especies de rizobios descritas y plantas hospederas.. ……..11

Cuadro 2.2. Materiales utilizados como soportes para biofertilizantes... ……..15

Cuadro 2.3. Propiedades físicas y químicas del bagazo de caña de azúcar……20

Cuadro 2.4. Composición del medio YEM…….....22

Cuadro 2.5. Bacterias endófitas y plantas de las que fueron aisladas…….....33

Cuadro 4.1. Parámetros cinéticos de las cepas CFN 42 y LBP2…….....56

Cuadro 4.2. Determinaciones fisicoquímicas realizadas a los soportes sólidos.…….57

Cuadro 4.3. Determinaciones fisicoquímicas realizadas a los soportes líquidos……..58

Cuadro 4.4. Concentración celular de ambos microorganismos en el momento de la producción e inoculación del soporte……...59

Cuadro 4.5. Sobrevivencia de *Rhizobium etli* CFN 42 y *Rhizobium* sp. LBP2 en los diferentes biofertilizantes durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente……...67

Cuadro 4.6. Sobrevivencia de *Rhizobium etli* CFN 42 y *Rhizobium* sp. LBP2 en los diferentes biofertilizantes a los 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente……72

Cuadro 4.7. Concentración celular inoculada a los cultivos de *Cymbopogon citratus* L. por cada tratamiento……...73

Cuadro 4.8. Parámetros morfométricos medidos en cultivos de *Cymbopogon citratus* L. de 5 meses de edad, inoculados con diferentes tratamientos……..……74

Cuadro 4.9. Determinación de nitrógeno total en cultivos de *Cymbopogon citratus* L. de 5 meses de edad, inoculados con diferentes tratamientos……..74

Figura 2.1. Micrografía Electrónica de Barrido (SEM) de la bacteria del suelo fijadora de nitrógeno *Rhizobium* sp. ……9

Figura 2.2. Planta de *Cymbopogon citratus* L.……24

Figura 2.3. Mapa de distribución mundial de *Cymbopogon citratus* L.……...25

Figura 3.1. Matraces fermentador utilizados durante la estandarización de las cepas CFN 42 y LBP2……40

Figura 3.2. Cinética de crecimiento de las cepas CFN 42 y LBP2…….....41

Figura 3.3. Potenciómetro Bench Meter® utilizado para medir el pH……..…42

Figura 3.4. Cajas con agar YEM y tubos con diluciones…….……47

Figura 3.5. Conteo hecho en el contador de colonias……...47

Figura 3.6. Elaboración de la mezcla turba-perlita, usada como sustrato para el crecimiento de los cultivos……48

Figura 3.7. Inoculación de los biofertilizantes en cultivos de *Cymbopogon citratus* L. ……..…….....49

Figura 3.8. Cultivos de *Cymbopogon citratus* L.……49

Figura 3.9. Raíces de los cultivos de *Cymbopogon citratus* L…….....50

Figura 3.10. Digestión de muestras de *Cymbopogon citratus* L. mediante el método Microkjeldahl……50

Figura 3.11. Kit HANNA C213 utilizado para la determinación de nitritos, nitratos y amoniaco……...…...52

Figura 3.12. Celda con reactivo para la determinación de nitritos……..53

Figura 3.13. Determinación de nitratos con el programa P15 del Kit HANNA C213……..53

Figura 4.1. Curva de crecimiento de la cepa CFN 42 durante la cinética de crecimiento …….....54

Figura 4.2. Curva de crecimiento de la cepa LBP2 durante la cinética de crecimiento ……55

Figura 4.3. Monitoreo de pH de los biofertilizantes sólidos durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente ……..60

Figura 4.4. Monitoreo de humedad de los biofertilizantes sólidos durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente……...61

Figura 4.5. Monitoreo de pH de los biofertilizantes líquidos durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente……...62

Figura 4.6. Monitoreo de densidad de los biofertilizantes líquidos durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente……...63

Figura 4.7. Monitoreo de viscosidad del medio YEM + M durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente……...64

Figura 4.8. Monitoreo de viscosidad de CMC + A durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente……...65

Figura 4.9. Porcentaje de sobrevivencia de *Rhizobium etli* CFN 42 y *Rhizobium* sp. LBP2 en los diferentes biofertilizantes durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente……70

Resumen

Los rizobios son bien conocidos por su capacidad para establecer simbiosis con leguminosas, pero además son colonizadores de la rizosfera de un amplio rango de plantas y son capaces de habitar en plantas no leguminosas, endofíticamente. La mayor parte de los inoculantes rizobianos alrededor del mundo están elaborados a base de turba, esto se debe a las propiedades que posee este material para brindar un ambiente de protección a los microorganismos inoculados. Sin embargo, la turba es un material no renovable, por lo que es recomendable realizar estudios para evaluar materiales alternativos que puedan ser adecuados para ser utilizados como soportes para bacterias rizobianas.

En este estudio se evaluó la eficiencia de cuatro materiales (medio YEM adicionado con manitol, carboximetil celulosa con almidón, turba y bagazo de caña con perlita) para ser emplados como soportes en inoculantes rizobianos, con respecto a su capacidad para mantener la viabilidad de los microorganismos empleados (*Rhizobium etli* CFN 42 y *Rhizobium* sp. LBP2) y mejorar el rendimiento en cultivos de zacate limón (*Cymbopogon citratus* L.), así como también su capacidad para aumentar la concentración de nitrógeno total presente en el cultivo.

La sobrevivencia de *Rhizobium etli* CFN 42 y *Rhizobium* sp. LBP2 y los parámetros fisicoquímicos (pH, densidad, viscosidad y humedad) de los cuatro soportes fueron monitoreados durante un periodo de ocho meses a temperatura ambiente. Tanto la turba como el bagazo de caña con perlita fueron capaces de mantener concentraciones superiores a 1×10^9 ufc/g de la cepa LBP2, mientras que la cepa CFN 42 estuvo por encima de 4×10^8 ufc/g o ufc/ml en turba, carboximetil celulosa con almidón y bagazo de caña con perlita. El medio YEM adicionado con manitol fue el menos eficiente en la conservación de la viabilidad de la cepa LBP2 y en el caso de la cepa CFN 42, únicamente sobrevivió hasta los 120 días. La Carboximetil celulosa con almidón fue el soporte más efectivo en la conservación de la viabilidad celular para la cepa CFN 42, mientras que la turba lo fue para la cepa LBP2. El medio YEM adicionado con manitol e inoculado con la cepa LBP2 fue el que más elevó la concentración de nitrógeno presente en los cultivos de *Cymbopogon citratus* L. Mientras que el bagazo de caña con perlita fue eficiente tanto en su capacidad para mantener la viabilidad de la cepa LBP2, como para ser utilizado como biofertilizante en cultivos de *Cymbopogon citratus* L. con buenos resultados.

Capítulo I

Introducción

Uno de los problemas fundamentales que enfrenta la humanidad, es la producción de alimentos en cantidad suficiente, de acuerdo a las necesidades de la población. Para solucionar este problema se ha recurrido a la utilización de fertilizantes químicos, los cuales se aplican a los cultivos en cantidades cada vez mayores; el uso masivo de estos productos, ha generado la contaminación y eutrofización de las aguas dulces por lixiviación del NO_3^- de los suelos (Rebah *et al*., 2007).

En México, los fertilizantes químicos sintéticos empezaron a usarse a mediados del siglo XX y rápidamente se convirtieron en elementos indispensables en los campos agrícolas. Su bajo costo y amplia distribución nacional entre los productores, dado que eran subsidiados por el gobierno federal, constituyeron una barrera para el aprovechamiento de los recursos biológicos del suelo. Se han encontrado explotaciones agrícolas con diferentes niveles de deterioro en su rizosfera, dependiendo de la intensidad, frecuencia y duración de las aplicaciones de agroquímicos empleados (Aguirre *et al*., 2009).

Actualmente se están desarrollando tecnologías que utilizan diferentes microorganismos con funciones específicas en la agricultura, para mejorar la productividad de las plantas. Todos son una fuente facilitadora del manejo de los nutrimentos que benefician el funcionamiento de los cultivos, y garantizan una productividad biológica, económica y ecológica más exitosa, sin contaminación del ambiente y de inocuidad reconocida para el hombre (Aguirre *et al*., 2009).

Los microorganismos del suelo aprovechados en la agricultura han tenido diversas denominaciones. Tradicionalmente se han utilizado los términos “inóculo” o “inocular” que es la introducción de gérmenes en un sustrato cualquiera (Font Quer, 1977), pero también se han denominado “fertilizantes bacterianos” (Dommergues, 1978) e “inoculantes bacterianos” (Kapulnik y Okon, 2002).

Los biofertilizantes son preparados de microorganismos aplicados al suelo y/o planta con el fin de sustituir parcial o totalmente la fertilización sintética así como disminuir la contaminación generada por los agroquímicos. Los microorganismos utilizados en los biofertilizantes son clasificados dentro de dos grupos: El primer grupo incluye microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta, fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando hierro y fósforo inorgánico y mejorando la tolerancia al stress por sequía, salinidad, metales tóxicos y exceso de pesticidas, por parte de la planta. El segundo grupo incluye microorganismos los cuales son capaces de disminuir o prevenir los efectos de deterioro de microorganismos patógenos (Bashan y Holguin, 1998; Lucy *et al*., 2004). Puede haber microorganismos que puedan estar en los dos grupos, que además de promover el crecimiento de la planta, inhiba los efectos de microorganismos patógenos (Kloepper *et al.*, 1980).

Los principales microorganismos utilizados como biofertilizantes son bacterias (*Azospirillum*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*), y hongos micorrízicos del género *Glomus* (Bashan, 1998; Bashan y Holguin, 1997; Quilambo, 2003).

En las últimas décadas se han realizado diversas investigaciones que destacan la importancia de las bacterias de la rizosfera. Muchas de ellas estimulan el crecimiento de gramíneas como caña de azúcar, trigo, cebada, sorgo, maíz y pastos tropicales. Los mecanismos de acción de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) son variados e incluyen la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (Döbereiner *et al*., 1995), producción de sustancias reguladoras del crecimiento (Arshad y Frankenberger,1998b), solubilización de minerales y nutrimentos (Crowley *et al*., 1991), incremento en el volumen de la raíz (Bowen y Rovira, 1999), inducción de resistencia sistémica a patógenos(Van Peer *et al*., 1991), inhibición del crecimiento de organismos antagónicos (Utkhede *et al*., 1999) e interacción sinérgica con otros microorganismos (Bashan *et al*., 1996).

Las gramíneas forman uno de los grupos vegetales más importantes desde el punto de vista económico (Pohl, 1986). Además de su utilización como forraje, las gramíneas son empleadas por el hombre en la elaboración de productos médicos, artesanales y también en la industria. En el mundo la familia Poaceae o Gramineae incluye 702 géneros y 9675

especies (Clayton y Renvoize, 1986). Con respecto a México, Valdés y Dávila (1995) registran 206 géneros y Beetle (1987) estima que existen alrededor de 1127 especies.

En México se han consignado incrementos en el rendimiento de maíz entre el 30-70% en diferentes regiones donde el uso de los fertilizantes es nulo (Caballero-Mellado, 1991). En Latinoamérica, Okon y Labandera (1994) citan resultados favorables en rendimiento con la simbiosis *Azospirillum*-gramínea en el 70% de los resultados de investigación realizados de 1974 a 1994. Con relación a México y otras regiones del mundo, Dobbelaere *et al*. (2001) consignan efectos positivos de la inoculación para el 62-95 % de los casos.

El cultivo de zacate limón (*C. citratus* L.) ha tomado gran importancia en México debido a sus bajos costos de producción y, sobre todo, a la constante demanda en países Europeos de sus hojas, las cuales se utilizan principalmente para la elaboración y formulación de té e infusiones. Aunado a lo anterior, en México, tradicionalmente el té de zacate limón es utilizado como inductor del sueño, tranquilizante, digestivo, antigripal y antiespasmódico (Rauber *et al*., 2005).

Es de suma importancia producir biofertilizantes empleando microorganismos aislados de la región de estudio, debido a que éstos se encuentran mejor adaptados a las condiciones del suelo, además de poseer un mayor nivel de competitividad (Martínez-Romero y Rosenblueth, 1990). En tal sentido, el presente trabajo tuvo como finalidad la elaboración de un biofertilizante a partir de la cepa nativa *Rhizobium* sp. LBP2, aislada de la planta medicinal *Calliandra grandiflora* Benth., en el estado de Chiapas. El biofertilizante producido fue evaluado en *Cymbopogon citratus* L. (zacate limón) y se determinó su efectividad mediante la evaluación de parámetros morfométricos, bioquímicos, y sobre el rendimiento agronómico y la producción de las plantas.

Capítulo II

Análisis de fundamentos

2.1. Biofertilizantes

En 1913, Fritz Haber descubrió un proceso para la síntesis de amoniaco por combinación directa del nitrógeno y el hidrógeno y en 1930 Carl Bosch lo adaptó en forma comercial. El proceso actual de producción de fertilizante nitrogenado se conoce como Haber-Bosch y se caracteriza por requerir altas cantidades de energía para lograr fijar en materiales inertes el nitrógeno, y de esta forma, ser utilizado por los productores. La energía utilizada deriva de fuentes no renovables, como petróleo, gas o carbón. Döbereiner (1977) señala que la energía requerida para producir una tonelada de fertilizante nitrogenado es la equivalente a 7 barriles de petróleo y Tilak (1998) refiere que la energía necesaria para elaborar 1 kg de fertilizante nitrogenado son 80 MJ ó 11.2 kWh; para fósforo 12 MJ ó 1.1 kWh y para potasio 8 MJ ó kWh. Los microorganismos realizan el mismo proceso; en el caso del nitrógeno a través de las bacterias fijadoras de nitrógeno y/o mediante el transporte de P y K con los hongos micorrízicos, pero en ambos casos, la energía utilizada deriva del proceso fotosintético de las plantas (Aguirre *et al*., 2009).

El conocimiento de los beneficios de los microorganismos en el desarrollo de las plantas se remonta a la edad media, en la Roma antigua, pero su evolución y progreso aumentaron con el invento del microscopio y las técnicas microbianas durante el periodo de 1891-1910 (Freire, 1975).

Entre 1895 y 1904, el microbiólogo neerlandés Martinus Beijerinck, pionero de la microbiología, realizó diversas investigaciones con lo cual se pudieron conocer importantes procesos microbiológicos, como la fijación de nitrógeno atmosférico, la formación de nódulos por microorganismos en las leguminosas y el aislamiento del organismo responsable de la formación de los nódulos (Aguirre *et al*., 2009).

Los microorganismos benéficos para la agricultura son muchos y desarrollan sus funciones bajo la influencia de las raíces de las plantas (Aguirre *et al*., 2009). La raíz, además de las funciones de anclaje, absorción y transporte de agua y nutrimentos al sistema vascular, pone a la planta en contacto con la rizosfera, es decir, la zona del suelo que rodea a las raíces de las plantas donde abundan los microorganismos (Balandreau y Knowles, 1978), que incluye

especialmente la región de crecimiento en la raíz (Alexander, 1977; Arshad y Frankenberg, 1998a), donde se da un flujo de compuestos orgánicos (Barea y Azcón-Aguilar, 1983) que sirven a los microorganismos como fuente de carbono (Bowen y Rovira, 1999).

Las fuentes de carbono empleadas por los microorganismos de la rizósfera pueden ser los residuos de células liberados por lisis, el mucílago y los exudados radicales de bajo peso molecular (Marschner y Römheld, 1996). Además de las fuentes de carbono, los microorganismos obtienen de la rizosfera, agua, condiciones favorables de O_2, y mayor acceso a minerales como molibdeno, fierro, calcio, potasio y magnesio (Loredo *et al*., 2007). La rizosfera se extiende desde la superficie de la raíz hasta 2 mm fuera y sus condiciones fisicoquímicas y biológicas difieren en muchos aspectos del resto del suelo situado a cierta distancia (Barea y Azcón-Aguilar, 1983).

Actualmente se utilizan diferentes microorganismos con funciones específicas en la agricultura para mejorar la productividad de las plantas. Todos son una fuente facilitadora del manejo de los nutrimentos que benefician el funcionamiento de los cultivos, y forman parte de una tecnología que garantiza una productividad biológica, económica y ecológica más exitosa y sin contaminación del ambiente y de inocuidad reconocida para el hombre (Aguirre *et al*., 2009).

Algunos productos comerciales que contienen solamente bacterias, son comúnmente llamados “biofertilizantes”, como el caso de *Rhizobium*; “fitoestimulantes”, como en *Azospirillum* o “biopesticidas”, cuando se utilizan para el control biológico como *Pseudomonas* (Kapulnik y Okon, 2002). En todos los casos pueden utilizarse en los cultivos anuales, las praderas de gramíneas y leguminosas, hortalizas y frutales.

Un biofertilizante es una sustancia que contiene microorganismos vivos que, cuando se aplica a las semillas, superficies de las plantas, o el suelo, colonizan la rizosfera o el interior de la planta y promueve el crecimiento al aumentar el suministro o la disponibilidad de nutrientes primarios a la planta huésped. En el mercado existe una gran variedad de biofertilizantes y están diseñados en función a las necesidades del agricultor y sobre todo del tipo de cultivo. El empleo de estos mecanismos tiene la gran ventaja que permiten nutrir el suelo y favorecer el crecimiento de la planta sin afectar el equilibrio ecológico y son muy bien aprovechados por éstas (Vessey, 2003).

Los biofertilizantes son recomendados en el programa 21 como resultado de la llamada cumbre para la Tierra, firmada en Río de Janeiro en 1992. Son considerados biotecnologías "apropiables", que es un término creado para las herramientas biotecnológicas que contribuyen al desarrollo sostenible de un país y que proveen beneficios tangibles a los destinatarios y, además, por ser ambientalmente seguras y socioeconómica y culturalmente aceptables (Cumbre para la Tierra, 1992).

2.1.1. Inoculantes rizobianos

Los inoculantes microbianos son preparaciones que contienen cepas activas de microorganismos en concentraciones suficientes. Estos se usan ya sea para fijar el nitrógeno atmosférico o para solubilizar nutrientes de las plantas, tales como fosfatos; así como también, para estimular el crecimiento de las plantas a través de la producción de sustancias promotoras del crecimiento y/o agentes de biocontrol para suprimir patógenos de las plantas. De los diferentes biofertilizantes, los inoculantes rizobianos específicos para diferentes leguminosas, son los más importantes (Tilak *et al*., 2010). Los inoculantes rizobianos son cultivos de bacterias vivas que son aplicados a semillas o plantas jóvenes, infectando su sistema radical con bacterias benéficas (Elevitch, 2004).

Los inoculantes rizobianos comerciales se han usado por más de un siglo para obtener altos rendimientos en los cultivos. Se ha estimado que cerca de 2000 toneladas de inoculantes rizobianos se producen alrededor del mundo cada año (Rebah *et al*., 2007). Dichos inoculantes se encuentran disponibles como productos sólidos, polvo, producidos a base de turba, en forma granular o como inoculantes líquidos elaborados con medio de cultivo (Khavazi *et al*., 2007).

En muchos países, el desarrollo local de inoculantes rizobianos comerciales está limitado por la falta de desarrollo tecnológico o la escacez de recursos como la turba, el soporte rizobiano más comunmente usado en los países incluyendo a Estados Unidos, Canadá, Australia y Rusia (Roughley, 1970; Smith, 1992).

El número de rizobios requerido para la inoculación depende del tamaño de la semilla de la planta y de la velocidad de inoculación sugerida por el fabricante (Rebah *et al*., 2007). Olsen *et al*. (1994) mencionan que el número mínimo de células de *Rhizobium* sp., necesario en un inoculante varía en todo el mundo con rangos entre 10^7 hasta 4×10^9 ufc/g de inoculante.

Mientras que Khavazi *et al*. (2007) toman como estándar la concentración de 10^9 ufc/g o ml de inoculante.

La ley N°. 86955 expedida en Brasil el 18 de febrero de 1982, exige que la concentración celular presente en un biofertilizante debe ser 10^8 ufc/g de inoculante, concentración que han usado diversos autores en experimentos en campo, con resultados positivos (De Freitas y Germida, 1991; Di Ciocco y Rodriguez, 1994; Fages, 1994; Okon *et al*., 1988; Tran Van *et al*., 2000; Weller y Cook, 1986).

Los estándares aceptables para el número de rizobios/g de soporte son variables. Sin embargo, en muchos países, 10^7 células/g o más es la concentración tomada como estándar (Muniruzzaman y Khan, 1992).

Los rizobios son bacterias Gram negativas y aerobias obligadas que nodulan las raíces y tallos, pertenecen casi exclusivamente a la subclase α-Proteobacteria. Están divididos dentro de seis géneros: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Wang y Martínez-Romero, 2000). Sin embargo, recientemente nuevos tipos de rizobio han sido aislados de leguminosas tropicales como *Burkholderia* sp. (Moullin *et al*., 2001) y *Ralstonia* sp. aislada de *Mimosa* spp. (Chen *et al*., 2001) miembros de la subclase de β-proteobacteria. Tradicionalmente los rizobios han sido divididos dentro de los grupos de rápido y lento crecimiento (*Rhizobium* y *Bradyrhizobium*), el nombre *Mesorhizobium* denota el crecimiento intermedio entre el rápido y el lento (Chen *et al*., 1995). Las cepas pertenecientes a los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* son de rápido crecimiento (Odee *et al*., 2002). A la fecha existen más de 50 especies de 10 géneros reportadas como noduladoras (Gu *et al*., 2008).

La producción local de inoculantes es deseable, debido a la adaptación a las condiciones locales. Para hacerlo, es necesario encontrar soportes y preparar métodos que sean ampliamente accesibles localmente (Khavazi *et al*., 2007). Por ello se pretende desarrollar un inoculante rizobiano que sea simple, accesible y barato de modo que facilite su producción en el estado de Chiapas.

2.1.2. Fijación biológica del nitrógeno

La fijación del nitrógeno por los microorganismos es una de las rutas más importantes para introducir de la atmósfera, el nitrógeno molecular (N_2) a las cadenas alimentarias de la biosfera (Bergersen, 1978). El 78% del aire en la atmósfera es nitrógeno y en esta forma no puede ser utilizado por algunos microorganismos de vida libre o asociados a los sistemas radicales que poseen el complejo nitrogenasa (Aparicio-Trejo y Arrese-Igor, 1993).

La fijación biológica de nitrógeno es la conversión enzimática de nitrógeno gaseoso a amonio; es una característica exclusiva de procariontes y se encuentra distribuida en muchos géneros de bacterias (Young, 1992). Además de las bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre, existen bacterias del suelo que se asocian a plantas y, en particular, un grupo de éstas (de los géneros *Rhizobium* y otros relacionados) se asocian a leguminosas (Van Berkum *et al*., 1999). La asociación *Rhizobium*-leguminosa contribuye entre un 1/3 y un 1/2 del nitrógeno fijado de la atmósfera y se basa en el intercambio de carbono por nitrógeno entre ambos simbiontes ya que para las plantas el nutriente más limitante es el nitrógeno.

La fijación simbiótica del nitrógeno es un proceso metabólico con participación de la leguminosa y la bacteria. El rizobio se encuentra en los nódulos formados en el sistema radical y la planta le suministra los monosacáridos generados en la fotosíntesis. El microorganismo utiliza estas fuentes de carbono como energía para reducir el N_2 atmosférico a iones amonio y de esta manera “fijarlo” (Carrol *et al*., 1985). Es la culminación de una compleja interacción entre la bacteria y el hospedero (Bergersen, 1978; Graham, 1984).

Todas las bacterias fijadoras de nitrógeno producen nitrogenasa, la cual se compone de dos complejos proteicos. Este complejo enzimático cataliza la reacción de reducción de nitrógeno gaseoso a amoniaco con un gasto considerable de ATP, el cual es generado por la fosforilación oxidativa que exige la disponibilidad y consumo de importantes cantidades de oxígeno (Dixon y Wheeler, 1986). La reacción química que cataliza la nitrogenasa puede describirse según la siguiente ecuación:

$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16\ ATP \longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$$

La nitrogenasa cataliza también la reducción de otros sustratos, incluyendo acetileno, cianuro, azida, óxido de nitrógeno e hidrazina. La reducción de acetileno a etileno se mide

con frecuencia para estimar las tasas de fijación de nitrógeno en plantas y suelos, en parte porque resulta muy sencillo cuantificar el etileno con un cromatógrafo de gases (Hill, 1988).

2.1.3. Género *Rhizobium*

2.1.3.1. Descripción microscópica y macroscópica

Son bacilos que miden 0.5-1.0 x 1.2-3.0 µm. No esporoformados. Gram negativos. Se mueven por medio de 1-6 flagelos que pueden ser peritricales o subpolares. Las fimbrias han sido descritas en algunas cepas. Las colonias generalmente son blancas o color beige, circulares, convexas, semitranslúcidas u opacas y mucilaginosas; generalmente miden 2-4 mm de diámetro a los 3-5 días de incubación en agar YEM (Extracto de Levadura y Manitol). El crecimiento en un medio de carbohidratos es usualmente acompañado de reacción ácida y abundante cantidad de exopolisacáridos extracelulares. Se desarrolla una pronunciada turbidez de 2 a 3 días en caldo aireado o agitado (Kuykendall *et al*., 2005). En la figura 2.1 se muestra la bacteria *Rhizobium* sp., vista a través de un microscopio electrónico de barrido.

Figura 2.1. Micrografía Electrónica de Barrido (SEM) de la bacteria del suelo fijadora de nitrógeno *Rhizobium* sp. (Fotografía tomada por Steve Gschmeissner)

2.1.3.2. Metabolismo

Son aeróbicos, poseen un metabolismo de tipo respiratorio con oxígeno como aceptor final de electrones. La temperatura óptima para su crecimiento está entre 25 y 30 °C, algunas especies pueden crecer a temperaturas de 40°C. El pH óptimo de crecimiento se encuentra

entre 6.0 y 7.0, sin embargo pueden crecer 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).

Son microorganismos quimioorganotróficos, utilizando una gran variedad de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos cómo 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, pantetonato, 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 Embden-Meyerhof-Parnas opere en *Rhizobium* sp., debido a que la actividad en las enzimas fructosa-1,6 difosfato aldolasa y 6-fosfofructoquinasa son bajas. Los polioles son sustratos para una deshidrogenasa inducible que convierte manitol en fructosa o xilulosa. La L-arabinosa es metabolizada a α-cetoglutarato. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos 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 α-cetoglutarato (Kuykendall *et al*., 2005).

2.1.3.3. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

Todas las especies del género *Rhizobium* forman nódulos en las raíces o tallos de las leguminosas y se establecen dentro de estas estructuras en donde proliferan, se diferencian y fijan nitrógeno. Existe especificidad en esta relación, lo que significa que una especie de leguminosa establece simbiosis con un limitado número de especies de *Rhizobium* (Long, 1989). Se han identificado diferentes sitios de diversificación de las leguminosas y éstos coinciden con los sitios de diversificación de los *Rhizobium,* que son capaces de establecer simbiosis con las leguminosas en cuestión (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996).

En los últimos años se ha incrementado el número de especies y géneros rizobianos porque se han analizado leguminosas que no se habían estudiado y porque la metodología para clasificar bacterias es más poderosa. Hoy en día se están empleando técnicas de biología

molecular que han permitido establecer las relaciones filogenéticas de estas bacterias (Van Berkum y Eardly, 1998).

México es uno de los sitios de origen del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), y de diferentes especies de *Leucaena, Mimosa, Sesbania* y *Acacia* y de otras muchas leguminosas. El aislamiento de las bacterias de estas leguminosas ha revelado en algunos casos una diversidad genética enorme, lo cual ha llevado a proponer nuevas especies de *Rhizobium*, las cuales son nativas de México y no se encuentran en otros sitios salvo en las ocasiones en que, ya sea deliberadamente o no, han sido introducidas en estos lugares. En el cuadro 2.1 se enlistan las especies de rizobios descritas, sus respectivas plantas hospederas y el lugar de procedencia de cada una.

Cuadro 2.1. Especies de rizobios descritas y plantas hospederas (Lloret y Martínez-Romero, 2005)

Filo	**Género**	**Especie**	**Cepa tipo**	**Hospedero de aislamiento**	**Lugar de aislamiento**	**Referencia**
α-Proteobacteria	*Azorhizobium*	*A. caulinodans*	ORS571^T	*Sesbania rostrata* Brem.	Senegal, África	Dreyfus *et al*., 1988
	Bradyrhizobium	*B. betae*	PL7HG1^T	*Beta vulgaris* L.	España	Rivas *et al*., 2004
		B. canariense	BTA-1^T	*Chamaecytisus proliferus* L. f.	Tenerife, Islas Canarias	Vinuesa *et al*., 2005
		B. elkanii	USDA76^T	*Glycine max* L.	Maryland, U.S.A.	Kuykendall *et al*., 1992
		B. japonicum	USDA6^T	*Glycine max* L.	Japón	Kuykendall *et al*., 1992
		B. liaoningense	USDA3622^T	*Glycine max* L.	Heilongjiang, China	Xu *et al*., 1995
		B. yuanmingense	CCBAU 1071^T	*Lespedeza cuneata* Dum.	Pekin, China	Yao *et al*., 2002
	Devosia	*D. neptuniae*	J1^T	*Neptunia natans* L. f.	India	Rivas *et al*., 2003
	Methylobacterium	*M. nodulans*	ORS2060^T	*Crotalaria pocarpa* L.	Senegal, África	Sy *et al*., 2001
	Mesorhizobium	*M. amorphae*	LMG 18977^T	*Amorpha fruticosa* L.	China	Wang *et al*., 1999
		M. chacoense	PR5^T	*Prosopis alba* Griseb.	Chancaní, Argentina	Velázquez *et al*., 2001
		M. ciceri	USDA 3383^T	*Cicer arietinum* L.	España	Jarvis *et al*., 1997; Nour *et al*., 1994

		M. huakuii	CCBAU 2609^T	*Astragalus sinicus* L.	Nanjing, China	Chen *et al*., 1991; Jarvis *et al*., 1997
		M. loti	USDA 3471^T	*Lotus tenuis* Willd.	Nueva Zelanda	Jarvis *et al*., 1982; Jarvis *et al*., 1997
		M. mediterraneum	USDA 3392^T	*Cicer arietinum* L.	España	Jarvis *et al*., 1997; Nour *et al*., 1995
		M. plurifarium	ORS1032^T	*Acacia senegal* Willd.	Senegal, África	de Lajudie *et al*., 1998
		M. septentrionale	SDW014^T	*Astragalus adsurgens* Pall.	Norte de China	Gao *et al*., 2004
		M. temperatum	SDW018^T	*Astragalus adsurgens* Pall.	Norte de China	Gao *et al*., 2004
		M. tianshanense	CCBAU3306^T	*Glyzyrrhiza pallidiflora* Maxim.	Xinjinang, China	Chen *et al*., 1995; Jarvis *et al*., 1997
	Rhizobium	*R. etli*	CFN 42^T	*Phaseolus vulgaris* L.	Guanajuato, México	Segovia *et al*., 1993
		R. galegae	HAMBI 540^T	*Galega orientalis* Lam.	Finlandia	Lindström, 1989
		R. gallicum	R602sp^T	*Phaseolus vulgaris* L.	Maine et Loire, Francia	Amarger *et al*., 1997
		R. giardinii	H152^T	*Phaseolus vulgaris* L.	Côte d´Or, Francia	Amarger *et al*., 1997
		R. hainanense	CCBAU 57015	*Desmodium sinuatum* Baker.	Hainan, China	Chen *et al*., 1997
		R. huautlense	LMG 18254^T	*Sesbania herbacea* Mill.	Morelos, México	Wang *et al*., 1998
		R. leguminosarum bv. *viciae*	USDA 2370^T	*Vicia faba* L.		Frank, 1879; Frank, 1889; Jarvis *et al*., 1982
		R. loessense	CCBAU 7190B	*Astragalus complanatus* R. Br.	Meseta de Loess, China	Wei *et al*., 2003
		R. mongolense	USDA 1844^T	*Medicago ruthenica* L.	Mongolia	van Berkum *et al*., 1998
		R. tropici	CIAT 899^T	*Phaseolus vulgaris* L.	Colombia	Martínez-Romero *et al*., 1991
		R. undicola	ORS 992^T	*Neptunia natans* L. f.	Senegal, África	de Lajudie *et al*., 1998; Young *et al*., 2001

		R. yanglingense	CCBAU 71623^T	*Gueldenstaedtia multiflora* Bunge.	Gansu, Noroeste de China	Tan *et al*., 2001
	Sinorhizobium	*S. americanum*	CFNEI156^T	*Acacia acatlensis* Benth.	Morelos, México	Toledo *et al*., 2003
		S. arboris	HAMBI 1552^T	*Prosopis chilensis* Mol.	Sudán, Africa	Nick *et al*., 1999
		S. fredii	USDA 205^T	*Glycine soja* Sieb. & Zuc.	Honan, China	Chen *et al*., 1988; Scholla y Elkan, 1984
		S. kostiense	HAMBI 1489^T	*Acacia senegal* Willd.	Sudán, Africa	Nick *et al*., 1999
		S. medicae	USDA 1037^T	*Medicago truncatula* Gaertn.	Francia	Rome *et al*., 1996
		S. meliloti	USDA 1002^T	*Medicago sativa* L.		Jordan, 1984
		S. morelense	LMG 21331^T	*Leucaena leucocephala* Lam.	Morelos, México	Wang *et al*., 2002
		S. saheli	ORS 609^T	*Sesbania cannabina* Retz.	Senegal, África	de Lajudie *et al*., 1994
		S. terangae	ORS 1009^T	*Acacia laeta* Benth.	Senegal, África	de Lajudie *et al*., 1994
		S. xinjiangense	CCBAU 110^T	*Glycine max* L.	Xinjiang, China	Chen *et al*., 1988
β-Proteobacteria	*Wautersia*	*W. taiwanensis*	LMG 19424^T	*Mimosa pudica* L.	Taiwan, China	Chen *et al*., 2001; Vaneechoutte *et al*., 2004
	Burkholderia	*B. tuberum*	STM 678^T	*Aspalathus carnosa* Berg.	Sudáfrica	Vandamme *et al*., 2002
		B. phymatum	STM815^T	*Machaerium lunatum* L.f.	Guayana Francesa	Vandamme *et al*., 2002

Algunas especies del género *Calliandra* (Leguminosae, Mimosoidea), han sido cultivadas para la horticultura y otras como *C. calothyrsus* Meisn. han sido empleadas en programas de agroforestería, principalmente en áreas tropicales, considerando su potencial de crecimiento y capacidad para fijar nitrógeno atmosférico (Evans, 1996). Bala y Giller (2001) encontraron que *C. calothyrsus* Meisn. puede ser nodulada por cepas parecidas a los géneros de rápido crecimiento *Agrobacterium, Mesorhizobium, Rhizobium y Sinorhizobium*, por lo que al parecer este género presenta promiscuidad, pudiendo la nodulación en especies de este género, depender del tipo de suelo (Moreira *et al*., 1992).

En este trabajo se utilizó la bacteria *Rhizobium* sp., una cepa aislada de las raíces de *Calliandra grandiflora*, una leguminosa arbustiva que crece en la depresión central del estado de Chiapas, Mexico. De acuerdo a la filogenia del gen 16S rADN, se comprobó que esta cepa corresponde a una nueva especie de *Rhizobium*. Esta cepa ha demostrado capacidad para crecer en suelo de naturaleza ácida (pH: 4.5-6.5) y puede tolerar la presencia de metales pesados, tales como aluminio y cobre y soporta concentraciones altas de salinidad (mayor a 2 %); sin embargo, la principal cualidad de esta bacteria es el potencial de nodulación y fijación de N_2. Esta cepa rizobiana es especial, puede nodular a otras leguminosas, tales como: *Phaseolus vulgaris* L., *Leucaena leucocephala* Lam. y *Acaciella angustissima* Mill. Por lo anterior, reúne varias características biológicas, que la convierten en una cepa con alto potencial para su empleo como biofertilizante (Villalobos-Escobedo, 2011).

2.2. Soportes

Los biofertilizantes se preparan usualmente como soportes que contienen microorganismos efectivos. La incorporación de microorganismos en soportes permite una fácil manipulación, almacenamiento a largo plazo y una alta efectividad en los biofertilizantes (Abdul Rahim *et al*., 2006).

Los soportes son materiales orgánicos o inorgánicos en los cuales se deposita el inóculo. Un adecuado soporte rizobiano debe tener una buena capacidad de retención de agua, buenas características de aireación, soporte para el crecimiento y supervivencia bacteriana, no ser tóxico, fácil de esterilizar, manejado en el campo, amigable con el medio ambiente y tener una buena calidad de almacenamiento. Además, es importante para su producción y utilización, que pueda ser fácilmente convertido en polvo, mezclable, empacable, adherible a las semillas, estar disponible como polvo o gránulo, liberar fácilmente a los rizobios en el suelo y ser barato (Bashan, 1998; Burton, 1981; Rebah *et al*., 2002; Smith, 1992).

Existen diferentes tipos de soportes que han sido empleados en función a sus propiedades y características físico-químicas, las cuales contribuyen a la sobrevivencia celular en los biofertilizantes, estos de manera general se clasifican en sólidos y líquidos.

Brevemente, tres categorías generales de materiales alternativos usados como soportes son: (a) materiales del suelo, incluyendo carbón o mezclas de carbón y otros materiales; (b)

materiales extraídos de plantas, incluyendo bagazo, cáscara de arroz y composta; y (c) ingredientes neutros, incluyendo vermiculita, mezclas de vermiculita y otros materiales, perlita, roca fosfórica, sulfato de calcio y algunos geles poliacrílicos sintéticos (Rebah *et al*., 2007; Smith, 1992).

A continuación se muestran diferentes materiales utilizados como soportes para la elaboración de biofertilizantes con diferentes microorganismos (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Materiales utilizados como soportes para biofertilizantes (Abdul Rahim *et al*., 2006)

Soporte	Microorganismo	Características	Referencia
Residuo industrial de ácido oxálico esterilizado	*Rhizobium*	• Inoculación en semillas • Se multiplicó el número de *Rhizobium* en este soporte a temperatura ambiente hasta por 90 días • La esterilización del soporte contribuyó significativamente al incremento del rendimiento del grano, número de nódulos y contenido de nitrógeno	Kaushal *et al*., 1996
Gránulos secos de alginato-perlita	*Rhizobium*	• Inoculación en suelo • Las cepas de *Rhizobium* sobrevivieron en los gránulos secos más de 180 días • El inoculante pudo ser almacenado en un estado seco sin perder mucha viabilidad	Hedge y Brahmaprakash, 1992
Composta de aserrín	*Bradyrhizobium* , *Rhizobium* y *Azospirillum*	• Inoculación en semillas • Mostró buen crecimiento y sobrevivencia de las cepas del inoculante	Kostov y Lynch, 1998

Agroperlita, arcilla expandida, caolín, celita, diatomeas, porosil MP, micro-cel, vermiculita	*Agrobacterium radiobacter* K84	• La detección se realizó para obtener una formulación mejorada para las células de la cepa K84 • Se examinó el efecto del almacenamiento del soporte a temperatura ambiente y de su contenido de agua en la sobrevivencia de la cepa K84.	Pesenti-Barili *et al*., 1991
Turba con células cultivadas en suero de leche	*Rhizobium meliloti*	• Inoculación en semillas • Hubo una mayor sobrevivencia a diferentes temperaturas durante el almacenamiento, incluso bajo desecación	Bissonnette y Lalande, 1988
Suelos minerales	*Rhizobium*	• Inoculación en semillas • *Rhizobium* tuvo una mayor sobrevivencia a 4°C que a temperaturas más altas	Chao y Alexander, 1984
Carbón	*Rhizobium*	• Inoculación semillas • Siete de los ocho carbones probados soportaron el crecimiento y la sobrevivencia de cepas de *R. phaseoli*. La mayoría contenían más de 10^7 rizobios/g después de 12 meses	Paczkowski y Berryhill, 1979
Inoculantes granulares modificados con nutrientes	*Bradyrhizobium Japonicum*	• Inoculación en suelo • Gránulos de bentonita, gránulos de illita y esmectita o gránulos de sílice modificado con gricerol, fueron inoculados	Fouilleux *et al*., 1996

		con otros biofertilizantes a base de turba y la bacteria *Bradyrhizobium japonicum*	
Aceite de soya o cacahuate adicionada con células liofilizadas	*Rhizobium*	• Inoculación en semillas • Proporciona más protección que los inoculantes elaborados a base de turba, cuando los rizobios son inoculados en semillas y expuestos a condiciones de sequía y altas temperaturas	Kremer y Peterson, 1982
Perlita	*Rhizobium, Bradyrhizobium, Bacillus*	• Inoculación en semillas • La combinación de un adhesivo de sacarosa con la perlita permitieron una mayor sobrevivencia en las bacterias en las semillas • Produjo resultados similares a los inoculantes elaborados a base de turba, en cuanto a número de nódulos, peso seco de los nódulos, rendimiento del cultivo y contenido de nitrógeno	Daza *et al*., 2000
Lodos de aguas residuales	*Sinorhizobium Meliloti*	• Inoculación en semillas • El resultado mostró la idoneidad de usar lodo como soporte debido a que éste tiene el mismo o mayor potencial que la turba para mantener la sobrevivencia de *S. meliloti*	Rebah *et al*., 2002
Salvado de trigo, bagazo de caña	*Rhizobium*/ *Bradyrhizobium* y	• Inoculación en suelo • El número de	Abd-Alla y Omar, 2001

	Aspergillus niger	microorganismos fue el más alto con la turba, seguido por el salvado de trigo y el bagazo de caña	
Piedra pómez suplementada con nutrientes	*Rhizobium*	• Inoculación en semillas • Mostró buenas propiedades de almacenamiento y manipulación, y pudo ser mezclado directamente con las semillas durante el proceso de siembra	Einarsson *et al*., 1993

2.2.1. Sólidos

Actualmente, los inoculantes en base a soportes sólidos son los más ampliamente difundidos. Se utilizan varios tipos de soportes como turba (Smith, 1992), carbón mineral (Paczkowski y Berryhill, 1979), mezclas suelo-vermicomposta (Benedetti *et al*., 1991), suelo-composta (Ormeño-Orrillo y Zúñiga Dávila, 1999a), suelo- carbón vegetal (Beck *et al*., 1993) y suelo- cáscara de arroz (Pramakik e Iswaran, 1973). En muchos casos se recurre a la esterilización de estos soportes en autoclave (Ormeño-Orrillo y Zúñiga Dávila, 1999b) o por irradiación gamma (Strijdom y Jansen Van Rensburg, 1981). Los soportes sólidos pueden presentarse en forma de polvo o gránulos, donde los factores más importantes que deben cumplir como obligación son su capacidad de retención de agua, pues esto favorece al incremento en la actividad de agua en el entorno que protege a la célula y el tamaño de partícula, que beneficia la adherencia en la planta, generalmente este tipo de vehículo es finamente molido y en campo es necesario usar un adhesivo. Sin embargo esta práctica eleva los costos de producción de los inoculantes y por otro lado la esterilización por calor, puede conllevar a la liberación o producción de compuestos tóxicos para los rizobios (Matos y Zúñiga, 2003).

2.2.1.1. Turba

Entre los soportes sólidos más frecuentemente usados se encuentra la turba, este material ha sido fácil de usar y aplicar, y mantiene la viabilidad celular entre las 10^9 células por gramo de soporte, sin embargo, la distribución geográfica de este recurso no es muy favorable, por lo que su uso se ve limitado (Estrada, 2008). Los inoculantes a base de turba se venden en

Brasil desde 1950 y hoy en día cuenta con la mitad del mercado de Brasil (Freire y Vernetti, 1999). El uso de inoculantes elaborados a base de turba también está restringido debido a las variaciones en sus propiedades físicas y químicas. Por otra parte, la turba es un material no renovable de origen fósil, extraído de un sistema natural muy frágil, las turberas (Fernandes *et al*., 2009).

La turba se forma por los restos de materia orgánica vegetal disgregada y parcialmente descompuesta, procedente de la antigua vegetación de áreas pantanosas, en las que como consecuencia de unas condiciones ambientales pobres en oxígeno y con exceso de agua se ha producido la mencionada descomposición parcial (Núñez, 2009).

La turba está compuesta, de manera general, por carbono 59%, hidrógeno 6%, oxígeno 33% y nitrógeno 2%. Se pueden clasificar en tres grupos: turbas rubias (esfango), negras y de color marrón. Las turbas rubias tienen un mayor contenido en materia orgánica y están menos descompuestas. Las turbas negras están más mineralizadas, tienen un menor contenido en materia y las de color marrón son las de transición entre éstas (Núñez, 2009).

2.2.1.2. Bagazo de caña

El bagazo de caña es un residuo fibroso proveniente de la molienda de la caña de azúcar, es rico en material celulósico y con algún valor nutricional para nutrición animal o vegetal (IFAI, 2005).

Ospina *et al*. (2007) definen al bagazo como el residuo lignocelulósico sobrante de los tallos de la caña de azúcar. Presenta una alta heterogeneidad de tamaño de partículas que oscilan entre 25 y 50 mm y está compuesto por fibra (45%), sólidos insolubles (2-3%), sólidos solubles (2-3%) y agua (50%). La fibra es la fracción sólida orgánica insoluble en agua, que contiene los elementos estructurales. Los componentes insolubles básicamente están compuestos por tierra, piedra y otros materiales incorporados durante el corte de la caña. Los sólidos solubles están compuestos por la sacarosa que no fue extraída en el proceso de molido, además de ceras y otros compuestos químicos. El agua presente en el bagazo resulta de la retención por mecanismos de absorción y capilaridad y su contenido tiene un efecto importante en los procesos tecnológicos utilizados para su aprovechamiento como materia prima.

Químicamente el bagazo está compuesto por celulosa, hemicelulosa y lignina (90%) y otros componentes (10%). La celulosa representa entre 41 y 44%, la hemicelulosa entre 25 y 27% y la lignina entre 20 y 22%. Los otros componentes encontrados en el bagazo incluyen componentes solubles en solventes orgánicos que representan 3% y compuestos solubles en agua que incluyen sacarosa y otros azúcares y polisacáridos que representan 7% (Ospina *et al*., 2007). En el cuadro 2.3 se muestran algunas de las propiedades físicas y químicas del bagazo de caña de azúcar.

Cuadro 2.3. Propiedades físicas y químicas del bagazo de caña de azúcar (Khavazi *et al*., 2007)

N (%)	0.42
P (%)	0.04
K (%)	0.16
Fe (mg/kg)	2370
Mn (mg/kg)	44
Cu (mg/kg)	5
Zn (mg/kg)	26
Conductividad eléctrica (ds/m)	1.62
pH	7.34
Materia orgánica (%)	53.0
Capacidad de retención de agua (%)	200

2.2.1.3. Perlita

La perlita es una piedra volcánica compuesta por silicato de aluminio poco hidratado. Para su uso comercial, es expuesta a un proceso de exfoliación a altas temperaturas que matan a los microorganismos. Sin embargo, si es necesario, puede ser fácilmente esterilizado sin riesgo de producir sustancias tóxicas (Daza *et al*., 2000).

El material recién extraído se muele y es transformado industrialmente mediante un tratamiento térmico con precalentado a 300-400°C y depositado en hornos a 1000°C. A estas temperaturas se evapora el agua contenida en sus partículas, obteniendo un material muy

ligero con alta porosidad, obteniendo un material de 128 Kg/m^3 de densidad (Baixauli y Aguilar, 2002).

Existen en el mercado diferentes tamaños de partícula, que da lugar a los distintos tipos de perlita, siendo uno de los más comercializados el tipo B-12, que está formado por fracciones media y gruesas junto con fracciones finas (Baixauli y Aguilar, 2002).

La perlita es un material inerte que no se descompone ni biológica ni químicamente. Al ser un silicato de aluminio, empleando soluciones nutritivas con pH inferior a 5, se puede producir una solubilización del aluminio y provocar fitotoxicidad. El pH es neutro o ligeramente alcalino inicialmente y puede ser corregido. Su salinidad es muy baja. Tiene muy baja capacidad de intercambio catiónico (1.5-2.5meq/100g) y capacidad tampón (Baixauli y Aguilar, 2002).

2.2.2. Líquidos

El uso de soportes líquidos es una estrategia que ha sido desarrollada recientemente, y en ésta se propone diluir un inóculo rizobiano en un medio que asegura la atenuación y estabilidad; Schuh (2005), propone la aplicación de geles como soportes, evaluando la viabilidad de las cepas durante un año de almacenamiento, todas las formulaciones empleadas fueron líquidas.

Fernandes (2009) plantea formulaciones con carboximetilcelulosa y almidón en relación 60-40% respectivamente, con un agente compatibilizante que es el MgO al 1%, en todas ellas el conteo de viabilidad de células/mililitro de los biofertilizante se evaluó exitosamente, utilizando *Bradyrhizobium japonicum,* durante un periodo de 165 días de almacenamiento.

Los soportes líquidos simplifican el proceso de producción, ya que no hay necesidad de preparar un adhesivo y su aplicación en semillas o sobre el suelo es más fácil. Sin embargo, la supervivencia bacteriana en este tipo soporte no es muy buena, ya que las bacterias carecen de la protección adecuada (Singleton *et al*., 2002). Este tipo de soportes se usan comúnmente en áreas grandes, principalmente con soya; y son más adecuados para la siembra mecánica (Freire y Vernetti, 1999).

2.2.2.1. Extracto de Levadura y Manitol (YEM)

El Extracto de Levadura y Manitol es el medio más comunmente usado para el crecimiento de rizobios y está hecho a partir de preparaciones acuosas de levadura o extracto de levadura comercial, en forma de polvo o pasta (Ormeño-Orrillo y Zúñiga-Dávila, 1998; Sherwood, 1972).

Para uso de laboratorio el medio estándar incluye una fuente de carbono (manitol), una fuente de nitrógeno (extracto de levadura) y sales minerales (Rebah *et al*., 2007). La composición del medio YEM se muestra en el cuadro 2.4.

Cuadro 2.4. Composición del medio YEM (Somasegaran y Hoben, 1985)

Reactivo	Cantidad
Agar bacteriológico	15g
Fosfato de potasio dibásico	0.5g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2g
Cloruro de sodio	0.1g
Extracto de levadura	1g
Manitol	10g
Agua destilada	1L

2.2.2.2. Almidón

El almidón puro es un polvo blanco, inodoro e insípido, que es insoluble en agua fría y alcohol. Se encuentra constituido de una mezcla de amilopectina (cerca del 75%) y amilosa (cerca del 25%), directamente extraída de material vegetal, tales como granos de maíz y de trigo (Parker y Ring, 2001).

Entre los soportes alternativos evaluados, los materiales poliméricos se destacan debido a su bajo costo, compatibilidad microbiana y fácil aplicación en campo (Denardin y Freire, 2000; Fernandes *et al*., 2009; Silva *et al*., 2009). La mezcla de carboximetil celulosa y almidón forma un polímero cuya composición ha demostrado la capacidad de mantener una alta concentración rizobiana hasta por seis meses de almacenamiento, y el inoculante producido con esos soportes muestra el mismo rendimiento que los inoculantes preparados a base de turba en condiciones de invernadero (Fernandes *et al*., 2009). Estas mezclas

también son factibles para producir inoculantes que contienen bacterias diazotróficas que se asocian con gramíneas importantes, tales como la caña de azúcar (Silva *et al*., 2009).

2.2.2.3. Carboximetil celulosa

La carboximetil celulosa (CMC) es un éster derivado de la celulosa, originado por la reacción de celulosa con hidróxido de sodio y con monocloroacetato de sodio, lo cual genera un polímero altamente higroscópico y viscoso, no tóxico para los humanos (Sanz *et al.*, 2005).

El almidón y la CMC son inmiscibles debido al alto peso molecular de ambos. Sin embargo, su similaridad molecular resulta en una afinidad parcial y contribuye a la estabilidad del gel formado (Suvorova *et al*., 1999), con características reológicas y químicas apropiadas para el almacenamiento rizobiano.

2.3. Zacate limón (*Cymbopogon citratus* L.)

2.3.1. Descripción botánica

Cymbopogon citratus L. es una hierba perenne de la familia Poaceae, robusta, de tallos muy ramificados de 1-2 m de altura, con nudos ceríferos. Sus ramas son alargadas y un tanto penduladas, con hojas aromáticas amontonadas cerca de la base, glaucas, de 60-100 cm de largo. Presentan inflorescencia amarilla en espiga. No florece o lo hace muy rara vez en el trópico (Soto *et al.*, 2002).

En una planta de *C. citratus* L. desarrollada (Figura 2.2), pueden encontrarse hojas cuyas longitudes varían desde 22 cm hasta 82 cm y la mayor proporción se encuentra entre los rangos de 34 a 46 cm, 58 y 70 cm (Soto *et al*., 1984). En cuanto a su sistema radical, un estudio sobre la distribución de este en un suelo ferralítico rojo típico mostró, que el mayor porcentaje de raíces se encuentra hasta los 0.30 m de profundidad en el suelo. En la distribución horizontal y para las distancias entre las hileras de las plantas de 0.90 m, la mayor proporción de raíces se halla a los 22.5 cm a partir del eje central del plantón (Soto *et al.*, 2002).

Figura 2.2. Planta de *Cymbopogon citratus* L.

2.3.2. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Filo: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Commelimidae

Orden: Cyperales

Familia: Poaceae

Género: *Cymbopogon*

Especie: *Cymbopogon citratus* L.

2.3.3. Generalidades

La naturaleza aromática del género *Cymbopogon* ha atraído la atención del hombre a lo largo de su historia. El agradable olor que poseen las diferentes especies de este género por sus contenidos en aceites esenciales ricos en compuestos terpénicos ha creado una demanda de estos para el desarrollo de la industria en Sri Lanka, India, Singapur, Malaya,

Java, Formosa, China, Francia, Alemania, África, Seychelle, Islas Comoros, Madagascar, Haití, Puerto Rico, México, Guatemala, Honduras, Salvador, Ecuador, Brasil y Argentina (Soto *et al.*, 2002).

Alrededor de 120 especies pertenecen a este género, con una variada combinación de compuestos en sus aceites esenciales, los cuales son usados en perfumería, cosméticos y preparaciones farmacéuticas, entre las que se distinguen por su importancia *C. nardus* L., *C. winterrianus* Jowitt., *C. flexiosus* Stapf., *C. martini* Roxb. y *C. citratus* L. (Soto *et al*., 2002).

Las hierbas del género *Cymbopogon* son perennes, una vez plantadas con un rendimiento económico de 3 a 5 años en dependencia de la fertilidad del suelo, condiciones climáticas y la práctica fitotécnica (Pareek y Gupta, 1985).

2.3.4. Origen y distribución

El Centro de origen de esta especie es el Sureste Asiático y al igual que el resto de las especies del género *Cymbopogon*, está distribuida en las regiones tropicales y subtropicales (Gupta y Jain, 1978).

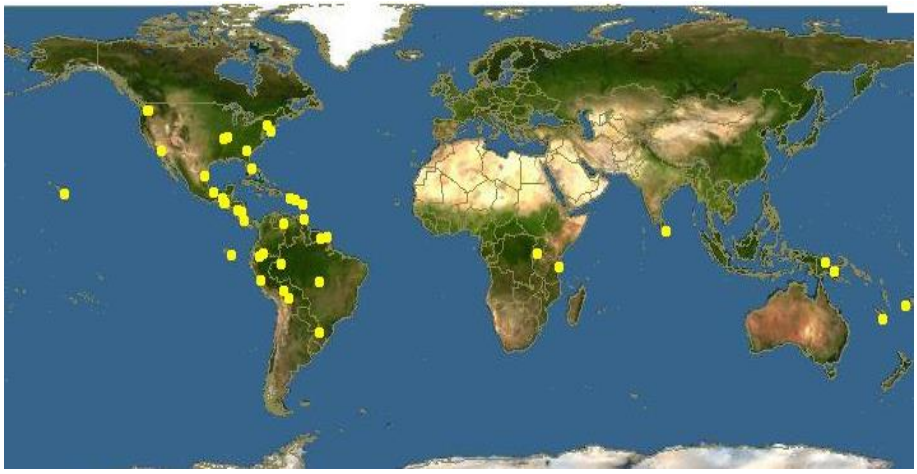


Figura 2.3. Mapa de distribución mundial de *Cymbopogon citratus* L.

2.3.5. Clima

El viento cálido es quizás uno de los elementos del clima que más afecta a la plantación al provocar un aumento de la evapotranspiración de las hojas, apareciendo de forma precoz necrosis apical en estas y fundamentalmente cuando no ha existido un suministro adecuado de agua a través del riego (Soto *et al*., 2002).

La calidad, cantidad y duración de la luz son características que juegan un papel preponderante en los rendimientos agrícolas de esta especie. La posición vertical de las hojas le permite una mayor cantidad de superficie foliar por unidad de superficie del suelo y una utilización mayor de la luz como consecuencia inmediata. Este factor conjuntamente con el aumento de la temperatura y duración del día, determina un rápido crecimiento en masa verde experimentado en cierta época del año, alcanzando la madurez en menos tiempo (Soto *et al*., 2002).

La mejor adaptación se encuentra en las zonas donde la temperatura media mensual es de 24-26°C, valores de temperatura por encima de 35 °C afectan su crecimiento, sobre todo cuando el suministro hídrico es deficiente. El mejor crecimiento del sistema radical se produce cuando la temperatura del suelo fluctúa entre 21-23 °C, retardándose su desarrollo por debajo de 21 °C como sucede en los meses de diciembre, enero y febrero (Soto *et al*., 2002).

2.3.6. Fenología

Pocas poaceas presentan en sus hojas aceites esenciales, las más importantes son precisamente las del género *Cymbopogon*. Las hojas no son realmente lampiñas pues a lo largo de los nervios se encuentran cerdas que le comunican cierta aspereza que se acentúa en las hojas secas y en los bordes, estas cerdas se lubrican. El color de las hojas es variable en cuanto al tono del verde en dependencia de donde se desarrolla, a veces se percibe un aspecto ceniciento. A plena exposición solar las hojas pueden presentar tonalidades violáceas que denotan la presencia de pigmentos antocianos (Soto *et al*., 2002).

Los rizomas presentan numerosos haces concéntricos y de él brotan las hojas más unidas y mediante la ramificación de ellos se forman grandes macollos o cepas. El período de brotación, al realizar la plantación es de 10 a 15 días, comenzando el ahijamiento a los 20-30 días y alcanzando la maduración fisiológica a los 180 días, siempre que la plantación haya recibido las atenciones fitotécnicas de fertilización, control de malezas, riego y control fitosanitario (Soto *et al*., 2002).

2.3.7. Plantación, fecha y distancia

La mejor época de plantación para esta especie son los meses de marzo a mayo porque permite realizar la primera cosecha a partir de los 9 meses con rendimiento mínimo de 18-22

t/ha de masa verde y una concentración de aceite esencial de 0.3-0.5 % rico en citral, logrando la plantación una altura de 1.10-1.20 m debido a las condiciones climáticas predominantes en ese período. Aunque se puede plantar en cualquier época del año, las plantaciones realizadas en noviembre-febrero se desarrollan con lentitud en su primera etapa alcanzando la madurez más tardíamente (10-11 meses). Si la plantación se efectúa en los meses de julio-agosto, septiembre, octubre, la plantación presentará un buen crecimiento inicial, pero aminora el mismo a partir del mes de noviembre, obteniendo la madurez más tardíamente. Una plantación realizada en junio puede resultar buena en rendimiento de biomasa y aceite (Soto *et al.*, 2002).

Si la cosecha se va a realizar después de los 12 meses o más, el marco de plantación a emplear es de 1 x 1 m para una población de 10 000 propágulos/ha, obteniendo un rendimiento entre 2-2.7 kg/planta. Es recomendable que la profundidad de la plantación sea de 25-30 cm, tapando el propágulo hasta 1/3 de su longitud, lo que permitirá un mayor grado de ahijamiento y sobre todo un menor número de hijuelos aéreos que son las causas del debilitamiento de la planta madre en detrimento de la macolla, además de afectar el tiempo de vida útil de la plantación al reducirse el número de cosechas económicamente rentables (Soto *et al.*, 2002).

2.3.8. Fertilización

El cultivo de esta especie requiere importantes suministros de nitrógeno, fósforo, potasio y materia orgánica para obtener buenos rendimientos. Si el aceite esencial se va a utilizar para la fabricación de medicamentos, no deben aportarse estos elementos a través de los fertilizantes inorgánicos, la única vía autorizada es la fertilización orgánica, lo que implicaría una dosis mayor por hectárea, para suplir las deficiencias nutricionales y mejorar las propiedades físicas del suelo.

Los estudios de fertilización realizados recomiendan una dosis de fertilización de 100 kg/ha de nitrógeno al año en dos aplicaciones. La primera a los dos meses de plantado y la segunda después de la cosecha. Se recomienda urea al 46 %, 50 kg/ha de potasio y fósforo al año aplicado como fertilización de fondo antes de realizar la plantación (Soto *et al.*, 2002).
Es un cultivo exigente en la fertilización orgánica para lograr óptimos rendimientos, la cual debe ser aplicada de forma localizada en el surco antes de la plantación con una dosis de 20 t/ha. Con el objetivo de disminuir la dosis de fertilizantes químicos estos se pueden suplir con

materia orgánica tales como la cachaza, estiércol y otros aplicándola de forma localizada en el fondo del surco antes de realizar la plantación (Soto *et al.*, 2002).

2.3.9. Aceite esencial de zacate limón (*Cymbopogon citratus* L.)

Cymbopogon citratus L. se utiliza en medicina tradicional como expectorante y antigripal, y sus preparados se utilizan por sus efectos ansiolíticos, hipnóticos, analgésicos y diuréticos. Esta planta ha sido estudiada en Cuba (Silva *et al*., 1991) y Brasil (Hernández *et al.*, 1998).

Los miembros del género *Cymbopogon* destacan por su contenido de aceites esenciales, los cuales varían en su composición y concentración dependiendo de la especie y las condiciones de crecimiento de los cultivos (Chisowa *et al.*, 1998; Kulkarni *et al*., 1997; Rao y Sunita, 1992; Rahman *et al.*, 1992; Wijesekera, 1981).

El cultivo de esta especie requiere importantes suministros de nitrógeno, fósforo, potasio y materia orgánica para obtener buenos rendimientos. Si el aceite esencial se va a utilizar para la fabricación de medicamentos, no deben aportarse estos elementos a través de los fertilizantes inorgánicos, la única vía autorizada es la fertilización orgánica, lo que implicaría una dosis mayor por hectárea, para suplir las deficiencias nutricionales y mejorar las propiedades físicas del suelo (Soto *et al.*, 2002).

Los aceites esenciales son productos volátiles de composición química compleja ampliamente difundidos en el reino vegetal (Mizrahi, 1967). En el aceite esencial de *C. citratus* L. predomina el aldehído citral (mezcla de geranial y neral) alcanzando concentraciones de 75%. El citral es precursor de iononas, vitamina A, metilionona y citronellol (Quintero *et al.*, 1999). Estos Metabolitos secundarios se extraen de las plantas por diversos métodos según su naturaleza y el órgano vegetal donde se encuentran; así por ejemplo, el aceite de cáscaras de cítricos se puede extraer por prensado mecánico y arrastre de vapor, otros se extraen por medio de solventes, aplicando fluidos supercríticos y, en el caso de *C. citratus* L., es recomendable realizar la extracción por hidrodestilación (Mizrahi, 1967).

2.3.9.1. Factores que afectan el rendimiento y composición de aceite esencial

Nair (1982) señala que las condiciones óptimas para el desarrollo de *Cymbopogon citratus* L. son calor y clima húmedo con plena exposición solar y lluvia de 2500- 2800 mm al año uniformemente distribuidas.

Handique y Gupta (1985) indican que este cultivo en las condiciones de Jorhat, India mostró gran variación en el contenido de aceite esencial de un mes a otro, durante todo el año. Al relacionar los rendimientos de aceite con las variaciones de temperatura encontró que el aumento o disminución de ésta, tiene una pequeña relación con el contenido mensual de aceite. La lluvia, por otra parte, por sí misma, no guardó una relación con el contenido de aceite, así como la humedad relativa. Sin embargo, la humedad del suelo sí tuvo relación con el contenido de aceite en comparación con otros factores.

La condición estacional acumulativa y su variación siempre estuvo relacionada en algún grado con el patrón de variación total del contenido de aceite, y algunos factores que aún son desconocidos también influyen sobre la variación del contenido de aceite. Estos factores desconocidos pueden ser una variación de algunas actividades bioquímicas o fisiológicas rítmicas relacionadas con la síntesis del aceite, que necesita una profunda investigación (Soto *et al.*, 2002).

2.4. *Rhizobium* como endófitos y como rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas no leguminosas

Las bacterias endofíticas son aquellas que colonizan las plantas internamente, sin dañarlas. Las bacterias endofíticas son aisladas comúnmente de tejidos internos de plantas, directamente por centrifugación o indirectamente desinfectando la superficie de la planta (Jeger y Spence, 2001).

2.4.1. Rizobacterias endofíticas

La definición de endófitos y las consideraciones técnicas para su aislamiento y caracterización han sido revisadas extensivamente (Reinhold-Hurek, 1998 a y b; Hartman *et al*., 2000; James, 2000). En leguminosas no noduladas, los rizobios fueron encontrados comúnmente dentro de las raíces sin formación de nódulos (Allen y Allen, 1981). Éste es probablemente el primer reporte de rizobios como endófitos.

Los rizobios también han sido encontrados como colonizadores comunes de la rizósfera de un amplio rango de plantas (Rovira, 1961; Höflich *et al*., 1995; Chabot *et al*., 1996) y también como bacterias endofíticas no solamente en leguminosas, sino también en no leguminosas (Sturz *et al*., 1997; O´ Callaghan, 1999).

Los rizobios muestran efectos promotores del crecimiento en plantas, lo cual puede ser debido a la solubilización de fosfato, producción de hormonas y otros mecanismos (Höflich *et al*., 1995; Yanni *et al*., 2001). Cepas de *R. Undicola* (anteriormente *Allorhizobium*) fueron aisladas como endófitos plantas de banana y se ha encontrado que son rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) de plántulas derivadas de cultivos de tejidos (Sessitsch *et al*., 2002).

Hay indicios de algún grado de adaptación entre plantas locales y rizobios endofíticos (Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero, 2001). En Brasil se han encontrado efectos benéficos de endófitos locales sobre el rendimiento de plantas, mientras que cuando varios aislados chinos fueron probados con variedades de arroz californiano, los rendimientos no se incrementaron (Phillips et al., 2000). Además se encontraron bacterias del género *Azorhizobium* en un estudio sobre bacterias endofíticas de razas nativas de arroz en Nepal (Engelhard *et al*., 2000). En este caso no hubo una clara asociación de rizobios endofíticos con leguminosas.

En África, se encontraron bacterias del género *bradyrhizobium* fotosintéticas que son endófitos naturales del arroz silvestre. Estos *bradyrhizobium* fotosintéticos colonizaron la superficie de la raíz y también espacios entercelulares, pero raramente se encontraron en espacios intracelulares (Chaintreuil *et al*., 2000). Además, cepas de *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium*, aisladas de *Sesbania aculeata* y *Aeschynomene fluminensis* colonizaron arroz endofíticamente. Su contribución al crecimiento del arroz está por ser establecida (Tan *et al*., 2001).

Hace 700 años surgió en Egipto la tradición de cultivar arroz en rotación con trébol de Alejandría, esto dio el fundamento para la búsqueda de rizobios como endófitos del arroz (Yanni *et al*., 1997). La rizósfera del campo donde fue cultivado el arroz en rotación con el trébol de Alejandría contenía cerca de 1.7×10^6 *R. leguminosarum* bv. *trifolii* autóctonos por gramo de suelo (Yanni *et al*., 1997). Esos rizobios noduladores del trébol, invadieron naturalmente las raíces del arroz y alcanzaron una población interna de cerca de 1.1×10^6 endófitos por gramo de peso fresco de arroz (Yanni *et al*., 1997). Se ha publicado una revisión sobre este proyecto multinacional indicando que la rotación arroz-trébol reemplazó del 25 al 33% de la fertilización de nitrógeno requerida en cultivos donde sólo se sembró arroz (Yanni *et al*., 2001).

R. etli es un endófito natural del maíz en cultivos tradicionales de México, donde hay una enorme riqueza de cepas de *R. etli* que nodulan *Phaseolus vulgaris* L. (Piñero *et al*, 1988; Martínez-Romero, 2002). La agricultura tradicional mexicana y peruana está basada en asociaciones maíz-frijol. Éste tipo de agricultura requiere un buen desarrollo de la compatibilidad entre el maíz y el frijol, y sus ventajas han sido documentadas (Souza *et al*., 1997). Se han obtenido buenas respuestas a la inoculación con *R. etli* de razas originales de maíz, así como de variedades de maíz no mejoradas, cuando se cultivaron en cámaras de crecimiento y en invernadero. Los efectos fueron causados probablemente por sustancias promotoras del crecimiento tales como hormonas o lumicromo (Gutiérrez- Zamora y Martínez- Romero, 2001) o por una supresión de patógenos. El papel de la fijación de nitrógeno en esta asociación está bajo estudio en la actualidad.

El descubrimiento de la fijación de nitrógeno en caña de azúcar abrió un nuevo camino en la investigación de esta área (Ruschel *et al*., 1975; Boddey *et al*., 1991; Urquiaga *et al*., 1992). Para obtener niveles considerables de fijación de nitrógeno en caña de azúcar, las plantas requieren de condiciones óptimas de agua, temperatura, fosfato y otros nutrientes (Boddey *et al*., 1995). La capacidad de la caña de azúcar para fijar nitrógeno ha sido atribuida al hecho de que se han usado bajos niveles de fertilización química en este cultivo, en Brasil por un largo tiempo. Existen diversas investigaciones sobre endófitos de caña de azúcar (Boddey *et al*., 1995; Baldani *et al*., 2000) y reportes sobre su localización *in planta* (James *et al*., 1994; James y Olivares, 1998; Fuentes-Ramírez *et al*., 1999). Parece ser que las comunidades de bacterias son responsables de la fijación de nitrógeno (Baldani *et al*., 2000).

El posible mecanismo de entrada de las bacterias endofíticas dentro de los tejidos de plantas ha sido revisado (James *et al*., 1994; Reddy *et al*., 1997). Es un descubrimiento común que las células de las plantas que son ocupadas por endófitos mueren, lo cual constituye un importante contraste con la situación de las bacterias que se encuentran dentro de los nódulos (Hurek et al., 1994; Sprent y James, 1995; Reddy *et al*., 1997). Poco se conoce de los genes rizobiales requeridos para penetrar en una planta como un endófito, pero parece ser que los genes *nod* no son requeridos (Gough *et al*., 1997) y que los flavonoides mejoran este proceso (Gough *et al*., 1997; Webster *et al*., 1998).

2.4.2. Empleo de *Rhizobium* como bacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR)

Es bien conocido que un considerable número de especies bacterianas asociadas con la rizósfera de las plantas son capaces de ejercer un efecto benéfico en el crecimiento de plantas. Este grupo de bacterias llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas (PGPR) incluye el género *Rhizobium* (Sessitsch *et al*., 2002). Estas bacterias se caracterizan por su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje de las plantas. La estimulación indirecta del crecimiento de plantas incluye una variedad de mecanismos por los cuales la bacteria inhibe la acción fúngica sobre el crecimiento y desarrollo de la planta (Hassan *et al*., 1997; Essalmani y Lahlou, 2003). La estimulación directa puede incluir la fijación de nitrógeno (Sessitsch *et al*., 2002), la producción de hormonas (Perrine *et al*., 2004), de enzimas (Mayak *et al*., 2004) de sideróforos (Van Rossum *et al*., 1994; Carson *et al*., 2000) y solubilización de fosfatos (Rodriguez y Fraga, 1999).

La capacidad PGPR de *Rhizobium* ha sido estudiada por varias décadas (Chabot *et al*., 1996; Chakravarty y Purkayastha, 1984; Hassan *et al*., 1997; Rodriguez y Fraga, 1999), sin embargo, en los últimos años este estudio ha sido intensificado (Dey *et al*., 2004; Essalmani y Lahlou, 2003; Mhadhbi *et al*., 2004; Perrine *et al*., 2004; Yanni *et al*., 2001) porque la agricultura sustentable demanda mejorar la eficiencia de la fijación de nitrógeno a través del uso de bacterias competitivas capaces de extender la ventaja de la simbiosis a otros cultivos no leguminosas.

Perrine *et al*., (2004) encontraron cepas de *Rhizobium* productoras de altas concentraciones de ácido indol acético que estimularon el crecimiento de semillas de arroz. Indican que su efecto es similar al ácido indol acético exógeno.

Numerosos estudios han demostrado el uso de rizobios como bacterias fijadoras del N y como promotoras del crecimiento de plantas no leguminosas. Por ejemplo *R. leguminosarum* bv *trifolii* y cepas de *Bradyrhizobium* se han encontrado en raíces de arroz y *R. etli* en raíces de maíz. Los rizobios pueden también introducirse y colonizar otras plantas, tal como sucede con *Azorhizobium caulinodans* en las raíces de la oleaginosa *Brassica napus* L. Estas asociaciones entre rizobios y plantas no leguminosas pueden mejorar el crecimiento de las plantas aunque no se ha demostrado que sea mediante la fijación de nitrógeno (Wang *et al*.,

2002). Antoun *et al*. (1998) reportaron algunas evidencias directas de la colonización de raíces y la actividad PGPR de rizobios con no leguminosas.

Chabot *et al*. (1996), Yanni *et al*. (2001) y Perrine *et al*. (2004) sostienen que las moléculas promotoras del crecimiento como el ácido indol acético, las giberelinas y las citoquininas producidas por los rizobios, presentes ya sea en la rizósfera o en los tejidos de las plantas estimulan el mayor desarrollo de la raíz y realizan la capacidad de absorción de nutrientes de la raíz en beneficio de la planta no leguminosa. Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero (2001) encontraron incrementos de 42% de la materia seca de la parte aérea y de 49% de la materia seca de raíz en plantas de maíz inoculadas con *R. etli*. Dichos autores mencionan que el efecto benéfico de *R. etli* en plantas de maíz puede deberse a los mecanismos descritos anteriormente.

Una inmensa diversidad de bacterias noduladoras e incluso nuevos grupos de éstas, han sido descubiertas recientemente. Queda por verse si estos nuevos descubrimientos contribuyen a la fijación de nitrógeno global y si estas nuevas bacterias representan cepas potenciales para ser usadas como inoculantes. Históricamente, la diversidad rizobiana ha sido determinada a partir de aislados de nódulos; sin embargo, estudios recientes indican que en el suelo existe una mayor diversidad de rizobios de los que han sido descritos. Los rizobios son considerados ahora como endófitos o rizobacterias de plantas no leguminosas, algunas de las cuales muestran efectos promotores del crecimiento en plantas. Sin embargo, se requieren más investigaciones para dilucidar su diversidad, mecanismos de interacción y contribución en la fijación de nitrógeno y el crecimiento de las plantas (Sessitsch *et al*., 2002).

En el cuadro 2.5, se muestra un reporte de bacterias endófiticas y las plantas de las cuales fueron aisladas.

Cuadro 2.5. Bacterias endófitas y plantas de las que fueron aisladas (Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006)

Filo	**Endófitas**	**Planta**	**Referencia**
	Azorhizobium caulinodans	Arroz	Engelhard *et al*., 2000
	Azospirillum brasilense	Banana	Weber *et al*., 1999
	Azospirillum Amazonense	Banana, Piña	Weber *et al*., 1999
	Bradyrhizobium japonicum	Arroz	Chantreuil *et al*., 2000

α-Proteobacteria	*Gluconobacter diazotrophicus*	Caña de azúcar, café	Cavalcante y Döbereiner, 1988; Jiménez-Salgado *et al*., 1997
	Methylobacterium mesophilicuma	Cítricos	Araujo *et al*., 2002
	Methylobacterium Exthorquens	Pino, cítricos	Araujo *et al*., 2002; Pirttilä *et al*., 2004
	Rhizobium leguminosarum	Arroz	Yanni *et al*., 1997
	Rhizobium (Agrobacterium) radiobacter	Zanahoria, arroz	Surette *et al*., 2003
	Sinorhizobium meliloti	Batata	Reiter *et al*., 2003
	Sphingomonas paucimobilisa	Arroz	Engelhard *et al*., 2000
β-Proteobacteria	*Azoarcus* sp.	Arroz, pasto	Engelhard *et al*., 2000; Reinhold-Hurek *et al*., 1993
	Burkholderia pickettiia	Maíz	Mc Inroy y Kloepper, 1995
	Burkholderia cepacia	Cítricos	Araujo *et al*., 2001; Barac *et al*., 2004
	Burkholderia sp.	Banana, piña, arroz	Weber *et al*., 1999; Engelhard *et al*., 2000
	Chromobacterium violaceuma	Arroz	Phillips *et al*., 2000
	Herbaspirillum seropedicae	Caña de azúcar, arroz, maíz, sorgo, banana	Olivares *et al*., 1996; Weber *et al*., 1999
	Herbaspirillum rubrisulbalbicans	Caña de azúcar	Olivares *et al*., 1996
	Citrobacter sp.	Banana	Martínez *et al*., 2003
	Enterobacter spp.	Maíz	Mc Inroy y Kloepper, 1995
	Enterobacter sakazakiia	Soya	Kuklinsky-Sobral *et al*., 2004
	Enterobacter cloacaea	Cítricos, maíz	Araujo *et al*., 2001; Hinton *et al*., 1995
	Enterobacter agglomeransa	Soya	Kuklinsky-Sobral *et al*., 2004
	Enterobacter asburiae	Batata	Asis y Adachi, 2003
	Erwinia sp.	Soya	Kuklinsky-Sobral *et al*., 2004
	Escherichia coli	Lechuga	Ingham *et al*., 2005
	Klebsiella sp.	Trigo, batata, arroz	Engelhard *et al*., 2000; Iniguez *et al*., 2004; Reiter *et al*., 2003
	Klebsiella pneumoniae	Soya	Kuklinsky-Sobral *et al*., 2004
	Klebsiella variicola	Banana, arroz, maíz, caña de	Rosenblueth *et al*., 2004

γ-Proteobacteria		azúcar	
	Klebsiella terrígena	Zanahoria	Surette *et al*., 2003
	Klebsiella oxytoca	Soya	Kuklinsky-Sobral *et al*., 2004
	Pantoea sp.	Arroz, soya	Kuklinsky-Sobral *et al*., 2004; Verma *et al*., 2004
	Pantoea agglomerans	Cítricos, batata	Araujo *et al*., 2001; Asis y Adachi, 2003
	Pseudomonas chlororaphis	Zanahoria	Sturz y Kimpinsky, 2004; Surette *et al*., 2003
	Pseudomonas putida	Zanahoria	Surette *et al*., 2003
	Pseudomonas fluorescens	Zanahoria	Surette *et al*., 2003
	Pseudomonas citronellolis	Soya	Kuklinsky-Sobral *et al*., 2004
	Pseudomonas synxantha	Pino	Pirttilä *et al*., 2004
	Salmonella entérica	Zanahoria, rabano, tomate	Cooley *et al*., 2003; Guo *et al*., 2002; Islam *et al*., 2004
	Serratia sp.	Arroz	Sandhiya *et al*., 2005
	Serratia marcescens	Arroz	Gyaneshwar *et al*., 2001
	Stenotrophomonas	Pasto	Dalton *et al*., 2004
Firmicutes	*Bacillus* spp.	Cítricos	Araujo *et al*., 2001
	Bacillus megaterium	Maíz, zanahoria, cítricos	Araujo *et al*., 2001; Mc Inroy y Kloepper, 1995; Surette *et al*., 2003
	Clostridium sp.	Pastura	Miyamoto *et al*., 2004
	Paenibacillus odorifer	Batata	Reiter *et al*., 2003
	Staphylococcus saprophyticus	Zanahoria	Surette *et al*., 2003
Bacteroides	*Sphingobacterium* sp.	Arroz	Phillips *et al*., 2000
Actinobacteria	*Arthrobacter globiformis*	Maíz	Chelius y Triplett, 2000
	Curtobacterium flaccumfaciens	Cítricos	Araujo *et al*., 2002
	Kocuria varians	Caléndula	Sturz y Kimpinsky, 2004
	Microbacterium esteraromaticum	Caléndula	Sturz y Kimpinsky, 2004
	Microbacterium testaceum	Maíz	Zinniel *et al*., 2002
	Mycobacterium sp.	Trigo, pino	Conn y Franco, 2004; Pirttilä *et al*., 2005
	Nocardia sp.	Cítricos	Araujo *et al*., 2002
	Streptomyces	Trigo	Coombs y Franco, 2003

2.5. Mecanismo de entrada de bacterias endofíticas en tejidos de plantas

2.5.1. Precolonización

Antes de la colonización endofítica, aparecen fuertes interacciones entre la planta hospedadora y la bacteria endofítica, y parecen ser un prerrequisito significativo para un exitoso establecimiento de la asociación planta-bacteria endofítica. Con excepción de las bacterias endofíticas transmitidas por semillas, una exitosa colonización endofítica ocurre a través de varias etapas importantes, incluyendo la búsqueda del hospedador, reconocimiento, colonización de la superficie de la planta y entrada al tejido interno de la planta. Con respecto a las fases de colonización externa e interna características para la mayoría de las bacterias endofíticas, su asociación con plantas puede ser dividida en precolonización y postcolonización. La precolonización incluye el movimiento bacterial hacia la raíz, unión de la bacteria a la superficie de la raíz, proceso de reconocimiento planta-bacteria en la superficie de la raíz y finalmente la penetración de la bacteria en la raíz. Mientras que la postcolonización considera la multiplicación bacteriana y la localización dentro del tejido de la raíz, incluyendo potenciales efectos benéficos para la planta. La importancia de cada uno esos mecanismos no es clara todavía y solamente algunos de ellos podrían ser esenciales para establecer una exitosa asociación planta-endófito (Jeger y Spence, 2001).

2.5.1.1. Movimiento

Las bacterias endofíticas probablemente encuentran a su hospedador por quimiotaxis, encuentro accidental o una mezcla de los dos. Los exudados liberados por la raíz inician un gradiente de nutrientes, lo cual se cree que dirige a las potenciales bacterias endofíticas a la superficie de la raíz. Por ejemplo, la migración de bacterias benéficas asociadas con plantas, tales como *Pseudomonas fluorescens* y *Azospirillum brasilense* hacia las raíces del trigo fue estimulada por varios genotipos de trigo y por atrayentes sintéticos (Bashan, 1986). El contacto al azar con la raíz podría ser un importante y a veces descuidado prerrequisito para la penetración, especialmente cuando se consideran los efectos de los factores abióticos como precipitación, pueden tener sobre los movimientos de la bacteria dentro del suelo (Jeger y Spence, 2001).

2.5.1.2. Unión

De la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se sabe que la unión de la rizobacteria al rizoplano es esencial para la penetración bacteriana (Vance, 1983). La unión mediada por los

polisacáridos de la superficie de la bacteria con las lectinas de la superficie de la raíz, es muy específico y solamente aquellas bacterias unidas a la superficie de la raíz pueden convertirse en simbiontes. Únicamente se puede suponer que un proceso similar ocurre en las bacterias endofíticas y hay datos muy limitados para sustentar esta hipótesis.

2.5.1.3. Reconocimiento

Cuando una bacteria endofítica se encuentra en la proximidad de una planta, surgen ciertas incógnitas en cuanto a la presencia de mecanismos bacterianos para el reconocimiento de una planta hospedadora adecuada ó de mecanismos de las plantas para el reconocimiento de un adecuado endófito. Si la etapa de reconocimiento se desarrolla, entonces se establece una forma específica de contacto entre un elicitor liberado por la bacteria y un correspondiente receptor de la planta hospedadera. De acuerdo a Vance (1983), este contacto puede ocurrir extracelularmente como un evento anticipado dentro de la asociación planta-endófito o puede ocurrir más tarde a nivel intercelular o intracelular. Además, el resultado del reconocimiento puede ser positivo, resultando en una exitosa asociación planta-endófito; o negativo, culminando en respuestas de la planta tales como hipersensibilidad, resistencia inducida, acumulación de fitoalexinas, deposiciones de la pared celular y formación de papilas, que impiden la entrada de la bacteria a la planta.

Las baterías endofíticas son conocidas por moverse sistemáticamente dentro de la planta e incluso colonizar diferentes tejidos del hospedador, indicando que no se presentan mecanismos de inmovilización en la planta. Por lo tanto se concluye que si el proceso de reconocimiento entre la bacteria endofítica y la planta aparece, esto no necesariamente desencadena mecanismos de defensa de la planta o que las bacterias endofíticas son capaces de inhibir o pasar por alto tales mecanismos de defensa. La importancia del proceso de reconocimiento en las asociaciones planta-endófito aún está inconclusa y requiere de una mayor investigación para un mejor entendimiento (Jeger y Spence, 2001).

2.5.1.4. Penetración

Las principales rutas de entrada de las bacterias endofíticas son: aberturas naturales tales como hidátodos, estomas y lenticelas; heridas causadas por abrasión con partículas del suelo, daño por patógenos y formación de raíces laterales; microporos; y daño mecánico abiótico. Sin embargo, se cree que la primera y probablemente más importante entrada para las bacterias endofíticas es a través heridas y microporos presentes en etapas tempranas del

desarrollo de la raíz. El tejido de las raíces jóvenes es usualmente débil y no diferenciado y aún no puede prevenir la entrada de bacterias endofíticas a capas más profundas del tejido de la raíz (Jeger y Spence, 2001).

Para llevar a cabo los modos de entrada anteriormente mecionados, la bacteria toma ventaja de las aberturas naturales o artificiales presentes en la superficie de la planta. Sin embargo, la incógnita sigue siendo si la penetración bacteriana es pasiva o es un proceso más activo mediado por la misma bacteria endofítica y/o la planta. Puede asumirse una penetración pasiva por aberturas naturales tales como hidátodos y estomas, donde la entrada es apoyada por una película de agua ininterrumpida que se extiende desde la superficie de las hojas hasta el hidátodo o estoma. Las células bacterianas que han alcanzado al hidátodo o estoma pueden colonizar fácilmente la superficie de la hoja (Jeger y Spence, 2001).

Capítulo III

Procedimiento o método

3.1. Conservación de las cepas

Las cepas rizobianas empleadas en esta investigación fueron: *Rhizobium* sp. LBP2 y *Rhizobium etli* CFN 42. La cepa LBP2 fue proporcionada por el cepario del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Dicha cepa fue aislada de la leguminosa arbustiva *Calliandra grandiflora* (Villalobos-Escobedo, 2011). La cepa CNF 42 fue proporcionada por el Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, ubicado en la ciudad de Cuernavaca, Morelos, México.

Para su conservación, ambas cepas fueron resembradas en placas con agar YEM (Extracto de Levadura y Manitol), las cuales fueron incubadas a 28°C durante 48 h (Toledo *et al.*, 2003). Posteriormente se realizó una resuspensión bacteriana colocando de una a dos asadas en tubos estériles con 10 ml de medio PY (Peptona-Extracto de Levadura) y se agregaron 10 ml de resuspensión a un matraz Erlenmeyer con 90 ml de medio YEM, el cual permaneció en agitación constante (120 rpm) a 28°C durante 24 h. Se colocaron 400 µl de glicerol al 60% y 400 µl de suspensión bacteriana (procedente del matraz semilla) en tubos Eppendorf y se agitaron con ayuda de un vortex, posteriormente fueron etiquetados y almacenados en un congelador a -20°C.

La resiembra de los microorganismos se llevó a cabo periódicamente en tubos con medio PY (Peptona-Extracto de Levadura), incubados a 28°C durante 48 h, para posteriormente obtener una resuspensión bacteriana agregando 10 ml de medio YEM estéril a cada tubo (Rincón *et al.*, 2009).

Por otro lado, el semilleo se realizó en matraces Erlenmeyer de 300 ml con 60 ml de medio YEM (Somasegaran y Hoben, 1985) partiendo de un inóculo del 15 %. Los matraces se incubaron a 28°C con agitación constante (120 rpm) por 24 h.

3.2. Estandarización del inóculo

La estandarización se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer con capacidad de 2 L conteniendo 400 ml de medio YEM (1/5 del volumen total), partiendo de un inóculo del 15% procedente de matraz semilla, con una aireación de 5 vvm. Las unidades experimentales utilizadas, fueron diseñadas de forma semejante a un fermentador airlift (Figura 3.1).

Figura 3.1. Matraces fermentador utilizados durante la estandarización de las cepas CFN 42 y LBP2

Se realizó el monitoreo del crecimiento celular durante 48 horas. Cada 3 horas se realizó el conteo por la técnica de diluciones en serie y siembra en placa y simultáneamente se evaluó la D.O. (Densidad Óptica) de cada muestra en un espectrofotómetro UV-2100 a una longitud de onda de 600 nm (Ventura *et al.*, 2009). Cada evaluación se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos se emplearon en la construcción de la curva patrón de cada microorganismo.

3.3. Determinación de parámetros cinéticos

La cinética de crecimiento de *Rhizobium* sp. LBP2 y *Rhizobium etli* CFN 42, se llevó a cabo en matraces fermentador de 2 L con 400 ml de medio YEM, partiendo de un inóculo del 15% (60 ml) procedente del matraz semilla, empleando una aireación de 5 vvm (Figura 3.2).

Se monitoreó el crecimiento de cada microorganismo durante 48 horas, tomando muestras cada 3 horas. Posteriormente se leyeron las muestras en un espectrofotómetro UV-2100 a una longitud de onda de 600 nm, cada muestra se leyó por triplicado (Ventura *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos fueron transformados a concentración celular (ufc/ml) empleando la ecuación generada por la curva patrón del microorganismo en cuestión y posteriormente

empleados para la determinación de los parámetros cinéticos μ_{max}, td, X_0, X_{max} y n° de generaciones (Scriban, 1985).

Figura 3.2. Cinética de crecimiento de las cepas CFN 42 y LBP2

3.4. Obtención de los soportes

Los materiales empleados como soportes fueron los siguientes:

- Turba marca PROMIX 1100 de origen canadiense
- Bagazo de caña, proveniente del ingenio azucarero del municipio de Pujiltic, Chiapas
- Perlita mineral expandida marca “Perlita de la Laguana” variedad Premium
- Medio YEM (Extracto de Levadura y Manitol), suplementado con 10g/L de Manitol
- Carboximetil celulosa marca COSMOPOLITA
- Almidón (Reactivo)

3.5. Caracterización fisicoquímica de los soportes

3.5.1. Sólidos

Para todas las pruebas, los soporte sólidos (turba y bagazo con perlita) fueron previamente molidos y tamizados en malla 100 para homogeneizar el tamaño de partícula (Estrada, 2008), posteriormente fueron esterilizados a 121 °C, 15 lb/pulg^2 por 40 min (Daza, 2000; Khavazi *et al.*, 2007). Se determinaron los parámetros de pH, capacidad de retención de agua, humedad y friabilidad.

3.5.1.1. pH

Para la determinación de pH se tomó una muestra de 10 g de cada repetición, por soporte y se mezcló con 90 ml de agua destilada hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente se tomó la lectura del pH con un potenciómetro de la marca Bench Meter® (Figura 3.3), las lecturas se realizaron por triplicado para cada muestra. Los soportes sólidos que no se encontraban a un pH neutro fueron ajustados con $CaCO_3$ en polvo (Daza *et al.*, 2000), y los líquidos con soluciones de HCl a diferentes normalidades (0.1, 0.2 y 0.3 N).

Figura 3.3. Potenciómetro Bench Meter® utilizado para medir el pH

3.5.1.2. Capacidad de retención de agua

Se pesó una muestra de 50 g del soporte sólido, la cual fue colocada en un colador y se le agregó agua destilada abundante hasta humedecer la muestra en su totalidad. Se dejó reposar la muestra durante 24 horas hasta que el agua dejó de lixiviar. Posteriormente se colocó la muestra en un trozo de papel aluminio y se introdujo en un horno a 70°C hasta llegar a peso constante (Somasegaran y Hoben, 1985). El procedimiento se realizó por duplicado.

La capacidad de retención de agua fue calculada mediante la siguiente fórmula:

%CRH= (Pi- Pf/Pf) x 100

Donde:

%CRH = Porcentaje de capacidad de retención de agua

Pi= Peso inicial

Pf= peso final (Peso cte. – peso papel)

3.5.1.3. Humedad

Se pesó una muestra con 10 g de soporte sólido se colocó en un trozo de papel aluminio a peso constante. Posteriormente la muestra se mantuvo en un horno a 70°C hasta llegar a peso constante. El procedimiento se realizó por triplicado para cada soporte (A.O.A.C., 1990).

Se realizó el cálculo de porcentaje de humedad usando la siguiente fórmula:

$$\frac{P_i - P_f}{P_i} X\ 100 = \%\ \text{de humedad}$$

Donde:

P_i = Peso inicial

P_f = Peso final

3.5.1.4. Prueba de friabilidad

Se tomó una muestra de 1 g de soporte y se le agregó agua progresivamente de 0.5 en 0.5 ml y homogenizando la mezcla sin que el soporte pierda su consistencia sólida. La friabilidad de cada soporte se expresa en ml/g, se obtiene dividiendo los mililitros de líquido agregados al soporte entre el peso en gramos del soporte (1g) (Somasegaran y Hoben, 1985).

3.5.2. Líquidos

Los soportes empleados fueron medio YEM suplementado con 10g/l de manitol (Vincent, 1970) y Carboximetil Celulosa con almidón (Fernandes *et al.*, 2009); a los cuales se les evaluó pH, densidad y viscosidad.

3.5.2.1. pH

La determinación de pH se llevó a cabo utilizando un potenciómetro de la marca Bench Meter®, las mediciones se realizaron por triplicado para cada muestra (A.O.A.C., 1998).

3.5.2.2. Densidad

Para la determinación de densidad se utilizó un picnómetro *Gay Lussac* de volumen conocido (25 ml) a peso constante, el cual se llenó completamente con el soporte y se pesó en una balanza analítica; las mediciones se realizaron por triplicado para cada muestra (A.O.A.C., 1995). El cálculo de la densidad se llevó a cabo utilizando la siguiente fórmula:

$$\rho 1 = \frac{M3-M1}{M2-M1} \rho H_2O$$

Dónde:

ρ1= Densidad del soporte

ρH_2O= Densidad del agua destilada a α temperatura

M1= Peso del picnómetro vacío

M2= Peso del picnómetro con agua destilada

M3= Peso del picnómetro con soporte

3.5.2.3. Viscosidad

La determinación de viscosidad se realizó empleando un viscosímetro de Ostwald y se realizaron siete mediciones por muestra (A.O.A.C., 1965).

Para el cálculo de la viscosidad de las muestras se empleó la siguiente fórmula:

$$\mu = K\rho t$$

Dónde:

μ=viscosidad del fluido

K=constante del viscosímetro utilizado

ρ= densidad del fluido

t= tiempo promedio del fluido

3.6. Elaboración de biofertilizantes

La biomasa necesaria para la inoculación de los soportes se obtuvo mediante una fermentación de 27 horas con una aireación constante de 2.5 vvm, realizada en un matraz fermentador de 2 L con 800 ml de medio YEM, para cada microorganismo (Ventura *et al.*, 2009).

3.6.1. Medio YEM (Extracto de Levadura y Manitol), adicionado con Manitol

En el caso de este soporte, antes del inicio de la fermentación se le agregaron al medio 10 g/l de manitol adicionales a su composición original (Vincent, 1970).

Transcurrido el tiempo de la fermentación, se tomaron muestras de 35 ml de medio YEM suplementado, con una concentración celular de 4.36×10^{9} ufc/ml para LBP2 y de 4.69×10^{8}

ufc/ml para CFN 42. Bajo condiciones estériles cada muestra de 35 ml fue depositada en su respectiva bolsa de polipropileno autoclavable (SARTEDT), previamente esterilizada en autoclave a 121°C y 15 Lb/in^2 por 15 minutos. El contenido de las bolsas se agitó hasta homogenizarlo y por último las bolsas fueron cerradas y aseguradas con clips (Khavazi *et al.*, 2007). Para su almacenamiento, cada bolsa fue colocada dentro de un recipiente de plástico con tapa.

Los biofertilizantes obtenidos fueron almacenados a temperatura ambiente para el posterior monitoreo de sobrevivencia celular, pH, densidad y viscosidad. Los biofertilizantes se elaboraron por cuadruplicado, para cada monitoreo programado (Fernandes *et al.*, 2009).

3.6.2. Turba

El soporte utilizado fue previamente molido y tamizado en malla 100, y su pH fue ajustado a un pH neutro (7.0) con $CaCO_3$ en polvo (Khavazi *et al.*, 2007; Somasegaran y Hoben, 1985).

Se pesaron muestras de 35 g de soporte, las cuales fueron primeramente depositadas en bolsas autoclavables de polipropileno, y esterilizadas en autoclave a 121°C y 15 Lb/in^2 por 45 minutos (Khavazi *et al.*, 2007). Posteriormente, cada muestra de soporte fue inoculada con 35 ml de medio de cultivo YEM, con una concentración celular de 7.61 x 10^9 ufc/ml para LBP2 y de 2.91 x 10^8 ufc/ml para CFN 42. El contenido de las bolsas se homogenizó manualmente y posteriormente éstas fueron cerradas y aseguradas con clips (Khavazi *et al.*, 2007).

Los biofertilizantes obtenidos fueron almacenados a temperatura ambiente para el posterior monitoreo de sobrevivencia celular, humedad y pH. Las muestras se realizaron por cuadruplicado, para cada tiempo de monitoreo requerido (Khavazi *et al.*, 2007).

3.6.3. Carboximetil celulosa con almidón

Se preparó una mezcla Carboximetil celulosa y almidón en una proporción 60-40% (p/p) respectivamente y con esta mezcla se elaboró una solución al 1.28% p/v; la cual se utilizó como soporte (Fernandes *et al.*, 2009).

Se tomaron muestras de 35 ml de soporte, las cuales fueron colocadas en bolsas autoclavables de polipropileno y esterilizadas en autoclave a 121°C y 15 Lb/pulg^2 por 15 minutos. Posteriormente, a cada muestra de soporte se le agregaron 35 ml de medio de

cultivo YEM, con una concentración celular de 8.76 x 10^9 ufc/ml para LBP2 y de 2.78 x 10^8 ufc/ml para CFN 42. El contenido de las bolsas se agitó hasta homogenizarlo y por último las bolsas fueron cerradas y aseguradas con clips (Khavazi *et al.*, 2007).

Los biofertilizantes obtenidos fueron almacenados a temperatura ambiente para el posterior monitoreo de sobrevivencia celular, pH, densidad y viscosidad. Las muestras se realizaron por cuadruplicado, para cada tiempo de monitoreo requerido (Fernandes *et al.*, 2009).

3.6.4. Bagazo de caña con perlita

El bagazo de caña y la perlita utilizados fueron previamente molidos y tamizados en malla 100 por separado, para posteriormente realizar una mezcla de ambos en una proporción 75-25%, bagazo-perlita (Khavazi *et al.*, 2007).

Se pesaron muestras de 35 g de soporte, las cuales fueron primeramente depositadas en bolsas autoclavables de polipropileno, y esterilizadas en autoclave a 121°C y 15 Lb/in^2 por 40 minutos. Posteriormente, cada muestra de soporte fue inoculada con 35 ml de medio de cultivo YEM, con una concentración celular de 8.09 x 10^9 ufc/ml para LBP2 y de 3.65 x 10^8 ufc/ml para CFN 42. El contenido de las bolsas se homogenizó manualmente y posteriormente éstas fueron cerradas y aseguradas con clips (Khavazi *et al.*, 2007).

Los biofertilizantes obtenidos fueron almacenados a temperatura ambiente para el posterior monitoreo de sobrevivencia celular, humedad y pH. Las muestras se realizaron por cuadruplicado, para cada tiempo de monitoreo requerido (Khavazi *et al.*, 2007).

3.7. Monitoreo de los biofertilizantes durante su almacenamiento

Para el caso de los soportes sólidos, se evaluó sobrevivencia celular, humedad y pH a los 0, 14, 60, 120, 180 y 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente (Khavazi *et al.*, 2007). Los métodos empleados para las determinaciones de humedad y pH, se describen en el apartado 3.4.1.

En el caso de los soportes líquidos, se determinó sobrevivencia celular, pH, densidad y viscosidad a los 0, 14, 60, 120, 180 y 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente (Fernandes *et al.*, 2009). Los métodos empleados para evaluar pH, densidad y viscosidad se describen en el apartado 3.4.2.

3.7.1. Sobrevivencia celular

La evaluación de la sobrevivencia celular para los cuatro soportes se llevó a cabo por la técnica de diluciones en serie y cuenta en placa, en agar YEM (Figura 3.4). Para realizar el conteo se utilizó un contador de colonias (Figura 3.5). Las evaluaciones se realizaron por triplicado a los 0, 14, 60, 120, 180 y 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente (Albareda *et al.*, 2008; Daza *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2009; Khavazi *et al.*, 2007).

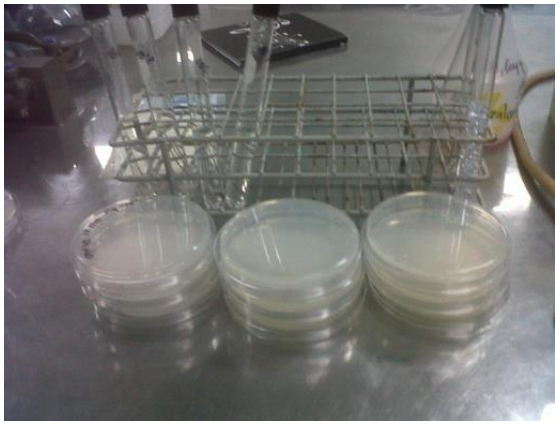


Figura 3.4. Cajas con agar YEM y tubos con diluciones

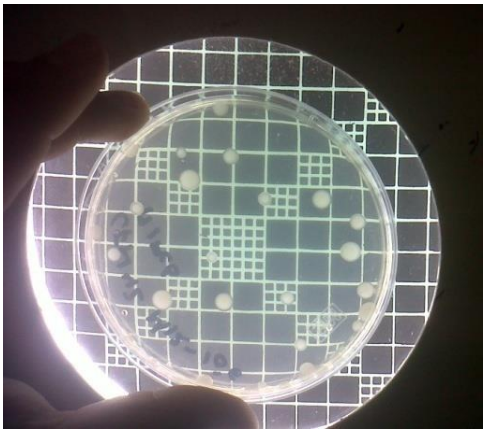


Figura 3.5. Conteo hecho en el contador de colonias

3.8. Evaluación de biofertilizantes en cultivos de zacate limón (*Cymbopogon citratus* L.)

Después de dos meses de almacenamiento, los biofertilizantes se evaluaron en plantas de zacate limón (*Cymbopogon citratus* L.). El experimento se llevó a cabo en un invernadero en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Hijuelos de zacate limón provenientes de plantas adultas fueron sembradas en maceteros de plástico con capacidad de 20 L que contenían 5 kg de sustrato en una relación 2:1 de turba y perlita respectivamente (Figura 3.6). Primeramente fue depositada una capa de 10 cm de sustrato en la macetera y enseguida el hijuelo fue plantado e inoculado y se terminó de agregar el resto del sustrato.

Figura 3.6. Elaboración de la mezcla turba-perlita, usada como sustrato para el crecimiento de los cultivos

Se aplicaron 6 tratamientos con 5 repeticiones cada uno, dos de los tratamientos corresponden a los biofertilizantes sólidos (turba y bagazo-perlita), en este caso cada hijuelo se inoculó con 5 g del biofertilizante en cuestión, utilizando goma arábiga al 30% como adhesivo. Los dos siguientes tratamientos pertenecen a los soportes líquidos (medio YEM adicionado con manitol y Carboximetil celulosa con almidón), en este caso se agregaron 5 ml de biofertilizante directamente a la base de cada hijuelo (Figura 3.7). Finalmente los dos tratamientos restantes fueron un control negativo y un control positivo, a este último se le agregaron 5 ml de solución KNO_3 al 1.25 M. Las plantas fueron regadas con agua potable cada 48 h y una vez a la semana con solución fahraeus (Somasegaran y Hoben, 1985), y se dejaron crecer durante 5 meses (Anexo 1).

Figura 3.7. Inoculación de los biofertilizantes en cultivos de *Cymbopogon citratus* L.

Los tratamientos fueron distribuidos mediante un diseño de bloques completamente aleatorio (Figura 3.8). Transcurridos cinco meses después de la aplicación de los biofertilizantes, se evaluaron las siguientes variables de respuesta: altura total de la planta, peso fresco, peso seco, número de hijuelos, rendimiento del aceite esencial, y el contenido de nitrógeno total en la planta mediante la prueba de Hanna (Antolinez *et al.*, 2008).

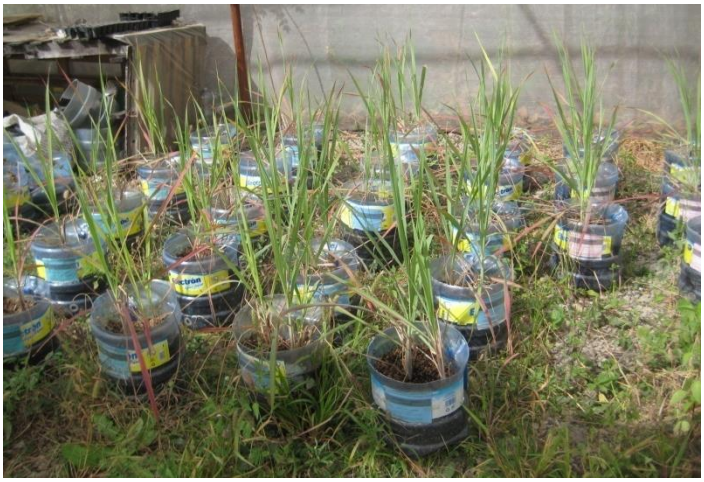


Figura 3.8. Cultivos de *Cymbopogon citratus* L.

3.8.1. Evaluación de las variables de respuesta

La altura de la planta se obtuvo midiendo desde la base de la planta hasta la parte terminal de las hojas superiores y se expresó en centímetros (cm); se contabilizó el número de hijuelos que generó cada planta para obtener un promedio; inmediatamente después de la cosecha se obtuvo el peso fresco de cada planta expresada en gramos (g) y por último para obtener el peso seco de la planta, se sometió a un proceso de secado en estufa a 60°C por 48 horas, los pesos se obtuvieron con la ayuda de una balanza analítica (Antolinez *et al.*,

2008). En la figura 3.9 se muestran algunas raíces de los cultivos de zacate limón que fueron medidas y pesadas.

Figura 3.9. Raíces de los cultivos de *Cympopogon citratus* L.

3.8.2. Cuantificación de nitrógeno total en la planta (Kit HANNA modelo C213)

Las muestras secas provenientes de cada planta fueron molidas y tamizadas en malla 100. Posteriormente se pesaron 0.2 g de cada muestra y se colocaron en un matraz microkjeldahl (por duplicado), al cual se le agregaron 0.8 g de catalizador tipo microkjeldahl (K_2SO_4 + HgO) y 4 ml de H_2SO_4 concentrado (A. O. A. C., 2000). El ácido destruyó la materia orgánica (Bremner y Mulvaney, 1982).

Las muestras fueron digeridas durante 1 a 1.5 horas, después de que toda el agua ha sido evaporada y el ácido inicia su ebullición. La placa de digestión se mantuvo entre 360 y 390 °C para permitir la ebullición de la mezcla de ácido con las sales que se adicionaron a la materia seca de las plantas. El proceso de digestión se detuvo cuando la solución se tornó transparente (o color verde claro) y la muestra se dejó enfriar (Figura 3.10).

Figura 3.10. Digestión de muestras de *Cymbopogon citratus* L. mediante el método Microkjeldahl

Después de enfriar la muestra, el matraz microkjeldahl se lavó 5 veces con porciones de agua destilada de 2 ml y se transfirió la solución resultante a un matraz volumétrico de 100 ml, finalmente se aforó con agua destilada.

3.8.2.1. Nitritos

Para la cuantificación de nitritos se tomó una muestra de 10 ml, proveniente del matraz volumétrico y se colocó dentro de la celda de un espectrofotómetro marca Hanna modelo C213 para su determinación (Figura 3.11). Se ejecutó el programa 17 para nitrito (rango bajo) y la celda con muestra se colocó en el porta celda del espectrofotómetro para calibrarse presionando el botón “ZERO”. Posteriormente se vació un sobre de reactivo para determinar nitrito en la celda con la muestra (Figura 3.12), se agitó suavemente y se reinsertó la celda en el espectrofotómetro (Manual de Instrucciones C200 series. Fotómetro Multiparamétrico de Sobremesa).

Por último se presionó el botón “TIMER” y transcurrieron 5.59 min, transcurrido dicho tiempo se presionó el botón “READ DIRECT”. Se tomó la lectura que se muestra en la pantalla en mg/L, correspondiente a cada muestra y se multiplicó por el factor 3.29. Los datos fueron convertidos posteriormente a mg de Nitrógeno total/g de planta seca (Manual de Instrucciones C200 series. Fotómetro Multiparamétrico de Sobremesa).

3.8.2.2. Nitratos

Para la cuantificación de nitratos se tomó una muestra de 10 ml, proveniente del matraz volumétrico y se colocó dentro de la celda de un espectrofotómetro marca Hanna modelo C213 para su determinación. Se ejecutó el programa 15 para nitrato y la celda con muestra se colocó en el porta celda del espectrofotómetro para calibrarse presionando el botón “ZERO” (Figura 3.13). Posteriormente se vació un sobre de reactivo para determinar nitrato en la celda con la muestra, se agitó vigorosamente durante 10 segundos moviendo la cubeta de arriba abajo y se continuó agitando suavemente durante 50 segundos; se reinsertó la celda en el espectrofotómetro (Manual de Instrucciones C200 series. Fotómetro Multiparamétrico de Sobremesa).

Por último se presionó el botón “TIMER” y transcurrieron 4.29 min, transcurrido dicho tiempo se presionó el botón “READ DIRECT”. Se tomó la lectura que se muestra en la pantalla en mg/L, correspondiente a cada muestra y se multiplicó por el factor 4.43. Los datos fueron

convertidos posteriormente a mg de Nitrógeno total/g de planta seca (Manual de Instrucciones C200 series. Fotómetro Multiparamétrico de Sobremesa).

3.8.2.3. Amoniaco

Para la cuantificación de nitritos se tomó una muestra de 10 ml, proveniente del matraz volumétrico y se colocó dentro de la celda de un espectrofotómetro marca Hanna modelo C213 para su determinación. Se ejecutó el programa 3 para amoniaco (rango bajo) y la celda con muestra se colocó en el porta celda del espectrofotómetro para calibrarse presionando el botón “ZERO”. Posteriormente se añadieron 4 gotas del reactivo 1 y 4 gotas del reactivo 2 para determinar amoniaco, en la celda con la muestra; se agitó suavemente y se reinsertó la celda en el espectrofotómetro (Manual de Instrucciones C200 series. Fotómetro Multiparamétrico de Sobremesa).

Por último se presionó el botón “TIMER” y transcurrieron 3.29 min, transcurrido dicho tiempo se presionó el botón “READ DIRECT”. Se tomó la lectura que se muestra en la pantalla en mg/L, correspondiente a cada muestra y se multiplicó por el factor 1.214. Los datos fueron convertidos posteriormente a mg de Nitrógeno total/g de planta seca (Manual de Instrucciones C200 series. Fotómetro Multiparamétrico de Sobremesa).

Se realizó la suma de los resultados obtenidos para nitritos, nitratos y amoniaco para obtener el contenido de nitrógeno total presente en cada planta y con ello se evaluó la capacidad efectiva que poseen las cepas empleadas para poder fijar nitrógeno en las plantas de zacate limón (*Cymbopogon citratus* L.).

Figura 3.11. Kit HANNA C213 utilizado para la determinación de nitritos, nitratos y amoniaco

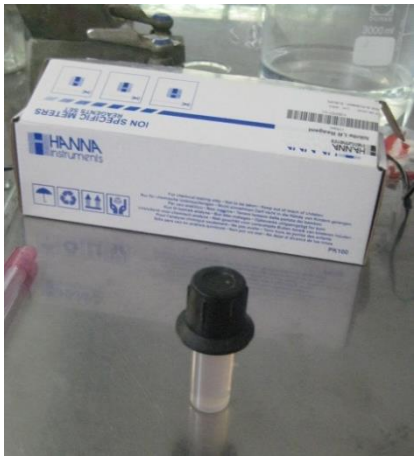


Figura 3.12. Celda con reactivo para la determinación de nitritos

Figura 3.13. Determinación de nitratos con el programa P15 del Kit HANNA C213

Capítulo IV

Análisis de resultados

4.1. Estandarización del inóculo

Se construyó la curva patrón de los microorganismos *Rhizobium etli* CFN 42 y *Rhizobium* sp. LBP2, como lo muestran los anexos 2.1 y 2.2 respectivamente.

El cálculo de ambas curvas patrón se realizó por el método de los mínimos cuadrados, correlacionando los valores de absorbancia y concentración celular; obteniéndose las siguientes ecuaciones:

$y=9x10^{-9}\ x + 0.323$; $R^2=0.926$ para la cepa CFN 42 y

$y=5x10^{-10}\ x + 0.783$; $R^2=0.946$ para la cepa LBP2.

Las ecuaciones obtenidas se utilizaron en los experimentos posteriores para definir el volumen de caldo YEM a inocular en los soportes y de esta manera conocer la concentración celular inicial presente en los diferentes biofertilizantes evaluados.

Por otra parte, es importante mencionar que las curvas de crecimiento de los dos microorganismos estudiados (Figuras 4.1 y 4.2), muestran comportamientos diferentes a pesar de que ambos pertenecen al género *Rhizobium* y que crecieron en el mismo medio, bajo las mismas condiciones.

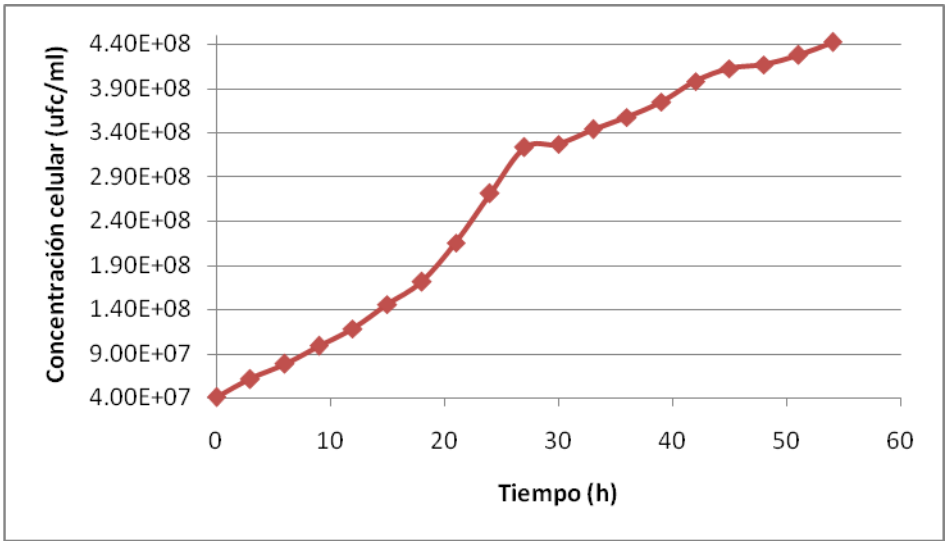


Figura 4.1. Curva de crecimiento de la cepa CFN 42 durante la cinética de crecimiento

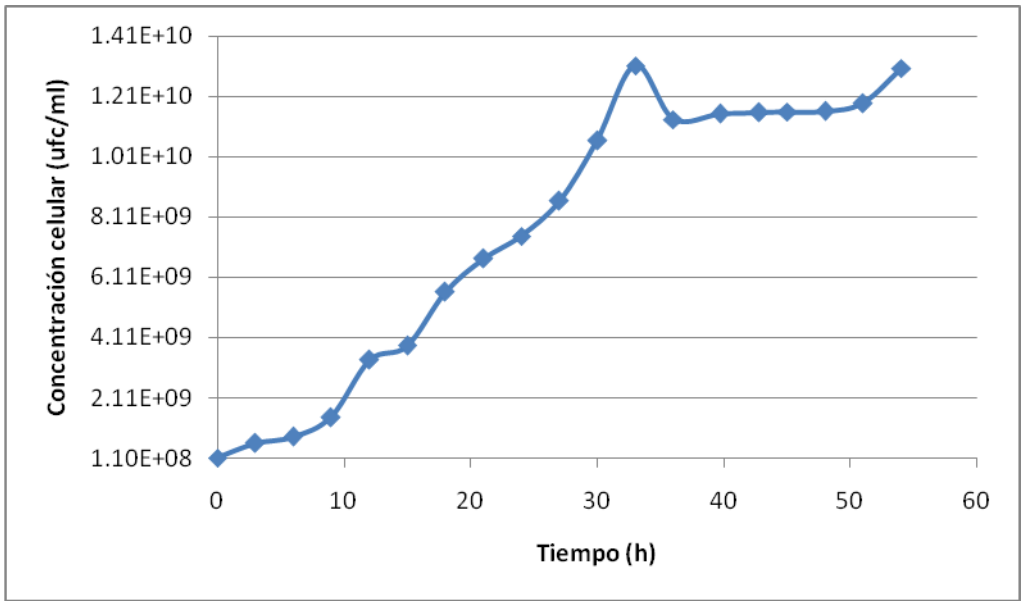


Figura 4.2. Curva de crecimiento de la cepa LBP2 durante la cinética de crecimiento

El medio YEM es el que comúnmente se ha empleado como medio de crecimiento para bacterias denominadas rizobios (Ormeño-Orrillo y Zúñiga-Dávila, 1998; Sherwood, 1972). La fuente de carbono en este medio es el manitol, el cual puede ser asimilado por las bacterias del género *Rhizobium* al ser transformado a fructosa o xilulosa por medio de una deshidrogenasa inducible (Kuykendall *et al.*, 2005). Por lo cual, se deduce que en este experimento, tanto *Rhizobium etli*, como *Rhizobium* sp. fueron capaces de metabolizar la fuente de carbono que se encontraba disponible en el medio.

Como puede notarse en las figuras 4.1 y 4.2, ninguno de los microorganismos presentó fase de adaptación, es decir, su fase log comenzó a partir de la hora cero. Además, en el caso de ambas cepas, la duración de sus fases log fue de 27 horas. La diferencia más notable entre ambos microorganismos fue la máxima concentración celular alcanzada durante las cinéticas de crecimiento, ya que el microorganismo *Rhizobium* sp. LBP2 tuvo un incremento poblacional mucho mayor, alcanzando una población de 1.31×10^{10} ufc/ml, a diferencia de *Rhizobium etli* CFN 42, el cual llegó a una concentración de 4.42×10^{8} ufc/ml.

Puede observarse que a pesar de que la fase log de ambos microorganismos tuvieron la misma duración, la cepa LBP2 presentó la capacidad de crecer a muy altas concentraciones (superiores a 1×10^{10}), aumentando dos unidades logarítmicas durante la cinética de crecimiento; a diferencia de la cepa CFN 42, la cual sólo aumentó una unidad logarítmica. La situación anterior pudo deberse a que la cepa LBP2 posee la capacidad de asimilar de manera óptima la fuente de carbono disponible en el medio (Manitol).

4.2. Parámetros cinéticos obtenidos

Dando el tratamiento matemático adecuado a los datos obtenidos, se determinaron los parámetros cinéticos para las cepas en estudio, mostrados en el cuadro 4.1.

Cuadro 4.1. Parámetros cinéticos de las cepas CFN 42 y LBP2

Cepa	**Parámetros**				
	μ_{max} (h^{-1})	**td (h)**	**N° gen**	**X_0 (ufc/ml)**	**$X_{máx}$ (ufc/ml)**
CNF 42	0.072	9.6270	2	$4.07x10^7$	$4.42x10^8$
LBP2	0.143	4.8472	5	$1.19x10^8$	$1.31x10^{10}$

Neyra (1995) reportó que el tiempo de duplicación de las bacterias del género *Rhizobium* es de 2 a 4 horas. Mientras que Kuykendall *et al*. (2005) le dan un rango más amplio, de 1.5 a 5.0 horas.

De forma más específica, Rojas *et al*. (2009) determinaron los parámetros de td y μ_{max} en medio YEM para *Rhizobium* sp. C50, cuyos valores fueron 2.676 h y 0.259 h^{-1} respectivamente. Mientras que Arias-Poblano *et al*. (2011) determinaron los valores de td y μ_{max} de *Rhizobium etli* C1 a nivel matraz en medio YEM, cuyos resultados fueron 4.951 h y 0.14 h^{-1} respectivamente.

En nuestro experimento, la cepa LBP2 mostró un tiempo de duplicación que se encuentra ligeramente fuera del rango reportado por Vincent (1974) y Neyra (1995). Sin embargo, éste parámetro se encuentra dentro del rango reportado por Kuykendall *et al*. (2005) para las bacterias del género *Rhizobium*.

Los parámetros cinéticos de td y μ_{max} de *Rhizobium* sp. LBP2 difirieron con los resultados obtenidos por Rojas *et al*. (2009), como puede observarse en el cuadro 4.1. Tomando en cuenta que la cepa LBP2 tuvo un tiempo de duplicación de casi el doble en comparación con el microorganismo *Rhizobium* sp. C50 empleado por Rojas *et al*. (2009). Sin embargo, éstos mismos parámetros cinéticos (td y μ_{max}) fueron muy semejantes a los obtenidos por Arias-Poblano *et al*. (2011) a pesar de que se trata de dos microorganismos de diferentes especies.

Por otra parte, los resultados obtenidos para la cepa CFN 42 en cuanto a td y μ_{max} no estuvieron dentro del rango de las bacterias del género *Rhizobium*, el tiempo de duplicación obtenido en este estudio se asemeja más al de las bacterias del género *Bradyrhizobium*, cuyo valor es mayor de 6 horas (Neyra, 1995).

Jordan y Allen (1974) y Vincent (1974) dividieron las especies del género *Rhizobium* en dos grupos sobre la base de velocidad de crecimiento y efecto sobre el pH del medio YEM bajo condiciones estándar de laboratorio. Los rizobios de rápido crecimiento tienen tiempos de duplicación de 2 a 4 horas, mientras que los rizobios referidos como de lento crecimiento tienen tiempos de duplicación de 6 horas o más. De acuerdo a esta clasificación, puede decirse que la cepa LBP2 empleada en éste estudio se encuentra dentro del grupo de los rizobios de rápido crecimiento, mientras que la cepa CFN 42 se encuentra dentro del grupo de los rizobios de lento crecimiento.

Únicamente la cepa LBP2 alcanzó una biomasa máxima superior a $1x10^9$ ufc/ml, que es la concentración óptima recomendada para la su utilización como biofertilizante (Khavazi *et al.*, 2007).

4.3. Caracterización fisicoquímica de los soportes

Los resultados obtenidos durante la caracterización fisicoquímica de los soportes sólidos y líquidos se muestran en los cuadros 4.2 y 4.3 respectivamente.

Cuadro 4.2. Determinaciones fisicoquímicas realizadas a los soportes sólidos

Soporte	**Determinaciones**			
	pH	**Humedad (%)**	**Capacidad de retención de agua (%)**	**Friabilidad (ml/g)**
Turba (ajustada con $CaCO_3$)	6.76 ±0.28	95.76 ±9.90	281.75 ±5.17	Máx. 1
Bagazo de caña con perlita (BC + P)	7.75 ±0.003	53.5 ±5.86	555.41 ±60.7	Máx. 1.5

Cuadro 4.3. Determinaciones fisicoquímicas realizadas a los soportes líquidos

Soporte	Determinaciones		
	pH	Densidad (Kg/m^3)	Viscosidad (Cp)
YEM con Manitol (YEM + M)	7.35 ±0.002	1005.3 ±5.03	0.7787 ±0.04
Carboximetil celulosa con almidón (CMC + A)	10.84±0.08	999.16 ±1.30	414.10 ±21.61

Khavazi *et al*. (2007), publicaron que los soportes a ser empleados en la elaboración de biofertilizantes deben tener un pH cercano al neutro (7.0). En este experimento, la turba presentó un pH inicial de 3.83, por lo que tuvo que ajustarse con 3.5 g de $CaCO_3$ por cada 10 g de turba hasta que se obtuvo un pH de 6.76. Los soportes YEM con manitol y bagazo de caña con perlita, tuvieron un pH cercano al neutro, por lo que no tuvieron que ser ajustados (Cuadros 4.2 y 4.3). Por su parte, la mezcla de Carboximetil celulosa con almidón presentó un pH alcalino; sin embargo, al ajustarse con soluciones de ácido clorhídrico 0.1, 0.2 y 0.3 N, las propiedades reológicas del soporte se vieron muy afectadas, por lo que éste se empleó con el pH original (10.84). Este cambio negativo observado en las propiedades reológicas (disminución drástica de la viscosidad del soporte) pudo deberse al rompimiento de los enlaces glucosídicos presentes en el almidón, debido a la hidrólisis ácida del almidón, catalizada por las soluciones ácidas utilizadas (Wade, 1993; Solomons, 2004).

Las regiones amorfas de los gránulos de almidón sometidos a tratamientos con agentes químicos como el hipoclorito de sodio (NaClO) o el ácido clorhídrico (HCl), son más susceptibles a sufrir una hidrólisis que las zonas cristalinas. Además, los tratamientos de degradación por hidrólisis ácida o lintnerización disminuyen la masa molar del almidón, lo que permite obtener moléculas lineales o escasamente ramificadas (Shin *et al*., 2004).

En el cuadro 4.2 puede observarse que tanto la turba (después de ajustar su pH) como el BC + P, tienen un pH cercano al neutro y una gran capacidad de retención de agua, características deseables en un soporte rizobiano (Bashan, 1998; Burton, 1981; Rebah *et al.*, 2002; Smith, 1992).

Por otra parte, los soportes líquidos presentan propiedades fisicoquímicas muy diferentes entre sí (Cuadro 4.3), ya que el pH del medio YEM + M fue muy cercano al neutro, en cambio

el pH de la mezcla de CMC + A fue muy alcalino. Además, la viscosidad de éste último soporte fue 530 veces mayor que la del medio YEM + M. Esta elevada viscosidad podría representar una ventaja al brindarle a las células inoculadas un ambiente de mayor protección (Fernandes *et al*., 2009).

Los parámetros de humedad en el caso de los soportes sólidos, y de densidad y viscosidad para los soportes líquidos, fueron determinados inicialmente, para emplearlos como referencia y compararlos con los resultados de los monitoreos posteriores, y de esta forma advertir cambios significativos que pudieran indicar contaminación u otros factores que afecten la calidad del los biofertilizantes elaborados, durante el periodo de almacenamiento.

4.4. Elaboración de biofertilizantes

Los cuatro soportes fueron inoculados con las cepas *R. etli* CFN 42 y *Rhizobium* sp. LBP2, por lo que fue necesario estimar las concentraciones de cada microorganismo presente en los matraces de producción y en los biofertilizantes (cuadro 4.4).

Cuadro 4.4. Concentración celular de ambos microorganismos en el momento de la producción e inoculación del soporte

Tratamientos	**Concentración celular en el matraz de producción (ufc/ml)**	**Concentración celular en el soporte al t_0 (ufc/ml ó ufc/g)**
YEM + M/ CFN 42	4.99×10^8	4.99×10^8
YEM + M/ LBP2	3.97×10^9	3.97×10^9
Turba/ CFN 42	3.02×10^8	3.02×10^8
Turba/ LBP2	7.21×10^9	7.21×10^9
CMC + A/ CFN 42	2.87×10^8	1.44×10^8
CMC + A/ LBP2	8.36×10^9	4.18×10^9
BC + P/ CFN 42	3.84×10^8	3.84×10^8
BC + P/ LBP2	7.69×10^9	7.69×10^9

Como puede observarse en el cuadro 4.4, *Rhizobium* sp. LBP2 alcanzó una concentración muy elevada, mayor de 1×10^9 ufc/ml en los matraces de producción con medio YEM + M

(Khavazi *et al*., 2007), en cambio *R. etli* tuvo su crecimiento máximo en el orden de 10^8, no pudiendo alcanzar la concentración celular recomendada como óptima.

Fernandes *et al*. (2009) emplearon concentraciones de 4.5 x 10^8 cel/ ml y 4.2 x 10^8 cel/ml de la bacteria *Bradyrhizobium japonicum* en la elaboración de biofertilizantes a base de polímeros. Por otra parte, de Albareda *et al*. (2008) emplearon concentraciones de 10^8-10^{10} ufc/ml durante sus experimentos para evaluar la sobrevivencia de bacterias rizobianas en diferentes soportes. Por lo que si bien la concentración celular alcanzada por *R. etli* CFN 42 en este experimento no fue la óptima, su rango es aceptable para ser empleado con fines de biofertilización.

4.5. Monitoreo de los biofertilizantes durante su almacenamiento

4.5.1. Parámetros fisicoquímicos

Khavazi *et al*. (2007) monitorearon la sobrevivencia de *Bradyrhizobium japonicum* en diferentes soportes, a los cuales se les dio un periodo de maduración de 2 semanas; tomando como referencia lo anterior, en este experimento los parámetros fisicoquímicos se midieron a partir del día 14 y permanecieron en almacenamiento hasta por 240 días.

4.5.1.1. Soportes sólidos

En la figura 4.3 se muestran las variaciones de pH que presentaron los biofertilizantes sólidos durante el periodo de almacenamiento.

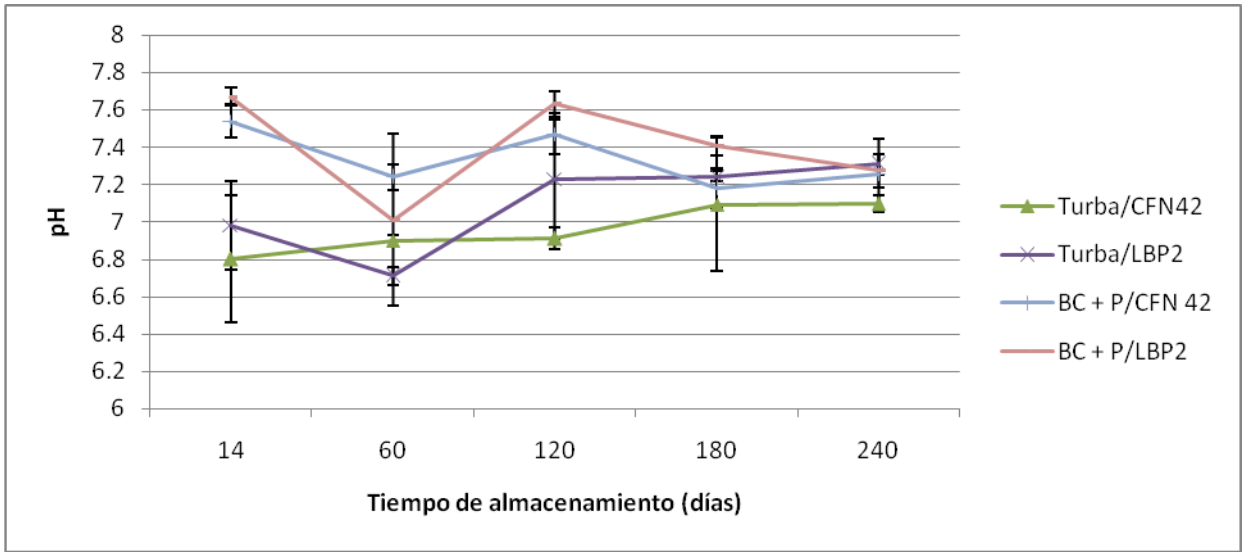


Figura 4.3. Monitoreo de pH de los biofertilizantes sólidos durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente

Durante el periodo de almacenamiento, el pH de los biofertilizantes sólidos se mantuvo en el rango de 6.4 a 7.8, cercano a la neutralidad; lo cual representa una gran ventaja, ya que el pH óptimo de crecimiento de las bacterias del género *Rhizobium* se encuentra entre 6.0 y 7.0, sin embargo pueden crecer entre valores de 4.0 a 10.0 (Kuykendall *et al.*, 2005).

Aunque el pH no varió de manera drástica, las variaciones de pH que presentó el biofertilizante a base BC + P, fueron muy similares en ambas cepas (CFN 42 y LBP2); ya que a los 14 y 120 días de almacenamiento tuvieron un pH muy similar entre esos dos tiempos. De la misma forma, a los 60, 180 y 240 días de almacenamiento el pH es muy similar entre estos mismos tiempos. En este biofertilizante, ambas cepas tienen el mismo comportamiento en cuanto a las variaciones de pH aunque no pertenezcan a la misma especie; lo anterior sugiere que el BC + P es un soporte que provee un medio ambiente estable en lo que respecta al pH.

Los biofertilizantes elaborados a base de turba, presentaron un comportamiento uniforme, ya que no existieron variaciones significativas de pH durante los 240 días de almacenamiento. Ambos microorganismos a pesar de ser de diferentes especies, tuvieron el mismo comportamiento en las variaciones de pH.

Otro de los parámetros fisicoquímicos medidos en los biofertilizantes sólidos fue el porcentaje de humedad. Las variaciones presentadas a lo largo del almacenamiento se muestran en la figura 4.4.

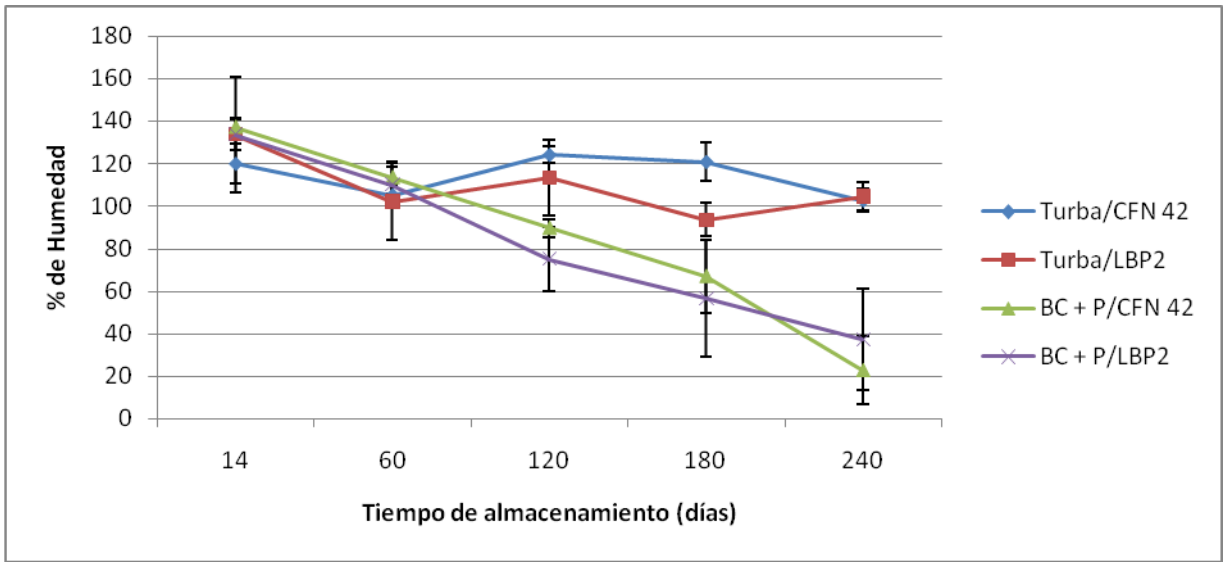


Figura 4.4. Monitoreo de humedad de los biofertilizantes sólidos durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente

La variación de la humedad en los biofertilizantes sólidos durante el periodo de almacenamiento, fue muy diferente entre los dos materiales (turba y BC + P). La humedad de los biofertilizantes elaborados a base de turba se mantuvo sin grandes variaciones, la pérdida de humedad en este soporte varió entre el 20 y el 40%, llegando hasta aproximadamente un 100% de humedad a los 240 días de almacenamiento, en el caso de ambas cepas. Esta estabilidad en la humedad de la turba, muestra que la desecación de este biofertilizante es mínima, y por lo tanto, que las células inoculadas no sufrieron de estrés osmótico (Estrada, 2008).

Por otra parte, los biofertilizantes elaborados a base de BC + P, presentaron variaciones significativas en el porcentaje de humedad, a lo largo del periodo de almacenamiento. Las pérdidas de humedad fueron bastante grandes en el caso de ambos microorganismos, variando entre el 120 y el 90%. Estrada (2008), menciona que la desecación es uno de los factores limitantes en la conservación del inoculante, causando acumulación de sales y solutos, estrés osmótico y alteración del metabolismo microbiano. En este experimento, la humedad puede considerarse un factor limitante para el mantenimiento de la viabilidad celular en los biofertilizantes elaborados a base de BC + P.

4.5.1.2. Soportes líquidos

A continuación se muestran las variaciones de pH que presentaron los biofertilizantes líquidos durante el periodo de almacenamiento (Figura 4.5).

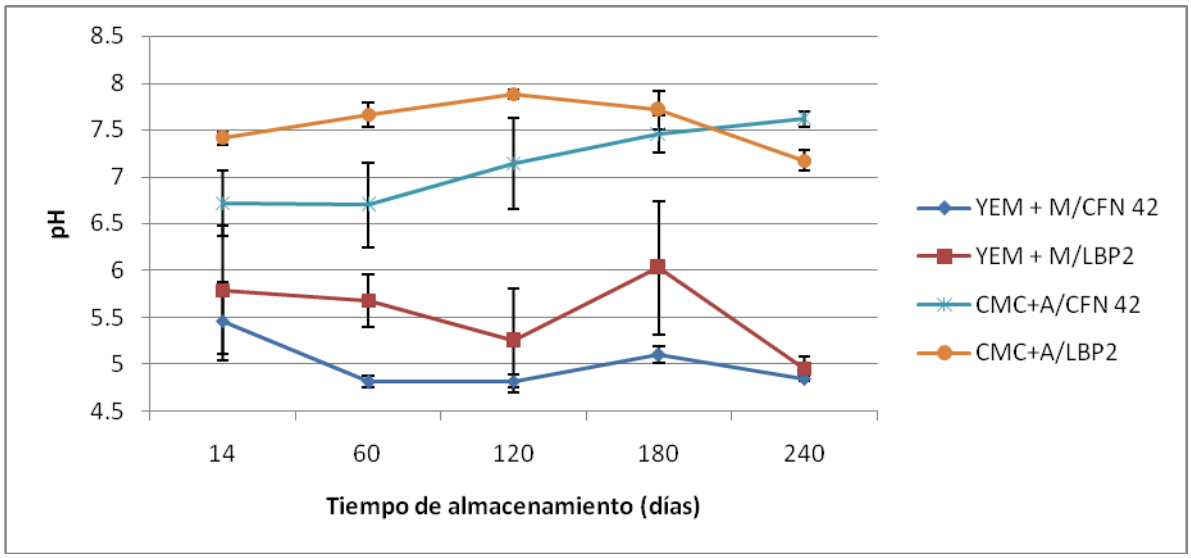


Figura 4.5. Monitoreo de pH de los biofertilizantes líquidos durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente

Los biofertilizantes elaborados a base de medio YEM + M, tuvieron inicialmente un pH entre 5 y 6, el cual mantuvieron oscilando a lo largo del periodo de almacenamiento; presentando una variación entre 5.5 y 4.8. Cabe recordar que el pH óptimo de éstas bacterias se encuentra entre 6.0 y 7.0 (Kuykendall *et al.*, 2005), por lo que el bajo pH del medio YEM + M lo convierte en un factor limitante para la sobrevivencia tanto de la cepa CFN 42 como de la cepa LBP2.

Las reacciones ácidas en el medio YEM y la alta producción de exopolisacáridos extracelulares son propias del género *Rhizobium* (Kuykendall *et al*, 2005), lo cual podría representar una desventaja en el momento de emplear este medio como soporte para inóculos rizobianos.

Por su parte, el pH de los biofertilizantes elaborados a base de CMC + A estuvo entre 6.7 y 7.2 durante el periodo de almacenamiento, lo cual sugiere que existe un ambiente óptimo para el crecimiento y sobrevivencia celular para ambos microorganismos.

Otro de los parámetros fisicoquímicos medidos en los biofertilizantes líquidos fue la densidad. Los monitoreos realizados a lo largo de los 240 días de almacenamiento se muestran a continuación (Figura 4.6).

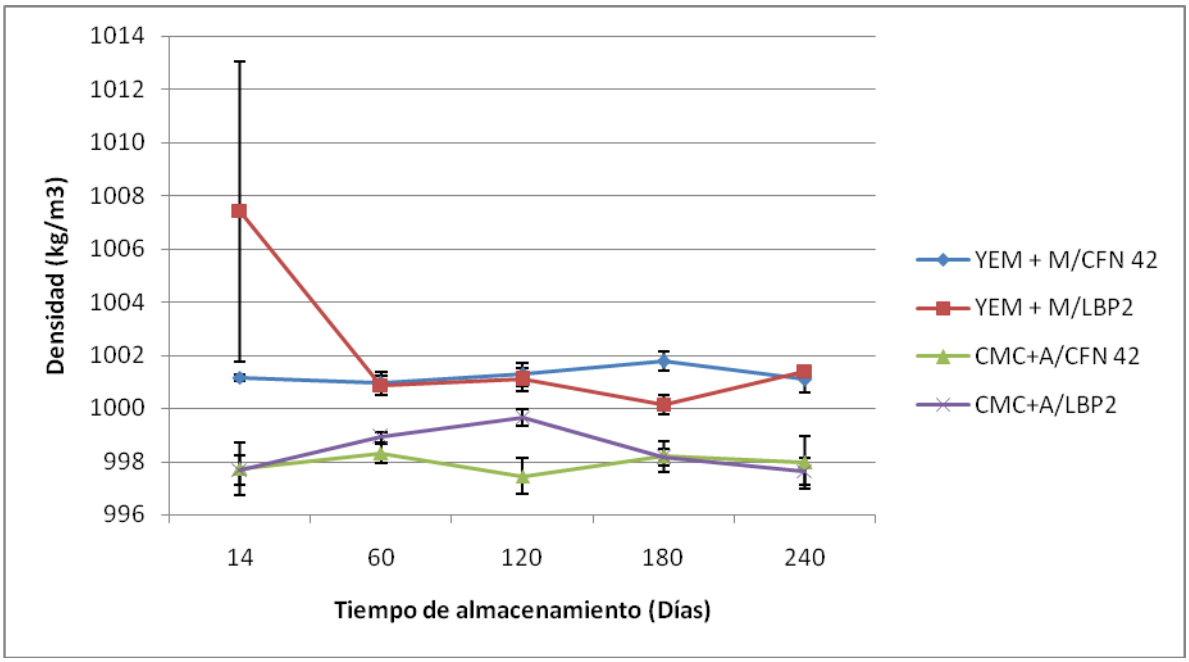


Figura 4.6. Monitoreo de densidad de los biofertilizantes líquidos durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente

La densidad de todos los biofertilizantes inoculados se mantuvo sin variaciones significativas a lo largo de los 240 días de almacenamiento, en el caso de ambos microorganismos. Con excepción del biofertilizante elaborado a base de medio YEM + M e inoculado con la cepa LBP2, el cual presentó un marcado descenso en su densidad del día 14 al 60, pasando de 1007.41 hasta 1000.85 Kg/m^3; situación que pudo deberse a errores en el momento de la medición, ya que esta muestra presentó una desviación estándar muy grande. Sin embargo, a partir de los 60 días, la densidad se mantuvo constante durante el tiempo restante.

La densidad de los biofertilizantes elaborados a base de medio YEM + M se mantuvo oscilando entre 997 y 1000 Kg/m^3, mientras que la de los biofertilizantes elaborados a base de CMC + A se mantuvieron en un rango entre 1000 y 1002 Kg/m^3.

Las figuras 4.7 y 4.8 muestran la variación que tuvo la viscosidad de los medios líquidos a lo largo del periodo de almacenamiento.

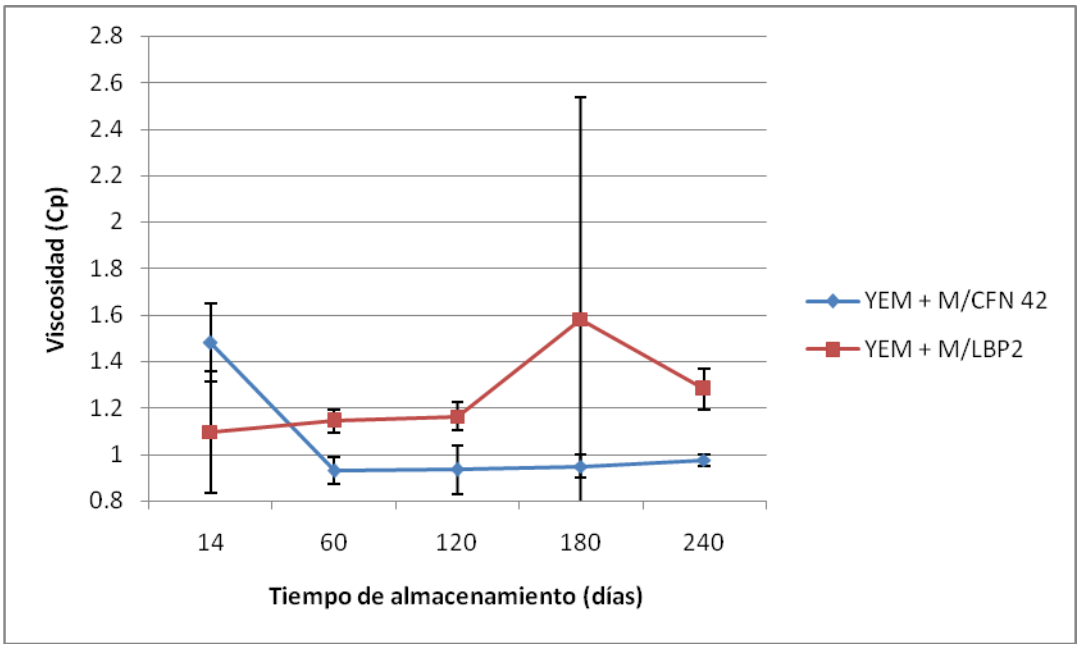


Figura 4.7. Monitoreo de viscosidad del medio YEM + M durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente

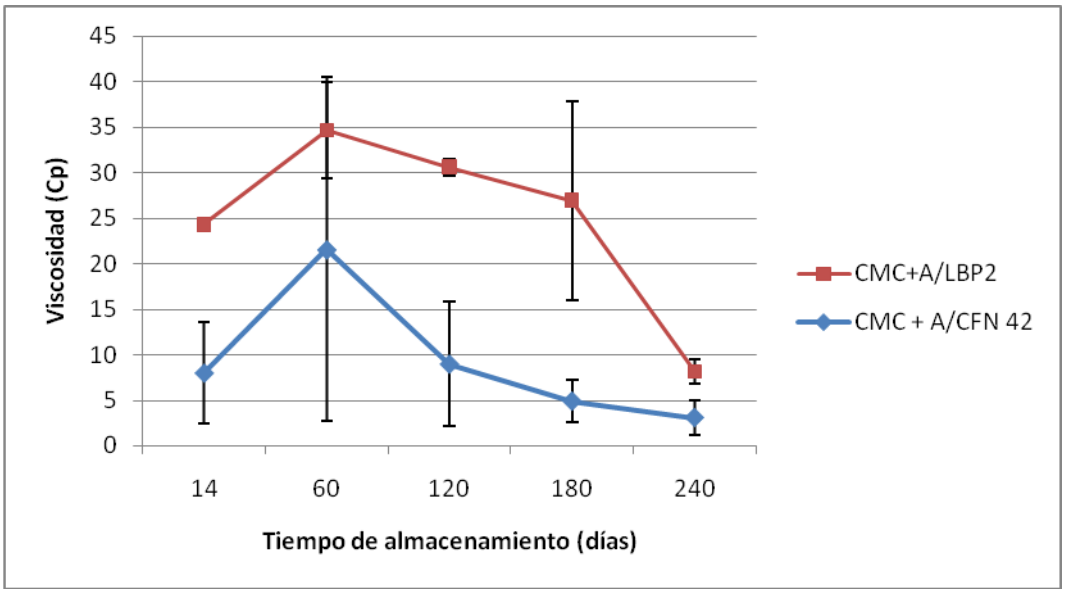


Figura 4.8. Monitoreo de viscosidad de CMC + A durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente

La viscosidad de la CMC + A fue mucho mayor que la del medio YEM + M. Esto se debe a que la Carboximetil celulosa y el almidón poseen una similaridad molecular entre sí, lo cual resulta en una afinidad parcial que contribuye a la estabilidad del gel formado, con características reológicas y químicas apropiadas para el almacenamiento rizobial (Sanz *et al.*, 2005; Suvorova *et al.*, 1999). Las propiedades anteriormente mencionadas, le dan a éste soporte una gran ventaja frente al medio YEM + M para ser un mejor soporte rizobiano. En este experimento, la variación de la viscosidad fue distinta para cada uno de los cuatro diferentes tipos de biofertilizantes líquidos elaborados.

Únicamente el medio YEM + M inoculado con la cepa LBP2 mantuvo una viscosidad constante, aunque en el monitoreo del día 180, se observó un elevado ascenso; sin embargo, esto pudo deberse a errores en el momento de la medición, ya que la desviación estándar es bastante grande.

La viscosidad del medio YEM + M inoculado con la cepa CFN 42, tuvo un descenso significativo del día 14 al día 60, pasando de 1.48 a 0.93 cp, y a partir de ese momento se mantuvo constante durante el resto del periodo de almacenamiento.

En cuanto a la mezcla de CMC + A inoculada con la cepa CFN 42, la viscosidad tuvo un ascenso muy marcado, pasando de 7.96 hasta 21.57 cp; lo cual pudo deberse a errores en el momento de la medición, ya que la desviación estándar fue muy elevada. Al final del

tiempo de almacenamiento, la viscosidad de este soporte disminuyó hasta 3.07 cp, lo cual, evidencía la pérdida de sus propiedades reológicas y por lo tanto de su calidad como biofertilizante.

Por su parte, la viscosidad de la CMC + A inoculada con la cepa LBP2, tuvo un ascenso significativo a los 60 días de almacenamiento, alcanzando una viscosidad de 34.63 cp; y posteriormente tuvo un descenso significativo al final del tiempo de almacenamiento, llegando hasta 8.14 cp, lo que representa una disminución en la calidad de éste biofertilizante.

4.5.2. Sobrevivencia celular

Se realizó el monitoreo de la sobrevivencia de la cepa *R. etli* CFN 42 y la cepa *Rhizobium* sp. LBP2 en cuatro diferentes soportes (medio YEM suplementado con manitol, turba, carboximetil celulosa con almidón y bagazo de caña con perlita), los cuales fueron almacenados a temperatura ambiente durante un periodo de 240 días (Cuadro 4.5).

Cuadro 4.5. Sobrevivencia de *Rhizobium etli* CFN 42 y *Rhizobium* sp. LBP2 en los diferentes biofertilizantes durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

Tratamientos	**Concentración celular (ufc/ml ó ufc/g)**					
	0 días	**14 días**	**60 días**	**120 días**	**180 días**	**240 días**
YEM + M/ CFN 42	4.99×10^{8}	5.7×10^{7} ±2.31×10^{6}	2.35×10^{7} ±4.47×10^{6}	0	0	0
YEM + M/ LBP2	3.97×10^{9}	1.57×10^{9} ±9.4×10^{7}	1.81×10^{8} ±9.2×10^{7}	1.31×10^{8} ±1.09×10^{8}	5.01×10^{7} ±2.17×10^{6}	6.37×10^{7} ±1.22×10^{7}
Turba/ CFN 42	3.02×10^{8}	1.2×10^{9} ±3.37×10^{7}	1.43×10^{9} ±5.29×10^{8}	1.61×10^{9} ±1.17×10^{8}	5.9×10^{8} ±1.37×10^{8}	4.86×10^{8} ±4.54×10^{7}
Turba/ LBP2	7.21×10^{9}	7.47×10^{8} ±4.91×10^{8}	2.8×10^{9} ±4.31×10^{8}	4.02×10^{9} ±7.57×10^{8}	8.37×10^{9} ±1.81×10^{9}	3.51×10^{9} ±8.33×10^{8}
CMC + A/ CFN 42	1.44×10^{8}	8.35×10^{8} ±8.71×10^{7}	7.47×10^{8} ±2.85×10^{7}	4.49×10^{8} ±2.73×10^{8}	1.41×10^{9} ±2.47×10^{8}	6.27×10^{8} ±9.43×10^{6}
CMC + A/ LBP2	4.18×10^{9}	6.97×10^{8} ±5.46×10^{7}	8.67×10^{8} ±1.19×10^{8}	1.89×10^{8} ±6.43×10^{7}	2.18×10^{8} ±3.7×10^{7}	7.03×10^{8} ±5.55×10^{7}
BC + P/ CFN 42	3.84×10^{8}	7.51×10^{8} ±4.64×10^{8}	3.89×10^{8} ±1.84×10^{7}	5.60×10^{8} ±3.61×10^{7}	7.7×10^{8} ±1.53×10^{8}	5.06×10^{8} ±1.7×10^{8}
BC + P/ LBP2	7.69×10^{9}	2.39×10^{9} ±1.09×10^{9}	4.37×10^{9} ±9.85×10^{8}	5.41×10^{9} ±7.86×10^{8}	2.96×10^{9} ±5.09×10^{7}	1.08×10^{9} ±1.01×10^{8}

Como puede observarse en la tabla anterior, el medio YEM + M fue el que menos favoreció a la conservación de la viabilidad celular en ambos microorganismos; ya que la cepa CFN 42 llegó a su fase de muerte a partir de los 120 días de almacenamiento, monitoreo en el que no hubo crecimiento de colonias cuando se realizó la siembra en agar YEM. Por su parte, aunque la cepa LBP2 aún presentaba sobrevivencia celular, su población se vio disminuida hasta en dos unidades logarítmicas y fue la menor población de todos los biofertilizantes. Estos resultados tan desfavorables pudieron deberse principalmente al pH sumamente bajo que presentó el medio YEM + M (Figura 4.5) y también por el probable agotamiento de la fuente de carbono (manitol).

Existen referencias de que aunque el medio YEM es ampliamente utilizado para bacterias rizobianas, no siempre es el que produce las más altas velocidades de crecimiento o de rendimientos en biomasa (Lasala, 2000). En estudios dónde se ha utilizado medio YEM como soporte para inoculantes rizobianos, el caldo YEM por sí mismo no obtuvo resultados óptimos para sobrevivencia celular, sin embargo, al modificar su composición agregando sustancias como glicerol o melaza, se favorecieron sus propiedades y se obtuvieron mejores resultados (Nápoles *et al.*, 2006; Singleton, 2002). En éste experimento se utilizó medio YEM adicionado con 10g/l de manitol (Vincent, 1970), sin embargo, aunque se esperaba que la adición de manitol mejorara las características del soporte para obtener una mayor sobrevivencia celular, esto no sucedió ya que éste soporte tuvo la menor sobrevivencia celular para ambos microorganismos.

Por su parte, la mezcla de CMC + A resultó ser efectiva para el mantenimiento de la viabilidad celular de ambas cepas, ya que a los 240 días de almacenamiento, su concentración celular estaba por arriba de $6x10^8$ ufc/ ml. Esto se atribuye a las propiedades reológicas del polímero (Suvorova *et al.*, 1999) y al pH óptimo que mantuvo este material durante el periodo de almacenamiento, ya que es poco probable que el almidón pueda ser utilizado como fuente de carbono por estos microorganismos (Kuykendall *et al.*, 2005). La cepa CFN 42 mostró la mayor sobrevivencia celular en este soporte.

Fernandes *et al*. (2009) estudiaron mezclas de Carboximetil celulosa con almidón en diferentes proporciones, que fueron empleadas como soportes para inoculantes rizobianos; siendo la mejor proporción 40-60% de Carboximetil celulosa y almidón respectivamente, mostrando una sobrevivencia celular en el orden de 10^9 ufc/ ml a los 180 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

En cuanto a la sobrevivencia celular en turba, ésta posee gran cantidad de materia orgánica, fuentes de carbono y otros elementos, tales como nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio, potasio y hierro, necesarios para conservar viables a las células del soporte. Además posee un porcentaje elevado de capacidad de retención de agua, de hasta un 335%, por lo que brinda un ambiente de protección para los microorganismos (Hashem y Abo-baker, 2010).

En este estudio, la turba mostró ser uno de los soportes más efectivos, siendo el que presentó mayor concentración celular para la cepa LBP2, la cual se mantuvo en un orden de 10^9 ufc/g. La cepa CFN 42 se mantuvo en un orden de 10^9 ufc/g hasta los 120 días de

almacenamiento, después del cual presentó un descenso hasta llegar a una concentración de $4.86x10^8$ ufc/g a los 240 días de almacenamiento. El mantenimiento de la viabilidad celular en este soporte, se vio beneficiado por la conservación de la humedad y el pH óptimo que presentó (Figuras 4.5 y 4.6), creando de esta manera un ambiente adecuado para la sobrevivencia de los microorganismos.

En cuanto al BC + P, al igual que la turba posee una gran cantidad de materia orgánica y fuentes de carbono y nitrógeno, que pueden ser utilizados por las bacterias, esto aunado a su alta capacidad de retención de agua, de hasta un 200% y su bajo costo (Khavazi *et al.*, 2007), lo hacen un material apropiado para ser utilizado como soporte para inoculantes rizobianos. Además, la perlita posee propiedades deseables en un material usado como soporte, tales como una alta porosidad, pH neutro, baja salinidad, capacidad támpon y además, no es tóxica ni se descompone química o biológicamente (Baixauli y Aguilar, 2002; Daza *et al*., 2000).

La sobrevivencia celular mostrada por la cepa CFN 42 en BC + P fue del orden de 10^8 ufc/g, mientras que para la cepa LBP2 fue de 10^9 ufc/g; por lo que se le considera un material muy efectivo para el mantenimiento celular. El hecho de que las concentraciones celulares de ambas cepas no fueran más altas, pudo deberse al estrés osmótico que sufrieron las células debido a la gran pérdida de humedad que sufrió este material.

En la figura 4.9 se muestra una gráfica de sobrevivencia con los diferentes soportes, durante los 240 días de almacenamiento.

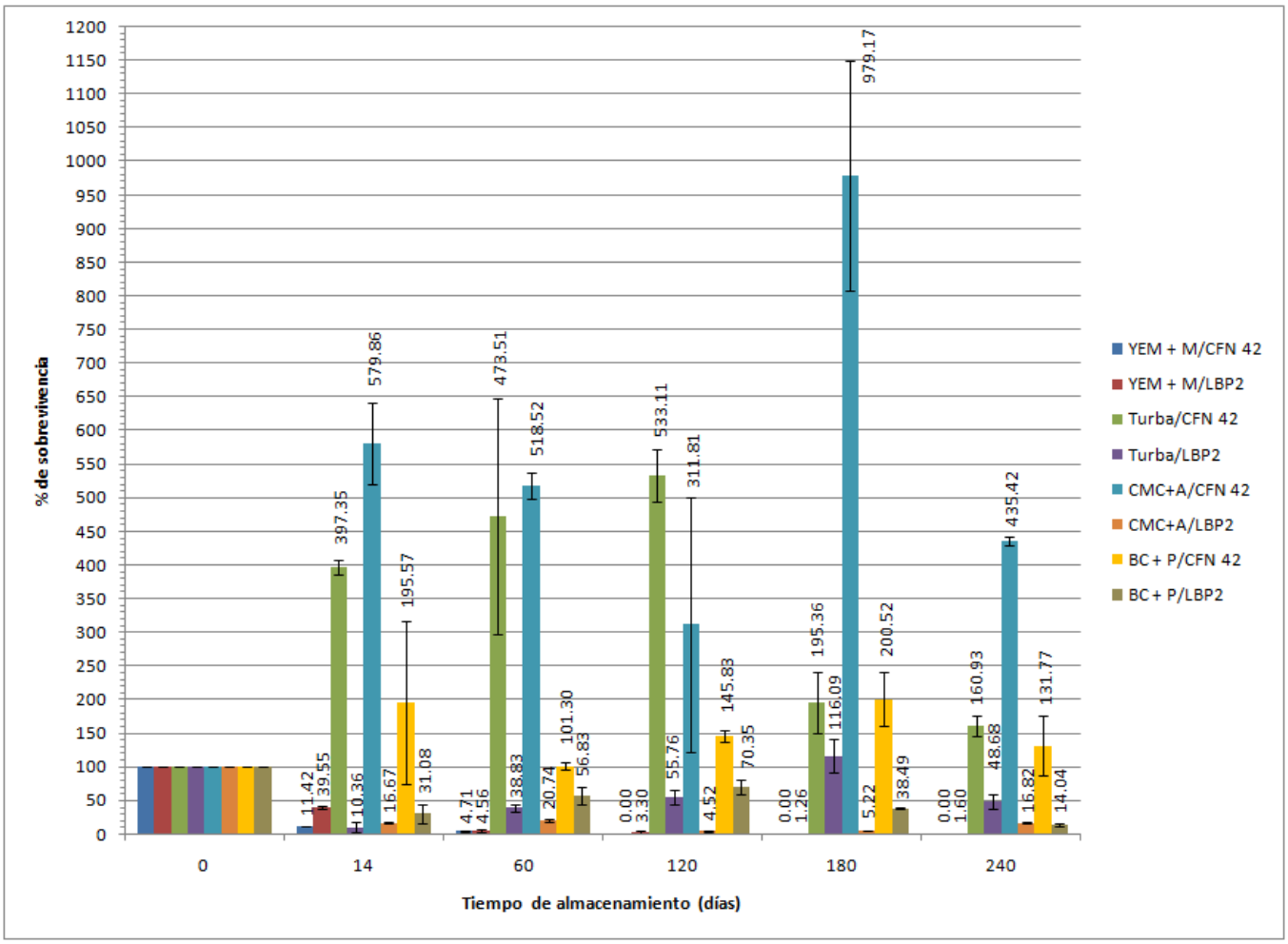


Figura 4.9. Porcentaje de sobrevivencia de *Rhizobium etli* CFN 42 y *Rhizobium* sp. LBP2 en los biofertilizantes durante 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

Puede apreciarse que la cepa CFN 42 tuvo un porcentaje de sobrevivencia muy superior a la de LBP2, ya que se matuvo por arriba del 100% en tres de los materiales utilizados a lo largo de los 240 días de almacenamiento. La única excepción fue el medio YEM + M, en el cual sólo sobrevivió hasta los 60 días.

Puede observarse que la mayor sobrevivencia de la cepa CFN 42 se dio en el soporte elaborado a base de CMC + A, en el cual el porcentaje de sobrevivencia osciló entre 300 y 1000% (Figura 4.9). Cabe señalar que el mayor porcentaje de sobrevivencia de ésta cepa se presentó a los 180 días en el soporte anteriormente mencionado (CMC + A), con un 979.17%; sin embargo, éste resultado no es confiable, ya que su desviación estándar fue

una de las más elevadas (>100%), situación que se debió muy probablemente a errores en el momento de la realización de las técnicas de dilución en series y conteo en placa. Por lo anterior, se tomó el valor obtenido a los 14 días en el soporte CMC + A como el mayor porcentaje de sobrevivencia de la cepa CFN 42, con 579.86%.

Por su parte, la sobrevivencia celular de la cepa LBP2 en los soportes sólidos estuvo por debajo de 50%, en la mayoría de los casos. Siendo las excepciones, la turba a los 120 días con 55.76% y el bagazo con perlita a los 60 y 120 días, con 56.83% y 70.35% respectivamente. Únicamente en uno de los monitoreos se alcanzó un porcentaje de sobrevivencia mayor al 100% para esta cepa y fue a los 180 días en turba.

En cuanto a los soportes líquidos, la cepa LBP2 tuvo una sobrevivencia aún menor que la de los soportes sólidos, siendo ésta menor del 50% tanto para el medio YEM + M como para la CMC + A.

Cabe mencionar que aunque la sobrevivencia celular de la cepa LBP2 fue muy baja comparada con la de la cepa CFN 42, su ventaja es que crece hasta concentraciones elevadas y si bien la población disminuyó, aún mantuvo concentraciones celulares del orden de 10^8 y 10^9 ufc/g o ufc/ml en todos los soportes, con excepción del medio YEM + M.

En el cuadro 4.6 se muestra la concentración y el porcentaje de sobrevivencia final de las cepas, en los diferentes soportes.

Cuadro 4.6. Sobrevivencia de *Rhizobium etli* CFN 42 y *Rhizobium* sp. LBP2 en los diferentes biofertilizantes a los 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente

Tratamientos	**240 días de almacenamiento**	
	Sobrevivencia celular (ufc/g ó ufc/ml)	**% de sobrevivencia**
YEM + M/ CFN 42	0^{a}	0^{a}
YEM + M/ LBP2	$6.37 \times 10^{7\ a}$	1.60^{a}
Turba/ CFN 42	$4.86 \times 10^{8\ ab}$	160.93^{c}
Turba/ LBP2	$3.51 \times 10^{9\ d}$	48.68^{b}
CMC + A/ CFN 42	$6.27 \times 10^{8\ bc}$	435.42^{d}
CMC + A/ LBP2	$7.03 \times 10^{8\ bc}$	16.82^{a}
BC + P/ CFN 42	$5.06 \times 10^{8\ ab}$	131.77^{c}
BC + P/ LBP2	$1.08 \times 10^{9\ c}$	14.04^{a}

Como puede observarse (cuadro 4.6), las concentraciones celulares y los porcentajes de sobrevivencia no son proporcionales entre ellos, al final del periodo de almacenamiento. Esto puede notarse, ya que las mayores concentraciones celulares las tuvo la cepa LBP2, mientras que los mayores porcentajes de sobrevivencia los tuvo la cepa CFN 42.

El medio YEM adicionado con manitol fue el menos favorecedor para ambos microorganismos tanto en la concentración celular como en el porcentaje de sobrevivencia.

El soporte que tuvo la mayor concentración celular para la cepa CFN 42 fue la CMC + A, asimismo fue el que tuvo el mayor porcentaje de sobrevivencia.

En cuanto a la cepa LBP2, el soporte que tuvo la mayor concentración celular y que también tuvo el mayor porcentaje de sobrevivencia fue la turba.

4.6. Efectividad de los biofertilizantes sobre cultivos de zacate limón (*Cymbopogon citratus* L.)

Los hijuelos de zacate limón empleados en este experimento fueron inoculados con los biofertilizantes que tenían 60 días de almacenamiento. A continuación se muestran las concentraciones celulares inoculadas a los cultivos de *Cymbopogon citratus* L. de acuerdo a cada tratamiento (Cuadro 4.7).

Cuadro 4.7. Concentración celular inoculada a los cultivos de *Cymbopogon citratus* L. por cada tratamiento

Tratamientos	**Concentración celular inoculada (ufc/ml ó ufc/g)**
Control negativo*	0^{a}
Control positivo^{+}	0^{a}
YEM + M/ LBP2	$1.81 \times 10^{8\ ab}$
Turba/ LBP2	$2.8 \times 10^{9\ c}$
CMC + A/ LBP2	$8.67 \times 10^{8\ b}$
BC + P/ LBP2	$4.37 \times 10^{9\ d}$

*El control negativo es un tratamiento no inoculado y $^{+}$el control positivo es una solución de KNO_3 1.25 M

Para evidenciar los beneficios que tuvieron los biofertilizantes en los cultivos de zacate limón, se hizo la medición de los parámetros morfométricos adecuados (Antolinez *et al.*, 2008) y se compararon con controles positivos y negativos, los resultados se muestran en el cuadro 4.8.

Cuadro 4.8. Parámetros morfométricos medidos en cultivos de *Cymbopogon citratus* L. de 5 meses de edad, inoculados con diferentes tratamientos

Tratamientos	**Parámetros morfométricos**				
	Largo de raíz (cm)	**Altura total (cm)**	**Peso fresco (g)**	**Peso seco (g)**	**Número de hijuelos**
Control negativo*	69[a]	133.75[a]	26.95[a]	6.6[a]	1[a]
Control positivo[+]	86[a]	157.5[a]	30.45[a]	8.85[a]	1[a]
YEM + M/ LBP2	117[bc]	200.5[b]	31.75[a]	9.25[a]	1[a]
Turba/ LBP2	88[ab]	164.125[ab]	33.075[a]	13.375[b]	1[a]
CMC + A/ LBP2	81.5[a]	169.75a[b]	49.375[b]	13.75[b]	1[a]
BC + P/ LBP2	119.25 [c]	198.275[b]	31.4[a]	14.15[b]	1.5[a]

*El control negativo es un tratamiento no inoculado y [+]el control positivo es una solución de KNO_3 1.25 M

En el cuadro 4.9 se muestra la concentración de nitrógeno fijado en las plantas de zacate limón de 5 meses de edad.

Cuadro 4.9. Determinación de nitrógeno total en cultivos de *Cymbopogon citratus* L. de 5 meses de edad, inoculados con diferentes tratamientos

Tratamientos	**Nitrógeno total (mg de nitrógeno/g de planta)**
Control negativo*	5.8068[a]
Control positivo[+]	6.7826[bc]
YEM +M/ LBP2	8.4708[d]
Turba/ LBP2	5.9186[ab]
CMC + A/ LBP2	6.1967[ab]
BC + P/ LBP2	7.4474[c]

*El control negativo es un tratamiento no inoculado y [+]el control positivo es una solución de KNO_3 1.25 M

Puede observarse que el control positivo y el control negativo no tuvieron diferencias significativas entre ellos, en ninguno de los parámetros morfómetricos medidos (Cuadro 4.8). Únicamente tuvieron diferencias significativas en cuanto a la concentración de nitrógeno total cuantificado (Cuadro 4.9).

Por otra parte, se demostró que existieron diferencias significativas entre el control positivo y los otros tratamientos en cuanto a los parámetros morfómetricos (Cuadro 4.8). Sin embargo, sólo dos de los tratamientos mostraron diferencias significativas frente al control positivo en cuanto al contenido de nitrógeno (Cuadro 4.9).

Los tratamientos que tuvieron una diferencia significativa con respecto al control positivo en cuanto al largo de la raíz fueron YEM + M/ LBP2 y BC + P/LBP2. En cuanto a la altura total, los tratamientos con diferencias significativas con respecto al control positivo fueron YEM + M/ LBP2, CMC+A/LBP2 y BC + P/ LBP2. Por otra parte, sólo el tratamiento CMC + A/ LBP2 mostró una diferencia significativa con respecto al control positivo en cuanto al peso fresco. En cuanto al peso seco, únicamente el tratamiento YEM + M/ LBP2 no presentó diferencia significativa frente al control positivo (Cuadro 4.8).

Por su parte, los tratamientos que mostraron diferencias significativas con respecto al control positivo en cuanto a la concentración de nitrógeno fueron YEM + M/ LBP2 y BC + P/ LBP2.

El tratamiento que más benefició a los cultivos de *Cymbopogon citratus* L. fue el de BC + P/ LBP2, ya que fue el que mejoró el mayor número de parámetros morfométricos, así como también fue el segundo mejor en cuanto a la concentración de nitrógeno encontrado con respecto al control positivo. Además, este material resultó ser el que mayor población celular tuvo a los 60 días de almacenamiento (Cuadro 4.7).

El BC + P fue uno de los mejores materiales para el mantenimiento de la concentración celular (Cuadro 4.7) y el porcentaje de sobrevivencia (Figura 4.9) a los 60 días de almacenamiento, debido a las propiedades anteriomente mencionadas, como su alta capacidad de retención de agua, disponibilidad de fuentes de carbono y energía, y bajo costo por tratarse de un material de desecho (Khavazi *et al*., 2007). Por lo que dicho material pudo emplearse exitosamente como soporte para la bacteria *Rhizobium* sp. LBP2 y como biofertilizante para cultivos de zacate limón con resultados favorables.

Todo lo anterior evidenció que estos biofertilizantes inoculados con *Rhizobium* sp. LBP2, favorecieron en diversos aspectos a los cultivos de *Cymbopogon citratus* L. a pesar de estas no pertenecen a la familia de las leguminosas y por ello no se esperaba que se estableciera una relación simbiótica.

Existen reportes de plantas pertenecientes a la familia Poaceae, tales como caña de azúcar y maíz en las cuales se ha encontrado la presencia de microorganismos endófitos (Baldani *et al*., 2000; Boddey *et al*., 1995; Martínez-Romero, 2002; Piñero *et al*, 1988). En México se ha encontrado la presencia de *R. etli* como endófito natural del maíz, en su mayoría en campos donde se lleva a cabo la rotación de cultivos maíz-frijol (Gutiérrez- Zamora y Martínez-Romero, 2001). En este caso se obtuvieron buenos resultados, sin embargo, este caso no se demostró que haya existido fijación de nitrógeno en las plantas de maíz.

En este experimento se consideró de suma importancia medir las concentraciones de nitrógeno total presentes en las plantas de *Cymbopogon citratus* L. y de este modo demostrar si existió fijación de nitrógeno en los cultivos y si ello tuvo influencia en el crecimiento y peso de los cultivos. Sin embargo, únicamente puede suponerse que se estableció una relación endofítica entre *Rhizobium* sp. y *Cymbopogon citratus* L. o en su defecto, que la bacteria haya sobrevivido en la rizosfera próxima a las raíces aunque no haya penetrado en los tejidos de la planta, ya que los rizobios son capaces de sobrevivir en tres diferentes estados, en los nódulos de las leguminosas, dentro de las plantas como endófitos y en el suelo (Wang *et al*., 2002).

Es recomendable que en posteriores experimentos de este tipo, se mida la capacidad de colonización endofítica de las bacterias rizobianas en cultivos de zacate limón, para verificar que este tipo de bacterias es capaz de establecer una relación endofítica con *Cymbopogon citratus* L., mediante la técnica empleada por Gutiérrez-Zamora y Martínez-Romero (2001). Además de realizar otras pruebas para comprobar si *Rhizobium* sp. es capaz de desarrollar otros mecanismos PGPR tales como la producción de hormonas (Perrine *et al*., 2004), de enzimas (Mayak *et al*., 2004) de sideróforos (Van Rossum *et al*., 1994; Carson *et al*., 2000) y solubilización de fosfatos (Rodriguez y Fraga, 1999); y de este modo comprobar si puede atribuírseles la mejora de ciertos parámetros morfométricos.

Capítulo V

Conclusiones y recomendaciones

- La cepa LBP2 fue capaz de crecer en caldo YEM hasta alcanzar concentraciones superiores a 8 x 10^9 ufc/ml, lo cual representa una gran ventaja y la hace una bacteria muy apropiada para ser empleada como biofertilizante.
- El porcentaje de viabilidad de la cepa LBP2 se encuentró por debajo del 50% en todos los biofertilizantes; sin embargo, dicha cepa fue capaz de conservar la mayor concentración celular, por encima de 3 x 10^9 ufc/g en turba a los 240 días de almacenamiento a temperatura ambiente.
- La concentración celular de la cepa LBP2 fue superior a la de la cepa CFN 42 en todos los soportes, sin embargo, la cepa CFN 42 tuvo el mayor porcentaje de viabilidad, por encima del 400% en carboximetil celulosa con almidón.
- El medio YEM adicionado con manitol fue el menos eficiente en la conservación de la viabilidad de la cepa LBP2 y en el caso de la cepa CFN 42, únicamente sobrevivió hasta los 120 días. La disminución del pH de este soporte fue probablemente el factor crítico que contribuyó a la disminución de la concentración celular la cepa LBP2 y a la desaparición de la cepa CFN 42.
- Tanto la turba como el bagazo de caña con perlita fueron capaces de mantener concentraciones superiores a 1 x 10^9 ufc/g de la cepa LBP2.
- La Carboximetil celulosa con almidón fue el soporte más efectivo en la conservación de la viabilidad celular para la cepa CFN 42, tanto en porcentaje como en concentración celular.
- La turba fue el soporte más efectivo en la conservación de la viabilidad celular de la cepa LBP2, tanto en porcentaje como en concentración celular.
- El medio YEM adicionado con manitol e inoculado con la cepa LBP2, fue el soporte más eficiente en cuanto al aumento de la concentración de nitrógeno presente en los cultivos de *Cymbopogon citratus* L.; lo cual contrasta notoriamente con su poca

capacidad para conservar la viabilidad de la cepa LBP2. Lo anterior sugiere en este caso, que la capacidad de un biofertilizante para aumentar la concentración de nitrógeno en una planta no está directamente relacionada con una alta concentración celular del microorganismo.

- El bagazo de caña con perlita fue capaz de mantener concentraciones por encima de 1×10^9 ufc/g de la cepa LBP2 hasta por 240 días a temperatura ambiente, lo cual lo hace un material apropiado para ser usado como soporte; además, se obtuvieron mejoras en los cultivos de *Cymbopogon citratus* L. en cuanto a largo de la raíz, altura total, peso seco y contenido de nitrógeno total, con respecto al control positivo. Aunado a lo anterior, es importante destacar la disponibilidad y el bajo costo del bagazo de caña por tratarse de un residuo.

- El bagazo de caña con perlita resultó ser un material eficaz para ser empleado como soporte de bacterias rizobianas así como también para ser utilizado como biofertilizante en cultivos de zacate limón con buenos resultados.

- La bacteria *Rhizobium sp.* LBP2 fue capaz de favorecer el crecimiento y el contenido de nitrógeno presente en *Cymbopogon citratus* L. a pesar de no ser una leguminosa y por lo tanto de no establecer una relación simbiótica con dicha planta.

Capítulo VI

Bibliografía

A.O.A.C. (1965), Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington D. C.

A.O.A.C. (1990), Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington D. C.

A.O.A.C. (1995), Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington D. C.

A.O.A.C. (1998), Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 16° edición, Washington D. C.

A.O.A.C. (2000), Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington D. C.

Abd-Alla, M. H. y Omar, S. A. (2001). Survival of rhizobia/bradyrhizobia and rock-phosphate-solubilizing fungus *Aspergillus niger* on various carriers from some agroindustrial wastes and their effects on nodulation and growth of faba bean and soybean. *J. Plant Nutr*. Vol(24): 261-272.

Abdul Rahim, K., Balog, R., Gandanegara, S., Jiarong, P., Narumi, I., Nuntagij, A., Ohyama, T., Saito, M., Senoo, K., Sun Suh, J., Van Toan, P. y Yokoyama, T. (2006). Carriers for Biofertilizers. En: *Biofertilizer Manual*. Foro para la Cooperación Nuclear en Asia. Proyecto biofertilizante. Japan Atomic Industrial Forum. 41-49 p.

Aguirre, J., Irizar, M., Durán, A., Grajeda, O., Peña, M., Loredo, C. y Gutiérrez, A. (2009). Importancia y definición de los biofertilizantes. En: *Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México. 11-31 p.

Albareda, M., Rodríguez Navarro, D., Camacho, M. y Temprano, F. (2008). Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol (40): 2771-2779.

Alexander, M. (1977). *Introduction to soil microbiology*. Segunda edición. John Wiley y Sons (Eds). Springer-Verlag, USA. 423-437 p.

Allen, O.N. y Allen, E.K. (1981). *The Leguminosae: a Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation*. University of Wisconsin Press, U.S.A. 807 p.

Antolinez, J., De Colmenares, N., Usubillaga, A., Darghan, E. y Linares, S. (2008). Evaluación de variables agronómicas en el cultivo de limonaria (*Cymbopogon citratus* Stapf) para la producción de aceite esencial. *Interciencia*. Vol(9): 693-699.

Antoun, H., Beauchamp, C. y Goussard, N. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non legumes. Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil.* Vol(204): 57-67.

Aparicio-Trejo, P. y Arrese-Igor, C. (1993). Fijación de nitrógeno. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal.* Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (Eds). Mc Graw Hill, España. 193-214 p.

Arias-Poblano, C., García-Cabrera, R., Villegas-Cruz, J., Leonardo, A., Morales, M. y Trujillo-Roldan, M. (2011). Evaluación del crecimiento de una cepa de *R.etli* utilizada como biofertilizante, en cultivos a nivel matraz y biorreactor, bajo distintas condiciones nutrimentales y de operación. *XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Querétaro, 19 y 20 de Junio de 2011, 17 p.

Arshad, M. y Frankenberger, W. (1998a). Microbial production of plant hormones. *Plant and soil*. Vol(133): 1-8.

Arshad, M. y Frankenberger, W. (1998b). Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions. *Advances in Agronomy*. Vol(62): 45-151.

Baixauli, C. y Aguilar, J. (2002). Principales sustratos usados, características y propiedades. Principales sustratos empleados, características y propiedades. En: *Cultivo sin suelo de hortalizas. Aspectos prácticos y experiencias.* Generalitat Valenciana, España. 15-26 p.

Bala, A. y Giller, K. (2001). Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes. *New Phytologist*. Vol(147):495-507.

Balandreau, J. y Knowles, R. (1978). The rhizosphere. En: *Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants*. Dommergues, Y. y Krupa, S. (Eds). Elsevier, Países bajos. 243-268 p.

Baldani, J.I., Oliveira, A.L.M., Guimaraes, S.L., Baldani, V.L.D., Reis, F.B., Jr., Silva, L.G., Reis, V.M., Teixeira, K.R.S. y Döbereiner, J. (2000). Biological nitrogen fixation (BNF) in non-leguminous plants: the role of endophytic diazotrophs. En: *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*. Pedrosa, F.O., Hungria, M., Yates, G. y Newton, W. E. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Países Bajos. 397–400 p.

Barea, J. y Azcón-Aguilar, C. (1983). Mycorrhiza and their significance on nodulating nitrogen fixing plants. *Advances in agronomy*. Vol(36):1-54.

Bashan, Y. (1986). Alginate Beads As Synthetic Inoculant Carriers for the Slow Release of Bacteria That Affect Plant Growth. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol(51): 1089-1098.

Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv*. Vol(16):729-740.

Bashan, Y. y Holguin G. (1997). Azospirillum-Plant Relationships: Environmental and Physiological Advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* Vol (43): 103-121.

Bashan Y. y Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth- promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* Vol(30): 1225-1228.

Bashan, Y., Holguín G. y Ferrera-Cerrato R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. II. Bacterias asociativas de la rizosfera. *Terra*. Vol(14): 195-210.

Beck, D.P., Materon, L.A. y Afandi, F. (1993). Practical *Rhizobium*-Legume Technology Manual. Technical Manual N° 19. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Aleppo. 1-60 p.

Beetle, A. A. (1987). Noteworthy grasses from Mexico XIII. *Phytologia.* Vol (4):297-309.

Benedetti E., Zúñiga D. y Carbajal N. (1991). Viabilidad y efectividad de diez inoculantes de *Rhizobium* almacenados durante seis meses a 4°C. En: *Segunda Reunión de Expertos en Leguminosas de Grano de la Zona Andina*. Cali. 113 p.

Bergensen, F. (1978). Physiology of legume simbiosis: Chapter 8B. En:*Interactions between nonpathogenic soil microorganisms and plants.* Dommergues, Y. y Krupa, S. (Eds). Elsevier Scientific Publishing Company, Países bajos. 305-326 p.

Bissonnette, N. y Lalande, R. (1988). High survivability of cheese whey-grown Rhizobium cells upon exposure to physical stress. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol(54): 183-187.

Boddey, R.M., de Oliveira, O.C., Urquiaga, S., Reis, V.M., de Olivares, F.L., Baldani, V.L.D. y Döbereiner, J. (1995). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil.* Vol(174):195–209.

Boddey, R.M., Urquiaga, S., Reis, V. y Döbereiner, J. (1991). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant Soil.* Vol(137): 111–117.

Bowen G. D. y Rovira A. D. (1999). The Rhizosphere and Its Management to Improve Plant Growth. *Advances in Agronomy*. Vol(66): 1-102.

Bremner, J. M. y Mulvaney, C. S. (1982). Nitrogen-Total: methods of soil and plant analysis. *American Soc. of Agron. Madison*. Vol(9): 595-624.

Burton, J. (1981). Rhizobium inoculants for developing countries. *Trop Agricult* (Trinidad). Vol(58): 291-295.

Caballero-Mellado, J. (1991). Experiencias de inoculación de maíz y trigo con *Azospirillum* a nivel intensivo y de investigación. *Memorias del III congreso Nacional de la Fijación Biológica del Nitrógeno*. Centro de Fijación Biológica del Nitrógeno, UNAM. Cuernavaca, Morelos, México; 2 al 5 de Diciembre. 20-24 p.

Carrol, B., McNeil, D. y Gresshoff, P. (1985). A supernodulation and nitrate-tolerant symbiotic (nts) soybean mutant. *Plant Physiology*. Vol(78): 646-650.

Carson K., Meyer, J. y Dilworth, M. (2000). Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol(32): 11-21.

Chabot , R., Antoun, H., Kloepper, J. y Beauchamp, C. (1996). Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar. Phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol(62): 2767-2772.

Chaintreuil, C., Giraud, E., Prin, Y., Lorquin, J., Bâ, A., Gillis, M., de Lajudie, P. y Dreyfus, B. (2000). Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl. Environ. Microbiol*. Vol(66): 5437–5447.

Chakravarty, U. y Purkayastha, R. (1984). Role of Rhizobitoxine in protecting soybean roots from *Macrophomina phaseolina* infection. *Can. J. Microbiol*. Vol(30): 285-289.

Chao, W. L. y Alexander, M. (1984). Mineral soils as carriers for *Rhizobium* inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol (47): 94-97.

Chen, W., Laevens, S., Lee, T., Coenye, T., De Vos, P., Mergeay, M. y Vademme, P. (2001). Ralstonia taiwanensis sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of cystis fibrosis patient. *International journal of systematic Evolution Microbiology*. Vol (51): 1729-1735.

Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y. y Chen, X. (1995). Characteristics of *Rhizobium thianshanense* sp. Nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid and saline environment in Xinjiang, Pleople´s Republic of China. *International journal of systematic bacteriology*. Vol (45): 153-159.

Chisowa, E., May, D. y Farman, D. (1998). Volatile constituents of the essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf grow in Zambia. *Flav. Fragr. J.* Vol (13): 13-29.

Clayton, W. D. y Renvoize, S. A. (1986). Genera Graminum. Grases of the world. *Kew Bulletin Additional Series XIII.* Londres, Inglaterra, 389 p.

Crowley, D.E., Wang, Y. C., Reid, C.P y Szaniszlo, P.J. (1991). Mechanisms of iron acquisitionfrom siderophores by microorganisms and plants. *Plant and Soil*. Vol(130): 179-198.

Cumbre para la Tierra (1992). Programa 21. Programa de acción de las Naciones Unidas de Río. Río de Janeiro, Brasil, 3 al 14 de Junio.

Daza, A., Santamaría, C., Rodriguez, D., Camacho, M., Orive, R. y Temprano, F. (2000). Perlite as carrier for bacterial inoculants. *Soil & Biochemistry.* Vol (32): 567-572.

De Freitas, J. y Germida, J. (1991). *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol.* Vol(37):780-784.

Denardin, N.D. y Freire, J.R. (2000). Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol(16): 215-217.

Dey, R., Pal, K., Bhatt, D. y Chauhan, S. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research.* Vol (159): 371-394.

Di Ciocco, C. y Rodriguez, E. (1994). Field inoculation of *Setaria italica* with *Azospirillum* spp. In Argentine humid pampas. *Field Crop Res*. Vol(37): 253-257.

Dixon, R. y Wheeler, C. (1986). *Nitrogen fixation in plants*. Chapman y Hall (Eds). Blackie, USA. 45-60 p.

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre Juan Francisco, Kapulnik, Y., Brener, S.,Burdman, s., Kadouri, D., Sang, S. y Okon J. (2001). Responses of agronomicallyimportant crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* Vol (9): 871-879.

Döbereiner, J. (1977). Present and future opportunities to improve the nitrogen nutrition of crops through biological fixation. En: *Biological nitrogen fixation in farming systems of tropics.* Ayanaba, A. y Dart, P. (Eds). John Wiley and Sons, USA. 3-12 p.

Döbereiner, J., Urquiaga, S., Boddey, R.M. y Ahmad N. (1995). Alternatives for nitrogen of cropsin tropical agriculture. Nitrogen economy in tropical soil. *Fertilizer Research*. Vol(42): 339-346.

Dommergues, Y. (1978). Impact on soil management and plant growth. En: *Interacions between non-pathogenic soil microorganisms and plants.* Dommergues, Y. y Krupa, S. (Eds). Elsevier. Países Bajos. 443-458 p.

Einarsson, S., Gudmundsson, J., Sverrisson, H., Kristjansson J. y Runolfsson, S. (1993). Production of *Rhizobium* Inoculants for *Lupinus nootkatensis* on Nutrient-Supplemented Pumice. *Applied and environmental Microbiology.* Vol(11): 3666-3668.

Elevitch, C.R. (2004). Biological Nitrogen Fixation. En: *The overstory book. Cultivating connections with trees*. Elevitch, C. R. (Ed). Permanent Agriculture Resources (PAR), USA. 81-82 p.

Engelhard, M., Hurek, T. y Reinhold-Hurek, B. (2000). Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ. Microbiol*. Vol(2):131–141.

Essalmani H. y Lahlou H. (2003). Mécanismes de bioprotection des plantes de lentile par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* sp. Lentis. *C.R. Biologies.* Vol(326): 1163-1173.

Estrada, G. (2008). *Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: efecto sobre la humedad y pH del producto*. Tesis, Ponticia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias en la carrera de microbiología industrial. Bogotá, Colombia.

Evans, D.O. (1996). International Workshop on the Genus *Calliandra.* Proceedings in Bogor (Indonesia). *Forest, Farm and Community Tree Research Reports* Special Issue. Winrock International Institute for Agricultural Development. London (United Kingdom). 23-27 de Enero, 268 p.

Fages, J. (1994). *Azospirillum* inoculants and field experiments. En: *Azospirillum-Plant associations*. Okon, Y. (Ed). CRC Press, Florida. 87-110 p.

Fernandes, J., Paulo, I., Tiago, R., Paulo, J., Gustavo, X. y Gouvêa, N. (2009). Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. *Pesq. agropec. bras.* Vol(44): 1184-1190.

Font Quer, P. (1977). Diccionario de Botánica. 6° reimpresión. Editorial Labor, S. A. Barcelona, España. 1244 p.

Fouilleux, G., Revellin, C., Hartman, A. y Catroux, G. (1996). Increase of *Bradhyrhizobium japonicum* numbers in soils and enhanced nodulation of soybean using granular inoculants amended with nutrients. *FEMS Microbiol Ecology.* Vol(20): 173-183.

Freire, J. (1975). Micorbiologia do solo. Departamento do solos. Facultadade de Agronomía de la Universidad Federal do Río Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 234 p.

Freire, J. y Vernetti, F. (1999). A pesquisa com soja, a seleçao de rizóbio e produção de inoculantes no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha.* Vol(5): 117-126.

Fuentes-Ramírez, L.E., Caballero-Mellado, J., Sepúlveda, J. y Martínez-Romero, E. (1999). Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiol. Ecol*. Vol(29): 117–128.

Gough, C., Vasse, J., Galera, C., Webster, G., Cocking, E. y Dénarié, J. (1997). Interactions between bacterial diazotrophs and non-legume dicots: *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Soil.* Vol(194):123–130.

Graham, H. (1984). Plant factors affecting nodulation and symbiotic nitrogen fixation in legumes. En: *Biological nitrogen fixation ecology technology and physiology.* Alexander, M. (Ed). Plenum Press, USA. 75-95 p.

Gu, C., Wang, E., Tian, C., Han, T., Chen, W. y Sui, X. (2008). Rhizobium miluonense sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from Lespedeza root nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol(58): 1364-1368.

Gupta, B. K. y Jain, N. (1978). Cultivation and utilization of Genus *Cymbopogon* in Indian. *Perfumer India.* Vol(22): 55-68.

Gutiérrez-Zamora, M. y Martínez-Romero, E. (2001). Natural andophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biotechnology*. Vol(91): 117-126.

Handique, A.K. y Gupta, R.K. (1985). Variation of oil content in lemon grass as influenced by seasonal changes and its genetics. *Indian*. Vol(2): 54-63.

Hartmann, A., Stoffels, M., Eckert, B., Kirchhof, G., y Schloter, M. (2000). Analysis of the presence and diversity of diazotrophic endophytes. En: *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for Analysis of a Biological Process*. Triplett, E. W. (Ed). Horizon Scientific Press, Reino Unido. 727–736 p.

Hashem, M. y Abo-baker, A. (2010). Evaluation of Water hyacinth and Sugarcane Bagasse Composts as a Carrier for *Rhizobium* Inoculants and their effects on Faba Bean. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, Vol(6): 1022-1028.

Hassan Dar G., Zargar M.Y. y Beigh G.M. (1997). Biocontrol of *Fusarium* Root Rot in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using Symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. *Microb. Ecol.* Vol(34): 74-80.

Hedge, S.V. y Brahmaprakash, G. P. (1992). A dry granular inoculant of *Rhizobium* for soil application. *Plant Soil*. Vol(144): 309-311.

Hernández, L., Paredes, I. y Alonso, O. (1998). Estudio del efecto diurético de la hoja de *Cymbopogon citratus* en modelo de ratas. *Rev. Cub. Plant. Medic*. Vol(3): 79-82.

Hill, S. (1988). How is nitrogenase regulated by oxygen? *FEMS Lett. Microbiol. Rev*. Vol(54): 111-130.

Höflich, G., Wiehe, W. y Hecht-Buchholz, C. (1995). Rhizosphere colonization of different crops with growth promoting *Pseudomonas* and *Rhizobium* bacteria. *Microbiol. Res*. Vol(150)**:** 139–147.

Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., Van Montagu, M. y Kellenberger, E. (1994). Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* Vol(176): 1913–1923.

IFAI (Instituto de Fomento Agropecuario e Industrial). (2005). Producción de abonos y fertilizantes a partir de subproductos de la industria azucarera orgánica. Ingenio Azucarero San Javier. Instituto de Fomento Agropecuario e Industrial, Misiones, AR. 4 p.

James, E.K. (2000). Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Res*. Vol(65): 197–209.

James, E.K. Reis, V.M., Olivares, F.L., Baldani, J.I. y Döbereiner, J. (1994). Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J. Exp. Bot.* Vol(45): 757–766.

James, E.K. y Olivares, F.L. (1998). Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* Vol(17): 77–119.

Jeger, M. J. y Spence, N. J. (2001). Plant interactions with Endophytic Bacteria. En: *Biotic interactions in Plant-Pathogen Associations.* Hallman, J. (Ed). CABI Publishing, Reino Unido. 87-120 p.

Jordan, D. C. y AIIen, O. N. (1974). Genus II. Rhizobium. En: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Buchanan, R. E. y N. E. Gibbons (Eds.). The Williams & Wilkins Co., USA. 262-264 p.

Kapulnik, Y. y Okon, Y. (2002). Plant growth promotion by rhizosphere bacteria. En: *Plant roots. The hidden half. Third edition revised and expanded.* Waisel, Y., Eshell, A. y Kafkafi, U. (Eds). Marcel Dekker, USA. 869-895 p.

Kaushal, D., Bansal, M. R. y Bansal, M. P. (1996). Cell kinetics of the rat seminiferous epithelium following lead acetate treatment. *J Trace Elem Exp Med*. Vol(9): 47-56.

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

Kloepper, J. W., Schroth, M. N. y Miller, T. D. (1980). Effects of Rhizosphere colonization by plant growth–promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*. Vol(70):1078-1082.

Kostov, O. y Lynch, J. M. (1998). Composted sawdust as a carrier for *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* and *Azospirillum* in crop inoculation. *World Jour. Microbiol. Biotechnol.* Vol(3): 389-397.

Kremer, R. J. y Peterson, H. L. (1982). Effect of inoculant carrier on survival of *Rhizobium* on inoculated seed. *Soil. Sci.* Vol(134): 117-125.

Kulkarni, R., Mallavarapu, G., Baskaran, K. y Armes, S. (1997). Essential oil composition of a Citronella-like variant of lemongrass. *JEOR.* Vol(9): 393-395.

Kuykendall, L., Young, J., Martinez, E., Kerr, A., Sawada, H. (2005). Genus I. *Rhizobium.* En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Garrity, G., Brenner, D., Krieg, N., Staley, J. (Eds). Springer, USA. 325-340 p.

Lasala, F. (2000). Mesorhizobium plurifarium, una nueva especie productora de polihidroxialcanoatos (PHAs): estudio de la síntesis a escala de zaranda. Universidad de La Habana, 60 p.

Lloret, L. y Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. Rev. *Latinoam. Microbiol*. Vol(47): 43-60.

Long, S. R. (1989). *Rhizobium*-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell*. Vol(56): 203-214.

Loredo, O., Beltrán, L. Peña del Río, A. (2007). Uso de biofertilizantes para la producción de maíz forrajero en condiciones de temporal. Folleto científico N° 2. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noreste. Campo Experimental San Luis. 60 p.

Lucy, M., Reed, E. y Glick, B. R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Vol(86): 1-25.

Manual de Instrucciones C200 series. Fotómetro Multiparamétrico de Sobremesa. Hanna Instruments.

Marschner, H. y Römheld, V. (1996). Root-Induced changes in the availability of micronutrients in the rhizosphere. En: *Plant roots: The hidden half*. Waisel, Y., Eshel, A. y Kafkafi, U. (Eds). Marcel Dekker, Inc., USA. 557-579 p.

Martínez-Romero, E., (2002). Role of nitrogen fixation in common bean based cropping systems in Latin America: an overview of *Phaseolus vulgaris-Rhizobium* symbiosis. *Plant Soil* (accepted for publication).

Martínez-Romero, E. y Caballero-Mellado, J. (1996). *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.* Vol(15): 113-140.

Martínez-Romero, E. y Rosenblueth, M. (1990). Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl.Environ. Microbiol.* Vol(56): 2384-2388.

Matos Cuzcano, G. y Zúñiga Dávila, D. (2003). Viabilidad de cepas de rizobios en inoculantes basados en soportes no estériles. *Ecol. Apl.* Vol(2): 81-85.

Mayak, S., Tirosh, T. y Glick, B. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress**.** *Plant Physiology and Biochemistry*. Vol(42): 565-572.

Mhadhbi, H., Jebara, M., Limam, F. y Elarbi Aouani, M. (2004). Rhizobial strain involvement in plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chickpea-rhizobia symbioses: modulation by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry.* Vol(42): 717-722.

Mizrahi, I. (1967). Aceites esenciales. Producción en la Argentina, métodos de extracción y de análisis. *Rev. Fac. Agr. Univ. La plata* . Vol(43):165-186.

Moreira, F.M., De Souza, S.M., y Faria, S.M. (1992). Occurence of nodulation in legume species in the amazon region of Brazil. *New Phytologist.* Vol(121): 563-570.

Moullin, L., Munive, A., Dreyfus, B. y Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the betasuclass of Proteobacteria. *Nature*. Vol(41): 948-950.

Muniruzzaman, S. y Khan, S. (1992). Suitability of some local agro-industrial wastes as carrier materials for *Rhizobium* sp. Infecting *Sesbania bispinosa. World Journal of microbiology and biotechnology*. Vol(8): 329-330.

Nair E. (1982). Promotional aspects of lemon grass. Cultivation & Utilization of Aromatic Plants Regional Research Laboratory. *Jommu-Tawi*. Vol (28): 314-317.

Nápoles, M.C., Martínez, J., Costales, D., Gómez, G. y Somers, E. (2006). Efecto de diferentes medios de cultivo en la multiplicación celular de *Bradyrhizobium elkanii*. *Cult. Trop*. Vol(27): 35-38.

Neyra, M. (1995). Información general sobre la fijación de nitrógeno. En: *Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno.* FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Italia. 1-5 p.

Núñez, A. (2009). Turba y zeolita como soportes de inoculantes microbianos con acción fertilizante. *ICIDCA*. Vol(3): 22-27.

O'Callaghan, K.J., Davey, M.R. y Cocking, E.C. (1999). Xylem colonization of *Sesbania rostrata* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. En: *Highlights of Nitrogen Fixation Research*. Martínez, E. y Hernández, G. (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, U.S.A. 145–147 p.

Odee, D., Haukka, K., McInroy, S., Sprent, J., Sutherland, J. y Young, J. (2002). Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. *Soil Biology. Biochemistry.* Vol(34): 801-811.

Okon, Y. y Labandera, C. (1994). Agronomic Applications of *Azospirillum* evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology.* Vol(12): 1591-1601.

Okon, Y., Kapulnik, Y. y Sarig, S. (1988). Field inoculation studies *Azospirillum* in Israel. En: Biological Nitrogen Fixation Recent Developments. Subba Rao, N. (Ed). Oxford & IBH Publishing Co, India. 175-195 p.

Olsen, G. J, Woese, C. R. y Overbeek, R. (1994). The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J Bacteriol* . Vol(176): 1-6.

Ormeño-Orrillo, E. y Zúñiga-Dávila D. (1999a). Supervivencia y características simbióticas de *Bradyrhizobium* sp. inoculado en una mezcla de suelo y compost. *Biota.* Vol(99): 41-49.

Ormeño-Orrillo, E. y Zúñiga-Dávila D. (1999b). Optimización del tiempo de esterilización de soportes basados en suelo y compost en la producción de inoculantes para leguminosas. *Revista Peruana de Biología.* Vol(6): 181-184.

Ormeño-Orrillo, E. y Zúñiga-Dávila, D. (1998). Modification of YEM broth for medium scale production of legume inoculants. *Revista Peruana de Biología.* Vol(2): 83-89.

Ospina, H., Gil, J., Espinosa, J. y Loaiza, J. (2007). Protocolo para el desarrollo y la evaluación de suplementos nutricionales para rumiantes, elaborados a partir subproductos de la agroindustria de la caña de azúcar. Informe final. Documento confidencial. Cali, CO. 62 p.

Paczkowski M. y Berryhill D. (1979). Survival of *Rhizobium phaseoli* in coal-based legume inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol(38): 612-615.

Pareek, S. y Gupta R. (1985). On the status of agronomic research in *Cymbopogon* grasses in India with projections on the future work. *Indian Perfumer.* Vol(29): 215-224.

Parker, R. y Ring, S. (2001). Aspects of the physical chemistry of starch. *Journal of Cereal Science.* Vol(34): 1-17.

Perrine F., Rolfe B., Hynes M. y Hocart C. (2004). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of indolacetic acid and tryptophan following aquerous chloroformate derivatisation of *Rhizobium* exudates. *Plant Physiology and Biochemistry.* Vol(42): 723-729.

Pesenti-Barili, B., Ferdani, E., Mosti, M. y Degli-Innocenti, F. (1991). Survival of *Agrobacterium radiobacter* K84 on various carriers for crown gall control. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol(57): 2047-2051.

Phillips, D.A., Martínez-Romero, E., Yang, G. P. y Joseph, C.M. (2000). Release of nitrogen: a key trait in selecting bacterial endophytes for agronomically useful nitrogen fixation. En: *The Quest for Nitrogen Fixation in Rice. Proceedings of the Third Working Group Meeting on Assessing Opportunities for Nitrogen Fixation in Rice*. Ladha, J. K. y Reddy, P. M. (Eds). International Rice Research Institute, Filipinas. 205–217 p.

Piñero, D., Martínez, E. y Selander, R.K. (1988). Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol(54): 2825–2832.

Pohl, R. W. (1986). Man and the grasses: a history. En: Grass systematics and evolution. Soderstrom, T. R., Hilu, K. W., Campbell, C. S. y Barkworth, M. E. (Eds.). Smithsonian Institute, USA. 355-358 p.

Pramakik M. y Iswaran V. (1973). Survival of *Rhizobium japonicum* in various carriers. *Zbl. Bakt. Abt. II.* Vol(128): 232-239.

Quilambo, O.A. (2003). The Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Simbiosis. *Afr. J. Biotechnol.* Vol(12): 539-546.

Quintero, A., González, N. y Vera, A. (1999). Obtención y análisis cromatográfico del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Limonaria). *Mem. Inst. Biol. Exper*. Vol(1):211-214.

Rahman, M., Alam, M. y Khunda, M. (1992) Comparative yield performance of essential oil of five *Cymbopogon* species, in Bangladesh*. Ind. Perf.* Vol(32): 117-123.

Rao, B. y Sunita, L. (1992). New aroma chemicals in *Cymbopogons .Ind. Perf.* Vol(36): 241-245.

Rauber, C.S., Gutierres, S. y Schappoval, E.E. (2005). Determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* Vol(37): 597-601.

Rebah, F., Prévost, D., Yezza, A., Tyagi R. D. (2007). Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculants production: A review. *Bioresour Technol.* Vol(98): 3535-3546.

Rebah, F., Tyagi, R., Prevost, D. (2002). Wastewater sludge as a substrate for growth and carrier for rhizobia: the effect of storage conditions on survival of *Sinorhizobium meliloti*. *Bioresour Technol.* Vol(83):145-151.

Reddy, P.M., Ladha, J.K., So, R.B., Hernández, R.J., Ramos, M.C., Angeles, O.R., Dazzo, F.B. y de Bruijn, F.J. (1997). Rhizobial communication with rice roots: induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. *Plant Soil.* Vol(194): 81-98.

Reinhold-Hurek, B. y Hurek, T., (1998a). Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Crit. Rev. Plant Sci*. Vol(17): 29–54.

Reinhold-Hurek, B. y Hurek, T. (1998b). Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol*. Vol(6): 139–144.

Rincón, R. R., Molina, E., Culebro, E. N. y Gutiérrez, M. F. (2009). Biofertilización del Timbre (*Acacia angustissima* Mill Kuntze). En: *Experiencias con biofertilizantes en cultivos de importancia para el estado de Chiapas.* Salvador, F. M. y Gutiérrez, M. F. (Eds). Universidad Autónoma de Chiapas, México. 67-76.

Rodriguez H. y Fraga R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. Vol(17):319-339.
Rojas, F., Garrido, M. y Bonilla, R. (2009). Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. *Ciencia y tecnología agropecuaria.* Vol(10): 70-80.

Rosenblueth, M. y Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interaction with host. *The American Phythopathological Society*. Vol(19): 827-837.

Roughley, R. J. (1970). The preparation and use of legume seed inoculants. *Plant Soil*. Vol(32): 675-701.

Rovira, A.D. (1961). *Rhizobium* numbers in the rhizospheres of red clover and paspalum in relation to soil treatment and the numbers of bacteria and fungi. *Aust. J. Agric. Res.* Vol (12): 77–83.

Ruschel, A.P., Henis, Y. y Salati, E. (1975). Nitrogen ^{15} tracing of N-fixation with soil-grown sugarcane seedlings. *Soil Biol. Biochem*. Vol(7):181–182.

Sanz, T., Fernández, M., Salvador, A., Muñhoz, J. y Fiszman, S. (2005). Thermogelation properties of methylcellulose (MC) and their effects on the batter formula. *Food Hydrocolloids*. Vol(19): 141-147.

Schuh, C. A. (2005). *Biopolimeros como soportes para inoculantes.* Tesis, Universidad Federeal del Rio Grande del Sur. Puerto Alegre, Brasil.

Scriban, R. (1985). Bioingeniería. En: *Biotecnología.* Sriban, R. (Ed). El manual moderno, México. 166-190 p.

Sessitsch, A., Howieson, J., Perret, X., Antoun, H. y Martínez-Romero, E. (2002). Advances in *Rhizobium* Research. *Critical Reviews in Plant Sciences.* Vol(21): 323-378.

Sherwood, M. T. (1972). Inhibition of *Rhizobium trifolii* by Yeast Extracts or Glycine is Prevented by Calcium. *Journal of General Microbiology*. Vol(71):351-358.

Shin, S., Bien, J., Park, K. H. y Moon, T. W. (2004). Effect of partial acid hydrolisis and heat–moisture treatment on formation of resistant tuber starch. *Cereal Chem*. Vol (81): 194–198.

Silva, M. F., Oliveira, P. J., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G. y Reis, V. M. (2009). Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. *Pesq. Agropec. Bras*. Vol(44): 1437-1443.

Silva, V., Defreitas, J., Matos, A., Paiba, W., Presgrave, O. y Fingola, F. (1991). Neurobehavioural study of the effect of betemyrcene on rodents. *Brazil J. Biol. Res.* Vol(24): 827-831.

Singleton, P., Keyser, H. y Sande, E. (2002). Development and Evaluation of Liquid Inoculants. En: *Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam.* Herridge, D. (Ed). Springer, Países Bajos. 52-66 p.

Smith, R. S. (1992). Legume inoculant formulation and application. *Canadian J. MIcrobiol*. Vol(38): 485-492.

Solomons, G. T. (2004). Carbohidratos. En: *Química Orgánica*. Wiley, J. & Sons (Eds). Limusa Wiley, México. 1191-1244 p.

Somasegaran, P., y Hoben, H. J. (1985). General Microbiology *Rhizobium* Introduction. En: *Methods in legume-rhizobium technology*. Springer Laboratory. United States Agency for International Development (USAID), Hawaii. 23-28 p.

Soto, R., Vega, G. y Barrios, A. (1984). Método para el cálculo del área foliar en Caña Santa (*C. citratus)*. *Rev. Cienc. Técn. MINIL*. Vol(2): 39-41.

Soto, R., Vega, G. y Tamajón, A. (2002). Instructivo técnico para el cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Caña santa). *Rev cubana plant med.* Vol(7): 89-95.

Souza, V., Bain, J., Silva, C., Bouchet, V., Valera, A., Marquez, E. y Eguiarte, L.E. (1997). Ethnomicrobiology: do agricultural practices modify the population structure of the nitrogen fixing bacteria *Rhizobium etli* biovar phaseoli. *J. Ethnobiol.* Vol(17): 249–266.

Sprent, J.I. y James, E.K. (1995). N_2–fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation. En: *Azospirillum VI and related microorganims.* del Gallo, F. I., Vanderleyden, J. y de Zamaroczy, M. (Eds). Springer-Verlag, Alemania. 15–30 p.

Strijdom, B.W. y Van Rensburg, H. (1981). Effect of steam sterilization and gamma irradiation of peat on quality of *Rhizobium* inoculants. *Appl. Environ. Microbiol*. Vol(41): 1344-1347.

Sturz, A.W., Christie, B.R., Matheson, B.G. y Nowak, J. (1997). Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol. Fert. Soils.* Vol(25): 13–19.

Suvorova, A., Tjukova, I. y Trufanova., E. (1999). Thermodynamic and diffusion properties of biodegradable systems based of starch and cellulose derivatives. *Journal of Polymers and Environment*. Vol(7): 35-40.

Tan, Z., Hurek, T., Vinuesa, P., Müller, P., Ladha, J. K. y Reinhold-Hurek, B. (2001). Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Appl. Environ. Microbiol*. Vol(67): 3655–3664.

Tilak, K. (1998). ICAR NEWS. *A science and technology newsletter.* Vol(4): 19-20.

Tilak, K., Pal, K. y Dey, R. (2010). Biological Nitrogen Fixation. En: *Microbes for Sustainable Agriculture*. International Publishing House (IK), India. 6-35 p.

Toledo, I., Lloret, L., Martinez-Romero, E. (2003). *Sinorhizobium americanum sp*. Nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia spp*. In Mexico. *Syst Appl Microbiol.* Vol(26): 54-64.

Tran Van, V., Bergeongoke, S., Balandreau, J. y Heulin, T. (2000). Repeated beneficial effects of rice inoculation with a stain of *Burkholeria vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant soil*. Vol(281): 273-284.

Urquiaga, S., Cruz, K.H.S. y Boddey, R.M. (1992). Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen^{15}- and nitrogen-balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* Vol(56): 105–114.

Utkhede, R. S., Koch, C.A. y Menzies, J.G. (1999). Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythium aphanidermatum*. *Can. J. Plant Pathol.* Vol(21): 265-271

Valdés, J. y Dávila, P. (1995). Clasificación de los géneros de Gramineae (Poaceae) mexicanas. *Acta Bot. Mex*. Vol(33): 37-50.

Van Berkum, P. y Eardly, B. D. (1998). Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobia*ceae. En: The *Rhizobiaceae*. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Spaink, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, P. J. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Holanda. 2-21.

Van Berkum, P., Ruihua, F., Campbell, T. A. y Eardly, B. D. (1999). Some issues of relevance in the taxonomy of rhizobia. En: *Highlights of Nitrogen Fixation Research.* Martinez-Romero, E. y G. Hernandez (Eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, USA. 267-269 p.

Van Peer, R., Niemann, G. J. y Schippers, B. (1991). Induced resistance and phytoalexinaccumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology.* Vol(81): 728-734.

Van Rossum, D., Muyotcha, A., Van Verseveld, H.W., Stouthamer, A.H. y Boogerd, F. (1994). Siderophore production by *Bradyrhizobium* spp. strains nodulating grundnut. *Plant and Soil.* Vol(163): 177-187.

Vance, C. P. (1983). *Rhizobium* infection and nodulation: a beneficial plant disease?. *Annu Rev Microbiol*. Vol(37):399–424.

Ventura, L., Mendoza, W., Rincón, R. (2009). Producción de inoculantes rhizobianos en un fermentador Air-lift. En: *Experiencias con biofertilizantes en cultivos de importancia en el estado de Chiapas*. Salvador, M., Gutiérrez, F. (Eds.) Universidad Autónoma de Chiapas, México. 119-135 p.

Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as bio-fertilizers. *Plant Soil*. Vol(255): 571-586.

Villalobos-Escobedo, J. (2011). Diversidad genética de rhizobios que nodulan a *Calliandra grandiflora* (Tesis de Licenciatura no publicada). Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Chiapas, México.

Vincent, J. (1970). A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme. Blackwell, Reino Unido. 164p.

Vincent, J. (1974). Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. En: *Biology of nitrogen fixation*. Quispel, A. (Ed.). North-Holland Publishing Co., Países Bajos. 265-347p.

Wade, L. G. (1993). Carbohidratos y ácidos nucleicos. En: *Química Orgánica*. Joraanstand, D. (Ed). Prentice Hall, México. 1109-1170 p.

Wang, E. T. y Martínez-Romero, E. (2000). Phylogeny of root-and stem-nodule bacteria associated with legumes. En: *Prokaryotic Nitrogen-Fixation*. *A model system for the analysis of a biological process*. Triplett, E. W. (Ed). Horizon Scientific Press, Reino Unido. 237-250 p.

Wang, T., Martinez, J. y López, I. (2002). *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. Monografía. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Webster, G., Jain, V., Davey, M. R., Gough, C., Vasse, J., Dénarié, J. y Cocking, E.C. (1998). The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. *Plant Cell Environ*. Vol(21): 373–383.

Weller, D. y Cook, R. (1986). Increased growth of wheat by seed treatment with fluorescent *Pseudomonas*, and implication of *Pythium* control. *Can. J. Microbiol.* Vol(8): 328-334.

Wijesekera, R. (1981). *Practical manual on: The essential oils industry*. Thailand Institute of Scientific and Technological Research. Central Institute of Medical and Aromatic Plants, India. United Nations Industrial Development Organization (UNIDO), Austria. 173p.

Yanni, Y., Rizk, R., Fattah, F.K. y Squartine, A. (2001). The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. t*rifolii* with rice root. *Australian Journal of Plant Physiology.* Vol(28): 845-870.

Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Corich, V., Squartini, A., Ninke, K., Philip-Hollingsworth, S., Orgambide, G., De Bruijn, F., Stoltzfus, J., Buckley, D., Schmidt, T.M., Mateos, P.F., Ladha, J.K. y Dazzo, F.B. (1997). Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil.* Vol(194): 99–114.

Young, J. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En: *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, Burns y Evans (Eds.). Chapman & Hall, U.S.A. 43-86 p.

Capítulo VII

Anexos

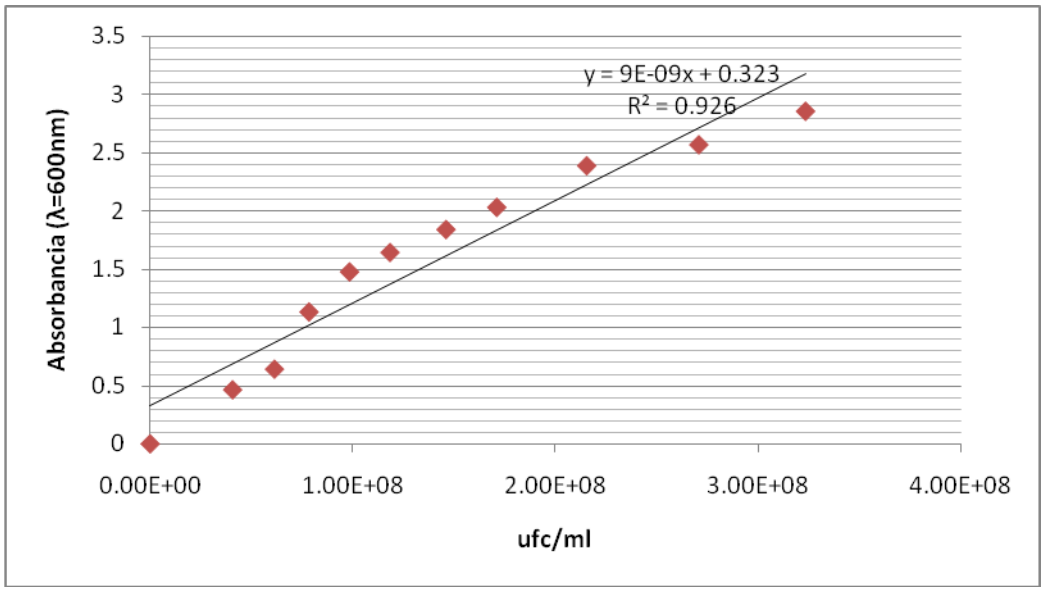
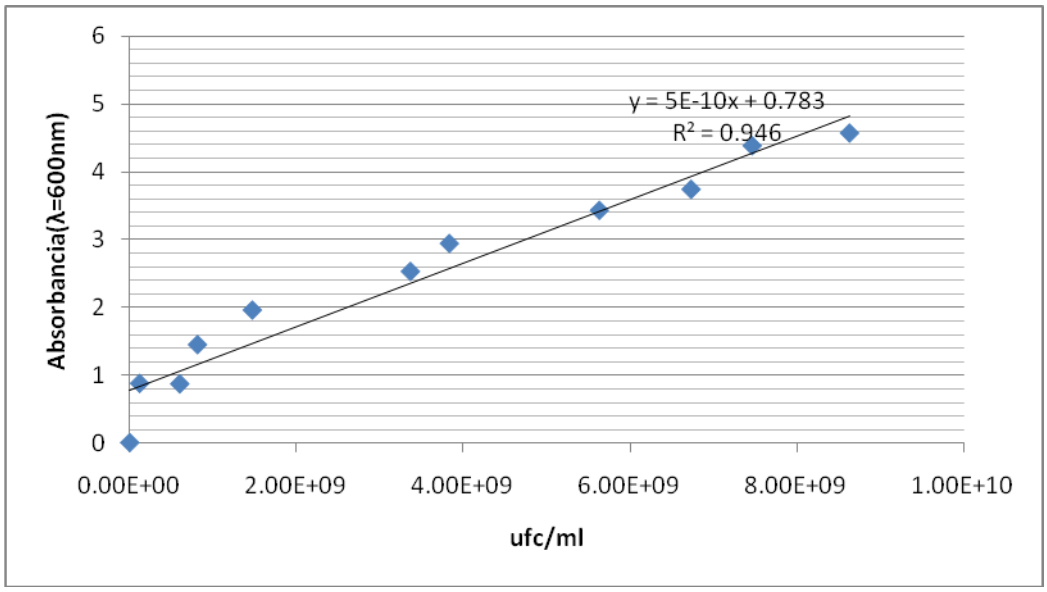
1. Composición de la solución fahraeus

Solución	REACTIVO	Cantidad
A	Na_2HPO_4 .$2H_2O$	1.5 g/L
B	K_2HPO_4	1 g/L
C	$MgSO_4$ .7H2O	1.2 g/L
D	$CaCl_2$	1 g/L
E	CITRATO FÉRRICO	0.05 g/L
ELEMENTOS TRAZAS	Mn, Cu, B, Mo, Zn	(2.86 g de HBO_4 + 2.03 g $MnSO_4$. $4H_2O$ + $ZnSO_4$. $7H_2O$ + $CuSO_4$. $5H_2O$ + H_2MoO_4. H_2O)/L

Para preparar un litro de la solución fahraeus se agregan 10 ml de cada solución (A, B, C, D y E) y 1 ml solución de elementos trazas y se afora a un litro con agua destilada (Somasegaran *et al.*, 1985).

2. Curvas patrón de *Rhizobium etli* CFN 42 y *Rhizobium* sp. LBP2

2.1. Curva patrón de la cepa CFN 42



2.2. Curva patrón de la cepa LBP2