



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MEJORAMIENTO DE LAS CONDICIONES DE  
CULTIVO SUMERGIDO PARA *Rhizobium etli* EN  
MATRACES AGITADOS**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

**CE AKATL MIKIZTLI ARIAS POBLANO**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesor: <u>María Guadalupe Tsuzuki Reyes</u>
VOCAL	Profesor: <u>Martha Giles Gómez</u>
SECRETARIO	Profesor: <u>Mauricio Alberto Trujillo Roldán</u>
1er. SUPLENTE	Profesor: <u>Beatriz Ruíz Villafan</u>
2do. SUPLENTE	Profesor: <u>Sandra Paola Sánchez Rodríguez</u>

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Unidad de Bioprocesos

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor del tema:

---

Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán

Sustentante:

---

Ce Akatl Mikiztli Arias Poblano

El presente proyecto se llevó a cabo en las instalaciones de la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en asociación con la empresa Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V. La dirección corrió a cargo del Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán, contando con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 82533, 103393, 181895 y 178528) y del Programa de Apoyo Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN228509).

Agradecimientos:

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

UNIDAD DE BIOPROCESOS

Dr. MAURICIO A. TRUJILLO-ROLDÁN

ING. ABEL BLANCAS

QFB. JESÚS VILLEGAS

M. en C. RAMSÉS GARCÍA

PROYECTOS CONACyT: 82533, 103393, 181895 y 178528

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, que me dieron lo suficiente para estar hasta donde estoy. Gracias a mis papás que hasta el día de hoy me han apoyado y han confiado en mí para hacer esto.

Al Dr. Mauricio Trujillo por confiar en mí para realizar este proyecto. A todo su grupo de trabajo de la Unidad de Bioprocesos, en especial a los amigos que ahí hice, Aurea Gutiérrez, Mariana Soto, Christian Rico, Eduardo Acevedo, Leslie Zavalza y demás.

Moises Richo, gracias por tu presencia en mi vida y en especial en este momento, por tu insistencia en la culminación de este trabajo, por tu ayuda y apoyo, sabes que siempre te estaré agradecida.

A mis amigos de la facultad de Química, con los que compartí una gran y muy buena parte de mi vida y desarrollo tanto personal como profesional, Karina Rosete (gracias a la química de alimentos por presentarnos), I.Q. Elena Villalba, Alianny Alpizar, Carlos Melchor, Araceli Hernández, Juan Castellanos, Miguel, Nayely.

Al jurado que revisó, y autorizó este escrito: el Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán, Martha Giles Gómez y Ma. Guadalupe Tsuzuki Reyes.

Gracias al CONACYT y al PAPIIT-UNAM, pues sin su interés en la investigación, nos la habríamos visto más difícil para realizar este trabajo. De igual manera a Biofábrica Siglo XXI, gracias por su interés en el desarrollo de biofertilizantes, sin eso, no hubiera conocido a *R. etli* de esta manera tan cercana.

Gracias a todas las personas que por su presencia o ausencia me han ayudado a ser la persona que hoy soy.

## INDICE

1. RESUMEN .....	1
2. GENERALIDADES .....	3
2.1 Fijación de nitrógeno .....	3
2.1.1 Proceso de la fijación biológica de nitrógeno .....	5
2.1.2 Complejo enzimático de la nitrogenasa .....	6
2.1.3 Relación bacteria-leguminosa .....	7
2.1.3.1 Proceso de nodulación .....	9
2.2 Generalidades de <i>Rhizobium etli</i> .....	11
2.2.1 Taxonomía de <i>Rhizobium spp.</i> .....	14
2.2.2 Metabolismo de <i>Rhizobium etli</i> .....	14
2.2.2.1 Metabolismo del carbono en vida libre .....	16
2.2.2.2 Metabolismo del carbono en simbiosis .....	19
2.2.2.3 Producción de poli- $\beta$ -hidroxibutirato y su importancia como polímero de reserva en los rizobios .....	21
2.3 Crecimiento bacteriano .....	22
2.3.1 Curva de crecimiento bacteriano para explicar el comportamiento del crecimiento de los microorganismos .....	23
2.4 Generalidades de los biofertilizantes .....	26

2.4.1	Comparación de los biofertilizantes contra los fertilizantes químicos nitrogenados .....	27
2.4.2	Uso de <i>Rhizobium etli</i> como biofertilizante en la planta del frijol .....	29
3.	JUSTIFICACIÓN .....	34
4.	HIPÓTESIS .....	35
5.	OBJETIVOS .....	35
5.1	Objetivo general .....	35
5.2	Objetivos particulares .....	35
6.	METODOLOGÍA .....	36
6.1	Caracterización de las cepas utilizadas .....	36
6.2	Elaboración de una curva de peso seco .....	36
6.3	Diseño del medio de cultivo variando la fuente de carbono y su relación Carbono/Nitrógeno para los cultivos sumergidos.....	37
6.4	Cinéticas de crecimiento de las cepas .....	42
6.5	Determinación de las unidades formadoras de colonias .....	43
6.5.1	Determinación de la viabilidad de las muestras almacenadas por lo menos cuatro meses.....	45

6.5.2	Determinación de la viabilidad de las muestras almacenadas a diferentes temperaturas (4° y 23°C).....	45
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
7.1	Caracterización de la morfología colonial y bacteriana de las cepas utilizadas para comprobación de pureza .....	47
7.2	Curva de peso seco para relacionar la densidad óptica observada con la biomasa obtenida en los cultivos bacterianos .....	49
7.2.1	Curva de peso seco para <i>Rhizobium etli</i> HP .....	49
7.2.2	Curva de peso seco para <i>Rhizobium etli</i> CIAT .....	50
7.3	Cinéticas de crecimiento de las fermentaciones variando la fuente de carbono y la relación C/N en el medio de cultivo.....	51
7.3.1	Cinéticas de crecimiento para <i>Rhizobium etli</i> HP .....	52
7.3.1.1	Variación de la fuente de carbono en el medio de cultivo .....	52
7.3.1.2	Modificación de la relación Carbono/Nitrógeno en el medio de cultivo .....	54
7.3.2	Cinéticas de crecimiento para <i>Rhizobium etli</i> CIAT ....	60
7.3.2.1	Variación de la fuente de carbono en el medio de cultivo .....	60
7.3.2.2	Modificación de la relación Carbono/Nitrógeno en el medio de cultivo .....	63

7.4	Conteo de las unidades formadoras de colonias para la determinación de las células viables en el inóculo bacteriano.....	68
7.4.1	Conteo de las unidades formadoras de colonias para <i>Rhizobium etli</i> HP .....	69
7.4.2	Conteo de las unidades formadoras de colonias para <i>Rhizobium etli</i> CIAT .....	72
7.4.2.1	Viabilidad de muestras almacenadas a dos diferentes temperaturas .....	74
8.	CONCLUSIONES .....	77
9.	PERSPECTIVAS .....	78
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	79

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación general de las etapas del ciclo del nitrógeno.....	4
<b>Figura 2.</b> Esquematización general del proceso de nodulación realizado por las bacterias simbiotes en una planta leguminosa.....	12
<b>Figura 3.</b> Representación general del metabolismo principal de <i>Rhizobium etli</i> en vida libre.....	18
<b>Figura 4.</b> Representación de las principales rutas metabólicas del catabolismo de carbono en rizobios de rápido crecimiento.....	20
<b>Figura 5.</b> Curva de crecimiento donde se muestran las cuatro fases del desarrollo microbiano.....	25
<b>Figura 6.</b> Principales estados productores de frijol en el 2008.....	31
<b>Figura 7.</b> Comparativo de la cosecha de frijol con y sin uso de <i>R. etli</i> y micorriza, mostrado como incremento neto (\$/Ha) y con base en el rendimiento del grano.....	31
<b>Figura 8. A.</b> Estriado por agotamiento en medio PY de <i>R. etli</i> <b>HP</b> después de 48 h de incubación a $30 \pm 2$ °C. <b>B.</b> Micrografía de una tinción de Gram de <i>R. etli</i> <b>HP</b> de 48 h de incubación a $30 \pm 2$ °C.....	47
<b>Figura 9. A.</b> Estriado por agotamiento en medio PY de <i>R. etli</i> <b>CIAT</b> después de 48 h de incubación a $30 \pm 2$ °C. <b>B.</b> Micrografía de una tinción de Gram de <i>R. etli</i> <b>CIAT</b> de 48 h de incubación a $30 \pm 2$ °C.....	48

**Figura 10.** Curva de peso seco donde se relacionan los valores absorbancia a 600 nm con respecto a la biomasa (peso seco), para la cepa **HP**.....50

**Figura 11.** Curva de peso seco donde se relacionan los valores absorbancia a 600 nm con respecto a la biomasa (peso seco), para la cepa **CIAT**.....51

**Figura 12.** Comportamiento del crecimiento bacteriano en una relación C/N:37 variando la fuente de carbono. Cepa HP.....52

**Figura 13.** Comportamiento del crecimiento bacteriano en una relación C/N:74 variando la fuente de carbono. Cepa HP.....53

**Figura 14.** Comportamiento del crecimiento bacteriano en una relación C/N:111 variando la fuente de carbono. Cepa HP. Incubando 24 h el medio con fructosa y 48 h los medios con glucosa, sacarosa y manitol.....53

**Figura 15.** Comparación del comportamiento del crecimiento bacteriano en el medio YEG (glucosa). Cepa HP.....55

**Figura 16.** Comparación del comportamiento del crecimiento bacteriano en el medio YEF (fructosa). Cepa HP.....56

**Figura 17.** Comparación del comportamiento del crecimiento bacteriano en el medio YES (sacarosa). Cepa HP.....56

**Figura 18.** Comparación del comportamiento del crecimiento bacteriano en el medio YEM (manitol). Cepa HP.....57

<b>Figura 19.</b> Comportamiento del crecimiento bacteriano en una relación C/N:37 variando la fuente de carbono. Cepa CIAT.....	61
<b>Figura 20.</b> Comportamiento del crecimiento bacteriano en una relación C/N:74 variando la fuente de carbono. Cepa CIAT.....	61
<b>Figura 21.</b> Comportamiento del crecimiento bacteriano en una relación C/N:111 variando la fuente de carbono. Cepa CIAT.....	62
<b>Figura 22.</b> Comparación del comportamiento del crecimiento bacteriano en el medio YEG (glucosa). Cepa CIAT.....	63
<b>Figura 23.</b> Comparación del comportamiento del crecimiento bacteriano en el medio YEF (fructosa). Cepa CIAT.....	64
<b>Figura 24.</b> Comparación del comportamiento del crecimiento bacteriano en el medio YES (sacarosa). Cepa CIAT.....	64
<b>Figura 25.</b> Comparación del comportamiento del crecimiento bacteriano en el medio YEM (manitol). Cepa CIAT.....	65

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Algunas especies del género <i>Rhizobium</i> y sus respectivos hospederos.....	15
<b>Tabla 2.</b> Principales fuentes de carbono utilizadas por <i>Rhizobium etli</i> en vida libre.....	17
<b>Tabla 3.</b> Composición de los medios de cultivo utilizados, variando la fuente de carbono y su relación con respecto al nitrógeno en el medio de cultivo.....	41
<b>Tabla 4.</b> Composición del medio sólido PY para la cuenta en placa de los microorganismos.....	44
<b>Tabla 5.</b> Valores del peso seco constante de las muestras de <i>R. etli</i> <b>HP</b> , expresados como biomasa (g/L).....	49
<b>Tabla 6.</b> Valores del peso seco constante de las muestras de <i>R. etli</i> <b>CIAT</b> , expresados como biomasa (g/L).....	50
<b>Tabla 7.</b> Relación de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la densidad óptica máxima (D.O. máx) según la relación C/N con respecto a cada fuente de carbono para la cepa <b>HP</b> .....	58
<b>Tabla 8.</b> Relación de las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) y la densidad óptica máxima (D.O. máx) según la relación C/N con respecto a cada fuente de carbono para la cepa <b>CIAT</b> .....	66

**Tabla 9.** Monitoreo de la vida de anaquel de los inoculantes de *R. etli* **HP**, especificando la fuente de carbono, la relación C/N, la viabilidad expresada como UFC/mL y el tiempo de almacenamiento al momento del monitoreo.....70

**Tabla 10.** Monitoreo de la vida de anaquel de los inoculantes de *R. etli* **CIAT**, especificando la fuente de carbono, la relación C/N, la viabilidad expresada como UFC/mL y el tiempo de almacenamiento al momento del monitoreo.....72

**Tabla 11.** Monitoreo de la viabilidad a un mes y seis meses, de dos muestras de *R. etli* CIAT, con medio agotado YEM y YEG, en una relación C/N: 37, almacenadas a 4 y 23 °C cada una.....75

## 1. RESUMEN

*Rhizobium etli* posee varias características de interés para su investigación, como su capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis con la planta leguminosa del frijol. Esto permite que se pueda utilizar a *R. etli* como un potencial biofertilizante, cuyo uso podría ayudar al cultivo de dicha planta y, tomando en cuenta el contexto económico y medioambiental de la actualidad, sería de utilidad.

Biofábrica S.XXI S.A. de C.V. es una empresa que ha apoyado la investigación científica de los biofertilizantes, desde su desarrollo, optimización y utilización en el campo mexicano. Su trabajo va de la mano con la Universidad Nacional Autónoma de México, por medio de una exclusividad para la producción y comercialización de biofertilizantes a base de *Rhizobium etli* y otros microorganismos. Esto ha permitido que, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, se desarrollen proyectos dirigidos hacia el estudio de estos microorganismos.

En este estudio, se trabajó con dos cepas de *R. etli* (HP y CIAT) y se modificó el medio de cultivo, variando la fuente de carbono usando manitol, glucosa, fructosa y sacarosa; y su concentración en el mismo, variando la relación Carbono/Nitrógeno (g/g) en 37, 74 y 111. Esto se hizo con el fin de observar qué fuente de carbono y qué relación C/N permite obtener rendimientos suficientes en el proceso fermentativo así como mantener viables las células durante más tiempo, para posteriormente hacer un escalamiento del proceso para una producción masiva del inoculante bacteriano.

Los parámetros que se tomaron en cuenta para elegir el mejor carbohidrato y la mejor relación C/N para cada cepa, fueron: la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$  [ $h^{-1}$ ]), la densidad óptica máxima (D.O. máx  $_{600\text{ nm}}$  [u.a.]) y la viabilidad (UFC/mL). Se observó que ambas cepas presentan un mejor crecimiento con glucosa bajo una C/N: 74, presentando una velocidad específica de crecimiento de  $0.131\text{ h}^{-1}$  para la cepa HP y de  $0.116\text{ h}^{-1}$  para la cepa CIAT. La cuenta inicial de microorganismos fue de  $4.9 \times 10^8$  UFC/mL para la cepa HP y de  $3.3 \times 10^9$  UFC/mL para la cepa CIAT. Tras ocho meses de almacenamiento a temperatura ambiente ( $24^{\circ}\text{C}$ ), la cepa HP mostró una viabilidad de  $4.5 \times 10^7$  UFC/mL y CIAT de  $2.8 \times 10^8$  UFC/mL, lo que corresponde a un mantenimiento de la viabilidad en un 90.8% para la cepa HP y de 91.5% para la cepa CIAT.

## 2. GENERALIDADES

### 2.1 Fijación de nitrógeno

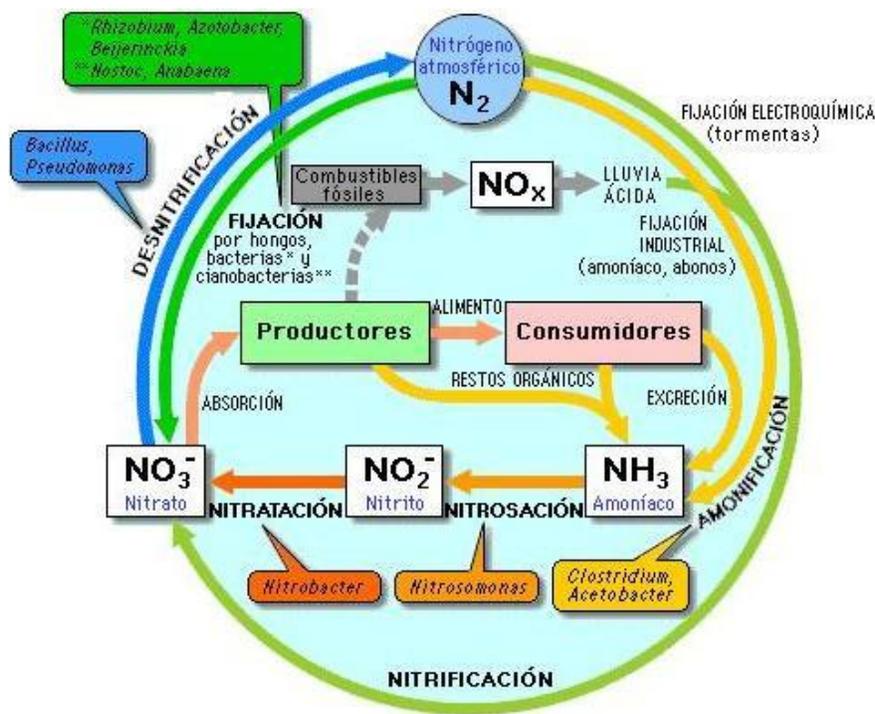
El nitrógeno es un constituyente de suma importancia para los seres vivos, tanto animales como plantas, presentándose como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, entre otros. En la naturaleza el nitrógeno se puede presentar en forma orgánica o inorgánica, y los cambios que ocurren para que sea un compuesto de una u otra naturaleza son reacciones químicas que siguen un patrón, denominado ciclo del nitrógeno, que le permiten integrarse en todos los sistemas que conocemos como minerales solubles en agua, presentes en el suelo como materia orgánica o como un gas inerte en la atmósfera (Rodríguez *et al.* 1984).

El nitrógeno molecular ( $N_2$ ) representa casi el 78% del aire que se encuentra en la biosfera, pero no es asimilable por los vegetales y los animales. Para que pueda ser asimilado se debe reducir, y los únicos seres vivos capaces de realizar ésto son algunos organismos pertenecientes a los dominios *Eucaria* y *Archaea*. Estos microorganismos tienen un complejo enzimático llamado nitrogenasa, que transforma el nitrógeno gaseoso en amonio por medio de un proceso denominado fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Navarro y Navarro, 2003; Ingraham e Ingraham, 1998).

Es gracias a las bacterias fijadoras de nitrógeno, entre ellas *Rhizobium etli*, que las plantas pueden obtener y asimilar el nitrógeno atmosférico, pues estos microorganismos tienen la capacidad de captar y transformar

el nitrógeno en compuestos proteicos que están disponibles para las plantas.

Anualmente, la cantidad de nitrógeno fijada por los organismos vivos asciende a  $10^8$  toneladas a nivel mundial, de la cual la mayor parte procede de la simbiosis biológica (Madigan *et al.* 2003). Es mediante este proceso, que se puede hacer prescindible el uso de abonos o fertilizantes nitrogenados en los suelos de cultivo, con lo que se pueden reducir algunos de los problemas de contaminación ambiental, así como la inversión económica cuantiosa, que termina encareciendo los productos cosechados (Caballero-Mellado, 2009).



**Figura 1.** Representación general de las etapas del ciclo del nitrógeno. Tomado de <http://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/ciclo-del-nitrogeno> (07/noviembre/2012).

En el ciclo del nitrógeno (figura 1), las bacterias fijadoras de nitrógeno juegan un papel importante en este proceso de recirculación de nutrientes, pues es en la parte de fijación en la que se regresan nutrientes al suelo que pueden ser utilizados por la planta.

### **2.1.1 Proceso de la fijación biológica de nitrógeno**

Para que se lleve a cabo la fijación biológica de nitrógeno (FBN), se requiere que el ciclo de ácidos tricarbónicos (ATC) sea funcional en los microorganismos fijadores de nitrógeno, para la oxidación de ácidos orgánicos. Karr *et al.* (1984), encontraron una correlación entre un incremento en la fijación de nitrógeno y un incremento en el contenido de un polímero de reserva, el Poli- $\beta$ -Hidroxibutirato (PHB). Así como se ha encontrado que la energía suministrada en forma de fotosintatos es esencial para la FBN (Stowers, 1985; Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000).

Estos microorganismos fijadores de nitrógeno inducen a la formación de un nuevo órgano en la planta, llamado nódulo, es en esta parte en donde se lleva a cabo la fijación biológica de nitrógeno, que inicia cuando el nódulo alcanza su madurez, la cual se puede dar entre 15 y 20 días después de la infección (Almaraz *et al.* 2007). Este proceso es la parte reguladora del ciclo del nitrógeno, en la que el nitrógeno atmosférico pasa a una forma combinada, compensando las pérdidas por desnitrificación y volatilización del amonio (Rodríguez *et al.* 1984).

La reacción de formación del amonio libera más energía de la que consume, pero tiene una energía de activación alta. Esta reacción se da en tres pasos y en cada uno se necesita un par de electrones. Se sabe

que las bacterias en simbiosis pueden consumir cerca del 20% del ATP producido por la planta huésped (Prescott *et al.* 2002).

Se ha estimado que el costo de este proceso de fijación biológica es de 6 mg de carbono por cada miligramo de nitrógeno fijado (Almaraz *et al.* 2007). Exigiendo así una inversión mayor de carbono para la obtención de nitrógeno fijado.

En el nódulo está una proteína llamada leghemoglobina, que se une al oxígeno para mantenerlo en concentraciones óptimas y que se lleve a cabo la fijación del nitrógeno (Ingraham e Ingraham, 1998). Se genera un ambiente microaerófilo, para que los bacteroides puedan fijar el nitrógeno con la enzima nitrogenasa (Tortora *et al.* 2007), y la planta posteriormente incorpore el amoníaco a la materia orgánica en forma de amina, para ser metabolizada y transformada en otras moléculas que la planta necesita.

### **2.1.2 Complejo enzimático de la nitrogenasa**

La nitrogenasa, también llamada dinitrogenasa, constituye el complejo enzimático de las bacterias diazótrofes, cuya capacidad es única en los microorganismos procariontes (Lloret y Martínez-Romero, 2005), y que cataliza la reducción de nitrógeno a amoníaco (FBN), con liberación de hidrógeno cuya reacción se puede expresar como:



En los sistemas simbióticos, esta enzima se encuentra exclusivamente en el microsimbionte (bacteroide). De manera estricta, es un complejo

enzimático formado por el componente I, o molibdoferroproteína y el componente II o ferro-proteína. El componente I consta de cuatro subunidades y es el encargado de la reducción del nitrógeno a amoníaco y el componente II, que está formado por dos subunidades, se encarga de la transferencia al componente I de la energía necesaria para que éste pueda llevar a cabo aquella reducción (Navarro y Navarro, 2003).

Para que la reducción del nitrógeno se lleve a cabo se necesitan varios factores; como la presencia de los dos componentes de la enzima, energía biológica en forma de ATP (adenosín trifosfato), iones magnesio, protones, poder reductor y un ambiente anaerobio (Madigan *et al.* 2003; Gartland *et al.* 2011).

La fijación de nitrógeno consume aproximadamente 28 moléculas de ATP por molécula de nitrógeno reducida, dicha energía proviene de la fotosíntesis que la planta realiza (Rodríguez *et al.* 1984; Gómez, 2000; Stowers, 1985). Esto equivale aproximadamente a 2.6 gramos de carbono por cada gramo de nitrógeno fijado.

### **2.1.3 Relación simbiótica bacteria-leguminosa**

Se estima que ambos simbios (rizobio y leguminosa) han coevolucionado hace al menos 70 a 100 millones de años, desde que las leguminosas se originaron. Por otra parte, el origen de los genes de la nodulación puede ubicarse después del origen de las leguminosas, y los diazótrofos existentes de los distintos linajes de rizobios adquirieron su identidad como diazótrofos simbios (Lloret y Martínez-Romero, 2005).

Debido a la naturaleza de la enzima nitrogenasa, se cree que el origen de los rizobios y su interacción simbiótica con las plantas se remonta a 150 millones de años. Esto se puede explicar inicialmente por la sensibilidad de la nitrogenasa al oxígeno, ya que, en un principio la atmósfera primitiva no contenía oxígeno (Rodríguez *et al.* 1984). Por esta razón, los microorganismos que habitaban el planeta debían de ser anaerobios. Posteriormente, las especies de *Rhizobium* han evolucionado para vivir en condiciones microaerófilas, por lo menos dentro del nódulo que se forma durante la simbiosis con la leguminosa (Encarnación *et al.* 1995).

La proliferación de este grupo de bacterias sobre la Tierra fue uno de los factores que hizo posible la futura colonización de los ambientes terrestres, que eran muy pobres en nutrientes durante el periodo Jurásico y Cretácico (Rodríguez *et al.* 1984).

Una de las cualidades de las leguminosas es su capacidad para establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium*, es por esta razón que se usan en rotación con cultivos de cereales y otras plantas no leguminosas para recuperar la fertilidad del suelo, ya que además de la fijación de nitrógeno, se da una mejor absorción de fósforo, aunque el suelo sea pobre en su contenido (Zvietcovich *et al.* 1999).

La coevolución de las leguminosas y los rizobios ha traído consigo la especialización de los factores Nod, que son moléculas que median el reconocimiento y la organogénesis del nódulo durante la simbiosis (Nápoles *et al.* 2008). Estas moléculas han generado una gama variada de "decoraciones" en los genes *nod*, como pueden ser metilaciones,

acetilaciones, sulfataciones y glicosilaciones, para adecuarse a su hospedero con una alta especificidad (Lloret y Martínez-Romero, 2005).

La investigación de Madrigal-Carrillo y colaboradores en el año 2008, ha sugerido que *Rhizobium etli*, también tiene la capacidad de colonizar las raíces de plantas no leguminosas o no específicas, tan eficientemente como a su hospedero original, teniendo un efecto en el crecimiento y nodulación de las plantas.

Se estima que la simbiosis rizobio-leguminosa puede fijar de 24 hasta 584 kg de nitrógeno por hectárea por año (Gómez, 2000).

### **2.1.3.1 Proceso de nodulación**

En la figura 2 se muestra el proceso de nodulación que realiza la bacteria en la raíz de la planta, que inicia con la bacteria libre (paso 1 de la figura 2) en el suelo.

La leguminosa libera metabolitos secundarios, compuestos de naturaleza flavonoide como naringenina, genisteína y daidzeína, así como betaínas y ácidos aldónicos. Esto ocurre cuando a la planta le hace falta nitrógeno, y en respuesta a estos mensajes químicos, la bacteria es atraída hacia la región apical de los pelos radicales de la raíz. Si los compuestos secretados por la planta son reconocidos por los rizobios, se inicia el proceso de transcripción de los genes implicados en la nodulación (genes *nod*). Este proceso involucra la proteína NodD, la cual, al entrar en contacto con los flavonoides sufre un cambio conformacional, que permite que la ARN polimerasa comience a traducir, lo que da como resultado la

producción de enzimas que se encargan de la síntesis y secreción de los factores de nodulación (factores Nod). Estos se conforman por un esqueleto de 3, 4 o hasta 5 residuos de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 modificados (Gartland *et al.* 2011).

Los factores Nod son reconocidos por la planta e inducen varios cambios morfológicos y fisiológicos en los pelos radicales de la leguminosa. Los pelos radicales son células tubulares que se desarrollan a partir de las células más externas de la raíz, lo que le permite a la planta aumentar su superficie de absorción y así adquirir más nutrientes del suelo (Tortora *et al.* 2007). Estas respuestas se inducen en ausencia de la bacteria, con lo que se puede iniciar la infección hacia la planta (paso 2 de la figura 2), pero para que penetre el pelo radical y llegue al córtex de la raíz se debe formar una nueva estructura, conocida como hilo de infección, que se forma con el estímulo continuo del rizobio y los factores Nod que produce.

El hilo de infección es una estructura tubular que se forma con material de la pared del pelo radical, previniendo así el contacto directo entre el citoplasma de la célula vegetal y el rizobio, y en consecuencia, la respuesta de defensa de la planta. El primer efecto morfológico producido por los factores Nod, previo a la formación del hilo de infección, es el hinchamiento de la zona apical del pelo que posteriormente da lugar a un enroscamiento del mismo. Esto ayuda a atrapar a las bacterias localizadas en esta zona y generar un nuevo sitio de crecimiento, pero hacia adentro del pelo. Las bacterias se desplazan dentro del hilo de infección (paso 3) e incluso se dividen en su trayectoria al interior del pelo, y comienzan a infectar las células corticales (paso 4).

Cuando los rizobios llegan al primordio del nódulo, que se formó previamente, éstos son excitados del hilo de infección y endocitados simultáneamente por las células que forman el primordio (paso 5 y paso 6), con lo que se da lugar a la formación de estructuras membranales que contienen intracelularmente a las bacterias, llamadas *simbiosomas*. En esta parte del proceso están involucradas una serie de proteínas que inhiben la maduración del endosoma evitando que éste sea degradado en la vacuola (paso 7).

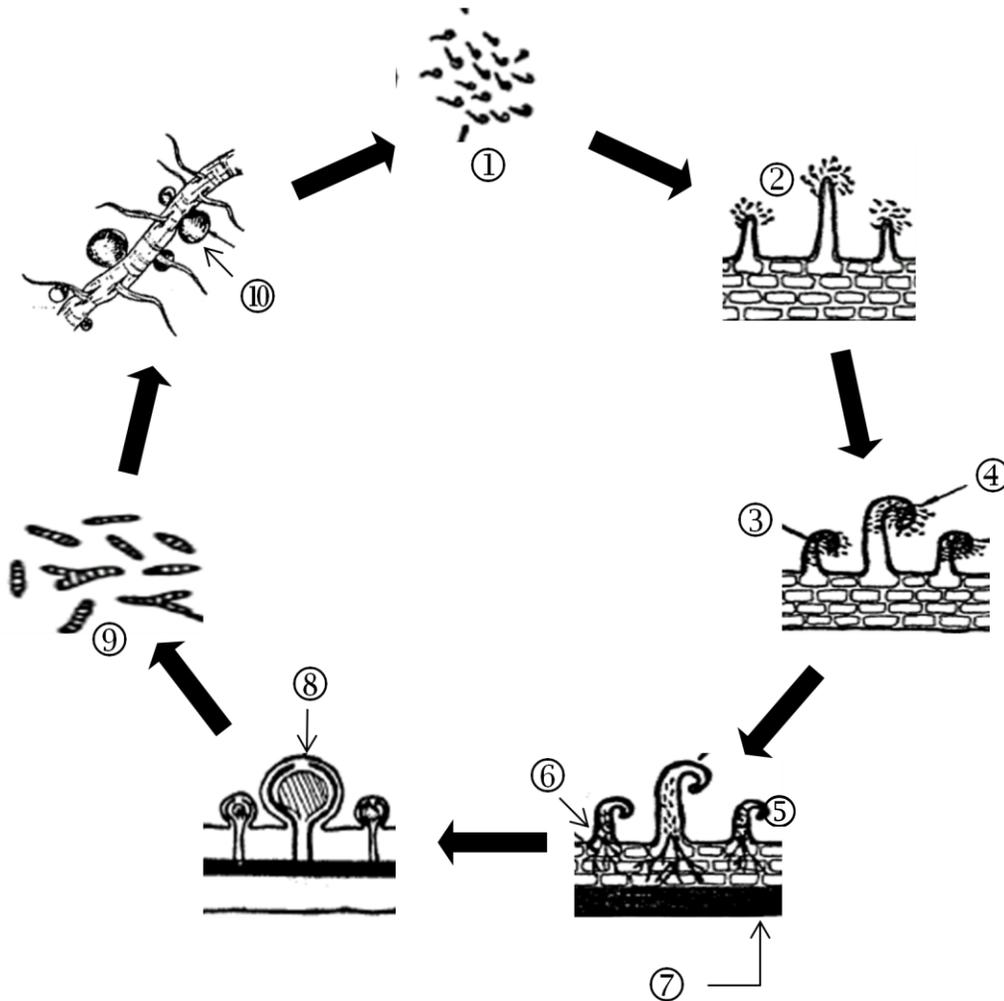
Cuando la bacteria está en la raíz de la planta, se aloja en los nódulos (paso 8), donde sufre cambios morfológicos importantes, como lo son el aumento de tamaño de las células y una diferenciación de la bacteria a un estado de bacteroide (paso 9). Ahora la bacteria forma parte de la raíz de la planta, pues pierde su pared celular, y es ahí donde se llevará a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico (paso 10). (Gartland *et al.* 2011; Quinto y Cárdenas, 2007).

## **2.2 Generalidades de *Rhizobium etli***

*Rhizobium etli* es una alfaproteobacteria, grupo al que pertenecen la mayoría de los géneros fotótrofos, como *Acetobacter* y *Rickettsiales*.

Son bacilos cortos Gram-negativos, con dimensiones de 1.2 a 4.0  $\mu\text{m}$  de largo por 0.5 a 0.9  $\mu\text{m}$  de ancho (Contreras *et al.* 2007), son pleomórficas (a veces, en condiciones adversas de crecimiento), no esporuladas, móviles por dos a seis flagelos peritricos ó un solo flagelo lateral, inocuas para el ser humano, habitan comúnmente el suelo y la

rizósfera, son aerobios, aunque en condiciones de microaerobiosis también puede crecer (Lloret y Martínez-Romero, 2005). Se observa producción de granos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB).



**Figura 2.** Esquematación general del proceso de nodulación realizado por las bacterias simbiotas en una planta leguminosa. Tomado de Vanderleyden y Pieterneel (1995).

*R. etli* pertenece a las *Rhizobiaceas*, familia de bacterias que habitan el suelo y que pueden fijar el nitrógeno del aire estableciendo una relación simbiótica con plantas leguminosas (Rodríguez *et al.* 1984; Gómez, 2000), principalmente de la familia *Fabaceae* (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000). Su temperatura óptima de crecimiento en condiciones artificiales es de 25 °C y su pH óptimo es de 5.0 a 8.0 (Peralta-Díaz *et al.* 2007).

Las colonias producidas por estos microorganismos son circulares, convexas, semitraslucidas y mucilaginosas, con diámetro de 2 a 5 mm, crecidas durante 2 a 3 días en medio agar-peptona de caseína-levadura (PY) (Gartland *et al.* 2011).

Los rizobios se pueden agrupar en dos géneros de acuerdo al tipo de crecimiento, el cual puede ser rápido o lento. En el llamado crecimiento rápido las células se dividen en un lapso corto de tiempo, de 2 a 5 horas, a 30°C y se produce una reacción ácida en un medio con sales minerales y manitol. A este género se le denomina *Rhizobium*. Por otro lado, en el crecimiento lento, las divisiones celulares se producen cada 12 a 24 horas (Anand y Dogra, 1991) y a este género se le denomina *Bradyrhizobium*.

Debido a que las bacterias del género *Rhizobium* pueden utilizar una gran variedad de carbohidratos y ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía, se les denomina microorganismos quimioorganoheterótrofos. La actividad de estos microorganismos en el suelo es importante, ya que favorecen la fertilidad del mismo por la metabolización de los nutrientes y su posterior reincorporación a la rizósfera, para que otros organismos puedan aprovecharlos (Contreras *et al.* 2007).

### **2.2.1 Taxonomía de *Rhizobium spp.***

Aunque la taxonomía está en cambio continuo, actualmente los rizobios se agrupan en cinco géneros, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*; algunas especies de rizobios del género *Rhizobium* se muestra en la tabla 1, junto con su hospedero específico, resaltando a *R. etli* (Almaraz *et al.* 2007).

Anteriormente, *Rhizobium etli* era designado como *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Lloret y Martínez-Romero, 2005), pero actualmente ya se maneja como una especie diferente, por lo que así será tratado en esta tesis.

### **2.2.2 Metabolismo de *Rhizobium etli***

A nivel laboratorio, las bacterias han desarrollado las vías glucolíticas necesarias para poder metabolizar las diferentes fuentes de carbono que se les agreguen en el medio de cultivo, aunque no todas las metabolizan de la misma manera.

Algunos de los cofactores presentes en el extracto de levadura inducen al metabolismo, tanto catalítico así como de síntesis de glutamato, lo que se refleja en una mayor obtención de energía y de intermediarios metabólicos clave para la síntesis de biomoléculas, y por lo tanto mayor productividad en biomasa (Rojas *et al.* 2009).

**Tabla 1.** Algunas especies del género *Rhizobium* y sus respectivos hospederos. Tomado de Almaraz *et al.* (2007)

Especie de <i>Rhizobium</i>	Hospedero
<i>R. leguminosarum</i>	
biovar <i>viciae</i>	tribu <i>Vicieae</i> ( <i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lens</i> )
biovar <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
biovar <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i>
<b><i>R. etli</i></b>	
<b>biovar <i>phaseoli</i></b>	<b><i>Phaseolus vulgaris</i></b>
biovar <i>mimosae</i>	<i>Mimosa affinis</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega orientalis</i> , <i>G. officinalis</i>
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium</i>
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i>

El metabolismo de este microorganismo puede variar, según como se encuentre en la naturaleza, ya sea en vida libre o como bacteroide en simbiosis con la planta del frijol. Como se puede ver en la figura 3, el metabolismo global en vida libre de *Rhizobium etli* es complejo e intrincado. Cada número indica cada una de las rutas, tanto anabólicas como catabólicas que emplea este microorganismo para la asimilación de

nutrientes, la obtención de energía, así como la síntesis de aminoácidos, por mencionar algunas (Resendis-Antonio *et al.* 2007).

### **2.2.2.1 Metabolismo del carbono en vida libre**

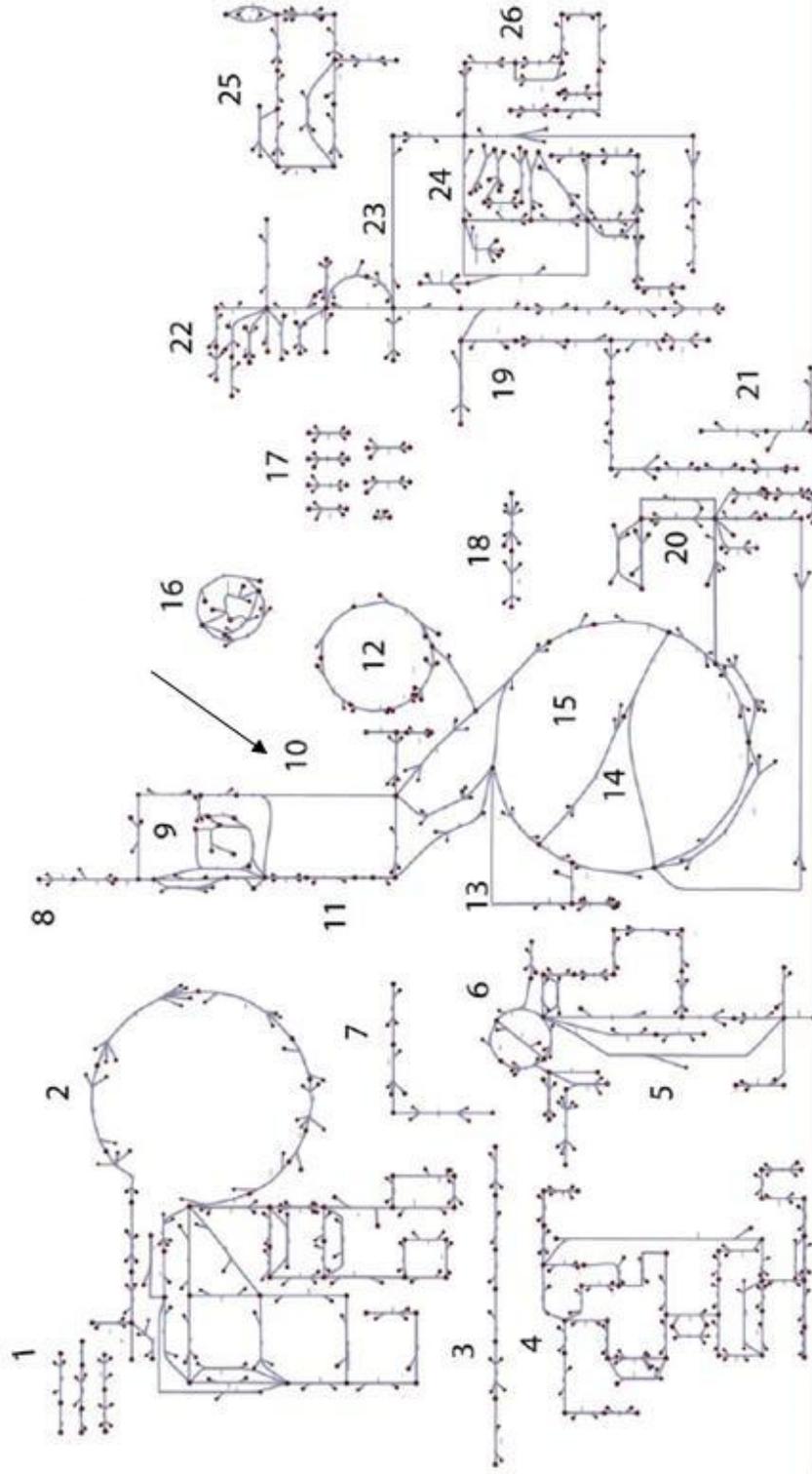
En vida libre, *Rhizobium etli* puede utilizar una amplia gama de compuestos para obtener energía, como lo son los hidratos de carbono, ácidos orgánicos o polioles. Para el catabolismo de estos compuestos, emplea diversas rutas metabólicas, siendo la ruta Entner-Doudoroff (ED) (representada en la figura 3 con el número 10), la vía que proporciona de manera más directa los metabolitos necesarios para el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Éste es parte importante del metabolismo celular y junto a la ruta de las pentosas fosfato (PP), las tres rutas, forman la parte central del metabolismo de *R. etli*. (Prell y Poole, 2006).

Se ha reportado que tanto el manitol, como la glucosa y sacarosa son de las primeras fuentes de carbono que el género *Rhizobium* utiliza en vida libre, y su catabolismo se puede diferenciar según su velocidad de crecimiento. Debido a que *R. etli* es de rápido crecimiento, se sabe que crece con una amplia variedad de sustratos de carbono, como pueden ser hexosas, pentosas, disacáridos, trisacáridos y ácidos orgánicos. En la tabla 2 se muestran algunos ejemplos de dichas fuentes de carbono que éste y otros rizobios de rápido crecimiento pueden metabolizar. Stowers (1985) reportó que el manitol es tradicionalmente usado como sustrato en los medios de crecimiento de rizobios.

**Tabla 2.** Principales fuentes de carbono utilizadas por *Rhizobium etli* en vida libre. Tomado de Stowers (1985).

Fuente de carbono	
<b>Glucosa</b>	Rafinosa
<b>Fructosa</b>	<b>Sacarosa</b>
Galactosa	Lactosa
Manosa	Trehalosa
<b>Manitol</b>	Piruvato
Ramnosa	Citrato
Dulcitol	Succinato
Arabinosa	Fumarato
Xilosa	Malato

Estando en vida libre, el rizobio debe de proveerse de energía, y esto lo logra metabolizando carbohidratos, por lo que debe emplear las rutas metabólicas para catabolizar dichos azúcares. Se sabe que *R. etli* no posee un sistema de fosfoenolpiruvato fosfotransferasa, pero como sí posee la ruta ED, es por esta ruta por la que puede metabolizar las hexosas, antes que otros carbohidratos (Stowers, 1985; Martínez *et al.* 2002).



1. Pentosa y glucuronato. 2. Metabolismo de purina. 3. Metabolismo de histidina. 4. Metabolismo de pirimidina. 5. Metabolismo de arginina y prolina. 6. Grupo amino/urea. 7. Metabolismo de inositol. 8. Metabolismo de glucogeno. 9. Ruta de las pentosas fosfato. 10. Ruta Entner-Doudoroff. 11. Glucólisis. 12. Ciclo del Poli-Hidroxibutirato. 13. Metabolismo de aspartato. 14. Derivación del glioxilato. 15. Ciclo de los ácidos tricarbóxicos. 16. Fosforilación oxidativa. 17. Aminoácidos tRNA. 18. Fijación de nitrógeno. 19. Valina, leucina e isoleucina. 20. Metabolismo glutamato-glutamina. 21. Metabolismo de glutatiónato. 22. Metabolismo de glicina, serina y treonina. 23. Metabolismo de metionina. 24. Metabolismo de cisteína y asimilación de azufre. 25. Nicotina/nicotinamida. 26. Lisina.

**Figura 3.** Representación general del metabolismo principal de *Rhizobium etli* en vida libre. Tomado de Resendis-Antonio *et al.* (2007).

El metabolismo de los disacáridos, como la sacarosa, se cree que se lleva a cabo por la acción de una invertasa, pues se ha reportado que hay una mayor actividad de esta enzima en células que han sido cultivadas en medios con sacarosa que en otros medios sin ella (Almaraz *et al.* 2007).

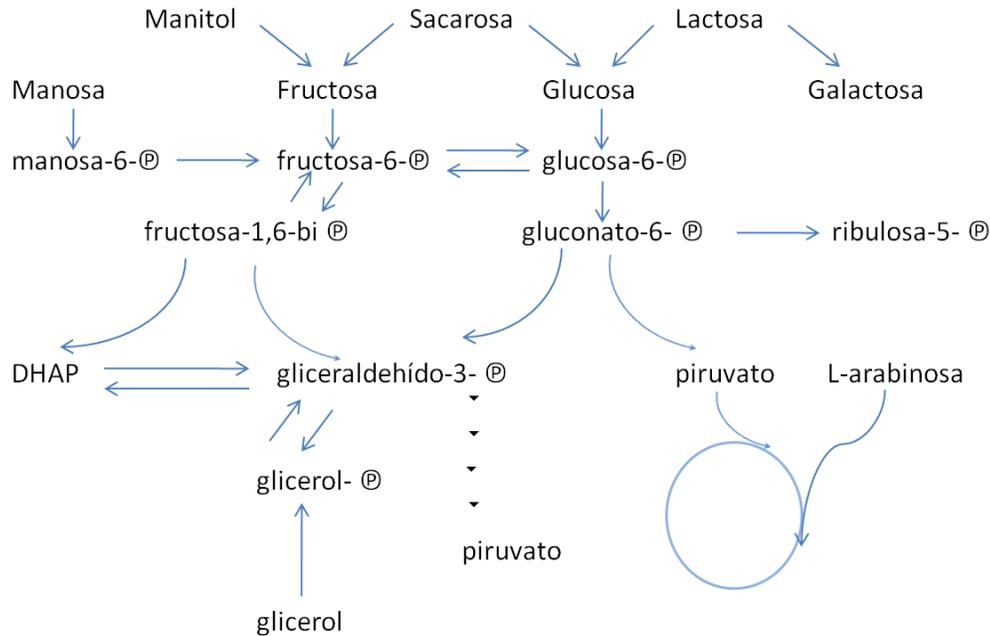
Con respecto a las hexosas, se sabe que la vía ED es la única ruta de catabolismo de la glucosa en la mayoría de los rizobios cuando se encuentran en vida libre. El manitol es metabolizado por medio de una manitol deshidrogenasa produciendo fructosa y ésta a su vez es metabolizada por una fructocinasa, obteniéndose fructosa-6-fosfato que posteriormente es metabolizada vía ED (Stowers, 1985).

En la figura 4 se puede ver parte del metabolismo de algunas fuentes de carbono, específicamente de la glucosa, fructosa, sacarosa y manitol, en bacterias de rápido crecimiento, como *R. etli*; su catabolismo y posterior incorporación a otras rutas metabólicas para la obtención de energía o como polímero de reserva.

#### **2.2.2.2 Metabolismo del carbono en simbiosis**

Como simbiote, *Rhizobium etli* emplea los fotosintatos provenientes de la parte aérea de la planta como su principal fuente de abastecimiento de carbono en el nódulo formado. Sin embargo, los bacteroides no pueden utilizar directamente di o monosacáridos, ya que carecen de transportadores o de vías glicolíticas completas para metabolizar dichos azúcares. Por otro lado, sí pueden utilizar ácidos orgánicos para poder

sustentar la respiración y la fijación de nitrógeno (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000).



**Figura 4.** Representación de las principales rutas metabólicas del catabolismo de carbono en rizobios de rápido crecimiento. Tomado de Stowers (1985).

Parece ser que la sacarosa, glucosa y fructosa son los principales compuestos con carbono que aparecen en los nódulos de las leguminosas (Stowers, 1985). Y se sabe que en el citosol del nódulo, las principales rutas metabólicas son: Emdben-Meyerhof-Parnas (EMP), la ruta PP y el ciclo de ATC, así como rutas metabólicas anaerobias, esto debido a que la presión parcial de oxígeno es aproximadamente de 10 nM dentro de los nódulos (Navarro y Navarro, 2003).

Los bacteroides de *Rhizobium etli* no poseen un transporte activo de glucosa, otras hexosas o disacáridos, ya que, generalmente, no metabolizan azúcares, pues es la planta la que realiza esa parte del metabolismo a cambio de los nutrientes nitrogenados que le provee el rizobio por medio de la fijación del nitrógeno. Se ha hecho evidente que los intermediarios del ciclo de ATC pueden ser la fuente principal de energía para el bacteroide (Prell y Poole, 2006).

Los ácidos orgánicos son considerados las principales fuentes de energía para el bacteroide, ya que apoyan a una mayor tasa de respiración de oxígeno y son los sustratos más efectivos para el soporte de la fijación de nitrógeno (Stowers, M., 1985).

### **2.2.2.3 Producción de poli- $\beta$ -hidroxibutirato y su importancia como polímero de reserva**

Desde el punto de vista nutricional, los PHA's (polihidroxicanoatos) se acumulan en respuesta a un factor nutricional limitante para el crecimiento, como lo puede ser la falta de magnesio, fósforo, nitrógeno u oxígeno, y en la presencia de la fuente de carbono en exceso (Martínez *et al.* 2002; Trainer y Charles, 2006).

Específicamente el PHB se almacena en forma de gránulos y su producción se basa en el metabolismo del carbono. Primero se degrada la fuente de carbono, convirtiéndose en acetil-CoA y posteriormente en Acetoacetyl-CoA, para después transformarse en el precursor del poli- $\beta$ -hidroxibutirato, el hidroxibutiril-CoA (Camire *et al.* 2008).

*Rhizobium etli* como bacteroide es capaz de almacenar carbono en forma de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) en la interfase del citoplasma, que puede representar cerca del 50% en peso seco en algunas especies de *Rhizobium* (Ford-Denison y Kiers, 2004). Se ha observado que bajo condiciones de acumulación de PHB, las células prefieren la vía ED, ya que permite la formación de NADPH, que es requerida para la formación del polímero (Cholula, 2005).

El PHB es hidrolizado en  $\beta$ -hidroxibutirato que es deshidrogenado para formar acetoacetato que en última instancia es oxidado por medio del ciclo de ATC (Stowers, 1985). La deshidrogenación del  $\beta$ -hidroxibutirato puede suministrar suficiente poder reductor para soportar la fijación de nitrógeno.

Este compuesto de manera independiente presenta un potencial para su uso industrial, esto debido a sus propiedades termoplásticas y de biodegradabilidad, pero en el simbiote representa un polímero de reserva de energía (Tavernier *et al.* 1997).

### **2.3 Crecimiento bacteriano**

En microbiología, la palabra crecimiento se refiere al incremento en el número de células, que también puede medirse como un aumento en la masa celular (Madigan *et al.* 2003). Aunque esto no implica de manera directa un crecimiento real, ya que puede ser que las células sólo estén incrementando sus productos de reserva, como puede ser la producción de PHB en el caso de *R. etli*.

Las condiciones de incubación (temperatura, tiempo, velocidad de agitación) así como el medio de cultivo son importantes al momento de definir el comportamiento de un microorganismo, pues es con respecto a estas condiciones que presenta características específicas como velocidad de crecimiento y viabilidad, por mencionar algunas. Cuando el microorganismo se ha adaptado a un medio de cultivo, se dice que las bacterias se encuentran en un estado de crecimiento equilibrado (Stainer, 1996).

Al modificar las condiciones de cultivo, la bacteria puede cambiar su velocidad de crecimiento, sus características morfológicas y sus capacidades metabólicas; por lo que se deben establecer valores específicos (velocidad específica de crecimiento) que permitan identificar qué tan asimilable es un medio bajo condiciones específicas de incubación.

### **2.3.1 Curva de crecimiento bacteriano**

El crecimiento de una población microbiana, en un sistema cerrado o en un cultivo sin renovación de medio, llamado cultivo monofásico, se puede representar por medio de una curva de crecimiento típica (Ortigoza y Ruiloba, 2004). Esto se esquematiza en la figura 5, la cual se divide en distintas fases que consisten en:

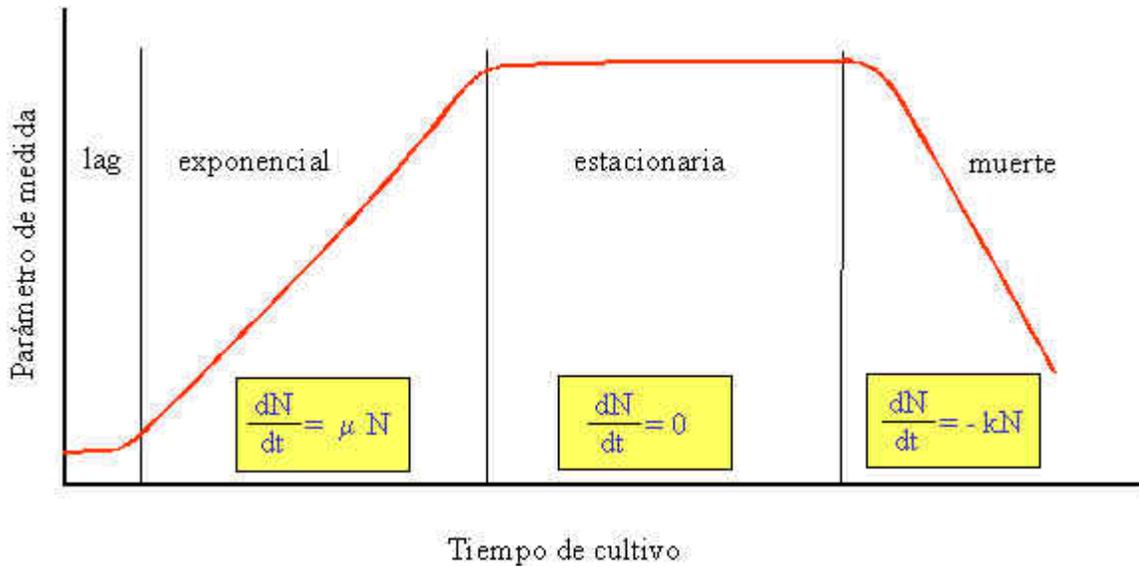
**Fase de latencia.** Al inocular los microorganismos en un medio de cultivo con nutrientes nuevos, el crecimiento no es inmediato, lleva un periodo de tiempo que depende de la procedencia del cultivo y de las condiciones de crecimiento. Hay un incremento en la actividad metabólica, pero no hay división celular (Prescott *et al.* 2002).

**Fase exponencial.** Se presenta un aumento constante en el crecimiento debido a que cada célula se reproduce por fisión binaria. El tiempo requerido para que cada célula se divida va disminuyendo gradualmente y la velocidad de duplicación alcanza su valor máximo. La velocidad de crecimiento está influenciada por varios factores, como son, las características del organismo, la presencia de oxígeno en el medio, la concentración de los sustratos, la temperatura y el pH del medio (Tortora *et al.* 2007).

**Fase estacionaria.** El crecimiento exponencial no se puede prolongar de manera indefinida, ya sea por la acumulación de metabolitos que inhiban el crecimiento celular, el agotamiento de los nutrientes, o que las células se obstaculizan mutuamente, la cantidad de células que se divide se vuelve proporcional a la cantidad de células que mueren (Hernández, 1997).

**Fase de muerte.** Aunque pueden haber células metabólicamente activas en el medio, es mayor la cantidad de células que mueren. Esta fase también puede llegar a ser exponencial. No obstante, la velocidad de muerte celular suele ser más lenta que la de crecimiento (Madigan *et al.* 2003, Tortora *et al.* 2007).

El crecimiento exponencial corresponde a una progresión geométrica de base 2; es decir, el número de células aumenta con un factor determinado cada unidad de tiempo. En esta fase, la tasa de aumento del número de células es proporcional al número de células presentes (Blanch y Clark, 1997).



**Figura 5.** Curva de crecimiento donde se muestran las cuatro fases del desarrollo microbiano. Tomado de Madigan *et al.* (2003).

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se define como el cambio en el número de células o biomasa ( $X$ ), con respecto al tiempo ( $t$ ) y es función de la concentración de un sustrato limitante, estando los demás en exceso, y se determina de acuerdo con el modelo cinético de Monod (Ramírez y Molina, 2005).

De manera matemática se expresa como:

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left( \frac{S}{K_S + S} \right) \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento [ $\text{h}^{-1}$ ]

$\mu_{m\acute{a}x}$ : velocidad específica máxima de crecimiento [ $h^{-1}$ ]

$S$ : concentración del sustrato limitante (g/L)

$K_s$ : constante de saturación (g/L)

El valor de  $\mu$  se puede calcular a partir del valor de la densidad óptica medida, o por la biomasa  $X_0$  y  $X_i$  en los tiempos  $t_0$  y  $t_i$  respectivamente, y se expresa en unidades de [ $h^{-1}$ ] (Schlegel, 1997).

$$\mu = \frac{\ln X_i - \ln X_0}{(t - t_0)} \quad \text{Ecuación 3}$$

Despejando el valor del  $\ln X_i$  y presentando la ecuación anterior como la ecuación de una recta:

$$\ln X_i = \ln X_0 + \mu t \quad \text{Ecuación 4}$$

A partir de esta ecuación, se sustituyen los valores de  $X_i$  y  $t$  obtenidos de los muestreos de cada cinética en la etapa exponencial, como el logaritmo natural de la densidad óptica con respecto al tiempo. De éste gráfico se calcula la pendiente, que corresponde a  $\mu$ .

## 2.4 Generalidades de los biofertilizantes

Durante la revolución verde (1960 a 1990), periodo en el que hubo un auge en la productividad agrícola por el crecimiento acelerado de la población a nivel mundial (en especial en los países en desarrollo) (Caballero-Mellado, 2009), se establecieron monocultivos y se abusó del uso de los agroquímicos y pesticidas. Con el tiempo esto disminuyó la

fertilidad del suelo que se destina para el cultivo de plantas de consumo humano, como lo son las legumbres. Ante ésto, se inició la búsqueda de nuevas alternativas para satisfacer la demanda de alimentos sin dañar el medio ambiente, creando una agricultura sustentable, por medio del uso de biofertilizantes.

Los biofertilizantes se definen como un producto que contiene microorganismos vivos no patógenos. Cuando estos se aplican a cultivos específicos, ya sea en el suelo o la semilla, pueden colonizar la rizósfera o el interior de la planta, para promover el crecimiento de la misma (Caballero-Mellado, 2010), mediante su capacidad de incrementar el suministro o la disponibilidad de nutrientes primarios a la planta, lo que conlleva a su desarrollo y crecimiento, mejorando el rendimiento de los cultivos. Por las condiciones actuales, el estudio de los inoculantes bacterianos ha tomado nuevo interés, para poder brindar mejores condiciones ambientales, así como beneficios económicos.

#### **2.4.1 Comparación de los biofertilizantes contra los fertilizantes químicos nitrogenados**

La mayoría de los fertilizantes nitrogenados de síntesis industrial se fabrican a partir de amoníaco, el que se obtiene por el procedimiento Haber-Bosch, que realiza la fijación química del nitrógeno atmosférico con hidrógeno proveniente de hidrocarburos (Navarro y Navarro, 2003).

El proceso Haber-Bosch requiere temperaturas de 500°C y presiones cercanas a las 200 atmósferas, en presencia de un catalizador (generalmente se utiliza níquel), lo que representa un elevado consumo

energético, pues se estima que se necesitan 1.5 Kg de combustible fósil por cada Kg de nitrógeno fijado (Rodríguez *et al.* 1984).

Hasta 1999, a nivel mundial se aplicaban cada año, aproximadamente  $7.7 \times 10^7$  toneladas de nitrógeno como fertilizante, constituyendo un requerimiento de combustible fósil de  $9.1 \times 10^{10}$  toneladas/año aproximadamente. Este valor corresponde a casi 1.4% del combustible fósil que se consume (Navarro y Navarro, 2003).

Aunque la fijación biológica de nitrógeno y la síntesis química se basan en el mismo principio, existe una gran diferencia en los costos de producción respectivos. Puede ser hasta 500 veces más económico a través de la fijación biológica, que mediante la síntesis química (Caballero-Mellado, 2010). Esto depende en gran medida del precio del petróleo, que es la base energética de la síntesis química.

Varios autores reportan diferentes cifras del aprovechamiento del nitrógeno por parte de las plantas, como Caballero-Mellado (2010) que menciona que de cada 100 Kg de un fertilizante mineral que se aplica a un cultivo, sólo entre el 60 y 80% es aprovechado por las plantas, el resto se pierde en forma de gases y en el agua de lluvia o riego. Por otro lado, Morales-Ibarra (2007) mencionó que del fertilizante químico que se aplica al suelo, sólo el 30 o el 40% es aprovechado por la planta.

Por lo mismo, el uso de los fertilizantes químicos está limitado por el alto costo y los efectos adversos sobre el medio ambiente. Ya que los residuos que no son absorbidos por la planta causan contaminación de aguas subterráneas, eutrofización, erosión y demás cambios en la estructura

físico-química del suelo y una drástica disminución de la biota edáfica (Rojas *et al.* 2009).

Varios autores han encontrado que el desarrollo de inoculantes bacterianos para uso agrícola puede contribuir a la disminución del uso de fertilizantes químicos (Villar *et al.* 2005; Madrigal-Carrillo *et al.* 2009; Matos y Zúñiga, 2003). Algunas de las ventajas que ofrecen los biofertilizantes son la producción de inoculantes que está basado en el uso de “productos” naturales renovables, por lo que no se corre el riesgo de la falta de materia prima para su producción. Son de fácil transportación, por ejemplo, se requiere de una bolsa de menos de 500 g para una hectárea de la mayoría de los cultivos (Caballero-Mellado, 2009). Además, enriquecen el suelo con materia orgánica y no son causantes de contaminación ambiental.

#### **2.4.2 Uso de *Rhizobium etli* como biofertilizante en la planta de frijol.**

El uso de *Rhizobium etli* se ha ido incrementando en los cultivos de frijol, *Phaseolus vulgaris*, y esto se debe a la alta especificidad de este microorganismo con esa planta en particular.

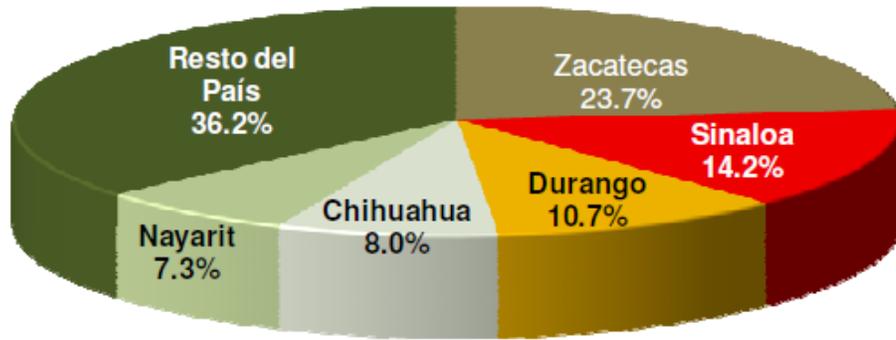
La razón del uso de estos microorganismos en la agricultura se basa principalmente en su carácter diazótrofo (*azoe*: nitrógeno; *trofos*: alimentación), ya que su capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis le permite obtener los nutrientes que necesita para crecer y a su vez, brindar los nutrientes que la planta requiere para su desarrollo.

*Rhizobium* puede interactuar con otros organismos en el suelo para favorecer el crecimiento de las plantas. Tal es el caso de las micorrizas, que se conforma por un amplio grupo de hongos que se asocia estrechamente a las raíces de las plantas (Peralta-Díaz *et al.* 2007).

Debido al interés específico hacia la planta de frijol, parte importante de la dieta de los mexicanos, se han realizado estudios para aprovechar la capacidad simbiótica de este microorganismo y así mejorar los cultivos para abastecer la demanda de la población.

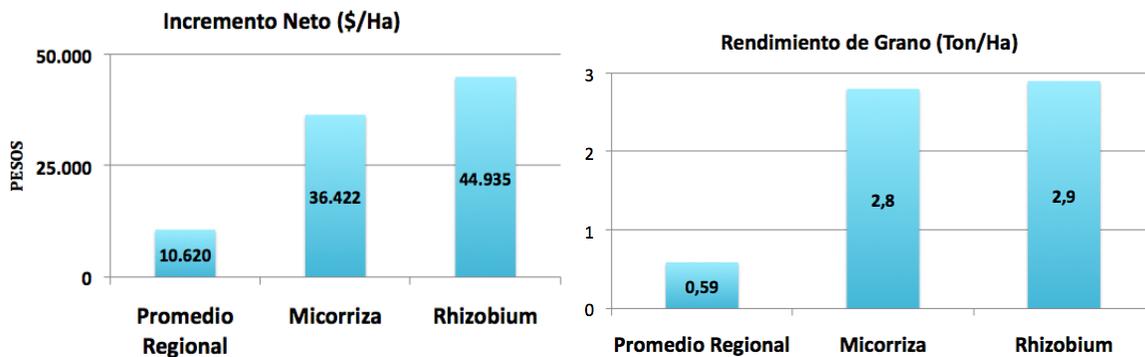
Se sabe que para el año 2008 la producción nacional de frijol fue de 1.07 millones de toneladas (SAGARPA, 2009) y que los principales estados productores fueron Zacatecas, Sinaloa y Durango, como se muestra en la figura 6, con los porcentajes de producción de los principales estados.

En cuanto a la producción total nacional, no se conoce el porcentaje de uso de biofertilizantes y mucho menos su concentración, pero en un estudio realizado sobre cultivos de frijol en la Huasteca Hidalguense en el periodo 2008/2009 por SAGARPA (figura 7), se observó un mayor rendimiento de grano al inocular con *R. etli*, en comparación con la producción tradicional, pues se incrementa el ingreso neto casi un 300% (Pérez-Camarillo, 2010).



**Figura 6.** Principales estados productores de frijol en el 2008. Tomado del reporte de SAGARPA, 2009.

A nivel nacional la producción de frijol se ha incrementado en las últimas décadas, esto debido a que se encuentra dentro de la canasta básica alimenticia, por lo que constituye una gran importancia económica y nutricional (FAO, 2007).



**Figura 7.** Comparativo de la cosecha de frijol con y sin uso de *R. etli* y micorriza, mostrado como incremento neto (\$/Ha) y con base en el rendimiento del grano. Tomado de Pérez-Camarillo (2010).

*Rhizobium etli* posee una gran habilidad para colonizar a la raíz de *Phaseolus vulgaris* y promover su crecimiento, además de desempeñar varios papeles importantes, tales como el control biológico de patógenos, el ciclaje de nutrientes, el establecimiento de las plántulas y la mejora en la calidad del suelo (Weller y Thomashow, 1994). Aunado a esto, Peralta-Díaz (2007) menciona algunos beneficios adicionales como un mayor vigor en la planta, menos ataque de plagas como la mosquita blanca, menor tasa de picado de semilla por gorgojo y un ciclo vital un poco más corto.

Dentro de la especie de *Rhizobium etli*, no todas las cepas se pueden utilizar como biofertilizante con la misma planta, esperando obtener el mismo resultado. Un criterio de selección del rizobio es que forme nódulos capaces de fijar nitrógeno, estableciendo una simbiosis efectiva con el hospedero, bajo un amplio espectro de condiciones ambientales: que presente ventajas al competir con rizobios no deseados, que sobreviva y se multiplique en el suelo, resistiendo pesticidas, desecación y algunas otras situaciones de estrés (Rodríguez *et al.* 1984). La concentración de bacterias inoculadas debe ser cercana al orden de  $5 \times 10^8$  UFC/g para asegurar la cantidad suficiente de bacterias por semilla (Peralta-Díaz, 2007) que permanezcan viables para poder infectar.

Otra de las actividades bacterianas importantes de *R. etli* es la producción de fitohormonas (auxinas), como el ácido indol acético, que favorece la germinación de las semillas y estimula la formación de raíces. Con lo que incrementa la capacidad de la planta para aprovechar los nutrientes del suelo, lo que a su vez favorece la fertilidad de los suelos (Caballero-Mellado, 2010).

En el estado de Morelos se hace uso de los biofertilizantes, principalmente en cultivos de maíz, utilizando *Azospirillum brasilense*. En el año 2010 se informó que el 30% del sector agrícola de dicho estado hace uso de los fertilizantes biológicos, con presencia de microorganismos fijadores de nitrógeno (Caballero-Mellado, 2010), aunque hasta el 2007, casi el 80% de la superficie agrícola de todo el país utilizaba fertilizantes químicos (Morales-Ibarra, 2007). Con estos avances en la incorporación del uso de biofertilizantes en más cultivos, se puede esperar que, en próximos años el uso de fertilizantes químicos siga reduciéndose.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El uso excesivo de fertilizantes químicos en el suelo agrícola, así como el uso de monocultivos ha disminuido el desarrollo y calidad de los productos agrícolas, y esto a su vez afecta a los campesinos que ven reducida su cosecha y por ende la inversión económica. La idea de utilizar microorganismos nativos del suelo que establezcan relaciones específicas con ciertas plantas, leguminosas en este caso, como una alternativa para mejorar la reciente situación del campo, no es actual. Se ha dado seguimiento al uso de estos microorganismos tanto para conocer su impacto en el ambiente (Gómez, 2000; Almaraz y Ferrera-Cerrato, 2000; Caballero-Mellado, 2009) como su efecto en el crecimiento de las plantas.

Este trabajo parte de la necesidad de conocer más sobre las condiciones de crecimiento de *R. etli* como bacteria en vida libre, para poder obtener una mayor cantidad de inóculo por medio de un proceso eficiente de fermentación, para posteriormente poder emplearlo como biofertilizante en el campo nacional e internacional.

Se propone modificar la fuente de carbono del medio para mejorar el crecimiento del microorganismo, alargar su tiempo de vida y favorecer su capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis.

#### **4. HIPÓTESIS**

*Rhizobium etli* puede metabolizar diferentes fuentes de carbono, obteniendo así un crecimiento específico; si se modifica la fuente de carbono y su concentración en el medio de cultivo, se podría influir en el crecimiento celular y en el tiempo de vida del microorganismo.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general**

Estudiar la influencia de diversas fuentes de carbono y la relación Carbono/Nitrógeno en el crecimiento de *Rhizobium etli* en cultivo sumergido en matraces agitados.

##### **5.2 Objetivos particulares**

Determinar el efecto de la variación y concentración en el medio de cultivo de manitol, glucosa, sacarosa y fructosa, en el crecimiento de *Rhizobium etli*.

Determinar las cinéticas de crecimiento de dos cepas de *Rhizobium etli* (CIAT y HP) en los diferentes medios de cultivo.

Determinar la viabilidad de los cultivos por medio de cuenta directa en placa.

Determinar el tiempo de vida de anaquel, por al menos seis meses, en las mejores condiciones de fuente de carbono y la relación C/N obtenidas.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Caracterización de las cepas utilizadas**

Se utilizaron dos cepas de *Rhizobium etli*, una aislada de suelo (CIAT) y una modificada genéticamente (HP). Éstas se encontraban conservadas en crioviales a -70 °C, con 30% de glicerol.

Su caracterización se basó en la siembra en medio peptona-extracto de levadura (PY, por sus siglas en inglés) sólido para observar su morfología colonial, estriando por agotamiento para obtener colonias aisladas.

Se escogió una colonia aislada de cada cepa y se le hizo una tinción diferencial de Gram (Ramírez-Gama *et al.* 2006), para verificar la morfología y pureza de las muestras.

### **6.2 Elaboración de una curva de peso seco.**

Se incubó un cultivo de cada cepa en medio extracto de levadura manitol (YEM, por sus siglas en inglés) a 200 rpm y  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , después de 24 horas se le midió la densidad óptica a 600 nm de longitud de onda. Cuando alcanzaron densidades de 1.0 unidades de absorbancia (u.a.) se hicieron diluciones para tener valores esperados de 0.0 u.a. a 1.0 u.a. con intervalos de 0.1 u.a. Posteriormente, se les midió la densidad óptica para conocer el valor real de cada dilución. Todo esto se realizó en un volumen total de 15.0 mL. Se concentraron las células en microtubos de 1.5 mL (previamente pesados y mantenidos a peso

constante durante 24 h) utilizando una microcentrífuga Eppendorf 5417R a 13000 rpm durante 15 minutos y 4 °C.

El sobrenadante se fue eliminando poco a poco. Se llenó el microtubo con 1.0 mL de la muestra y se centrifugó. Se eliminó el sobrenadante y se le volvió a agregar más muestra. Esto se realizó hasta que se eliminó todo el sobrenadante (15.0 mL). Después se colocaron los tubos en un horno con vacío (Precision, modelo 19) a  $105 \pm 2$  °C, se mantuvieron ahí hasta que estuvieron a peso constante. Los valores obtenidos se graficaron como la densidad óptica observada (u.a. 600 nm) con respecto a la biomasa, expresada en peso seco (g/L). Se hizo una regresión lineal para obtener el factor que nos permite relacionar la densidad óptica con la cantidad de biomasa del microorganismo (Hernández, 1997 con algunas modificaciones).

### **6.3 Diseño del medio de cultivo variando la fuente de carbono y su relación Carbono/Nitrógeno para los cultivos sumergidos.**

El medio de cultivo que se utilizó para hacer las cinéticas de crecimiento fue el medio YEM, pues está reportado que es el medio tradicionalmente utilizado para rizobios (Freire y Sato, 1999; Nápoles *et al.* 2004); al cual se le modificó la fuente de carbono sustituyendo el manitol por glucosa, fructosa y sacarosa. El criterio de selección de dichas fuentes se basó en la capacidad de éste microorganismo para metabolizarlas, así como los menores costos y la disponibilidad en el mercado de todas ellas. Se sabe que el manitol, así como la glucosa y sacarosa son de las primeras fuentes de carbono que *Rhizobium etli* utiliza en vida libre (Stowers,

1985); además sabemos que la sacarosa se disocia en glucosa y fructosa, por lo que propusimos analizar el metabolismo de la fructosa de manera independiente.

La composición del medio de cultivo se basó en la aportación de una fuente de carbono (carbohidratos) y de energía; extracto de levadura, que le proporciona a las bacterias productos de degradación de las proteínas, vitaminas, siendo así la principal fuente de nitrógeno en el medio; así como también brinda elementos traza por medio de las sales  $MgSO_4$ ,  $K_2HPO_4$  y  $NaCl$ , además de proporcionar cofactores enzimáticos (Rojas *et al.* 2009) y sustratos para la respiración. Aunque también contiene carbohidratos (10.7% aproximadamente), este valor resulta despreciable comparándolo con la cantidad agregada de cada una de las fuentes en las diferentes relaciones C/N.

Se estudiaron tres diferentes relaciones Carbono/Nitrógeno (g Carbono/g Nitrógeno), C/N: 37, C/N: 74 y C/N: 111. La empresa Biofábrica S.XXI S.A. de C.V. trabaja con el medio de cultivo en una relación C/N: 74, por lo que se decidió variar dicha relación en un 50% de su valor, tanto inferior (C/N:37) como superiormente (C/N:111). Esto se realizó, variando la concentración de carbohidrato y manteniendo constante la cantidad de fuente de nitrógeno, que es el extracto de levadura. Los cálculos para conocer la cantidad de hidrato de carbono que se debía agregar a cada medio en las diferentes fuentes de carbono son los siguientes:

Se determinó la cantidad de nitrógeno presente en el extracto de levadura, sabiendo que es la única fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, además de calcular su concentración final en el mismo.

$$\frac{0.5 \text{ g extracto de levadura}}{1.0 \text{ L}} \left| \frac{10.7 \text{ g Nitrógeno}}{100 \text{ g extracto de levadura}} \right| = 0.0535 \text{ g Nitrógeno/L}$$

Después se estableció la relación carbono/nitrógeno, expresada como gramos de Carbono/ gramos de Nitrógeno (g C/g N):

$$\frac{X \text{ g C}}{0.0535 \text{ g N}} = 37$$

Donde  $X$  es la cantidad de azúcar que se tiene que pesar y agregar al medio de cultivo, dependiendo de la relación C/N que se esté preparando, en el primer caso la relación es de 37 gC/gN.

Despejando  $X$ :

$$X = 37 (0.0535 \text{ g}) = 1.979 \text{ g C}$$

Este valor correspondió a los gramos de carbono que deben estar presentes en el medio de cultivo con una relación C/N: 37. Posteriormente, se hicieron los cálculos para cada fuente de carbono, con base en la cantidad de átomos de carbono que tiene cada molécula en particular.

Para el manitol el cálculo fue el siguiente:

$$1.979 \text{ g C} \left| \frac{182.172 \text{ g manitol}}{72 \text{ g C}} \right| = 5.0 \text{ g manitol}$$

Esto correspondió a la cantidad de manitol que se debió pesar, por cada litro de medio de cultivo, para la relación C/N: 37.

Para glucosa el cálculo fue:

$$1.979 \text{ g C} \left| \frac{180 \text{ g glucosa}}{72 \text{ g C}} \right| = 4.9 \text{ g glucosa}$$

La fructosa tiene el mismo peso molecular que la glucosa y posee la misma cantidad de átomos de carbono, por lo que el cálculo quedó de la siguiente manera:

$$1.979 \text{ g C} \left| \frac{180 \text{ g fructosa}}{72 \text{ g C}} \right| = 4.9 \text{ g fructosa}$$

Por último, la cantidad a pesar de sacarosa correspondió a:

$$1.979 \text{ g C} \left| \frac{342 \text{ g sacarosa}}{144 \text{ g C}} \right| = 4.7 \text{ g sacarosa}$$

Siguiendo la lógica del cálculo, se sustituye el valor de 37 por la relación C/N que se esté manejando en ese momento, ya sea 74 ó 111. Los valores obtenidos en todos estos cálculos se muestran en la tabla 3, expresados como gramos de reactivo por cada litro de medio de cultivo (g/L), manteniendo constantes los valores de los demás reactivos, tomando en cuenta la relación C/N que se esté manejando.

Con respecto a la relación C/N 74 el valor de X corresponde a:

$$X = 74 (0.0535 \text{ g}) = 3.959 \text{ g C}$$

Del mismo modo se calculan los gramos necesarios de carbono en un medio de cultivo con una relación C/N: 111.

$$X = 111 (0.0535 \text{ g}) = 5.938 \text{ g}$$

**Tabla 3.** Composición de los medios de cultivo utilizados, variando la fuente de carbono y su relación con respecto al nitrógeno en el medio de cultivo.

<b>Medio YEM (g/L)</b>	<b>C/N: 37</b>	<b>C/N: 74</b>	<b>C/N: 111</b>
<b>NaCl</b>	0.1	0.1	0.1
<b>Extracto de levadura</b>	0.5	0.5	0.5
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0.5	0.5	0.5
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	0.2	0.2	0.2
<b>Como fuente de carbono</b>			
<b>Manitol</b>	5.0	10.0	15.0
<b>Glucosa</b>	4.9	9.9	14.8
<b>Fructosa</b>	4.9	9.9	14.8
<b>Sacarosa</b>	4.7	9.4	14.1

#### **6.4 Cinéticas de crecimiento de las cepas**

Se prepararon preinóculos transfiriendo 1.0 mL de un vial con la cepa a utilizar, a un matraz de 500 mL con 100.0 mL de medio YEM. El matraz se incubó a 200 rpm,  $30 \pm 2$  °C durante 24 horas en una incubadora C25I, New Brunswick Scientific. Después de 24 horas de incubación se midió la densidad óptica por absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Genesys 5 (Thermospectronic). De cada inóculo se hicieron tinciones de Gram para verificar la pureza del cultivo. Los inóculos se realizaron hasta que el preinóculo alcanzó una densidad óptica entre 0.8-0.9 u.a., que es cuando se ha alcanzado el inicio de la fase exponencial, con lo que se evitó la fase lag en los inóculos de las fermentaciones.

A cada matraz de 500 mL con una relación 1:5 de medio de cultivo se le agregó el inóculo suficiente para tener un valor inicial de densidad óptica (D.O.) entre 0.08-0.1 u.a. El análisis de cada fuente de carbono y de cada relación Carbono/Nitrógeno se realizó por triplicado. Los matraces se incubaron durante 48 horas a 200 rpm y  $30 \pm 2$  °C. Se tomaron muestras cada dos horas en la fase exponencial de crecimiento. Posteriormente, se tomaron muestras cada 3 horas, para evaluar el crecimiento del cultivo midiendo la densidad óptica, a una longitud de onda de 600 nm. Se graficó el logaritmo natural de la densidad óptica promedio en función del tiempo.

## **6.5 Determinación de las unidades formadoras de colonias**

Se utilizó la técnica de diluciones sucesivas especificada en la NOM-092-SSA1-1994 con algunas variaciones específicas, para cuantificar la cantidad de células viables presentes. Se sembró una serie de cajas por cada matraz variable, lo que nos permitió obtener valores por triplicado de cada condición analizada, ya sea la variación de fuente de carbono, así como la relación C/N. De cada uno de los productos almacenados de las cinéticas realizadas, se tomaron 0.1 mL de muestra previamente homogeneizada, esta alícuota se aforó a 1.0 mL con 0.9 mL de agua peptonada estéril. Se hicieron diluciones sucesivas hasta la dilución  $1/10^8$ . Se sembraron cajas sólo de las diluciones  $1/10^6$ ,  $1/10^7$  y  $1/10^8$  al inicio del estudio. En los monitoreos subsecuentes, se disminuía la dilución para sembrar, tomando como criterio el tiempo de almacenamiento y el valor de UFC's obtenido en el primer monitoreo. Se inoculó por extensión superficial en placa de agar PY, cuya composición se muestra en la tabla 4; colocando 0.1 mL de la dilución respectiva. Las cajas Petri se incubaron a  $30 \pm 2$  °C durante 48 h en una incubadora (Felisa).

Sólo se tomaron en cuenta las cajas que presentaban un crecimiento entre 30 y 300 colonias para poder tener resultados estadísticamente representativos. En el caso de que los valores se salieran de dicho intervalo, se tomaban las placas más representativas haciendo el mismo cálculo.

Para conocer el valor real de las UFC/mL se utilizó la siguiente fórmula:

$$UFC / mL: NC \left( \frac{1}{FD} \right) \left( \frac{1}{V} \right) \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

UFC/mL: unidades formadoras de colonias en 1 mL de muestra

NC: número de colonias contadas en la placa

FD: factor de dilución de donde se tomó la muestra para inocular la placa

V: volumen de la alícuota de siembra (0.1 mL)

**Tabla 4.** Composición del medio sólido PY para la cuenta en placa de los microorganismos.

<b>Medio PY</b>	
<b>Peptona de caseína</b>	0.5 %
<b>Extracto de levadura</b>	0.3 %
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	7 mM
<b>Agar</b>	1.5%
<b>pH</b>	6.8

### **6.5.1 Determinación de la viabilidad de las muestras almacenadas por lo menos cuatro meses**

Los productos obtenidos de las fermentaciones realizadas se mantuvieron almacenados durante un año aproximadamente, bajo condiciones de temperatura ambiente (23°C) y sin contacto directo con luz solar. Dependiendo del valor inicial de UFC/mL y del tiempo de almacenamiento, que varió de 4 a 12 meses, se determinó el rango de dilución que se iba a utilizar para sembrar las muestras.

Para las muestras que tenían más tiempo de almacenamiento (9 a 12 meses) se utilizó un rango de dilución de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$ . Para las muestras entre 4 y 8 meses de almacenamiento las diluciones fueron de  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$ . Las muestras que desde el tiempo inicial mostraron un crecimiento casi nulo, se sembraron de manera directa en el agar para determinar presencia de células viables.

La siembra de las muestras se realizó con base en la metodología mostrada en la sección 6.5.

### **6.5.2 Determinación de la viabilidad de las muestras almacenadas a diferentes temperaturas (4° y 23°C)**

Para conocer el efecto de la temperatura de almacenamiento en las muestras de la cepa CIAT que presentaron un mejor resultado de viabilidad inicial, éstas se almacenaron a dos temperaturas: 4°C, que es

la temperatura de refrigeración a la cual la velocidad de crecimiento de los microorganismos mesófilos como *R. etli* se ve disminuida, pero bajo las condiciones correctas se pueden reactivar. Ésto se comparó con las muestras almacenadas a temperatura ambiente (23°C) que se tenían previamente. Se sembraron las muestras en el momento inicial de la incubación a 4°C.

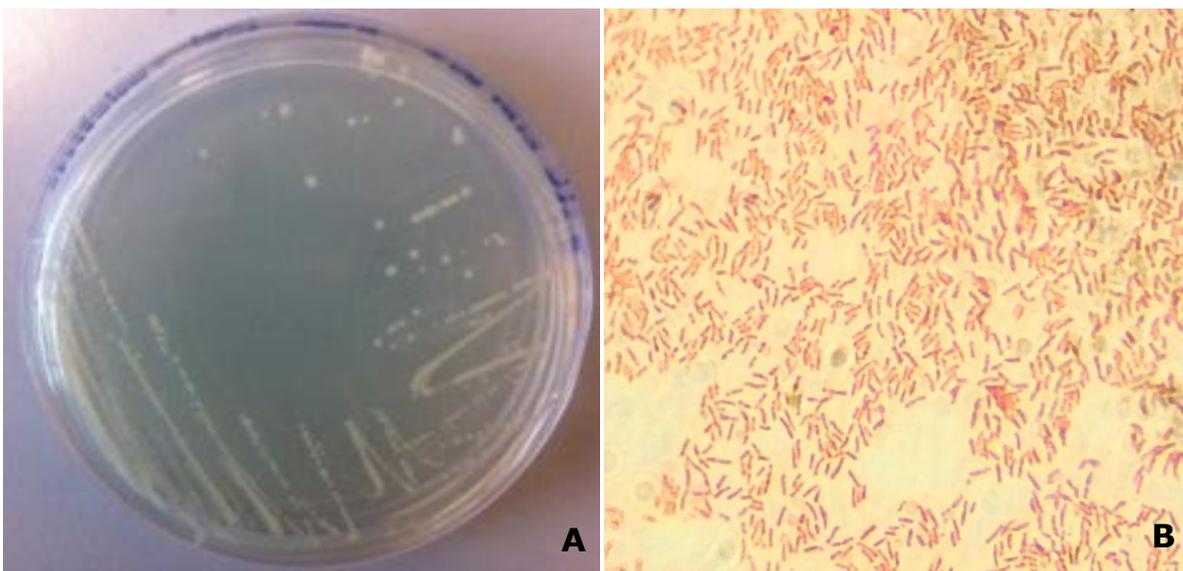
Después de seis meses se realizó una siembra directa para determinar la presencia del microorganismo, en caso de no haber crecido, se reportó como no observado. En las muestras que sí presentaron crecimiento se realizaron diluciones de  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$ .

La siembra de las muestras se realizó con base en la metodología mostrada en la sección 6.5.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

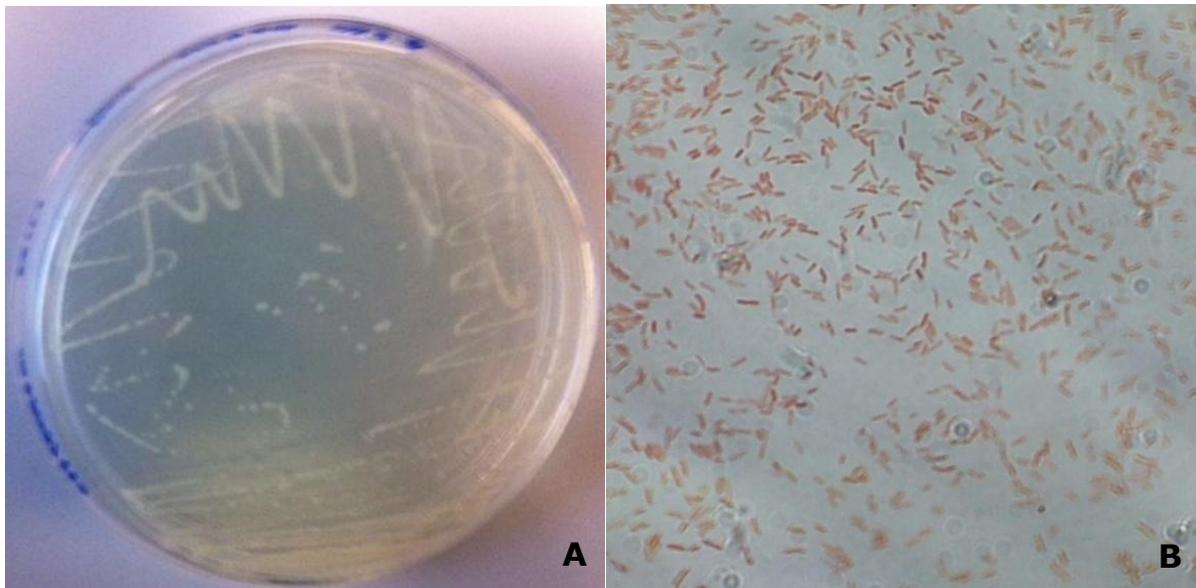
### 7.1 Caracterización de la morfología colonial y bacteriana de las cepas utilizadas para comprobación de pureza.

La caracterización de las cepas se realizó por medio de una prueba en placas con medio sólido PY para ver la morfología colonial y posteriormente se realizó una tinción diferencial de Gram de una colonia aislada de cada cepa para corroborar la morfología bacteriana. Esto se realizó para cada cepa y se pueden observar ambos resultados en las figuras 8 y 9, para la cepa HP y CIAT respectivamente.



**Figura 8. A.** Estriado por agotamiento en medio PY de *R. etli* **HP** después de 48 h de incubación a  $30 \pm 2$  °C. **B.** Micrografía de una tinción de Gram de *R. etli* **HP** de 48 h de incubación a  $30 \pm 2$  °C.

En ambos casos se observa que la morfología colonial coincide con las características establecidas en la literatura (Gómez, 2000; Lloret y Martínez-Romero, 2005) para este microorganismo, se observan colonias circulares, convexas, semitraslucidas y mucilaginosas, con diámetro aproximado de 4mm. Así como su morfología bacteriana, observando bacilos cortos Gram-negativos. Además, por medio de la tinción diferencial se puede notar que los cultivos de los que se partió para hacer las cinéticas de crecimiento no tienen presencia de algún otro microorganismo que pueda afectar los resultados posteriores por contaminación.



**Figura 9.** **A.** Estriado por agotamiento en medio PY de *R. etli* **CIAT** después de 48 h de incubación a  $30 \pm 2$  °C. **B.** Micrografía de una tinción de Gram de *R. etli* **CIAT** de 48 h de incubación a  $30 \pm 2$  °C.

## 7.2 Curva de peso seco para relacionar la densidad óptica observada con la biomasa obtenida en los cultivos bacterianos.

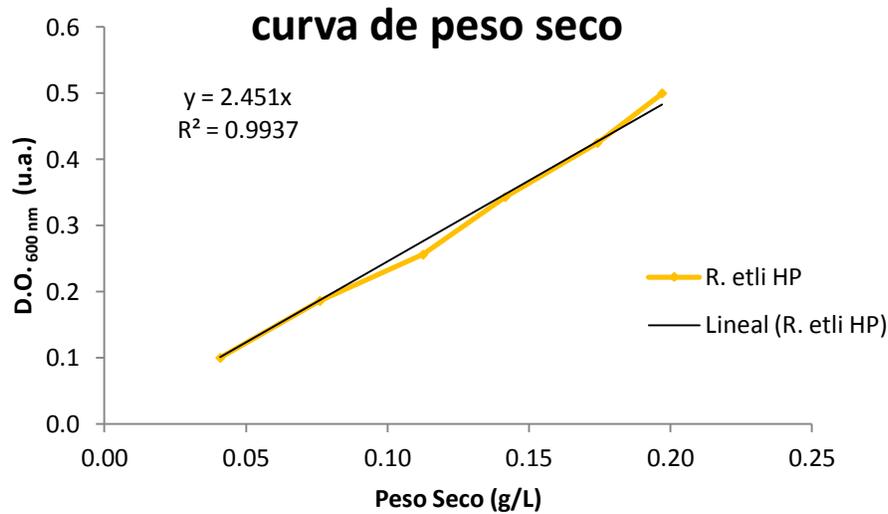
Con la metodología planteada en el inciso 6.2, se realizó una curva de peso seco para cada cepa del microorganismo, de manera independiente y por triplicado en cada caso.

### 7.2.1 Curva de peso seco para *Rhizobium etli* HP

Los valores que relacionan la densidad óptica (D.O.) observada, con el peso seco de la biomasa ( $X$ ) obtenido, de la cepa HP, se muestran en la tabla 5 y su respectivo gráfico se muestra en la figura 10 donde se relacionan estas variables para poder obtener el factor de correlación.

**Tabla 5.** Valores del peso seco constante de las muestras de *R. etli* HP, expresados como biomasa (g/L).

Densidad óptica 600 nm (u.a.)	$X$ promedio (g/L)	Desviación estándar (g/L)
0.100	0.041	1.11E-04
0.186	0.076	5.51E-05
0.256	0.113	8.33E-05
0.343	0.142	1.10E-04
0.425	0.174	9.54E-05
0.500	0.197	5.29E-05



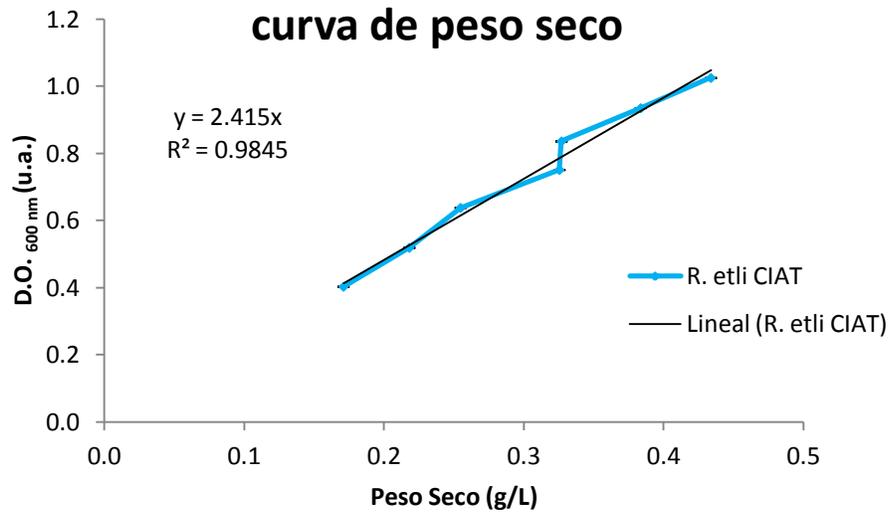
**Figura 10.** Curva de peso seco donde se relacionan los valores absorbancia a 600 nm con respecto a la biomasa (peso seco), para la cepa **HP**.

### 7.2.2 Curva de peso seco para *Rhizobium etli* CIAT

Para la cepa CIAT, los valores de densidad óptica observada con respecto a la biomasa como peso seco, se muestran en la tabla 6, así como su respectivo gráfico en la figura 11.

**Tabla 6.** Valores del peso seco constante de las muestras de *R. etli* **CIAT**, expresados como biomasa (g/L).

Densidad óptica 600 nm (u.a.)	X promedio (g/L)	Desviación estándar (g/L)
<b>0.403</b>	0.171	2.27 E-04
<b>0.519</b>	0.218	1.32 E-04
<b>0.638</b>	0.255	4.73E-05
<b>0.751</b>	0.325	1.16 E-04
<b>0.836</b>	0.327	4.62E-05
<b>0.935</b>	0.384	± 6.56E-05
<b>1.025</b>	0.434	± 6.66E-05



**Figura 11.** Curva de peso seco donde se relacionan los valores absorbancia a 600 nm con respecto a la biomasa (peso seco), para la cepa **CIAT**.

Para las dos cepas, la pendiente, que es el valor obtenido por la regresión lineal es muy parecida, siendo de 2.451 g/L ·u.a. y de 2.415 g/L ·u.a., para la cepa HP y CIAT, respectivamente, lo que muestra que independientemente de la cepa, las determinaciones de peso seco presentan una tendencia similar.

### **7.3 Cinéticas de crecimiento de las cepas variando la fuente de carbono y la relación C/N en el medio de cultivo**

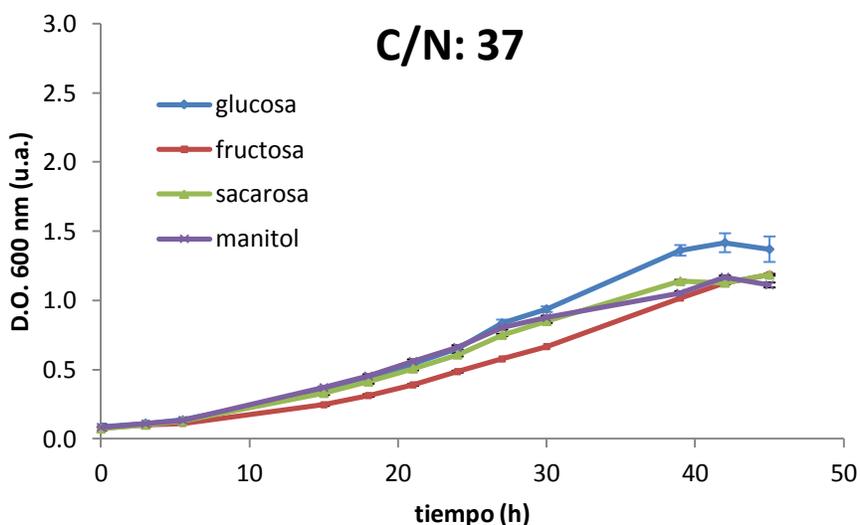
Las cinéticas de crecimiento se realizaron por triplicado para cada cepa, de manera independiente, con las diferentes fuentes de carbono y variando la relación C/N para cada una de ellas. Los resultados se presentan para cada cepa por separado.

### 7.3.1 Cinéticas de crecimiento para *Rhizobium etli* HP

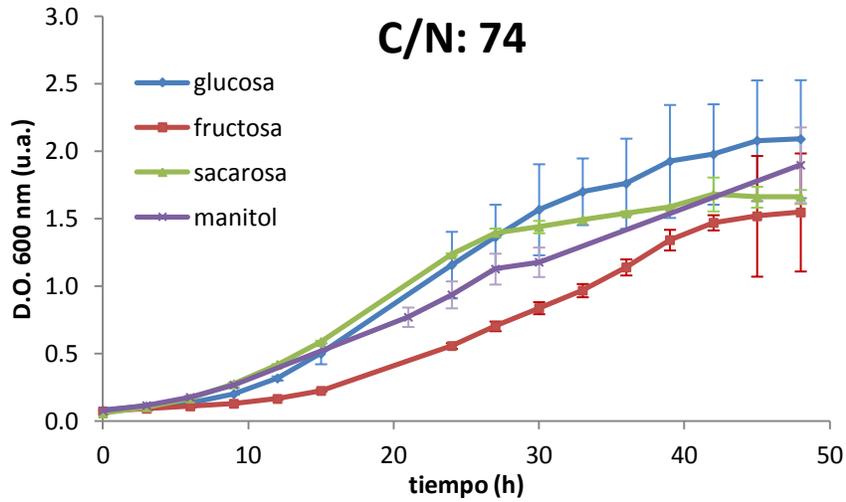
Los experimentos se realizaron de manera simultánea en cada ensayo, en los que se mantuvo constante una relación C/N y se varió la fuente de carbono con los cuatro carbohidratos disponibles, en cada relación C/N analizada.

#### 7.3.1.1 Variación de la fuente de carbono en el medio de cultivo

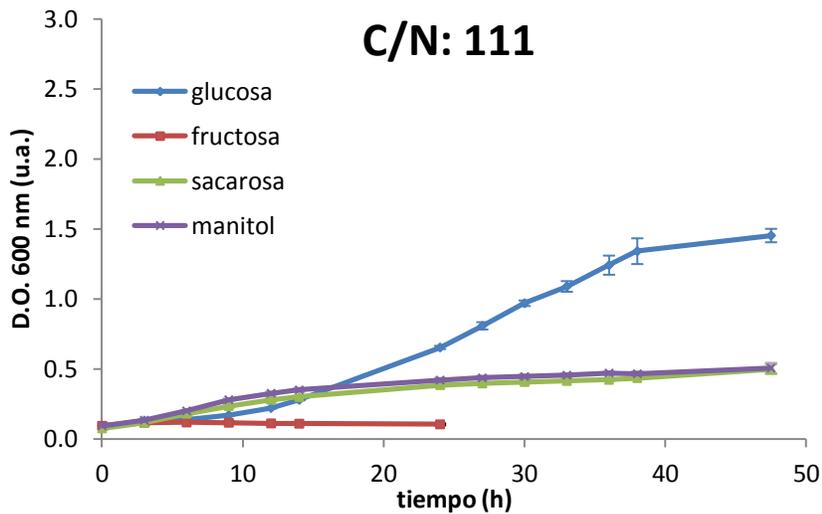
Para presentar los resultados de manera ordenada, primero se mencionarán aquellos obtenidos sustituyendo al manitol con las otras tres fuentes de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa), en cada una de las relaciones C/N analizadas (37, 74 y 111). De la figura 12 a la 14, se presentan las cinéticas de las relaciones C/N: 37 a la C/N: 111, respectivamente, con la comparación de las cuatro fuentes de carbono en cada una de ellas.



**Figura 12.** Cinética de crecimiento bacteriano en una relación C/N:37 variando la fuente de carbono. Cepa HP. Incubando 48 h,  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 200 rpm.



**Figura 13.** Cinética de crecimiento bacteriano en una relación C/N:74 variando la fuente de carbono. Cepa HP. Incubando 48 h,  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 200 rpm.



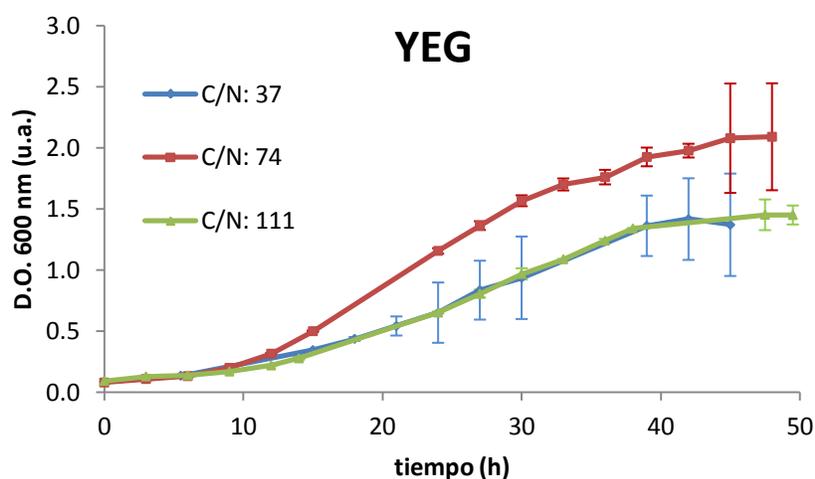
**Figura 14.** Cinética de crecimiento bacteriano en una relación C/N:111 variando la fuente de carbono. Cepa HP. Incubando 24 h el medio con fructosa y 48 h los medios con glucosa, sacarosa y manitol;  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 200 rpm.

En las cinéticas de crecimiento con C/N:37 y C/N:74 se nota una tendencia similar entre las cuatro fuentes de carbono, aunque sí se ve diferencia en el crecimiento, por los valores de densidad óptica obtenidos. Esto a diferencia de la relación mayor (C/N:111), en la que se ve un crecimiento superior utilizando glucosa y un crecimiento nulo con fructosa. En las relaciones C/N:37 y C/N:111 el medio con glucosa presentó un crecimiento mayor comparándolo con las demás fuentes de carbono en cada relación C/N. Siendo más significativo el valor en la relación C/N:111. Aunque en la relación C/N:74 la desviación estándar no permite obtener la misma conclusión, presenta una mejor tendencia que las demás fuentes de carbono.

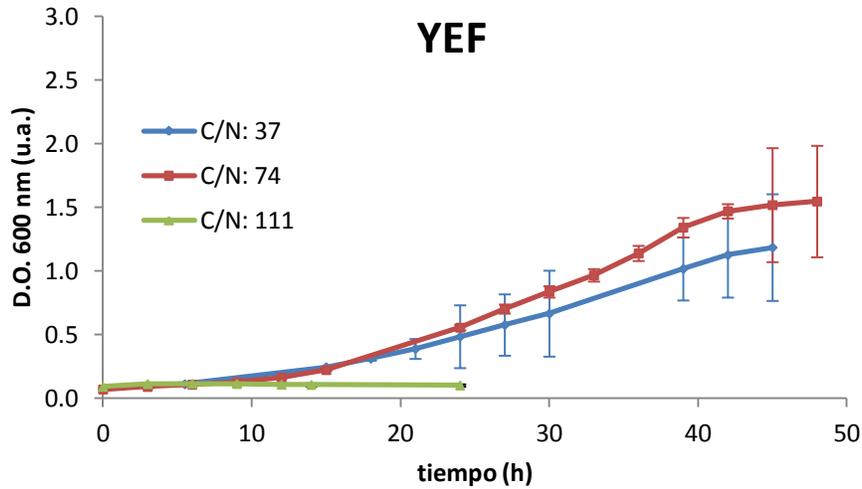
### **7.3.1.2 Modificación de la relación Carbono/Nitrógeno en el medio de cultivo**

Aunque los ensayos se realizaron simultáneamente, el manejo de los datos se puede realizar comparando ahora el efecto de la variación de la relación C/N, manteniendo fija la fuente de carbono. Estos resultados se muestran en la figura 15 para el medio YEG, en la figura 16 para el medio YEF, en la figura 17 se muestra el medio YES y finalmente el medio YEM en la figura 18. En cada gráfico se comparan las tres relaciones C/N con respecto a la fuente de carbono utilizada.

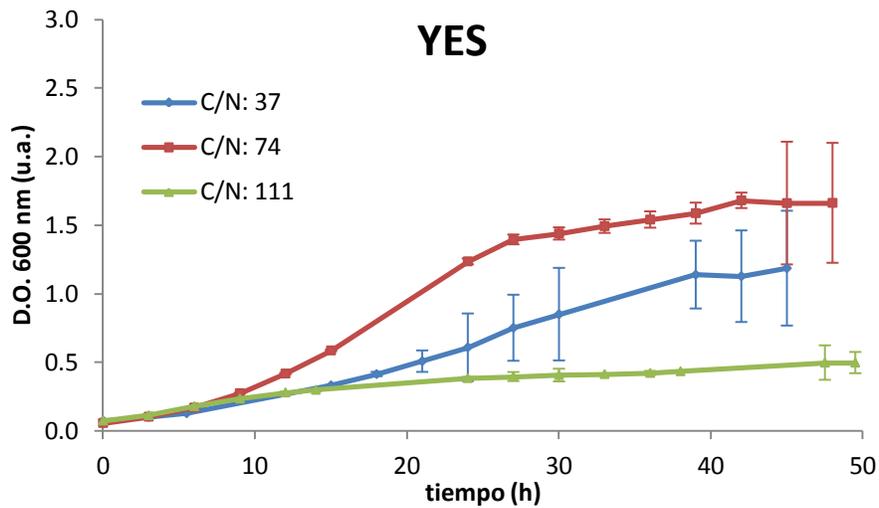
En cuanto a la relación C/N: 74, tomando en cuenta las desviaciones estándar, se puede observar que comparando las cuatro diferentes fuentes de carbono, es en esta relación C/N en donde se presenta un mayor crecimiento, con respecto a las dos relaciones C/N restantes. Y la relación C/N: 111 en todos los casos presenta un menor crecimiento con respecto a las otras relaciones C/N, independientemente del hidrato de carbono empleado.



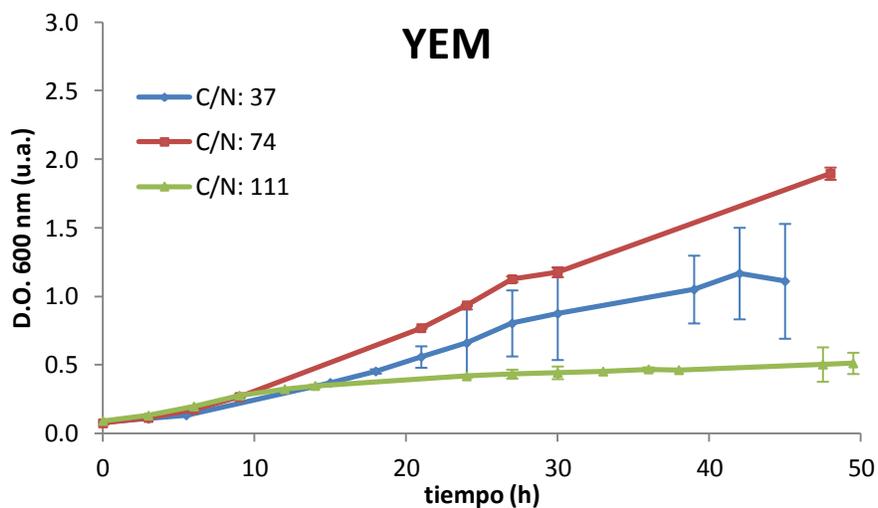
**Figura 15.** Comparación de las cinéticas de crecimiento bacteriano en el medio YEG (glucosa). Cepa HP. Incubando hasta 48 h con las tres diferentes relaciones C/N;  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 200 rpm.



**Figura 16.** Comparación de las cinéticas de crecimiento bacteriano en el medio YEF (fructosa). Cepa HP. Incubando hasta 48 h con las relaciones C/N de 37 y 74, y 24 h con la relación C/N:111;  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 200 rpm.



**Figura 17.** Comparación de las cinéticas de crecimiento bacteriano en el medio YES (sacarosa). Cepa HP. Incubando hasta 48 h con las tres diferentes relaciones C/N;  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 200 rpm.



**Figura 18.** Comparación de las cinéticas de crecimiento bacteriano en el medio YEM (manitol). Cepa HP. Incubando hasta 48 h con las tres diferentes relaciones C/N;  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 200 rpm.

Para poder hacer una valoración más completa es pertinente que los valores de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) obtenidos sean comparados con la densidad óptica máxima (D.O. máx), estos valores se obtuvieron para cada fuente de carbono en cada relación C/N y se observan en la tabla 7.

**Tabla 7.** Relación de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la densidad óptica máxima (D.O. máx) según la relación C/N con respecto a cada fuente de carbono para la cepa **HP**.

<b>Fuente de Carbono</b>	<b>Relación C/N (g/g)</b>	<b><math>\mu</math> (<math>h^{-1}</math>)</b>	<b>D.O. máx <sub>600 nm</sub> (u.a.)</b>	<b>Desviación estándar (u.a.)</b>
Glucosa	37	0.085	1.42	5.30E-02
	74	0.131	2.09	4.37E-01
	111	0.087	1.45	7.70E-02
Fructosa	37	0.075	1.19	6.99E-02
	74	0.073	1.55	4.37E-01
	111	0.006	0.12	5.13E-03
Sacarosa	37	0.085	1.19	8.14E-02
	74	0.146	1.68	7.75E-02
	111	0.099	0.50	3.52E-02
Manitol	37	0.089	1.17	5.86E-02
	74	0.102	1.90	2.80E-01
	111	0.088	0.51	4.30E-02

Se puede ver que las velocidades de crecimiento más bajas, que van de  $0.006 h^{-1}$  hasta  $0.075 h^{-1}$ , se presentaron en los medios con fructosa, en las tres relaciones (C/N: 37, C/N: 74 y C/N: 111), aunque en la relación C/N: 74 su valor de densidad óptica máxima no es tan bajo (1.55u.a.). Con respecto al manitol, vemos que los valores de velocidad específica

de crecimiento son parecidos en las tres relaciones ( $0.089 \text{ h}^{-1}$ ,  $0.102 \text{ h}^{-1}$  y  $0.088 \text{ h}^{-1}$  para C/N: 37, C/N: 74 y C/N: 111, respectivamente), pero presenta variaciones en los valores de densidad óptica máxima (1.17, 1.90 y 0.51u.a. para C/N: 37, C/N: 74 y C/N: 111, respectivamente). Aunque la velocidad de crecimiento mayor, que fue de  $0.146 \text{ h}^{-1}$ , se presentó en el medio con sacarosa bajo C/N: 74, la densidad óptica mayor se obtiene en el medio con glucosa a la misma relación C/N, siendo de 2.09u.a.. De manera general se observa que los mejores crecimientos se dieron bajo una relación de C/N: 74, siendo los valores de  $\mu$  superiores a  $0.1 \text{ h}^{-1}$  y presentando densidades ópticas mayores comparando las relaciones con cada fuente de carbono; esto coincide con lo que Stowers (1985) menciona sobre el aprovechamiento de la glucosa y la sacarosa como fuentes de carbono por *R. etli*, ya que por ser una bacteria de rápido crecimiento es capaz de metabolizar hexosas y disacáridos, a diferencia de otras bacterias de la misma especie pero de crecimiento lento.

La relación C/N: 74 con glucosa, presenta un aumento de un 28% en la velocidad específica de crecimiento con respecto al medio establecido con manitol en la misma relación, y un aumento del 10% en la densidad óptica máxima registrada. En cuanto a la sacarosa en la misma relación (C/N: 74) el aumento en el valor de  $\mu$  es del 43%, no así su D.O. máx, que presenta una disminución del 11% con respecto al medio con manitol bajo la misma relación de C/N: 74. Tomando en cuenta el valor más alto obtenido para el medio con fructosa, que fue a una relación C/N de 37, presenta una disminución de casi el 48% con respecto al

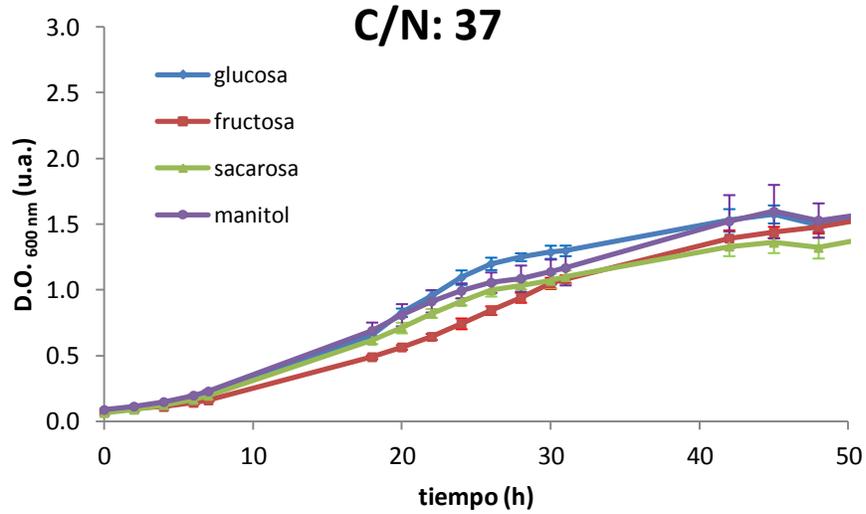
medio con sacarosa a 74 C/N y una disminución del 42% en  $\mu$  y una D.O. máx 43% menor con respecto al medio con glucosa a 74 C/N.

### **7.3.2 Cinéticas de crecimiento de *Rhizobium etli* CIAT**

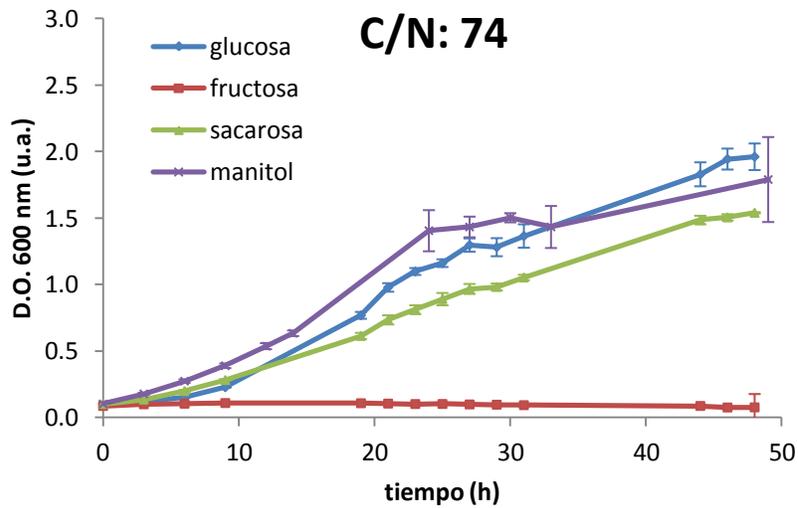
Para la cepa CIAT se procedió de la misma manera que para la cepa HP, se compararon los resultados con respecto a las fuentes de carbono y también con respecto a la variación de la relación C/N.

#### **7.3.2.1 Variación de la fuente de carbono en el medio de cultivo**

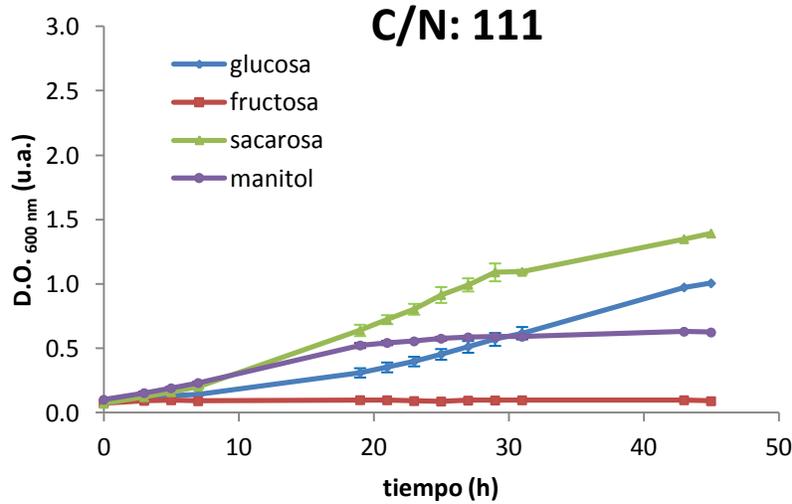
Cambiando la fuente de carbono del medio, manteniendo como constante la relación C/N del mismo, se obtuvieron los siguientes resultados para la cepa CIAT, que se muestran en la figura 19, para la relación C/N: 37, para la relación C/N: 74 en la figura 20 y por último en la figura 21 está representada la relación C/N: 111.



**Figura 19.** Cinética de crecimiento bacteriano en una relación C/N:37 variando la fuente de carbono. Ceba CIAT. Incubando 50 h,  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 200 rpm.



**Figura 20.** Cinética de crecimiento bacteriano en una relación C/N:74 variando la fuente de carbono. Ceba CIAT. Incubando 48 h,  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 200 rpm.

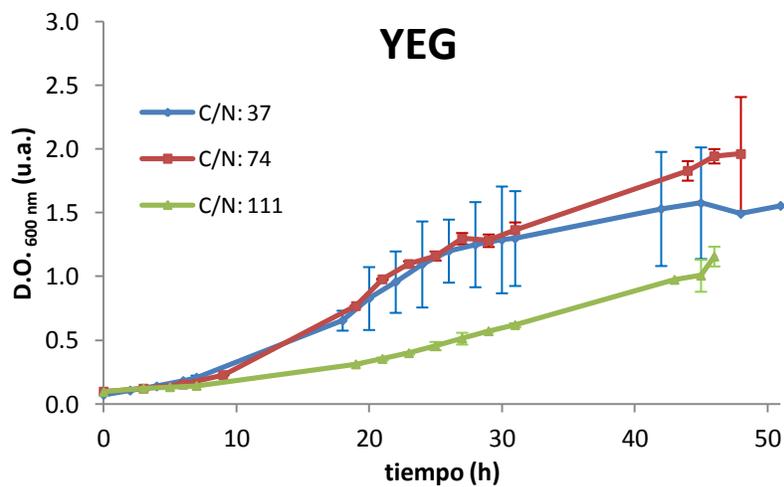


**Figura 21.** Cinética de crecimiento bacteriano en una relación C/N:111 variando la fuente de carbono. Cepa CIAT. Incubando 45 h,  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 200 rpm.

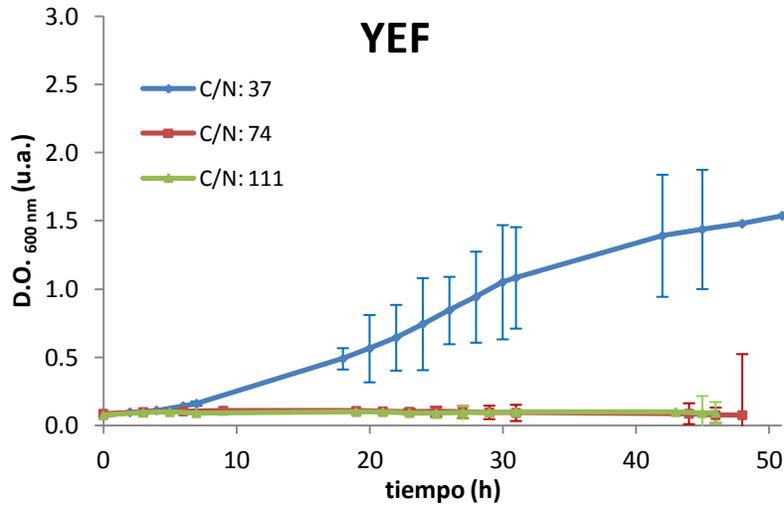
Con esta cepa las tendencias presentan una pequeña diferencia en cada relación C/N. En el medio que contiene fructosa, no se observó crecimiento desde la relación C/N: 74, ni en la relación C/N: 111. En la relación C/N: 37 las tendencias son similares en la cinética, aunque se separan conforme avanza el tiempo, la desviación no permite ver una diferencia significativa entre las cuatro fuentes de carbono; de igual manera para la relación C/N: 74, a excepción de la fructosa y para la relación C/N: 111 los crecimientos se muestran diferentes entre las cuatro condiciones, siendo diferentes a los resultados observados para la cepa HP.

### 7.3.2.2 Modificación de la relación Carbono/Nitrógeno en el medio de cultivo

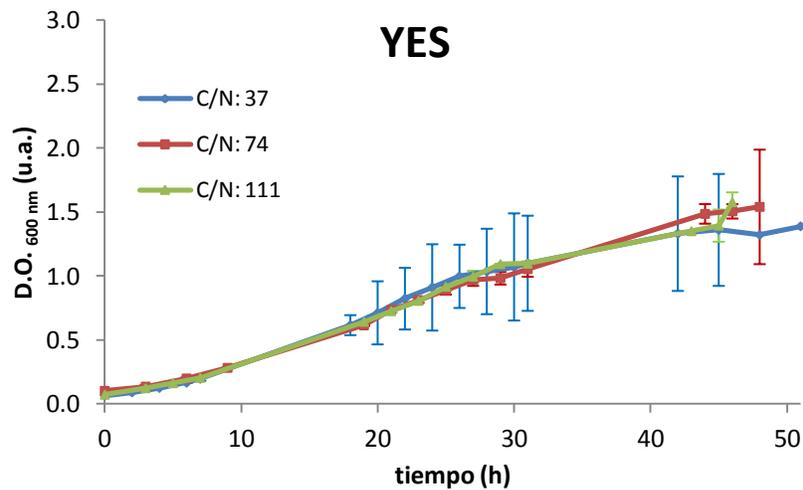
Comparando el efecto de la modificación de la relación C/N con respecto a cada una de las cuatro fuentes de carbono: glucosa (figura 22), fructosa (figura 23), sacarosa (figura 24) y manitol (Figura 25), se tienen los siguientes resultados de las cinéticas de crecimiento.



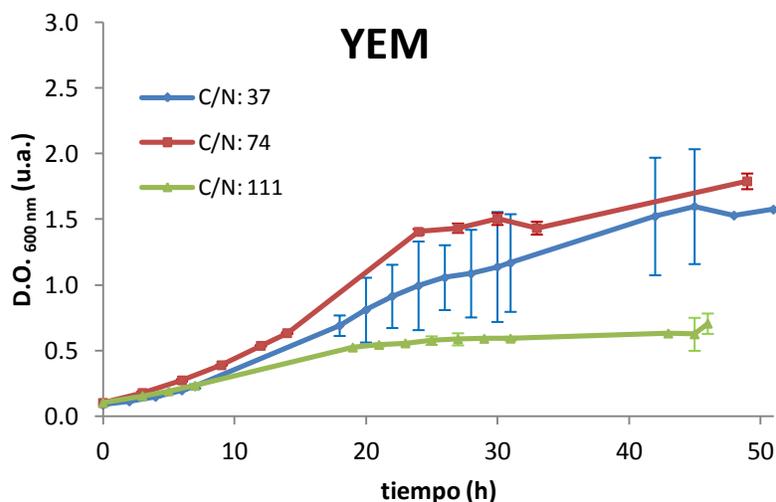
**Figura 22.** Comparación de las cinéticas de crecimiento bacteriano en el medio YEG (glucosa). Cepa CIAT. Incubando hasta 48 h con las relaciones C/N: 74 y C/N: 111, e incubando 50 h el medio con la relación C/N: 37;  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 200 rpm.



**Figura 23.** Comparación de las cinéticas de crecimiento bacteriano en el medio YEF (fructosa). Cepa CIAT. Incubando hasta 48 h con las relaciones C/N: 74 y C/N: 111, e incubando 50 h el medio con la relación C/N: 37;  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 200 rpm.



**Figura 24.** Comparación de las cinéticas de crecimiento bacteriano en el medio YES (sacarosa). Cepa CIAT. Incubando hasta 48 h con las relaciones C/N: 74 y C/N: 111, e incubando 50 h el medio con la relación C/N: 37;  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 200 rpm.



**Figura 25.** Comparación de las cinéticas de crecimiento bacteriano en el medio YEM (manitol). Cepa CIAT. Incubando hasta 48 h con las relaciones C/N: 74 y C/N: 111, e incubando 50 h el medio con la relación C/N: 37;  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , 200 rpm.

En el medio con glucosa se ve un comportamiento similar al de la cepa HP, el mayor crecimiento se observa en la relación C/N: 74. Aunque, durante las primeras 30 horas el crecimiento en esta relación y la menor (C/N: 37) fue muy parecido, en las restantes 18 horas se nota un aumento en la relación C/N: 74. Al parecer el menor crecimiento se da en la relación C/N: 111. Usando la fructosa sólo se observa crecimiento en la relación C/N: 37, las otras dos relaciones (C/N: 74 y C/N: 111) no mostraron crecimiento desde el inicio de la cinética. Con sacarosa, se muestra un comportamiento similar en las tres relaciones C/N durante toda la cinética, siendo al final un poco más alto el valor obtenido para la relación C/N: 74, con respecto a las otras dos relaciones (C/N: 37 y C/N: 111). En el caso del manitol, se aprecia que el crecimiento es mayor en la relación C/N: 74 y menor en la relación C/N: 111.

En la tabla 8 se pueden observar los valores obtenidos de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y densidad óptica máxima medida (D.O. máx) relacionados a cada una de las fuentes de carbono en las tres respectivas relaciones C/N para la cepa CIAT.

**Tabla 8.** Relación de las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) y la densidad óptica máxima (D.O. max) según la relación C/N con respecto a cada fuente de carbono para la cepa **CIAT**.

<b>Fuente de Carbono</b>	<b>Relación C/N (g/g)</b>	<b><math>\mu</math> (<math>h^{-1}</math>)</b>	<b>D.O. máx <sup>600 nm</sup> (u.a.)</b>	<b>Desviación estándar (u.a.)</b>
Glucosa	37	0.107	1.58	6.84E-02
	74	0.116	1.96	1.00E-01
	111	0.061	1.16	9.54E-02
Fructosa	37	0.101	1.54	5.68E-02
	74	0.015	0.11	6.66E-03
	111	0.023	0.10	2.83E-03
Sacarosa	37	0.104	1.39	8.94E-02
	74	0.088	1.54	5.29E-03
	111	0.098	1.58	8.38E-02
Manitol	37	0.101	1.60	1.44E-01
	74	0.089	1.79	3.20E-01
	111	0.070	0.71	1.70E-02

Las menores velocidades específicas de crecimiento ( $0.015 \text{ h}^{-1}$  y  $0.023 \text{ h}^{-1}$ ) y densidad óptica máxima ( $0.11 \text{ u.a.}$  y  $0.10 \text{ u.a.}$ ) se dieron en el medio con fructosa, en sus relaciones C/N: 74 y C/N: 111, respectivamente. También, se observan velocidades de crecimiento bajas en la relación C/N: 111 para los medios con glucosa ( $0.061 \text{ h}^{-1}$ ) y manitol ( $0.070 \text{ h}^{-1}$ ). El medio con sacarosa presenta valores similares a las otras fuentes de carbono, tanto de velocidad específica de crecimiento como de densidad óptica máxima, independientemente de la relación C/N que se esté manejando. En la relación C/N: 37, el comportamiento fue parecido para todos los carbohidratos,  $0.107 \text{ h}^{-1}$  y D.O. máx de  $1.58 \text{ u.a.}$  para la glucosa;  $0.101 \text{ h}^{-1}$  y D.O. máx de  $1.54 \text{ u.a.}$  para la fructosa;  $0.104 \text{ h}^{-1}$  y D.O. máx de  $1.39 \text{ u.a.}$  para la sacarosa y  $0.101 \text{ h}^{-1}$  y D.O. máx de  $1.60 \text{ u.a.}$  para el manitol. El mejor resultado, en cuanto a velocidad de crecimiento ( $0.116 \text{ h}^{-1}$ ) y densidad óptica máxima ( $1.96 \text{ u.a.}$ ), se obtiene con glucosa en una relación de C/N: 74.

Tomando como referencia los valores para manitol en la relación C/N: 74 (valores dados por la empresa Biofábrica S.XXI S.A. de C.V.) y comparando los valores de glucosa en la misma relación C/N, se observa un aumento del 30% en el valor de  $\mu$  y un aumento de casi el 10% en la D.O. máxima. Haciendo lo mismo para el medio con fructosa bajo una C/N: 37 se presenta un aumento del 13% en el valor de  $\mu$  y una disminución del 14% en el valor de D.O. máxima. Cabe señalar que el valor más alto de  $\mu$  para el manitol se dio bajo la relación C/N: 37, obteniendo un aumento del 13% en este valor y una disminución de casi el 11% en la D.O. máxima con respecto a la misma fuente de carbono en una relación C/N: 74.

En la literatura (Martínez *et al.* 2002; Stowers,1985) se menciona el metabolismo de esta fuente de carbono, glucosa, por medio de la vía Entner-Doudoroff, lo que concuerda con el hecho de que fue esta fuente de carbono la que presentó un mejor resultado con respecto al crecimiento de los microorganismos durante los ensayos, en comparación con los otros tres carbohidratos, fructosa, sacarosa y manitol.

Con respecto al metabolismo de la sacarosa y su buen aprovechamiento para la producción de biomasa y mejora de la velocidad de crecimiento, se puede decir que, aunque sea un disacárido y no todos los microorganismos son capaces de metabolizarlos, *R.etli* posee enzimas capaces de hidrolizar la sacarosa para poder aprovechar los monosacáridos obtenidos (Almaraz *et al.* 2007).

#### **7.4 Conteo de las unidades formadoras de colonias para la determinación de las células viables en el inóculo bacteriano**

Para poder conocer la viabilidad celular del inóculo bacteriano, se realizaron conteos de las unidades formadoras de colonias (UFC's) al terminar los ensayos en los matraces, tomando este tiempo como tiempo cero ( $t_0$ ) de almacenamiento y se realizó un monitoreo para conocer la viabilidad actual de las muestras almacenadas a temperatura ambiente, sin contacto directo a la luz del sol y debidamente selladas en tubos traslúcidos.

#### **7.4.1 Conteo de unidades formadoras de colonias para *Rhizobium etli* HP**

Al igual que las cinéticas de crecimiento de las cepas, la cuenta de los microorganismos viables y su respectivo manejo de datos, se realizó de manera independiente para cada cepa, identificando la fuente de carbono empleada en el medio de cultivo, así como la relación C/N que se estuviera manejando.

Para la cepa HP, los resultados de la viabilidad hasta el primer monitoreo, cuya fecha se especifica para cada una de las muestras, se presentan en la tabla 9 para cada una de las fuentes de carbono utilizadas (glucosa, fructosa, sacarosa y manitol) y a su vez para cada relación C/N estudiada.

El primer monitoreo de la viabilidad de las muestras indica que hay una disminución en la concentración celular en la mayoría de los casos, con fructosa, sacarosa y manitol como fuente de carbono, en cualquiera de las tres relaciones C/N estudiadas; a excepción del medio con glucosa en C/N: 37 ( $2.5 \times 10^8$  UFC/mL). Las disminuciones son de hasta dos unidades exponenciales, como en la muestra con glucosa y una relación C/N de 111 ( $4.6 \times 10^7$  UFC/mL), la muestra con fructosa en la relación C/N:74 ( $3.4 \times 10^7$  UFC/mL), y todas las muestras con sacarosa y manitol, en las tres diferentes relaciones C/N.

**Tabla 9.** Monitoreo de la vida de anaquel de los inoculantes de *R. etli* **HP**, especificando la fuente de carbono, la relación C/N, la viabilidad expresada como UFC/mL y el tiempo de almacenamiento al momento del monitoreo después de 6 meses de almacenamiento.

Fuente de Carbono	C/N (g/g)	UFC/mL				T.A. (meses)
		t <sub>0</sub>	% dispersión	t <sub>1</sub>	% dispersión	
Glucosa	37	6.0x10 <sup>8</sup>	3.2E-01	2.5x10 <sup>8</sup>	3.0E-01	7
	74	4.9x10 <sup>8</sup>	3.4E-01	4.5x10 <sup>7</sup>	1.4E-01	8
	111	1.8x10 <sup>9</sup>	3.7E-01	4.6x10 <sup>7</sup>	2.4E-01	8
Fructosa	37	2.5x10 <sup>9</sup>	4.2E-01	1.4x10 <sup>8</sup>	2.5E-01	7
	74	1.3x10 <sup>9</sup>	2.0E-01	3.4x10 <sup>7</sup>	3.6E-01	8
	111	N/O*	N/O*	N/O*	N/O*	N/O*
Sacarosa	37	5.7x10 <sup>8</sup>	2.7E-01	4.5x10 <sup>6</sup>	1.1E-01	7
	74	5.0x10 <sup>9</sup>	2.5E-01	5.0x10 <sup>6</sup>	3.5E-01	8
	111	4.7x10 <sup>8</sup>	2.6E-01	5.2x10 <sup>6</sup>	2.6E-01	8
Manitol	37	5.0x10 <sup>9</sup>	3.2E-01	2.0x10 <sup>7</sup>	2.0E-01	7
	74	8.5x10 <sup>9</sup>	1.4E-01	4.9x10 <sup>7</sup>	5.9E-02	12
	111	5.2x10 <sup>9</sup>	2.4E-01	6.4x10 <sup>7</sup>	2.5E-01	8

N/O: No Observado

T.A.: Tiempo de almacenamiento

t<sub>0</sub>: recién almacenadas

t<sub>1</sub>: monitoreo según el T.A.

\*: debido al crecimiento nulo de las bacterias en los cultivos, las muestras almacenadas ya no presentaron viabilidad, incluso en siembra directa en placa.

En el caso de las muestras que presentaron una mayor velocidad de crecimiento (glucosa C/N: 74 y sacarosa C/N: 74), se observa que su viabilidad no muestra los valores esperados con base en su

comportamiento durante la cinética de crecimiento, de hecho, la mayor caída de viabilidad se da en sacarosa con la relación C/N: 74 ( $5.0 \times 10^6$  UFC/mL), presentando un 33% menos de concentración celular. Aunque los valores han disminuido, se siguen manteniendo en un nivel aceptable para su uso como inoculantes, pues Caballero-Mellado (2009) menciona que para que un biofertilizante pueda ser asimilado correctamente, éste debe tener una concentración no menor del millón de bacterias. Cabe señalar que algunas muestras con 8 meses de almacenamiento, tienen la misma concentración microbiana que la muestra de manitol con C/N: 74, con 12 meses de almacenamiento, que es de  $4.9 \times 10^7$  UFC/mL, por lo que especulamos que entre los 8 y 12 meses de almacenamiento no se da una caída significativa de la viabilidad celular. Las muestras de sacarosa en las tres relaciones C/N, presentan el nivel más bajo de concentración celular (de  $4.5$  a  $5.2 \times 10^6$  UFC/mL).

En el caso del medio con glucosa y la relación C/N: 37, se puede observar que la viabilidad se mantiene casi en un 100% a los siete meses de almacenamiento, con un porcentaje de dispersión del 0.3%. Con respecto a la muestra con C/N: 74, sólo se observa una disminución de casi el 13% de la viabilidad a ocho meses de almacenamiento, manteniéndose en  $4.5 \times 10^7$  UFC/mL, con lo que se puede utilizar como inóculo bacteriano al cumplir con el parámetro de concentración celular (Peralta-Díaz *et al.* 2007).

#### 7.4.2 Conteo de unidades formadoras de colonias para *Rhizobium etli* CIAT

Para la cepa CIAT, los valores del monitoreo de viabilidad se acomodaron de acuerdo a cada una de las fuentes de carbono utilizadas, y cada una de las relaciones C/N estudiadas, esto para poder comparar de mejor manera el efecto de estas variaciones en la viabilidad celular del inoculo. Estos valores se condensan en la tabla 10.

**Tabla 10.** Monitoreo de la vida de anaquel de los inoculantes de *R. etli* CIAT, especificando la fuente de carbono, la relación C/N, la viabilidad expresada como UFC/mL y el tiempo de almacenamiento al momento del monitoreo a partir de los 4 meses de almacenamiento.

Fuente de Carbono	C/N	UFC/mL				T.A. (meses)
		t <sub>0</sub>	% dispersión	t <sub>1</sub>	% dispersión	
Glucosa	37	2.5x10 <sup>9</sup>	3.1E-01	2.2x10 <sup>8</sup>	2.7E-01	6
	74	3.3x10 <sup>9</sup>	2.7E-01	2.8x10 <sup>8</sup>	6.7E-02	8
	111	1.5x10 <sup>10</sup>	3.4E-01	2.4x10 <sup>8</sup>	3.0E-01	4
Fructosa	37	8.5x10 <sup>8</sup>	6.1E-02	5.8x10 <sup>7</sup>	1.6E-01	6
	74	N/O*	N/O*	N/O*	N/O*	N/O*
	111	N/O*	N/O*	N/O*	N/O*	N/O*
Sacarosa	37	4.7x10 <sup>10</sup>	2.4E-01	5.1x10 <sup>7</sup>	2.8E-02	6
	74	4x10 <sup>9</sup>	1.2E-01	4.7x10 <sup>8</sup>	1.7E-01	9
	111	3.7x10 <sup>9</sup>	2.2E-01	3.4x10 <sup>8</sup>	2.0E-01	4
Manitol	37	2.3x10 <sup>9</sup>	4.0E-01	4x10 <sup>7</sup>	1.5E-01	6
	74	1.7x10 <sup>10</sup>	3.9E-01	3.7x10 <sup>8</sup>	1.9E-01	7
	111	2x10 <sup>10</sup>	2.7E-01	4.5x10 <sup>8</sup>	1.6E-01	4

N/O: No Observado

T.A.: Tiempo de Almacenamiento

$t_0$ : recién almacenadas

$t_1$ : monitoreo según el T.A.

\*: debido al crecimiento nulo de las bacterias en los cultivos, las muestras almacenadas ya no presentaron viabilidad, incluso en siembra directa en placa.

Para CIAT la concentración celular viable se mantiene en una unidad logarítmica por arriba de las muestras de la cepa HP, tomando en cuenta que el tiempo de almacenamiento es menor. La muestra que presentó una mayor velocidad de crecimiento, cuya relación C/N es de 74 utilizando glucosa, no presenta una concentración celular mayor ( $2.8 \times 10^8$  UFC/mL), como se hubiera esperado por los resultados obtenidos en los ensayos previos, de hecho, la viabilidad de la mayoría de las muestras se encuentra dentro del mismo rango exponencial ( $10^7$ - $10^8$ ), aunque las muestras lleven entre 4 y 9 meses de almacenamiento.

La disminución de viabilidad después de 8 meses de almacenamiento, en el medio con glucosa con relación C/N: 74, fue de 11%. La mayor caída de viabilidad se dio en el medio con sacarosa con una relación C/N: 37 y fue del 30%, aunque la concentración celular viable se redujo ( $5.1 \times 10^7$  UFC/mL), sigue siendo una cantidad aceptable para su uso como inoculante en el suelo agrícola ya que mantiene un valor superior al millón de células (Caballero-Mellado, 2009).

En los medios en los que se empleó fructosa, se puede observar que desde la relación C/N:74 no se presenta un crecimiento representativo como para ser contemplados como un medio de cultivo alternativo.

#### **7.4.2.1 Viabilidad de muestras almacenadas a dos temperaturas diferentes**

Para la cepa CIAT, aparte del monitoreo a temperatura ambiente se realizó una prueba de almacenamiento de los cultivos bacterianos a una menor temperatura (4°C). Esto con el fin de ver el impacto de la temperatura en la viabilidad de las células, estando almacenadas en el medio de cultivo agotado.

Estas condiciones de almacenamiento sólo se aplicaron a los inóculos que presentaron un mejor crecimiento, determinado por la velocidad específica de crecimiento y la densidad óptica máxima medida en el cultivo sumergido, así como una viabilidad aceptable en condiciones de temperatura ambiente (23 °C). En este caso las fuentes de carbono que mostraron ser mejores para la cepa CIAT, son glucosa y manitol en una relación C/N de 37. El monitoreo reportado se realizó a un mes ( $t_1$ ) y seis meses ( $t_2$ ) de almacenamiento, en las dos condiciones de temperatura (4°C y 23 °C) y los resultados se observan en la tabla 11.

La elección de esta fuente de carbono se debe también a su accesibilidad económica. Ya que, para la producción industrial del inoculante, algo de lo que se busca es reducir los costos de producción y la glucosa presenta un costo menor al manitol en un 93% según una comparación que realizamos (2011). Con esto se puede reducir considerablemente el costo total de la producción asegurando la presencia de suficientes bacterias de buena calidad para inocular los suelos de siembra.

Con respecto a la comparación de las dos temperaturas de almacenamiento se puede observar, contrario a lo que se reporta en la literatura (Freire y Sato, 1999; Peralta-Díaz *et al.* 2007), las muestras que se presentan con mayor viabilidad hasta el término de este trabajo, son las que se han mantenido a temperatura ambiente. Dichos autores reportaron tener una mayor concentración celular tras almacenar sus muestras bajo temperaturas de refrigeración, en comparación con temperaturas más cálidas (23°C). Tanto con manitol (97%) como con glucosa (92%), siendo  $1.4 \times 10^9$  UFC/mL la concentración celular de la muestra con glucosa y de  $1.6 \times 10^9$  UFC/mL para la muestra con manitol. En ambos casos, la viabilidad mantenida hasta el momento está por arriba de lo aceptado para su uso como inóculo.

**Tabla 11.** Monitoreo de la viabilidad a un mes y seis meses, de dos muestras de *R. etli* CIAT, con medio agotado YEM y YEG, en una relación C/N: 37, almacenadas a 4° y 23°C cada una.

Fuente de carbono	Temp. de Almacenamiento	UFC/mL				
		t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	% dispersión	t <sub>2</sub>	% dispersión
Glucosa C/N:37	4°C	$2.5 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	6.7E-01	N/O*	N/O*
	23°C	$2.2 \times 10^{10}$	$4.7 \times 10^{10}$	1.4E-01	$1.4 \times 10^9$	1.2E-01
Manitol C/N:37	4 °C	$2.3 \times 10^9$	$3.0 \times 10^8$	2.4E-01	N/O*	N/O*
	23 °C	$1.3 \times 10^{10}$	$2.1 \times 10^{10}$	2.5E-01	$1.6 \times 10^9$	3.2E-01

N/O: No Observado

$t_0$ : recién almacenadas

$t_1$ : un mes de almacenamiento

$t_2$ : seis meses de almacenamiento

\*: debido al crecimiento nulo de las bacterias en los cultivos, las muestras almacenadas ya no presentaron viabilidad, incluso en siembra directa en placa.

Se deben hacer más monitoreos para poder concluir de mejor manera cuál puede ser una mejor fuente de carbono y a qué temperatura se mantiene la viabilidad celular por más tiempo.

## 8. CONCLUSIONES

Al variar la fuente de carbono del medio de cultivo, utilizando manitol, glucosa, sacarosa y fructosa, se pudo demostrar que la mejor fuente de carbono para las cepas HP y CIAT de *Rhizobium etli* es la glucosa, presentando los mejores valores de velocidad específica de crecimiento, siendo de  $0.131 \text{ h}^{-1}$  para HP y  $0.116 \text{ h}^{-1}$  para CIAT en la relación C/N:74 en ambos casos.

La mayor viabilidad también se presenta en las muestras obtenidas de los medios de cultivo con glucosa bajo una relación C/N:74, para ambas cepas, observando valores de 90.8% y 91.5% de viabilidad para la cepa HP y CIAT, respectivamente.

Las mejores condiciones obtenidas de crecimiento y viabilidad inicial se dieron utilizando glucosa y manitol como fuente de carbono, con una relación C/N:37 (g/g), para la cepa CIAT de *R. etli*. Después de seis meses de almacenamiento a  $4^\circ$  y  $23^\circ\text{C}$ , la viabilidad celular se mantuvo más alta en condiciones de temperatura ambiente ( $23^\circ\text{C}$ ), siendo del 97% para el medio con glucosa.

## 9. PERSPECTIVAS

En este experimento se trabajó con fuentes de carbono económicamente más accesibles para uso industrial. Para un posterior estudio, se pueden emplear otras fuentes de carbono que la bacteria metaboliza más fácilmente. A su vez, se puede variar la fuente de nitrógeno del medio de cultivo, todo esto con el fin de mejorar los rendimientos de producción, así como elevar el tiempo de vida media de las bacterias en el inóculo.

Con base en la información sobre la importancia de la producción y metabolismo del PHB en la bacteria en vida libre y el bacteroide, se podrían realizar experimentos de hidrólisis ácida para hacer una cuantificación del PHB de las células y su comportamiento con respecto al tiempo. Para poder mostrar, además, si existe una relación directa entre el almacenamiento de este polímero y el mantenimiento de la viabilidad de la bacteria que lo produzca y almacene.

El fin de este experimento fue la investigación de las condiciones de cultivo que pueden mejorar el rendimiento y viabilidad de *R. etli* a nivel de matraz, por lo que, lo que prosigue es el escalamiento a biorreactores de 1, 10 y hasta 1000 L, para la producción del inóculo con las nuevas condiciones propuestas con base en los resultados obtenidos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- ALARCÓN A., Ferrera-Cerrato R. "Biofertilizantes: importancia y utilización en la agricultura". **Agricultura técnica en México**. 2000 26 (002): 191-203.
- ALMARAZ J., Ferrera-Cerrato R., Alarcón A. "Fijación simbiótica de Nitrógeno en Leguminosas". Microbiología Agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta microorganismo. Editorial Trillas. México 2007. p.p. 225-238.
- ANAND R., Dogra B. "Physiological and biochemical characteristics of fast and slow growing *Rhizobium* sp. pigeonpea (*Cajanus cajan*)". **Journal of Applied Microbiology**. 1991 70 (3): 197-202.
- BLANCH, H. W., Clark, D. S. Biochemical Engineering. Marcel Dekker. U. S. A. 1997.
- CABALLERO-MELLADO J. "Uso de Biofertilizantes en la Agricultura Mexicana". **Claridades Agropecuarias**. 2009 Julio. p.p. 41-45.
- CABALLERO-MELLADO J. "Microbios que nutren a las plantas (Biofertilizantes)". **La Unión de Morelos**. 2010 septiembre. p.p. 34-35.
- CAMIRE Joseph, Hinton G., Hou J., Linton E., Merrigan S., Mortensen T., Nelson D., Porter R., Sims K., Sims M. "Efficient systems for monitoring polyhydroxybutyrate production in microorganisms". **iGEM** 2008.

- CHOLULA, Laura. "Estudio de la producción de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) en *Azospirillum brasilense* Sp7". México, 2005. Presentada en el Instituto Politécnico Nacional para obtener el grado de Maestro en ciencias en biotecnología genómica.
- CONTRERAS Charly., Iriarte J., Muñoz A. "Aislamiento y caracterización bioquímica, fisiológica y morfológica de géneros *Rhizobium sp.* y *Bradyrhizobium sp.* asociados a la leguminosa *Cajanus Cajan* en parcelas agrícolas del municipio de Sumpués, departamento de Sucre". Sincelejo, 2007. Presentada en la Universidad de Sucre para obtener el grado de Biólogo.
- ENCARNACIÓN S., Dunn M., Willms K. "Fermentative and Aerobic Metabolism in *Rhizobium etli*". **Journal of Bacteriology**. 1995 177 (11):3058-3066.
- FORD-DENISON R., Kiers T. "Why are most rhizobial beneficial to their plant hosts, rather than parasitic?" **Microbes and Infection**. 2004 6:1235-1239.
- FREIRE J., Sato M. "Conservación de cultivos de Rizobios". **Revista Latinoamericana de Microbiología**. 1999 41:35-41.
- GARTLAND A., Duran A., Rangel A., Tovar F., Dr. Sánchez F. "El uso de tres cepas diferentes de *Rhizobium* como fertilizante natural, comparado con un fertilizante químico". Instituto de Biotecnología, UNAM-Campus Morelos. 2011.
- GÓMEZ Flaviano. "Tópicos selectos de la producción agrícola actual. Uso de biofertilizantes en México". México, 2000.

Presentada en la Universidad Nacional Autónoma de México para obtener el grado de Ingeniero Agrícola.

- HERNÁNDEZ Aurelio. Microbiología. Editorial Paraninfo. España 1997.
- INGRAHAM J., Ingraham C. Introducción a la microbiología. Editorial Reverté. España 1998. p.p. 713-717.
- KARR, D.B., Waters, J. K., Suzuki, F., Emerich, D.W. "Enzymes of the Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and citric acid cycles of *Rhizobium japonicum* bacteroids." **Plant Physiology**. 1984 75:1158-1162.
- LLORET L., Martínez-Romero E. "Evolución y filogenia de *Rhizobium*". **Revista Latinoamericana de Microbiología**. 2005 Vol. 47: 43-60.
- MADIGAN M., Martinko J., Parker J. Brock Biología de los microorganismos. Décima Edición. Pearson Educación. España 2003.
- MADRIGAL-CARRILLO E., Rivas I., Garcidueñas C., Guerrero A., Morales J. "Efecto de aislados bacterianos de la familia de las rhizobacterias provenientes de alfalfa (*Medicago sativa*) en la mejora del crecimiento de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y nodulación en jitomate (*Solanum lycopersicon*)" **Investigación y ciencia**. 2008 43:10-15.
- MARTÍNEZ, L., Castañeda M., Molina D. "Producción bacteriana de polihidroxicanoatos (PHAs). **Temas de actualidad en**

**microbiología, Ambiente y Salud.** Publicación especial de la Benemérita Universidad de Puebla. 2002. p.p. 71-94.

- MATOS, G., Zúñiga, D. "Viabilidad de cepas de rizobios en inoculantes basados en soportes no estériles". **Ecología Aplicada.** 2003 2 001: 81-85.
- MORALES-IBARRA, M., "Agro XXI". **Milenio.** Enero 2007. p.p. 1-15.
- NÁPOLES, M., Costales, D., Corbera, J., Belkis, M., Cabrera, J., Reynaldo, I., Cartaya, O., Varela, M., Hernández, G., Bordallo, E., Hernández, R., Hormanzana, J., Rodríguez, A. "Influencia del medio de cultivo y los rizobios en la nodulación de soya y el frijol". **Biotecnología Aplicada.** 2004 21 (4): 260-262.
- NÁPOLES, M., Gómez, G., Costales D. "Factores de nodulación. Experiencia en Cuba". **Cultivos Tropicales.** 2008 29 (2): 71-80.
- NAVARRO, S., Navarro, G. "El nitrógeno en el suelo". Química Agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. España 2003. p.p. 183-199.
- NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en Placa. Norma Oficial Mexicana. México.
- ORTIGOZA, J., Ruiloba, S. Microbiología práctica. Segunda Edición. México 2004. p.p. 39-43, 113-120.
- PERALTA-DÍAZ, H., Lira-Saldívar, R., Medina-Torres, J. "Biofertilizantes, bacterias promotoras del crecimiento y

biofumigación". Agricultura Sustentable y Biofertilizantes. México 2007. p.p. 121-131.

- PRELL, J., Poole, P. "Metabolic changes of rhizobia in legume nodules". **Trends in Microbiology**. 2006 14 (4): 161-168.
- PRESCOTT, L., Harley, J., Klein, D. Microbiología. Quinta edición. Mc Graw Hill. España 2002. p.p. 727-730.
- QUINTO, C., Cárdenas, L. "Diálogo para ganar: interacción simbiótica entre una bacteria del suelo y el frijol" **Biotechnología**. 2007 14: 273-280.
- RAMÍREZ-GAMA, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. Manual de Prácticas de Microbiología General. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- RAMÍREZ, O., Molina, M. "Evaluación de parámetros cinéticos para la *Shacharomyces cerevisiae* utilizando agua de coco como sustrato". **Ingeniería**. 2005 15 (1,2): 91-102.
- RESENDIS-ANTONIO, O., Reed, J., Encarnación, S., Collado-Vides, J., Palsson, B. "Metabolic reconstruction and modeling of nitrogen fixation en *Rhizobium etli*". **PLOS Computational Biology**. 2007 3 (10): 1887-1895.
- RODRÍGUEZ, C., Sevillano, F., Subramaniam, P., "La fijación de nitrógeno atmosférico. Una biotecnología en la producción agraria". **Instituto De Recursos Naturales y Agrobiología**. España 1984. p.p. 8-60.

- ROJAS, D., Garrido, M., Bonilla, R. "Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium sp*". **Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria**. 2009 10 (1): 70-80.
- SCHLEGEL H.G. Microbiología General. Nueva edición. Ediciones Omega. España 1997. p.p. 213-216.
- STAINER R. Microbiología. Segunda edición. Editorial Reverté. España 1996. p.p. 195-209.
- STOWERS, M. "Carbon metabolism in *Rhizobium* species". **Annual Review of Microbiology**. 1985 39:89-108.
- TAVERNIER, Patricia., Portais, J., Nava, J., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J. "Exopolysaccharide and Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains." **Applied and Environmental Microbiology**. 1997 63: 21-26.
- TORTORA, G., Funke, B., Case, C. Introducción a la microbiología. Novena edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina 2007. p.p. 813-816.
- TRAINER, M., Charles, T. "The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes". **Microbiology Biotechnology** 2006 71:377-386.
- VANDERLEYDEN, J., Pieterel, R. "The *Rhizobium*-plant symbiosis". **Microbiology Reviews**. 1995 59: 124-142.

- VILLAR, J., Viñals, M., Álvarez, X., Dorta, M. "Tecnología de producción de inoculantes de *Azospirillum* y factibilidad económica de su aplicación agrícola en cultivos seleccionados". **Cultivos Microbianos**. 2005 26 (3): 23-26.
- WELLER, D.M., Thomashow, L. S. "Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere". Microbial Ecology of Rhizosphere Microorganisms. Germany 1994. p.p. 1-18
- ZVIETCOVICH, G., Nieves, G., Claveri, A., Luis Miguel C., Gomero, L., Velásquez, H. "Estudio de la asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa-hongo micorrítico para la producción de inoculante doble de uso agrícola en Arequipa". Manejo ecológico de suelos. Conceptos, experiencias y técnicas. Editorial gráfica Sttefany. Perú 1999. p.p. 57-66.

### **Fuentes digitales**

- PÉREZ-CAMARILLO, J., 2010. Biofábrica Siglo XXI.  
<http://www.biofabrica.com.mx/blog/?tag=rhizobium-etli> Última consulta: 09/11/12
- <http://www.sagarpa.gob.mx/> Última consulta: 08/11/11
- [http://www.fao.org/index\\_es.htm](http://www.fao.org/index_es.htm) Última consulta: 09/11/12