



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

BIOFERTILIZANTES: VIABILIDAD Y CARACTERÍSTICAS  
FISIOLÓGICAS DE *Azospirillum* EN DIFERENTES SOPORTES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JAVIER ALFONSO BONIFAZ GUTIÉRREZ



México, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2005

M 351973



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** M. en C. Rosa María Ramírez Gama

**VOCAL** M. en C. María Guadalupe Tsuzuki Reyes

**SECRETARIO** Q. F. B. Adriana Guadalupe Mejía Chávez

**1ER SUPLENTE** Q. F. B. Eduardo Bonilla Espinosa

**2DO SUPLENTE** Q. F. B. Norma Angélica Castellanos Chávez

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EXPERIMENTAL,  
EDIFICIO A, FACULTAD DE QUÍMICA UNAM**

**ASESOR:**

  
**M. en C. ROSA MARÍA RAMÍREZ GAMA**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

  
**M. en C. MARÍA DEL CARMEN URZÚA HERNÁNDEZ**

**SUSTENTANTE:**

  
**JAVIER ALFONSO BONIFAZ GUTIÉRREZ**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser una institución completa y permitir formar profesionistas.

A la maestra Rosa María Ramírez Gama por su confianza y gran apoyo para la realización de este trabajo. Muchas gracias.

A la maestra María del Carmen Urzúa Hernández por su tiempo y dedicación para concluir este proyecto. Muchas gracias.

A la maestra Guadalupe Tsuzuki Reyes y la maestra Adriana Mejía por su apoyo en la revisión de este trabajo.

A Israel y Luis quienes me apoyaron en la parte experimental.

A todo el equipo del Laboratorio de Microbiología Experimental, por ser un buen grupo y hacer agradable cada día de trabajo en el laboratorio.

A mis padres quienes me han demostrado que trabajando duro y con dedicación se pueden lograr muchas cosas y muchas gracias porque nunca me ha faltado nada.

A mi hermana Lidiet, gracias por ser como eres. Te quiero mucho.

A mis hermanos de la noche Iván y Zian por los buenos momentos que hemos pasado y ser unos grandes amigos.

A Mina y Carlos por los Mundos sin Corazón.

A los profesores de la Universidad por tener preocupación de formar buenos profesionistas.

Y a todos los compañeros con quienes conviví durante la carrera.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	2
HIPÓTESIS	4
OBJETIVOS	4
1. ANTECEDENTES	5
1.1 INOCULANTES BIOLÓGICOS	5
1.2 BIOFERTILIZANTES	5
1.3 BIOFERTILIZACIÓN CON <i>Azospirillum</i>	21
1.4 EL GÉNERO <i>Azospirillum</i>	24
2. METODOLOGÍA	34
2.1 ACTIVACIÓN Y VERIFICACIÓN DE PUREZA DE LA CEPA	35
2.2 ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO	35
2.3 PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES	37
2.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS BIOFERTILIZANTES	40
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1 VERIFICACIÓN DE PUREZA DE LA CEPA	45
3.2 ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO	46
3.3 PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES	47
3.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS BIOFERTILIZANTES	48
CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXOS	64

## INTRODUCCIÓN

Los biofertilizantes son preparados microbianos mezclados con un soporte. Estos se aplican con el propósito de mejorar la nutrición vegetal. La inoculación de semillas y suelos con microorganismos benéficos (biofertilización) es una práctica bien conocida que ofrece la posibilidad de sustituir o al menos disminuir el uso de agroquímicos así como la contaminación generada por los mismos.

Algunos ejemplos de bacterias que favorecen la nutrición vegetal corresponden a *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus* y *Pseudomonas*; estas actúan a través de uno o varios de los siguientes mecanismos: a) Fijación de nitrógeno atmosférico, transformándolo a amoníaco que es una de las formas útiles para las plantas. b) Solubilización de minerales, lo que permite aumentar la disponibilidad de los nutrimentos. c) Producción de sideróforos, los cuales acomplejan el hierro oxidado, lo reducen y lo hacen disponible para los vegetales. d) Producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas y citocininas), a través de las cuales estimulan el desarrollo de las raíces favoreciendo una mayor absorción de agua y nutrimentos (Glick y colab., 2001).

Los biofertilizantes se han elaborado para proveer una fuente confiable de microorganismos que favorezcan el desarrollo de las plantas. Para ello es esencial el diseño de formulaciones que contengan cepas seleccionadas mezcladas con un sustrato que asegure la sobrevivencia de un número elevado de las mismas (Fesenko y colab. 1995; Yardin y colab. 2000; Ramírez-Gama, 2002).

Los biofertilizantes se comercializan en tres presentaciones: Líquida, en polvo y granular; para estos últimos el soporte más comúnmente empleado corresponde a la turba.

Una presentación más reciente corresponde a las perlas de alginato, de la cual se describen numerosas ventajas que derivan del uso del polímero, el que protege a las bacterias del estrés ambiental de manera más eficiente y permite la liberación gradual de las mismas en el suelo (Bashan y Carrillo, 1996). El mayor avance sobre la producción y aplicación de los biofertilizantes se ha logrado con aquellos a base de *Rhizobium* que son específicos para leguminosas, en donde los métodos y estándares de control de calidad están bien establecidos. En tanto que la distribución de productos comerciales con otras

bacterias promotoras de desarrollo vegetal es más restringida, lo que se debe a: a) Que los resultados obtenidos con éstas es aún muy variable; b) La baja calidad de los inoculantes y c) Que los organismos inoculados sobreviven pobremente en el medio ambiente (Yardin y colab., 2000).

La clave para la elaboración de los inoculantes, radica en un sistema efectivo de control de calidad (Thompson, 1980, citado por Ramírez-Gama, 2002). Este implica un proceso de inspección continuo que se aplica a la materia prima, durante las diferentes etapas de producción, en el producto terminado, antes de su venta o distribución y cercano a la fecha de caducidad.

En este sentido y considerando: i) las ventajas reportadas para los biofertilizantes a base de alginato; ii) que en el Laboratorio de Microbiología Experimental se cuenta con la cepa de *Azospirillum brasilense* VS9 previamente seleccionada; y iii) que no existen estándares de control de calidad para este tipo de biofertilizantes, en este trabajo se compara la calidad de cuatro biofertilizantes, tres producidos con el sistema tradicional (uno líquido, dos sólidos en polvo y granular a base de turba) y uno, todavía en estudio, a base de perlas de alginato. Además se expone un panorama general de las materias primas, condiciones de producción y métodos de control que se aplican para la elaboración de biofertilizantes, con especial énfasis en aquellos que contienen *Azospirillum*, así como las características de esta bacteria.

## HIPÓTESIS

Los diferentes soportes empleados en la producción de biofertilizantes, influyen en la viabilidad y características fisiológicas de los microorganismos y consecuentemente en la calidad de este tipo de productos.

## OBJETIVO GENERAL

Comparar la calidad de cuatro presentaciones de biofertilizantes producidos con la cepa VS9 de *Azospirillum brasilense* cuya actividad promotora del desarrollo vegetal ha sido plenamente comprobada.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la concentración del inóculo a emplear en la producción de cuatro tipos de biofertilizantes.
2. Comparar la viabilidad de las bacterias en los cuatro productos después de su almacenamiento.
3. Confirmar que *Azospirillum* conserva las características fisiológicas de interés agronómico después de seis meses de almacenamiento.

## HIPÓTESIS

Los diferentes soportes empleados en la producción de biofertilizantes, influyen en la viabilidad y características fisiológicas de los microorganismos y consecuentemente en la calidad de este tipo de productos.

## OBJETIVO GENERAL

Comparar la calidad de cuatro presentaciones de biofertilizantes producidos con la cepa VS9 de *Azospirillum brasilense* cuya actividad promotora del desarrollo vegetal ha sido plenamente comprobada.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la concentración del inóculo a emplear en la producción de cuatro tipos de biofertilizantes.
2. Comparar la viabilidad de las bacterias en los cuatro productos después de su almacenamiento.
3. Confirmar que *Azospirillum* conserva las características fisiológicas de interés agronómico después de seis meses de almacenamiento.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 INOCULANTES BIOLÓGICOS.**

La inoculación de semillas y suelos con microorganismos benéficos es una práctica que ofrece la posibilidad de sustituir o al menos disminuir el uso de agroquímicos, así como la contaminación generada por los mismos, lo que conduce a la sostenibilidad del ambiente. Los inoculantes biológicos se producen y aplican con fines específicos para mejorar la nutrición vegetal (biofertilización), la eliminación o disminución de organismos patógenos y plagas (control biológico) y la eliminación o disminución de xenobióticos (biorremediación) (Bloenberg y Lutenberg, 2001; Vassileva y colab., 1999).

### **1.2 BIOFERTILIZANTES**

#### **1.2.1 Definición e importancia**

Se denomina biofertilizante a la mezcla de bacterias u hongos edáficos con un soporte inerte que al ser aplicado al suelo incrementa la productividad agrícola. Dicho efecto se debe a que los microorganismos utilizados tienen la capacidad de realizar uno o más de los siguientes mecanismos de acción:

- Fijación de nitrógeno atmosférico. Su reducción a amoníaco le permite ser utilizado por las mismas bacterias y por los vegetales.
- Solubilización de minerales. Se traduce en un aumento de nutrientes disponibles.
- Producción de sideróforos. Compuestos orgánicos quelantes que acomplejan al hierro oxidado, el cual es reducido a la forma en que lo utilizan las bacterias y las plantas.
- Producción de fitohormonas. Algunas de estas estimulan el crecimiento de las raíces favoreciendo una mayor absorción de agua y nutrientes.
- Mineralización de materia orgánica. Este mecanismo asegura la liberación de compuestos que son fácilmente asimilados por las plantas. (Glick, 2001)

Por lo que la biofertilización o enriquecimiento con este tipo de bacterias, que se asocian directa o indirectamente al sistema radical de las plantas, favorecerá su nutrición, desarrollo y producción.

### **1.2.2 Tipos de biofertilizantes**

El tipo de biofertilizantes se considera en función de tres aspectos: tipo de microorganismos, presentación comercial y contenido de una o varias cepas.

#### **1.2.2.1 Tipo de microorganismos.**

Como ejemplos de bacterias que se utilizan para la producción de biofertilizantes se tienen a los siguientes géneros:

*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia* y cianobacterias. Los dos primeros tienen la propiedad de colonizar las raíces de leguminosas donde forman nódulos y bajo esta asociación fijan nitrógeno. *Frankia* es un actinomiceto que forma nódulos fijadores de nitrógeno en más de 161 especies de plantas pertenecientes a siete familias diferentes con excepción de leguminosas. En China, la India y Canadá es muy utilizado este actinomiceto y se han implementado sistemas de plantación de especies de árboles de importancia agrícola que son susceptibles a la nodulación (Dart, 1993, citado por Lorence, 1999).

*Anabaena azollae* es una cianobacteria que fija nitrógeno en asociación con *Azolla*. Esta simbiosis se aprovecha en plantaciones de arroz en varios países de Asia, China y Vietnam donde se utiliza desde hace varios siglos. A pesar del potencial de *Anabaena* como biofertilizante, su uso está limitado por diversos factores como son la falta de abastecimiento de agua y fósforo que son insumos básicos para el desarrollo de los cultivos y de la fijación de N<sub>2</sub> respectivamente. Otras limitantes son la susceptibilidad a la temperatura, plagas y patógenos de las cepas de *Anabaena*. Así mismo no se cuenta con tecnologías de producción, almacenamiento y distribución de material de buena calidad (Kulasooriya, 1991; citado por Lorence, 1999).

Los ejemplos anteriores corresponden a bacterias simbióticas obligadas. En tanto que existen otras bacterias que pueden asociarse o vivir en forma libre, estas son genéricamente conocidas como PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) como ejemplos se tienen a:

*Azotobacter* y *Azospirillum* tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y producir reguladores del crecimiento vegetal. En Cuba se utilizan más los biofertilizantes basados en cepas de *Azotobacter* que se aplican en hortalizas, yuca, maíz, arroz y trigo (Lorence, 1999).

*Thiobacillus thiooxidans*, produce ácido sulfúrico, el cual solubiliza algunos minerales haciéndolos disponibles para las plantas. El contacto de este microorganismo con roca fosfórica y una pequeña cantidad de azufre elemental, produce un mejor crecimiento de los cultivos y pastizales comparándolos con los resultados obtenidos solo con roca fosfórica (Dart, 1993, citado por Lorence, 1999).

Los solubilizadores de fósforo como *Bacillus megatherium*, se utilizan en cultivos de jitomate, trigo y avena. Este producto se utiliza en Rusia y la India y han reportado buenos rendimientos en campo. En Cuba también se han desarrollado productos que consisten en mezclas de diferentes solubilizadores de fósforo, entre estos encontramos cepas nativas de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Streptomyces*. (Mulongoy y colab. 1992)

#### 1.2.2.2 Presentación comercial

Los biofertilizantes son comercializados en tres presentaciones:

- Líquidos. Son cultivos que en ocasiones se mezclan con aceite mineral ó compuestos orgánicos. Se aplican sobre las semillas o directamente en el suelo.
- Polvo. Es la forma más difundida y están constituidos por partículas de un tamaño que fluctúa entre 0.075 y 0.25µm. Se aplican sobre las semillas
- Granulares. La producción de éstos es más reciente, el tamaño de partícula se encuentra entre 0.35 a 1.18mm. Se aplican directamente al suelo.

### **1.2.2.3 Biofertilizantes unicepa y multicepa.**

La utilización de biofertilizantes unicepa y multicepa es muy discutida, y la tendencia general es eludir los biofertilizantes multicepa, debido a que se han detectado efectos antagónicos o de competencia en el soporte, lo que origina el predominio de alguna de ellas, la que en ocasiones es la menos efectiva (Stephens y Rask, 2000).

### **1.2.3 Producción de biofertilizantes**

Los biofertilizantes se han diseñado para proporcionar una fuente confiable de microorganismos que favorezcan el desarrollo de las plantas. Para ello es esencial considerar la calidad y características de: a) La materia prima a emplear, b) las condiciones del proceso de propagación, c) Del producto terminado, lo que en conjunto determina la obtención de un biofertilizante satisfactorio (Fages, 1992; Bashan y Holguin, 1997).

#### **1.2.3.1 Materia prima.**

Esta involucra a los microorganismos, el soporte y los componentes para el medio de cultivo de propagación.

- Microorganismos. El aseguramiento de la calidad del biofertilizante depende en gran medida del uso de cepas seleccionadas que hayan demostrado poseer características fisiológicas y ecológicas superiores a otras de su misma especie (Glick y colab., 1995; Ramírez Gama, 2002). Tal es el caso de la cepa VS9 de *Azospirillum brasilense* empleada en este trabajo, misma que ha demostrado ser fijadora de nitrógeno (Flores, 1985), productora de fitohormonas tales como el ácido indol acético y ácido giberélico (Hernández, 1997) y la que en experimentos de invernadero y de campo ha inducido incrementos en la producción de sorgo y de jitomate (Valtierra 1992; Esquivel-Cote, 1997; Urzúa, 1997; Ramírez-Gama y colab. 2001; Urzúa, 2001; Esquivel, 2002)

- Medio de cultivo de propagación. Los componentes del medio de cultivo varían con el tipo de bacterias a emplear, las cuales difieren en sus necesidades. Existen numerosas formulaciones para los medios de producción con las que se logran rendimientos celulares de  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> o mayores que son las recomendadas para estos fines (Córdova, 1985).
- Soporte. Constituye el vehículo de transporte de microorganismos vivos de la industria al campo, sin embargo no existe una formulación general disponible para liberar microorganismos al suelo (Trevors y colab., 1992).

El soporte constituye la mayor proporción (volumen o peso) de los inoculantes agrícolas y es una parte crítica en la formulación del producto. Este debe ser capaz de soportar el desarrollo y sobrevivencia de las bacterias de interés por un tiempo aceptable, con el fin de que durante su aplicación se asegure la liberación de un número elevado de bacterias viables y activas (Smith, 1992; Yardin y colab., 2000).

De acuerdo con Burton (1980), Smith (1992), Bashan y Carrillo (1996) y Stephens y Rask (2000) para lograr estos objetivos el soporte debe:

- Tener una alta capacidad de retención de humedad y características físico-químicas uniformes;
- Ser inocuo para las cepas bacterianas y para el ambiente
- Tener fácil disponibilidad y bajo costo;
- Poseer pH neutro, o fácil de ajustar;
- Contener un porcentaje de materia orgánica superior al 60%,
- Contener un porcentaje de sales menor al 1%,
- Ser fácil de: esterilizar, pulverizar y manipular durante el mezclado de productos en la fábrica, así como para su distribución y aplicación,
- Ser biodegradable y consistentes en su calidad,

- Tener buena adhesión a la semilla, que permita la adsorción de nutrientes y la liberación rápida de las bacterias en el suelo

Es posible que ningún soporte presente todas estas características, sin embargo es deseable que cumpla con la mayoría de ellas. La turba es un soporte que reúne la mayoría de las características mencionadas, y por esta razón es ampliamente utilizada y distribuida. Se ha demostrado que las bacterias al ser inoculadas en la turba permanecen metabólicamente activas, y si el soporte contiene los nutrientes necesarios y se conserva a temperatura adecuada, la multiplicación celular puede continuar durante el periodo de almacenamiento (Bashan y Carrillo, 1996).

En algunos países la disponibilidad de la turba es restringida, razón por la cual se han investigado nuevas alternativas con otros materiales naturales como son: suelos altamente orgánicos, suelos minerales enriquecidos con harina de alfalfa, paja molida, levadura y sacarosa, residuos crudos o composteados de diversos vegetales (cáscaras de café, arroz, mazorcas de maíz o bagazo de caña de azúcar, lirio acuático), algunas variedades de carbón mineral como antracita y lignita suplementados con compuestos orgánicos, roca fosfórica, aluminosilicatos como vermiculita, bentonita y perlita; todos éstos han demostrado soportar satisfactoriamente la sobrevivencia de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/g por periodos de 3 a 6 meses (Chao y Alexander, 1984; Crawford y Berryhill, 1983; Daza y colab., 2000; Falik y Okon, 1996; Ramírez, 1982; Ronchi y colab., 1997; Sparrow y Ham, 1983; Strijdom y Deschodt, 1975).

### **1.2.3.2 Características y condiciones del proceso de producción**

La manufactura del biofertilizante comprende nueve etapas:

- **Preparación del soporte.** Las materias primas empleadas deben ser modificadas antes de utilizarse como soportes, con el fin de ajustar las características necesarias para favorecer la propagación y sobrevivencia de las bacterias. En el caso de la turba ésta debe ser secada, molida, neutralizada y esterilizada. El secado favorece el proceso de molienda, reduce la microbiota y permite la incorporación adecuada de caldo de cultivo.

Se recomiendan temperaturas no mayores de 100°C, para reducir la humedad hasta aproximadamente un 9% (Córdova, 1985; Ramírez-Gama, 2002). Durante la molienda se ajusta el tamaño de partículas que se desea en el soporte, el polvo fino se pasa a través de mallas de 200-300, el polvo mediano se pasa a través de mallas 100-200 y para el granular se emplean mallas de 16-50. Generalmente la turba presenta un pH ácido, el cual se ajusta con carbonato de calcio a valores de 6.3 a 7.3 (Ramírez-Gama, 2002).

La formulación de los soportes líquidos varía de acuerdo al tipo de bacteria. El uso de éstos se ha promovido debido a que son de fácil manipulación y su eficacia es similar a los productos basados en turba. Su vida de anaquel es variable, muchos resultados indican que es limitada, pero en Uruguay han reportado que éstos mantienen su estabilidad hasta por dos años. (Hynes y colab., 1995). Su almacenamiento requiere de baja temperatura lo que incrementa el costo y limita su uso en países en desarrollo.

En los últimos 20 años se han evaluado distintas formulaciones basadas en polímeros, en los que se inmovilizan bacterias vivas y se suplementan con nutrientes. Bashan y Carrillo (1996) describieron al alginato como el polímero más útil para la producción de biofertilizantes, ellos señalan ventajas tales como: consistencia en calidad, facilidad de producción y manipulación durante el proceso de producción, pueden ser almacenados secos y a temperatura ambiente por periodos prolongados, requieren de poco espacio para su almacenaje, el encapsulamiento protege a las células del estrés ambiental y permiten su liberación gradual en el medio ambiente, también señalan algunas limitaciones de éstos en cuanto a los costos, debido especialmente a las materias primas empleadas y a que requieren de un mayor manejo biotecnológico.

Kremer y Peterson, 1982; Bashan, 1986; Bashan y Carrillo, 1996; Stephens y Rask, 2000 describen la producción de micro y macrocápsulas de alginato en las que reportan la inmovilización de un número elevado de bacterias ( $10^8$  a  $10^9$  UFC/g) y la sobrevivencia de éstas por 12 años.

**CUADRO 1.** Comparación de preparaciones a base de alginato y turba.

<b>Alginato</b>	<b>Turba</b>
No existe tecnología industrial económica	Procesos industriales exitosos
Químicamente y físicamente uniforme	No uniforme (materia orgánica compleja)
Biodegradable en suelo	Biodegradable en suelo
Fácil manipulación para el agricultor	Fácil manipulación para el agricultor
Complejidad para su manufactura	Producido fácilmente en la industria
No producen contaminación ambiental	No producen contaminación ambiental
Mayor consistencia en colonización de raíz con PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria)	Imprevisible colonización de raíz con algunas PGPB
Control de calidad técnicamente sencillo	Dificultad para mantener la misma calidad entre lotes
Liberación controlada de bacterias y puede ser manipulada en la formulación	La liberación no puede ser controlada
Conservación por tiempo prolongado a temperatura ambiente	Limitada conservación a 5°C por 1 año en turba no estéril y hasta 2 años en turba estéril
Almacenamiento en pequeños espacios	Grandes espacios para su almacenamiento
No puede contaminarse después de su producción	Fácilmente contaminable en condiciones de almacenaje inapropiadas y alto contenido de contaminantes en preparaciones no estériles
Resistente a los cambios de humedad	Susceptible a cambios de humedad
El polímero no ejerce efecto alguno sobre el crecimiento de la plantas	Algunas turbas inhiben el crecimiento de las plantas

(Bashan, 1998a)

Los soportes se pueden o no esterilizar pero resulta más efectivo el uso de soportes estériles, ya que en estos se alcanzan poblaciones más elevadas de las bacterias de interés, gracias a que al eliminar a los contaminantes se evita la competencia o el efecto antagónico causado por los mismos. Por otro lado, el producto al carecer de contaminantes puede tener una vida de anaquel más larga (Stephens y Rask, 2000).

La esterilización se puede realizar de diferentes formas, por calor húmedo (autoclave) o mediante radiaciones (Williams, 1984). La esterilización en autoclave implica tiempo y electricidad lo que aumenta los costos de producción, en tanto que la radiación requiere de equipos especializados, lo cual incrementa aún más el costo. Por otra parte se ha demostrado que las temperaturas elevadas y las radiaciones, generan la formación de sustancias tóxicas que comprometen la calidad del inoculante. En los últimos años se ha propuesto el uso de la radiación electrónica, que resulta más efectiva que las otras dos en cuanto al tiempo de exposición ya que ésta requiere de segundos mientras que las otras necesitan más de una hora para su esterilización (Ramírez-Gama, 2002).

**CUADRO 2.** Comparación entre inoculantes estériles y no estériles a base de turba

PARÁMETROS	INOCULANTE	
	ESTÉRIL	NO ESTÉRIL
Población de bacterias benéficas	Alto	Variable
Sobrevivencia	Alto pero depende del tipo de soporte	Relativamente bajo
Adición de nutrientes al soporte para incrementar la población final	Posible, sin alterar la calidad final del inoculante	No recomendable muchos contaminantes pueden desarrollarse con mayor rapidez que la bacteria de interés
Tipo de soporte elegido	Limitado. Muchos materiales no pueden ser esterilizados debido a que cambian su composición química y física después de este proceso	Casi ilimitado
Necesidad de mano de obra	Calificada y costosa	Menos calificada y por lo mismo menos costosa
Equipo de esterilización	Autoclaves costoso en adquisición y operación Esterilización por radiación no siempre disponible	No utilizado
Espacio de producción estéril	Amplio y costoso	No requerido
Monitoreo de contaminación	Esencial para el control de calidad del producto	Esencial para el control de calidad del producto
Costo total de producción	Alto	Menos costoso que los productos estériles

(Bashan, 1998a)

- **Preparación del medio de cultivo.** Para el caso específico de *Azospirillum*, Falik y Okon (1996) recomiendan como fuentes de carbono al malato y succinato con los que alcanzaron poblaciones de  $10^{10}$  UFC/mL. Por otra parte con caldo nutritivo

se reportan poblaciones de  $10^9$  UFC/mL. Este medio es también empleado para la propagación de bacterias solubilizadoras de fósforo y para *Pseudomonas*. (Ramos y Callao, 1967)

- **Activación de la cepa (para obtención de cultivo madre).** El medio de cultivo empleado para este fin varía con el método con el que se conservan las cepas. En el caso de *Azospirillum*, para las cepas liofilizadas se recomienda hidratar y adicionar el liofilizado en caldo nutritivo o en un medio líquido a base de sales y malato con cloruro de amonio. Cuando las cepas se han conservado en el medio Nfb ss (Malato sales libre de nitrógeno semisólido) se resiembra en el mismo medio, lo que además de la activación permite confirmar que la cepa conserva su característica de fijar nitrógeno.
- **Propagación masiva.** Esta etapa involucra dos fases: **adaptación u obtención del cultivo semilla**, el que se utiliza como inóculo de volúmenes mayores del medio de cultivo que servirá para la **obtención del cultivo concentrado** con el que se impregna el soporte. Las condiciones de incubación varían con el tipo de bacteria empleada.
- **Impregnación del soporte.** Este se realiza mezclando el soporte previamente acondicionado con el cultivo bacteriano. En los biofertilizantes líquidos se ajusta la población y se mezcla con el medio de cultivo estéril. En tanto que en los soportes sólidos, el cultivo se mezcla ya sea en charolas y agitación o por inyección del cultivo. En este caso la impregnación debe proporcionar una humedad del 50 al 60% con base al peso seco. Los soportes no estériles se ajustan del 35 al 40% de humedad (Thompson, 1980, citado por Ramírez-Gama, 2002).
- **Maduración.** El tiempo de maduración varía con la bacteria y el soporte utilizado. En el caso de *Azospirillum* se incuba el biofertilizante líquido o sólido durante 48 horas, después de las cuales se alcanzan poblaciones de  $10^{10}$  UFC/mL ó g. (Tsuzuki y Urzúa, 2003 datos no reportados).
- **Empaque.** Es muy común el uso de bolsas de polietileno con espesor de 0.020 – 0.025µm, éste permite un intercambio gaseoso suficiente y mantiene el nivel de humedad estable (Córdova, 1985).

El producto terminado debe incluir etiquetas en las que se registre el número de lote de producción, número de bacterias por gramo de inoculante, género y especie de la bacteria, contenido neto, condiciones de almacenamiento, forma de distribución y aplicación, fecha de caducidad, nombre y dirección del productor (Thompson, 1980, citado por Ramírez-Gama, 2002).

- **Almacenamiento.** Después del proceso de empaque los frascos o bolsas se conservan en un lugar oscuro a 4-5° C o bien a temperatura ambiente. En este sentido Roughley y Pulsford (1982) indican que a mayor temperatura de almacenamiento menor tiempo de caducidad, debido a que el descenso de la población está relacionado con la temperatura (Cano Zavala, 1988).
- **Control de calidad.** Implica un proceso de inspección continuo que se aplica en la materia prima, durante las diferentes etapas de producción y en producto terminado, antes de su venta o distribución y cercano a la fecha de caducidad. Los métodos para evaluar la calidad en el proceso de producción y productos basados en *Rhizobium* se llevan a cabo mediante pruebas cualitativas y cuantitativas. Las primeras incluyen, determinación de pH, preparaciones en fresco y frotos con tinción de Gram, inoculación en medios de cultivo diferenciales y técnicas inmunológicas. Las pruebas cuantitativas incluyen la determinación del número total de bacterias mediante la cámara de Petroff-Hauser y la cuenta de bacterias viables por el método de dilución y vertido en placa ó por número más probable (NMP) de plantas colonizadas (Ramírez-Gama, 2002)

La tinción de Gram y las preparaciones en fresco son métodos rápidos que permiten verificar la pureza, reacción al gram, además de confirmar la morfología y movilidad de las células.

Las características coloniales de las bacterias en los medios de cultivo diferenciales permiten detectar de forma rápida la ausencia o presencia de contaminantes; por ejemplo, en Malato sales (adicionado de agar, extracto de levadura, cloruro de amonio y azul de bromotimol), agar extracto de papa (BMS), agar rojo congo. En este último las cepas de *Azospirillum brasilense* y *A. lipoferum* originan colonias rojo escarlata que permite diferenciarlas de otras bacterias.

Las técnicas inmunológicas, como aglutinación en tubo, de precipitación capilar, inmunolectroforesis, inmunofluorescencia e inmunoensayos enzimáticos (ELISA), permiten la identificación específica de las bacterias de interés.

La cuenta de bacterias viables por el método de dilución y vertido en placa. Esta prueba involucra como lo dice su nombre una serie de diluciones y goteo, extensión o vertido en la placa de las diluciones apropiadas y la utilización de los medios de cultivo apropiados.

Para *Azospirillum* se recomienda la Cuenta de bacterias viables por NMP (Número Más Probable). Este se aplica para la cuantificación de *Azospirillum*, e involucra la preparación de diluciones y la adición de alícuotas de las diluciones adecuadas en tubos que contienen el medio de cultivo Malato-sales libre de nitrógeno en estado semisólido. Con este se determina el NMP de bacterias en los cultivos y en los biofertilizantes.

Método de dilución e infección en planta o NMP. En este se colocan alícuotas de diluciones seriadas sobre la superficie de semillas desinfectadas del hospedante específico, éstas son cultivadas en sistemas hidropónicos que se mantienen en invernadero de 4-8 semanas.

La calidad de las cepas seleccionadas depende de la pureza de los cultivos y que éstos conserven las características de interés agrícola por las que fueron elegidas. Los cultivos deben ser viables, estar adecuadamente identificados y de una historia conocida. Las pruebas de control de calidad que se recomiendan antes de iniciar un proceso de producción son la tipificación serológica y confirmación de su efecto por inoculación en plantas lo que debe estar acompañado de controles negativos no inoculados.

### 1.2.3.3 Calidad del producto terminado

La calidad del producto terminado, se efectúa realizando pruebas como son la cuenta por dilución y vertido en placa, colonización en raíz de plantas, ensayos de efectividad, contenido de humedad, ausencia de contaminantes y conservación de características de interés agrícola (Ramírez-Gama, 2002).

Respecto a la población de *Azospirillum* que debe estar presente en el biofertilizante se ha encontrado que en muchos casos la concentración debe oscilar entre  $10^6$  - $10^9$  UFC por gramo o mililitro de inoculante, según se trate del producto sólido o líquido respectivamente (Okon y Labandera, 1994; Bashan 1998).

En el siguiente cuadro se indican las variables que se consideran en el control de calidad de biofertilizantes a base diferentes microorganismos.

**Cuadro 3. Valores Estándar Para Biofertilizantes<sup>1</sup>**

Parámetros	<i>Rhizobium</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Azospirillum</i>	PSM <sup>*</sup>
Cuenta de bacterias viables después de 15 días de la fabricación	$>1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^7$	$>1 \times 10^8$	$>1 \times 10^8$
Contaminación	Neg	Neg	Neg	Neg
Cuenta de bacterias viables antes de la fecha de caducidad	$> 1 \times 10^7$	$> 1 \times 10^6$	$> 1 \times 10^7$	$> 1 \times 10^7$
PH	6.0-7.5	6.0-7.5	6.0-7.5	6.0-7.5
Eficiencia de la cepa	Capaz de producir buena nodulación. El peso seco de las plantas inoculadas debe ser mayor a 50% comparado con el control	Capaz de fijar 10mg de N/g de sacarosa consumida	Capaz de fijar 10mg de N/g de malato usado	Capaz de solubilizar P en una zona $>10$ mm

<sup>\*</sup> Microorganismos solubilizadores de fósforo (Phosphate Solubilizing Microorganism)

<sup>1</sup> (Regional Biofertilizer Development Center, 2005)

#### **1.2.4 Calidad de la colección de cultivos.**

Debido a que la calidad de los biofertilizantes depende en gran medida de la utilización de cepas seleccionadas y a que el proceso de selección es largo y costoso, al implicar una serie de determinaciones que se efectúan a nivel de laboratorio, invernadero y campo, resulta fundamental tener especial cuidado en su conservación (Keyser, 1987).

Aún cuando existen diversos métodos para la conservación de cepas, el más recomendado corresponde a la liofilización, debido a que al compararlo con otros métodos, permite la conservación durante períodos más largos por lo que minimiza la necesidad de resiembra, los riesgos de contaminación y variación genética (Gibson y colab. 1990).

Un buen principio para la conservación de cepas seleccionadas es que una vez que se ha confirmado la pureza en un subcultivo fresco, se preparen a partir de éste numerosos cultivos y se liofilicen, lo cual disminuye las posibilidades de contaminación y de acumular cambios genéticos desconocidos (Lupwayi y colab., 2000).

Una colección de cepas de interés agrícola de calidad debe poseer la siguiente información de cada cepa:

- Número o clave de identificación
- Localización del sitio de aislamiento
- El hospedero y tipo de suelo del cual se aisló
- Datos de conservación
- Historia completa de la cepa (Datos del trabajo realizado por el donador o por el laboratorio que la recibió sobre su caracterización, así como de los hospederos en los que ha sido probada)
- Información de la repurificación o inoculación y reaislamiento de nódulos ó raíces.

### 1.2.5 Métodos de aplicación.

La aplicación de biofertilizantes se puede realizar por los siguientes métodos: recubrimiento de las semillas y directamente en el suelo (Gault y colab., 1982; Hedge y Brahma Prakash, 1992)

#### 1.2.5.1 La biofertilización en semillas

La aplicación de biofertilizantes en semilla puede realizarse en los siguientes momentos:

- Meses antes de la siembra. Este proceso es realizado por la compañía que comercializa las semillas.
- En el momento e *In situ*, se puede efectuar:
  - Justo antes de la siembra
  - Después de la germinación

La biofertilización *in situ* es la más utilizada, debido a que es de bajo costo, no obstante presenta algunas desventajas como son: a) se requiere de trabajo adicional antes de la siembra o después de la germinación de las semillas, b) posibles daños en las semillas durante el mezclado con el biofertilizante lo que se traduce en un menor porcentaje de germinación, c) efecto de la radiación UV y condiciones adversas del suelo (pH, sequía, presencia de pesticidas) que ocasionan la disminución de la población de bacterias introducidas. Por otra parte la utilización de semillas previamente tratadas con pesticidas también ocasiona la disminución de la población bacteriana inoculada (Fages, 1992).

#### 1.2.5.2 Biofertilización en suelo.

Esta práctica es de aplicación más fácil para el agricultor, pero en ocasiones no es efectiva y es más costosa debido a que se requiere mayor cantidad de biofertilizante en orden de toneladas por hectárea (Bashan, 1998a)

En el siguiente cuadro se describen los diferentes métodos de biofertilización, así como las ventajas y desventajas que presentan los mismos.

**Cuadro 4. Métodos de aplicación de biofertilizantes (Adaptado de Bashan, 1998a)**

Método	Modalidad	Ventajas	Desventajas
1. Recubrimiento de semillas		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Con una apropiada aplicación se asegura que cada semilla contenga la bacteria</li> <li>- Utilización de cantidades reducidas</li> <li>- La aplicación es fácil para el agricultor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La cantidad de bacterias que se unen a la superficie de las semillas puede ser limitada, especialmente en semillas pequeñas</li> <li>- Las bacterias introducidas pueden entrar en contacto directo con pesticidas aplicadas a las semillas</li> <li>- Las bacterias introducidas no tienen protección contra condiciones de estrés (altas temperaturas, sequía)</li> </ul>
	1.1 Las semillas se mezclan en seco con biofertilizante en polvo.	- Por su fácil aplicación es la más popular para el agricultor	- La adhesión a semillas es pobre y se utiliza más biofertilizantes para la mezcla y aplicación
	1.2 Las semillas se humedecen con agua ó con algún adherente (goma arábica) y posteriormente son mezcladas con el biofertilizante en polvo.		- Al secarse se desprende de las semillas una cantidad considerable de biofertilizante
	1.3 Las semillas se cubren con un adherente (goma arábica) y se mezclan con el biofertilizante en polvo y posteriormente se agrega carbonato de calcio.	- Se neutraliza la acidez del suelo alrededor de la semilla	- Consume más tiempo y es un poco más costoso
	1.4 El biofertilizante se mezcla con agua y posteriormente se agrega a las semillas.	- Después de secarse el biofertilizante se mantiene adherido a las semillas	
	1.5 Semilla preinoculada	- El biofertilizante contiene alta población de bacterias y presenta buena sobrevivencia	- El proceso se realiza por la compañía que comercializa la semilla lo que incrementa los costos
	1.6 Recubrimiento de semillas con formulaciones líquidas	- Hay buen recubrimiento y adhesión a la semilla	
2. Aplicación en suelo	2.1 El biofertilizante se suspende en agua y se dispersa en los surcos durante la siembra	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Procedimiento fácil y además también ofrece la alternativa para recubrimiento de semillas</li> <li>- Requiere menor tiempo la cantidad de agua utilizada aumenta la sobrevivencia de las bacterias.</li> </ul>	
	2.2 Aplicación de biofertilizante granular en los surcos durante la siembra.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se requieren cantidades mayores</li> <li>- El contacto con químicos aplicados en semillas es mínimo</li> <li>- Elimina el trabajo en campo de mezcla de semillas con biofertilizante</li> <li>- Incrementa la habilidad de la bacteria para resistir condiciones de sequía</li> <li>- Fácil uso con aplicadores granulares</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La aplicación es más costosa que el recubrimiento de semillas</li> <li>- Gran competencia de los microorganismos nativos con las bacterias liberadas</li> <li>- Una vez liberados de los gránulos las bacterias pueden ser presa de protozoarios</li> <li>- Para colonizar raíces las bacterias deberán desplazarse por el suelo desde el sitio de aplicación hasta las raíces</li> </ul>

### 1.2.6 Uso de biofertilizantes.

La primera patente de inoculantes a base de *Rhizobium* se remonta a la última década del siglo XIX, lo que explica en gran medida que este tipo de biofertilizantes sean en la actualidad los más difundidos y comercializados, además de que la tecnología desarrollada para *Rhizobium*, durante el siglo pasado, constituya la base para la producción de biofertilizantes que contienen otro tipo de microorganismos.

A pesar de la abundante información que existe sobre estos productos, las bondades que ofrecen para asegurar la productividad agrícola y la sostenibilidad del ambiente, su uso es aún limitado. Esto se observa particularmente en países en desarrollo y se debe a que su distribución y normas de regulación son inapropiadas. (Ramírez-Gamma, 2002)

### 1.3 BIOFERTILIZACIÓN CON *Azospirillum*.

Okon y Labandera (1994) reportan el uso de biofertilizantes a base de *Azospirillum* en los siguientes países:

En Estados Unidos se realizó la evaluación en campo del efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en diversas especies vegetales y en estos experimentos los resultados fueron consistentes con incrementos en el rendimiento de cultivos de mijo, sorgo (11-24%), y maíz (10-20%). La comercialización de biofertilizantes a base de esta bacteria de la marca "Azo-Green" se recomienda para mejorar el vigor de la semilla para el establecimiento de la plántula y el sistema radicular y resistencia a la sequía.

Experimentos de campo realizados en la India en donde se empleó un biofertilizante cuyo soporte consistía en una mezcla 1:1 de abono de granja y turba con una densidad bacteriana de  $1.5 \times 10^{11}$  UFC/g. los resultados de las pruebas mostraron incrementos en el rendimiento en mijo y sorgo de 15 y 19% respectivamente.

En Tailandia los resultados obtenidos indican incrementos del 15-35% en cultivos de maíz comparado con los controles no inoculados.

En Israel se han llevado a cabo diversos experimentos por muchos años en cultivos de trigo, maíz, sorgo, pastos, granos y leguminosas forrajeras. El biofertilizante a base de turba con una población de  $1 \times 10^7$  UFC /g de la cepa Cd de *Azospirillum brasilense* dio lugar a incrementos significativos que van de 15-20% en sorgo, y de 20-30% en maíz.

En Italia se realizaron experimentos de inoculación con dos especies *A. lipoferum* y *A. brasilense*. Este biofertilizante contenía como acarreador una mezcla 1:1 de turba y abono bovino y una población de  $1 \times 10^9$  UFC/g. En los cultivos de arroz, trigo, maíz y tabaco se encontraron incrementos en el rendimiento del 3 - 54%.

En Francia una empresa realizó experimentos con diferentes cepas de *Azospirillum*. Se demostró que *A. lipoferum*, mejoró la nutrición del cultivo, en cuanto a contenido de nitrógeno. Además se observó floración temprana, mayor vigor en plantas y resistencia a la sequía.

En México la Universidad Autónoma de Puebla ha experimentado también con esta bacteria, usando como soporte turba y una densidad poblacional de  $3-5 \times 10^8$  UFC/g, también reportan incrementos que van de 23-60%.

En la Facultad de Química de la UNAM, se realizaron experimentos con diferentes cepas de *Azospirillum* utilizando un soporte líquido (Malato Sales), con una densidad poblacional entre  $10^5$  y  $10^8$ , en cultivos de jitomate. En éstos se reporta que: a) Se requiere diferente densidad poblacional para obtener efectos positivos cuando se emplea el biofertilizante en sistemas hidropónicos o suelo; b) que en ambos casos la floración se anticipa en los tratamientos inoculados con respecto al control sin bacteria, c) mejoría en la características de las plantas y d) se presentan incrementos de 25-52% en la producción (Esquivel-Cote, 1997; Urzúa, 1997; Ramírez-Gama y colab., 2001; Urzúa, 2001).

En Puebla, en 1999, se sembraron dos híbridos de sorgo (D65 y RB3006) inoculados en la siembra con *Azospirillum* ó micorrizas ó con ambos. Los rendimientos observados en los diferentes tratamientos mostraron que existe un incremento en el rendimiento de D65 cuando se inoculó con *Azospirillum* ó con *Azospirillum* + micorriza, que superó al testigo fertilizado; este comportamiento se observó también en el híbrido RB 3006 (Irizar y colab. 2003). Al respecto Okón y Labandera-González (1994), mencionan que en México se obtuvieron incrementos de 10-15% en el rendimiento de sorgo cuando se inoculó con *Azospirillum*.

Durante los años 1999 al 2001 se establecieron diversos experimentos y parcelas de validación para evaluar la respuesta de los biofertilizantes, en éstos se utilizaron bacterias de la especie *Azospirillum brasilense* en cultivos de cereales. Estos trabajos realizados por el INIFAP en la región de la Mesa Central de México indican que en algunas localidades hubo incrementos en la producción sobre el testigo fertilizado, que fueron hasta de 60% en maíz, 85% en trigo, 74% en cebada y 25% en avena (Irizar y colab. 2003).

En la actualidad existen diversos productos que se comercializan en diferentes países, en el Cuadro 5 se exponen algunos ejemplos.

**Cuadro 5.** Productos comerciales basados en *Azospirillum* (Adaptado de Lorence, 1999)

Producto	Empresa	Especificaciones
Azo-Green	Genesis Trufs and forages, P.O. Box 10, Huntsville, UT84317, E.U.A.	<i>A. brasilense</i>
Azogreen	Pionner France Mais, Aussonne, Toulouse, Francia	<i>A. lipoferum</i> cepa CRT-1 microencapsulada en matriz de polímero $1.5 \times 10^8$ UFC/semilla
Biofertilizante para maíz	Centro de investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México	<i>A. brasilense</i> $3-5 \times 10^8$ UFC/g En turba como soporte
Biofertilizante para maíz y sorgo	Asesoría Integral Agropecuaria y Administrativa S.A. de C.V. Plaza San Jacinto No.23-D Col San Ángel Del. Álvaro Obregón. México D.F. CP:01000	<i>Azospirillum brasilense</i> $5 \times$ $10^8$ / g de biofertilizante En turba molida como soporte
Zea-nit	Heligenetics 45030 Gaiba, RO, Italia, Via Provinciale 62ª/12	Mezcla de <i>A. brasilense</i> cepa Cd(ATCC 29729) y <i>A.</i> <i>lipoferum</i> cepa Br-17(ATCC 29709) Sólido: vermiculita como soporte ( $1 \times 10^9$ UFC /g) Líquido: ( $1 \times 10^9$ UFC/mL)

#### 1.4 EL GÉNERO *Azospirillum*

En 1925 Beijerinck, aisló esta bacteria de suelos carentes de nitrógeno en Holanda y la llamó *Spirillum lipoferum*. Siete años después en 1932, Scroder la aisló en Indonesia del suelo y algas marinas (Becking, 1982).

Este microorganismo estuvo olvidado varias décadas, hasta que Döbereiner y Day en 1976 lo redescubrieron y reportaron que la bacteria fijaba nitrógeno. Actualmente se ha demostrado que la distribución ecológica de *Azospirillum* es extremadamente amplia, se ha aislado de suelos tropicales, subtropicales y templados de todo el mundo. Se han encontrado cepas en asociación con monocotiledóneas, tales como maíz, arroz, caña de azúcar, sorgo y algunos pastos forrajeros, así como con dicotiledóneas (Stacey y colab., 1992) y cactáceas (Mascarúa y colab., 1988).

De acuerdo con Okon (1994), *Azospirillum* ha sido catalogada como una "rizobacteria promotora de desarrollo vegetal" ó PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria), y las investigaciones sobre ésta son muy numerosas debido a que esta bacteria presenta muchas características de interés agrícola.

Hasta la fecha se han descrito seis especies de *Azospirillum*. Las dos primeras en describirse fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Tarrand, Krieg y Döbereiner, 1978), basándose en las diferencias fisiológicas y morfológicas de varias cepas y estudios de homología de DNA. Posteriormente se describieron las especies *A. amazonense* aislada de pastos del área Amazónica de Brasil (Döbereiner, 1983), *A. halopraeferans* (Reinhold y colab., 1987), *A. irakense* (Khamas y colab., 1989) estas dos aisladas de suelos alcalinos y *A. largomobile* aislada de los lagos de Australia, (Dekhil, 1997), siendo corregido el nombre de esta especie a *A. largimobile* (Sly y Stackebrandt, 1999). Recientemente, en honor a quien reiniciara los estudios de este género bacteriano y descubriera otros diazótrofos, se nombró la especie *A. doebereineriae*. (Hartmann y colab., 2000).

### 1.4.1 Características Microscópicas

El género *Azospirillum* pertenece a la subclase alfa de las proteobacterias (Okon e Itzigsohn, 1992), las características más importantes en la identificación de esta bacteria son: la forma vibrioide, el pleomorfismo y su movilidad en espiral, misma que se pierde a las 72 horas en algunas especies (Döbereiner, 1992).

La movilidad de esta especie de bacterias se da mediante un flagelo polar y con un movimiento típico helicoidal o vibratorio en medio líquido, solo *A. brasilense*, *A. lipoferum* y *A. irakense* presentan un flagelo lateral cuando se desarrollan en medios de cultivo sólido el cual utilizan para desplazarse sobre la superficie (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

Las bacterias de este género son fijadoras de nitrógeno de vida libre, Gram negativas, su diámetro oscila entre 0.9 y 1.2  $\mu\text{m}$ . Las células presentan en su interior elevadas cantidades de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) que constituyen hasta un 50% del peso seco celular (Okon y colab., 1976), éstas se observan al microscopio como gránulos refringentes en el interior de las células. Diversas funciones fisiológicas son atribuidas al PBH, como permitir una mayor resistencia a la desecación, a la luz ultravioleta y al choque osmótico (Tal y Okon, 1985). Dependiendo la edad del cultivo, las células pueden cambiar de forma y producir cistos o quistes que desempeñan una función importante en la sobrevivencia de las células en el ambiente cuando los nutrientes son escasos y previo a la asociación con la planta. (Tal y Okon, 1985, Okon e Itzigsohn, 1992).

### 1.4.2 Características metabólicas y culturales

Las especies de *Azospirillum* crecen bien con ácidos orgánicos como el malato y succinato pero tienen la habilidad de utilizar diferentes azúcares y aminoácidos como fuente de carbono y energía. Estas células son muy versátiles y tienen una amplia variedad de rutas metabólicas para obtener energía (ATP) e intermediarios (por bloqueo de síntesis de otros compuestos) a partir de ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos (Okon, 1985). Se desarrolla bien a pH neutro, aunque algunas prefieren condiciones más ácidas (Holt y colab., 1994), la fijación de nitrógeno ocurre únicamente en condiciones microaeróbicas y su temperatura óptima de crecimiento es de 32-35°C.

El medio de cultivo más utilizado para el estudio de especies de *Azospirillum*, es el Nfb semi-sólido (ss) que está compuesto por malato y sales, además de ser un medio de cultivo carente de nitrógeno. Este tipo de medio de cultivo se aplica para efectuar el aislamiento, el desarrollo característico de *Azospirillum* en este medio se presenta en forma de una película blanca y densa a 2mm debajo de la superficie del medio de cultivo, debido a que la bacteria solo fija el nitrógeno en condiciones microaerofílicas, por lo que el desarrollo inicial se presenta debajo de la superficie que es en donde existe esta condición. La reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, provoca la alcalinización del medio y el vire del indicador azul de bromotimol. Este medio también se utiliza para evaluar la capacidad fijadora de nitrógeno. Con tal fin en cultivos de 24 horas se inyecta un volumen conocido de acetileno, se incuba y se extrae el gas para determinar la cantidad de acetileno reducido mediante cromatografía de gases.

A continuación se describen las características culturales de *Azospirillum* en tres medios de cultivo empleados para este fin.

En gelosa nutritiva, las colonias se observan de forma circular, con textura seca, elevación umbonada, con bordes lobulados y las colonias con más de una semana de incubación muestran una pigmentación rosa opaco característica (Tarrand y colab., 1978).

En agar rojo congo, las colonias toman una coloración rojo escarlata que permite diferenciarla de otros géneros bacterianos. También se pueden encontrar colonias mutantes de *Azospirillum* de color blanco debido a la incapacidad de producir polisacáridos no identificados (Rodríguez-Cáceres, 1982).

En agar papa (BMS), después de 1-2 semanas de incubación a 33-35°C, las colonias de *Azospirillum* se muestran de color rosa, opacas, con borde irregular, arrugadas y con elevación umbonada (Döbereiner y colab., 1976). La pigmentación se ve favorecida en agar BMS cuando estas se incuban con luz. Algunas cepas de *A. brasilense* forman colonias con una coloración rosa intenso (Tarrand y colab. 1978).

### 1.4.3 Características de importancia agronómica

Se han realizado diversos experimentos que permiten confirmar la capacidad de *Azospirillum* de promover el desarrollo de las plantas tanto en campo como en invernadero. Las bacterias de este género son bien conocidas desde hace años como rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal ó PGPR (Okon y Labandera, 1994; Okon y Vanderleyden, 1997).

El aumento en el crecimiento de las plantas por parte de *A. brasilense* no solo se limita al efecto de la fijación de nitrógeno. Existen otros mecanismos propuestos para explicar estos efectos benéficos. La inoculación con esta bacteria mejora el desarrollo de las raíces (Okon y Kapulnik, 1986; Umali-García y colab., 1980), aumenta el aprovechamiento de minerales (Barton y colab., 1986; Lyn y colab., 1983) y agua por el sistema radical (Sarig y colab., 1988). Para explicar este efecto se han propuesto los siguientes mecanismos de acción:

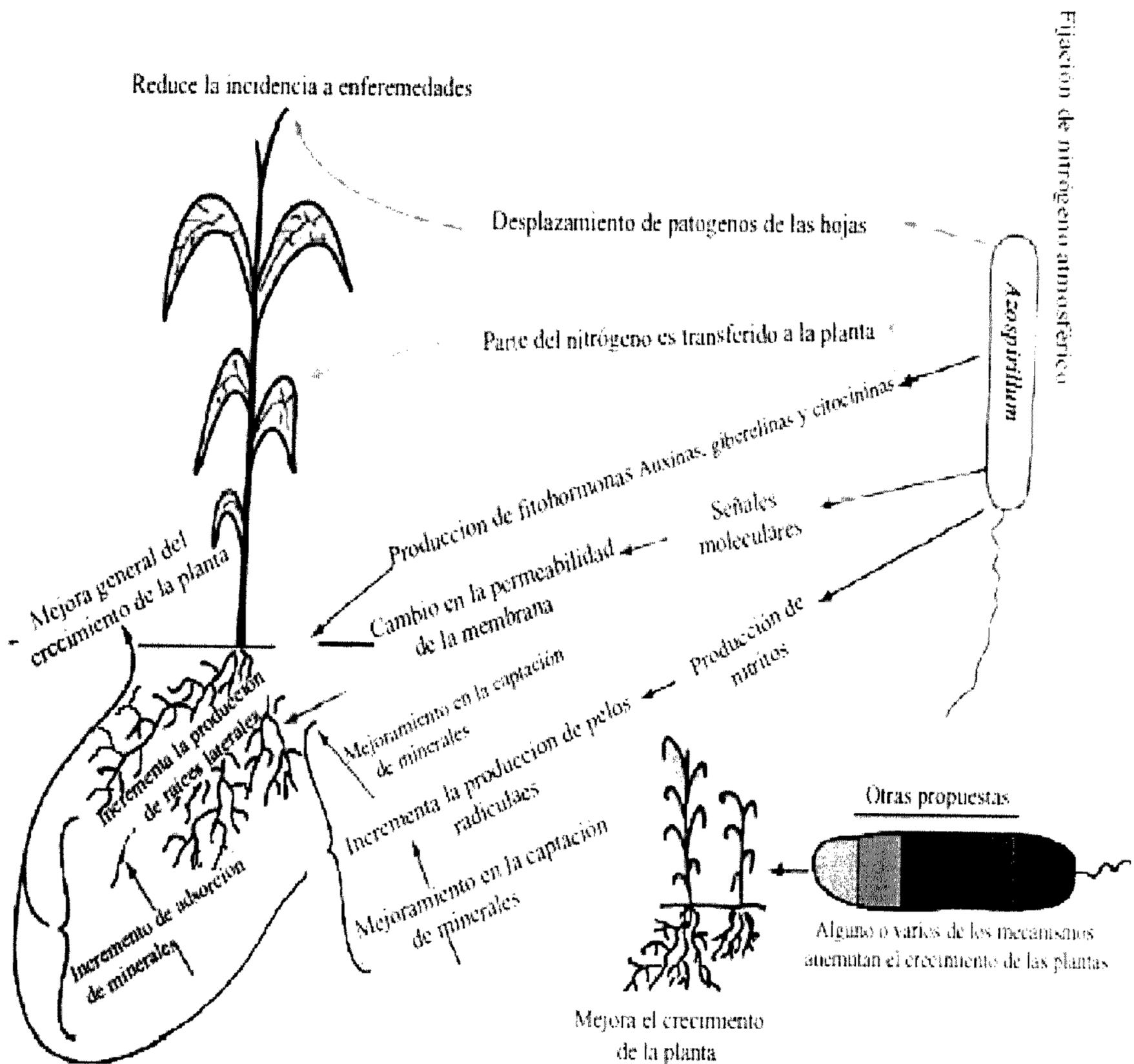
a) fijación de nitrógeno, b) actividad hormonal, c) señales de moléculas no definidas que interfieren con el metabolismo de la planta, d) producción de nitritos y e) alteración de la permeabilidad de la raíz (Glick y colab., 2001).

Todas las propuestas son válidas, no obstante y a pesar de casi 30 años de investigación no se ha definido cual de ellos es el más importante. En este sentido Bashan y Levanony (1990) indican que estos mecanismos probablemente se lleven a cabo simultáneamente o de manera secuencial, lo que depende de las condiciones ambientales que predominen.

1.4.4 Mecanismos de acción

El modo de acción de *Azospirillum* hasta la fecha no esta bien definido, sin embargo se han descrito la producción de fitohormona, la fijación de nitrógeno atmosférico, señales moleculares indefinidas que interfiere con el metabolismo de la planta, producción de nitritos.(Figura 1)

Figura 1. Mecanismos de acción de *Azospirillum*. (Tomado de Bashan y De-Bashan, 2005)



#### 1.4.4.1 Fijación de nitrógeno

La fijación de nitrógeno fue el primer mecanismo propuesto para explicar el mejoramiento en el desarrollo de las plantas cuando éstas se inoculan con *Azospirillum*. Esto se debía a que se presentaba un incremento en el número de compuestos nitrogenados y la actividad de la nitrogenasa.

Este mecanismo ha sido cuestionado debido a que las bacterias de este género no excretan cantidades significativas de amonio en crecimiento diazotrófico. Este aspecto fue confirmado por Bashan y colab. (1989), en un estudio en el que empleó una mutante no fijadora, la cual al ser inoculada indujo resultados similares a cuando se inoculó la cepa nativa.

#### 1.4.4.2 Producción de fitohormonas

Las fitohormonas son moléculas que se sintetizan en las plantas y actúan a muy bajas concentraciones ( $10^{-6}$  a  $10^{-9}$ ) regulando su crecimiento, desarrollo y metabolismo. Se conocen varias clases de hormonas vegetales, algunas de ellas son promotoras del crecimiento (auxinas, giberelinas y citocininas) y otras ejercen un efecto opuesto (etileno, ácido abscísico). Los niveles hormonales se pueden alcanzar por síntesis, transporte, compartimentalización o destrucción (Lorence, 1999).

Es conocido que estas hormonas, son también producidas por diversas bacterias que viven en asociación con las plantas y está comprobado que éstas incrementan la velocidad de crecimiento y mejoran el rendimiento de las plantas. (Barea, 1974; Brown, 1976).

La aplicación externa de hormonas sintéticas u hormonas purificadas de cultivos bacterianos son similares a los efectos producidos por la inoculación con *Azospirillum* sobre el desarrollo y morfología de la raíz (Tien y colab., 1979).

- **Auxinas**

El efecto de las auxinas se observa en el crecimiento y morfogénesis de las plantas, La más abundante y estudiada es el ácido indol-3-acético (AIA) y está comprobado que éste induce el alargamiento de las raíces. El principal precursor de esta hormona es el triptófano. Entre los principales procesos que regulan las auxinas destacan la iniciación de la radícula y de las raíces adventicias (enraizamiento), la prevención de la caída de flores y frutos, el retardo de senescencia y tropismo (Hernandez, 2001; Gonzalez, 2001).

La inoculación con *Azospirillum* produce un efecto de deformación en la raíz, induciendo la ramificación de ésta, un efecto similar se produce cuando se agrega AIA purificado y existen reportes que indican que las cepas de *Azospirillum* producen más de 30µg de AIA/mL en medios de cultivo complementados con triptófano (Jain y Patriquin, 1985).

- **Giberelinas**

Las giberelinas representan un grupo de diterpenoides acídicos encontrados en las angiospermas, gimnospermas, helechos, algas, hongos y bacterias. Se conocen 138 giberelinas diferentes, todas ellas presentan la estructura básica del ácido giberélico y difieren solo en sus cadenas laterales, las mas comunes son: GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> y GA<sub>9</sub> (www.plant-hormones; Lorence, 1999).

Las giberelinas presentan muchos efectos fisiológicos, cada uno depende del tipo de giberelina presente en cada especie de planta (Davies, 1995; Mauseth, 1991; Raven y colab., 1992; Salisbury y Ross, 1992). Algunos de los efectos que se observan son: incremento en el crecimiento de tallos, interrupción del periodo de latencia de las semillas provocando la germinación, movilización de las reservas de azúcares, inducción de la brotación de yemas, promoción del desarrollo de frutos y estimulación de la síntesis de RNA mensajero.

Se ha encontrado que las giberelinas GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub> son producidas por *Azospirillum*, aunque en pequeñas cantidades estas son biológicamente importantes (Janzen y colab., 1992; Tien y colab., 1979).

- **Citocininas**

La primera citocinina descubierta fue la Kinetina, cuya acción es promover la división celular (citocinesis). Las citocininas se han encontrado en la mayoría de las plantas superiores así como en musgos, hongos, bacterias. Actualmente se conocen más de 200 citocininas naturales y sintéticas. La más común en las plantas es la zeatina. ([www.plant-hormones](http://www.plant-hormones)).

La kinetina también se ha encontrado en cultivos de *Azospirillum*, los efectos que producen las citocininas son: estimulación de la división celular, retrasan el envejecimiento de los órganos vegetales, promueven la organogénesis en los callos celulares, la expansión celular en cotiledones y hojas, el desarrollo de cloroplastos, la ruptura de latencia de yemas axilares y también presentan un efecto inhibitorio del desarrollo de raíces laterales (Rojas y Ramírez, 1993).

- **Etileno**

El etileno es una hormona vegetal de bajo peso molecular que se difunde a través de los tejidos. Éste se produce en las plantas pero no en bacterias y se sintetiza en los tejidos senescentes y frutos maduros. Los efectos que provoca en las plantas son: maduración de frutos, interviene en la caída de las hojas, flores y frutos, elonga el tallo de las monocotiledóneas, en muchas especies inhibe la floración y puede cambiar el sexo de flores en desarrollo. Éste también interacciona en otros procesos como la formación de raíces adventicias, la diferenciación del tallo y raíz (Rojas y Ramírez, 1993).

Las plantas sintetizan mayor cantidad de etileno en respuesta al estrés y al ataque de patógenos, provocando así la estimulación de la senescencia, caída de hojas, inhibición del desarrollo de raíces y muerte celular en los sitios de infección (Bashan y de-Bashan, 2005). Se ha reportado que varias cepas bacterianas aisladas del suelo como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* y *Enterobacter cloacae* entre otras, son capaces de utilizar como única fuente de nitrógeno al ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico (ACC) el cual es el precursor del etileno (Glick y colab. 1999). La enzima acc-deaminasa producida por las bacterias desamina el ACC y en consecuencia la disminución de los niveles de etileno y facilita el crecimiento vegetal (Penrose y Glick, 2003).

#### **1.4.4.3 Producción de nitritos**

Los nitritos excretados por *Azospirillum* provocan un incremento en la formación de raíces laterales (Bothe y colab., 1992). Este mecanismo se ha propuesto en los últimos años y está poco estudiado (Bashan y Holguin, 1997).

#### **1.4.4.4 Alteración de la permeabilidad de la membrana**

Se sugiere que las bacterias son capaces de excretar y transmitir señales moleculares indefinidas que pasan a través de la pared celular de las plantas y son reconocidas por sus membranas. Esta interacción activa una serie de reacciones que provocan la alteración de la permeabilidad de la membrana (Bashan y Holguin, 1997).

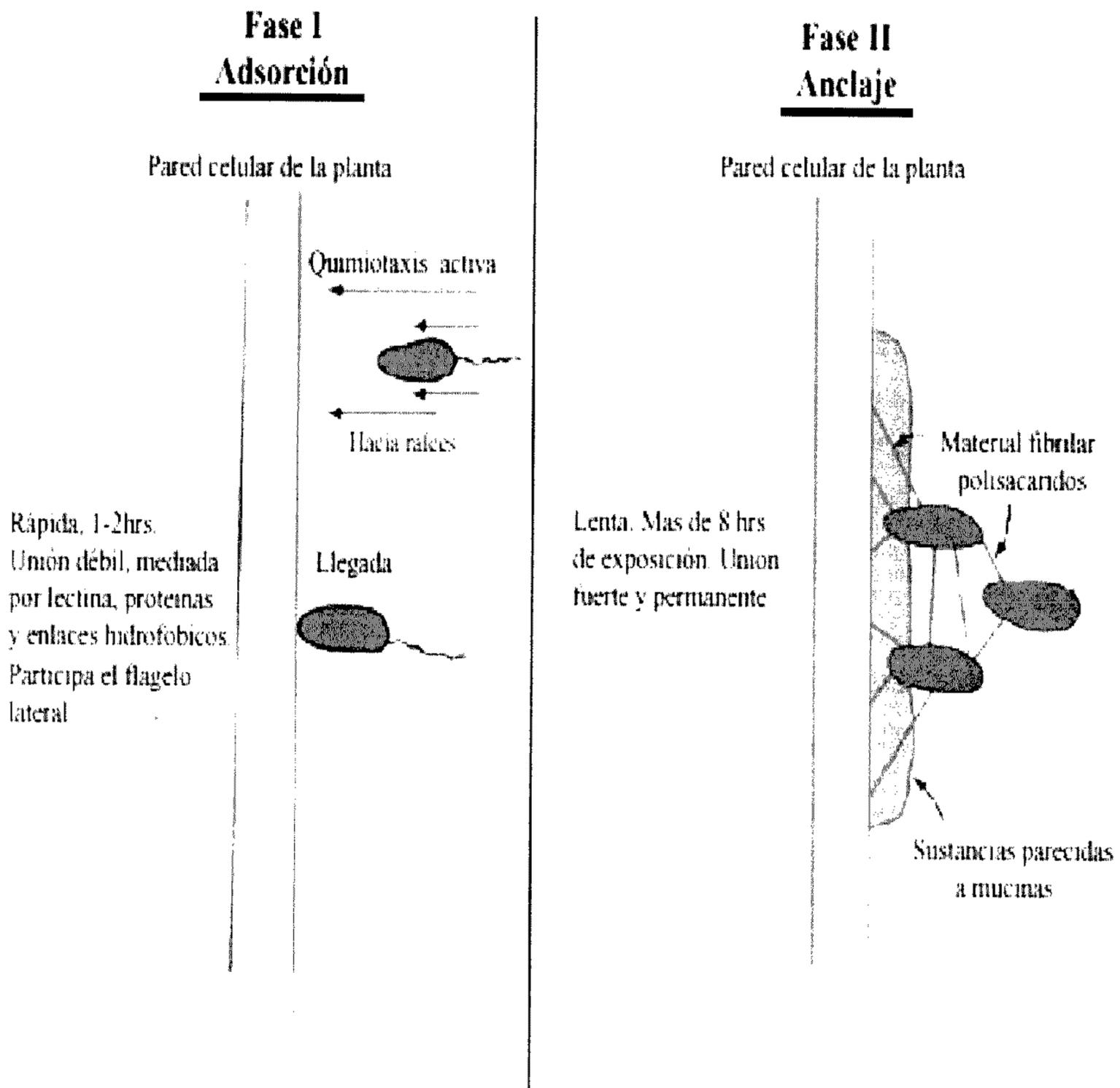
#### **1.4.4.5 Colonización de las raíces**

Para que las plantas sean beneficiadas a través de uno o más de los mecanismos de acción que efectúa *Azospirillum* es indispensable que la bacteria colonice las raíces. *Azospirillum* ha desarrollado dos formas de unión: La primera (fase de adsorción) es débil y se alcanza en corto tiempo de 1-2 horas después de incubación (después de que la bacteria migra hacia las raíces por quimiotaxis o aerotaxis, o que la raíz alcanza el sitio de aplicación del inoculante). Este proceso involucra interacciones hidrofóbicas y el reconocimiento de lectina entre la bacteria y la pared celular de la planta.

La segunda (fase de anclaje) es más fuerte e irreversible, comienza desde las 8 y hasta un máximo de 16 horas de incubación, este involucra la elaboración de una red de polisacáridos-proteínas, la cual ancla a la bacteria permanentemente a la superficie de la raíz (Michiels y colab., 1991; Zaady y Okon, 1990, Steenhoutd y Vanderleyden, 2000). Posteriormente se lleva a cabo la multiplicación celular y forma pequeños agregados, esta forma de unión proporciona la ventaja de competir por los nutrientes que libera la raíz, mejor que las que se unen de forma simple (Bashan y de-Bashan, 2005). En raíces de jitomate, pepino, algodón y soja solo se ha observado la segunda fase (Bashan y colab., 1991), probablemente este sea el principal factor de la colonización efectiva.

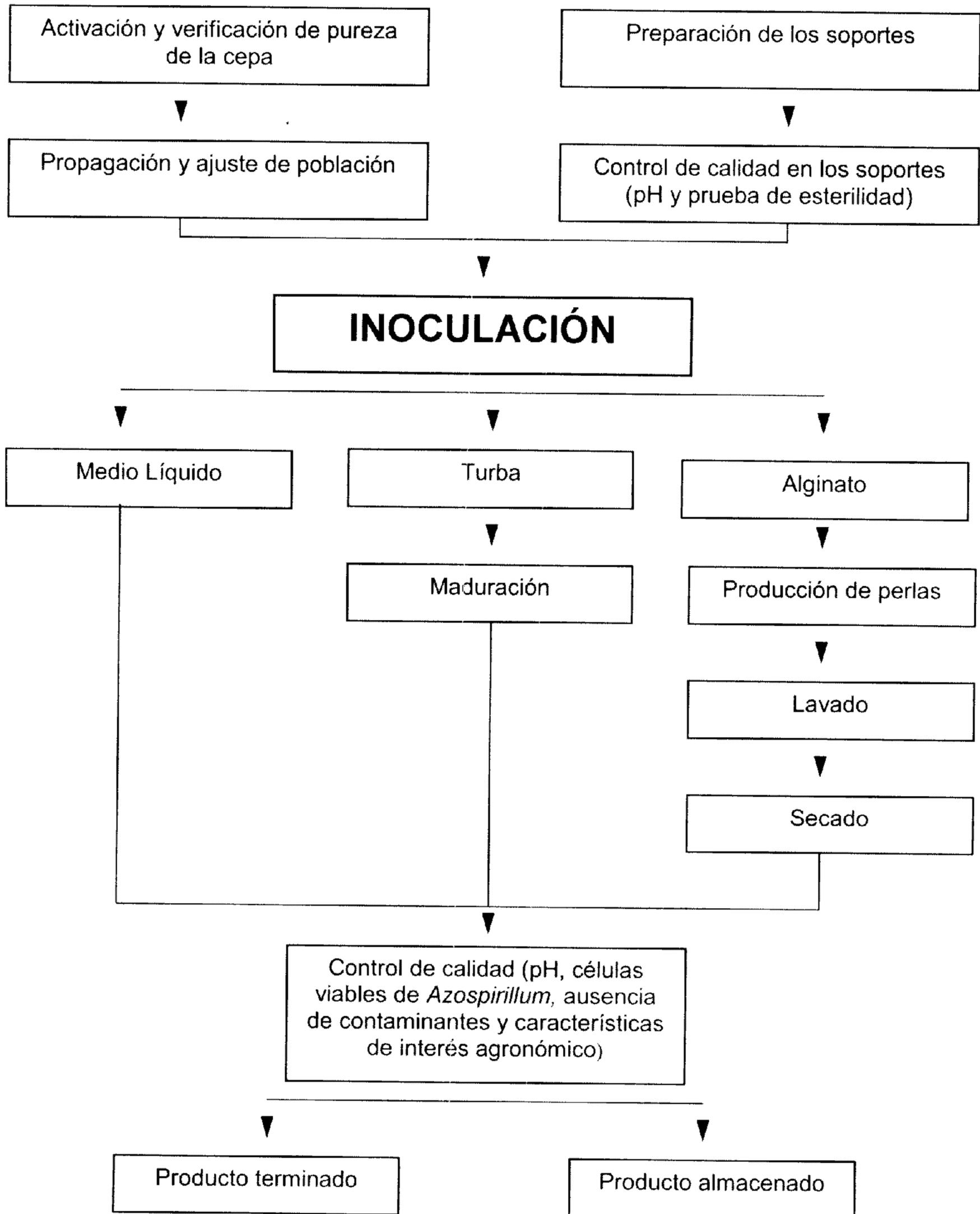
La unión deficiente entre las bacterias de *Azospirillum* y las raíces de las plantas puede provocar: 1) Que las sustancias excretadas por la bacteria se difundan en la rizosfera y sean consumidas por otros microorganismos antes de que las plantas puedan utilizarlas. 2) Que el agua arrastre a los microorganismos lejos de las raíces donde no existan suficientes nutrientes para que éstas sobrevivan. 3) Los sitios donde no haya unión de las bacterias con la raíz, son vulnerables a la colonización de microorganismos posiblemente no benéficos para las plantas.

**Figura 2.** Tipos de unión de *Azospirillum* con raíces de plantas. (Tomado de Bashan y de-Bashan, 2005)



## 2. METODOLOGÍA

### DIAGRAMA GENERAL DE ACTIVIDADES



## MATERIAL BIOLÓGICO

Para la producción de los biofertilizantes se empleó la cepa VS9 perteneciente a la especie *Azospirillum brasilense* la cual se aisló de sorgo rojo en el Valle de Santiago, Gto. y que pertenece a la colección del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM.

### 2.1 ACTIVACIÓN Y VERIFICACIÓN DE PUREZA DE LA CEPA

Del cultivo de referencia se tomó una asada y se suspendió en Solución Salina Isotónica (SSI). A partir de esta suspensión se inocularon:

- Tubos que contenían un medio de cultivo semisólido a base de malato, diversas sales y carente de nitrógeno al cual se le conoce como Nfbss (Anexo 1) (Tarrand y colab., 1978).
- Cajas Petri que contenían Gelosa Nutritiva o Agar BMS (Anexo 1). Todas fueron incubadas a 35°C durante 7 días, después de los cuales se hizo la observación de las características coloniales. (Tarrand y colab., 1978).

De los cultivos anteriores se hicieron observaciones microscópicas en las que se verificó la pureza, morfología y movilidad de la bacteria en estudio, así como la presencia de gránulos refringentes en el interior de las bacterias y la formación de cistos.

### 2.2 ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO

Considerando que los biofertilizantes a base de *Azospirillum* tienen un efecto benéfico sobre el desarrollo de los vegetales cuando la población oscila entre  $10^6$  y  $10^8$  bacterias viables / mL o g de soporte, y que la cantidad de células viables varía con el tipo de soporte, se realizó un ensayo preliminar a fin de establecer la concentración inicial del inóculo y su repercusión en la concentración del biofertilizante líquido y de los tres sólidos (turba molida o en polvo fino, turba sin moler y perlas de alginato) después de siete días de almacenamiento.

### 2.2.1 Curva de crecimiento

El ensayo se realizó por triplicado, efectuándose tres resiembras sucesivas que corresponden a:

- **Activación** de la cepa en medio Nfbss y en las condiciones de incubación antes indicadas.
- **Adaptación** de la cepa al medio de cultivo -Caldo Nutritivo (Anexo1)- que se empleará para la producción del biofertilizante, en este caso los cultivos se incubaron por 72 horas con agitación de 150rpm a la temperatura indicada.
- **Propagación.** Del cultivo anterior se transfirieron alícuotas de 5mL a tres matraces que contenían caldo nutritivo (CN). Éstos se incubaron en las condiciones indicadas, realizándose las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 560nm ( $A_{560}$ ) del cultivo al tiempo cero e intervalos de cuatro horas durante 48 horas.

### 2.2.2 Determinación de células viables para el ajuste del inóculo inicial

A partir de cultivos en fase logarítmica terminal se tomaron las alícuotas con diferentes volúmenes y mediante la adición de caldo nutritivo se ajustaron a las lecturas de  $A_{560}$  recomendadas por Urzúa, (2001); Esquivel, (2002); Hernández y Hernandez y Ruíz, (1987) que corresponden a 0.008, 0.015, 0.030, respectivamente y por Bashan, (1986) 1.0, 1.5 y 2.0.

En el caso de las perlas de alginato, el cultivo de 24hrs se centrifugó a 3000rpm por 15min, el paquete celular se lavó dos veces con SSI estéril; posteriormente se suspendió en la misma solución y se ajustó a la lectura de  $A_{560}$  requerida.

La cuantificación de células viables se realizó mediante el método de diluciones y vertido en placa en gelosa nutritiva. Cada determinación se hizo por triplicado.

## 2.3 PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES

Se prepararon cuatro presentaciones de biofertilizantes, uno líquido y tres sólidos. De estos últimos dos a base de turba canadiense (Sunshine), molida (en polvo) y sin moler y el tercero a base de alginato (granular). De cada tipo de biofertilizante se prepararon 30 unidades que fueron almacenadas durante diferentes tiempos a temperatura ambiente. Simultáneamente de cada biofertilizante se prepararon 18 unidades que no fueron inoculadas y se emplearon como control de esterilidad.

### 2.3.1 Preparación de soportes

#### 2.3.1.1 Líquido

Este soporte corresponde al medio de cultivo que se emplea en la propagación (CN) el que contiene extracto y peptona de carne. Para su uso el pH se ajustó entre 6.8 y 7.0 y se esterilizó en autoclave a 121°C, con una presión de 15lb/in<sup>2</sup> durante 15 minutos.

#### 2.3.1.2 Sólidos

**a) Polvo** (turba molida) – 1000g de turba se molieron en un molino de martillos (Micro-Pulverizer) con lo que se obtuvieron partículas de 0.075 a 0.025mm de diámetro. Posteriormente se neutralizó con 200g de carbonato de calcio; se esterilizó en autoclave a 121°C, presión de 15lb/in<sup>2</sup> durante 2hrs y se distribuyó en bolsas de polietileno, colocando 20.0g en cada una.

**b) Turba sin moler** – Se emplearon 1000g de turba. La neutralización, esterilización y distribución, se efectuó siguiendo el procedimiento antes indicado.

**c) Granular** (alginato de sodio) - 15g de alginato de sodio de 3500cps y 5 gramos de alginato de sodio de 14000cps (Sigma) se disolvieron en 800mL de agua destilada, esta mezcla se esterilizó en autoclave a 121°C, presión de 15lb/in<sup>2</sup> por 15min.

### 2.3.2 Preparación del inoculante

**2.3.2.1 Activación.** A partir del cultivo en el que se verificó la pureza, se realizó una resiembra en tres tubos que contenían 10mL del medio Nfbss, los cuales se incubaron a 35°C por 72hrs.

**2.3.2.2 Adaptación.** Para lograr la adaptación de la cepa al nuevo medio de cultivo se transfirieron cinco asadas del cultivo anterior en matraces de 250 mL con 125mL de CN. Estos se incubaron a 35°C con 150rpm de agitación por 72hrs.

**2.3.2.3 Propagación.** Del cultivo anterior se transfirieron alícuotas de 5mL a matraces con 125mL de CN y se incubó a 35°C con 150rpm de agitación por 24hrs. Tiempo en el que la cepa está en la fase logarítmica.

### 2.3.3 Ajuste del inóculo

Con base en la densidad poblacional recomendada para las diferentes presentaciones de biofertilizante y los resultados obtenidos en el ensayo preliminar, a los cultivos de propagación se les adicionó CN y se ajustaron a las lecturas de absorbancia indicadas en el siguiente cuadro:

**Cuadro 6.** Ajuste final del inóculo

BIOFERTILIZANTE	$A_{560}$
LIQUIDO	0.009
TURBA POLVO	0.013
TURBA SIN MOLER	0.032
PERLAS DE ALGINATO	1.951

### 2.3.4 Inoculación de los soportes

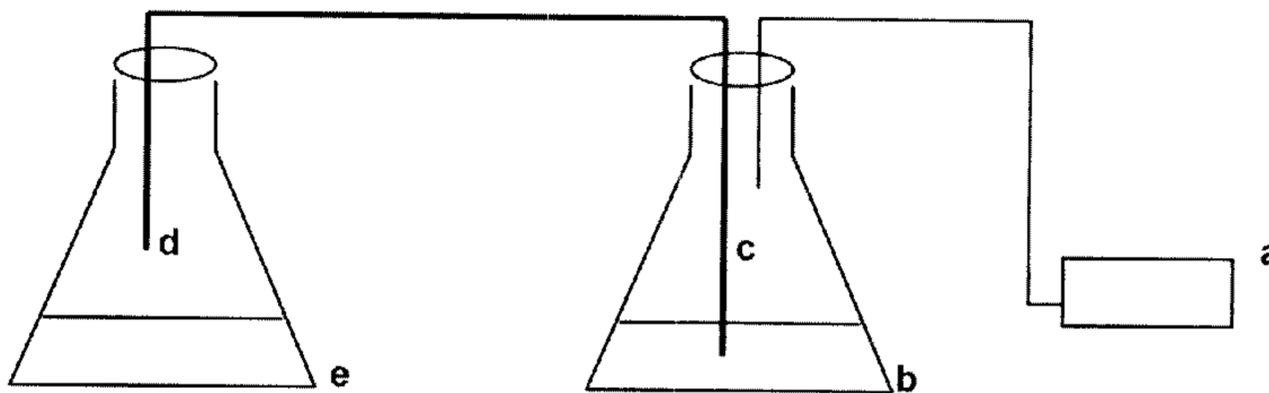
**Biofertilizante líquido.** La suspensión del inóculo ajustado, se distribuyó en frascos de vidrio ámbar limpios y estériles colocando en cada uno 20mL.

**Biofertilizantes a base de turba molida y sin moler.** A cada bolsa con 20g de turba se le adicionaron 20.0mL del inóculo ajustado (Córdova, 1985), inmediatamente después se homogeneizó y se selló herméticamente. Para su maduración todas las bolsas se incubaron a 28°C durante siete días.

**Biofertilizante granular a base de alginato.** 200mL de la suspensión bacteriana ajustada se mezclaron con el alginato de sodio estéril. Para la producción de las perlas (figura 3), la mezcla anterior se goteó en una solución de cloruro de calcio 2.0% (Anexo1) en agitación, posteriormente las perlas se lavaron con SSI estéril. Para aumentar la cantidad de bacterias (enriquecimiento o maduración), las perlas se colocaron en CN e incubaron durante 24hrs a 35°C y agitación de 200rpm. El medio se drenó y las perlas se deshidrataron colocándolas en una campana de flujo laminar durante 12hrs, posteriormente se distribuyeron en frascos viales limpios y estériles con 2.0g cada uno. El tamaño final de las perlas corresponde al característico de la presentación granular.

Todos los inoculantes se almacenaron a temperatura ambiente, en un lugar seco y protegido de la luz.

**Figura 3.** Sistema de producción de perlas de alginato



La bomba de aire (a) inyecta aire al matraz que contiene la mezcla de alginato de sodio y la suspensión bacteriana (b), de esta forma se incrementa la presión en el matraz, la mezcla pasa a través del tubo de vidrio (c) y sale por la punta capilar de vidrio (d) de diámetro similar a agujas calibre 21. Las gotas al caer en la solución de  $\text{CaCl}_2$  (e) forman las perlas.

## 2.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS BIOFERTILIZANTES

### 2.4.1 Pruebas de control de calidad de soportes.

- pH: Este debe de estar cercano a la neutralidad para permitir la propagación y sobrevivencia de la bacteria (Ramírez-Gama, 2002). Se determinó con un potenciómetro Beckman Mod. H2.

Soporte líquido. La determinación se realizó directamente en el medio de cultivo.

Soporte sólido a base de turba. Se pesó 1g de turba y se suspendió en 10mL de agua destilada posteriormente se determinó el pH.

Soporte sólido a base de alginato. La determinación se realizó directamente en el alginato disuelto en agua.

- Porcentaje de humedad en soportes a base de turba: una muestra de turba se pesó y secó en horno hasta peso constante y el % se obtuvo por la diferencia de los pesos inicial y final.
- Prueba de esterilidad: Para confirmar la ausencia de contaminantes se tomaron tres muestras de cada soporte, se realizó una dilución 1:10 (p/v) y se sembró mediante la técnica de vertido en placa empleándose gelosa nutritiva como medio de cultivo. La ausencia de contaminantes es fundamental debido a que su permanencia y propagación dan lugar a la competencia por nutrientes y espacio, inhibiendo la multiplicación de la bacteria de interés (Stephens y Rask, 2000).

### 2.4.2 Pruebas de calidad durante el proceso de producción

Durante la activación, adaptación y propagación de los cultivos se verificó la pureza mediante la observación microscópica en fresco y tinción de Gram. Determinaciones que se hicieron al tiempo cero y después de la incubación.

### 2.4.3 Pruebas de control de calidad en producto terminado.

Inmediatamente después del envasado se tomaron tres muestras de cada tipo de biofertilizante y se efectuaron las siguientes determinaciones:

- pH: Biofertilizante líquido. La determinación se realizó de la misma forma que en el soporte.  
Biofertilizantes a base de turba. Se siguió el mismo procedimiento realizado en el soporte.  
Biofertilizante granular. Se tomaron 10 perlas, se disolvieron en 5mL de buffer de fosfatos (Anexo 1) y finalmente se determinó el pH.
- Porcentaje de humedad en biofertilizantes a base de turba: mismo procedimiento que en el soporte.
- Cuantificación de células viables / mL ó g del biofertilizante
- Detección de contaminantes - se tomaron 3 muestras sin inocular.

Las dos últimas determinaciones se realizaron por el método de dilución y vertido en placa empleando gelosa nutritiva. El criterio a seguir para el control de calidad fue la observación de las características macro y microscópicas típicas de las colonias desarrolladas.

#### **2.4.4 Pruebas de control de calidad en producto almacenado.**

Las determinaciones indicadas anteriormente se repitieron en tres muestras de cada tipo de biofertilizante a los siguientes tiempos de almacenamiento 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días. La detección de contaminantes se realizó tomando tres muestras sin inocular a los 30, 60, 120, 150 y 180 días.

##### **2.4.4.1 Verificación de las características fisiológicas de interés agronómico.**

Estas determinaciones se realizaron al tercer mes de almacenamiento.

###### **2.4.4.1.1 Producción de compuestos indólicos mediante la prueba de Salkowski.**

En esta determinación los compuestos indólicos se manifiestan por la reacción con el reactivo de Salkovski que produce un color rojo fucsia.

- **Inducción enzimática**

Se tomó 1g del biofertilizante a base de turba, 1.0mL del biofertilizante líquido y 10 perlas del biofertilizante a base de alginato, cada uno de ellos se adicionó en matraces Erlenmeyer con 100mL de medio de cultivo de Tyler, recomendado por Jain y Patriquin (1985)-Anexo 1- adicionado con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y 100 $\mu\text{g}$  de triptófano, las condiciones de incubación fueron a 35°C con 150rpm de agitación por 24hrs.

- **Determinación de compuestos indólicos.**

Después de la incubación se tomaron alícuotas de diferentes volúmenes y se ajustó la población celular por nefelometría hasta obtener una lectura aproximada de 10UK las lecturas se realizaron en un nefelómetro Klett Summerson con filtro verde. Posteriormente se transfirieron 10mL de la suspensión ajustada en matraces con 100mL del medio de cultivo anterior la adición se hizo por duplicado, y se incubó a 35°C con 150rpm de agitación.

La detección de compuestos indólicos, se realizó mediante la reacción colorimétrica de Salkowski.

Después de 24, 48, 72, 96 y 120hrs de incubación se tomaron alícuotas de 5mL de cada uno de los cultivos, se centrifugaron a 3000 rpm por 25 min. A 1mL del sobrenadante se le agregaron 4mL del reactivo de Salkowski (Anexo 1) y se realizó la lectura de absorbancia a 530nm, a los 20 min de la reacción. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech).

Para calcular la cantidad de compuestos indólicos producidos, se realizó una curva patrón de concentraciones estándar de ácido indol acético, se calculó así la concentración del compuesto en la muestra a partir de la absorbancia y el coeficiente de absorción molar.

#### **2.4.4.1.2 Fijación de nitrógeno**

Se tomó un gramo de biofertilizante a base de turba, 1mL del biofertilizante líquido y 10 perlas del biofertilizante a base de alginato, cada tipo de muestra se adicionó en

matraces Erlenmeyer con 100mL de medio de Tyler y se incubó por 24 horas a 35°C con 150rpm de agitación.

A cada matraz se le ajustó la lectura a 10UK; a partir de cada matraz se inocularon con asa tres tubos con Nfbss carente de nitrógeno los cuales se incubaron a 35°C durante 72 horas, a partir de estos tubos se efectuó una resiembra en el mismo medio. En éstos nuevos cultivos, las lecturas se efectuaron cada 24 horas mediante el registro del desarrollo microbiano típico y observación de características microscópicas en preparaciones en fresco.

#### **2.4.4.1.3 Colonización de raíz**

Para confirmar la capacidad de colonización de raíz por parte de la bacteria, se utilizaron semillas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*), tipo bola, variedad caimán, con germinación de 90-95%.

##### **• Inoculación de semillas**

Debido a que las semillas estaban recubiertas con un fungicida que inhibe el desarrollo de *Azospirillum*, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y agitación con vortex.

Después las semillas se inocularon con el biofertilizante correspondiente:

##### **Biofertilizante líquido:**

Las semillas se colocaron en 20mL del biofertilizante por una hora, posteriormente se sembraron en charolas de germinación que contenían turba sin esterilizar.

##### **Biofertilizantes Sólidos:**

###### **a) Polvo (turba molida)**

En una bolsa de plástico se colocó un gramo de semillas previamente lavadas, se agregaron 3mL de un adherente (goma arábica 40%) y 0.01g del biofertilizante, estas se agitaron hasta lograr el recubrimiento de las semillas y se procedió a distribuirlas en charolas de germinación que contenían turba sin esterilizar

b) Turba sin moler

En cada oquedad de las charolas de germinación que contenían turba sin esterilizar, se colocaron una semilla y 0.05g del biofertilizante a 1cm de profundidad.

c) Granular (perlas de alginato)

En cada oquedad de las charolas de germinación que contenían turba sin esterilizar, se colocaron una semilla y 0.1g de perlas de alginato a 1cm de profundidad.

**Tratamiento sin inocular (testigo)**

Las semillas previamente lavadas se colocaron directamente en las charolas de germinación con turba sin esterilizar.

**Cultivo en Invernadero**

Por cada tratamiento se sembraron 10 semillas y las charolas se mantuvieron en invernadero (previamente desinfectado con el gas generado por una mezcla de permanganato y formaldehído) durante 45 días a 30/18°C día / noche y 75% de humedad relativa. Se efectuaron riegos semanales con agua filtrada.

**Cuantificación de *Azospirillum***

A los 45 días se seleccionaron al azar cinco plantas de cada tratamiento. A las raíces se les eliminó el soporte adherido mediante un lavado superficial. Posteriormente se colocaron en cajas de Petri, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% durante un minuto y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Se tomó un gramo de raíz y se maceró en 9mL de agua destilada estéril y a partir de esta suspensión se realizaron diluciones decimales hasta  $10^{-5}$ . Se inocularon series de cinco tubos con Nfbss con 1mL de las diluciones  $10^{-3}$  hasta  $10^{-5}$  de cada uno de los tratamientos. Los tubos se incubaron a 37°C y la lectura se realizó a las 72 horas.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

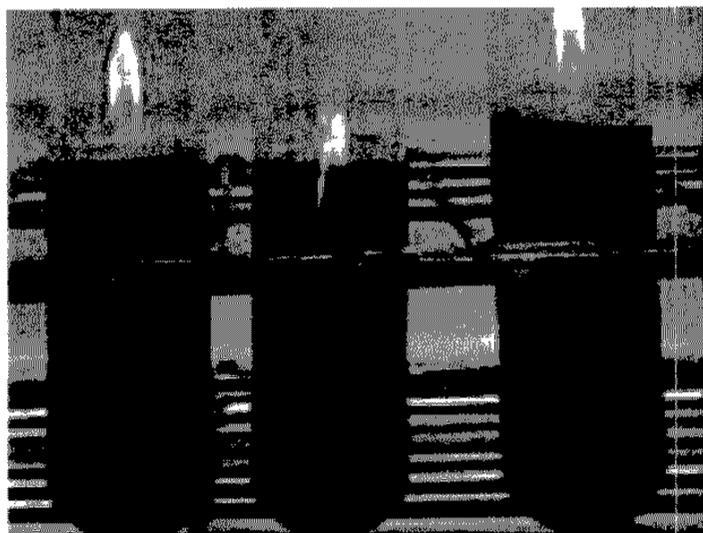
#### 3.1 VERIFICACIÓN DE PUREZA DE LA CEPA

En el Cuadro 7 se presentan las características macroscópicas y microscópicas observadas en los tubos con Nfbss y en las placas de gelosa nutritiva, en este se observa que el desarrollo de la cepa en ambos medios corresponde a las características reportadas por Döbereiner (1978) y Holt en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994). Asimismo se confirmó que el cultivo estaba puro.

**Cuadro 7.** Características de *Azospirillum* observadas en la verificación de pureza de la cepa.

Medio	Características macroscópicas	Características microscópicas
<b>NFb ss</b>	Formación de película de crecimiento entre 2-3mm debajo de la superficie, y alcalinización del medio que confirma la fijación de nitrógeno atmosférico. (Fig. 4)	Tinción en fresco.- las bacterias presentan forma vibrioide, con movilidad helicoidal y gránulos refringentes de poli-β-hidroxibutirato en su interior y forma de cistos.
<b>Gelosa Nutritiva</b>	Colonias rosadas, de forma circular con borde irregular, de aspecto seco y elevación umbonada. (Fig. 5)	Tinción al Gram.- Bacilos, Gram negativo, presencia de gránulos de poli-β-hidroxibutirato

**Figura 4.** *Azospirillum brasilense* VS9 en Nfb ss



**Figura 5.** *Azospirillum brasilense* VS9 en gelosa nutritiva

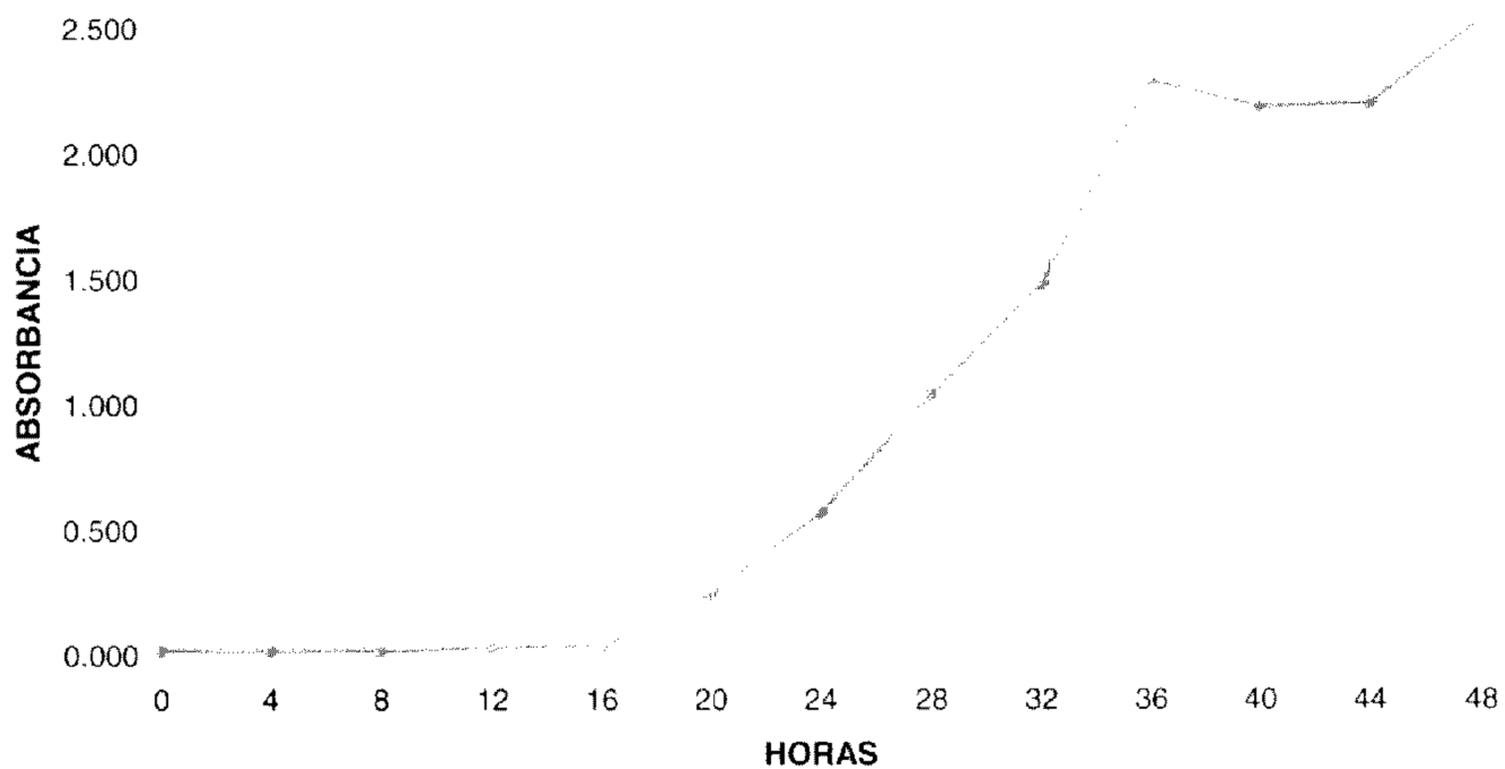


### 3.2 ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO

#### 3.2.1 Curva de crecimiento

En la Figura 6 se presenta la gráfica con las lecturas de absorbancia a diferentes tiempos de incubación, en donde se observa que la fase logarítmica se mantuvo de las 20 a las 36 horas, por esta razón se eligió el cultivo con 36 horas de incubación.

**Figura 6.** Curva de crecimiento de *Azospirillum brasilense* VS9 en caldo nutritivo



#### 3.2.2 Determinación de células viables en el inóculo inicial

Los resultados obtenidos (Cuadro 8) permitieron seleccionar las lecturas de absorbancia adecuadas para el inóculo inicial de cada biofertilizante, las que corresponden a 0.009 para el biofertilizante líquido; 0.013 para el sólido en polvo a 0.032 para el sólido granular a base de turba y 1.951 para el sólido granular a base de alginato.

**Cuadro 8.** Lecturas de absorbancia y población inicial

Biofertilizante	$A_{560}$	UFC /g ó mL
Líquido	0.009	$2.2 \times 10^7$
Sólido polvo (turba)	0.013	$8.2 \times 10^6$
Sólido granular (turba)	0.032	$2.6 \times 10^6$
Sólido granular (alginato)	1.951	$1.3 \times 10^7$

### 3.3 PRODUCCIÓN DE BIOFERTILIZANTES.

El proceso de producción de cada uno de los biofertilizantes es distinto, en cada caso se utilizaron diferentes materias primas y procedimientos:

- Las materias primas utilizadas para la producción del biofertilizante líquido son menos costosas y el procedimiento para la elaboración del mismo es más sencillo.
- En el caso de los biofertilizantes sólidos a base de turba, se debe considerar que la turba no se produce en México, por lo que es necesario importar esta materia prima, por otra parte la esterilización de la misma requiere de un tiempo mayor, además de que el proceso implica mayor manipulación y por lo tanto se necesita un mayor cuidado para evitar contaminación, esto hace del proceso más laborioso y costoso que el biofertilizante líquido.
- Por último el biofertilizante sólido a base de alginato, necesita de materias primas más costosas, mayor cantidad de material, el proceso requiere de más tiempo y manipulación ya que requiere de más pasos y se necesitan 12hrs para la deshidratación de las perlas.

Las Figuras 7 a 10 ilustran los cuatro tipos de biofertilizantes

Figura 7.



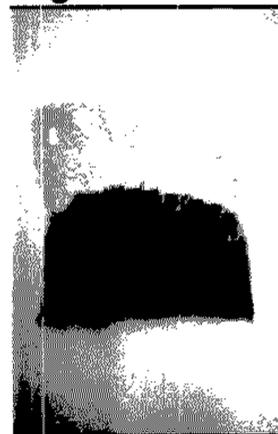
Líquido

Figura 8.



Turba en polvo

Figura 9.



Turba sin moler

Figura 10.



Perlas de alginato

### 3.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS BIOFERTILIZANTES

#### 3.4.1 Pruebas de control de calidad de soportes.

En el Cuadro 9 se observa que el pH de los cuatro soportes fue próximo a la neutralidad y en ninguno de ellos se detectó la presencia de contaminantes. En lo que respecta al porcentaje de humedad, en el caso de la turba, éste se encuentra muy cercano al recomendado, y que corresponden a aproximadamente 9% de humedad (Córdova, 1985).

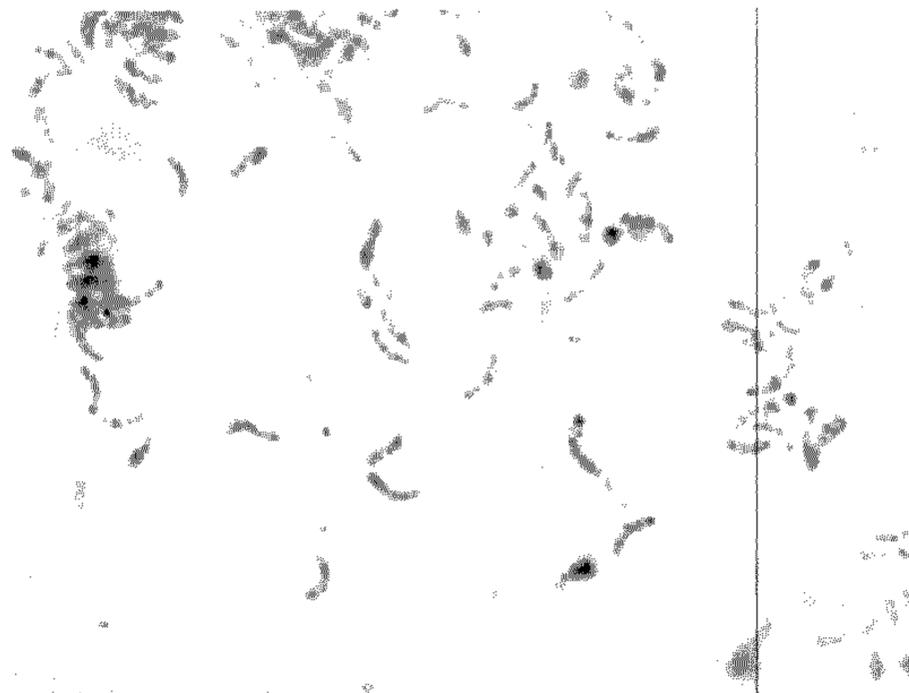
**Cuadro 9.** Control de calidad de los soportes esterilizados

Soportes	pH	# de microorganismos / g	% Humedad
Líquido	7.2	0	ND
Turba polvo	6.9	0	11
Turba granular	6.9	0	10
Alginato	6.85	0	ND

### 3.4.2 Pruebas del control de calidad durante el proceso de producción

Las observaciones de las preparaciones en fresco y con tinción de Gram realizados en los cultivos de activación, adaptación y propagación mostraron un solo tipo de morfología. En las preparaciones en fresco se observaron formas espirales móviles con gránulos refringentes que corresponden a poli- $\beta$ -hidroxibutirato. (Figura 11). En tanto que en los frotos teñidos se observaron formas bacilares curvos Gram negativo, lo que coincide con lo reportado por Tarrand y colab. (1978).

**Figura 11.** *Azospirillum brasilense* VS9.



Preparación en fresco tomada de un cultivo de 72hrs  
en el medio Nfb-ss (100x)

### 3.4.3 Pruebas de control de calidad en producto terminado y almacenado

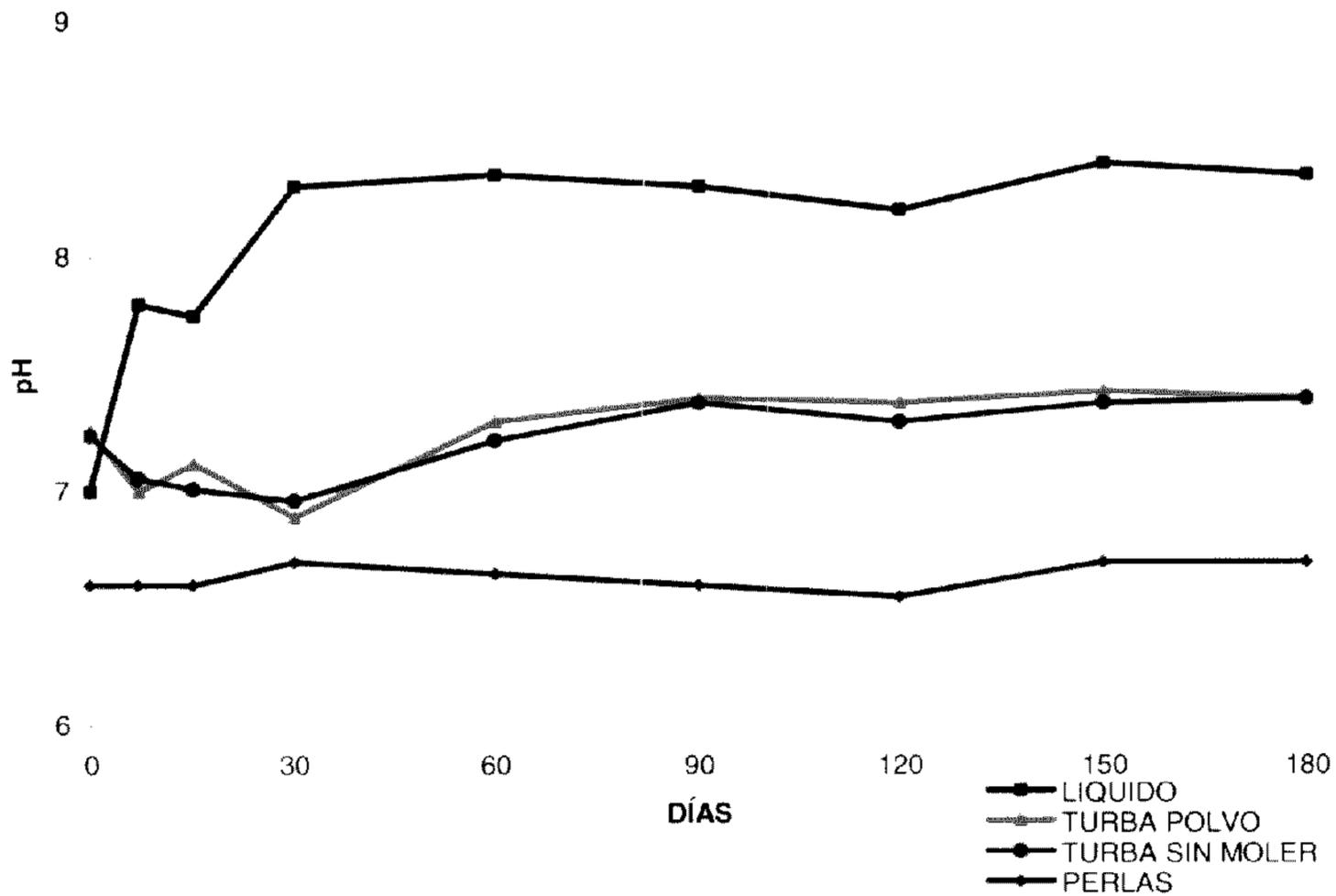
En la Figura 12 se observa que en el producto terminado (tiempo 0) de los cuatro biofertilizantes el pH fluctuó entre 6.6 y 7.3, estos valores se encuentran cercanos a la neutralidad lo que favoreció la propagación y sobrevivencia del microorganismo.

Durante el almacenamiento el pH se mantuvo constante en el biofertilizante a base de alginato, esto se debe a que al permanecer inmobilizadas en la matriz del polímero, el

metabolismo de las bacterias se encuentra reducido; en cambio en el biofertilizante líquido se registraron variaciones que determinaron la alcalinización del mismo. Lo anterior no es sorprendente si se considera que en el biofertilizante líquido el soporte es el mismo medio de cultivo y los productos del metabolismo se acumulan en él lo cual incide en el incremento del pH.

En tanto que en los biofertilizantes sólidos a base de turba, registraron ligeras variaciones durante los primeros 60 días y después se mantuvo constante con valores muy próximos a la neutralidad, en la literatura se indica que las bacterias en la turba se mantienen metabólicamente activas (Bashan y Carrillo, 1996), este hecho no refleja cambios en el pH, y puede deberse a que la turba permite amortiguar los metabolitos producidos por las bacterias.

**Figura 12.** Seguimiento del pH de cuatro biofertilizantes a diferentes tiempos de almacenamiento

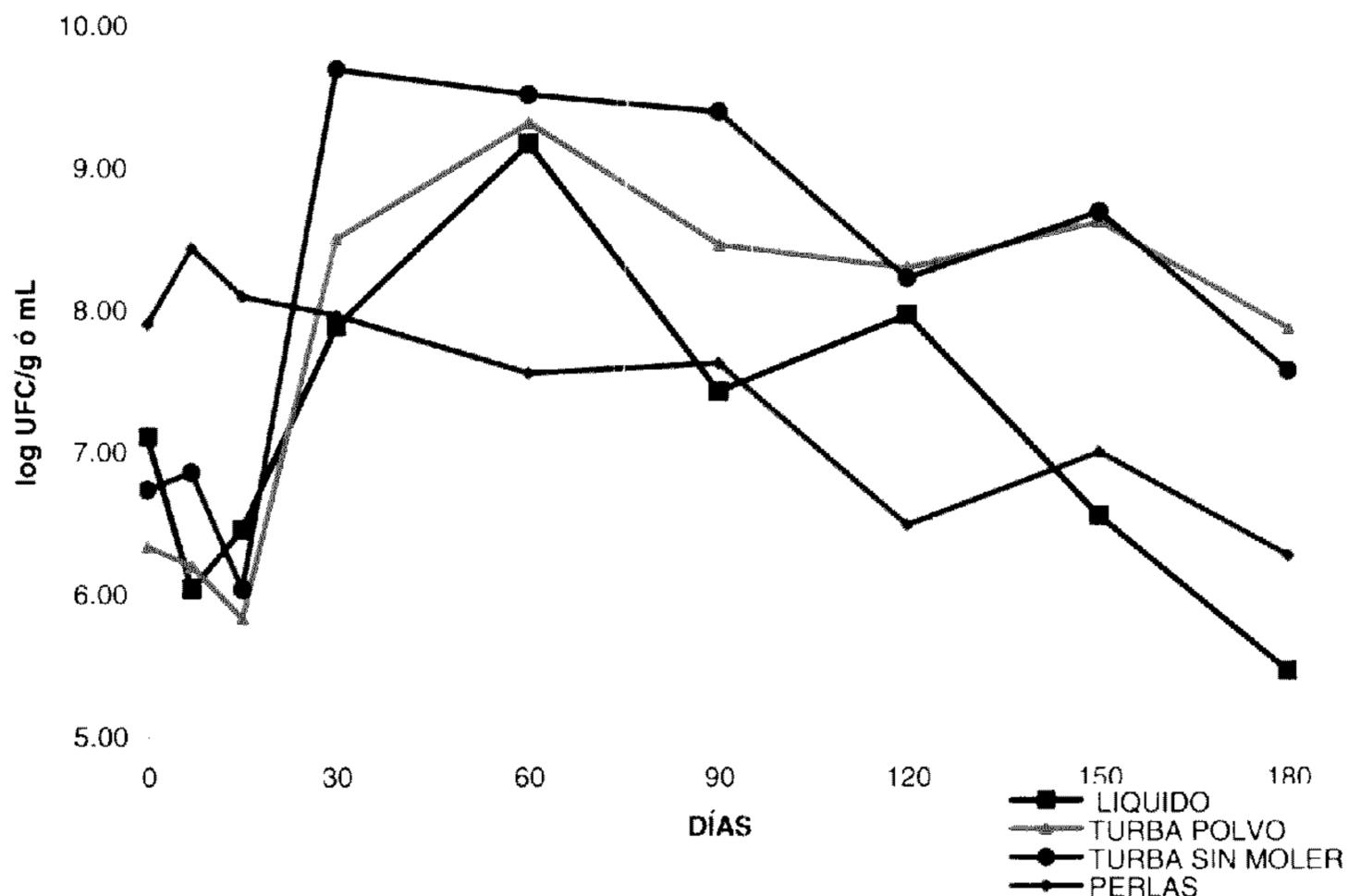


Respecto a la cantidad de bacterias viables en los inoculantes, Bashan y Levanony (1990) menciona que las poblaciones óptimas deben fluctuar entre  $10^6$  y  $10^8$  UFC / g. Los resultados obtenidos indican que en producto terminado, así como durante los primeros cinco meses de almacenamiento, la población se mantuvo dentro del intervalo recomendado por los estándares internacionales. Figura 13.

La disminución de la población en los diferentes biofertilizantes es gradual y de diferente proporción en cada uno de ellos, en el caso del inoculante líquido se observa más pronunciada y se puede relacionar con el cambio en el pH, debido a que al alcalinizarse el medio líquido la sobrevivencia de los microorganismos se vio afectada (Figuras 12 y 13).

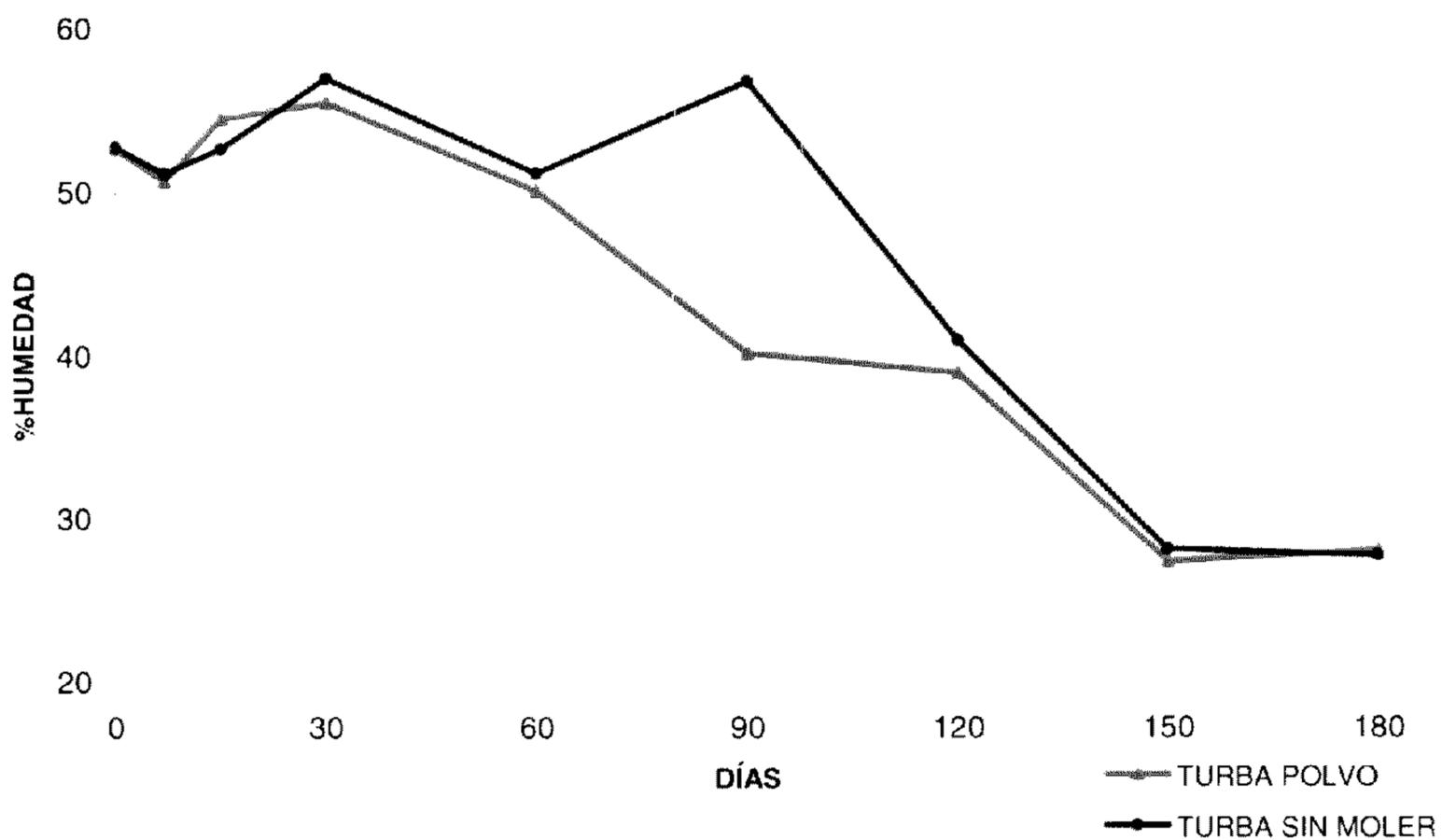
En las determinaciones realizadas a los cuatro biofertilizantes durante los diferentes periodos de almacenamiento, en las placas de gelosa en las que se efectuó la cuantificación se registró el crecimiento de un solo tipo de colonias que corresponden a *Azospirillum* lo que indica que no hubo contaminación con otro tipo de microorganismos.

**Figura 13.** Seguimiento de la viabilidad de *Azospirillum brasilense* VS9 en los biofertilizantes al tiempo cero y durante el almacenamiento



En la Figura 14 se observa que el porcentaje de humedad disminuyó a partir de los 90 días en el biofertilizante en polvo y de los 120 días en el biofertilizante a base de turba sin moler. Después de estos tiempos, el porcentaje de humedad estuvo por debajo del recomendado para este tipo de biofertilizantes que va de 50-60% de humedad (Córdova, 1985). El uso de bolsas de polietileno de las que se desconocía el tamaño del poro pudo influir en la pérdida de humedad, ya que para esta presentación se recomienda usar recipientes con espesor de 20-25 $\mu$ m (Córdova, 1985) con lo que se asegura el intercambio gaseoso, el mantenimiento de humedad y la sobrevivencia de los microorganismos por periodos hasta de 12 meses. No obstante es pertinente enfatizar que a pesar de la pérdida de humedad la densidad poblacional se mantuvo dentro de los intervalos recomendados.

**Figura 14.** Contenido de humedad en biofertilizantes a base de turba



### 3.4.4.1 Verificación de las características fisiológicas de interés agronómico

#### 3.4.4.1.1 Producción de compuestos indólicos

En estudios anteriores se reporta que *Azospirillum brasilense* produce ácido indol acético (AIA); aspecto de gran interés debido a que mediante este mecanismo el microorganismo estimula el crecimiento de las raíces, la absorción de nutrimentos y una mayor producción (Tien y colab, 1979). Esta característica también ha sido reportada en la cepa VS9 (Hernández, 1997) misma que se empleó en este estudio.

En el cuadro 10 se observa que en el cultivo stock de la cepa VS9 de *Azospirillum brasilense*, la producción de ácido indol acético se registra desde las 24 horas. La mayor producción de éste se presenta a las 48 horas para después mantenerse constante. Al comparar estos resultados con los obtenidos de los cultivos a partir de los cuatro biofertilizantes se observa un comportamiento similar lo que indica que la cepa conservó esta característica y que los soportes empleados no influyeron en la misma.

**Cuadro 10.** Producción de Ácido indol acético en cultivos de referencia y los procedentes de biofertilizantes

TIEMPO (horas)	Ácido indol acético (µg/mL)				
	REFERENCIA	LÍQUIDO	TURBA POLVO	TURBA SIN MOLER	PERLAS
24	16.604	20.812	17.545	21.059	18.881
48	68.436	68.535	69.079	68.931	69.426
72	64.871	66.604	66.554	67.941	66.208
96	67.396	67.248	68.485	67.000	66.356
120	69.079	70.812	69.921	70.267	68.980

Resultados similares reportan Hartmann y colab. (1983), quienes indican que la producción de AIA por parte de *A. brasilense* es de 40 y 80 µg/mL, cuando el medio de cultivo de inducción enzimática recomendado por Jain y Patriquin (1985) es

complementado con triptófano. Mascarúa-Esparza y colab. en 1988, reportan que las cepas de *A. brasilense* producen entre 36.5 y 75 µg/mL. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo.

### 3.4.4.1.2 Fijación de nitrógeno

En el Cuadro 11 se observa que los microorganismos procedentes de los cuatro tipos de biofertilizantes fueron capaces de desarrollarse en el medio carente de nitrógeno, lo que confirma que los microorganismos conservaron su capacidad para fijar nitrógeno y que los soportes no influyeron en esta característica.

En todos los casos se registró el crecimiento de la bacteria como una película que se formó en la parte media del tubo y que emigró hacia la superficie a medida que aumentó el tiempo de incubación y la alcalinización del medio de cultivo.

**Cuadro 11.** Desarrollo de *Azospirillum brasilense* VS9 en Nfbss carente de nitrógeno

	24HRS	48HRS	72HRS
PERLAS	+	++	+++
LIQUIDO	+	++	+++
TURBA POLVO	+	++	+++
TURBA SIN MOLER	+	++	+++
STOCK	+	++	+++

+ Ligero vire del medio de cultivo y aparición de película a en la parte media del tubo

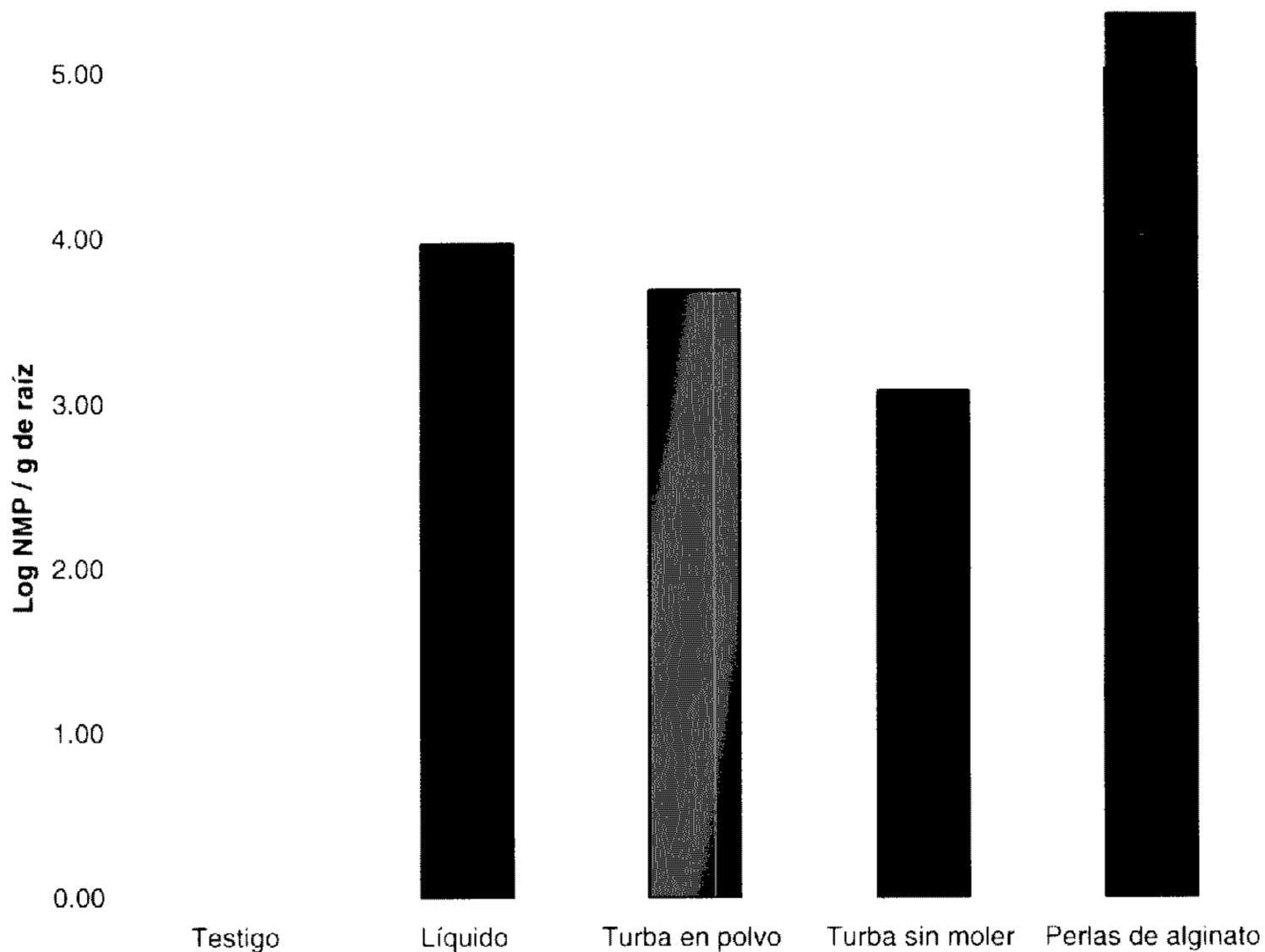
++ Vire intenso del medio de cultivo y película con migración ascendente

+++ Vire completo del medio de cultivo y presencia de la película en la superficie del medio de cultivo.

### 3.4.4.1.3 Colonización de raíz

En la Figura 15 se observa que en las raíces procedentes del tratamiento testigo no se detectó la presencia de *Azospirillum*. En tanto que las bacterias procedentes de los cuatro biofertilizantes conservaron la capacidad de colonización observándose una mayor presencia microbiana en las raíces procedentes del biofertilizante a base de perlas de alginato. Esto coincide con lo reportado por Bashan (1998b), Esquivel (1997) y Urzúa (2001), quienes confirmaron la colonización de raíces de jitomate por *Azospirillum* procedente de biofertilizantes líquidos, e indican poblaciones en raíz entre  $10^3$  y  $10^7$  UFC / g de raíz.

**Figura 15.** Colonización de raíces con *Azospirillum brasilense* VS9 en plántulas de jitomate inoculadas con cuatro biofertilizantes



## CONCLUSIONES

1. La aplicación de buenas prácticas de manufactura condujeron a la obtención de biofertilizantes con buena calidad.
2. Los soportes empleados en la producción de biofertilizantes sólidos no influyeron en la viabilidad y características fisiológicas de la cepa VS9 de *Azospirillum brasilense* .
3. A pesar de la disminución de la población y alcalinización en el biofertilizante líquido la población bacteriana se mantuvo dentro del intervalo recomendado durante el almacenamiento
4. La obtención del biofertilizante a base de perlas de alginato, implica un proceso más complejo y costoso.
5. La centrifugación y deshidratación empleadas para la obtención de perlas de alginato no alteraron la calidad de este tipo de biofertilizante.
6. Todos los biofertilizantes cumplen con las características de interés agrícola, aunque por costos son más recomendables los biofertilizantes a base de turba.

## RECOMENDACIONES

1. Efectuar el seguimiento de la viabilidad de la *Azospirillum brasilense* VS9 por un mayor periodo a fin de establecer la caducidad de los productos.
2. Realizar estudios del efecto de la aplicación de las cuatro presentaciones de biofertilizantes sobre el desarrollo de las plantas de interés agrícola
3. Establecer colaboración con otras instituciones de investigación nacionales y de otros países a fin de generar un proyecto de normatividad que regule la calidad de este tipo de productos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barea, J.M., y Brown M.E. 1974. Effects on plant growth produced by *Azotobacter paspali* related to synthesis of plant growth regulated substances. J. Appl. Bacteriol. 40: 583-593.
- Barton, L.L., Johnson, G.V., Orbuck Miller, S. 1986. The effect of *Azospirillum brasilense* on iron absorption and translocation by *Sorghum*. J. Plant. Nutr. 557-565.
- Bashan, Y. 1986. Alginate bead as a synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. Applied and Environmental Microbiology. 51: 1089-1098
- a Bashan, Y. 1998. Inoculants of Growth-Promoting Bacteria for use in Agriculture. Biotechnology Advances, Vol. 16, No.4: 729-770.
- b Bashan, Y. 1998. *Azospirillum* Plant Growth-Promoting Strains are Nonpathogenic on tomato, pepper, cotton and wheat. Can. J. Microbiol. 44: 168-174.
- Bashan, Y. y Carrillo A. 1996. Inoculantes microbianos para la agricultura sostenible. En: Perez-Moreno J. y Ferrera-Cerrato R. (eds.). Nuevos Horizontes en Agricultura: Agroecología y Desarrollo Sostenible. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México. p. 125-155.
- Bashan, Y., y de-Bashan, L.E. 2005. Bacteria/Plant growth-promotion. In: Encyclopedia of soils in The Environment. (Ed.) D. Hillel, Elsevier, Oxford, U.K.. Volume 1. pp.103-115.
- Bashan, Y., Holguin, G. 1997. *Azospirillum* – Plant Relationships: Environmental and Physiological Advances(1990-1996). Can. J. Microbiol. Vol. 43. p. 103-121.
- Bashan, Y., Levanony, H. 1990. Current Status of *Azospirillum* as a Challenge for Agriculture. Can. J. Microbiol. 36:591-598.
- Bashan, Y., Levanony, H. y Whitmoyer, R.E., 1991. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. Journal of General Microbiology 137: 187-196.
- Bashan, Y., Singh, M. Y Levanony, H. 1989. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. Can. J. Bot.. 67: 2429-2439.
- Becking, I.H.1982. *Azospirillum lipoferum*-a reappraisal. En: Klingmüller, W. *Azospirillum* Genetics, physiology, ecology, Berk Häuser Verlag, Basel. pp.130-149.
- Bloemberg, G.V., y Lutenberg, P.J. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Plant Biology. 4:343-350.
- Bothe, H., Körsgen, H., Lehmacher, T. y Hundeshagen, B. 1992. Differential effects of *Azospirillum*, auxin and combined nitrogen on the growth of the roots of wheat. Symbiosis. 13: 167-179.
- Brown, M.E. 1976. Role of *Azotobacter paspali* in association with *Paspalum notatum*. J. Appl. Bacteriol. 40:341-348.
- Burton, J.C. 1980. New Development in inoculating legumes. En: Subba, R.N.S. (ed) Recent Advances on Biological Nitrogen Fixation. Edward Arnol, India. p. 380-405.
- Cano, Z.N.L. 1988. Estudio comparativo de la calidad de diferentes inoculantes biológicos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D.F. 82 p.

- Chao, W.C. y Alexander, M. 1984. Mineral Soils as carriers for *Rhizobium* inoculants. *Applied and Environmental Microbiology*. 47:94-97.
- Córdova, U. R. 1985. Evaluación de la turba nacional como soporte para inoculantes de leguminosas con cepas de *Rhizobium japonicum*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- Crawford, S.L. y Berryhill, D.L. 1983. Survival of *Rhizobium phaseoli* in coal-based legume inoculants applied to seeds. *Applied and Environmental Microbiology*. 45: 703-705.
- Davies, P. J. 1995. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht: Kluwer.
- Daza A., Santamaria, C. Rodríguez-Navarro, D.N., Camacho, M., Orive, R. y Tempano F. 2000. Perlite as a carrier for bacterial inoculants. *Soil Biology and Biotechnology*. 32: 567-572.
- Dekhil, S.B., M. Cahil, E. Stackebrandt, and L. I. Sly. 1997. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 20:72-77.
- Döbereiner, J.; Marriel, I.E. y Nery, M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.*, 22:1464-1473,
- Döbereiner, J. 1983. Ten years *Azospirillum*, p. 9-23. En W. Klingmüller(ed.), *Azospirillum II: Genetics, physiology, and ecology*. Birkhauser, Basel Switzerland. (Experientia supplementum, 48).
- Döbereiner, J. 1992. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*, p. 2236-2253. En A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder y K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. Springer-Verlag. New York.
- Esquivel-Cote, R. 1997. Efecto de la fertilización biológica con *Azospirillum* y la fertilización química simultánea sobre el desarrollo de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) bajo condiciones de invernadero. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F.
- Esquivel-Cote, R. 2002. Selección e identificación de rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal aisladas de cultivos regados con aguas residuales y su efecto sobre el desarrollo del jitomate. (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- Fages, J. 1992. An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. *Symbiosis*. 13:15-16.
- Falik, E., y Okon, Y. 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense* biomass production, survival and growth promotion of *Serratia italica* and *Zea mays*. *Soil Biol. Biochem.* 28:123-126.
- Fesenko, A.N., N. A. Provorov, I.F. Orlov, B.V. Simarov. 1995. Selection of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains for inoculation of *Pisum sativum* L. Cultivars: analysis of symbiotic efficiency and nodulation competitiveness. *Plant Soil* 172: 189-198.
- Flores Ayala, A. A. 1985. Aislamiento y caracterización de *Azospirillum* sp de la rizosfera de sorgo en Valle de Santiago, Gto. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.
- Gault, R.R., Chase, D.L. y Brockwell, J. 1982. Effects of spray inoculation equipment on the viability of *Rhizobium* spp. In liquid inoculants for legumes. *Aust. J. Expt. Agric. Anim. Husb.* 22: 299-309.

- Gibson, A.H., Demezas, D.H, Gault, R.R. Bhuvanewari, T.V. y Brockwell, J. 1990. Genetic stability in rhizobia in the field. *Plant Soil*. 129: 37-44.
- Glick, B.R., Karaturovic, D.M. y Newell, P.C. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth. *Biotechnology advances*. 19:135-138.
- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G., Penrose, D.M. 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press. London.
- Glick, B.R.; Penrose, D.M. y Wenbo, M. 2001. Meeting report. Bacterial promotions of plant growth. *Biotechnology Advances*. 19:135-138.
- González S., D. 2001. Efecto de la inoculación de *Azospirillum* y hongos micorrizicos arbusculares en el crecimiento de *Lycopersicon esculentum*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- Hartmann A., Singh, M., y Klingmüller, W. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29, 916-923.
- Hartmann, A., M. Stoffels, B. Eckert, G. Kirchhof, y M. Schloter. 2000. Analysis of the presence and diversity of diazotrophic endophytes, p. 727-. *En* E. W. Triplett (ed.), *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process*. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- Hedge, S.V. y Brahma Prakash, G.P. 1992. A dry granular inoculant of *Rhizobium* for soil application. *Plant Soil*. 144: 309-311.
- Hernández B., M. A. 2001. Evaluación del efecto de dos grupos de rizobacterias productoras de fitohormonas: *Azospirillum* y solubilizadoras de fósforo, sobre el crecimiento de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- Hernández P., S. y Ruiz S., H. 1987. Evaluación del comportamiento de cepas de *Azospirillum* en turba. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Hernández P., O. 1997. *Azospirillum* como productor de fitohormonas (auxinas y giberelinas) *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- Holt, J.G. 1994. *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. 9ed. Baltimore, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Hynes, R.K., Craig, K.A., Covert, D., Smith, R.S. y Rennie R.J. 1995. Liquid rhizobial inoculants for lentil and field pea. *J. Prod. Agric.* 8: 547-552.
- Irizar Garza, M.B. Vargas Vázquez, P., Garza García, D., Tut y Couoh, C., Rojas Martínez, I., Trujillo Campos, A., García Silva, R., Aguirre Montoya, D., Concepción Martínez Glz., J., Alvarado Mendoza, S., Grageda Cabrera, O., Valero Garza, J., Aguirre Medina, J.F. 2003. Respuesta De Cultivos Agrícolas a los Biofertilizantes en la Mesa Central De México. *Agricultura Técnica en México*. Vol. 29. Núm. 2.
- Jain, D. K., y Patriquin, D. G.. 1985. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.* 31:206-210.
- Janzen, R.A., Rood S. B., Dormaar, J.F., y McGill, W.B. 1992. *Azospirillum brasilense* produces gibberelin in pure culture on chemically defined medium and in co-culture on straw. *Soil Biol. Biochem.* 24: 1061-1064.

- Keyser, H.H. 1987. The role of culture collections in biological nitrogen fixation. En: Elkam, G.H. (ed). Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. World J. Microbiol. Biotech. 14:389-397.
- Khammas, K. M., E. Ageron, P. A. D. Grimont, y P. Kaiser. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. Res. Microbiol. 140:679-693.
- Kremer, J.R. y Peterson, L.H. 1982. Effect of inoculant carrier on survival of *Rhizobium* on inoculated seed. Soil Science. 134:117-125.
- Lorence, A. 1999. Agrobiológicos. Cuadernos de vigilancia biotecnológica. Solleiro, J.L. y Castañón, R. (eds). Centro para la innovación Tecnológica/UNAM
- Lupwayi, N.Z. Olsen, P.E., Sande, E.S., Keyser, H.H., Collins, M.M. Singleton, P.W. y Rice, W.A. 2000. Inoculant quality and its evaluation. Field Crops Research. 65:259-270.
- Lyn, W., Okon, Y., Hardy, R.W.F. 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. Appl. Eviro. Microbiol. 45:1775-1779.
- Mascarúa-Esparza, M.A., Villa-González, R. y Caballero-Mellado, J. 1988. Acetylene reduction and indolacetic acid production by *Azospirillum* isolates from *Cactaceous* plants. Plant and Soil. 106: 91-95.
- Mauseth, J. D. 1991. Botany: An Introduction to Plant Biology. Philadelphia: Saunders. pp. 348-415.
- Michiels, K.W., Croes, C.L. y Vanderleyden, J. (1991) Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. J. Gen. Microbiol. 137, 2241-2246.
- Mulongoy, K., Gianinazzi, S., Roger, P.A. y Dommergues, Y. 1992. Biofertilizers: Agronomic and environmental impacts and economics. En: Da Silva, E.J., Ratledge, C. y Sasson, A. (eds). Biotechnology: Economic and social aspects. Issues for developing countries. Cambridge University Press. G.B. p. 55-69.
- Okon, Y., Albrecht, S. L. y Burris, R. H.. 1976. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. J. Bacteriol. 127:1248-1254.
- Okon, Y. 1985. *Azospirillum* as a Potential Inoculant or Agriculture. Trends Biotechnol. 3: 223-228.
- Okon, Y., y Kapulnik. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. Plant Soil. 90: 3-16.
- Okon, Y., y Itzigsohn, R. 1992. Poly-b-hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. FEMS Microbiol. Rev. 103:131-140.
- Okon, Y., y Labandera-Gonzalez, C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. and Biochem. 26: 1591-1601.
- Okon, Y. y Vanderleyden, J. 1997. Root associated *Azospirillum* species can stimulate plants. ASM News. 63: 366-370.
- Penrose D.M y B.R Glick. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiologia Plantarum. 118; 10-15.
- Ramírez-Gamía, R.M., Tsuzuki-Reyes, G., Arreguin Espinosa de los Monteros, R., Ferrera-Cerrato, R., Urzúa, M.C., Esquivel-Cote, R., Gonzalez, D., Hernández-Bautista, M., Tenorio, M.E., Rodríguez, J.L., Castillo, N.D., Franco Mendoza, M., Quiroga, M.A. 2001. Estudio comparativo del

efecto de bacterias promotoras del desarrollo vegetal sobre el crecimiento y rendimiento de jitomate. Informe final del proyecto 27972B. CONACYT.

Ramírez-Gama, R.M. 2002. Producción y control de calidad de inoculantes agrícolas bacterianos. Agricultura Técnica en México. INIFAP, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, S.I.R.C.E. y Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, México, p. 67-86.

Ramírez, R.M. 1982. Estudio comparativo de la supervivencia de *Rhizobium phaseoli* en compostas y turba. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.

Ramos, A. y Callao, V. 1967. El empleo de la solubilización de fosfatos en placa como técnica diferencial bacteriana. Microbiología Española. 20:1-2.

Raven, P. H., Evert, R. F., y Eichhorn, S. E. 1992. Biology of Plants. New York: Worth. pp. 545-572.

Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans, y J. De Ley. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). Int. J. Syst. Bacteriol. 37:43-51.

Rojas Garcidueñas, M. y Ramírez H. 1993. Control Hormonal del desarrollo de las plantas. Fisiología Tecnología Experimentación. Segunda edición. Limusa. Grupo Noriega Editores. México.

Rodríguez-Cáceres, E. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Appl. Environ. Microbiol. 44:990-991.

Ronchi, A.L., Grassano, A. y Balatti, A.P. 1997. Perlite as a carrier for legume inoculants. Agrochimica. 41:186-195.

Salisbury, F. B., y Ross, C. W. 1992. Plant Physiology. Belmont, CA: Wadsworth. pp. 357-407, 531-548.

Sarig, S., Blum, A, Okon, Y. 1988. Improvement of the water status and the yield of field growth sorghum (*Sorghum bicolor* L.) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. J. Agric. SCI. 110:271-277

Sly, L. I., y Stackebrandt, E. 1999. Description of *Skermanella parooensis* gen. nov., sp. nov. to accommodate *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* following the transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum*. Int. J. Syst. Bacteriol. 49:541-544.

Smith, R.S. 1992. Legume inoculant formulation and application. Can. J. Microbiol. 38: 485-492.

Sparrow, S.D. y Ham, G.E. 1983. Survival of *Rhizobium phaseoli* in six carriers materials. Agronomy Journal. 75: 181-184.

Stacey, G., Burris, R. y Evans, H. 1992. Biological Nitrogen Fixation. Chapman & Hall. USA.

Steenhoudt, D., Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum* a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiology Reviews 24:487-506.

Stephens , J. H.G. y Rask, H.M. 2000. Inoculant production and formulation. Field Crop Research. 65: 249-258.

Strijdom, B.W. y Deschodt, C.C. 1975. Carriers of rhizobia and effect of prior treatment on survival of rhizobia. En: Nutman, P.S. (ed). Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cambirdge University Press. London. p. 151-168.

Taiz, L. y Zeiger, E. 1991. Plant Physiology. Benjamins/ Cummings Publishin Company, Redwood City, CA. p. 565.

Tal, S. y Okon, Y. 1985. Production of the reserve material poly-bhydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. Can. J. Microbiol. 31:608-613.

Tarrand, J. J., N. R. Krieg, y J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. And *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24:967-980.

Tien, T. M., M. H. Gaskins, y D. H. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl. Environ. Microbiol. 37:1016- 1024.

Trevors, J.T., Van Elsas, J.D., Lee, H. y Van Overbeek, L.S. 1992. Use of alginate and other carriers for encapsulation of microbial cells for use in soil. Microbiol. Releases. 1: 61-69.

Umali-García, M., Hubel, D.H. Gaskins, M.H., Dazzo, F.B. 1980. Assosiation of *Azospirillum* with grass roots. Appl. Evirom.Microbiol.39:219-226.

Urzúa, H. M. del C. 1997. Evaluación del efecto de *Azospirillum* sobre el rendimiento de *Lycopersicum esculentum* (bajo condiciones controladas. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. UNAM. México

Urzúa, H. M. del C. 2001. Selección de la concentración óptima de *Azospirillum* y su combinación con diferentes dosis de fertilización en dos sistemas de cultivo de jitomate (*Lycopersyson esculentum*). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.

Valtierra, L.M. 1992. Potencial de *Azospirillum* sp. como biofertilizante biológico de *Sorghum bicolor*(L.) Moench. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo.

Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J. y Vassileva, N. 1999. Effect of encapsulated cells of *Enterobacter* s pon plant growth and phosphate uptake. Bioresource Technology. 67:229-232.

Williams, P.M. 1984. Current use legume inoculant tecnology. En: Alexander, M. (ed) BNF. Ecology Technology and Physioly. Plenum Press New York y London. p. 173-199.

Yardin, M.R.; Kennedy, I.R. y Thies, J.E. 2000. Development of high quality carrier material for field delivery of key microorganisms used as bio-fertilisers and bio-pesticides. Radiation Physics and Chemistry. 57:565-568.

Zaady, E. y Okon, Y. 1990. Cultural Conditions affecting *Azospirillum brasilense* cell agregation and adsorption to maize roots. Soil. Biol. Biochem. 22:1103:1107.

### **CITAS ELECTRÓNICAS**

Regional Biofertilizer Development Center [en línea]. 2005. India. Disponible en Internet: [http://manipur.nic.in/rbdc/quality\\_control.htm](http://manipur.nic.in/rbdc/quality_control.htm).

Plant hormones. [en línea].2005. Disponible en Internet: <http://www.plant-hormones.info/>

**ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS****Medio NFb semisólido**

Medio recomendado por Tarrand y colab (1978) para el aislamiento y caracterización primaria de *Azospirillum*.

Ácido succinico	5.0	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	g
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.2	g
NaCl	0.1	g
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0.02	g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.002	g
MnSO <sub>4</sub> 2 H <sub>2</sub> O	0.1	g
FeCl <sub>3</sub>	0.002	g
KOH	4.5	g
Azul de bromotimol	2.0	mL
Agar	4.0	g
H <sub>2</sub> O	1	L
pH	6.8	

**Gelosa nutritiva**

Extracto de carne	3	g
Peptona de carne	5	g
Agar	17	g
H <sub>2</sub> O	1	L
pH	7.0	

**Medio BMS (agar papa)**

Papas cortadas	200	g
Ácido málico	2.5	g
Azul de bromotimol (Sol. alcohólica al 0.5%)	2	gotas
KOH	2.5	g
Azúcar comercial	2.5	g
*Solución de vitaminas	1.0	mL
Agar	15	g
H <sub>2</sub> O	1	L

\*(0.1g de biotina, 0.02g de piridoxina en 1L de agua destilada)

**Caldo nutritivo**

Extracto de carne	3	g
Peptona de carne	5	g
H <sub>2</sub> O	1	L
pH	7.0	

**Medio Tyler (Jain y Patriquin, 1985)**

Succinato de Na	2.5	g
Fructuosa	2.5	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4	g
MgSO <sub>4</sub>	0.2	g
NaCl	0.1	g
CaCl <sub>2</sub>	0.02	g
FeCl <sub>3</sub>	0.01	g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.002	g
Agar	14	g
H <sub>2</sub> O	1	L
pH	6.8-7.0	
Triptófano	0.1	g

Medio líquido se adiciona NH<sub>4</sub>Cl 1.5g

La fructuosa y la fuente de fósforo se esterilizan cada uno por separado

El triptófano se esteriliza por filtración

**Reactivo de Salkowski**

FeCl <sub>3</sub>	3	mL
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60	mL
H <sub>2</sub> O	100	mL

**Buffer de fosfatos para disolver perlas de alginato**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.9072g/100mL
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.1867g/100mL

**Solución de CaCl (2%)**

CaCl	2	g
H <sub>2</sub> O	100	mL

## ANEXO 2.

**Cuadro 12.** Curva de crecimiento de *Azospirillum brasilense* VS9 en caldo nutritivo

HORAS	A	B	C	PROMEDIO
0	0.028	0.025	0.024	0.026
4	0.023	0.022	0.023	0.023
8	0.027	0.026	0.025	0.026
12	0.048	0.036	0.032	0.039
16	0.040	0.039	0.040	0.040
20	0.330	0.172	0.251	0.251
24	0.672	0.488	0.562	0.574
28	1.005	1.080	1.043	1.043
32	1.530	1.440	1.485	1.485
36	1.890	2.680	2.320	2.297
40	2.157	2.228	2.193	2.193
44	2.050	2.360	2.205	2.205
48	2.684	2.420	2.520	2.541

**Cuadro 13.** Promedio de cuenta de unidades formadoras de colonias de biofertilizantes a diferentes tiempos

UFC	0 DIAS	7 DIAS	15 DIAS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	120 DIAS	150 DIAS	180 DIAS
5 PERLAS	$3.20 \times 10^5$	$1.10 \times 10^6$	$5.00 \times 10^5$	$5.70 \times 10^3$	$1.44 \times 10^5$	$1.70 \times 10^5$	$1.23 \times 10^4$	$4.00 \times 10^4$	$7.50 \times 10^3$
1g PERLAS	$8.06 \times 10^7$	$2.77 \times 10^8$	$1.26 \times 10^8$	$1.44 \times 10^6$	$3.64 \times 10^7$	$4.28 \times 10^7$	$3.11 \times 10^6$	$1.01 \times 10^7$	$1.89 \times 10^6$
1mL LIQUIDO	$1.30 \times 10^7$	$1.10 \times 10^6$	$2.90 \times 10^6$	$7.70 \times 10^7$	$1.50 \times 10^9$	$2.70 \times 10^7$	$9.30 \times 10^7$	$3.60 \times 10^6$	$2.90 \times 10^5$
1g TURBA POLVO	$2.20 \times 10^6$	$1.60 \times 10^5$	$6.80 \times 10^5$	$3.20 \times 10^8$	$2.10 \times 10^9$	$2.90 \times 10^8$	$2.00 \times 10^8$	$4.20 \times 10^8$	$7.45 \times 10^7$
1g TURBA SIN MOLER	$5.50 \times 10^6$	$7.30 \times 10^6$	$1.10 \times 10^6$	$5.00 \times 10^9$	$3.30 \times 10^9$	$2.50 \times 10^9$	$1.70 \times 10^8$	$5.00 \times 10^8$	$3.76 \times 10^7$

**Cuadro 14.** Promedio de la determinación de pH de cuatro biofertilizantes a diferentes tiempos

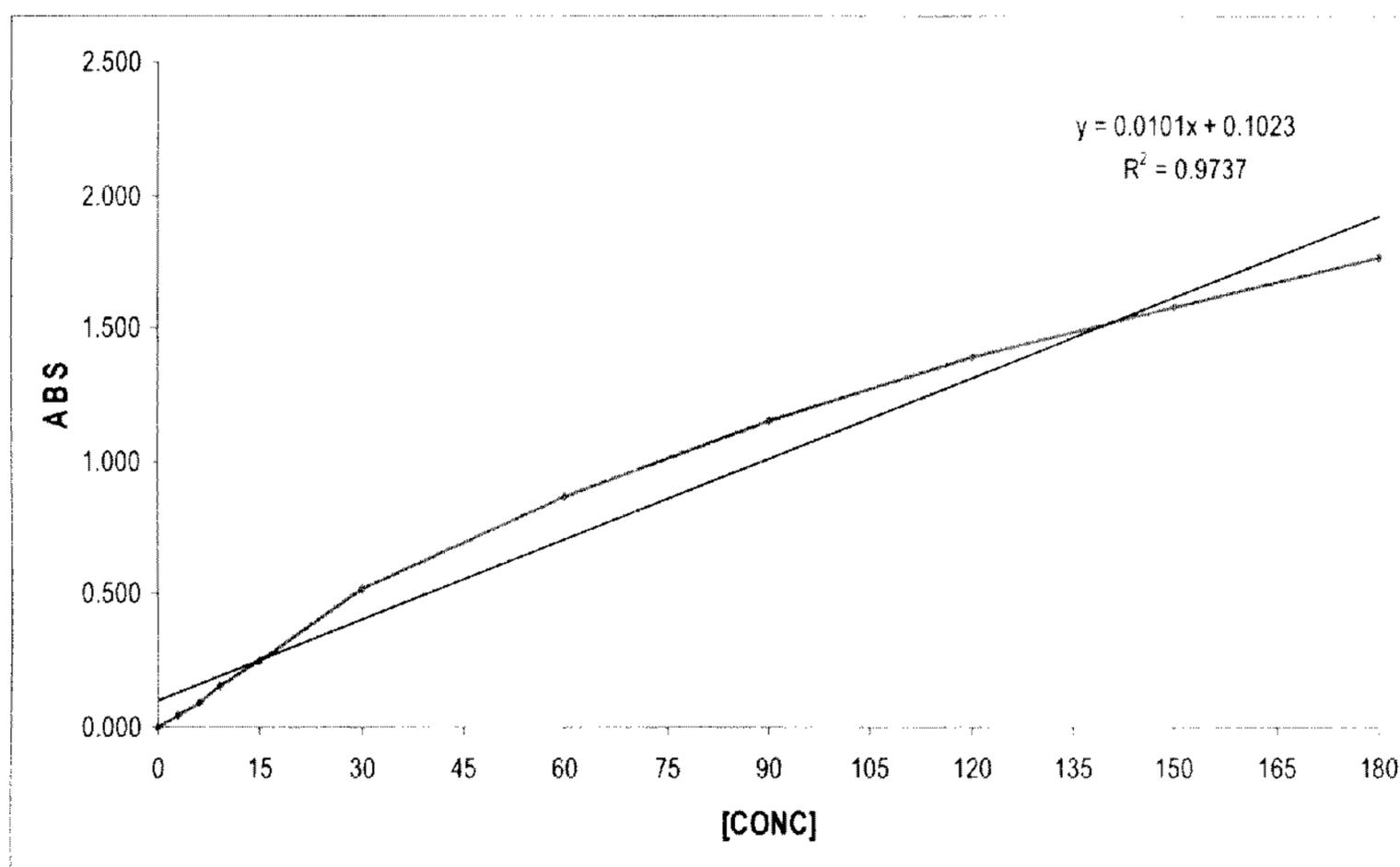
	0	7	15	30	60	90	120	150	180
PERLAS	6.6	6.6	6.6	6.7	6.65	6.6	6.55	6.7	6.7
LIQUIDO	7	7.8	7.75	8.3	8.35	8.3	8.2	8.4	8.35
TURBA POLVO	7.26	7	7.12	6.89	7.3	7.4	7.38	7.43	7.4
TURBA SIN MOLER	7.24	7.06	7.01	6.96	7.22	7.38	7.3	7.38	7.4

**Cuadro 15.** Promedio de la determinación de % de humedad de biofertilizantes a base de turba a diferentes tiempos

	0	7	15	30	60	90	120	150	180
TURBA POLVO	52.7	50.7	54.5	55.5	50.1	40.2	39	27.4	28.1
TURBA SIN MOLER	52.8	51.2	52.7	57	51.2	56.8	41	28.2	27.8

**Cuadro 16.** Curva estándar de Ácido Indol Acético (AIA)

[ $\mu\text{g/mL}$ ]	ABS
0	0.000
3	0.047
6	0.091
9	0.155
15	0.251
30	0.522
60	0.867
90	1.154
120	1.390
150	1.576
180	1.762

**Figura 16.** Curva estándar de AIA [ $\mu\text{g/mL}$ ]

**Cuadro 17.** Lecturas de absorbancia (560nm) para determinación de auxinas

HORAS	PERLAS	LIQUIDO	TURBA POLVO	TURBA SIN MOLER	STOCK
24	0.294	0.241	0.270	0.329	0.259
	0.292	0.384	0.289	0.301	0.281
48	0.789	0.817	0.803	0.807	0.798
	0.818	0.772	0.797	0.790	0.789
72	0.773	0.776	0.777	0.788	0.756
	0.769	0.774	0.772	0.789	0.759
96	0.766	0.802	0.787	0.780	0.782
	0.779	0.761	0.801	0.778	0.784
120	0.799	0.813	0.805	0.800	0.803
	0.799	0.822	0.812	0.824	0.797

**Cuadro 18.** Concentración de AIA [ $\mu\text{g/mL}$ ]

	PERLAS	LIQUIDO	TURBA POLVO	TURBA SIN MOLER	STOCK
24	18.980	13.733	16.604	22.446	15.515
	18.782	27.891	18.485	19.673	17.693
48	67.990	70.762	69.376	69.772	68.881
	70.861	66.307	68.782	68.089	67.990
72	66.406	66.703	66.802	67.891	64.723
	66.010	66.505	66.307	67.990	65.020
96	65.713	69.277	67.792	67.099	67.297
	67.000	65.218	69.178	66.901	67.495
120	68.980	70.366	69.574	69.079	69.376
	68.980	71.257	70.267	71.455	68.782