



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE DIFERENTES
BIOFERTILIZANTES Y COMPOSTA EN EL
CRECIMIENTO VEGETAL DE HORTALIZAS
CULTIVADAS BAJO CONDICIONES DE
INVERNADERO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

OMAR GUILLERMO VELASCO BECERRIL



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: ADRIANA GUADALUPE MEJÍA CHÁVEZ

VOCAL: PROFESOR: JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO

SECRETARIO: PROFESOR: ROSALBA ESQUIVEL COTE

1er. SUPLENTE: PROFESOR: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

2º SUPLENTE: PROFESOR: MARÍA GUADALUPE TSUZUKI REYES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EXPERIMENTAL. EDIFICIO A. FACULTAD DE QUÍMICA.

ASESOR DEL TEMA:

ROSALBA ESQUIVEL COTE

SUPERVISOR TÉCNICO:

MARÍA GUADALUPE TSUZUKI REYES

SUSTENTANTE:

OMAR GUILLERMO VELASCO BECERRIL

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química.

Al Colegio de Profesores de la Facultad de Química (UNAM) y la sección 024 de la AAPAUNAM por el apoyo recibido mediante la cátedra "Angelina Quintero".

Al Laboratorio de Microbiología Experimental

A la Dra. Rosalba Esquivel Cote por el gran apoyo académico y humano recibido de su parte

A la Q. F. B. Adriana Guadalupe Mejía Chávez y al Dr. José de Jesús, por sus comentarios y sugerencias para enriquecer este trabajo.

A MVZ Fermín Jiménez Flores, a Don Pedro Jiménez Olivares y a Mauricio Jiménez por el invaluable apoyo recibido.

A la M. en C. María Guadalupe Tsuzuki Reyes

A la M. en C. Rosa María Ramírez Gama.

A mis compañeros Pedro Pablo Chavero Guerra, Flor Anel Jiménez Acuña y Darío Rodrigo de la Cruz por el análisis microbiológico de la composta.

DEDICATORIAS

**“¡Tú gran astro!
¿Qué sería de tu felicidad si no tuvieras a aquellos a quienes
iluminas?
(Así habló Zaratustra)**

A mí padre Guillermo y madre Angélica, que con el anhelo de su libertad y paternidad han logrado labrar mi camino hacia la nobleza del espíritu.

A mis hermanos Héctor y Camila, por el gran vínculo que nos une y nos convierte en uno solo.

A mí abuela Socorro y a mí tío Manuel por todo el apoyo recibido durante todo este tiempo.

A mis amigos, soñadores despiertos tras el crepúsculo de un mundo imposible. En especial a ti duendecilla, tal vez el futuro sea incierto pero nunca dejes de soñar como la niña que fuiste.

ÍNDICE

➤ Introducción	1
➤ Hipótesis	2
➤ Objetivos	2
➤ Antecedentes	
Requerimientos nutricionales en plantas	3
Fertilizantes químicos	4
a) Fertilizantes nitrogenados	5
b) Fertilizantes fosfatados	6
Biofertilización	6
Rizosfera	7
Rizobacterias	7
Mecanismos de RPCV	9
Rizobacterias utilizadas como biofertilizantes	15
a) <i>Azospirillum</i>	15
b) <i>Bacillus</i>	19
c) <i>Pseudomonas</i>	21
Composta	22
Importancia del cultivo de hortalizas en México	27
➤ Metodología	29
➤ Resultados	39
➤ Discusión de resultados	49
➤ Conclusiones	54
➤ Expectativas	54
➤ Bibliografía	55
➤ Anexo I: Tablas de resultados	60

Y no dejamos de preguntarnos,
una y otra vez,
Hasta que un puñado de tierra
Nos calla la boca...
Pero ¿es eso una respuesta?

HEINRICH HEINE
"LAZARO"
(1854)

Ubi dubium ibi libertus.

(Donde hay duda,
hay libertad)

INTRODUCCIÓN

El uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) como biofertilizantes de cultivos agrícolas y forestales ha sido una biotecnología muy atractiva para sustituir el uso de agroquímicos en campo y así evitar la contaminación del suelo y agua. Algunos géneros de RPCV como *Azospirillum*, *Bacillus*, y *Pseudomonas* han demostrado que su inoculación en plantas incrementa la biomasa, contenido nutrimental, rendimiento y resistencia a patógenos. Además, cuando el biofertilizante es aplicado en combinación con composta favorece la retención de agua en el suelo. En México, los biofertilizantes hechos a base de *Azospirillum*, *Rhizobium*, Micorrizas o una combinación de ellos, se aplican en sólo ciertas zonas geográficas y en cultivos como leguminosas, gramíneas como el maíz y la caña de azúcar, entre otros, como el algodón, papaya y papa; no obstante, en casi ningún caso se aplica a especies hortícolas. Las hortalizas son cultivos que requieren del almácigo para producir las plántulas que serán trasplantadas a campo, y requieren de dosis altas de fertilizantes químicos. Nuestro país se encuentra entre los principales productores y exportadores de hortalizas en el mundo. Sin embargo, el efecto de las RPCV en la colonización y el crecimiento de plántulas de hortalizas, no ha sido hondamente estudiado.

HIPÓTESIS

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) promueven el crecimiento vegetal mediante diferentes mecanismos de acción y su efecto se incrementa en presencia de materia orgánica (composta), entonces al menos una de las cepas de RPCV en presencia de composta promoverá alguna de las variables de crecimiento de las hortalizas, lo que se verá reflejado en la producción del cultivo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de diferentes RPCV y composta en el crecimiento vegetal de hortalizas cultivadas en condiciones de invernadero.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la capacidad de colonización de las cepas de RPCV: *Azospirillum*, *Bacillus* y *Pseudomonas* en raíces de lechuga (*Lactuca sativa* L.), espinaca (*Spinacia oleracea* L.) y calabaza (*Cucurbita pepo* L.).
2. Evaluar el efecto de la biofertilización con cepas de RPCV con la adición de composta en diferentes variables de crecimiento en tres especies hortícolas cultivadas en condiciones de invernadero.

1. ANTECEDENTES

1.1 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES EN PLANTAS

Las plantas sintetizan sus nutrientes a partir de elementos químicos que toman del aire, agua y suelo. De todos los elementos químicos que aparecen en la naturaleza, sesenta se pueden encontrar en las plantas, aunque de ellos, sólo dieciséis se consideran elementos esenciales para las plantas, de forma que éstas no se desarrollan cuando falta cualquiera de ellos (Margulis y Sagan, 2005). De estos elementos esenciales, sólo el carbono y el oxígeno provienen del aire; los catorce restantes son suministrados por el suelo (Ibídem). En la tabla 1 se muestra la función y la forma como las plantas asimilan los elementos nutricionales esenciales.

Tabla1. Elementos químicos esenciales para la nutrición de las plantas (Margulis y Sagan, 2005).

Elemento	Forma asimilable en la planta	Funciones del elemento en la planta
Carbono	CO ₂	Forma parte de todas las moléculas orgánicas.
Oxígeno	O ₂	Forma parte de todas las moléculas orgánicas.
Hidrógeno	H ₂ O	Forma parte de todas las moléculas orgánicas.
Nitrógeno	NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺	Componente de todos los aminoácidos y nucleótidos.
Potasio	K ⁺	Intervienen en la apertura y cierre de estomas.
Calcio	Ca ²⁺	Forma parte de la pared celular y regula la permeabilidad celular
Fósforo	H ₂ PO ₄ ⁻	Componente de nucleótidos y de los lípidos que forman las membranas.
Magnesio	Mg ²⁺	Forma parte de la clorofila.
Azufre	SO ₄ ²⁻	Componente de algunos aminoácidos.
Cloro	Cl ⁻	Protege los fotosistemas de componentes oxidantes producidos durante la fotólisis del agua
Hierro	Fe ²⁺ , Fe ³⁺	Forma parte de algunos transportadores de electrones y activa enzimas importantes en las síntesis de clorofila.
Cobre	Cu ⁺ , Cu ²⁺	Forma parte de algunos transportadores de electrones y de algunas enzimas.
Manganeso	Mn ²⁺	Activa enzimas importantes para el catabolismo y es necesario para la liberación de oxígeno durante la fotosíntesis.
Zinc	Zn ²⁺	Activador o componente de muchas enzimas.
Boro	BO ₃ ³⁺	Forma un complejo con los carbohidratos, facilitando su transporte por la planta.
Molibdeno	MoO ₄ ²⁻	Importante para la asimilación de nitratos.

De los 16 elementos esenciales, se encuentran macronutrientes (primarios y secundarios) y micronutrientes. El nitrógeno, fósforo y potasio son macronutrientes primarios mientras que elementos como calcio, azufre y magnesio forman parte de macronutrientes secundarios. La diferencia que existe entre macronutrientes primarios y secundarios son las cantidades existentes en los suelos. Para los macronutrientes secundarios las cantidades existentes en los suelos generalmente son suficientes para los requerimientos que necesitan las plantas y son tomados directamente del suelo, sin que se produzcan normalmente deficiencias (FAO, 2002). Mientras que para los macronutrientes primarios, es necesario adicionarlos al suelo para una buena producción agrícola. Por este motivo la industria agrícola requiere de bastantes cantidades de fertilizantes de síntesis química nitrogenados y fosfatados. Entre los fertilizantes nitrogenados de uso más frecuente se encuentran la urea, el nitrato de amonio y el sulfato de amonio (Chien, 2001). Mientras el dihidrógeno fosfato de calcio ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) es la principal especie química en los fertilizantes fosfatados (SAGARPA, 2008).

1.2 FERTILIZANTES QUÍMICOS.

Los fertilizantes químicos son productos sintéticos desprovistos de materia orgánica que contienen en forma disponible uno o más de los 16 elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo vegetal (Hill y Kolb, 1999). Sin embargo el abuso de estos productos ha causado un impacto desfavorable en el medio ambiente (Esquivel-Cote, 2011).

1.2.1 FERTILIZANTES NITROGENADOS.

El nitrógeno es aplicado al suelo principalmente en forma de fertilizante amoniacal o fertilizantes a bases de nitratos. El problema ambiental más importante debido al uso de fertilizantes nitrogenados, es la acumulación de nitratos en el subsuelo por lixiviación, el nitrato lixiviado es incorporado a aguas subterráneas, o bien es arrastrado hacia los cauces y reservorios superficiales, donde pueden actuar como fertilizantes de la vegetación acuática, de tal manera que si se concentran se puede originar la eutrofización del medio.

En un medio eutrofizado, se produce la proliferación de especies como algas y otras plantas verdes que cubren la superficie. Esto trae como consecuencia un elevado consumo de oxígeno y su disminución en el medio acuático, así mismo dificulta la incidencia de la radiación solar por debajo de la superficie. Estos dos fenómenos producen una reducción de la capacidad autodepuradora del medio y una merma en la capacidad fotosintética de los organismos acuáticos (Chien, 2001).

Por otro lado, los nitratos pueden ser reducidos a nitritos en el interior del organismo humano y originar la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina. La hemoglobina se encarga del transporte del oxígeno a través de los vasos sanguíneos y capilares, pero la metahemoglobina no es capaz de captar y ceder oxígeno de forma funcional. También los nitritos, pueden reaccionar con las aminos, originando las nitrosaminas, compuestos con acción cancerígena (Carvajal y cols., 1980).

1.2.2 FERTILIZANTES FOSFATADOS.

Los fosfatados son incorporados a los suelos de cultivo principalmente en forma de fertilizantes solubles como fosfato monoamónico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) y fosfato diamónico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$). Sin embargo, los fertilizantes fosfatados solubles son rápidamente fijados al suelo, por lo que la dosis que se manejan para aplicar a los cultivos son excesivas, incrementando así el riesgo de acidificación y ensalitramiento del suelo (Arcand y Scheider, 2006). Al igual que con los fertilizantes nitrogenados, los fosfatos de lo fertilizantes puede acumularse por lixiviación, llegar a aguas subterránea o mantos superficiales y provocar la eutrofización.

1.3 BIOFERTILIZACIÓN.

La biofertilización de semillas y suelos con microorganismos benéficos es una técnica que ofrece la posibilidad de sustituir, o al menos disminuir, el uso de agroquímicos, así como la contaminación generada por ellos. 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 disminución de xenobióticos (biorremediación) (Vassileva y cols., 1999). El término biofertilizante puede definirse como preparados biotecnológicos que contienen células vivas o latentes de cepas microbianas eficientes fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo o con diversos mecanismos de acción, que se utilizan para aplicar a las semillas o al suelo, con el objetivo de incrementar el número de estos microorganismo en el medio y acelerar los procesos microbianos, de tal forma que se aumenten las cantidades de nutrientes que pueden ser asimilados por las plantas, estimular los procesos fisiológicos que

influyen sobre el desarrollo y el rendimiento de los cultivos (Dibut, 2006).

Estas mezclas microbianas son aplicadas a los suelos para desempeñar funciones específicas, las cuales benefician la productividad de las plantas, incluyendo la absorción de agua y nutrientes, la fijación de nitrógeno, la solubilización de minerales, la producción de estimuladores de crecimiento vegetal y el biocontrol de patógenos (EcuRed, 2014).

1.4 RIZOSFERA

La rizosfera comprende el espacio físico circundante a las raíces de las plantas con el suelo. Aquí se encuentra una variedad de microorganismos que realizan una interacción biológica directa con las raíces, las cuales generan una gran cantidad de compuestos orgánicos denominados, exudados radiculares. Estos compuestos pueden ser agrupados en dos conjuntos: los que contienen altas y bajas concentraciones de mucílagos (Bhattacharyya., 2011). Entre los que contienen bajas concentraciones de mucílago se encuentran aminoácidos, ácidos orgánicos, monosacáridos, fenoles y otros metabolitos secundarios; mientras que los de alta concentración de mucílagos se encuentran polisacáridos y proteínas (Bhattacharyya y cols., 2011). Los exudados de las raíces desempeñan un papel importante en las plantas como atrayentes y repelentes químicos en la rizosfera (Camelo y cols., 2011).

1.5 RIZOBACTERIAS.

Las bacterias que colonizan la rizosfera son llamadas rizobacterias (Schroth y Hancock, 1982). Éstas pueden ser de vida libre o asociativa, aeróbicas, anaeróbicas o anaeróbicas facultativas (Bashan y cols., 1995).

Las rizobacterias pueden tener dos tipos de efecto sobre las plantas: a) Perjudicial: por la colonización de un fitopatógeno que provoque la inhibición del crecimiento vegetal, y b) Benéfico: favoreciendo la absorción de nutrientes e incrementando el crecimiento vegetal. Un ejemplo muy claro de éste último tipo son las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) (Suslow y Schoroth, 1982).

Entre las RPCV más conocidas están las especies pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Bashan y cols., 2007). El efecto que estas bacterias presentan se puede categorizar en tres formas generales: biofertilizante, fitoestimulador y biopesticida (Bhattacharyya y Jha, 2011), los cuales se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Efecto de las RPCV en la promoción del crecimiento vegetal.

Efecto	Definición	Mecanismo de acción	Referencias
Biofertilizante	Microorganismos, que se aplican a la semilla, superficie de la planta o el suelo y promueven el crecimiento de las plantas a través del aumento de los nutrientes principales.	Fijación biológica del nitrógeno. Utilización del fósforo insoluble.	Vessey, 2003 Somers y cols. , 2004
Fitoestimulador	Microorganismos, con la habilidad de producir fitohormonas como ácido indol acético, ácido giberelico, citocininas y etileno.	Producción de fitohormonas.	Lugtenberg y cols. , 2002 Somers y cols., 2004
Biopesticida	Microorganismos que controlan el desarrollo de agentes patógenos vegetales.	Producción de antibióticos, sideróforos, HCN. Producción de enzimas hidrolíticas.	Vessey, 2003 Somers y cols., 2004

1.6 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL.

Las rizobacterias alteran el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos (Cameloy cols., 2011), de los cuales se pueden diferenciar claramente dos procesos esenciales: a) producción de sustancias orgánicas, que son producto del metabolismo secundario de las bacterias, capaces de promover respuestas fisiológicas específicas en las células vegetales (M. do Vale Barreto y cols., 2010); y b) la intervención directa de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos, en los cuales pueden hacer disponibles compuestos orgánicos e inorgánicos que son aprovechados por las plantas (Camelo y cols., 2011)

1.6.1 REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL

Los reguladores de crecimiento vegetal, son compuestos orgánicos que desencadenan varias respuestas en la célula vegetal a nivel bioquímico, fisiológico y morfológico. De acuerdo a varias clasificaciones se encuentran distribuidas en cinco grupos principales: auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Son capaces de contribuir al desarrollo y regulación de muchos parámetros fisiológicos, además incrementan la resistencia de las plantas a diversos factores ambientales (M. do Vale Barreto y cols., 2010).

I. Auxinas

Dentro de las auxinas, el ácido indol acético (AIA) es la auxina más estudiada debido a que ha demostrado efectos tales como: formación de dominios apicales, diferenciación vascular, promoción del desarrollo de raíces laterales y adventicias, desarrollo de frutos, regulación del ciclo celular y en el desarrollo de órganos (Camelo y cols., 2011).

Varias rizobacterias han sido reportadas como productores de AIA, entre los cuales se pueden mencionar a *Azotobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* (Ahmad y cols., 2006), *Azospirillum sp.* (Lutenberg y cols., 2002) y *Pantoea agglomerans* (Caballero y cols., 2007).

La síntesis de AIA en rizobacterias, está ligada principalmente a tres rutas metabólicas que tienen como precursor al triptófano (figura 1). La primera ruta es la del ácido indol-3-pirúvico, presente en plantas y microorganismos como *Azospirillum sp.* y *Pseudomonas sp.* (Bhattacharyya y cols., 2011). En la segunda ruta la formación de la triptamina a partir del triptófano se presenta como una vía alternativa para la producción de AIA. Como tercera vía se encuentra la producción de AIA vía indol-3-acetamina (IAM) (Camelo y cols., 2011).

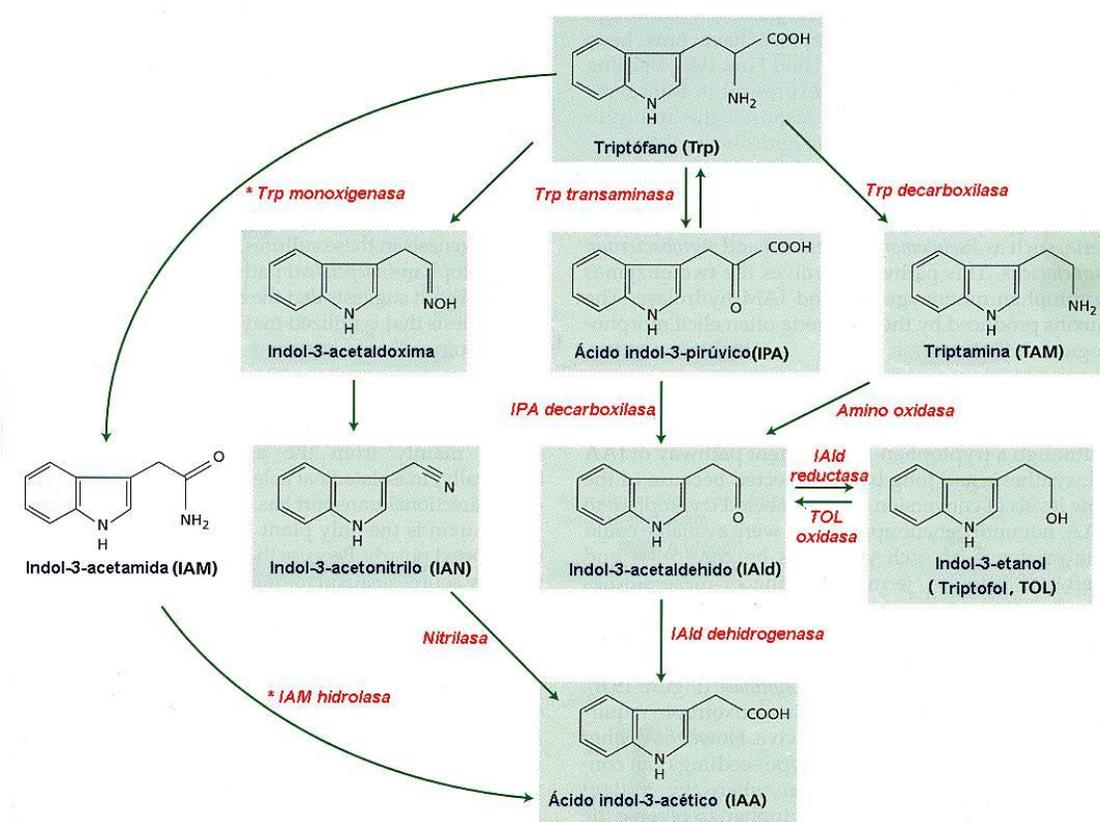


Figura 1. Biosíntesis del ácido indolacético a partir de triptófano en plantas y bacterias (Tomada de Taiz, L. y Zieger, E. 2002).

II. Citoquininas y giberelinas.

Las citoquininas son compuestos químicos capaces de regular el ciclo celular de las células vegetales, estimular la división celular, estimulan la expansión foliar debido al alargamiento celular, retrasan la senescencia foliar y evitan la pérdida de agua por transpiración (Taiz y Zieger, 2002). Las citoquininas son derivados de las amino purinas, estructuralmente clasificadas en dos familias, las adenincitocininas y las difenilureacitocinas (Camelo y cols., 2011). La figura 2 muestra la biosíntesis general de las citoquininas. Entre las citoquininas más comunes se encuentran la zeatina y la bencialadenina (Taiz L. y Zieger E., 2002).

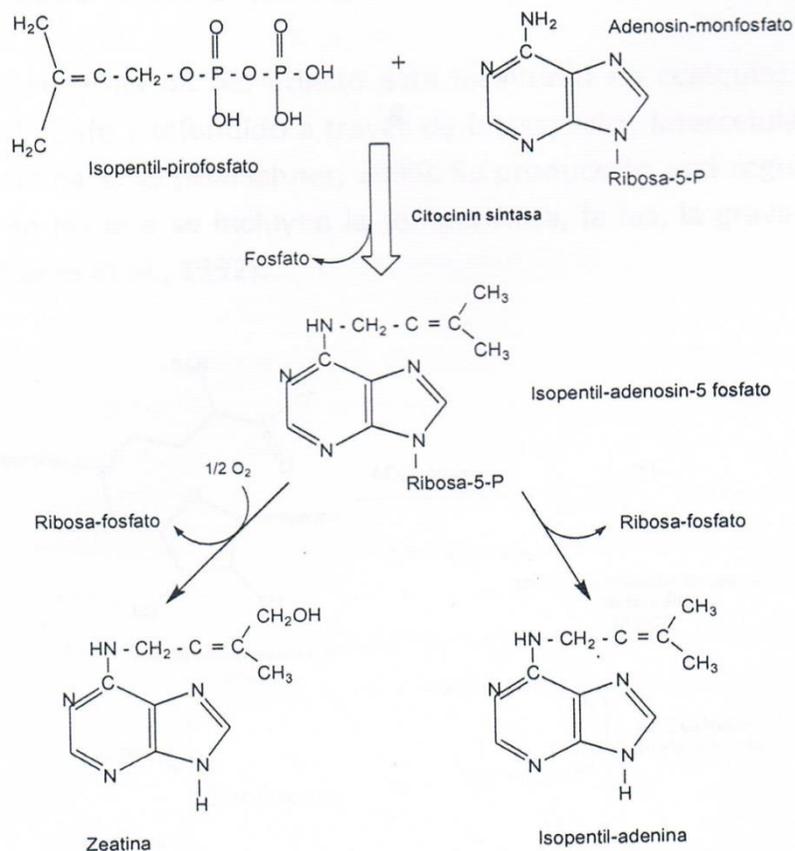


Figura 2. Biosíntesis de citoquininas. (Tomada de Esquivel-Cote, 2011).

Las giberelinas son producidas por bacterias del género *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* y *Bacillus sp* o *Azospirillum*, particularmente *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum* (Bottini y cols., 2004; Camelo y cols., 2011). Este regulador de crecimiento es capaz de promover la floración, el desarrollo de frutos, inducir la germinación de semillas e incrementar el crecimiento de tallos. Las giberelinas son moléculas complejas de diterpenos tetracarboxílicas (Bhattacharyya y cols., 2011).

1.6.2 FIJACIÓN DE NITRÓGENO.

El nitrógeno es un constituyente esencial de moléculas fundamentales de todos los seres vivos ya que forman parte de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas, (Bhattacharyya y cols., 2011). El nitrógeno molecular (N_2) es la única fuente reservada de nitrógeno accesible en la biosfera; no obstante, esta reserva no es utilizada directamente por los vegetales. Para que el N_2 pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido a amoníaco. Para ello, uno de los mecanismos empleados por algunas RPCV es la fijación no simbiótica de nitrógeno, por ejemplo la realizada en especies como: *Azoarcus* (Reinhold y cols., 1987), *Azospirillum* (Bashan y de-Bashan 2010), *Burkholderia* (Estrada de los Santos y cols., 2001), *Gluconacetobacter* (Fuentes-Ramírez y cols., 2001) y *Pseudomonas* (Mirza y cols., 2006).

La asimilación de nitrógeno en plantas consiste en un proceso de tres etapas. Inicialmente el NO_3^- es reducido a NO_2^- por la enzima nitrato reductasa. Este proceso es seguido por la subsecuente reducción del NO_2^- a NH_4^+ . Finalmente el NH_4^+ es asimilado en forma de aminoácidos por medio de reacciones catalizadas por las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa (M. do Vale Barreto y cols., 2010).

Todos los microorganismos que fijan nitrógeno lo hacen gracias a la actividad del complejo enzimático nitrogenasa (Nasa); la enzima requiere la colaboración de otras dos proteínas llamadas ferredoxina y flavodoxina; éstas actúan como donadores de electrones y reductores de la nitrogenasa (Bhattacharyya y cols., 2011). El complejo enzimático Nasa, está constituida por dos metaloproteínas: a) Nitrogenasa I, dinitrogenasa reductasa o ferroproteína reductasa (Bhattacharyya y cols., 2011), esta proteína tiene la función de transportar los electrones del donador de electrones (ferredoxina o flavodoxina), hacia la proteína II para llevar a cabo la reducción de la molécula N_2), b) Nitrogenasa II, dinitrogenasa o ferro molibdeno-proteína (figura 3).

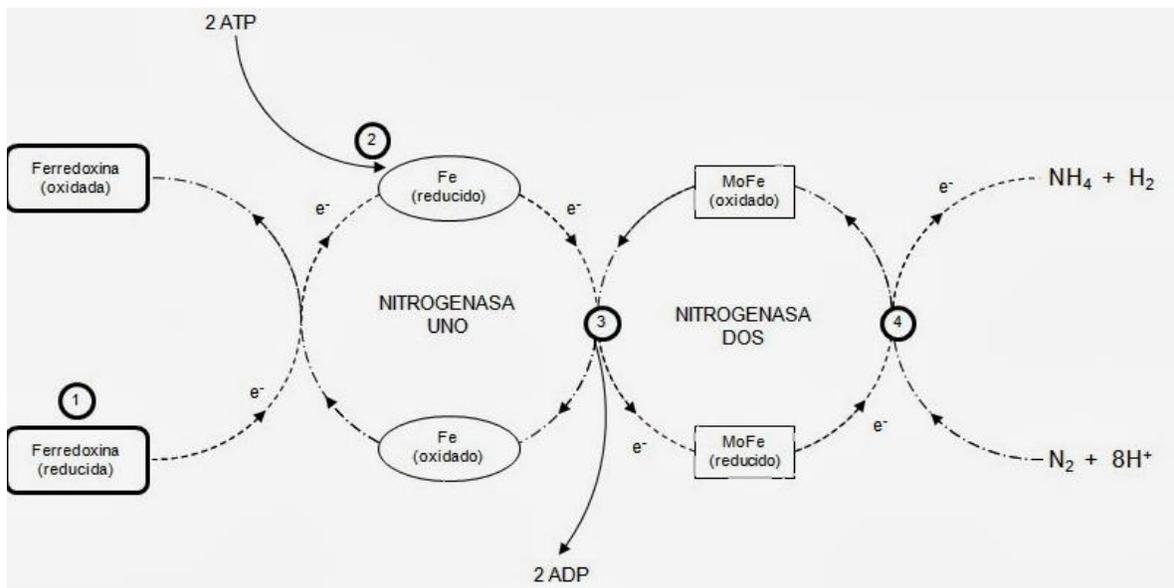


Figura 3. Flujo de electrones hacia el sitio activo de la nitrogenasa para la reducción del N_2 . Reacción de la nitrogenasa. Los electrones generados por la actividad metabólica son transferidos vía flavodoxina (Fld) o ferredoxina (Fd), hacia la ferroproteína reductasa, que a su vez los transfiere a la ferro-molibdeno-dinitrogenasa, por cada par de electrones transferidos se requiere la hidrólisis de 2 mol de ATP (Bhattacharyya y cols., 2011).

1.6.3 SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO.

El fósforo es un elemento esencial para los organismos, se trata de un componente esencial de moléculas como ARN, ADN y ATP, así como de los fosfolípidos (M. do Vale Barreto y cols., 2010). El fósforo disponible es absorbido en forma de $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ y como HPO_4^{2-} , pero es fácilmente convertido en complejos insolubles como fosfatos de Fe, Al o Mn en suelos ácidos y fosfatos de Ca y Mg en suelos alcalinos (Torriani-Gorini, 1994). Debido a lo anterior, el fósforo es uno de los elementos que con mayor frecuencia resulta limitante en los suelos (Bashan y cols., 1995). La producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por las rizobacterias es un mecanismo por el cual se solubiliza el fosfato del suelo, hace al fósforo disponible para la nutrición de las plantas (Bashan y cols., 1995). La solubilización del fosfato por los ácidos orgánicos depende del pH y la mineralogía del suelo.

Dentro de los mecanismos se encuentran el intercambio de los protones (H^+), los cuáles se intercambian por el fósforo ligado a la superficie de los cristales de $\text{Al}(\text{OH})_3$ o $\text{Fe}(\text{OH})_3$ reduciéndolos y liberando el fósforo (Holguin y cols., 2007). Bashan y colaboradores (1995) han reportado que los ácidos orgánicos que intervienen en la solubilización del fósforo son: oxálico, cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, acético, glicónico, fumárico, adípico, indolacético y 2-cetoglucónico. Algunos de los géneros bacterianos con la capacidad de solubilizar fosfato son: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Erwinia*.

1.6.4 PRODUCCIÓN DE SIDERÓFOROS.

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de los organismos, las plantas lo obtienen del suelo y cuando la disposición del nutriente es limitada la microbiota de la rizosfera entran en competencia por adquirirlo (Holguin y cols., 2007). Las RPCV producen compuestos de bajo peso molecular para obtener hierro del suelo, estos compuestos son denominados sideróforos (Bashan y cols., 1995). Los sideróforos son compuestos que desempeñan la función de atrapar específicamente el hierro e incorporarlo al metabolismo celular. Estructuralmente son considerados como compuestos ligantes al hierro que funcionan de formar general uniéndose covalentemente al hierro sin generar cambios en el estado de oxidación (Camelo y cols., 2011).

El mecanismo bioquímico de los sideróforos, que implica el transporte y la liberación del hierro dentro de la célula, involucra una serie de reacciones de óxido-reducción mediadas por la diferencia en el potencial electroquímico de la membrana externa y el citoplasma. El ingreso a través de la membrana externa sucede con la ayuda de proteínas receptoras, en el periplasma. El sideróforo ligado a hierro es transportado libremente y el ingreso al citoplasma del hierro es mediado por proteínas estererasas con gastos de ATP, mientras que el sideróforo es excretado al medio (Aguado y cols., 2012).

1.7 RIZOBACTERIAS UTILIZADAS COMO BIOFERTILIZANTES

1.7.1 AZOSPIRILLUM

Desde su redescubrimiento por Döbereiner y colaboradores (1976), las especies de *Azospirillum* son la RPCV mejor caracterizadas. A pesar de muchos experimentos exitosos, tanto en condiciones de invernadero como de campo, su aplicación a gran escala no ha sido fácil, debido a

problemas como la inconsistencia y lo poco previsible de los resultados obtenidos en campo (Bhattacharyya y cols., 2011).

1.7.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *AZOSPIRILLUM*

Son bacterias Gram-negativas, con morfología celular de vibrio, presentan un diámetro de 1,0 μm x 2,1-3,8 μm . Poseen movilidad en espiral debido a la presencia de flagelos (Caballero-Mellado, 2001). Presentan la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. En el medio de cultivo semisólido NFB (medio libre de nitrógeno) se caracteriza por crecer en forma de un velo blanquecino bajo la superficie del medio (Caballero-Mellado, 2001). Se desarrollan a pH de 6,8-7,0 y a temperaturas entre 30-35°C (Marín y cols., 1999). En el medio agar ácido málico-rojo Congo desarrolla colonias secas de color rojo escarlata con bordes irregulares (Krieg y Döbereiner, 1984).

Las bacterias del género *Azospirillum* han sido aisladas de la rizosfera de pastos y cereales de todo el mundo, tanto de zonas tropicales, así como de climas templados (Döbereiner y cols., 1976) En la actualidad se han descrito 16 especies pertenecientes al género *Azospirillum*: *A. lipoferum*, *A. brasilense* (Tarrand y cols., 1978), *A. amazonense* (Magalhaes y cols., 1983), *A. halopraeferens* (Reinhold y cols., 1987), *A. irakense* (Khammas y cols., 1989), *A. largimobile* (Sly y Stackebrandt, 1999), *A. doebereineriae* (Eckert y cols., 2001), *A. oryzae* (Xie y Yokota, 2005), *A. melinis* (Peng y cols., 2006), *A. canadense* (Mehnaz y cols., 2007a), *A. zae* (Mehnaz y cols., 2007b), *A. rugosum* (Young y cols., 2008), *A. palatum* (Zhou y cols., 2009), *A. picis* (Lin y cols., 2009), *A. thiophilum* (Lavrinenko y cols., 2010) y *A. formosense* (Lin y cols., 2011).

1.7.1.2 ASOCIACIÓN *AZOSPIRILLUM*-PLANTA

La mayoría de los estudios sobre la asociación *Azospirillum*-planta se han llevado a cabo en cereales y pastos y en menor grado, en otras familias de plantas (Bashan y cols., 1991). *Azospirillum* vive libremente en el suelo, su concentración es mayor en la rizosfera donde se adsorbe al mucílago de la superficie radical, principalmente en los pelos radicales (Caballero-Mellado, 2001). Esta asociación con la raíz no forma una estructura visible o especializada que indique que la planta se encuentra infectada. La infección inicia cuando la bacteria entra por los pelos radicales lisados y por la emergencia de raíces laterales, para luego extenderse hacia las raíces principales. *Azospirillum* tiende a colonizar, preferentemente las zonas de elongación de la raíz y de los pelos radiculares (Bashan y cols., 1991; Bashan y cols., 1995). Umali-Garcia y colaboradores (1980) mencionan que las características invasivas de *Azospirillum* se deben en parte a la producción de pectinlisisa y endopoligalacturonasa por parte de la bacteria, enzimas que deshidratan la pectina que mantiene unidas las paredes celulares en los tejidos radicales.

Azospirillum ha desarrollado dos formas de unión (figura 4): la fase de adsorción, es débil y se alcanza en corto tiempo. Este proceso involucra interacciones hidrofóbicas y el reconocimiento de la adhesina lectina de la bacteria y la pared celular de la planta junto con la participación del flagelo (Michiels y cols., 1991). La fase de anclaje es más fuerte e irreversible, esta involucra la elaboración de una red de polisacáridos, la cual ancla a la bacteria permanentemente a la superficie de la raíz (Steenhoutd y Vanderleyden, 2000).

Azospirillum ha sido observado mediante microscopía electrónica en los espacios intercelulares dentro de los tejidos radicales, así como intracelularmente en células muertas (Umali-Gacia y cols., 1980).

1.7.1.3 MECANISMOS DE ACCIÓN PRESENTES EN EL GÉNERO *AZOSPIRILLUM*

No se ha definido el mecanismo principal por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal (Holguin y cols., 2007), sin embargo se ha propuesto la intervención simultanea de varios mecanismos de acción como: a) Fijación de nitrógeno, lo cual contribuye con nitrógeno a la planta; b) Efectos hormonales, los cuales promueven el metabolismo y crecimiento vegetal; c) Incremento en el crecimiento del sistema radicular, y d) Alteración del funcionamiento de la membrana por medio de moléculas de comunicación celular que son de bajo peso molecular y pueden ser las responsables de alterar actividades y funciones de la membrana relacionadas con la absorción de iones (Bashan y Levanony, 1990).

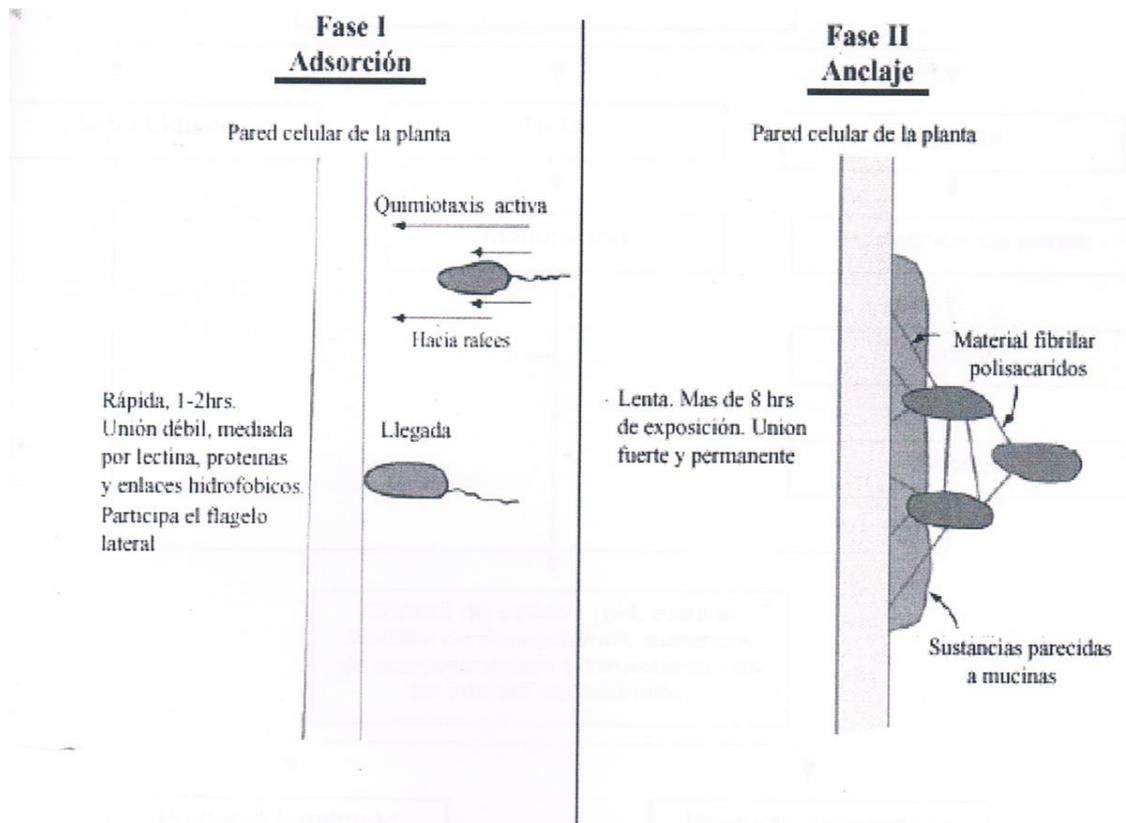


Figura 4. Mecanismo de unión de *Azospirillum* con raíces de plantas. (Tomada de Bashan y de-Bashan, 2005).

1.7.2 BACILLUS

Las especies de *Bacillus* han sido objeto de estudio dentro del área agronómica debido a sus perspectivas ecológicas, sus mecanismos que promueven el crecimiento vegetal y control de patógenos, así como las repercusiones en los ecosistemas en donde se ha utilizado como biofertilizante en diversos cultivos (Kumar y cols., 2011).

1.7.2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE BACILLUS

El género *Bacillus* se caracteriza por ser bacilos Gram positivos de gran tamaño (4-10µm) de extremos rectos, aislados, en pares o cadenas, esporulados, no exigentes y en general móviles. Se observan áreas claras sin teñir que corresponden a endosporas, las cuales solo se observan a partir de cultivos viejos o mediante técnicas que provoquen la esporulación. Incluyen bacterias aeróbicas estrictas y anaeróbicas facultativas. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza; algunos forman parte de la floral normal de los ambientes (Kumar y cols., 2011). Para su cultivo deben ser empleados medios ricos y simples tales como agar sangre, agar chocolate y agar nutritivo. Su morfología colonial es variable y depende de la especie.

Las especies que se pueden aislar más frecuentemente asociadas a las plantas, ya sea de la rizosfera o de los tejidos internos (endófitos), son *B. subtilis* (Cazorla y cols., 2007), *B. megaterium* (Ali y cols., 2009), *B. licheniformis* (Tendulkar y cols., 2007), *B. circulans* (Mehta y cols., 2010) y *B. cereus* (Handelsman y cols., 1990).

1.7.2.2 ASOCIACIÓN *BACILLUS*-PLANTA

Los miembros del género *Bacillus*, se han aislado de numerosos cultivos de interés económico como caña de azúcar (Velázquez y cols., 2008), algodón (Reva y cols., 2002), trigo (Beneduzi y cols., 2008), maíz (Hernández y cols., 2003), papa (Calvo y cols., 2008) y arroz (Trivedi y cols., 2007).

1.7.2.3 MECANISMOS DE ACCIÓN PRESENTES EN EL GÉNERO *BACILLUS*

El efecto benéfico en el crecimiento vegetal por parte de las especies del género *Bacillus* puede ocurrir de forma directa e indirecta (Tejera-Hernández y cols., 2011). Dentro de los mecanismos directos que promueven el crecimiento vegetal podemos encontrar: a) producción de reguladores de crecimiento principalmente AIA y giberelinas (Swain y cols., 2007), las cuales incrementa el área radicular; b) solubilización de fosforó, nutriente esencial para las plantas (Bhattacharyya y cols., 2011). Por su parte, la forma indirecta de promoción del crecimiento vegetal está relacionada con: a) Síntesis de compuestos volátiles de naturaleza orgánica como 2, 3-butanediol y acetoína, compuestos elicitors (Ryu y cols., 2003; Bhattacharyya y cols., 2011); b) La producción de enzimas líticas como lipasas, proteasas y β -glucanasas que actúan principalmente sobre patógenos fúngicos (Tejera-Hernández y cols., 2011).

1.7.3 PSEUDOMONAS

1.7.3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE PSEUDOMONAS

El género *Pseudomonas* comprende bacterias Gram negativas con forma de bacilo recto o curvo de un diámetro aproximado de 0.5-1.0µm. Los miembros de este género normalmente son móviles por la presencia de uno o más flagelos. Otra característica asociada con las especies de *Pseudomonas* incluyen la producción de sideróforos bajo condiciones limitadas de hierro (Lugtenber y Bloemberg, 2002).

El género demuestra una gran diversidad metabólica, son capaces de colonizar una amplia variedad de nichos. Son de fácil cultivo, crecen en medios simples. En agar nutritivo forman colonias brillantes, de borde continuo y a veces ondulados con un centro opaco (Mirza y cols.,2006).

1.7.3.2 MECANISMOS DE ACCIÓN PRESENTES EN EL GÉNERO PSEUDOMONAS

Este género de bacterias pueden ejercer efectos benéficos directos, a través de la síntesis de reguladores de crecimiento vegetal como AIA, inhibición de la síntesis de etileno y solubilización de fósforo (Bhattacharyya y cols., 2011). De manera indirecta generan efectos benéficos, por medio de síntesis de compuestos antimicrobianos y fungicidas (2, 4 -diacetilfloroglucinol), y producción de sideróforos (Fakhouri y cols., 2011; Lugtenberg y cols., 2001).

1.8 COMPOSTA

1.8.1 DEFINICIÓN E IMPORTANCIA

La composta puede ser considerada como la agrupación de restos orgánicos a través de un proceso de fermentación originando un producto inodoro y con alto contenido de humus (García, 2004). El compostaje es un tratamiento biológico de degradación aerobia y termofílica, en donde la materia orgánica es descompuesta por una gran cantidad de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos, entre otros organismos aeróbicos y anaeróbicos, biotransformando los compuestos orgánicos en otros más simples (Haug, 1993). La composta posee un inestimable valor pues se trata de la recuperación a partir de los desechos originados por la actividad humana, que sin ningún tratamiento contaminarían el entorno.

Durante el proceso de compostaje existe un grupo predominante de microorganismos. Al inicio del proceso predominan las bacterias, levaduras, actinobacterias mesófilicas que se desarrollan entre 20 y 45°C, que descomponen con rapidez azúcares, almidón y proteínas, liberando una gran cantidad de energía. Alcanzando temperaturas superiores a los 40-45°C, se inicia el desarrollo de los microorganismos termófilos, con predominio de las bacterias y los actinobacterias termófilas. En esta fase termófila son descompuestos lípidos y fracciones de hemicelulosa. Al alcanzarse temperaturas de 55 hasta 60°C se consigue la eliminación de patógenos y parásitos. Cuando se reduce la temperatura, producto del agotamiento de las fuentes de carbono fácilmente degradables, reaparecen los microorganismos mesófilos. No obstante, dichos microorganismos pueden estar activos durante el estado termófilo en las capas más superficiales de la pila (Dibut, 2006).

Tabla 3. Tipos de microorganismos presentes durante el proceso de compostaje (Dibut, 2006).

Fase	Temperatura	Microorganismos presentes
Residuos frescos	Ambiente	Bacterias y hongos
Mesófila	Hasta 45-50°C	Gran cantidad de bacterias y hongos mesófilos. Poca cantidad de bacterias termófilas.
Termófila I	50 a 65°C	Hongos termófilos.
Termófila II	65 a 75°C	Bacterias termófilas. Actinobacterias.
Termófila III	75 a 45-50°C	Bacterias termófilas. Actinobacterias.
Maduración	45-50°C a ambiental	Actinobacterias, hongos y bacterias mesófilas. Inactivación de bacterias termófilas.

1.8.2 TIPOS DE COMPOSTA

Los sistemas de compostaje tienen como fin facilitar el control y la optimización de parámetros operacionales, para obtener un producto final con buena calidad fertilizante (INIFAP, 2002). La clasificación más común se realiza en función del aislamiento del material que va a someterse al proceso de compostaje con respecto al exterior, en cuyo caso se tienen sistemas abiertos y cerrados (Dibut, 2006).

1.8.2.1 SISTEMA ABIERTO

Son los más generalizados, constituyen la forma tradicional de compostaje, los sustratos a compostear se disponen en montones o pilas sin que se compriman excesivamente para permitir que el aire quede retenido; pueden estar al aire libre o en naves (López, 2010). Si las pilas son demasiado grandes, el oxígeno no puede penetrar en el centro, mientras que si son demasiado pequeñas no se calentarán adecuadamente (Dibut, 2006). La aireación de la masa fermentable se realiza frecuentemente por volteo mecánico de la pila.

1.8.2.2 SISTEMA CERRADO

Son sistemas desarrollados para reducir considerablemente las superficies de compostaje, y lograr un mejor control de los parámetros de fermentación (López, 2010). En estos sistemas la fase inicial de fermentación se realiza en reactores o contenedores que pueden ser horizontales o verticales, aireados-agitados y (Dibut, 2006), mientras que la fase final de maduración se hace al aire libre o en naves abiertas. Los ejemplos de reactores incluyen contenedores de acero aireados, tubos amplios de polietileno, reactores cilíndricos y distintas configuraciones de depósitos cerrados (Stofella y cols., 2003). Aunque estos sistemas requieren costos de instalación superiores a los sistemas abierto, presentan la ventaja de ser más rápidos y requieren menos espacio (INIFAP, 2002).

1.8.3 ETAPAS DEL COMPOSTAJE

El proceso básico del compostaje consta de las siguientes etapas:

- Mezclado
- Estabilización termofílica
- Estabilización final
- Secado

1.8.3.1 MEZCLADO

Es la primera etapa del proceso y consiste en obtener una mezcla homogénea al revolver la materia orgánica molida con lodo o tierra (López, 2010).

1.8.3.2 ESTABILIZACIÓN TERMOFÍLICA

La etapa termofílica tiene lugar después del mezclado y requiere de tres o cuatro semanas para completarse (López, 2010). En esta etapa se produce un aumento progresivo de la temperatura del material a compostear.

Al principio del proceso, se desarrollan las familias de microorganismos mesófilos, que inician la descomposición de las moléculas más fácilmente degradables. Esta actividad de descomposición genera energía que se libera en forma de calor, y se traduce en un incremento paulatino de la temperatura. Al avanzar el proceso y variar las condiciones empiezan a aparecer los microorganismos termófilos, a la vez que van disminuyendo los mesófilos (Barrena, 2006). Las sustancias fácilmente degradables como azúcares, grasas, almidón y proteínas, son rápidamente consumidas. Esta fase es muy importante, ya que al alcanzarse temperaturas tan elevadas, se consigue eliminar los microorganismos patógenos (Dibut, 2006).

La fase termófila se caracteriza por un elevado consumo de oxígeno y la liberación de una gran cantidad de energía por parte de la población microbiana (Barrena, 2006).

1.8.3.3 ESTABILIZACIÓN FINAL O FASE DE MADURACIÓN

Se realiza después de la fase termófila y su duración es de aproximadamente 30 días (López, 2010). Es una etapa muy importante donde se puede lograr la degradación adicional de compuestos difícilmente biodegradables (Haug, 1993). A medida que la composta madura, la generación de calor y la demanda de oxígeno disminuye sustancialmente debido a la limitación de nutrientes, con un descenso importante de la actividad microbiana (Barrena, 2006).

La maduración es una fase posterior de compostaje en la que la velocidad de descomposición decrece a un paso lento continuo y la composta madura en temperaturas menores a 40°C (Haug y cols., 1993). La maduración típicamente engloba el amontonar parcialmente la composta acabado en pilas que se airean pasivamente. Una vez finalizado el proceso, se obtiene un producto humificado estable en que los mecanismos de descomposición microbiana no ocurren o lo hace de forma muy lenta (Stofella y cols., 2003).

1.8.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO DE COMPOSTAJE

La degradación de la materia orgánica ocurre fundamentalmente en la superficie de las partículas orgánicas, por ello, además de la composición del sustrato, la cantidad de agua y oxígeno; el pH y la temperatura son factores determinantes del tipo y actividad de las poblaciones microbianas que se desarrollan durante el compostaje (López, 2010). Las temperaturas óptimas del proceso se encuentran entre 45 y 59°C. Temperaturas menores de 20°C frenan el crecimiento microbiano, y por tanto, la descomposición de los materiales. Los microorganismos que toman parte en la descomposición de los residuos sólidos son fundamentalmente bacterias y hongos, que mantiene su actividad en un determinado intervalo de temperatura; si son mesófilos desarrollan su actividad entre 15 y 45°C, si son termófilos desarrollan su actividad entre 45 y 70°C (INIFAP, 2002). El pH del sistema de compostaje debe estar en un intervalo 6-8, debido a que la mayor parte de los microorganismos tienen su actividad y crecimiento máximo dentro de este valor (López, 2010). En pH extremos de 5 u 11 retardan el proceso durante algunos días (INIFAP, 2002). El pH tiende a ser una medida que indica cómo avanza el proceso; en un inicio su descenso hasta 6.5 indica un proceso normal.

Conforme el tiempo transcurre se estabiliza el valor entre 7 y 8, lo que permite la degradación y maduración (Stofella y cols., 2003).

1.9 IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE HORTALIZAS EN MÉXICO

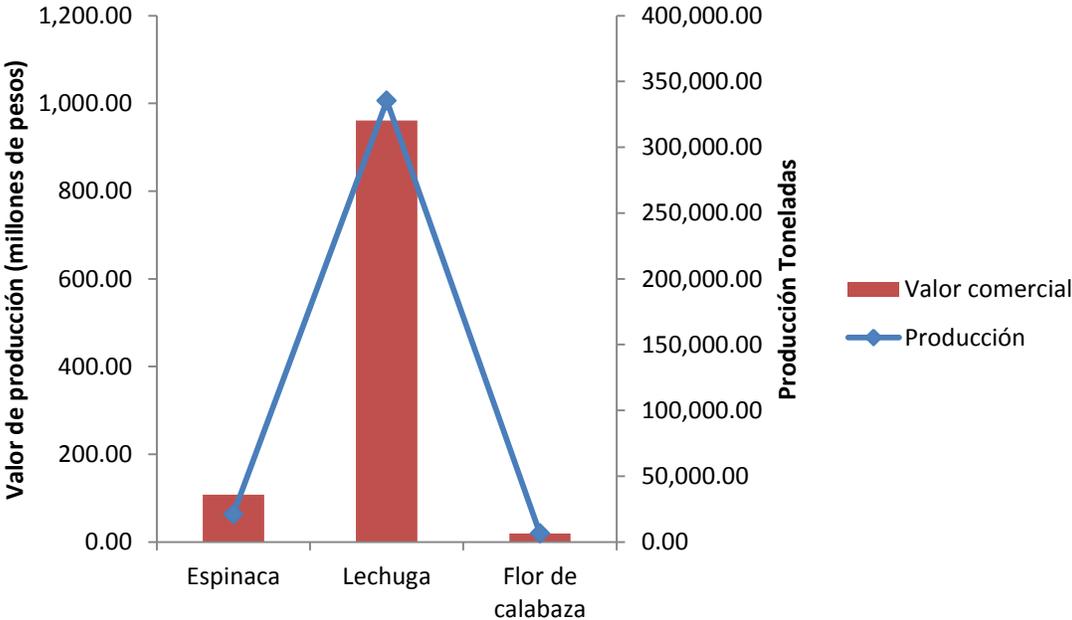
México se encuentra entre los principales productores y exportadores de hortalizas en el mundo, se ubica en el cuarto lugar a nivel mundial y primero en el continente. Otros exportadores de gran peso son los Países Bajos, España, China, Francia, Bélgica y Canadá. Durante el periodo 2000-2006 el campo mexicano produjo en promedio 9.33 millones de toneladas de hortalizas anuales con un valor comercial promedio de 31,233.4 millones de pesos (FINANCIERA RURAL, 2008).

No obstante no todas las hortalizas son igualmente beneficiosas para la economía nacional, entre los tipos más rentables destacan: el tomate rojo, chile verde, la cebolla, tomate verde, la calabacita y pepino (SIAP, 2014). Aunque las hortalizas anteriormente mencionadas son las de mayor valor comercial, cultivos como la calabaza (flor), lechuga y la espinaca tienen un valor importante de producción anual (Tabla 4).

Tabla 4. Producción y valor comercial de los cultivos de espinaca, lechuga y flor de calabaza en el año 2012 (SIAP, 2014).

Hortaliza	Producción anual (Ton)	Valor de producción anual (millones de pesos)
Espinaca	21,173.77	107.60
Lechuga	335,337.28	960.80
Flor de calabaza	6,488.56	19.1

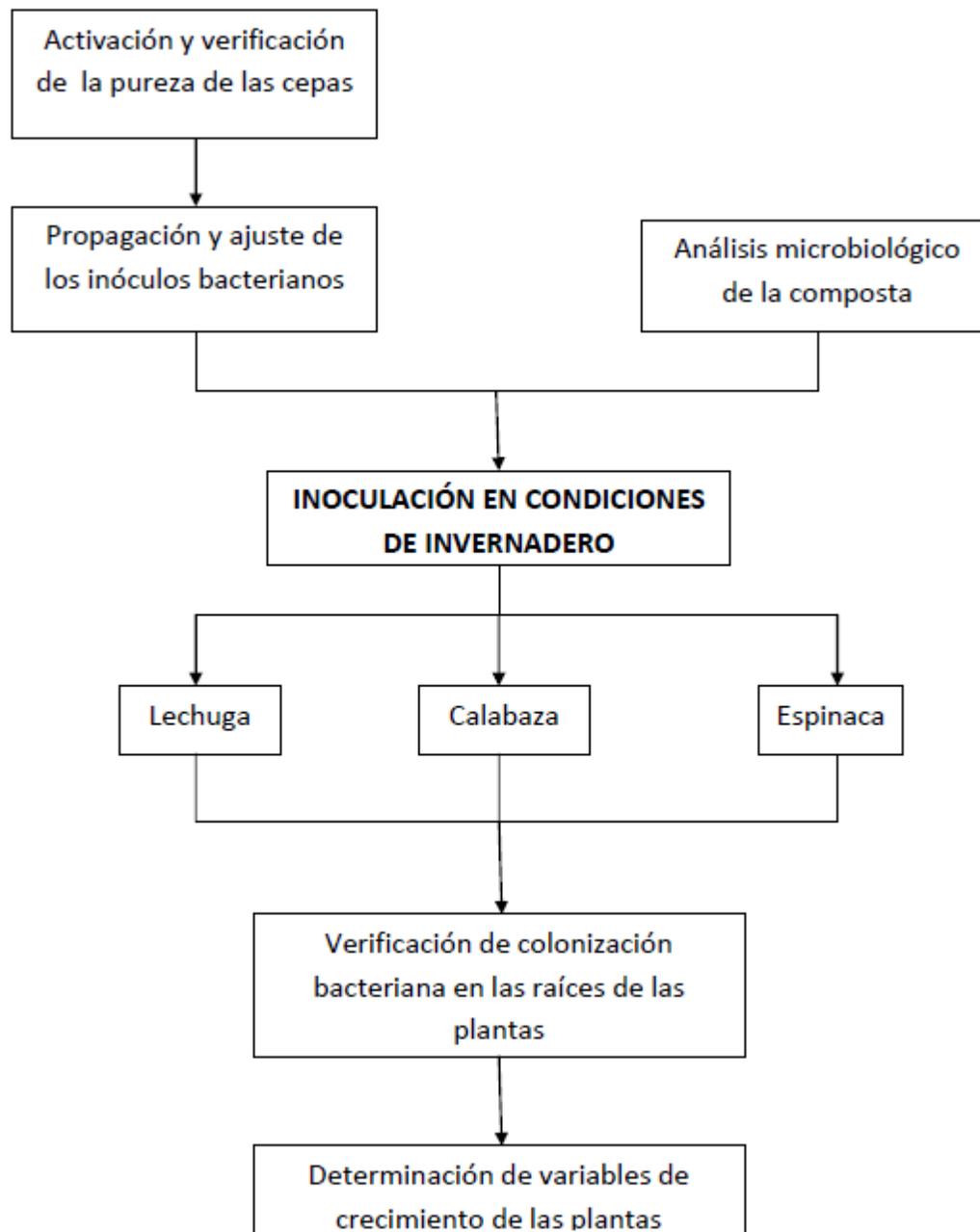
Datos del Banco Mundial (2014) reporta que México utilizó durante el periodo 2009-2013 61.7 Kg/Ha de fertilizantes en su producción agrícola, siendo el cuarto país latinoamericano que más utiliza este tipo de productos, solo por detrás de Brasil, Chile y Ecuador. Los productos fertilizantes abarcan los nitrogenados, potásicos y fosfatados; no incluyen nutrientes tradicionales como abono animal o vegetal. Esto indica que en el campo mexicano el uso de biofertilizantes en la actividad agrícola es escaso.



Gráfica 1. Producción y valor comercial de los cultivos de espinaca, lechuga y flor de calabaza en el año 2012 (SIAP, 2014).

2. METODOLOGÍA

DIAGRAMA GENERAL DE ACTIVIDADES



Para cumplir parte de los objetivos del presente estudio, se llevaron a cabo tres experimentos a diferentes tiempos. A continuación se detalla la metodología que se siguió en común y posteriormente se describirá cada uno de los experimentos.

- Instalaciones del cultivo.

Los experimentos se llevaron a cabo en los invernaderos de la empresa comercializadora y productora de hortalizas JITOSAN A.C. de R.L.S., ubicado en San Santiago Tepalcatlalpan, Xochimilco, D.F. México.

- Bacterias empleadas como biofertilizantes.

Se emplearon cinco biofertilizantes, cada uno elaborado por una RPCV diferente. Las cepas usadas fueron: **AZm5** de *Azospirillum lipoferum* (Esquivel-Cote, 2002), **Sp7** de *A. brasilense* (ATCC29145, Facultad de Química, UNAM), **Az39** de *A. brasilense* (donada por la Dra. Inés García de Salamone de la Cátedra de Microbiología, Universidad de Buenos Aires, Argentina), **PsCKC** de *Pseudomonas sp.* (aislada de un inoculante comercial A) y **Bs** de *Bacillus sp.* (aislada de un inoculante comercial B).

- Sustrato para el crecimiento de las plantas.

Se prepararon charolas para almácigo utilizando composta como sustrato, a base de abono de conejo, y restos vegetales de la poda de plantas de calabaza, pepino, espinaca, lechuga, en proporciones similares. La composta se elaboró bajo condiciones específicas del productor.

- Análisis microbiológico de la composta.

En el análisis microbiológico de la composta consistió, en determinar las diferentes variedades de grupos microbianos presentes. La metodología para el análisis de la composta fue realizada durante la estancia de investigación 2013-2 en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química, UNAM. Los productores de JITOSAN A.C. de R.L.S. emplean comúnmente la composta para el cultivo de hortalizas en invernadero. Los medios de cultivo y la metodología empleados se muestran en la figura 5.

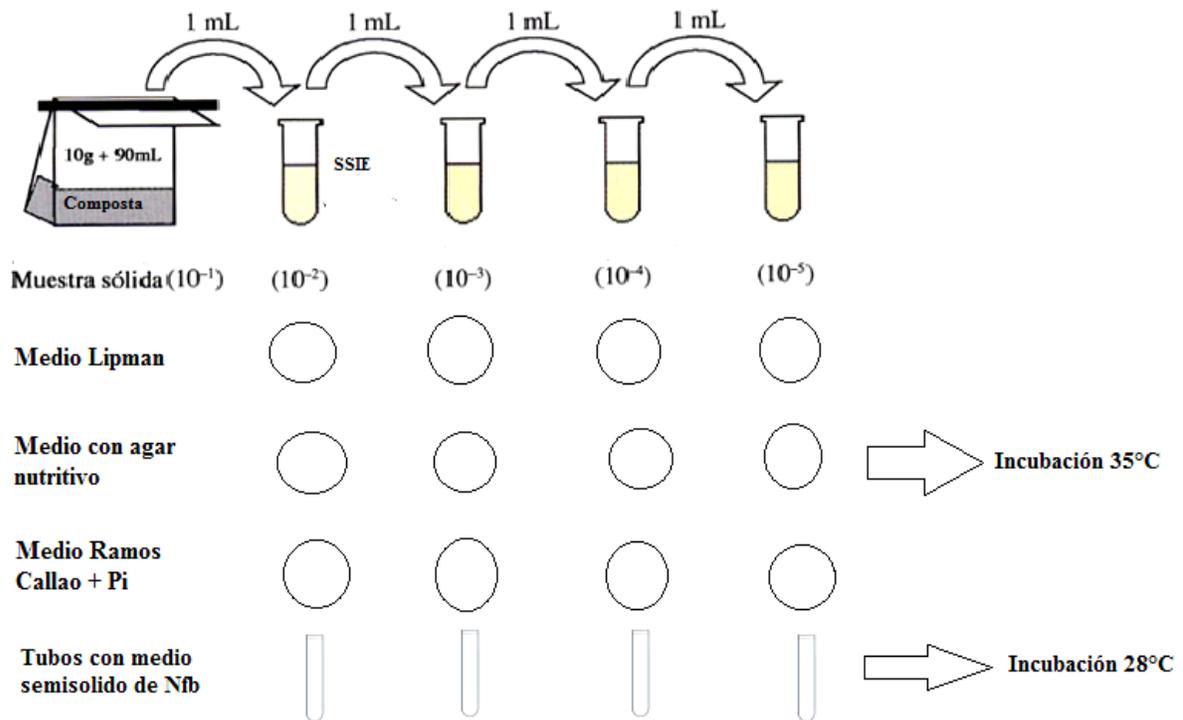


Figura 5. Método general del análisis microbiológico de la composta empleada en el experimento.

La técnica empleada consistió en dilución y vertido en placa. Diez gramos de la composta se disolvieron en 90 ml de solución salina isotónica estéril (SSIE), se realizaron diluciones decimales empleando tubos de ensayo estériles con 9 ml de SSIE. De cada dilución se tomó una alícuota de 1.0 ml y se colocaron en cajas Petri estériles, posteriormente se vertieron sobre ellas el medio de Lipman (fijadores de nitrógeno), medio Ramos Callao (solubilizadores de fósforo), medio con agar nutritivo (aerobios, mesófilos, heterótrofos) previamente esterilizados y fundidos. Las muestras se homogenizaron y se incubaron a 28°C durante 48 horas. Posteriormente se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) en las diferentes placas y se determinó UFC/ml. De igual manera 1.0 ml de cada dilución se inocularon en medio semisólido NFb (*Azospirillum*), el medio se incubó a 35°C durante 48 horas.

- Verificación de pureza de las cepas.

Para verificar que las cepas AZm5, Sp7, Az39 y PsCKC se encontraban puras, se realizaron cultivos medios específicos reportados en la literatura, para la cepa *Bs* solo se verifico la pureza mediante la tinción de gram. Por ejemplo, para el género de *Azospirillum* se emplearon el medio semisólido NFb (Döbereiner y cols., 1984; Carrera, 2012) y el medio rojo Congo (Ibídem). Para completar la descripción morfológica de las cepas, estas se sembraron en medio PDA y agar nutritivo mediante la técnica de estría en cuadrante radial, en este último medio se tomó una muestra bacteriana con ayuda de un asa estéril y se realizó un frotis al cual se le aplicó la tinción de Gram y se determinó las características microscópicas de cada cepa. Los diferentes medios de cultivo se incubaron a 35°C durante 48 horas.

La pureza de la cepa PsCKC del género *Pseudomonas sp.* se verificó con la caracterización de las colonias desarrolladas en agar nutritivo y agar cetrimida con condiciones de incubación de 28°C durante 48 horas. A partir del agar nutritivo se llevó a cabo un frotis y la tinción de Gram para observar las características microscópicas de la cepa.

La cepa Bs de *Bacillus sp.*, se inoculó en el medio de cultivo agar nutritivo mediante la técnica de estría en cuadrante radial. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas. Posteriormente se realizó un frotis y una tinción de Gram.

- Preparación de biofertilizantes y ajuste del inóculo.

Las bacterias se propagaron en el medio de cultivo caldo nutritivo a 34°C (*Azospirillum*) y 28°C (*Bacillus* y *Pseudomonas sp.*) a 150 rpm por 48 horas. Cada inóculo se ajustó a una densidad óptica (A_{560}) aproximada a 0.025 en SSIE. Para verificar la calidad de los inóculos se empleó la técnica de dilución y vertido en placa empleando el medio de cultivo agar nutritivo.

- Siembra y condiciones para el cultivo de las plantas.

Para la germinación y cultivo de las plántulas se empleó un invernadero con cubierta plástica (calibre 800 monocapa, verde clorofila), con una temperatura de $28^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ max/ $8\pm 1^{\circ}\text{C}$ min, una humedad relativa de 80%, y con luz natural. Las semillas fueron germinadas en charolas para almácigo de 200 cavidades preparadas con composta sin fertilizante como sustrato. La humedad del almácigo se mantuvo con riegos de sólo agua por nebulización dos veces por día durante 3 a 4 semanas hasta el trasplante a suelo.

- Colonización bacteriana en raíces de las hortalizas.

La colonización bacteriana en raíces se realizó mediante la siguiente metodología:

Se tomaron tres plántulas de cada tratamiento, se lavaron con agua destilada estéril y se sumergieron en alcohol al 70% (v/v) posteriormente se lavaron 8 veces bajo agitación constante en tubos de ensayo estériles con agua destilada estéril, las raíces se maceraron con un agitador de vidrio estéril y se inocularon en medio NFb semisólido para *Azospirillum* (34°C durante 5 días), en medio agar cetrimida para *Pseudomonas* (28°C durante 3 días), y en agar nutritivo para *Bacillus* (28°C durante 3 días). Posteriormente se registraron las características coloniales y microscópicas típicas de cada una de las bacterias.

2.1 EXPERIMENTO I EFECTO DE RPCV EN EL CRECIMIENTO DE LECHUGA (*LACTUCA SATIVA* L.)

Se emplearon semillas de lechuga (*Lactuca sativa* var. Starfigther). La inoculación se llevó a cabo a los ocho días después de la siembra, cuando las plántulas recién emergidas presentaban 4 hojas verdaderas. Se aplicaron 200 µl del inóculo respectivo en la base de cada una de las plántulas. El tratamiento control fue inoculado con sólo la SSIE.

Después de la siembra y tras la aparición de los dos cotiledones se llevó a cabo un primer muestreo de las plántulas (8 días después de la siembra), posteriormente éstas se inocularon, de acuerdo al tratamiento correspondiente, con 200µl de las siguientes cepas: AZm5, Az39 y Sp7 y PsCKC. Los subsecuentes muestreos se realizaron a los **22, 43 y 75** (cosecha) días posteriores a la siembra. Los tratamientos incluyeron 3 bacterias y un control (sin inocular).

-
-
- Variables de crecimiento en plantas de lechuga.

Se efectuaron cuatro muestreos. El primero de ellos correspondió al octavo día después de la siembra y día cero de inoculación, solo se tomaron 15 plántulas de toda la población total, a las cuáles se les determinó el peso seco y peso fresco de raíz, hoja y cotiledones. El segundo muestreo se llevó a cabo a los 22 días después de la siembra y octavo día posterior a la inoculación bacteriana, se tomaron 5 plántulas de cada tratamiento y se determinó el peso seco y peso fresco de raíz, hojas y cotiledones de cada una. El tercer muestreo correspondió a la etapa previa al trasplante, se llevó a cabo a los 43 días después de la siembra y 35 días posterior a la inoculación bacteriana, se tomaron 5 plantas de cada tratamiento y se les determinó el peso seco y peso fresco de raíz y hojas. El cuarto muestreo correspondió a la cosecha de lechuga, se llevó a cabo a los 75 días después de la siembra y 96 días posterior a la inoculación bacteriana, se tomaron 20 plantas de cada tratamiento y se les determinó el peso seco y fresco de raíz y hojas.

2.2 EXPERIMENTO II EFECTO DE RPCV EN EL CRECIMIENTO DE ESPINACA (*SPINACIA OLERACEA* L.)

Se emplearon semillas de espinaca (*Spinacia oleracea* var. Imperial spring). La inoculación se llevó a cabo a los 24 días después de la siembra. Cada plántula fue inoculada con 200 µl de cada cepa respectiva de su tratamiento en la base apical. El tratamiento control fue inoculado con 200 µl de SSIE.

Después de la siembra y tras la aparición de las primeras 2 hojas verdaderas se llevó a cabo un primer muestreo de las plántulas (24 días después de la siembra), posteriormente éstas se inocularon, de acuerdo al tratamiento correspondiente, con 200 µl de las siguientes cepas: AZm5, Az39, PsCKC, Bs y un tratamiento control.

Los subsecuentes muestreos se realizaron a los 61 y 76 días después de la siembra. Los tratamientos constaron de 4 bacterias y un tratamiento control (sin inocular).

- Variables de crecimiento en las plantas de espinaca.

Se efectuaron tres muestreos. El primero de ellos correspondió al día 24 después de la siembra y día cero de inoculación, solo se tomaron 18 plántulas de toda la población total, a las cuáles se les determinó el peso seco y peso fresco de raíz, hoja y cotiledones. El segundo muestreo se llevó a cabo a los 61 días después de la siembra y día 37 posterior a la inoculación bacteriana, se tomaron 10 plántulas de cada tratamiento y se determinó el peso seco y peso fresco de raíz, hojas y cotiledones de cada una. El tercer muestreo correspondió a la cosecha de espinaca, se llevó a cabo a los 76 días después de la siembra y 52 días posterior a la inoculación bacteriana, se tomaron 32 plantas de cada tratamiento y se les determinó el peso seco y peso fresco de raíz y hojas.

2.3 EXPERIMENTO III EFECTO DE RPCV EN EL CRECIMIENTO DE CALABAZA (*CUCURBITA PEPO* L.)

Se emplearon semillas de calabacita (*Cucurbita pepo* var. Round zucchini Squash).

La inoculación se llevó a cabo a los 24 días después de la siembra, tiempo estimado para el desarrollo de las plántulas. Se aplicaron 200 μ l del inóculo respectivo en la base apical de cada una de las plántulas. Para el tratamiento control se inoculó 200 μ l de SSIE.

Se inocularon, de acuerdo al tratamiento correspondiente, con 200 μ l de las siguientes cepas: AZm5, Az39, PsCKC, Bs y un control.

Los subsecuentes muestreos se realizaron a los 68, 72, 74 y 84 días después de la siembra. El diseño experimental contó con 5 camas de siembra de 4 bacterias y un tratamiento control (sin inocular).

- Variables de crecimiento en plántulas de calabaza.

Se efectuaron cuatro muestreos. El primero se realizó a los 68 días después de la siembra y día 46 de inoculación, se seleccionaron y marcaron 50 individuos por cada tratamiento (bloque), a las cuáles se les determinó la producción floral (longitud de la corola). El segundo muestreo se llevó a cabo a los 72 días después de la siembra y día 50 posterior a la inoculación, se determinaron nuevamente la producción foliar de las plantas anteriormente seleccionadas por tratamiento. Se llevaron a cabo un tercer y cuarto muestreo a los 74 días y 84 días después de la siembra respectivamente, al igual que los posteriores muestreos se determinó la producción foliar en las plantas marcadas por tratamiento.

- Diseño experimental y análisis estadístico de los tres experimentos

El diseño experimental fue de bloques al azar, considerando 4 tratamientos con 5 repeticiones. En la tabla 4 se indica los inóculos microbianos que se emplearon para cada cultivo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA y el procedimiento de la diferencia mínima significativa de Fisher ($p \leq 0.05$).

Tabla 5. Inóculos bacterianos empleados en los cultivos de lechuga, espinaca y calabaza.

Cultivo	Inóculo bacteriano
<p>Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) Var. Starfigther</p>	<p>AZm5 (<i>Azospirillum lipoferum</i>) Az39 (<i>Azospirillum lipoferum</i>) Sp7 (<i>Azospirillum brasilense</i>) PsCKC (<i>Pseudomonas sp.</i>).</p>
<p>Espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>) Var. Imperial spring</p>	<p>AZm5 (<i>Azospirillum lipoferum</i>) Az39 (<i>A. brasilense</i>) PsCKC (<i>Pseudomonas sp.</i>) Bs (<i>Bacillus sp.</i>)</p>
<p>Calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>) Var. Zuchini Squash</p>	<p>AZm5 (<i>Azospirillum lipoferum</i>) Az39 (<i>A. brasilense</i>) PsCKC (<i>Pseudomonas sp.</i>) Bs (<i>Bacillus sp.</i>)</p>

3. RESULTADOS

3.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA COMPOSTA

Los resultados del análisis microbiológico de la composta mostraron que la concentración de los grupos microbianos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo y aerobios, mesófilos, heterótrofos se encontraban en mayor proporción respecto al género *Azospirillum* (tabla 5).

Tabla 6. Análisis microbiológico de la composta proporcionada.

Grupo bacteriano	UFC/g de muestra
Fijadores de Nitrógeno	4.2×10^7
Solubilizadores de fósforo	4.4×10^6
Microorganismos aerobios, mesófilos, heterótrofos	$> 1 \times 10^7$
<i>Azospirillum</i>	1.8×10^3

3.2 VERIFICACIÓN DE PUREZA DE CEPAS

En la tabla 6 se presentan los resultados de las características microscópicas y macroscópicas de las cepas de *Azospirillum*, las cuales coinciden con las reportadas en la literatura (Tarrand y cols., 1978) de acuerdo a cada uno de los medios de cultivo.

La cepa PsCKC presentó colonias características al género *Pseudomonas* desarrolladas en agar cetrimida (tabla 7) (figura 6) las cuales coinciden con la literatura (Brown y Lowbury, 1965) tales como: colonias pequeñas y redondas de color verde amarillo, con fluorescencia azul verdosa bajo luz UV.

La cepa Bs presentó las características microscópicas típicas para la bacteria con la tinción de Gram (tabla 7), las cuales coinciden con la literatura (Reva y cols., 2002) (figura 7).

Tabla 7. Características microscópicas y macroscópicas de las cepas de *Azospirillum*

Cepa	Características microscópicas		Características macroscópicas			
	Morfología	Gram	NFb	Agar nutritivo	PDA	Rojo Congo
AZm5	Bacilo	Negativo	Presencia de un velo color blanco en la superficie y cambio de color del medio de verde a azul.	Colonias cremas, circulares y superficie rugosa.	Colonias cremas, redondas y elevación convexa.	Colonias circulares de consistencia rugosa y brillante y color roja.
Az39	Bacilo	Negativo	Presencia de un velo color blanco en la superficie y cambio de color del medio de verde a azul.	Colonias color crema con borde redondo.	Colonias color marfil, borde redondeado, elevación convexa.	Colonias ovoides, de consistencia cremosa, superficie rugosa y color rojo.
Sp7	Bacilo	Negativo	Presencia de un velo color blanco en la superficie y cambio de color del medio de verde a azul.	Colonias color crema con borde redondo.	Colonias color marfil, borde redondeado, elevación convexa.	Colonias ovoides, de consistencia cremosa, superficie rugosa y color rojo.

Tabla 8. Características microscópicas y macroscópicas de la cepa de *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*

Cepa	Características microscópicas		Características macroscópicas	
	Morfología	Gram	Agar nutritivo	Agar cetrimida
PsCKC	Bacilo	Negativo	Colonias color blanco, borde redondeado, elevación convexa	Colonias color amarillo, borde redondeado, elevación convexa, producción de pigmento amarillo-verdoso
Bs	Bacilo con formación de endospora	Positivo	Colonias blanquecinas, de forma irregular, secas.	ND

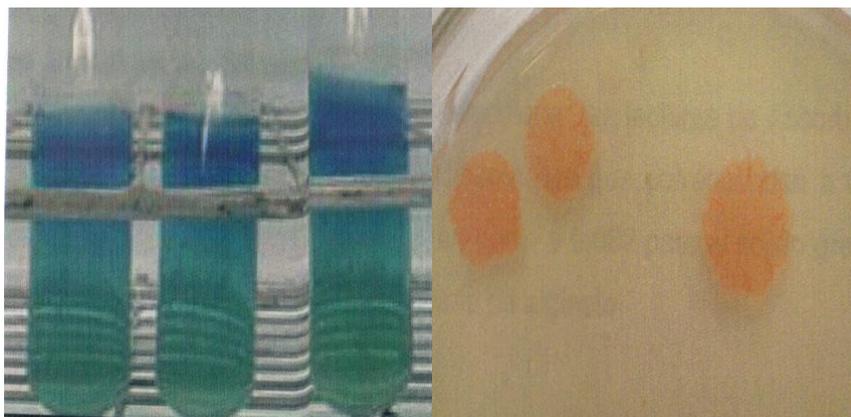


Figura 6. *Azospirillum sp.* en medio NFB ss y colonias de *Azospirillum sp.* en gelosa nutritiva.



Figura 7. Colonias de la cepa PsCKC en medio agar cetrimida y sus características microscópicas.



Figura 8. Colonias de la cepa Bs en medio agar nutritivo y sus características microscópicas.

3.3 AJUSTE Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS BIOFERTILIZANTES

Los resultados del control de calidad de los inóculos se muestran en la tabla 8. Observamos que todos los inóculos presentaron una concentración de 10^7 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) de inóculo a una densidad óptica aproximada a 0.025.

Tabla 9. Control de calidad de los biofertilizantes.

Cepa	D. O. ($\lambda=560\text{nm}$)	UFC/ml inóculo
AZm5	0.029	1.02×10^7
Az39	0.023	1.2×10^7
Sp7	0.028	3.4×10^7
PsCKC	0.031	1.7×10^7
Bs	0.035	2.1×10^7
Control	-	-

3.4 COLONIZACIÓN BACTERIANA EN RAÍCES

Los resultados de la tabla 9 muestran que, las cinco cepas evaluadas son capaces de colonizar las raíces de lechuga var. Starfigther, espinaca var. Imperial spring y calabaza var. Round zuchini Squash.

Tabla 10. Determinación de la colonización en las raíces de las plántulas de las hortalizas.

Tratamiento	Medio de cultivo		
	NFb	Agar cetrimida	Agar nutritivo
AZm5	+	ND	
Az39	+	ND	
Sp7	+	MD	
PsCKC	ND	+	
Bs	ND	ND	+*
Control	-	-	-

*Determinación por medio de microscopia.

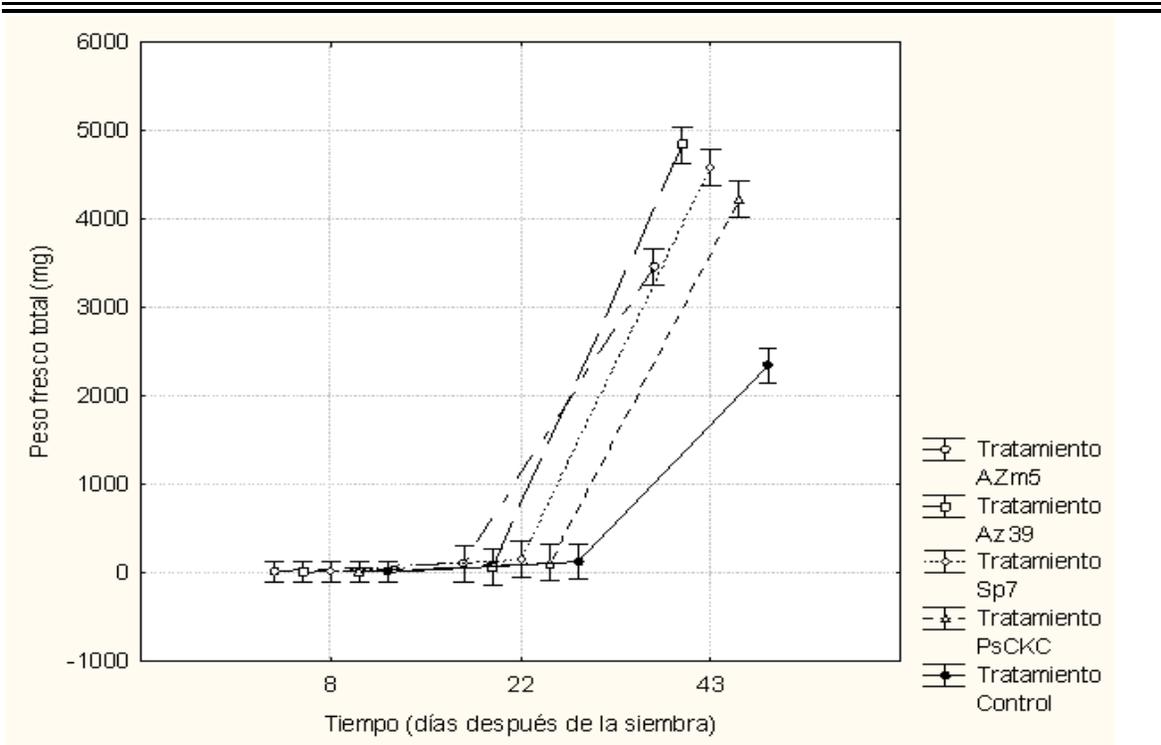
3.5 EFECTO DE RPCV EN EL CRECIMIENTO DE LECHUGA (*LACTUCA SATIVA* L.), ESPINACA (*SPINACIA OLERACEA* L.) Y CALABAZA (*CUCURBITA PEPO* L.).

En la gráfica 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos en el peso fresco y peso seco respectivamente para el cultivo de lechuga con diferentes tratamientos de RPCV, a los 8, 22 y 43 días posteriores a la siembra. En las gráficas 4 y 5 se muestran los datos obtenidos durante la cosecha que se llevó a cabo a los 75 días posteriores a la siembra.

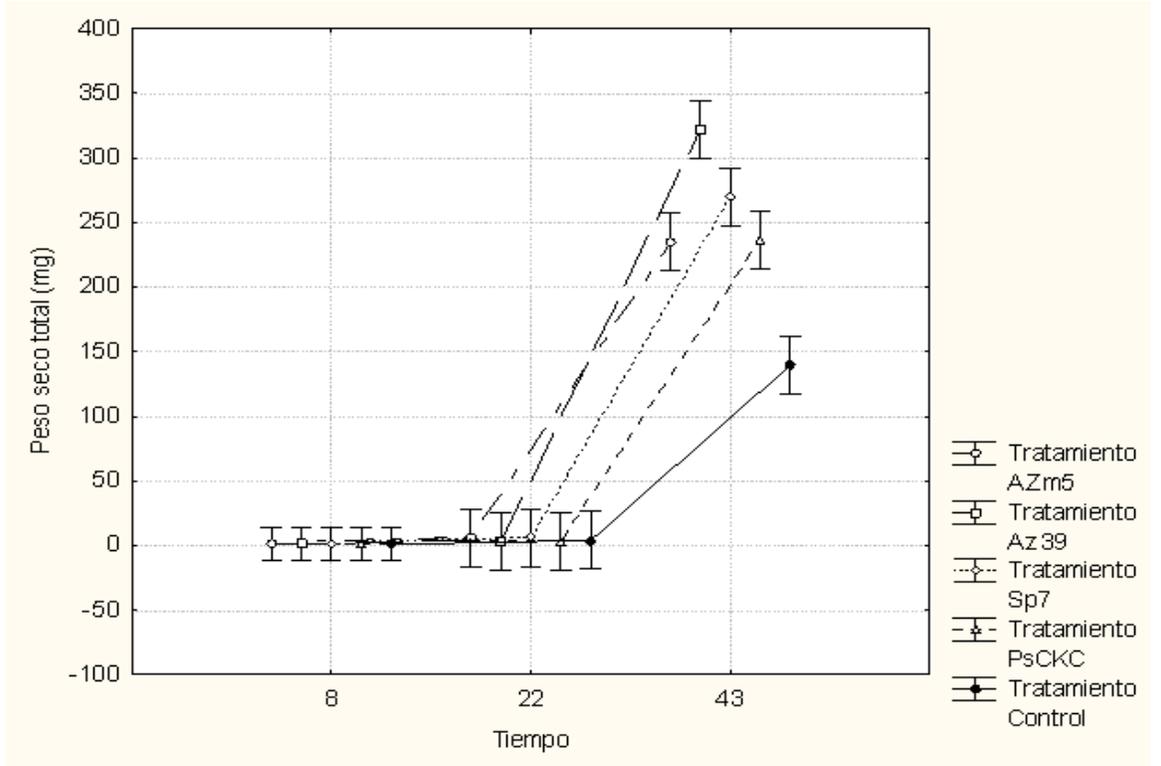
En las gráficas 6 y 7 se muestran los resultados obtenidos en el peso fresco y peso seco respectivamente el cultivo de espinaca con diferentes tratamientos de RPCV, a los 24, 61 y 76 días después de la siembra, éste último considerado como la cosecha del cultivo.

Debido a las condiciones en las cuales se llevó el cultivo de calabaza, sólo fue posible realizar el muestreo de la cosecha. En las gráficas 8 y 9 se observan los resultados obtenidos en la producción total de flor y la longitud de la corola en las plantas de calabaza con diferente tratamiento de RPCV.

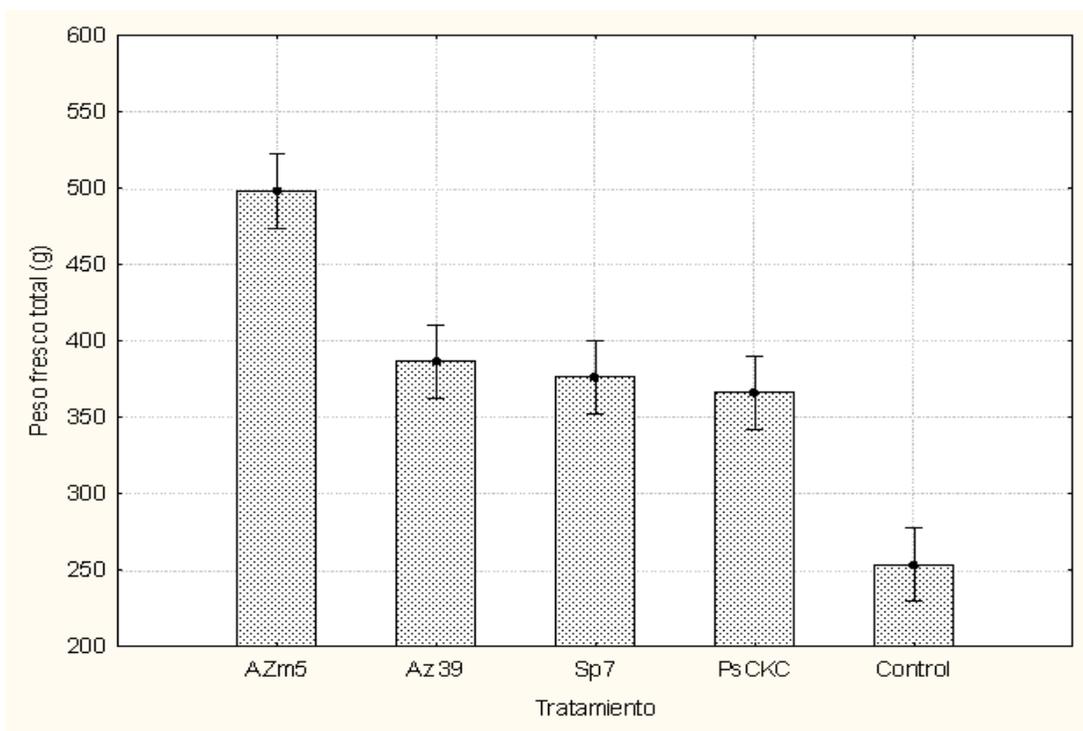
En el Anexo 1 se muestran los datos obtenidos en las diferentes variables de respuesta de cada uno de los cultivos con los diferentes tratamientos.



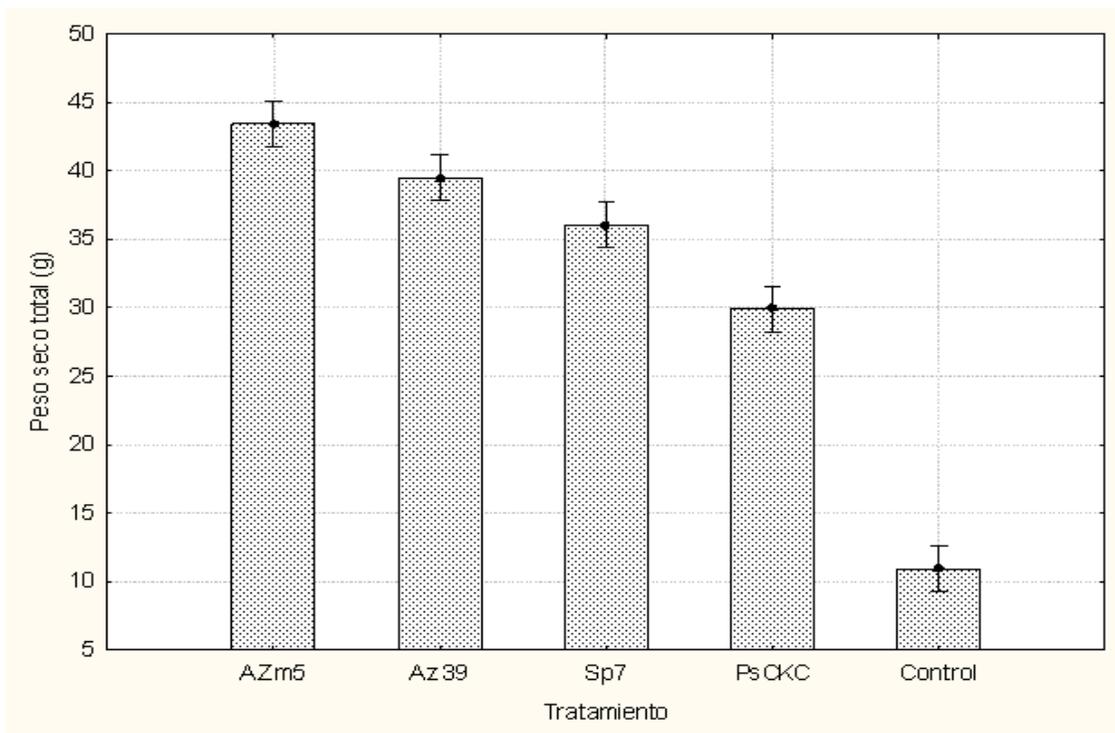
Gráfica 2. Efecto de la inoculación de *RPCV* en el peso fresco total de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa*) a diferentes días de crecimiento. Las barras representan el error estándar de la media de cinco repeticiones



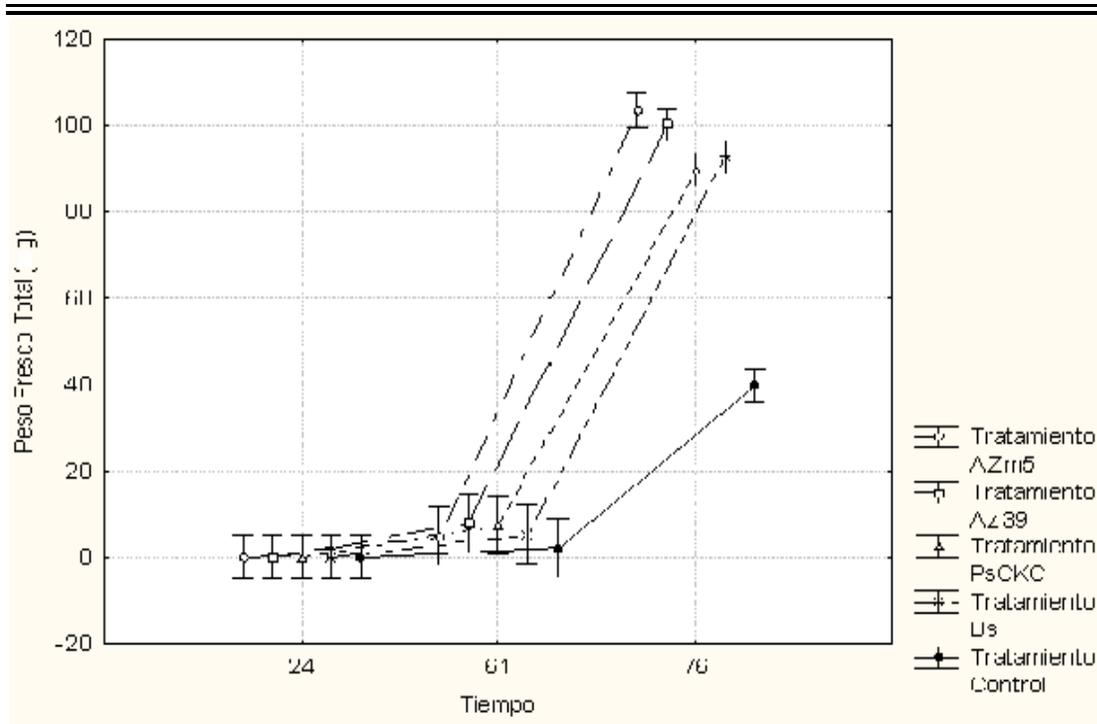
Gráfica 3. Efecto de la inoculación de *RPCV* en el peso seco total de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa*) a diferentes días de crecimiento. Las barras representan el error estándar de la media de cinco repeticiones



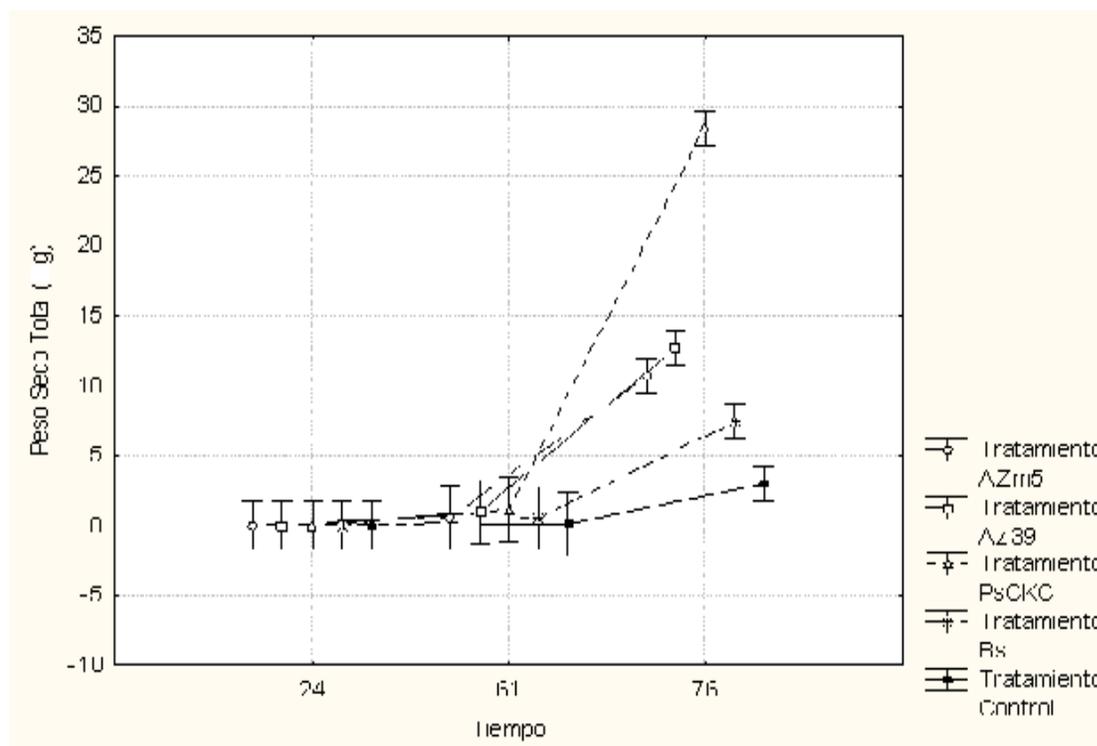
Gráfica 4. Efecto de la inoculación de *RPCV* en el peso fresco total de plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) en la cosecha. Las barras representan el error estándar de la media de cinco repeticiones



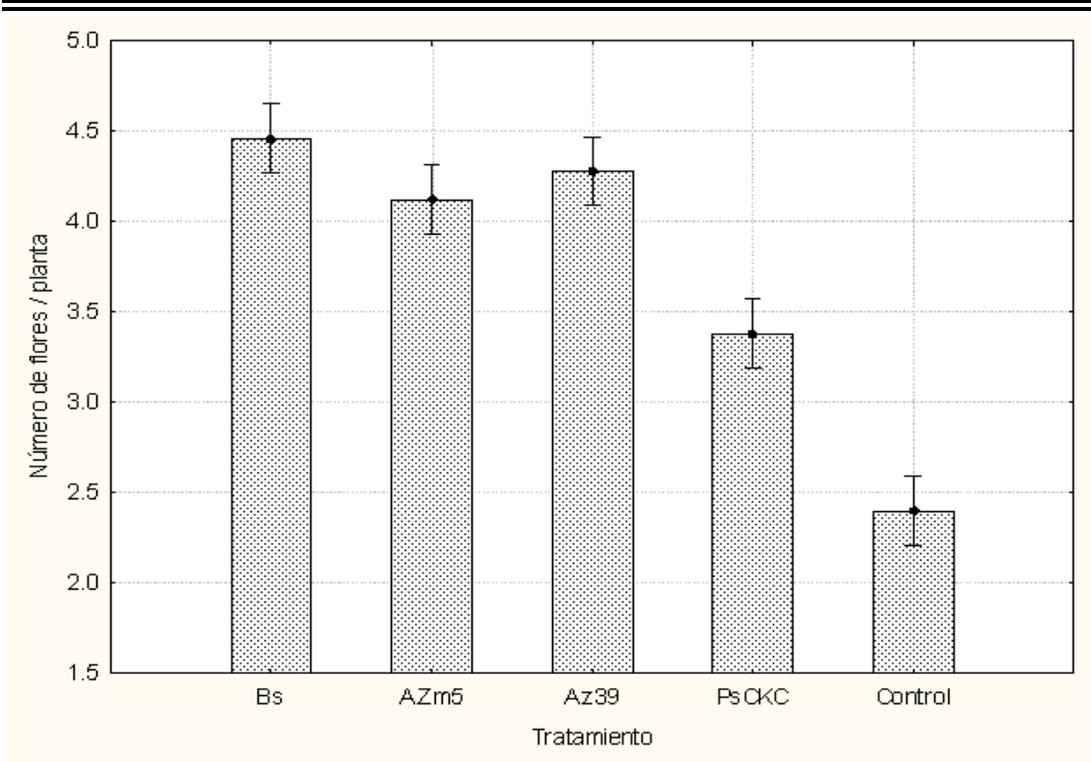
Gráfica 5. Efecto de la inoculación de *RPCV* en el peso seco total de plantass de lechuga (*Lactuca sativa*) en la cosecha. Las barras representan el error estándar de la media de cinco repeticiones



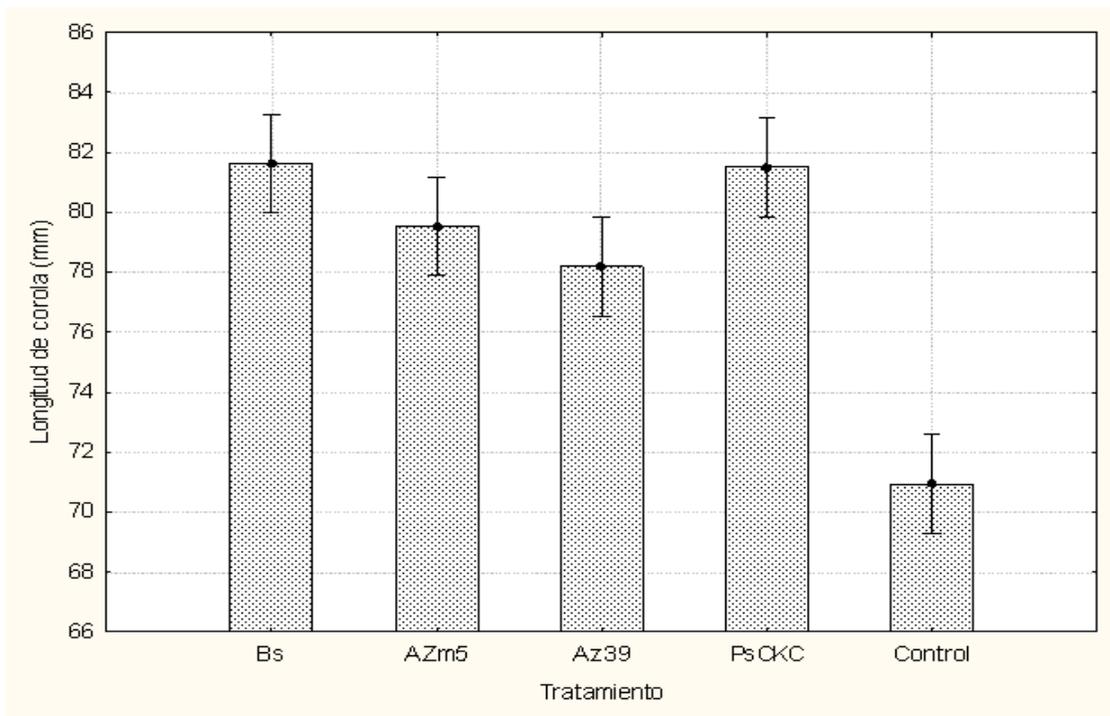
Gráfica 6. Efecto de la inoculación de *RPCV* en el peso fresco total de plántulas de espinaca a diferentes días de crecimiento. Las barras representan el error estándar de la media de cinco repeticiones.



Gráfica 7. Efecto de la inoculación de *RPCV* en el peso seco total de plántulas de espinaca a diferentes días de crecimiento. Las barras representan el error estándar de la media de cinco repeticiones.



Gráfica 8. Efecto de la inoculación de RPCV en el número de flores producidas por las plantas de calabaza. Las barras representan el error estándar de la media.



Gráfica 9. Efecto de la inoculación de RPCV en la longitud de la corola de las plantas de calabaza. Las barras representan el error estándar de la media.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

4.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA COMPOSTA

Los resultados expuestos en la tabla 6 sobre el análisis microbiológico de la composta indican que los valores de los diferentes grupos bacterianos encontrados se encuentran en el orden de 10^3 a 10^8 UFC/g. Lo que coincide con el valor reportado para otras compostas, que corresponde a 10^9 UFC/g de microorganismos, de los cuales las bacterias representan el 80% (Marshall y cols., 2004). Por otro lado el grupo de los fijadores de nitrógeno con un valor de 4.2×10^7 UFC/g es el de mayor presencia en la composta.

4.2 VERIFICACIÓN DE PUREZA DE CEPAS.

Los resultados expuestos en la tabla 7, confirman que los cultivos de cada género de RPCV empleados para preparar cada uno de los biofertilizantes estaban puros.

Las características microscópicas y macroscópicas de las cepas AZm5, Az39 y Sp7 del género *Azospirillum* coinciden con lo reportado por Krieg y Döbereiner (1984). De igual manera, la cepa de *Pseudomonas* (PsCKC) presentó las mismas características microscópicas y macroscópicas en medio cetrimida que lo reportado por Brown y Lowbury (1965), con la reacción de Gram se confirmó que se trataba de una bacteria Gram negativa con morfología celular bacilar, mientras que el cultivo en agar cetrimida nos indico la producción de un pigmento verde fluorescente (figura 7).

La cepa Bs del género *Bacillus* (Bs) a través de la reacción de Gram confirmó las características microscópicas reportadas por Reva y colaboradores (2002).

4.3 AJUSTE Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS BIOFERTILIZANTES

Los inóculos AZm5, Az39 y Sp7 de *Azospirillum* preparados para biofertilizar las plántulas de las hortalizas se ajustaron a una D.O. de aproximadamente 0.025, con esta D.O. se obtuvieron una concentración bacteriana del intervalo de 1×10^7 UFC/ml. A este respecto, se ha reportado que una concentración de 10^7 UFC/ml o superior (10^{10}) de células de *Azospirillum brasilense* incrementa la germinación de semillas de lechuga (Fasciglione y cols, 2012). En tanto para los inóculos de *Pseudomonas* y *Bacillus* se obtuvieron una D.O. de 0.031 y 0.035 respectivamente, con una concentración bacteriana de 1.7×10^7 para la cepa PsCKC y 2.1×10^7 para la cepa Bs.

En el caso de *Pseudomonas* y *Bacillus* no se han encontrado reportes que indiquen la concentración bacteriana idónea para la biofertilización de lechuga, espinaca o calabaza. No obstante, Vessey y colaboradores (2003) han observado que para muchas plántulas de cereales y cultivos comerciales la concentración de la inoculación es de alrededor de 10^5 - 10^6 UFC/ml. Una concentración de inóculo de 10^8 - 10^{10} UFC/ml generalmente inhibe el desarrollo radicular (Barbieri y cols., 1986; Bashan, 1990).

4.4 COLONIZACIÓN DE MICROORGANISMOS EN LAS RAÍCES.

Los resultados expuestos en la tabla 10 muestran que las cepas AZm5, Az39 y Sp7 del género *Azospirillum* evaluadas fueron capaces de colonizar las raíces de lechuga (*Lactuca sativa*, var. Starfigther), espinaca (*Spinacia oleracea*, var. Imperial spring) y calabaza (*Cucurbita pepo*, var. Round zucchini Squash), a una concentración bacteriana del intervalo de 1×10^7 UFC/ml de inóculo. De acuerdo a los resultados obtenidos, donde las raíces de plantas de lechuga, calabaza y espinaca al triturarlas y posteriormente inocularlas en medio Nfb semisólido,

mostraron las características típicas descritas para *Azospirillum* (Tarrand y cols, 1978), podemos afirmar que ambas cepas son capaces de colonizar las raíces de estas hortalizas eficientemente. Esto estaría indicando la capacidad, competitiva como colonizadora de estas bacterias aún cuando se utiliza un sustrato como la composta, con alta carga microbiana. Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con algunos trabajos que han informado que *Azospirillum* es capaz de colonizar lechuga (Lai y cols., 2008; Fasciglione y cols., 2012), espinaca (Gamo y Ahn, 1991), y otras hortalizas como jitomate (*Lycopersicon esculentum*), col (*Brassica rapa*), pepino (*Cucumis stivus*) (Bashan y Holguin, 1997) y pimiento (*Capsicum annuum*) (Bashan, 1998). Vande Broek y colaboradores (1993) descubrieron que diferentes cepas de *Azospirillum* tras ser inoculados en la raíces de trigo y otros cereales durante los primeros días de la asociación las células bacterianas colonizan específicamente los sitios de emergencia de las raíces laterales y las regiones de los pelos radicales, tanto de la raíz primaria como de las raíces secundarias y posteriormente la superficie de la raíz, pero las capacidades por colonizar las raíces de las plantas es variable dependiendo la cepa.

Los resultados (tabla 10) para determinar la colonización en las raíces de la cepa PsCKC y Bs del género *Pseudomonas* y *Bacillus*, respectivamente, indican que ambas cepas fueron capaces de colonizar las raíces de plantas de lechuga (*Lactuca sativa*, var. Starfigther), espinaca (*Spinacia oleracea*, var. Imperial spring) y calabaza (*Cucurbita pepo*, var. Round zucchini Squash). No obstante no se han reportado datos concretos de que cepas de *Pseudomonas* y *Bacillus* sean capaces de colonizar raíces de este tipo de hortalizas.

4.5 EFECTO DE RPCV EN EL CRECIMIENTO DE DIFERENTES HORTALIZAS LECHUGA (*LACTUCA SATIVA* L.), ESPINACA (*SPINACIA OLERACEA* L.) Y CALABAZA (*CUCURBITA PEPO* L.).

El efecto de la inoculación de las RPCV en cultivos hortícolas se determinó con diferentes variables de crecimiento de las plantas, tales como: peso fresco total, peso seco total, longitud de la corola y aumento de la floración.

En la gráfica 2 y gráfica 3 se puede observar que durante los primeros días (22 días después de la siembra) tras la inoculación de las cepas de RPCV en las plantas de lechuga, no existe una diferencia significativa en el desarrollo de las plantas, lo que nos indica que todas las plántulas eran homogéneas en aspecto y tamaño. Este efecto de la inoculación en las plantas no es tan notorio, ya que las bacterias requieren de un tiempo para adaptarse al medio antes de expresar todos sus mecanismos para promover el crecimiento vegetal. Para los 43 días después de la siembra, el efecto de la inoculación con los diferentes tratamientos muestra que todas las cepas de RPCV aumentan significativamente el peso fresco y peso seco en comparación con el tratamiento control. En la gráfica 4 y gráfica 5 se observa el peso fresco y peso seco de la cosecha de lechuga, en donde las cepas de RPCV aumentaron significativamente el peso fresco total y el peso seco total, respecto al tratamiento no inoculado. En donde las plantas inoculadas con las cepas de *Azospirillum* AZm5 y Az39 presentaron los valores más altos. Este fenómeno es económicamente muy importante, ya esta hortaliza se comercializa como un vegetal de hojas frescas.

Este fenómeno se debe al buen desarrollo de la raíz, que favoreció la absorción de agua hacia las hojas, lo cual coincide con lo reportado por Marschner (1995), quien reporta que la raíz favorece la capacidad de la planta para absorber agua y nutrimentos minerales del suelo.

En la gráfica 6 y gráfica 7 se observa el peso fresco total y peso seco total de plantas de espinaca con los diferentes tratamientos de RPCV. Se observan resultados similares al experimento de lechuga, durante los primeros días después de la inoculación no existe diferencia significativa en el peso fresco total y peso seco total entre los tratamientos de RPCV y el tratamiento control. Pero en los posteriores muestreos las cepas de RPCV aumentan significativamente el peso fresco total y peso seco total en comparación con el tratamiento control, siendo más evidente está en la variable del peso fresco. Nuevamente los tratamientos con las cepas de *Azospirillum* AZm5 y Az39 presentaron los mejores resultados. De acuerdo a la literatura, *Azospirillum* se ha distinguido por la producción de reguladores del crecimiento, tales como auxinas (ácido indol acético, AIA), giberelinas y citocininas (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). La producción de AIA, juega un papel muy importante en el crecimiento de la raíz, y en interacción con las citocininas son responsables del crecimiento vegetal (Taiz y Zeiger, 2002).

En las gráficas 8 y 9 se observa que los cultivos de calabaza inoculados con los diferentes inóculos de RPCV muestran una diferencia estadísticamente significativa en la producción de flor en comparación con el tratamiento no inoculado. Las plantas inoculadas con las cepas Bs, AZm5 y Az39 presentaron el mayor número de flores por planta (Gráfica 8). Respecto a la longitud de la corola de las flores, aquellas inoculadas con las cepas Bs y PsCKC produjeron las flores con corola más alta, por lo que podríamos proponer la biofertilización de plantas de calabaza con la cepa Bs de *Bacillus* para obtener la mejor producción de flor, aspecto económicamente importante para comercializar esta hortaliza.

CONCLUSIONES

- Las cepas del género *Azospirillum* AZm5 (*A. lipoferum*), Az39 (*A. brasilense*), Sp7 (*A. brasilense*), del género *Pseudomonas* (PsCKC) y del género *Bacillus* (Bs) fueron capaces de colonizar las raíces de plantas de lechuga (*Lactuca sativa*, var. Starfigther), espinaca (*Spinacia oleracea*, var. Imperial spring) y calabaza (*Cucurbita pepo*, var. Round zuchini Squash).
- Todas las cepas de RPCV empleadas como inóculos bacterianos en las diferentes especies hortícolas evaluadas promueven el crecimiento vegetal representado en el contenido hídrico, biomasa y producción.
- El empleo de composta en el cultivo de lechuga, espinaca y calabaza inoculadas con cepas RPCV, mejoro la productividad vegetal.

EXPECTATIVAS.

- Con los resultados obtenidos en las condiciones de cultivo empleado, las RPCV como AZm5, Az39, Sp7, PsCKC y Bs pueden ser empleadas en condiciones de campo en la biofertilización de lechuga, de calabaza y de espinaca.
- Las cepas de RCPV utilizadas en este trabajo pueden ser evaluadas como biofertilizantes en otras especies hortícolas de interés económico en México.
- Determinar cuantitativamente la producción de reguladores de crecimiento de las cepas de RPCV utilizadas en este trabajo.
- El sistema de cultivo RPCV-composta podría ser una biotecnología ambientalmente adecuada para la producción sustentable de hortalizas de hoja.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Aguado Santacruz G. A., Moreno G. B., Jiménez F. B., García M. E. y Preciado O. E. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de Hierro por las plantas: una síntesis. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 35 (1): 9-21. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61023295002>
- 2 Ali B., Sabri A. N., Ljung K., Shahida H. 2009. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. And their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* L. World Journal of Microbiology & Biotechnology 25(3):519-26.
- 3 Arcand M. M. y Schneider K. D. 2006. Plant- and microbial-based mechanisms to improve the agronomic effectiveness of phosphate rock: a review. Annals of the Brazilian Academy of Sciences. 78 (4): 791-807.
- 4 Banco Mundial (2014) Consumo de fertilizantes (kilogramos por hectárea de tierras cultivables) <http://datos.bancomundial.org/indicador/AG.CON.FERT.ZS> Consultado 07 2014
- 5 Barbieri P., Zanelli T., Galli E. y Zanetti G. 1986. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. *FEMS Microbiol. Lett.* 36: 87-90.
- 6 Barrena G. R. 2006. Compostaje de residuos sólidos orgánicos. Aplicación de técnicas respirométricas en el seguimiento del proceso. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Disponible en: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5307/rbg1de1.pdf?sequence=1>
- 7 Bashan Y (1998) *Azospirillum* plant growth-promoting strains are non pathogenic on tomato, pepper, cotton, and wheat. *Can J Microbiol* 44: 168-174
- 8 Bashan Y, Hognin G (1997) *Azospirillum*-plant relationship: environmental and physiological advances 1990-1997. *Can J Microbiol* 43: 103-121
- 9 Bashan Y. 1991. Changes in membrane potential of intact soybean root elongation zone cells induced by *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 37: 958-963.
- 10 Bashan Y. y de-Bashan L. E. 2010. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth-A Critical Assessment. *Advances in Agronomy* 108: 77-136.
- 11 Bashan Y., Khaosaad T., Salazar B. G., Ocampo J. A., Wiemken A., Oehl F. y Vierheilig H. 2007. Mycorrhizal characterization of the boojum tree, *Fouquieria columnaris*, an endemic ancient tree from the Baja California Peninsula, Mexico. *TREES-STRUCTURE AND FUNCTION.* 21(3):329-335
- 12 Bashan, Y. y H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36: 591-608.
- 13 Bashan, Y., Puente M.E., Rodríguez-Mendoza M.N., Holguin G., Toledo G., Ferrera-Cerrato R. y Pedrín S. 1995. Soil parameters which affect the survival of *Azospirillum brasilense*. In: *Azospirillum VI and Related Microorganisms, Genetics-Physiology-Ecology*, eds. I Fendrik, M Del Gallo, J Vanderleyden M. De Zamaroczy. G37: 441-449. NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- 14 Bashan, 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. P. p. 103-155.
- 15 Beneduzi A., Peres D., Beschoren da Costa P., Bodanese M. H. y Pereira L. M. 2008. Genetic and phenotypic diversity of plantgrowth- promoting bacilli

-
- isolated from wheat fields in southern Brazil. *Research in Microbiology* 159:244-50.
- 16 Bhattacharyya P. N. y Jha D. K. 2011. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol.* 28: 1327-1350.
 - 17 Brown V. L. y Lowbury E. J. L. 1965. Use of an improved cetrimide agar medium of culture methods for *P. aureginosa*. *J. Clin. Pathol.* 18:752.
 - 18 Caballero-Mellado, J. 2001. El género *Azospirillum*. pp. 177-198. En: *Microbios en línea*. E. Martínez-Romero y J. Martínez_romero (Eds). Universidad Nacional Autónoma de México. Versión electrónica en: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios>
 - 19 Calvo P., Reymundo L. y Zúñiga D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada* 7(1,2):141-48.
 - 20 Camelo M. R., Vera P. S., y Bonilla R. R. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista corpoica-Ciencia y tecnología Agropecuaria* 12(2), 159-166.
 - 21 Carrera González A. G. Caracterización Bioquímica, molecular y funcional del banco de cepas de *Azospirillum* spp. De INIAP aisladas de las rizósfera del cultivo de Maíz (*Zea Mays* L.) de la sierra ecuatoriana. Escuela Politécnica del ejército. Sangolquí, 2012.
 - 22 Carvajal A. E.; Alvarez A S., Sánchez P. E., Nitratos en aguas subterráneas; causa de metahemoglobinemia en lactantes. *Revista cubana de higiene y epidemiología*; 18(3): p.227-35, jul. - set. 1980.
 - 23 Cazorla F. M., Romero D., Pérez-García A., Lugtenberg B. J. J., de Vicente A. y Bloemberg G. 2007. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of Applied of Microbiology* 103:1950-19.
 - 24 Chien S. H. Efecto de diferentes fuentes de Nitrogeno amoniacal, la acidificación del suelo. Reporte de International Fertilizer Development Center (IFDC). Agosto del 2001. Disponible en: <http://www.fertilizando.com/articulos/Los%20Fertilizantes%20Nitrogenados%20y%20la%20Acidificacion%20del%20Suelo.asp>
 - 25 diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2832-2837.
 - 26 Dibut Alvarez, Bernardo. Biofertilizantes como insumos en Agricultura Sostenible. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt". (INIFAT). 2006
 - 27 EcuRed. 2014. Disponible en: <http://www.ecured.cu/index.php/2014>
 - 28 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.
 - 29 Esquivel-Cote R. 2011. El papel de *Azospirillum* y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de jitomate y su mecanismo de acción. Tesis de doctorado, Instituto de Ecología, UNAM.
 - 30 Estrada de los Santos P. R., Bustillos-Cristales R. y Caballero-Mellado J. 2001. *Burffholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2790-2798.
 - 31 FAO. Los fertilizantes y su uso. FAO, Roma, 2002.

-
-
- 32 Fasciglione G., Casanovas E. M., Yommi A., Sueldo R. J., y Barassi C. A. 2012-*Azospirillum* improves lettuce growth and transplant under saline conditions. *J Sci Food Agric* 2012; 92:2518-2523.
 - 33 Financiera rural. 2008. Reporte Anual. Disponible en:
<http://www.financierarural.gob.mx/fr/Programas%20Institucionales/Informe%20Anual%202008.pdf>
 - 34 Fuentes-Ramírez L. E., Bustillos-Cristales R., Tapia-Hernández A., Jiménez-Salgado T., Wang E. T., Martínez-Romero E. y Caballero-Mellado J. 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1305–1314.
 - 35 Gamo T, Ahn SB (1991) Growth promoting *Azospirillum* spp. Isolated from roots of several non-gramineous crops in Japan. *Soil Sci Plant Nutr* 37:455-461.
 - 36 García Fernando O. 2004. *Agricultura Sustentable y Materia Orgánica del Suelo: Siembra Directa, Rotaciones y Fertilidad*. III Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, Buenos Aires, 2004.
 - 37 Haug R. T. 1993. *The practical Handbook of Compost Engineering*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
 - 38 Hernández A., Caballero A. Pazos M., Ramírez R. y Heydrich M. 2003. Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo del maíz (*Zea mays* L.) de diferentes suelos de Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5(1):45-55.
 - 39 Hill, W. J. y Kolb, D.K. *Química para el Nuevo Milenio*. México, Pearson Educación, 1999.
 - 40 Holguin G., de-Bashan L.E., Glick B.R. y Bashan Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In: *Microbiología agrícola: hongos, bacterias micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo*. (Eds.) Ferrera-Cerrato, R., and Alarcon, A. Chapter 8. Published by: Editorial Trillas, Mexico City, Mexico. pp. 170-224.
 - 41 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. INIFAP. 2002. Seminario sobre uso de abonos orgánicos en la agricultura. Disponible en:
<http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1686/Seminario%20sobre%20uso%20de%20abonos%20organicos%20en%20la%20agricultura.pdf?sequence=1>
 - 42 Krieg, N. R. DC Dobereiner, J. (1984). Genus *Azospirillum* Tarrand, Krieg and Dobereiner 1979, 79AL (effective publication: Tarrand, Krieg and Dobereiner 1978, 967). In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, pp. 94-104. Edited by N. R. Krieg. Baltimore: Williams & Wilkins
 - 43 Kumar A., Prakash A. y Johri B. N. 2011. *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. D. K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystem*. Disponible en:
http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-18357-7_2#page-1
 - 44 Lai WA, Rekha PD, Arun AB, Young CC (2008) Effect of mineral fertilizer, pig manure, and *Azospirillum rugosum* on growth and nutrient contents of *Lactuca sativa* L. *Biol Fertil Soils* 45: 155-164
 - 45 Lin S. Y., Shen F. T. , Young L. S., Zhu Z. L., Chen W. M. y Young C. C. 2011. *Azospirillum formosense* sp. Nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from agricultural soil. *Int J Syst Evol Microbiol* En prensa.
 - 46 Lin S. Y., Young C. C., Hupfer H., Siering C., Arun A. B., Chen W. M., Lai W. A., She F. T., Rekah P. D., y Yassin A. F. 2009. *Azospirillum picis* sp. Nov., isolated from discarded tar. *Int Syst Evol Microbiol* 59: 761-765.

-
-
- 47 Lopez W. W. 2010. Estudios del uso de residuos industriales no peligrosos a través del proceso de compostaje y su aplicación para el cultivo de maíz y frijol. Tesis de Maestría. Centro de investigaciones en biotecnología aplicada, Tlaxcala. IPN. Disponible en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/6940/TESIS%20WENNDY%20LOPEZ%20WONG.pdf?sequence=1>
- 48 Lugtenberg B. J. Chin-A-Woeng T. F. y Bloemberg G. V. 2002. Microbe- plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Leeuwenhoek* 81:373-383
- 49 Lugtenberg B. J., Dekkers L. y Bloemberg G. V. 2001 Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu Rev Phytopathol* 39:461-490
- 50 Magalhaes F. M. M., Baldani J. I., Souto S. M., Kuykendall y Döbereiner J. 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Bras. Cienc.* 55: 417-430.
- 51 Márcia do Vale Barreto Figueiredo, Lucy Seldin, Fabio Fernando de Araujo and Rosa de Lima Ramos Mariano. 2010. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Fundamentals and Applications: disponible en : [file:///C:/Users/servidor/Downloads/9783642136115-c1%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/servidor/Downloads/9783642136115-c1%20(2).pdf)
- 52 Margulis L. y Sagan D. El proceso de nutrición en las plantas. McGraw-Hill, 2005. Disponible en: <http://www.mcgraw-hill.es/bcv/guide/capitulo/8448180895.pdf>
- 53 Marín-Cepeda V. y Grasto G. 1999. Fijación Biológica de Nitrrógeno: Bacterias Fijadoras de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical. Disponible en: <http://www.cnpab.embrapa.br>
- 54 Marschner H. 1995. 2ª. ed. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. San Diego, CA, USA, 889 pp.
- 55 Marshall M.N., Reddy A.P. y VanderGheynst J.S. 2004. Microbial ecology of compost. En: Lens P., Hamelers B., Hoitink H. y Bidlingmaier W. (Eds). Resource recovery and reuse in organic solid waste management. Integrated Environmental Technology Series. IWA Publishing, London, UK. pp 193-224.
- 56 Michiels K. W., Croes C. L. y Vanderleyden, J. 1991. Two diferent modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J Gen. Microbiol.* 137, 2241-2246.
- 57 Mirza M. S., Mehnaz S. y Normand P. 2006. Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biol Fertil Soils* 43:163-170.
- 58 Reinhold B., Hurek T., Fendrik I., Pot B., Gillis M., Kersters K., Thielemans S. y De Ley J. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp. Nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:43-51.
- 59 Reva O. N., Smirnov V. V. , Petterson B. y Priest F. G. 2002. *Bacillus endophyticus* sp. nov. isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol* ; 52:101-7.
- 60 SAGARPA. Subsecretaría de Desarrollo Rural. México, 2008. Uso de fertilizantes. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Usode%20de%20Fertilizantes.pdf>
- 61 Schroth, M. N. & J. G. Hancock. 1982. Disease suppressive soil and root - colonizing bacteria. *Science* 216: 1376 - 1381

-
-
- 62 Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP. 2014. Producción Agrícola annual. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/>
 - 63 Somers E., Vanderleyden J. y Srinivasan M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol* 30:205–240.
 - 64 Steenhoud O., y Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum* a free-living bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS. Microbiol. Rev.* 24:487-506
 - 65 Stoffella P. J. y Kahn B. A. 2003. *Utilización de compost en los sistemas de cultivo hortícola*. Publicado por Mundi-Prensa Libros. Madrid Barcelona.
 - 66 Suslow, T. y Schoroth, M. 1982. Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopathology* 2. 111-115 pp.
 - 67 Swain M. R., Naskar S. K. y Ray R. C. 2007. Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Pol J Microbiol* 56(2):103-10.
 - 68 Taiz L. y Zeiger E. 2002. *Plant Physiology*. 4ª. ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Mass, USA, 565 pp.
 - 69 Tarrand JJ, Krieg NR, Döbereiner J (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can J Microbiol* 24: 967-980
 - 70 Tejera-Hernández B., Rojas-Badía M. M, y Haydrich-Pérez M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 42, No. 3, pp. 131- 138. Disponible en:<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181222321004>
 - 71 Tendulkar S. R., Saikumari Y. K., Patel V., Raghotama S., Munshi T. K., Balaram P. y Chattoo, B. B. 2007. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology* 103:2331-9.
 - 72 Torriani-Gorini A. 1994. Regulation of phosphate metabolism and transport. The pho regulon of *Escherichia coli*. In: Torriani-Gorini A, Yagil E, Silver S (eds), *Phosphate in microorganisms*. Washington, D.C.: ASM Press, pp 1–4
 - 73 Trivedi P., Kumar B., Pandey A. y Palni L.M. S. 2007. Plant Growth promotion of rice by phosphate solubilizing bioinoculants in a Himalayan location. En: Velázquez E, Rodríguez-Barrueco C, editors. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, Springer, p.291-9.
 - 74 Umali-Garcia M., Hubbell D.H., Gaskins M.H. y Dazzo F.B. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 219-226.
 - 75 Vassileva M., Azcon R., Barea J.M. y Vassilev N., 1999. Effect of encapsulated *Enterobacter* sp. on plant growth and phosphate uptake. *Biores. Technol.* 67, 229–232.
 - 76 Velázquez E., Rojas M., Lorite M. J., Rivas R., Zurdo-Piñeiro J. L. y Heydrich M. 2008. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. *Journal of Basic Microbiology* 48:118-24.
 - 77 Vessey J. K. 2003 Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571–586

Anexo 1. Tablas de resultados.

Tabla 11. Variables de crecimiento de plántulas de lechuga a los ocho días después de la siembra.

Análisis Estadístico	Peso fresco de cotiledones (mg)	Peso fresco de tallo (mg)	Peso fresco raíz (mg)	Peso seco cotiledones (mg)	Peso seco tallo (mg)	Peso seco raíz (mg)
Media	5.65333333	2.87333333	3.48	0.52666667	0.14666667	0.30666667
Varianza	5.19409524	0.72495238	1.506	0.0392381	0.00409524	0.03638095
Desv St	2.27905578	0.85144135	1.22719192	0.19808608	0.06399405	0.19073792
No repeticiones	15	15	15	15	15	15

Tabla 12. Variables de crecimiento de plántulas de lechuga con diferente tratamiento a los 22 días después de la siembra.

Tratamiento	Análisis Estadístico	Peso seco cotiledones (mg)	Peso fresco hojas (mg)	Peso fresco raíz (mg)	Peso seco cotiledones (mg)	Peso seco hojas (mg)	Peso seco raíz (mg)
AZm5	Media	34.98	52.8	15.74	3.24	1.62	0.92
	Varianza	20.767	223.945	37.373	0.913	0.397	0.0204
	Desv St	4.5570824	14.964792	6.11334606	0.95551033	0.63007936	0.14282857
	Repeticiones	5	5	5	5	5	5
Az39	Media	23.42	27.1	13.7	0.76	0.938	1.238
	Varianza	32.447	260.39	50.755	0.073	0.62722	0.56497
	Desv St	5.69622682	16.1366044	7.12425435	0.27018512	0.79197222	0.75164486
	Repeticiones	5	5	5	5	5	5
Sp7	Media	39.92	102.66	20.48	1.72	2.68	1.634
	Varianza	54.397	1667.033	36.067	0.172	0.932	0.53203
	Desv St	7.37543219	40.8293154	6.00558074	0.41472883	0.96540147	0.72940387
	Repeticiones	5	5	5	5	5	5
PsCKC	Media	34.04	67.8	16.48	0.94	1.28	1.122
	Varianza	22.778	185.24	8.817	0.093	0.272	0.10642
	Desv St	4.7726303	13.6102902	2.96934336	0.30495901	0.52153619	0.32622078
	Repeticiones	5	5	5	5	5	5
Control	Media	36.48	72.56	20.9	1.52	1.002	1.446
	Varianza	16.607	164.923	35.875	0.312	0.05002	0.15398
	Desv St	4.07516871	12.842235	5.98957428	0.5585696	0.22365151	0.39240285
	Repeticiones	5	5	5	5	5	5

Tabla 13. Variables de crecimiento de plántulas de lechuga con diferente tratamiento a los 43 días después de la siembra.

Tratamiento	Análisis Estadístico	Peso fresco hojas (mg)	Peso fresco raíz (mg)	Peso seco hojas (mg)	Peso seco hojas (mg)
AZm5	Media	1906	1552	162	73
	Varianza	445780	608470	15970	1545
	Desv St	667.667582	780.044871	126.372465	39.306488
	Repeticiones	5	5	5	5
Az39	Media	3206	1634	232	90
	Varianza	138680	127030	8170	500
	Desv St	372.397637	356.412682	90.3880523	22.3606798
	Repeticiones	5	5	5	5
Sp7	Media	3090	1494	190	80
	Varianza	202450	26480	650	150
	Desv St	449.944441	162.726765	25.4950976	12.2474487
	Repeticiones	5	5	5	5
PsCKC	Media	2580	1644	164	73
	Varianza	355250	260430	17080	1545
	Desv St	596.028523	510.323427	130.690474	39.306488
	Repeticiones	5	5	5	5
Control	Media	1476	870	86	53.4
	Varianza	475830	498150	1880	1997.8
	Desv St	689.80432	705.797421	43.3589668	44.696756
	Repeticiones	5	5	5	5

Tabla 14. Variables de crecimiento de plántulas de lechuga con diferente tratamiento a los 75 días después de la siembra (cosecha).

Tratamiento	Análisis Estadístico	Peso fresco hojas (g)	Peso fresco raíz (g)	Peso seco hojas (g)	Peso seco raíz (g)
AZm5	Media	472.045	26.14	35.4285	8.0235
	Varianza	7759.4805	105.490947	82.7668555	10.4696766
	Desv St	88.0879135	10.2708786	9.09762912	3.23568796
	Repeticiones	20	20	20	20
Az39	Media	361.07	25.68	29.563	9.942
	Varianza	12374.9191	89.1837895	21.2587063	14.0833747
	Desv St	111.242613	9.44371693	4.61071646	3.75278227
	Repeticiones	20	20	20	20
Sp7	Media	358.955	17.725	29.5245	6.5065
	Varianza	14310.0352	63.9346053	24.0420787	9.93610816
	Desv St	119.62456	7.99591178	4.90327224	3.15215928
	Repeticiones	20	20	20	20
PsCkC	Media	326.16	40.05	21.0565	8.884
	Varianza	10334.3131	77.1689474	26.2694976	17.9753621
	Desv St	101.657823	8.78458578	5.1253778	4.23973609
	Repeticiones	20	20	20	20
Control	Media	236.02	17.645	8.9845	1.964
	Varianza	8431.19221	109.827868	8.49642605	1.75518316
	Desv St	91.8215237	10.4798792	2.91486296	1.32483326
	Repeticiones	20	20	20	20

Tabla 15. Variables de crecimiento de plántulas de espinaca a los 24 días después de la siembra.

Análisis Estadístico	Peso fresco hoja (g)	Peso fresco cotiledones (g)	Peso fresco tallo (g)	Peso fresco raíz (g)	Peso seco hojas (g)	Peso seco cotiledones (g)	Peso tallo (g)	Peso seco raíz (g)
Media	0.02028333	0.07607778	0.01123889	0.01225556	0.00087222	0.00793889	0.0006611 1	0.00237778
Varianza	0.00026969	0.00038999	1.6319E-05	3.9586E-05	3.6448E-07	5.9684E-06	8.6046E- 08	1.163E-06
Desv St	0.01642216	0.01974829	0.00403968	0.00629175	0.00060372	0.00244303	0.0002933 4	0.00107843
Repeticiones	18	18	18	18	18	18	18	18

Tabla 16. Variables de crecimiento de plántulas de espinaca con diferente tratamiento a los 61 días después de la siembra.

Tratamiento	Análisis Estadístico	Peso fresco hojas (g)	Peso fresco raíz (g)	Peso fresco cotiledones (g)	Peso seco hoja (g)	Peso seco raíz (g)	Peso seco cotiledones (g)
AZm5	Media	3.207	1.556	0.245	0.226	0.368	0.0099
	Varianza	1.39913444	1.00287111	0.01502778	0.01269333	0.07477333	4.2322E-05
	Desv St	1.18285014	1.00143453	0.12258784	0.11266469	0.27344713	0.00650555
	Repeticiones	10	10	10	10	10	10
Az39	Media	4.475	3.39	0.21	0.302	0.672	0.0182
	Varianza	1.07167222	1.86537778	0.0076	0.00735111	0.15746222	0.00128796
	Desv St	1.03521603	1.36578834	0.08717798	0.08573862	0.3968151	0.0358881
	Repeticiones	10	10	10	10	10	10
PsCKC	Media	3.758	3.751	0.204	0.267	0.902	0.00641
	Varianza	1.04246222	7.37629889	0.01327111	0.00664556	0.64759556	1.7259E-05
	Desv St	1.02101039	2.71593426	0.11520031	0.08152028	0.80473322	0.00415437
	Repeticiones	10	10	10	10	10	10
Bs	Media	3.186	1.913	0.388	0.261	0.246	0.01413
	Varianza	1.01531556	1.32435667	0.10164	0.00852111	0.02520444	0.00012695
	Desv St	1.00762868	1.15080696	0.31881029	0.09230986	0.15875908	0.01126707
	Repeticiones	10	10	10	10	10	10
Control	Media	1.433	0.569	0.184	0.085	0.04991	0.00596
	Varianza	0.34451222	0.85738778	0.00991556	0.00127222	0.00453741	3.8836E-05
	Desv St	0.58695164	0.92595236	0.09957688	0.03566822	0.06736027	0.00623185
	Repeticiones	10	10	10	10	10	10

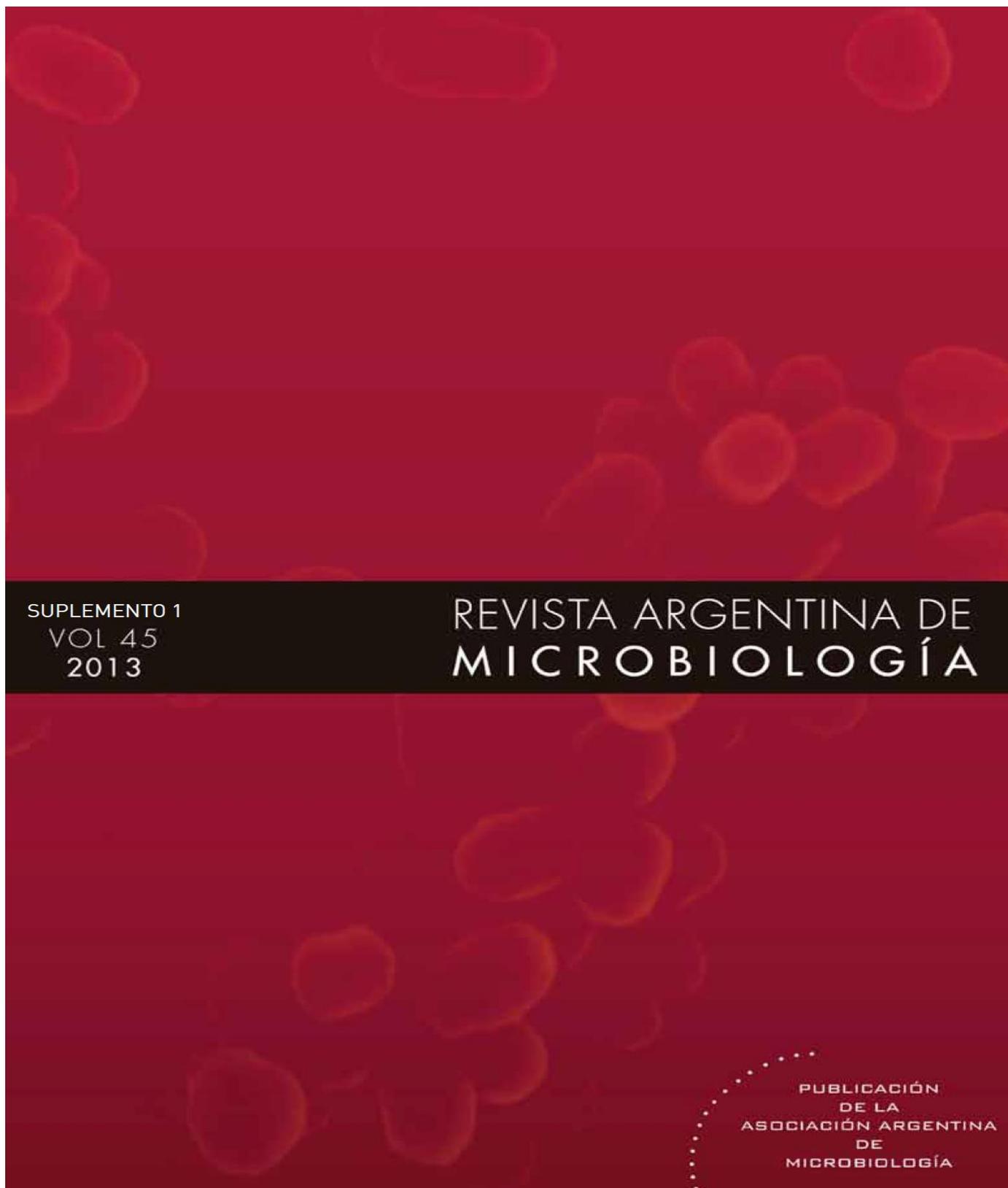
Tabla 17. Variables de crecimiento de plántulas de espinaca con diferente tratamiento a los 76 días después de la siembra.

Tratamiento	Análisis Estadístico	Peso fresco hojas (g)	Peso fresco raíz (g)	Peso seco (g)	Peso seco raíz (g)
AZm5	Media	98.2515625	5.3996875	9.3371875	1.3525
	Varianza	836.721672	5.53946764	12.7811757	0.34646452
	Desv St	28.9261417	2.35360737	3.57507702	0.58861236
	Repeticiones	32	32	32	32
Az39	Media	96.4175	3.91375	12.0825	0.62375
	Varianza	580.740787	8.49460484	258.749103	0.17514677
	Desv St	24.098564	2.91455054	16.0856801	0.41850541
	Repeticiones	32	32	32	32
PsCKC	Media	85.883125	3.9109375	27.3090625	1.0759375
	Varianza	1005.99176	5.92675716	178.322815	0.27165716
	Desv St	31.7173732	2.4344932	13.3537566	0.5212074
	Repeticiones	32	32	32	32
Bs	Media	88.9796875	3.7653125	6.96125	0.5215625
	Varianza	978.617584	6.1001999	4.79986935	0.06119425
	Desv St	31.2828641	2.46985828	2.19086041	0.24737472
	Repeticiones	32	32	32	32
Control	Media	40.3075758	1.3069697	2.96848485	0.20272727
	Varianza	690.701631	0.74570928	3.78594451	0.02757045
	Desv St	26.281203	0.8635446	1.94575037	0.16604353
	Repeticiones	32	32	32	32

Tabla 18. Variables de crecimiento de plantas de calabaza con diferente tratamiento.

Tratamiento	Análisis Estadístico	Número de flores	Longitud de la corola (mm)
AZm5	Media	20.7	80.039
	Varianza	6.233333	19.98169
	Desv St	2.496664	4.470089
	Repeticiones	50	50
Az39	Media	21.3	80.978
	Varianza	6.9	52.11468444
	Desv St	2.626785	7.2190501
	Repeticiones	50	50
PsCKC	Media	17.1	81.732
	Varianza	9.433333	61.71164
	Desv St	3.0713732	7.85567565
	Repeticiones	50	50
Bs	Media	22.1	81.962
	Varianza	7.2111111	26.6439066
	Desv St	2.685312	5.1617735
	Repeticiones	50	50
Control	Media	11.8	75.598
	Varianza	10.1777778	26.0231733
	Desv St	3.19026296	5.10129134
	Repeticiones	50	50

ANEXO 2. Publicación y presentación del trabajo.



XIII Congreso Argentino de Microbiología

II Congreso Microbiología Agrícola y Ambiental

23 al 26 de septiembre de 2013
Centro de Convenciones Palais Rouge

Jerónimo Salguero 1433/49
Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

resistencia a condiciones ambientales desfavorables y originan un incremento de vigor en semillas, también inhiben o suprimen a una amplia variedad de microorganismos, brindando protección a plantas contra diversos patógenos. Se considera que alrededor del 20 al 30% de las especies de pasturas en el mundo forman estas asociaciones simbióticas. El objetivo del estudio fue aislar y caracterizar los hongos endófitos presentes en *Bromus biebersteinii*, *Paspalum notatum* y *P. dilatatum*, y evaluar su potencial como productores de metabolitos bioactivos. Las colectas se realizaron en zonas cercanas a Zavalla y Funes, en los períodos de marzo-mayo y octubre-diciembre del 2012. Se colectaron plantas sin síntomas de enfermedad para el aislamiento de endófitos y plantas enfermas (cambio de color, marchitamiento, necrosis) para el aislamiento de hongos patógenos, que fueron usados en pruebas antagonistas. Los aislamientos de hongos se efectuaron en placas con medio de cultivo PDA y las identificaciones taxonómicas se realizaron por caracteres morfológicos macro y microscópicos. Para la producción y obtención de metabolitos bioactivos, se realizaron inoculaciones en medios líquidos enriquecidos y sometidos a agitación orbital. Se realizó la extracción de los metabolitos producidos con solventes orgánicos, los extractos fueron analizados por Cromatografía en Capa Delgada (TLC) para determinar la presencia de alcaloides. Se aisló la especie endófito *Acremonium strictum*, y diferentes cepas del género endófito *Acremonium*, también patógenos de los géneros de *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Curvularia*, que fueron enfrentados contra las cepas de *Acremonium* sp. Las cepas de *Acremonium* sp.: 033 (aislada de *P. dilatatum*), 050 y 073 (aisladas de *B. biebersteinii*), mostraron actividad antagonista contra *Alternaria* sp., *A. alternata*, *Alternaria* sp. aff. *cheiranthi*, *Curvularia* sp. aff. *clavata* y *Curvularia* sp. En la corrida de la TLC se evidenció la presencia de alcaloides en los extractos fúngicos de la cepa de *Acremonium* sp.: 040. Distintas especies del género *Acremonium* han sido reportadas como productoras de metabolitos de interés antibiótico y han sido estudiadas por su potencial como agente de control biológico. La conservación de la diversidad de especies forrajeras, combinada con el uso de nuevas biotecnologías que fomenten en la planta resistencia ante factores de estrés biótico y abiótico, constituye herramientas fundamentales para resolver problemas como el déficit de forraje por estrés hídrico y por el ataque de diversas plagas.

P-639

CARACTERIZACIÓN DE LA COLONIZACIÓN DE *Sorghum bicolor* POR *Burkholderia tropica*

P Bernabeu¹, J Boiardi¹, J Crespo¹, M Luna^{1,2}

¹ CINDEFI (UNLP; CCT-La Plata, CONICET), Facultad de Cs. Exactas. Calles 47 y 115. La Plata (1900), Argentina. ² CIC-PBA, Argentina.

El uso de microorganismos como biofertilizantes, bioestimulantes y biocontroladores es una alternativa para reducir el empleo de químicos en la agricultura. Dentro de estos microorganismos beneficiosos encontramos a las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) que son capaces de colonizar la rizosfera, el rizoplaneo e incluso, algunas de ellas, pueden penetrar en el interior de los tejidos vegetales. Estas últimas, llamadas endófitas, tienen ciertas ventajas competitivas frente a las rizosféricas. Independientemente del tipo de interacción planta-microorganismo el proceso de colonización siempre juega un papel muy importante, y a menudo la falta de respuesta en los ensayos a campo es atribuida a una ineficiente colonización. Por lo tanto, caracterizar el proceso de colonización es un prerrequisito crítico para el desarrollo de un inoculante efectivo. Con el objetivo de encontrar potenciales BPCV para gramíneas, en el presente trabajo se realizó la caracterización de la colonización de plantas de sorgo crecidas en condiciones gnotobióticas (donde el único microorganismo presente es el inoculado) de un inoculante a base de *Burkholderia tropica* Mto293, bacteria con probadas características de promoción del crecimiento *in vitro* y diazótrofo natural endófito de maíz. Por metodologías cultivo dependiente se determinó una gran colonización

superficial de las raíces (2-5 10⁷ UFC (Unidades Formadoras de Colonia)/g fresco de raíz) que fue acompañada por una población endófitica (2-3 10⁵ UFC/g fresco de raíz) desde las 48 horas postinoculación. Por microscopía de epifluorescencia, empleando el gen reportero de la Proteína Verde Fluorescente, se registró una colonización superficial característica y se determinaron los sitios de ingreso a la planta: pelos radicales y sitios de emergencia de raíces laterales. Por microscopía confocal se determinó que *B. tropica* Mto293 se comporta como una bacteria endófito en sorgo que se ubica principalmente en los espacios intercelulares de los tejidos radicales. Este estudio nos provee evidencias de la capacidad de *B. tropica* de colonizar eficientemente otros cultivos, tales como sorgo, diferentes de su hospedante natural. Futuros estudios a campo serán necesarios para evidenciar si esta eficiente colonización va a acompañada de una promoción del crecimiento vegetal.

P-640

EFFECTO DE *Azospirillum* EN EL CRECIMIENTO VEGETAL DE PLÁNTULAS DE LECHUGA (*Lactuca sativa* L.) VARIEDAD STARFIGTHER, EN UN CULTIVO DE ALMÁCIGO SIN FERTILIZAR, EN XOCHIMILCO, DISTRITO FEDERAL, MÉXICO

R Esquivel-Cote¹, OG Velasco-Becerril¹, F Jiménez-Flores², IE García de Salamone³, G Tsuzuki-Reyes¹, RM Ramírez-Gama¹

¹ Facultad de Química UNAM, México. ² JITOSAN S.P.R. de R.L., México. ³

Universidad Buenos Aires, Argentina.

Azospirillum representa uno de los géneros mejor caracterizados como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, su efecto benéfico se ha demostrado en numerosas plantas de cultivo y silvestres. La lechuga (*Lactuca sativa*) es una de las hortalizas de mayor consumo en México. El efecto de *Azospirillum* en el crecimiento de plántulas de lechuga, así como de otras hortalizas, no ha sido hondamente documentado. El objetivo del presente trabajo fue: evaluar el efecto de diferentes cepas de *Azospirillum* en el crecimiento de plántulas de lechuga en almácigo. El experimento se llevó a cabo en la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México y en las instalaciones de la mini empresa comercializadora y productora de hortalizas JITOSAN S.P.R. de R.L., ubicado en Xochimilco, Distrito Federal, México. Semillas de lechuga variedad Starfigther, se sembraron en charolas para almácigo con composta como sustrato. El cultivo se mantuvo en un invernadero con cubierta plástica, a 28°±1°C max/8±1°C min, una humedad relativa de 70%, con luz natural. Las plántulas fueron regadas con agua, sin la adición de fertilizante químico. La inoculación con una cepa de *Azospirillum lipoferum* (AZm5) y dos de *Azospirillum brasilense* (Az39 y Sp7) se efectuó 8 días después de la siembra (dds), aplicando 200 µL del inóculo respectivo (0.025 a A₅₆₀ equivalente a 1x10⁸ ufc/mL) en la base del tallo de cada plántula. Once días después de la inoculación (ddi), se verificó la colonización bacteriana en las raíces de las plantas. Se efectuaron tres muestreos, en los que se registró el peso fresco y seco de hojas o cotiledones y raíz. El diseño experimental fue de bloques al azar, considerando 4 tratamientos con 5 repeticiones. Los datos se analizaron mediante un ANOVA y el procedimiento de la diferencia mínima significativa de Fisher (p<0.05). Los resultados muestran que cada una de las cepas fue capaz de colonizar las raíces de las plántulas inoculadas. A los 22 dds (14 ddi), se registró que la cepa Sp7 incrementó significativamente el peso fresco y seco de la parte aérea de las plántulas, respecto a los otros tratamientos. A los 43 dds (35 ddi) se observó que las plantas inoculadas con las cepas Az39 y Sp7 incrementaron significativamente el peso fresco de hojas, respecto a los otros tratamientos. El presente estudio permitió concluir que, las cepas Az39 y Sp7 de *Azospirillum* son capaces de colonizar raíces de lechuga variedad Starfigther e incrementar la biomasa de las plántulas en almácigo a los 22 y 43 dds, por lo que pueden ser consideradas como cepas potenciales para la biofertilización de lechuga.