



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL pH EN CULTIVO
SUMERGIDO DE *Sinorhizobium meliloti* EN BIORREACTOR
DE TANQUE AGITADO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

I N G E N I E R O Q U Í M I C O

P R E S E N T A :

JAIME ULISES RAMÍREZ BENÍTEZ

ASESOR:

DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDÁN

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

M. en A. M.
ASUNTOS ACADÉMICOS Y ADMINISTRATIVOS



ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el Trabajo de Tesis

Caracterización del efecto del pH en cultivo sumergido de *Sinorhizobium meliloti* en biorreactor de tanque agitado

Que presenta el pasante: Jaime Ulises Ramirez Benitez
Con número de cuenta: 306177729 para obtener el Título de Ingeniero Químico

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Octubre de 2014

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Ricardo Paramest Hernández García	
VOCAL	M. en C. María de Jesús Cruz Onofre	
SECRETARIO	Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán	
1er. SUPLENTE	L.Q. Paula Álvarez Fernández	
2do. SUPLENTE	M. en B. María Veresa Ylizaliturri Gómez Palacios	

NOTA: Los simuladores de plantas están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (arts. 157).

HM/tec

El presente trabajo se llevó a cabo en La Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo el apoyo económico de la empresa Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V., el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 178528, 214404 y 220795) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica UNAM (PAPIIT IN-210013 y IN-209113.).

AGRADECIMIENTOS

La culminación de este proyecto representa la conclusión de una importante etapa en mi carrera profesional. Agradezco a la vida y a Dios por ponerme siempre en el lugar correcto en cada ciclo de mi vida, donde he podido conocer y aprender de personas con un gran valor humano y profesional.

A mis padres que con su confianza, ejemplo, libertad, fortaleza y trabajo duro me han apoyado siempre en todos mis proyectos. Siempre han creído en mí y eso me hace inmensamente feliz. El orgullo que siento por ustedes es incomparable, me siento bendecido de poder aprender de ambos. Lo que he logrado es por ustedes, este trabajo es el resultado de su esfuerzo y es una modesta forma de agradecerles todo lo que me han brindado. A mi hermano con un futuro increíblemente promisorio, no tengo más que decirle que sigas apasionándote por tu profesión.

A mis abuelos, aunque sólo esté con nosotros mi abuelita materna, les doy gracias por todo lo que le dieron a mis padres a pesar de las circunstancias, porque todo lo que alguna vez les brindaron es lo que hoy me permite crecer y desarrollarme personal y profesionalmente. A mis tíos, en quienes siempre he encontrado mucho apoyo y buen ejemplo.

Agradezco a la UNAM como institución por brindarme una educación de alta calidad, a las personas que forman parte de ella y por enseñarme a “aprender a aprender”. A mis amigos y compañeros de todos los niveles escolares y sobre todo aquellos que compartieron esta etapa de mi formación Elizabeth, Marlene, Ramsés, Octavio, José, Julio, Jorge, Enrique y Raúl. A ti Sandra que me acompañabas tardes de fines de semana en el laboratorio gracias por cuidarme, comprenderme y quererme como lo haces. A la Ing. Rocío Benítez que día con día me sigue sorprendiendo.

Al Dr. Mauricio Trujillo quien confió en mi persona para la realización de este trabajo. De quien aprendí mucho con su ejemplo y consejos para la vida profesional. Todos los recursos siempre estuvieron disponibles. Mis ideas para realizar experimentos no tuvieron freno y eso lo agradezco en demasía. Gracias por un día aceptarme dentro del grupo porque crecí mucho con ustedes.

A todos los integrantes de la Unidad de Bioprocesos, en especial al Biol. Jesús Villegas, Dra. Adriana Valdés, Dra. Martha, M. en C. Ramsés García, Ing. Abel Blancas, Biol. Karen Carrasco, Daniel Vázquez quienes me involucraron en el mundo de la biotecnología y cuyas colaboraciones en mi trabajo y lecciones de laboratorio siempre voy a llevar conmigo.

A mis asesores por sus amables y atinadas correcciones en este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

I.	ABREVIATURAS	VII
II.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
III.	ÍNDICE DE TABLAS	X
V.	INTRODUCCIÓN.....	3
VI.	ANTECEDENTES	5
	a. Importancia de los fertilizantes.....	5
	b. Impacto ambiental de los fertilizantes químicos	6
	c. Fijación biológica de nitrógeno.	7
	d. Efectos de la FBN sobre la acidez del suelo	8
	e. Simbiosis leguminosa-rizobio.....	8
	f. Invasión de los rizobios a la planta: el modelo <i>Medicago-S.meliloti</i> ?.....	8
	g. La nitrogenasa	10
	h. Competitividad en la nodulación de leguminosas con cepas de <i>Rhizobium</i>	11
	i. <i>Sinorhizobium meliloti</i>	12
	j. Función, tipos y producción de exopolisacáridos (EPS) en <i>S. meliloti</i>	15
	k. Producción y función del polímero intra celular Poli- β -hidroxibutirato en <i>S. meliloti</i>	17
	l. Características del suelo que impactan en la simbiosis <i>Sinorhizobium</i> -leguminosa	19
	m. Biofertilizantes.....	20
	n. Efecto del pH en el crecimiento de <i>Sinorhizobium meliloti</i> y en el proceso de nodulación	23
	o. Biorreactor	24
	p. Determinación del coeficiente de transferencia de masa (k_La)	29
VII.	JUSTIFICACIÓN	30
VIII.	HIPÓTESIS	30
IX.	OBJETIVOS	31
	a. Objetivo general.....	31
	b. Objetivos particulares.....	31
X.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
	a. Cepas de trabajo.....	32
	b. Descripción de los medios de cultivo	32
	c. Identificación de la cepa.....	32
	d. Resistencia a antibióticos.....	33
	e. Elaboración de banco de trabajo.....	33
	f. Cinéticas de crecimiento	33
	g. Determinación del crecimiento celular, consumo de sustrato y producción de polímeros intra y extra celulares	34
	h. Determinación de k_La	37
XI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
	a. Caracterización del reactor applikon biotechnology con capacidad de 1 L.....	39
	b. Caracterización macroscópica y microscópica de la cepa.....	41
	c. Determinación de manitol por el método colorimétrico de azúcares totales.....	43
	d. Determinación de PHB por el método de Law & Slepecky modificado	43
	e. Cinética de crecimiento de <i>S.meliloti</i> en matraces agitados sin control pH	45

f. Cinética de crecimiento de <i>S. meliloti</i> en biorreactor con control de pH 5	46
g. Cinética de crecimiento de <i>S. meliloti</i> en biorreactor con control de pH 6	47
h. Cinética de crecimiento de <i>S. meliloti</i> en biorreactor sin control de pH	49
i. Cinética de crecimiento de <i>S. meliloti</i> en biorreactor con control de pH 8.....	50
j. Cinética de crecimiento de <i>S. meliloti</i> en biorreactor con control de pH 9.....	52
k. Cinética de crecimiento de <i>S. meliloti</i> cepas A, B, D en bioreactores de 10 L	53
l. Velocidad específica de crecimiento de <i>S. meliloti</i> en función de la condición de pH en cultivo sumergido en biorreactor	54
XII. CONCLUSIONES.....	57
XIII. PERSPECTIVAS	58
XIV. BIBLIOGRAFÍA	59
XV. ANEXOS.....	66
XVI. GLOSARIO	68

I. ABREVIATURAS

μ	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
μg	Microgramo
μm	Micrómetro
C^*	Concentración de saturación de oxígeno disuelto
CAS	Chemical Abstract Service. División de la Sociedad Americana de Química que identifica a compuestos químicos orgánicos e inorgánicos.
C_g^*	Concentración de equilibrio de oxígeno en la fase gaseosa
C_L	Concentración de oxígeno en la fase líquida
C_{Lo}	Concentración de oxígeno en la fase líquida inicial
C_x	Concentración de microorganismos
d.o.	Densidad óptica
Da	Unidad de masa atómica
dc/dt	Cambio de concentración de oxígeno en el tiempo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPS	Exopolisacáridos
FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno
g	Gramos
g/L	Gramos sobre litro de solución
h	Tiempo en horas
h^{-1}	El inverso de la hora
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
K_2HPO_4	Difosfato de potasio
Kbp	Kilo-base, unidad de medida que representa la longitud de DNA o RNA es igual a 1000 Nucleótidos
k_{La}	Coefficiente de transferencia de masa
LB	Medio Luria Bertani
ln	Logaritmo Natural
mg	Miligramos
$MgSO_4 \cdot H_2O$	Sulfato de magnesio hidratado
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MtNFP	<i>M. truncala</i> Nod Factor Perception
NaCl	Cloruro de sodio
NH_3	Amoníaco
$(NH_4)_2SO_4$	Sulfato de amonio
NH_4Cl	Cloruro de amonio
NH_4NO_3	Nitrato de amonio

NO ₂	Ion nitrito
NO ₃	Ion nitrato
NO _x	Óxidos de Nitrógeno
O.D.	Oxígeno disuelto
OTR	Velocidad de transferencia de oxígeno
OUR	Velocidad de consumo de oxígeno
pH	Potencial de hidrógeno
PHB	Poli-β-hidroxibutirato
PY	Medio sólido con Peptona y extracto de levadura
Q _{O2}	Velocidad específica de consumo de oxígeno
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribosomal
t	Tiempo
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
u.a.	Unidades de absorbancia
UFC's/mL	Unidades formadoras de colonia por mililitro
ug	Microgramos
V	Volumen del reactor
v/v	Volumen sobre volumen
vvm	Volumen de aire por volumen de medio por minuto
w/v	Masa sobre volumen de muestra
w/w	Masa sobre masa
W _{PHB} /W _{Biomasa}	Masa de PHB por biomasa
YEM	Medio líquido con Extracto de Levadura y Manitol

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición elemental promedio de las plantas	5
Figura 2. Tendencias de la población humana y uso del nitrógeno a través del siglo XX.....	5
Figura 3. Inicio de la señalización entre <i>Medicago</i> y <i>S. meliloti</i>	9
Figura 4. Invasión y formación del bacteroide.....	10
Figura 5. Propuesta de integración de las rutas metabólicas en el género..... <i>Sinorhizobium</i>	14
Figura 6. Posible ruta catabólica de la manosa en <i>S. meliloti</i>	15
Figura 7. Estructura de los exopolisacáridos producidos por <i>S. meliloti</i>	16
Figura 8. Ciclo del PHB en <i>S. meliloti</i>	19
Figura 9. Principales partes de un biorreactor de tanque agitado	25
Figura 10. Biorreactor (1 l) aplikon biotechnology con controlador adi 1010.	25
Figura 11. Relación entre la densidad óptica y el peso seco de <i>S. meliloti</i>	35
Figura 12. Relación entre la concentración de manitol y la absorbancia a 490 nm	36
Figura 13. Relación entre la concentración de PHB y la absorbancia a 235 nm.....	37
Figura 14. Descripción esquemática de la técnica dinámica desorción-absorción de oxígeno	38
Figura 15. Valores de $k_L a$ en biorreactor aplikon biotechnology de 1 L	40
Figura 16. Efecto de la aireación en el mezclado en biorreactores de tanque agitado.....	41
Figura 17. Morfología macroscópica de <i>S. meliloti</i> en medio sólido	41
Figura 18. Morfología microscópica de <i>S. meliloti</i>	42
Figura 19. Morfología de <i>S. meliloti</i> en cultivo en caja con medio py	42
Figura 20. Resultados cinéticos del cultivo en matraz de <i>S. meliloti</i>	45
Figura 21. Cultivo en matraz de <i>S. meliloti</i> cepa A.....	45
Figura 22. Resultados cinéticos cultivo de <i>S. meliloti</i> en biorreactor de 1L control de pH 5	46
Figura 23. Resultados cinéticos cultivo de <i>S. meliloti</i> en biorreactor de 1L con control de pH 6	48
Figura 24. Resultados cinéticos cultivo de <i>S. meliloti</i> en biorreactor de 1L sin control de pH	49
Figura 25. Resultados cinéticos cultivo de <i>S. meliloti</i> en biorreactor de 1L con control de pH 8	50
Figura 26. Resultados cinéticos de la producción de EPS y PHB en cultivo de <i>S.</i> <i>meliloti</i> en biorreactor de 1 L con control de pH 8	51
Figura 27. Resultados cinéticos cultivo de <i>S. meliloti</i> en biorreactor de 1L con control de pH 9	52
Figura 28. Resultados cinéticos del cultivo de <i>S. meliloti</i> en biorreactor de 10 L.....	53
Figura 29. Velocidades específicas de crecimiento en función del pH para el cultivo sumergido de <i>S. meliloti</i>	54

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos potenciales de la FBN en el ambiente	7
Tabla 2. Metodologías para la determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno (k_La).	30
Tabla 3. Valores de k_La para agua, a diferentes rpm y flujo de aire.	40
Tabla 4. Valores de k_La para medio YEM, a diferentes rpm y flujo de aire	40
Tabla 5. Resumen de resultados del cultivo sumergido de <i>S. meliloti</i> en biorreactor de tanque agitado (1L) con medio de cultivo YEM.	54

IV. RESUMEN

Sinorhizobium meliloti es una bacteria con la capacidad de establecer relaciones simbióticas con leguminosas del género *Medicago*, al cual pertenece la alfalfa (*Medicago sativa*). Esta leguminosa es uno de los principales cultivos forrajeros producidos en el país. La relación bacteria-leguminosa permite obtener el nitrógeno necesario para el desarrollo de la planta a través de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). Esta representa una alternativa viable al uso de fertilizantes químicos, los cuales conllevan daños significativos en el ambiente, tales como: la liberación de dióxido de carbono (Jensen & Hauggaard-Nielsen, 2003), amonio, metano (Mosier, 2001), óxidos de nitrógeno (Jenkinson, 2001; Mosier, 2001; Ledley *et al.*, 1999); contaminación del agua (Morales *et al.*, 2011; Jenkinson, 2001); eutrofización de las aguas superficiales (Vollenweider *et al.*, 1980) y repercusiones en la biota del suelo (Caballero-Mellado y Martínez, 1999).

Lo que se busca es producir una formulación líquida a partir del cultivo sumergido de *S. meliloti* para ser aplicada en campo como fertilizante. Obtener un inoculante, implica considerar el procesamiento del medio base, la cuenta celular en el producto final, la eficiencia del organismo en campo, la conservación del producto y las condiciones del suelo.

Las condiciones del suelo en México varían en multitud de parámetros tales como el pH, temperatura, sales, niveles de hidratación, contenido de metales, etc. El estrés por pH externo constituye un factor limitante en la sobrevivencia y desarrollo de *S. meliloti* (de Lucena *et al.*, 2010). En este sentido, el presente proyecto consistió en estudiar el efecto del pH en el cultivo sumergido de *S. meliloti*. Para reconocer el efecto específico del estrés por pH sobre la viabilidad, velocidad específica de crecimiento, producción de exopolisacáridos (EPS) y poli- β -hidroxibutirato (PHB). Con el objeto de identificar la condición más favorable para la producción de una formulación líquida con altas cuenta celulares y producción de polímeros de reserva.

Los resultados sugieren que *S. meliloti* es muy sensible a condiciones de pH ácido. Esto impacta en su velocidad de crecimiento y la viabilidad del cultivo. Las condiciones neutras y alcalinas (pH 8 y 9) promovieron cuentas celulares de hasta 10^9 UFC/mL. Alcanzando mayores velocidades de crecimiento en valores de pH neutro y 8. La generación de EPS y PHB dependió de la condición de pH. La producción de EPS fue mayor en la fase exponencial de crecimiento del microorganismo, mientras que la generación de PHB comenzó al final de la fase exponencial. Los resultados proponen que i) *S. meliloti* ve afectado su crecimiento por condiciones de estrés ácido, no así por pH neutro y alcalino, ii) la generación de polímeros de reserva está en función de la etapa de crecimiento donde se desarrolla *S. meliloti* y al estrés por pH.

V. INTRODUCCIÓN

Los fertilizantes proveen a la planta de los macro y micro nutrientes necesarios para su desarrollo. Estos se encuentran naturalmente en el ambiente. Si se desea obtener mejor calidad y mayores rendimientos de los cultivos el uso de fertilizantes se vuelve imprescindible. Estos proveen los nutrientes que al suelo le faltan para el correcto desarrollo de la planta. Pueden ser de naturaleza primaria, secundaria o aquellos que proporcionan micronutrientes (FAO 2002, SAGARPA).

Un nutriente importante para el desarrollo de la planta es el nitrógeno (Erismar *et al.*, 2004). Su producción por medio de su conversión a compuestos amoniacales, representa $58 \times 10^9 \text{ m}^3$ de CO_2 por año (Jensen & Hauggaard-Nielsen, 2003).

Una alternativa que puede disminuir la aplicación de los fertilizantes químicos y la disminución de los daños al ambiente es la fijación biológica de nitrógeno, por sus siglas FBN (Alarcón *et al.*, 2000). La FBN es un proceso de reducción de N_2 a determinadas moléculas nitrogenadas como amonio y nitrato, por medio del complejo enzimático nitrogenasa, el cual es parte de la constitución celular de algunos tipos de células procariotas. Se identifican dos tipos de bacterias las de vida libre y simbióticas estas últimas necesitan formar asociaciones para fijar N_2 (Madigan *et al.*, 2009).

Las bacterias que colonizan la raíz de la planta se denominan rizobacterias (PGRP, por sus siglas en inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria). *Sinorhizobium meliloti* pertenece a la familia *Rhizobiaceae*. La mayor parte de los rizobios, nombre genérico de las bacterias Gram-negativas fijadoras de nitrógeno, son del orden VI, Rhizobiales de la clase I, α -proteobacteria (Kuykendall *et al.*, 2005). Simbióticamente *S. meliloti* es capaz de nodular la raíz de la alfalfa (Reeve *et al.*, 2006). Un efecto inherente de la simbiosis, es la fijación de nitrógeno por la bacteria y el aprovechamiento del mismo por parte de la planta.

De ahí la importancia de desarrollar formulaciones líquidas que contengan alta viabilidad de la bacteria *S. meliloti* para ser aplicadas como biofertilizantes. Sin embargo, el cultivo de un microorganismo específico en laboratorio no garantiza su efectividad en campo (Stephens & Rask, 1999). Debido a una multitud de factores bióticos y abióticos a los que se tiene que enfrentar en el ambiente, uno de ellos el pH.

El estrés por el pH externo constituye un factor limitante en la sobrevivencia y desarrollo de *S. meliloti* (de Lucena *et al.*, 2010). La relación entre la acidez del suelo y las poblaciones de rizobios nativos guardan una importante relación (Brockwell *et al.*, 1991). En el caso del pH del suelo podría ser posible seleccionar cepas que se adapten tempranamente a las condiciones que enfrentarán en el suelo, lo cual puede llegar a impactar en su competitividad, en el proceso de nodulación y en la efectividad de la fijación de nitrógeno (Toro, 1996).

Por las razones anteriores en este trabajo se reporta el efecto del pH en el cultivo sumergido de *S. meliloti*, con el objeto de reconocer aquella condición donde el cultivo

alcance mayores viabilidades, velocidades de crecimiento y producción de polímeros intra-extra celulares. Con el objetivo final de que su competitividad y efectividad en campo se vea beneficiada.

En el presente trabajo se comienza por describir el papel de los fertilizantes en la agricultura y sus efectos en el ambiente. Se analizan los efectos de la FBN y cómo puede ayudar a reducir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados. Se explica brevemente el modelo de invasión bacteria-hospedero e iniciación de la actividad simbiótica. Son mostradas las principales características fenotípicas, genotípicas, bioquímicas, taxonómicas y metabólicas que identifican a *S. meliloti*. Se plantea el papel de los exopolisacáridos y del polihidroxibutirato en el proceso de nodulación, así como, el efecto en la supervivencia de esta bacteria, sin olvidar aspectos como su síntesis y degradación. Son tratados temas como las características de los biofertilizantes y de equipos como los biorreactores que fueron el medio por el cual se pudo llevar a cabo nuestro estudio. Por último, se describen los estudios más recientes en cuanto al efecto del pH sobre *S. meliloti*.

Posteriormente se presentan la justificación, el alcance, los objetivos para la realización de este proyecto. El estudio se llevó a cabo en biorreactores con volumen de trabajo de 1L. Se caracterizaron a través de su coeficiente de transferencia de masa respecto a diferentes condiciones de aireación y agitación. Las cinéticas de crecimiento de *S. meliloti* en cultivo sumergido se realizaron a nivel matraz y posteriormente se usaron biorreactores. En estos últimos fue posible manipular las condiciones de pH, temperatura y oxígeno disuelto. Dentro de los métodos analíticos se hicieron modificaciones en la metodología propuesta por Law & Slepecky (1960) para cuantificar el PHB. La generación de EPS se cuantificó por gravimetría a partir de su deshidratación y posterior precipitación en presencia de un alcohol. El crecimiento y la viabilidad celular fueron evaluados por métodos espectrofotométricos, gravimétricos y de cuenta en placa.

En los resultados obtenidos se presentan primero los aspectos relacionados con la caracterización de la cepa y del reactor. Le siguen, los resultados de las técnicas analíticas y su precisión para cuantificar el PHB y la fuente de carbono. Se describe el comportamiento cinético en matraces y reactores. Se acompaña esta descripción con resultados sobre la viabilidad, producción de polímeros y variables de control de proceso.

Por último, se presenta un resumen y se concluye acerca de los resultados obtenidos. Se plantean una serie de sugerencias y/o perspectivas acerca del rumbo que pueden dar continuidad a futuros proyectos.

VI. ANTECEDENTES

a. Importancia de los fertilizantes

De acuerdo con las proyecciones de crecimiento poblacional del Banco Mundial, hasta el 90% del aumento en la necesidad de alimentos tendrá que provenir para 2020 de campos ya cultivados. Se estima que para 2015, habrá un promedio de 600 millones de personas en hambruna (FAO-IFA, 2002). De ahí la importancia de introducir en el campo nuevos sistemas agrícolas y tecnologías que permitan el incremento de la producción y rendimientos de los alimentos, que a su vez tengan un menor impacto en el ambiente.

Los nutrientes necesarios para la planta se dividen en macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes son el oxígeno, carbono, nitrógeno, fósforo y potasio, los cuales forman parte de los nutrientes primarios (Figura 1). El nitrógeno es absorbido por la planta en forma de nitrato o de amonio, llega a formar parte del 1 al 4% del extracto de la planta y está involucrado en la síntesis de proteínas. El fósforo representa del 0.1 al 0.4% del extracto seco de la planta y es indispensable en los procesos químico-fisiológicos de la planta. El potasio supe del 1 al 4% de la planta, activa más de 60 enzimas que juegan un papel importante en la síntesis de carbohidratos y proteínas. Los nutrientes secundarios son magnesio, azufre y calcio. Dentro de los micronutrientes se encuentran el hierro, manganeso, zinc, cobre, molibdeno, cloro y boro (FAO-IFA, 2002).

La fertilización con nitrógeno sintético, se estima, abasteció a 27% del total de la población del siglo XX (Erisman *et al.*, 2008). El estimado para 2008 es que será hasta un 48% de la población mundial quienes dependan del proceso Haber-Bosch para generar el nitrógeno necesario utilizado en la agricultura. La figura 2 muestra la gran dependencia de la producción de amonio industrial para la sociedad desde las primeras décadas del siglo XX.

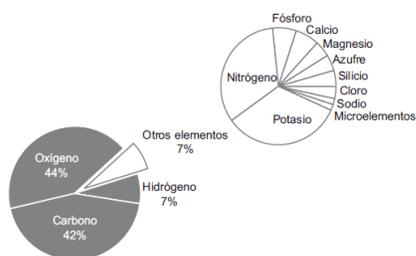


Figura 1. Composición elemental promedio de las plantas. (Tomado de FAO e IFA, 2002)

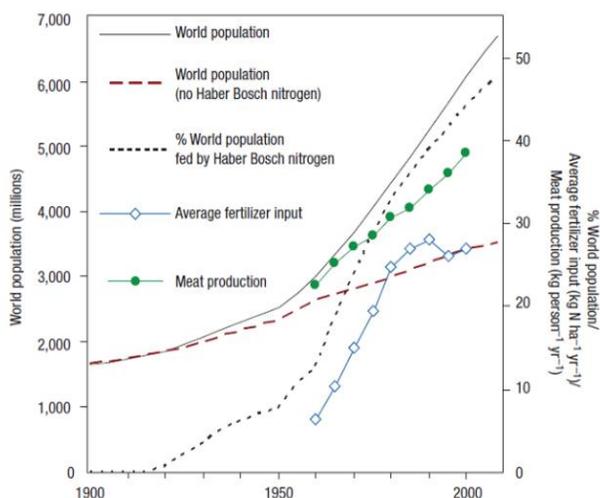


Figura 2. Tendencias de la población humana y uso del nitrógeno a través del siglo XX. (Tomado de Erisman *et al.*, 2008).

b. Impacto ambiental de los fertilizantes químicos

Debido a las temperaturas arriba de los 1200 °C y las presiones que van de los 100-300 bar, la reducción de nitrógeno en amoníaco (compuesto principal de los fertilizantes químicos) por medio del proceso Haber-Bosch, representa altos costos energéticos y económicos (Jensen & Hauggaard-Nielsen, 2003). El gas natural es el principal combustible utilizado en la producción de amoníaco, ocupa el 80% del total de combustibles destinados para este fin. De este total, aproximadamente 60% es usado como insumo y 37% para el calentamiento de los hornos, donde se producen gases como el hidrógeno y el monóxido de carbono a partir de metano y vapor. Se estima que por cada kilogramo de amoníaco producido se generan 0.7 m³ de CO₂ en las plantas de producción de fertilizantes que usan gas natural. Trasladándolo a términos globales representa un volumen equivalente a 58 x 10⁹ m³ de CO₂ por año. Representando el 0.5% de dióxido de carbono liberado a la atmósfera por la actividad industrial. Si se consideran los requerimientos de aplicación, transporte y empaqueo es probable estar cerca del 1% (Jensen & Hauggaard-Nielsen, 2003).

Durante la producción de fertilizantes químicos se liberan al ambiente óxidos de nitrógeno (NOx) (Mosier, 2001). Una de estas especies el ion nitrito (N₂O) es un potente gas de efecto invernadero y tienen una vida media de 130 años en la atmósfera, por lo que el mal manejo en la producción de fertilizantes contribuye al calentamiento global (Jenkinson, 2001). Es imposible evitar pérdidas de nitrógeno por la volatilización del amoníaco, la desnitrificación y la lixiviación de nitrato en los sistemas agrícolas. Además, las especies NOx tienen un papel activo en las reacciones de la troposfera e interactúa en aquellos ciclos involucrados con el ozono (O₃), radicales hidroxilo (OH), la oxidación del monóxido de carbono (CO) y metano (CH₄) (Mosier, 2001).

Otro efecto con el que se relaciona a los fertilizantes químicos nitrogenados es su impacto en la microbiota del suelo. Caballero-Mellado y Martínez (1999) señalan que la aplicación de fertilizantes químicos nitrogenados disminuyen la diversidad genética de rizobios en nódulos de frijol. En 2 años de pruebas encontraron que los niveles de fertilización comúnmente usados en los campos de México (40% nitrógeno (N), 40% fósforo (P) y 20% potasio (K)) disminuye la diversidad genética de la población que se encuentra en la rizosfera de la planta. Esto probablemente atribuido al nitrógeno, ya que ensayos adicionales usando sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), cloruro de amonio (NH₄Cl) o nitrato de amonio (NH₄NO₃) disminuyeron la diversidad genética de los nódulos en un 41, 33 y 26% respectivamente. La agrobiodiversidad ha sido disminuida, ya que para 2003 sólo 20 cultivos son los que proporcionaron el 80% de los alimentos a la humanidad. Esta pérdida de agrobiodiversidad lleva a la uniformidad genética, ilustrada por el caso del maíz, donde seis híbridos conforman más de 70% del cultivo mundial.

En la agricultura nacional los estudios sobre nutrición de los cultivos han seguido dos grandes vertientes, una de ellas la más tradicional en los últimos 60 años se ha enfocado

a la evaluación de los fertilizantes químicos sintéticos y otra a la exploración de la capacidad que tienen algunos microorganismos para mejorar la nutrición de las plantas y combatir algunos patógenos del suelo (Aguirre *et al.*, 2009). En México los fertilizantes químicos sintéticos empezaron a usarse a mediados del siglo XX y rápidamente se convirtieron en elementos indispensables en los campos agrícolas. Su bajo costo y amplia distribución entre los productores nacionales, además de algunos incentivos como los subsidiados por el gobierno federal, crearon una barrera en el uso de los recursos biológicos del suelo. Por lo anterior la aplicación de biofertilizantes fue exigua durante la llamada crisis energética mundial de los 70's. Con el cierre de plantas productoras de fertilizantes en México, la adquisición de fertilizantes industriales se tornó difícil para los pequeños y medianos agricultores. Sin embargo, su uso por más de 50 años había ya generado cambios en la microbiota del suelo (Aguirre *et al.*, 2009).

c. Fijación biológica de nitrógeno.

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) en los sistemas de agricultura es un recurso sostenible que aporta cantidades importantes de nitrógeno en los cultivos (Bohlool *et al.*, 1992). A nivel global se estima que es de 100 a 290 millones de toneladas de nitrógeno por año (Cleveland *et al.*, 1999). En comparación con los 83 millones de toneladas de nitrógeno fijadas por fertilizantes de origen industrial (Jenkinson, 2001).

Tabla 1. Efectos potenciales de la FBN en el ambiente (Tomado de Jensen & Hauggaard, 2003).

GM – Abono verde, N - Fertilizantes basados en nitrógeno, Parámetros: ↑ incremento ↓ decremento

Efectos potenciales de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) sobre determinados parámetros ambientales			
Efecto de la FBN per se	Efecto sobre la producción y aplicación de fertilizantes	Efecto sobre el ciclo del nitrógeno en los sistemas de cultivo	Efectos no relacionados con el N
Acidificación del suelo	↓ Uso de energía fosil	Periodos de precultivo/cultivo	Brinda estructura al suelo
↑ CO ₂ fijado/mol N asimilado ↑ Consumo de N en el suelo	↓ Emisión de CO ₂	↓ Emisión de N ₂ O ↓ Volatilización de amonio ↓ Riesgos por lixiviación de N ↓ Riesgo de pérdida de N por GM	Controla la erosión del suelo
	↓ Emisión de No _x		Provoca el enraizamiento profundo
		Periodo post-cultivo	Biodiversidad
		↑ Emisión de N ₂ O ↑ Volatilización de amonio ↑ Riesgo de lixiviación de N en sistemas intensivos ↑ Disponibilidad de N para cultivos posteriores	Captura de carbono
		Efectos a largo plazo de la FBN	
		↑ Fertilidad del suelo ↑ Capacidad del suelo para obtener N por FBN ↑ Riesgo de pérdida de N en sistemas intensivos	

d. Efectos de la FBN sobre la acidez del suelo

La FBN en un cultivo de alfalfa con un rendimiento de 10 ton/ha acidifica el suelo hasta el punto de que 600 kg de CaCO_3 serían necesarios para mantener constante el pH del suelo (Israel and Jackson, 1978). Aunque el efecto de la FBN sobre el pH del suelo es menor que lo observado durante la asimilación de amonio (Marschner, 1995), ambos incrementan la lixiviación de iones de calcio y magnesio. La acidificación por efecto de la FBN es benéfica en suelos alcalinos por la posibilidad de solubilizar algunos nutrientes necesarios para el crecimiento de la planta. Un ejemplo, es el caso del fósforo disponible en forma de fosfatos en las rocas y que por medio de la acidificación del suelo se libera y se mejora la eficiencia en su aprovechamiento.

La fijación de nitrógeno y la asimilación de amonio causan acidificación del medio mientras que las plantas que asimilan nitratos elevan el pH del suelo. Las plantas que asimilan amonio y las leguminosas que fijan el nitrógeno absorben mayores cantidades de cationes que de aniones, esto porque el nitrógeno no cargado entra en la raíz por una serie de protones que son secretados por la planta para balancear su pH interno (Raven, 1986).

e. Simbiosis leguminosa-rizobio

El término rizosfera fue usado por primera vez por Hiltner en 1904 para describir específicamente la interacción entre las bacterias y las raíces de las leguminosas (Hartmann *et al.*, 2007). El término fue ampliamente aceptado y acotado, definiendo a la rizosfera como el espacio en que la raíz tiene una determinada acción o influencia. Esto porque es una porción del suelo con propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las del resto, en la cual se establecen una multitud de relaciones biológicas.

f. Invasión de los rizobios a la planta: el modelo *Medicago-S.meliloti*

i. Proceso de nodulación

La raíz de la planta está en contacto con muchos microorganismos presentes de forma natural en el suelo y para su defensa establece barreras biológicas que no permiten su interacción. Es por ello que la invasión en la raíz de la leguminosa *Medicago sativa* (alfalfa) por parte de la bacteria *S. meliloti* requiere de una serie de señales químicas que permitan el reconocimiento de ambas para una exitosa infección y nodulación.

ii. Iniciación de la infección

Los rizobios tienen la capacidad de ligarse estrechamente a los pelos radiculares de las raíces de las plantas. Para ocasionar una simbiosis productiva, el rizobio debe reconocer

y posteriormente responder a la presencia de las raíces de la planta hospedera. Durante el crecimiento en la rizosfera de una planta hospedera, los rizobios son sensibles a compuestos como los flavonoides y las betaínas secretadas por la raíz hospedera. Existe una respuesta en el microorganismo que consiste en la activación de los genes Nod, los cuales codifican aproximadamente 25 proteínas requeridas para la síntesis y exportación por parte de la bacteria de los factores Nod, la cual es una señal de un lipopolisacárido que contiene quitina, de 4-5 unidades de N-acetilglucosamina. Los factores Nod inician mucho de los cambios vistos en las primeras etapas de nodulación, que incluyen la deformación de los pelos radicales, la despolarización de la membrana, las oscilaciones intracelulares de calcio y la iniciación de la división celular en el córtex las cuales establecen el meristemo y el nódulo primordio (Jones *et al.*, 2007). Los productos de otros genes *nod*, llevan a cabo modificaciones en los factores Nod que imprimen en ellos la especificidad para nodular solo con ciertas plantas hospederas y evitar así la formación de nódulos ineficientes (Perret *et al.*, 2000).

Los factores Nod estimulan la respuesta por parte de la planta. Una de las respuestas más tempranas, es el incremento de calcio disponible en los pelos radiculares de la raíz, provocando una alteración del citoesqueleto de los mismos. Acto seguido existe un enroscamiento de los pelos radiculares donde el rizobio es atrapado (Jones *et al.*, 2007).

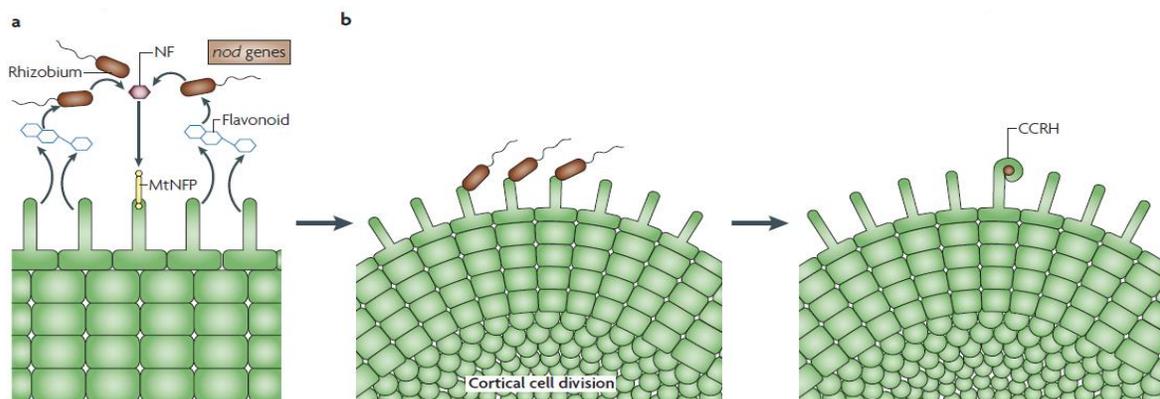


Figura 3. Inicio de la señalización entre *Medicago* y *S. meliloti*. a) La activación de los genes Nod requiere compuestos flavonoides emitidos por la planta. Los genes Nod inician la producción de factores Nod (NF) los cuales reconocen al receptor MtNFP (*M. truncatula* Nod Factor Perception) b) Formación del pelo radicular colonizado (CCRH) (Modificado de Jones *et al.*, 2007).

iii. Desarrollo del túbulo de infección

Antes de comenzar con la fijación de nitrógeno en la planta, la bacteria debe ser internalizada por las células de la planta en el córtex de la raíz. La bacteria penetra en estos estratos más profundos de la planta a través del túbulo de infección. Se ha encontrado que las cepas de *S. meliloti* que no pueden establecer conexiones eficientes con la planta, se debe a su incapacidad de producir β -glucanos, un tipo de exopolisacáridos (EPS), (Jones *et al.*, 2007). La bacteria atrapada en uno de los pelos radiculares es capaz de producir EPS simbióticamente activos que inducen el progresivo

crecimiento de las membranas celulares en la raíz que permitan el anclaje de la bacteria. El túbulo de infección es promovido por los EPS producidos por *S. meliloti*, tales como el succinoglicano y el galactoglucano (Jones *et al.*, 2007).

iv. Endocitosis del rizobio

Cuando el rizobio alcanza el córtex interno de la planta, debe ser capaz de internalizarse. Esto lo hace por un proceso de endocitosis que permite esta internalización. La bacteria y una membrana desprendida de la pared celular de la planta, forman una estructura conocida como el simbiosoma. En estos se pueden distinguir los siguientes elementos: membrana peribacteroidea, fluido peribacteroideo y el bacteroide (Brewin, 2004).

v. Diferenciación del bacteroide y supervivencia

Una vez que la bacteria ha sido internalizada, deben sobrevivir dentro del simbiosoma y tomar la forma del bacteroide donde se lleva a cabo la FBN. La nodulación de las plantas puede ser dividida en dos grupos, basado en los tipos de nódulos que forman: indeterminados y determinados. Los nódulos indeterminados se caracterizan por tener un meristemo permanente, típicamente solo un subconjunto de las células de la planta podrá contener microorganismos fijadores de nitrógeno. En el caso de los nódulos determinados la fijación de nitrógeno ocurre en todas las células infectadas simultáneamente, además solo una zona homogénea es la que presenta nódulos donde existe la fijación de nitrógeno (Vasse *et al.*, 1990).

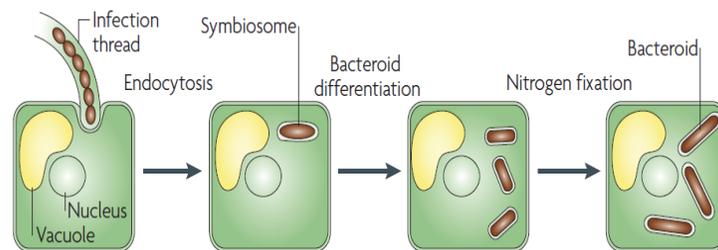


Figura 4. Invasión y formación del bacteroide (Modificado de Jones *et al.*, 2007).

g. La nitrogenasa

En la fijación biológica de nitrógeno, el N_2 se reduce a amoníaco NH_3 que se convierte en su forma orgánica. Esta reducción está catalizada por un gran complejo enzimático llamado nitrogenasa. Consta de dos proteínas diferentes: la dinitrogenasa y la dinitrogenasa-reductasa. Ambas proteínas contienen hierro y la dinitrogenasa contiene además molibdeno. Debido a la estabilidad del triple enlace del nitrógeno molecular, este compuesto es muy inerte. El proceso consiste en transferir seis electrones para reducir el nitrógeno molecular (N_2) a amoníaco (NH_3). La fijación biológica de nitrógeno es inhibida por altas concentraciones de oxígeno, por otras formas de nitrógeno fijado como los nitratos (NO_3) y algunos aminoácidos. La nitrogenasa-reductasa se inactiva rápida e

irreversiblemente por la presencia de oxígeno molecular (O₂). En las bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno, la nitrogenasa está protegida de la inactivación por el O₂ por medio de algunos mecanismos como: la eliminación rápida del O₂ por la respiración, la producción de capas mucosas que afectan la transferencia de O₂, por compartimentación o bien mediante la formación de un complejo con una proteína específica. Esta protección es reversible y cuando las concentraciones de oxígeno bajan, la nitrogenasa recupera su actividad (Madigan *et al.*, 2009).

La reducción del nitrógeno atmosférico, requiere al menos de 16 moléculas de adenosin trifosfato (ATP) y 8 equivalentes reductores por mol de amonio producido, por ello el gasto energético es elevado (Dunn, 1998).

h. Competitividad en la nodulación de leguminosas con cepas de *Rhizobium*

La nodulación efectiva de las leguminosas por los rizobios es un proceso complejo que al aire libre depende de muchos factores ambientales. Generalmente, la productividad en campo puede ser mejorada por la inoculación con bacterias altamente eficaces en los procesos de nodulación y fijación de nitrógeno. Sin embargo, la inoculación con cepas de *Rhizobium* no siempre es efectiva por la presencia en el suelo de cepas nativas que compiten en la nodulación con la planta hospedera. Esta habilidad para asegurar la nodulación de la planta por parte de determinada cepa, es definida como su competitividad y es una parte crucial en la producción de inoculantes (Toro, 1996). Altas y bajas temperaturas repercuten en la nodulación y en la fijación de nitrógeno. La temperatura óptima de estos procesos se ubica entre los 20 y 30°C. Los cambios de temperatura afectan la competitividad de las cepas de *Rhizobium* y aumentan la especificidad de ciertos consorcios bacterianos que intentan infectar a la planta. (Toro, 1996).

Los factores bióticos también repercuten en el proceso de nodulación, factores tales como la presencia de protozoa estimulada por el flujo de carbono en la rizosfera, mejora el rendimiento y la relación entre los microorganismos inoculados y el hospedero. La presencia en el suelo de bacterias epífitas tales como *Erwinia herbícola* pueden suprimir la nodulación por la producción de una toxina que bloquea la interacción entre el rizobio y el hospedero (Toro, 1996).

La habilidad de una cepa particular de rizobio para ser competitiva en la formación del nódulo puede ser alterada por cambios en los fenotipos, tales como la movilidad, la producción de polisacáridos o bien otra alteración en los factores involucrados en la simbiosis. Existen, por ejemplo genes que no están involucrados directamente en el proceso de nodulación pero que si afectan la competitividad del mismo. Este es el caso de los genes *nef* los cuales no son requeridos en los procesos simbióticos pero si ofrecen características de competitividad al rizobio (Sanjuan & Olivares, 1989).

i. *Sinorhizobium meliloti*

i. Descripción macroscópica y microscópica

S. meliloti forma colonias circulares, convexas, usualmente opacas, algunas traslúcidas, aglomeradas y mucilaginosas. Sus dimensiones son de 2-4 mm de diámetro dentro de los primeros 3-5 días de incubación en placa con manitol, sales y extracto de levadura (Kuykendall *et al.*, 2005). El tamaño de *S. meliloti* es de 0.5-1.0 x 1.2-3.0 μm . Comúnmente en su estructura interna almacena polímeros de reserva que son gránulos de PHB (polihidroxibutirato), por lo regular estos se encuentran presentes en células viejas (Kuykendall *et al.*, 2005). No forma esporas. Gram negativos. Son móviles por un flagelo polar o varios flagelos peritricos. Algunas especies contienen fimbrias. Su metabolismo es aeróbico con oxígeno como aceptor final de electrones. La temperatura óptima de crecimiento va de los 25 - 30°C, pero puede crecer a 10°C y otras pueden hacerlo hasta los 42-44°C. Son tolerantes al 1.0% NaCl y algunas especies pueden llegar a crecer en manitol con 4.5% NaCl. El pH óptimo de crecimiento es cercano a la neutralidad de (6-8), pero algunas especies pueden crecer a valores de 5 o hasta 10.5. La estructura de la membrana celular de *Sinorhizobium* es generalmente similar a otras bacterias Gram negativas. El peptidoglicano está compuesto por ácido glutámico, alanina, ácido diaminopimélico y aminoácidos. Además leucina, fenilalanina, serina y ácido aspártico han sido detectados en varias especies del género. Por otro lado la membrana de lipopolisacáridos está compuesta por ácido 2-keto-3-deoxyoctanoico, ácidos urónico, amino glucosa, glucosa y galactosa. Dentro de las pruebas bioquímicas son oxidasa positiva y catalasa positiva (Kuykendall *et al.*, 2005).

ii. Almacenamiento

Las cepas de *Sinorhizobium* pueden ser conservadas con medio extracto de levadura, manitol y sales, conteniendo de un 20 a 50% de glicerol y con refrigeración a -20°C o -70°C. La liofilización es una alternativa de conservación viable (Kuykendall *et al.*, 2005).

iii. Resistencia a antibióticos

Los antibióticos a los que *S. meliloti* presenta resistencia son:

- Ácido nalidíxico 20 ug/mL (Martínez *et al.*, 2002).
- Estreptomina 250 ug/mL (Bernal & Graham, 2011).
- Espectinomina 50 ug/mL (Bernal & Graham, 2011).

iv. Resistencia a la salinidad

Se ha reportado que algunas cepas de *S. meliloti* resisten concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) de hasta 300 mM. En general las cepas de *Rhizobium*, son sensibles a concentraciones de NaCl 100 mM. En cepas de *Rhizobium* que nodulan especies como

Medicago y *Prosopis*, la respuesta al estrés salino consiste en la producción intracelular de glutamato. El proceso de nodulación es sensible a altas concentraciones de sal o alta osmolaridad comparada con la sensibilidad de los rizobios (Graham, 1991).

v. Taxonomía y genética

La historia de la descripción taxonómica de los rizobios se remonta a 1888, cuando Beijerinck obtuvo el primer cultivo bacteriano puro de un nódulo de raíz de leguminosa y lo llamó *Bacillus radicícola*. Posteriormente se propuso el nombre de *Rhizobium* para estos aislados. Para 1929, basados en la especificidad de los huéspedes ya se habían reconocido seis especies: *R. meliloti*, *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. japonicum* y *R. lupini* (Wang et al., 2013).

Recientemente, el uso de técnicas moleculares ha provisto de una descripción más precisa de estas especies. Uno de los principales criterios para la descripción de estos géneros ha sido el análisis de la secuencia del gen 16S del RNA ribosomal (rRNA). Con base en esta secuencia todos los rizobios son miembros de la división α -Proteobacteria (Wang et al., 2013).

La taxonomía actual de los rizobios incluye factores morfológicos, bioquímicos, fisiológicos, genéticos y filogénicos. Sumado al rango de huéspedes que albergan estas bacterias. *S. meliloti* ha sido aislado principalmente de plantas de los géneros *Medicago*, *Meliloti* y *Trigonella* (Wang et al., 2013).

El género *Sinorhizobium* fue propuesto por primera vez para designar a las bacterias de crecimiento rápido que nodulan la soya. Posteriormente, se separó este género de *Rhizobium* principalmente debido a las diferencias en las secuencias de genes 16S rRNA. Sin embargo, no hay características fenotípicas específicas conocidas que distingan estos dos géneros. Plásmidos grandes e incluso megaplásmidos son comunes en estas especies y en algunos casos los genes simbióticos están localizados en un megaplásmido. Otras especies de este género son: *S. arboris*, *S. fredii*, *S. kostiense*, *S. medicae*, *S. saheli*, *S. terangaie* y *S. xinjiangense*. Algunos grupos de rizobia de suelo mexicano asociados a la leguminosa *Leucaena leucocephala* han sido clasificados como *Sinorhizobium* (Wang et al., 2013).

De acuerdo a la "Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes" (2008), el género *Ensifer* (descrito en 1982), tiene prioridad sobre el género *Sinorhizobium* (descrito en 1988) y los dos nombres son sinónimos del mismo taxón. En reunión de agosto de 2008, el "Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*" determinó, estar en acuerdo con la determinación de la Comisión Judicial, pero aclaró que el paso de los miembros del género *Sinorhizobium* a *Ensifer*, podrían ocasionar gran confusión entre la comunidad científica. Actualmente *Ensifer* y *Sinorhizobium* se utilizan indistintamente, aunque *Sinorhizobium* sigue siendo el término más común utilizado por la comunidad científica.

vi. Metabolismo de *S. meliloti*

S. meliloti, es una bacteria con metabolismo aerobio y heterótrofo, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos funciona como un generador de nucleótidos, a partir de la oxidación del piruvato en acetil co-enzima A (Encarnación *et al.*, 1995). A su vez estos nucleótidos son usados para generar energía en forma de ATP, vía el sistema transportador de electrones. Otra importante función es la producción polímeros de reserva, como el poli- β -hidroxibutirato, PHB. El cual es producido generalmente por la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA, que generan acetocetil-CoA, posteriormente las subsecuentes reacciones de reducción y polimerización dan lugar a este polímero natural. Este producto puede ser despolimerizado por la bacteria y reconvertido a acetil-CoA (Tombolini & Nuti, 1989). Tanto en el TCA como en la generación de PHB, el flujo de carbono a través de este paso es ampliamente influenciado por las condiciones de crecimiento, así mismo, los dos compiten por el mismo metabolito iniciador, la acetil-CoA. El papel del PHB es revelante, se sugiere, sirve como una fuente de reserva energética cuando el microorganismo se encuentra en vida libre o bien formando el bacteroide (Bergersen & Turner, 1990). En su metabolismo, es capaz de utilizar una amplia cantidad de carbohidratos y sales de ácidos orgánicos, produciendo además ácidos sin la formación de gas, sin embargo no puede metabolizar el almidón o la celulosa. Cuando se crece con carbohidratos hay generación de polisacáridos extracelulares. Las sales de amonio, nitrato, nitrito y varios tipos de aminoácidos pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno. Algunas cepas requieren factores de crecimiento como biotina, tiamina, pantotenato o ácido nicotínico (Kuykendall *et al.*, 2005). Los principales mecanismos para el catabolismo de la glucosa son la vía Entner-Doudoroff y el ciclo de las pentosas fosfato. Es poco probable que la vía de Embden-Meyerhof-Parnas opere, debido a que la actividad de las enzimas fructosa-1,6, difosfato aldolasa y 6 fosofructoquinasa son bajas (Kuykendall *et al.*, 2005).

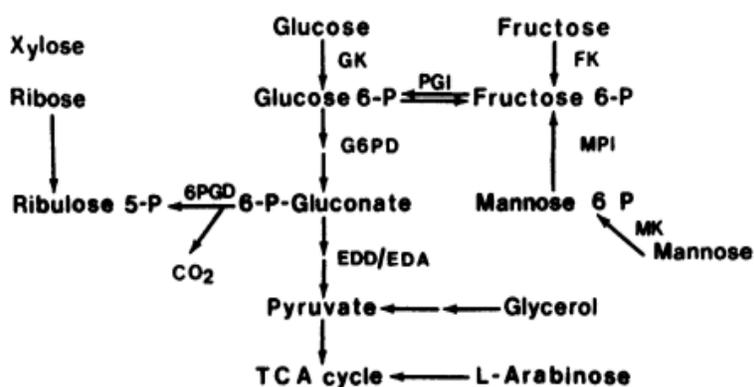


Figura 5. Propuesta de integración de las rutas metabólicas en el género *Sinorhizobium* (Tomado de Dunn, 1998).

EPS I es un heteropolisacárido ramificado compuesto por octasacáridos, mientras que los EPS II son heteropolisacáridos lineales formados por subunidades de disacáridos (Becker, 2002).

i. Regulación de la producción de succinoglucano y galactoglucano en *S. meliloti*

Zhan *et al.*, 1991 reportaron dos condiciones en las cuales se estimula la producción de EPS II en la cepa *S. meliloti* 2011 wild type. Una de ellas fue limitar la concentración de fosfato y por otro lado la mutación de los genes reguladores *mucR* o *expR*. Tanto los EPS I o II son secretados en dos fracciones que reflejan diferentes grados de polimerización: los de alto peso molecular (HMW) que consisten de cientos a miles de unidades repetidoras (polímeros de 10^6 - 10^7 Da) y los de bajo peso molecular (LMW) que representan monómeros, dímeros y trímeros en el caso de EPS I y oligómeros para los EPS II (Skorupska *et al.*, 2006).

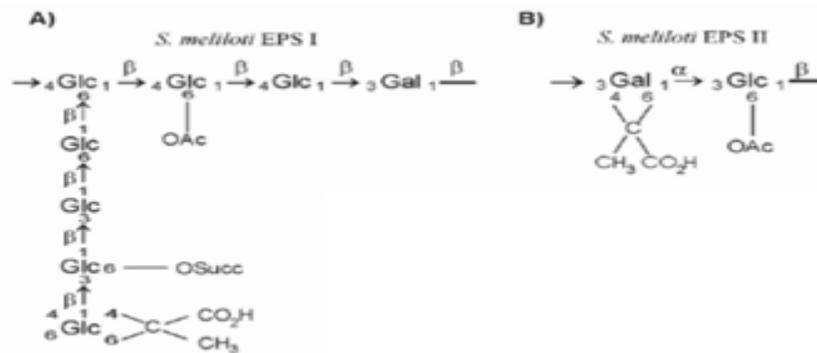


Figura 7. Estructura de los exopolisacáridos producidos por *S. meliloti* a) EPS grupo I b) EPS grupo II (Tomado de Becker 2002).

ii. Papel de los EPS en la simbiosis con la planta

S. meliloti fija el nitrógeno atmosférico por medio de los nódulos formados en la raíz de la planta. Para que exista su desarrollo es necesario el intercambio de señales bacteria-hospedero. La bacteria invade y coloniza la raíz por medio de los túbulos de infección, que están compuestos por exopolisacáridos (EPS) y material celular de la planta. La formación y desarrollo de estos túbulos son función de la producción de EPS especialmente succinoglucano. Un incremento en la producción de succinoglucano por *S. meliloti* impacta en una mayor productividad en la simbiosis, (Jones, 2012).

iii. Protección de los rizobios a la desecación

Algunas hipótesis señalan que los EPS crean micro habitas que les permite sobrevivir en condiciones de suelo desfavorable. Una de las hipótesis más aceptadas es que los EPS ayudan a sobrevivir al microorganismo a la desecación. Para demostrar esto se

compararon dos cepas de *S. meliloti*, una de ellas con aspecto en placa mucosoide y la otra no. La primera logró sobrevivir en ambientes con poca disponibilidad de agua en comparación con aquellas que no lo eran. Esto sugiere que los ambientes con EPS confieren cierta ventaja competitiva al microorganismo durante la desecación. Se ha encontrado que la actividad microbiana se reduce bruscamente cuando estos son expuestos a bajos niveles de agua (Robertson & Firestone, 1992). Los EPS tienen la capacidad de mantener su peso en agua cuando no hay disponibilidad de la misma, esto repercute en la hidratación continua de la membrana celular y enzimas extracelulares. Existe también la posibilidad de que los EPS atrapen nutrientes que pueden estar disponibles en los periodos de desecación. Además, aumentan la superficie externa de la célula y el área de contacto con el suelo se incrementa, lo cual implica una mejora en la difusión de algunos nutrientes al organismo. Finalmente, esto ayuda a que los microorganismos conserven sus funciones fisiológicas para compensar los efectos por la desecación (Chenu & Roberson, 1996).

iv. Protección de los rizobios por la presencia de metales catiónicos

La interacción entre polímeros microbianos aniónicos y los metales pesados tienen una implicación ecológica importante, estos últimos pueden ser removidos de soluciones por este tipo de polímeros. *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son cepas que contienen exopolisacáridos aniónicos, han sido estudiados y se ha encontrado que precipitan en presencia de metales tales como hierro (Fe^{3+}), estaño (Sn^{2+}), manganeso (Mn^{2+}), cobalto (Co^{2+}) y Aluminio (Al^{3+}). En este sentido, los cationes más importantes son el hierro y el aluminio debido a que estos se encuentran con mayor frecuencia en los suelos, en el caso de este último se sabe que es tóxico para miembros de la familia Rhizobiaceae. Por lo tanto la precipitación de un EPS con Al^{3+} puede resultar ser un mecanismo de desintoxicación que promueve la vida de la rizobacteria en suelos con altos contenidos de cationes metálicos (Corzo *et al.*, 1994).

v. Protección de los rizobios a estrés inducido por suelos ácidos

Los rizobios aislados de leguminosas donde las condiciones de suelo son ácidas producen significativamente más EPS que aquellas cepas sensibles a la acidez. Hay carencia de información entre modelos que relacionen estas dos variables, las cepas tolerantes a suelos ácidos producen mayor cantidad de exopolisacáridos (Cunningham & Munns, 1984).

k. Producción y función del polímero intra celular Poli- β -hidroxibutirato en *S. meliloti*

El polihidroxibutirato (PHB) es el miembro mejor caracterizado de los polihidroxialcanoatos (PHA). En los rizobios se ha demostrado la presencia del compuesto de reserva PHB. Sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de la cantidad del mismo

acumulado por diferentes especies. Los análisis con cepas de *S. meliloti* mutadas fenotípicamente en su producción de PHB, demuestran la habilidad de la misma para sintetizar y consumir PHB (Willis & Walker, 1998). La acumulación de PHB, en algunas bacterias, se presenta cuando existe una fuente de carbono disponible y limitación de algunos nutrientes, tales como el nitrógeno, fósforo u oxígeno. Los cuales limitan el crecimiento celular, pero favorecen la acumulación de PHB (Anderson & Dawes 1990).

En la mayoría de los organismos, el PHB es sintetizado a partir de la acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) por una secuencia de tres reacciones catalizadas por 3-ketotiolasa (acetyl Co-A acetiltransferasa), acetyl Co-A reductasa (hidroxibutiril-CoA dehidrogenasa y (poli3-hidroxibutirato) sintasa (Anderson & Dawes, 1990). El PHB cumple diferentes roles dentro de la célula. La posesión de PHB frecuentemente, pero no universalmente, retarda la degradación de componentes celulares tales como el ácido ribonucleico (RNA) y proteínas en períodos de limitación nutricional. Sin embargo, algunos reportes muestran que en *Rhizobium sp.*, cepa ORS 571 la degradación de PHB no está asociada directamente a la poca disponibilidad de fuente de carbono y si a altas concentraciones de oxígeno en el medio. Esto sugiere que el PHB presente en el rizobio puede cumplir dos funciones; por un lado servir como almacén de energía cuando el microorganismo se encuentra en vida libre, o bien, proteger a la enzima nitrogenasa, cuando las cantidades de oxígeno en el nódulo son altas y no existen otros compuestos oxidables (Anderson & Dawes, 1990).

Los rizobios son aerobios obligados. Sin embargo, todas las reacciones metabólicas que ocurren en el bacteroide, deben de ocurrir bajo condiciones microaerobias para proteger a la actividad de la enzima nitrogenasa (Trainer & Charles, 2006). Povolo & Casella (2000) mostraron que bajo condiciones limitantes de oxígeno *S. meliloti* es capaz de usar polímeros intracelulares como el glucógeno, para generar ATP, mientras los niveles de PHB se mantienen constantes. La habilidad de las células para repartir la acetyl-CoA entre el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) y la síntesis de PHB, con el objeto de mantener la respiración en niveles suficientemente bajos (condiciones microaerobias), dependen del estado metabólico de la bacteria.

La mayoría de los rizobios son capaces de almacenar PHB durante su crecimiento en vida libre. Sin embargo, no todos son capaces de almacenarlo durante la simbiosis con la planta, lo cual responde aparentemente a la fisiología del nódulo formado (Trainer & Charles, 2006). En el caso de la simbiosis *S. meliloti* – *M. sativa* es uno de los casos donde se forma un nódulo indeterminado y que no existe acumulación de PHB durante el proceso de simbiosis. Los rizobios que se encuentran en los tubos de infección poseen altas cantidades de PHB mientras que aquellos ubicados en el bacteroide no lo poseen (Hirsch *et al.* 1982). Estudios en nódulos muestran la formación de pequeñas cantidades de PHB, pero estas no son suficientes para permitir la formación de gránulos que sean visibles bajo microscopía electrónica (Kim & Copeland 1996).

En cuanto al cultivo sumergido la acumulación de PHB en cepas de crecimiento rápido se incrementa tardíamente en la fase exponencial y decrece en la fase estacionaria de crecimiento (Tombolini & Nuti, 1989). La producción de PHB en cultivo sumergido ha sido

poco reportada para cepas de la familia Rhizobieace. Tombolini & Nuti, (1989) reportan que $50\% w_{PHB}/w_{Biomasa}$ es la máxima concentración de PHB producido en cultivo sumergido de la cepa *S. meliloti* Rm41, en medio YMB (K_2HPO_4 , 0.5; $MgSO_4 \cdot H_2O$, 0.2; NaCl, 0.1; manitol 10; extracto de levadura, 0.4; g/L^{-1} , pH 6.8). El cultivo fue llevado a cabo en un fermentador de 1.5 L Biostat M.B. Braun, a $30^\circ C$, 500 rpm, durante todos los experimentos se mantuvo el oxígeno al 90% durante las primeras 30 h y posteriormente se controló a 30 y 50%

Tombolini & Nuti, (1989) reportan una acumulación de PHB del 50 % ($w_{PHB}/w_{Biomasa}$) en un cultivo batch, con control de pH a 6.8, después de las 90 h de cultivo con una concentración de oxígeno disuelto del 50% Por otro lado, también reportan que se puede alcanzar hasta una concentración de 55% ($w_{PHB}/w_{Biomasa}$) cuando se controla el oxígeno disuelto a 30% durante 150 h.

El PHB es producido por cepas de *Rhizobium* utilizando diferentes fuentes de carbono tales como sacarosa, glucosa y succinato. La mayor acumulación de PHB de las cepas analizadas se presenta hacia el final de la etapa exponencial, en medio enriquecido con una alta relación C:N y usando manitol como fuente de carbono (Tombolini & Nuti, 1989).

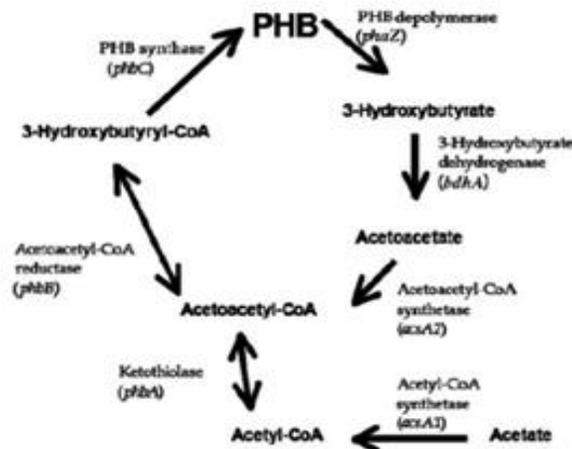


Figura 8. Ciclo del PHB en *S. meliloti* (Tomado de Charles, 2001).

I. Características del suelo que impactan en la simbiosis *Sinorhizobium*-leguminosa

En el caso del pH del suelo puede ser posible seleccionar cepas que se adapten tempranamente a las condiciones que enfrentarán en el suelo lo cual puede llegar a impactar en su competitividad, en el proceso de nodulación y en la efectividad de la fijación de nitrógeno (Toro, 1996). En el caso de cepas de *S. meliloti* crecidas a valores de pH ácidos in vitro, no necesitaron de tratamientos que les brindaran una competitividad superior cuando fueron aplicadas en campos cuyo pH característico era ácido (Howieson

et al., 1988). Los suelos neutros y con pH ligeramente alcalino favorecen la nodulación de las leguminosas, pero a bajo pH muchas leguminosas no son noduladas. El carbono exudado por la raíz de la planta decrece en suelos ácidos, lo cual impacta en el sustrato disponible para los microorganismos que se encuentran en la rizosfera. En suelos ácidos existe mayor disponibilidad de metales como el aluminio y el manganeso que pueden llegar a ser tóxicos, así como existe una deficiencia de fosfato, calcio y molibdeno. Las cepas de rizobio de crecimiento rápido son menos tolerantes a la presencia de aluminio y manganeso en el suelo que aquellas que de crecimiento lento (Toro, 1996).

Los suelos de Latinoamérica se caracterizan por ser deficientes en nitrógeno y tener en términos generales niveles bajos de fósforo y un pH ácido, lo cual, además de ser factores limitantes para la productividad de las plantas, afectarían el desarrollo de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*. La importancia del pH del suelo radica en que este es una de las pruebas con mayor relevancia para diagnosticar el crecimiento de las plantas. En general los suelos de regiones húmedas son ácidos y lo de las regiones áridas son alcalinos (Fassbender *et al.*, 1994).

i. Características de los suelos ácidos

Este tipo de suelos es pobre en magnesio y calcio intercambiable, tiene baja solubilidad de molibdeno y alta solubilidad de aluminio, hierro y magnesio. Por otro lado, es frecuente la presencia de toxinas orgánicas y un escaso aprovechamiento de nitrógeno y boro. Los suelos ligeramente ácidos con pH entre 6.1 y 6.5 son más satisfactorios para la mayoría de las plantas. Esto debido al correcto equilibrio entre los agentes químicos y biológicos (Fassbender *et al.*, 1994).

ii. Características de los suelos alcalinos

Se caracterizan por poseer grandes cantidades de calcio activo, magnesio, molibdeno, poco o ningún aluminio tóxico, una moderada aunque activa cantidad de humus y un aprovechamiento real de nitrógeno. Sin embargo a valores de pH mayores a 8.4 existe una inadecuada asimilación de hierro, manganeso, cobre, zinc y cobre sobre todo fósforo y boro (Fassbender *et al.*, 1994).

m. Biofertilizantes

Investigadores como Fuentes R. & Caballero M. (2005) los han definido como un producto que contiene microorganismos que ejercen de manera directa o indirecta efectos benéficos sobre el crecimiento y rendimiento del cultivo a través de diversos mecanismos. Aguirre (2009) afirma que un biofertilizante es una formulación con uno o varios microorganismos que son una fuente facilitadora del manejo de los nutrientes que benefician el funcionamiento de los cultivos y forma parte de una tecnología que brinda productividad biológica, económica y ecológica más exitosa sin contaminación al ambiente y de inocuidad reconocida para el hombre.

La inoculación con rizobacterias tiene un efecto notable en la fertilidad del suelo y calidad del mismo, reflejado en el contenido de materia orgánica, solubilidad del fósforo, la producción de fitohormonas y la fijación de nitrógeno en la planta hospedera (Mahecha, 2002).

La extensa capacidad de los inoculantes en las leguminosas, no ha desencadenado la creación de estándares internacionales de calidad ni en el uso de este tipo de productos. Esta brecha en la regulación de los productos microbianos en algunos casos ha conducido a inadecuados rendimientos y por lo tanto al abandono en su uso. Sin embargo, la producción de inoculantes efectivos puede superar las deficiencias en las legislaciones, con la responsabilidad de los fabricantes para el diseño e implementación de las diversas etapas a lo largo del proceso de producción, que conduzcan a la fabricación de productos con alta calidad y efectividad (Stephens & Rask, 1999).

i. Formulación de los inoculantes

Usar las formulaciones correctas en la producción de biofertilizantes es una de las barreras más frecuentes para la comercialización de estos. Un microorganismo puede funcionar de manera óptima bajo condiciones de laboratorio, pero la formulación de un microorganismo para que tenga una efectividad comparada en el campo es un paso muy difícil (Stephens & Rask, 2000).

Las formulaciones usualmente se comercializan en presentaciones como polvo (turba), líquida y granular. Los productos en turba son usualmente usados para la inoculación directa en la semilla, este tipo de producto es de los más comunes. En el caso de los líquidos pueden ser aplicados directamente a la semilla o bien en el surco durante la plantación. Los granulares se pueden aplicar en el surco o bien en estratos de la tierra más profundos donde va la semilla (Stephens & Rask, 2000). Hay otras muchas presentaciones de los inoculantes como es el caso de los que utilizan células suspendidas en aceites, concentrados celulares y cultivos liofilizados (Kremer & Peterson, 1983). Todo encaminado a incrementar las poblaciones de rizobios por unidad de volumen o peso, la eficiencia del organismo y la conservación del producto que está relacionado con la rentabilidad del producto (Stephens & Rask, 2000).

Recientemente, se ha promovido la presentación líquida del biofertilizante. Debido a que la eficiencia en campo ha sido comparable con las presentaciones en turba y de esta manera se evita el procesamiento del medio base. Sin embargo, dentro de las principales limitaciones de la presentación líquida se encuentran: una limitada vida de anaquel y altos costos en el uso de bajas de temperaturas para su conservación.

ii. Producción del inoculante

Existen tres importantes aspectos relativos a la producción del inoculante los cuales son:

- La calidad y el procesamiento del medio base.
- La eficiencia en la nodulación de la cepa y la fijación de nitrógeno.
- Alcanzar una adecuada cuenta celular tanto en el cultivo como en el producto final.

iii. El medio base

Smith (1992), apuntó que la materia prima para la fabricación de inoculantes está determinada por la disponibilidad, calidad y costo. El medio base debe tener dos propiedades fundamentales, por un lado soportar el crecimiento del organismo y además mantener una alta cuenta celular después de periodos razonables de tiempo. El medio debe tener una alta capacidad de retención de agua, tener uniformidad física y química, no ser tóxico para el microorganismo y ser seguro para su liberación en el ambiente. Necesita permitir el crecimiento del rizobio, tener un valor de pH adecuado para el microorganismo y debe permitir la liberación de los microorganismos fácilmente.

El manitol cumple con diferentes roles en la formulación líquida, por un lado es una fuente de carbono generalizada para diferentes tipos de rizobios. El manitol es un protector de las células durante el secado y se ha encontrado un mejoramiento en la producción de exopolisacáridos (Singlenton *et al.*, 2002). El D-Manitol es un polialcohol derivado de la hidrogenación del azúcar manosa. Se utiliza en alimentos, farmacia, medicina y química. Su punto de fusión se encuentra entre los 165-170 °C. Tienen una baja solubilidad en agua 18% (w/v) a 25 °C. En soluciones alcalinas es un poderoso secuestrante de iones metálicos. Sus propiedades higroscópicas incrementan la vida de anaquel de productos alimenticios y farmacéuticos (Soetaert *et al.*, 1999). Este polialcohol ha sido localizado en 100 diferentes especies de plantas superiores, además su producción en la planta se favorece en respuesta al estrés osmótico (Stoop *et al.*, 1996).

La cuantificación de manitol se lleva a cabo por diversas técnicas analíticas entre ellas se encuentran: los métodos cromatográficos (Beck & Hopf, 1990); los ensayos enzimáticos que ya se comercializan (Sigma-Aldrich No. Catálogo MAK096); métodos químicos basados en reacciones de oxidación de polialcoholes con reactivos como periodato de sodio (Sánchez, 1998); Dubois M. *et al.*, (1952) estandarizaron un método colorimétrico de cuantificación de azúcares, oligosacáridos y polisacáridos.

iv. La selección de la cepa

Para optimizar la fijación de nitrógeno en los cultivos, los microorganismos necesitan ser competitivos con las poblaciones autóctonas y ser eficientes en la fijación una vez formado el nódulo. El preacondicionamiento y por lo tanto la competitividad de la cepa puede ser alcanzada en parte a través del uso de medio limitados de nutrientes, esto puede reducir la probabilidad de que contaminantes se desarrollen en la formulación.

Independientemente de si la especie es capaz de nodular muchos cultivos o bien es más específica y solo favorece a ciertas especies es necesario que las cepas sean seleccionadas de una región geográfica, tipo de suelo y ambiente específicos. Las cepas deben ser compatibles con los cultivos comunes en esa área y mostrar una adaptabilidad para ser efectivos y eficientes sobre ciertas condiciones ambientales tales como la desecación y la presencia de compuestos tóxicos.

v. Cuenta celular

La falta de controles de calidad lleva a que los fabricantes implementen sus propios estándares. Esto en ocasiones provoca baja efectividad debido a la carencia de control. Algunos países se han encargado de establecer estos mínimos estándares o bien algunos autores reportan que para una alta efectividad en la nodulación, las formulaciones deben alcanzar cuentas celulares de 5×10^7 a 1×10^9 células de *Rhizobium* por gramo (Lupway *et al.*, 2000), lo que coincide con lo propuesto por Stephens & Rask (2000) quienes sugieren que el medio debe ser capaz de soportar poblaciones de hasta 10^9 rizobios por mililitro. En Canadá el estándar para los inoculantes producidos en 1997 fueron de 2×10^6 a 1.3×10^9 rizobios por gramo o por mililitro. Francia determinó que en el caso del frijol es de 10^6 rizobios por semilla. En el caso de los Estados Unidos y Reino Unido, los estándares de calidad se dejan muchas veces en manos del fabricante (Rebah *et al.*, 2007).

n. Efecto del pH en el crecimiento de *Sinorhizobium meliloti* y en el proceso de nodulación

El estrés por el pH externo constituye un factor limitante en la sobrevivencia y desarrollo de *S. meliloti* (de Lucena *et al.*, 2010). Hellweg *et al.*, (2009) reportan que la respuesta al pH ácido por parte de *S. meliloti*, involucra una gran cantidad de genes asociados con varias funciones celulares. Tales respuestas dependen del tiempo al que el cultivo ha sido sometido en determinada condición de pH. Una de estas funciones es la producción de EPS I, de los cuales existe un aumento en su producción en condiciones ácidas. Esto puede deberse a una respuesta de la célula para protegerse del ambiente ácido. La cepa de trabajo que emplearon fue *S. meliloti* 1021 y encontraron que esta no presenta crecimiento a un pH de 5, pero a un pH 5.75 si lo hubo, evidenciando así el efecto del estrés ácido. Cunningha *et al.*,(1984) evaluaron si existía una correlación entre la tolerancia a la acidez en distintos géneros de rizobios y cómo esto se relacionaba con el grado de EPS producidos. Las cepas de trabajo incluyeron a los géneros capaces de establecer relaciones simbióticas con *Phaseolus*, *Cicer*, *Leucaena*, *Meflotus/Medicago*, *Trifolium* y *Lens*. Encontraron que en todas las cepas analizadas aquellas que producían mayor cantidad de EPS eran más tolerantes al estrés ácido.

Brockwell *et al.*, (1991) reportaron que la relación entre la acidez y las poblaciones de rizobios nativas en el suelo guardan una importante relación. Encontraron que en suelos con pH 7 o mayor las poblaciones de rizobios alcanzan cuentas de hasta 89 000 rizobios/g. Mientras que, en suelos con un pH menor a 6 sólo alcanzaron cuentas de 37 rizobios/g. Dicho estudio se llevó a cabo en suelos de Australia en la región del Nuevo Gales Sur, conocida como la región Mcquarie, con una extensión de 62 000 km². En este sentido, Rice *et al.* (1976) en estudios hechos a nivel invernadero, reconocieron que: la viabilidad de *S. meliloti*, la cantidad de nódulos (*S. meliloti-M. sativa*) y los rendimientos de la alfalfa, decrecen bruscamente a valores de pH 6 o por abajo. Mientras que por encima de pH 6, no hallaron efectos significativos.

Robson & Loneragan (1970) encontraron que el crecimiento de *S. meliloti*, es más sensitivo a la acidez del suelo que el crecimiento de la planta *M. truncala* cuando le es suministrada adecuadas cantidades de nitrógeno. Se sugiere que el factor que puede permitir un mejor crecimiento de las especies *Medicago* es que estas sean inoculadas con cepas resistentes a suelos ácidos

Las cepas de *S. meliloti* son particularmente sensibles a la acidez del suelo. La capacidad de una bacteria para soportar diferentes valores de pH radica en que las células sean capaces de mantener un pH interno de entre 7.5 – 8, contra un pH de hasta tres unidades menores en el suelo. Esto lo puede lograr la célula por medio de la expulsión de protones y la sustitución por iones de potasio, para mantener el balance de cargas en el citoplasma. En *S. meliloti* se ha encontrado que el pH interno varía entre las 7.6 a 8 unidades de pH, aunque otros autores han encontrado que este valor es constante entre las 6.5 y 6.7 unidades de pH. El crecimiento de los rizobios en condiciones de estrés ácido, involucra cambios en la actividad metabólica. Lo cual probablemente implica en que el rizobio es capaz de mejorar las condiciones de pH externo antes del inicio de su crecimiento en un medio ácido (Graham, 1991).

Un camino para contrarrestar el efecto que tiene el pH ácido en cultivo sumergido de *S. meliloti*, es el propuesto por Howieson *et al.*, (1992) quienes encontraron que un aumento en la concentración de calcio repercutía favorablemente en la velocidad de crecimiento y la viabilidad. Sin embargo, no se observó tal efecto cuando el pH era neutro. Existen diferentes condiciones del suelo que pueden resultar desfavorables para el rizobio. Sin embargo, una de las más importantes es el nivel de acidez o alcalinidad en función del pH (Lupway *et al.*, 2000).

o. Biorreactor

i. Generalidades de los tanques agitados

Las actividades asociadas con los reactores biológicos incluyen el contacto gas/líquido, la detección de concentraciones en línea, el mezclado, la transferencia de calor, el control de la espuma, la alimentación de nutrientes y reactivos tales como los necesarios para controlar el nivel de acidez en cultivo (Perry *et al.*, 2005).

El fermentador tradicional en los bioprocesos es el reactor de tanque agitado, que es un reactor con agitación mecánica interna. La mayor ventaja de este sistema es su flexibilidad y la capacidad de proveer altos valores de transferencia de oxígeno. La aireación en este tipo de reactores se lleva a cabo por medio de difusores instalados dentro del sistema, está compuesto de un anillo con orificios, o bien un solo orificio. El tamaño de las burbujas y su dispersión a través del tanque son críticas en su funcionamiento. El biorreactor de tanque agitado cuenta con impulsores, los cuales deben proveer la agitación necesaria para homogenizar el medio, así como dispersar las

burbujas a través del tanque, para incrementar el tiempo de residencia de estas dentro del líquido y disminuir los tamaños de burbuja, con el objeto de aumentar el área de contacto gas-líquido y permitir así la mejor transferencia de masa (Shuler, 2008).

Existen diferentes tipos de impulsores, uno de los más comunes tanto en escala industrial como en laboratorio es el impulsor tipo Rushton. Está constituido de manera convencional por 6 u 8 paletas diseñadas para mover el fluido en dirección radial. Con el objeto de mejorar el mezclado, los reactores cuentan con un arreglo de 4 baffles (Shuler, 2008).

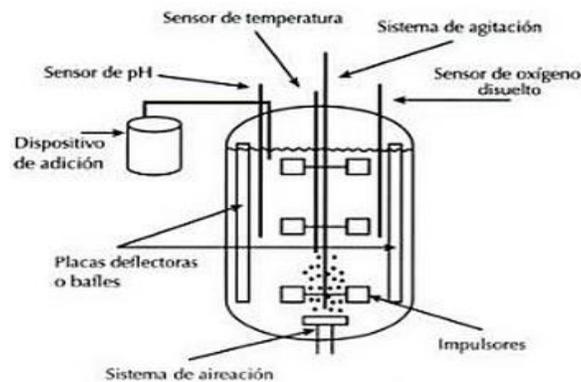


Figura 9. Principales partes de un biorreactor de tanque agitado (Tomado de Hernández *et al.*, 2003).

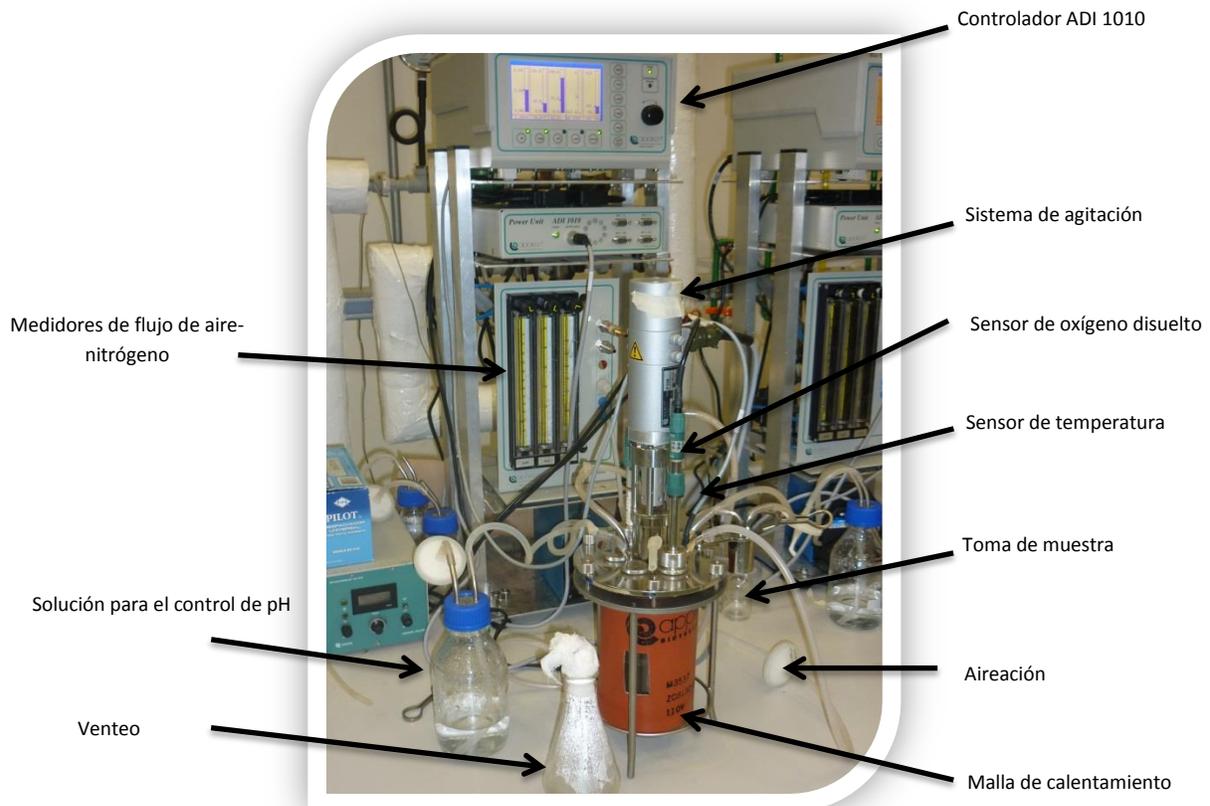


Figura 10. Biorreactor (1 L) Applikon Biotechnology con controlador ADI 1010. Unidad de Bioprocesos IIB-UNAM.

El cultivo tipo batch, utilizado en la parte experimental de este proyecto, se caracteriza por ser un sistema cerrado donde no hay adición de sustrato, ni remoción de células, ni del material celular excretado por las mismas en el biorreactor. La densidad celular se incrementa hasta que existe un factor limitante que detiene su crecimiento. Debido a esto, es posible reconocer un ciclo de crecimiento completo de la población de microorganismos. Este ciclo se puede clasificar en cuatro fases, una lag, exponencial, estacionaria y de muerte celular.

Durante la fase lag el microorganismo se adapta al medio de cultivo, puede ser breve o prolongada dependiendo de las condiciones de inoculación del mismo. La fase exponencial se caracteriza por ser un estado autocatalítico, que sigue un modelo de progresión base 2, cuando una célula se divide genera dos células hijas, que a su vez genera cada una a dos células más, lo que se puede expresar como $2^0 \rightarrow 2^1$ y sucesivamente. Para esta fase se cumple una relación directa entre el número de células iniciales y las presentes después de un determinado intervalo de tiempo, puede expresarse como:

$$N = N_0 2^n$$

Donde N es el número final de células, N_0 es el número inicial y n es el número de generaciones durante el período de fase exponencial. Esta expresión se relaciona con el tiempo de generación (g) que es una medida del tiempo en que tarda en duplicarse una población y se expresa como:

$$g = t/n$$

Puede ser calculada conociendo el número inicial y final de células, así como el tiempo en el que se presentó el crecimiento en fase exponencial.

Una de las expresiones utilizadas para caracterizar el crecimiento de un microorganismo es la velocidad específica de crecimiento expresada como μ (h^{-1}). Esta es función del tipo de microorganismo, la temperatura, el pH, la naturaleza y composición del medio, fuerza iónica, potencial redox, etc. El valor de μ se considera constante en la fase exponencial de crecimiento. Esta variable es útil para optimizar las condiciones de cultivo de un microorganismo en particular y también para probar el efecto positivo o negativo de algún tratamiento sobre el cultivo bacteriano. Experimentalmente, se pueden llevar a cabo mediciones de la concentración celular en función del tiempo, para obtener un valor de μ para nuestro sistema y microorganismo particular. Para ello, es necesario hacer un tratamiento matemático donde se genera una gráfica semilogarítmica del crecimiento celular en función del tiempo y se trata como una ecuación de primer orden, donde la pendiente de la recta representa, la velocidad específica de crecimiento.

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$
$$\int_{x_1}^{x_2} \frac{dx}{x} = \mu \int_{t_1}^{t_2} dt$$

$$\ln x_2 - \ln x_1 = \mu (t_2 - t_1)$$

$$\ln x_2 = \mu t + \ln x_1$$

Donde $\frac{dx}{dt}$ representa el cambio de concentración celular en función del tiempo, x es la concentración de células en el medio y t el tiempo de cultivo. El crecimiento exponencial no se puede prolongar de modo indefinido por lo tanto a la siguiente etapa se le denomina fase estacionaria donde el número de células permanece constante en el tiempo. Finalmente, el cultivo llega una fase de muerte, donde ocurre una baja en la viabilidad celular del cultivo. Las limitaciones del crecimiento puede deberse a múltiples factores, una de ellas, la limitación por disponibilidad de sustrato, lo cual puede presentarse en los cultivos tipo batch puesto que no se alimenta medio fresco al cultivo. Una expresión que representa la dependencia de la velocidad de crecimiento a partir de una fuente de sustrato limitante es:

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \left(\frac{S}{k_s + S} \right)$$

Donde S representa la concentración de sustrato y k_s es una constante de saturación. La velocidad específica de crecimiento, como ya se mencionó puede verse afectada por otros factores, en el caso de este trabajo se analiza en función del valor de pH.

ii. Electrodo de oxígeno disuelto

El primer modelo de electrodo para medir oxígeno disuelto fue patentado por Clark en 1959. El sistema se compone por un ánodo, cátodo, membrana, electrolito, aislante de vidrio y cuerpo del electrodo. El sensor se basa en un par de electrodos que están en contacto con una solución electrolítica, los cuales se encuentran separados por una fina membrana hidrofóbica.

El material de estas membranas es generalmente teflón, silicona o polietileno, su principal función es permitir únicamente el paso de oxígeno, evitando la interferencia por especies electroactivas o pasivantes. El material del cátodo es platino, oro o plata. Mientras que el del ánodo que a su vez actúa como electrodo de referencia es de plata/cloruro de plata. La función de la solución electrolítica es fijar un valor de pH adecuado para la detección del oxígeno, independiente de la muestra y mantener constante el potencial del electrodo de referencia (Alegret *et al.*, 2004).

Existen dos tipos de sensores. El polarográfico al que debe aplicarse un voltaje para efectuar la medida y el sensor galvánico en el cual se genera el voltaje suficiente para generar la medida. El uso extenso del electrodo polarográfico radica en que ofrece mayor tiempo de respuesta, puede trabajar por largos periodos de tiempo y requieren de menor flujo para tener lecturas estables (Crison, 2005).

Los sensores polarográficos requieren polarizarse unas horas antes a su uso. Esto se debe a que por cada molécula de oxígeno que se reduce entran cuatro electrones y cuatro abandonan el ánodo. El campo de medida es de 0-20 mg/L y con una desviación máxima del $\pm 1\%$ (Creus, 2011). Presentan pequeñas desviaciones de la señal por lo que deben calibrarse periódicamente. Esta calibración se puede hacer por medio de un simulador que libera una señal equivalente al 100% de saturación de oxígeno y 0% cuando el oxígeno es desplazado por nitrógeno en la solución.

iii. Electrodo de pH

Es un electrodo combinado de vidrio con uno de referencia de cloruro de plata. Un electrodo de pH debe calibrarse con dos o más tampones estándar, seleccionados de tal manera que el pH de la muestra esté dentro del intervalo de estos estándares. Se debe evitar la deshidratación de la membrana por lo que su conservación requiere mantenerla sumergida en una disolución acuosa. Idealmente, la solución debe ser la misma que la de la membrana (Harris, 2007).

iv. Sensor de temperatura

Los dos principales tipos de termómetros utilizados en los bioprocesos son el termómetro de resistencia y el termopar (Shuler, 2008). El termómetro de resistencia actúa debido al cambio en la resistencia eléctrica que experimentan los materiales al variar la temperatura. Ambas variables están relacionadas por lo tanto se pueden establecer un valor de temperatura en función de la resistencia eléctrica para cada instante en el tiempo (Muñoz *et al.*, 2004). El termopar está compuesto por metales diferentes que al estar en contacto producen una diferencia de potencial en función de la temperatura.

v. Esterilización

La esterilidad significa la ausencia de algún tipo de organismo viable. Con el objeto de obtener cultivos puros en los cuales solo el microorganismo deseable se encuentre presente, existe una buena cantidad de métodos físicos y químicos de esterilización. Sin embargo, la esterilización utilizada en este proyecto se hizo a partir de calor húmedo y por filtración. El calor húmedo desnaturaliza a las proteínas ya que causa la rotura de los enlaces puentes de hidrógeno. Este tipo de esterilización requiere temperaturas superiores a las de la ebullición del agua, lo cual se logra en autoclaves que usualmente operan a 121°C y 15 psi durante 15 min. La filtración es utilizada para la esterilización de los gases que tienen contacto directo con el medio de cultivo o materiales termolábiles. Para ello son utilizados filtros de membrana compuestos por sustancias como ésteres de celulosa o polímeros plásticos, cuyos diámetros de poro más usuales en la industria son de 0.22 y 0.45 μm (Tortora *et al.*, 2007).

vi. Sistema de control en biorreactores

El mantenimiento de las condiciones óptimas para la formación de productos en ambientes complejos en biorreactores, requiere de la medición y el control de algunos parámetros básicos tales como el pH, temperatura y oxígeno disuelto (Shuler, 2008). Con este objetivo se utilizan instrumentación y algoritmos de control que permitan mantener o manipular las condiciones de proceso. Sin embargo, en muchas ocasiones no se tiene el pleno conocimiento de la efectividad en el uso de la información recabada, sobre el ambiente químico intra y extra celular (Shuler, 2008).

La adquisición de datos puede llevarse a cabo on-line u off-line. Depende del tipo de instrumentación, de las posibilidades de mantener la esterilidad en la fermentación y de la precisión con la que el instrumento pueda hacer mediciones cuando las fermentaciones se llevan a cabo en tiempos largos. Para proceder al control automático de un proceso biotecnológico específico es necesario aplicar los valores evaluados y estimar el estado del proceso de acuerdo a los modelos matemáticos previamente establecidos. Es posible establecer sistemas simples de control o sistemas de control en cascada. Los sistemas de control toman la información del registro de datos, lo comparan frente a un set-point y emiten señales de salida que van a los elementos de control finales.

p. Determinación del coeficiente de transferencia de masa ($k_L a$)

En los procesos de fermentación aeróbicos es necesario un suministro adecuado de oxígeno que satisfaga los requerimientos metabólicos de los microorganismos empleados. Para ello es indispensable conocer los requerimientos de oxígeno del cultivo (Quintero, 1993). De tal manera que sea posible determinar el tipo de biorreactor, las condiciones de aireación y agitación capaces de mantener una determinada concentración de oxígeno disuelto (O.D.) en el medio de cultivo.

Se ha reportado ampliamente el sistema de transferencia de oxígeno desde una fase gaseosa hasta su aprovechamiento por el microorganismo, básicamente se puede dividir en las siguientes etapas:

- La transferencia difusional del oxígeno a través de la película formada en la región gas-líquido que rodea a las burbujas de aire en el medio de cultivo líquido.
- El camino y aglomeración de las burbujas en solución.
- La transferencia de oxígeno a través de la película de líquido que rodea a la célula.
- La reacción bioquímica intracelular.

La mayor resistencia a la transferencia de oxígeno la opone la película de líquido que rodea la burbuja. Aunque esto solo se cumple en el caso de organismos unicelulares, en los agregados celulares la difusión a través del agregado mismo constituye el paso controlante. Cuando la concentración de oxígeno disuelto en un cultivo en crecimiento, está cambiando con respecto al tiempo, la transferencia de oxígeno está dada por:

$$\frac{dc}{dt} = OTR - OUR$$

$$\frac{dc}{dt} = k_L a (C_g^* - C_L) - Q_{O_2} * C_X$$

$\frac{dc}{dt}$ representa el cambio de la concentración de oxígeno en el tiempo, la *OTR* es la velocidad de transferencia de oxígeno y la *OUR* es la velocidad del consumo de oxígeno. Mientras que el $k_L a$ es el coeficiente de transferencia de masa, C_g^* es la concentración de equilibrio de oxígeno en la fase gaseosa, C_L Concentración de oxígeno en la fase líquida y el consumo de oxígeno por parte de las células es Q_{O_2} , la concentración celular se representa (C_X).

Tabla 2. Metodologías para la determinación del coeficiente de transferencia de oxígeno ($k_L a$).

Medición indirecta			
Técnica	Aplicación	Ventajas	Desventajas
Eliminación de gas	Eliminación de oxígeno por inserción de un gas inerte. Posterior lectura de recuperación de oxígeno en el sistema.	Determinación rápida y sencilla sobre todo en reactores de volúmenes pequeños	Depende de la temperatura y el tiempo de respuesta del electrodo
Oxidación de sulfito	Reacción de oxidación del sulfito por la presencia de oxígeno en el sistema.	Aplicación en reactores con grandes volúmenes.	Depende de la pureza y concentración de la solución de sulfito. Calidad y concentración del catalizador. El valor de pH
Absorción de CO ₂	Consiste en burbujear CO ₂ en un fermentador que contenga una solución alcalina.	Útil en la medición de soluciones alcalinas	Aplicación solo en condiciones donde el pH es mayor a 10. En mezclas de gases se prefiere que sea baja la presión parcial de CO ₂ .

VII. JUSTIFICACIÓN

El estrés por pH externo constituye un factor limitante en la sobrevivencia y desarrollo de *Sinorhizobium meliloti* (Lucena *et al.*, 2010; Graham, 1991), que involucra diversas respuestas celulares (Hellweg *et al.*, 2009; Cunningha *et al.*, 1984). En el suelo se reconocen diferentes condiciones de pH para el crecimiento de la planta (Fassbender *et al.*, 1994). En este sentido, el presente trabajo se centra en reconocer el efecto en el crecimiento de *S. meliloti* cepa M7B46 respecto a diferentes condiciones de pH en cultivo sumergido. Así como, describir la producción de exopolisacáridos y polihidroxitirato del cual no existen antecedentes para esta cepa. Lo anterior con el objetivo de obtener una formulación de biofertilizante con alta efectividad en campo.

VIII. HIPÓTESIS

Caracterizar el crecimiento en cultivo sumergido de *Sinorhizobium meliloti* a diferentes condiciones de pH permitirá determinar su efecto sobre la viabilidad y generación de polímeros intra y extra celulares.

IX. OBJETIVOS

a. Objetivo general

Caracterizar el efecto del pH en el crecimiento de *Sinorhizobium meliloti* en cultivo sumergido en biorreactor de tanque agitado (1 L).

b. Objetivos particulares

1. Caracterizar el k_La en reactor de 1 L a diferentes condiciones de aireación y agitación.
2. Elaborar cinéticas de crecimiento en biorreactor de tanque agitado (1L) de *S. meliloti* a diferentes condiciones de pH.
3. Determinar la viabilidad y el crecimiento celular de *S. meliloti* a lo largo del cultivo en biorreactor, por medio del uso de técnicas espectrofotométricas (D.O.) y microbiológicas (UFC's/mL).
4. Elaboración de cinéticas de producción de exopolisacáridos generados por *S. meliloti* en las diferentes condiciones de pH.
5. Cuantificar la producción de polihidroxibutirato (PHB) a lo largo del cultivo.

X. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Cepas de trabajo

Las cepas de *Sinorhizobium meliloti* con las que se realizó el presente trabajo fueron proporcionadas por la empresa Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V., (en adelante se nombrarán con las letras A, B, D):

- Cepa A: *S. meliloti* M7 B46
- Cepa B: *S. meliloti* M8 B85
- Cepa D: *S. meliloti* M4 D604

b. Descripción de los medios de cultivo

La información de los medios de cultivo aquí descrita es propiedad de Biofábrica Siglo XXI S.A. de C.V.

- Medio sólido PY.

Para 1 litro de medio sólido PY se usó 0.7203 g de CaCl₂, 3 g de extracto de levadura, 5 g de peptona de caseína y 16 g de agar (Rico, 2012).

- Medio líquido YEM.

Para 1 litro de medio líquido YEM se empleó 10 g de manitol, 0.5 g de extracto de levadura, 0.1 g de NaCl, 0.5 g de K₂PO₄ y MgSO₄ (Rico, 2012).

- Medio LB (Luria Bertani).

Para 1 litro de medio sólido LB se utilizó 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto celular y 10 g de NaCl. Se ajusta el pH a un valor de 7.5 (Pedraza, 1999).

c. Identificación de la cepa

La evaluación macroscópica consistió en caracterizar las cepas se realizó en medio sólido PY. Se incubaron a una temperatura de 30°C hasta observar crecimiento en placa aproximadamente a las 48 horas. Se observó el tipo, tamaño y color de las colonias. Simultáneamente se sembró en caja con medio LB en el cual la cepa de *S. meliloti* no presenta crecimiento.

La evaluación microscópica se realizó por medio de una tinción de Gram. En un portaobjetos limpio se colocó una gota de agua destilada, con el asa estéril se tomó una colonia y se suspendió. Se fijó al porta objetos con calor, evaporando el agua. Una vez seca la muestra se agregó cristal violeta (1 min), se lavó con agua destilada y se agregó 1 ml de lugol por 1 min, se decoloró con alcohol-acetona, se lavó y se cubrió la preparación con safranina por 1 min. Se observó al microscopio marca Zeiss modelo Axiostar plus con el objetivo de inmersión 100X (De los Angeles y Pérez, 2004).

d. Resistencia a antibióticos

Los ensayos tanto en reactor como en matraz partieron de muestras de *S. meliloti* contenidas en cajas con medio sólido PY, esto con el fin de verificar la morfología de la cepa. Las cajas con el medio contenían ácido nalidíxico a una concentración de 40 µg/mL, al cual *S. meliloti* es resistente.

Las alícuotas del antibiótico se prepararon disolviendo hasta 50 mg_{Ac. Nalidíxico}/mL_{H₂O}, esterilizándolos por filtración con un filtro de jeringa estéril Millipore de 0.2 µm de diámetro de poro y se almacenaron a 4°C para su frecuente disponibilidad. Fueron agregados al medio de cultivo frío para evitar su degradación.

e. Elaboración de banco de trabajo

A partir de las cepas de *S. meliloti* contenidas en caja de Petri con medio PY, se realizó un crecimiento en matraz de 500 ml con 100 ml de medio YEM a 30°C y 200 rpm, sin control de pH. Se detuvo el cultivo a las 12 h cuando la densidad óptica se encontró en el intervalo de 0.6 - 0.8 que de acuerdo a la cinética de crecimiento representa la fase exponencial, la biomasa se dividió en tubos de fondo cónico y se centrifugó a 10,000 rpm a 14 °C por 10 min. Se hizo un lavado con solución isotónica de NaCl al 0.8% y se suspendió el paquete celular y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. Se decantó el sobrenadante y la biomasa se suspendió en una solución con glicerol al 50 % se almacenó a -70°C en crioviales (Rico, 2012).

f. Cinéticas de crecimiento

i. Cinéticas en matraz

Esta cinética se realizó por duplicado en matraz Erlenmeyer de 500 ml utilizando 100 ml de medio YEM, manteniendo la temperatura a 30°C y la agitación a 200 rpm en una incubadora New Brunswick Scientific Classic Series modelo C25 (Rico, 2012).

ii. Cinéticas en reactor de 1L

Esta cinética se realizó por duplicado en un biorreactor de tanque agitado Applikon (1 L) con Bio Controller ADI 1010. El cual cuenta con termopozos, electrodo de pH y de oxígeno disuelto. La agitación es suministrada por medio de una turbina Rushton. Se utilizó medio de cultivo YEM. El biorreactor junto con el medio se esterilizaron a 121°C por 15 min. El biorreactor fue inoculado con 5% en volumen de un inóculo crecido durante 12 h en matraz de 500 ml con 100 mL de medio YEM. El biorreactor se operó a 30°C y un control de oxígeno disuelto al 35% llevado a cabo por un control en cascada por agitación y mezcla de gases aire-nitrógeno, el control de la acidez del medio se llevó a cabo a pH 5, 6, 8, 9 y sin control (7± 0.4).

iii. Medidor de pH

Se utilizó un electrodo combinado de pH Mettler Toledo de Ag/AgCl cuyo rango de medida varía entre 0 y 12 unidades de pH y soporta una temperatura máxima de 130 °C. El calibrado del electrodo se realizó con el uso de buffers a pH de 4 y 7. El control de pH se llevó a cabo con el BioController ADI 1010 que emite señales que accionan bombas peristálticas de ácido y/o base. El uso de este tipo de bomba permite que el producto no tenga contacto directo con el mecanismo impulsor, esto garantiza la esterilidad del producto.

iv. Medidor de oxígeno

Para la medida del oxígeno disuelto se utilizó un electrodo de oxígeno disuelto polarográfico esterilizable Mettler Toledo. Consiste en un cátodo de platino y un ánodo de Ag/AgCl conectados conductimétricamente por un electrolito, separados de la solución mediante una membrana permeable al gas. Se polarizó aproximadamente 8 h después de esterilizar y antes de llevar a cabo las lecturas.

g. Determinación del crecimiento celular, consumo de sustrato y producción de polímeros intra y extra celulares

i. Cuantificación del crecimiento celular

El crecimiento de *S. meliloti* a lo largo del cultivo se determinó por turbidez, unidades formadoras de colonia y siembra en placa y por gravimetría.

Se midió indirectamente el crecimiento de *S. meliloti* por medio de la absorbancia, leída a una longitud de onda de 600 nm con un espectrofotómetro Genesys 5 ThermoSpectronic (Madigan *et al.*, 2009).

En el caso de las unidades formadoras de colonia por técnica de dilución y siembra en placa, la técnica consistió en realizar una serie de diluciones en factores de 10^{-3} hasta 10^{-6} en condiciones estériles con solución isotónica de NaCl al 0.85% a partir de una muestra de cultivo. Dependiendo de la fase de crecimiento donde se haya tomado la muestra, fue la dilución requerida. El propósito es que en el momento de sembrar en caja de Petri con medio PY, el número de colonias formadas esté entre 10 a 100, para que el conteo sea estadísticamente fiable.

De cada dilución se tomaron 100 μ L de muestra, agregándolos a una caja de Petri con medio PY. Se distribuyó cuidadosamente el inóculo en toda la caja con ayuda de una varilla de vidrio triangular previamente esterilizada. Hasta que la muestra fuera absorbida completamente por el medio sólido. Las cajas sembradas se incubaron a 30°C de 48-72 h en una incubadora Felisa. Se llevó a cabo el conteo de colonias formadas en un contador

de colonias Sol-Bat Q-20 y tomando en cuenta la dilución se reportó el resultado en UFC's/mL (De los Angeles y Pérez, 2004).

La técnica por gravimetría consistió en tomar muestras de cultivo con una cantidad de biomasa y densidad óptica determinadas. Las muestras se hicieron pasar a través de membranas Millipore de 0.22 μm de diámetro de poro. Previamente las membranas fueron llevadas a peso constante en una estufa Felisa a 80°C por 24 h. Las membranas se enfriaron en un secador que contenía gel de sílice y se pesaron en una balanza analítica Sartorius CP225D. Las muestras se hicieron pasar a través de las membranas, con la ayuda de un equipo de vidrio para filtración a vacío porta membranas marca Millipore. Una vez recolectada la muestra sobre la membrana se llevó a peso constante.

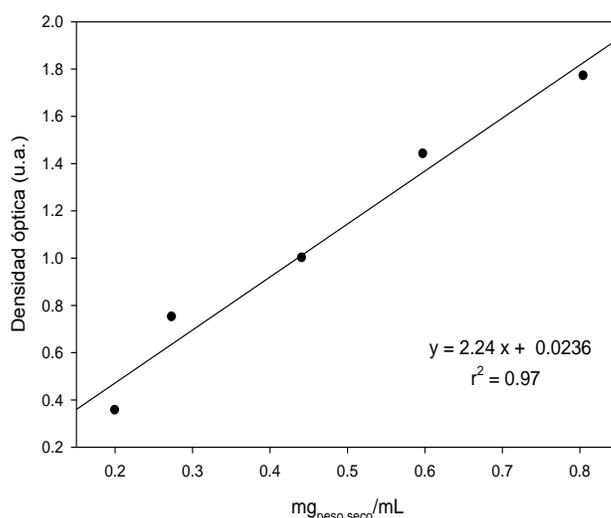


Figura 11. Relación entre la densidad óptica y el peso seco de *S. meliloti*, ensayo para la cepa A.

ii. Cinética de sustrato

Se centrifugaron las muestras obtenidas del cultivo a 10,000 rpm por 10 min en una centrífuga Eppendorf modelo S417R. El sobrenadante se analizó por el método fenol-sulfúrico para la determinación de azúcares totales. El procedimiento consistió en agregar 1 mL de muestra en un tubo de ensayo, posteriormente se agregó 1mL de fenol (5% v/v), por último se agregaron 5 mL de H₂SO₄ concentrado (por las paredes del tubo puesto que es una reacción exotérmica) y se agitó en vortex. Se esperó 10 minutos para completar la reacción a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 490 nm con celdas de vidrio óptico o cuarzo. La absorbancia se ajusta a cero con un blanco de agua tratado bajo el mismo procedimiento (Dubois *et al.*, 1956). Una curva estándar se obtuvo con D-Mannitol Sigma Aldrich CAS number 69-65-8, tratado bajo el mismo procedimiento.

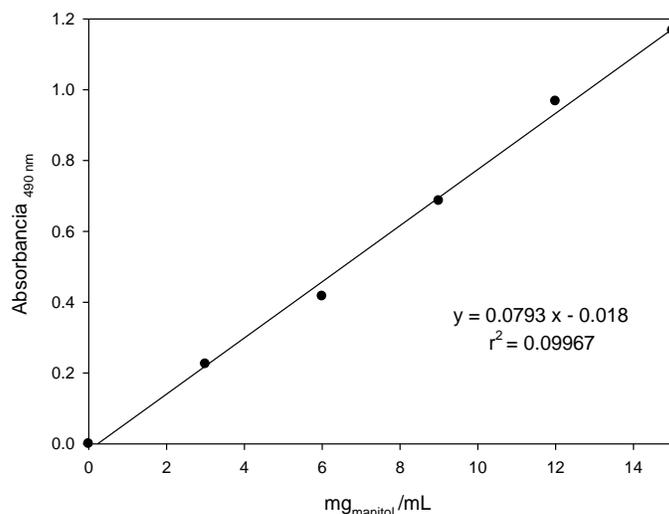


Figura 12. Relación entre la concentración de manitol y la absorbancia a 490 nm. (Modificado Dubois *et al.*, 1956).

iii. Cuantificación de exopolisacáridos (EPS)

Las muestras obtenidas en la cinética en reactor de 1 L, se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min. El volumen por muestra fue de 10 a 12 mL y al sobrenadante se adicionaron 3 volúmenes de isopropanol a 4°C por volumen de muestra. Esta solución se almacenó 24 h a -20°C en un refrigerador Revco Technologies REF-1617A14 para permitir la completa deshidratación de los EPS. El precipitado se colectó en membranas Millipore de 0.22 µm de diámetro de poro, previamente puestas a peso constante. Una vez colectados los EPS sobre la membrana se llevó a la incubadora a 80°C por 24 h y se determinó su peso. La cantidad de EPS se obtuvo por la diferencia en pesos de la membrana (Saranya *et al.*, 2011).

iv. Cuantificación de poli-β-hidroxibutirato PHB

Se cuantificó la cantidad de poli-β-hidroxibutirato (PHB) por medio de su conversión a ácido crotónico, el cual es posible valorar por espectrofotometría a una longitud onda de 235 nm (Law and Slepecky, 1961). Se procedió a realizar una curva estándar con PHB comercial Sigma Aldrich Número CAS: 29435-48-1. La curva estándar se realizó con concentraciones de PHB de 0 hasta 6 µg_{PHB}/mL_{H₂SO₄}. El procedimiento consistió en pesar una determinada cantidad de PHB y disolver en ácido sulfúrico concentrado hasta llegar a concentraciones de PHB en el intervalo mencionado. Las soluciones con PHB se almacenaron en tubos de vidrio con tapa, previamente lavados con Extran (6%), agua destilada, etanol y acetona. La solución de PHB y ácido sulfúrico se almacenó durante 4h a 70°C. Posterior a ello, se hizo un barrido de longitud de onda a cada muestra para verificar que el pico de absorbancia fuera a 235 nm, donde se leyó el ácido crotónico y se registró el valor de la absorbancia.

Para la cuantificación de PHB en las muestras obtenidas del cultivo de *S. meliloti* se procedió a tomar 1 mL de muestra del cultivo y centrifugarla 10 min a 12,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y al pellet recolectado se agregó 1 mL de hipoclorito de sodio (cloro comercial, cloralex). Se dejó reposar en baño maría a 30°C por 1 h. Se eliminó el hipoclorito de sodio por centrifugación a las condiciones descritas. Se hicieron lavados del pellet con 1 mL de agua destilada, se centrifugó y se agregó 1 mL de acetona fría, se centrifugó y por último se agregó 1 mL de etanol. El pellet resuspendido en etanol se trasvasó a un tubo de vidrio (previamente lavado con Extran (6%), agua destilada, etanol y acetona) y se permitió la evaporación del etanol. Una vez que el tubo de vidrio contenía sólo el PHB extraído se agregaron 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se llevó a la estufa para mantenerlo ahí por 4 h a 70°C, a la par un blanco de ácido sulfúrico fue sometido al mismo tratamiento. Para poder entrar a la curva estándar de PHB a partir de las muestras problema fue necesario diluirlas con el blanco de ácido sulfúrico tratado, en diluciones de 1/10 para muestras problema con densidades ópticas hasta de 2.

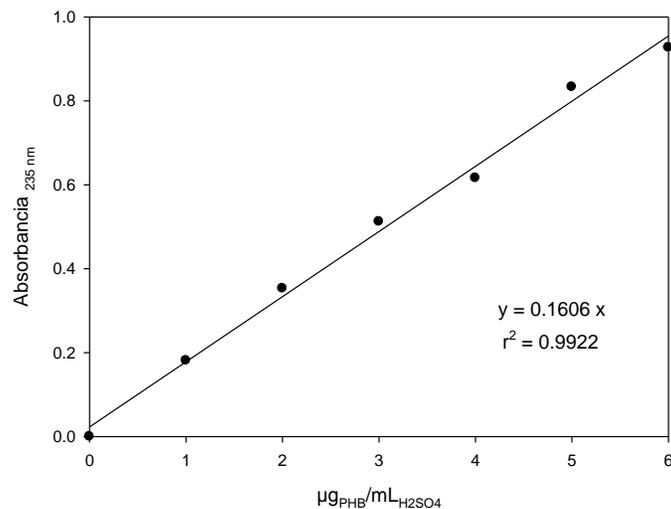


Figura 13. Relación entre la concentración de PHB y la absorbancia a 235 nm.

h. Determinación de $k_L a$

La técnica consistió en eliminar el oxígeno mediante el burbujeo de nitrógeno en lugar de aire, una vez que la concentración de oxígeno en el líquido es cero, se airea de nuevo y se toman mediciones de la recuperación de la concentración de oxígeno en el líquido a diferentes tiempos (Anexo 1)(Quintero, 1993). Se usaron 3 flujos de aire diferentes (0.3, 0.5, 1 vvm) y diferentes velocidades de agitación (200, 400, 600, 800 y 1000 rpm). La ecuación que describe el valor de $k_L a$ en función de la recuperación del oxígeno disuelto en el líquido es:

$$\ln \left[1 - \frac{C_L}{C^*} \right] = -k_L a t$$

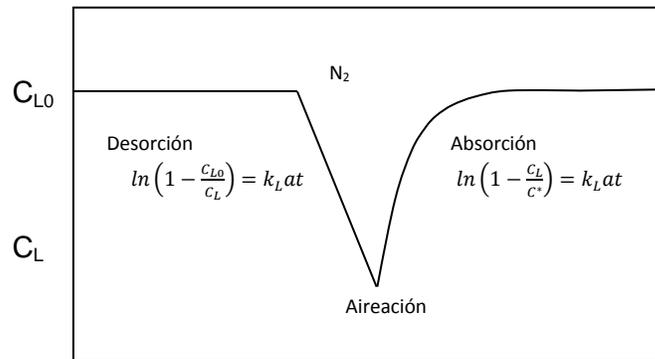


Figura 14. Descripción esquemática de la técnica dinámica desorción-absorción de oxígeno. (Tomado de García & Gómez, 2008).

XI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. Caracterización del reactor Applikon biotechnology con capacidad de 1 L

La caracterización del biorreactor de 1 L Applikon Biotechnology, consistió en el estudio del coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$) a diferentes condiciones de aireación y agitación, medidas en volumen de aire por volumen de medio (vvm) y revoluciones por minuto (rpm), respectivamente.

La velocidad de transferencia y la concentración de oxígeno disuelto se consideran como parte de los parámetros más importantes en el escalamiento de bioprocesos (Quintero, 1993).

Los valores de $k_L a$ obtenidos (Anexo 1 y 2) por la técnica de eliminación de gases a diferentes flujos de aire y agitación, para dos fluidos newtonianos (agua y medio YEM), se resumen en las tablas 3 y 4 y figura 15. Existe una relación proporcional entre la velocidad del impulsor (rpm) y los coeficientes de transferencia de masa ($k_L a$). Esto debido al efecto que tiene la velocidad de los impulsores sobre el área interfacial. El área interfacial es la superficie en la cual están en contacto la fase líquida con la fase gaseosa. Se considera que la resistencia más importante a la transferencia de masa se localiza en esta interfase líquido-gas. Cuando el impulsor aumenta su velocidad, rompe a las burbujas de gas haciéndolas más pequeñas, distribuyéndolas radialmente. Lo anterior da lugar a un incremento del área interfacial, permitiendo así una mejor transferencia de masa. Caso contrario, cuando la velocidad del impulsor es menor las burbujas son más grandes, disminuyendo el área de contacto y por lo tanto afectando así la transferencia de masa. Si la velocidad es muy baja puede presentarse un fenómeno de coalescencia entre burbujas (Treybal, 1981).

En un flujo de aireación a 0.3 vvm los valores de $k_L a$ fueron más bajos en comparación con las condiciones a 0.5 vvm y 1 vvm. Sin embargo, entre estas dos últimas condiciones de aireación no se presentaron diferencias significativas del valor de $k_L a$. Se sugiere que los altos flujos de aire provocan la formación de cavidades de aire detrás de los impulsores, zonas en las cuales las burbujas de aire son conglomeradas para formar grandes cavidades de aire (Martínez *et al.*, 1992). Aunque la diferencia del flujo aire entre 0.5 vvm y 1 vvm haya sido del doble, no se observó tal efecto en los valores de $k_L a$.

Tabla 3. Valores de k_La para agua, a diferentes rpm y flujo de aire. Biorreactor de 1 L Applikon biotechnology.

k_La en medio agua (h^{-1})			
Aireación (vvm) \ Agitación (rpm)	0.3	0.5	1
200	-	20.9	10.7
400	18.4	34.1	18.4
600	25	36.5	38.6
800	50.8	45.8	47.9
1000	49.7	49.7	43.7

Nota: El k_La para el flujo de 0.3 vvm y 200 rpm no fue calculado.

Tabla 4. Valores de k_La para medio YEM, a diferentes rpm y flujo de aire. Biorreactor de 1 L Applikon biotechnology.

k_La en medio YEM (h^{-1})			
Aireación (vvm) \ Agitación (rpm)	0.3	0.5	1
200	7.4	-	10.7
400	7.5	34.1	-
600	24	-	51.1
800	39.4	60.6	63.3

Nota: No se presentan los resultados de k_La donde la adquisición de datos por parte del controlador no fue continua.

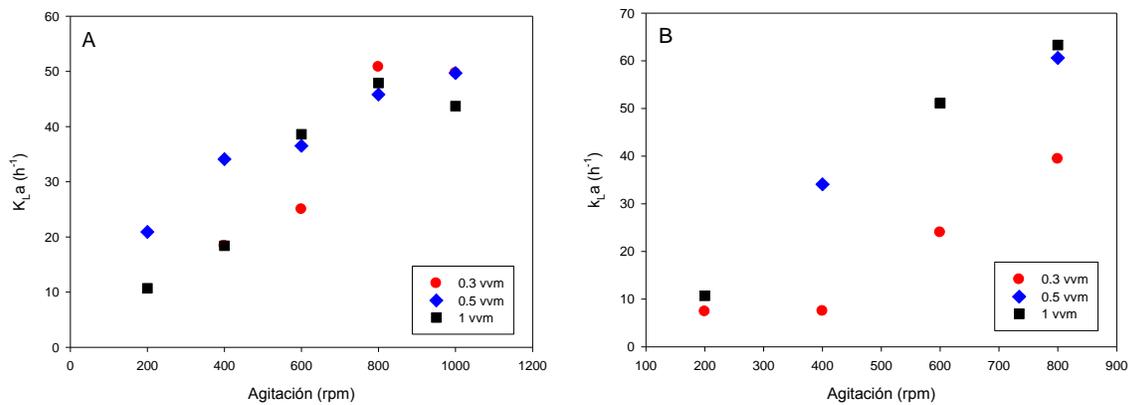


Figura 15. Valores de k_La en biorreactor Applikon Biotechnology de 1 L a diferentes condiciones de aireación y agitación a) Medio agua b) Medio YEM.

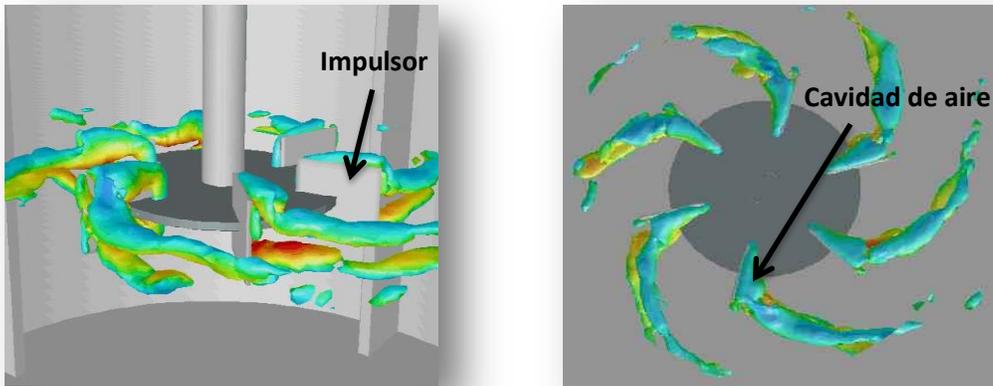


Figura 16. Efecto de la aireación en el mezclado en biorreactores de tanque agitado. Tomado de: <http://www.bakker.org/cfm/webdoc17.htm>

b. Caracterización macroscópica y microscópica de la cepa

La morfología macroscópica (figura 17) coincide con lo reportado por Kuykendall *et al.*, (2005). Cuando *S. meliloti* es crecido en medio sólido a base de manitol con sales minerales y extracto de levadura, la cepa presenta una estructura mucosa, semitranslúcida y color beige. Las colonias son circulares, convexas, usualmente opacas y aglomeradas. Sus dimensiones son de 2-4 mm de diámetro dentro de los primeros 3-5 días de incubación. Son bacilos cortos Gram-negativos (figura 18). No hay diferencias fenotípicas específicas de *S. meliloti* que permitan distinguirlo del género *Rhizobium* (Wang *et al.*, 2013). Previo a los ensayos, se realizó una eliminación de contaminaciones presentes en las cepas. Dicha eliminación se llevó a cabo con el uso de un antibiótico de amplio espectro (ácido nalidixico) a una concentración de 40 µg/ml. El resultado posterior a la eliminación de contaminaciones son las morfologías mostradas en la figura 17.

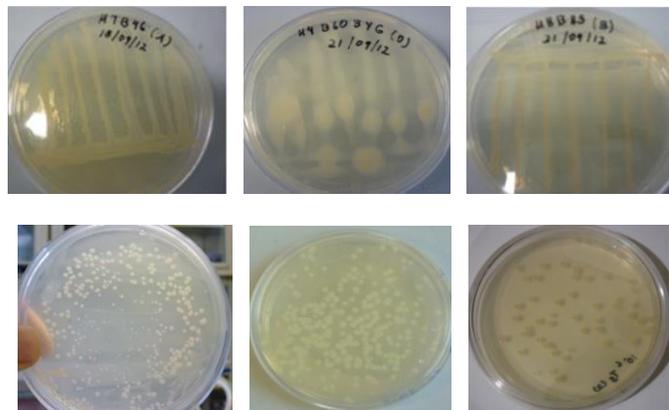


Figura 17. Morfología macroscópica de *S. meliloti* en medio sólido PY. Tiempo de incubación de 48 a 71 h a 30°C.

Wang *et al.*, (2013) reportan que las ocho especies dentro del género *Sinorhizobium* se caracterizan por tener un rápido crecimiento en medio con sales, extracto de levadura y manitol. Las cepas de trabajo crecen en medio sólido dentro de las primeras 48 a 72 h de incubación. Su almacenamiento a -70 °C con 50 % de glicerol conserva alta viabilidad de la cepa por lo menos en los primeros 6 meses. Aunque se infiere que la viabilidad con este método de conservación puede durar varios años (Hernández *et al.*, 2003).

Uno de los parámetros macroscópicos para evidenciar la existencia de alguna contaminación, fue el crecimiento en medio LB. Esta información fue brindada por personal de CCG UNAM, lugar en el cual fueron aisladas las cepas. Además, Graham (1991) reporta que las cepas de *Rhizobium* son sensibles a concentraciones de NaCl 100 mM. Sin embargo, también reporta que algunas cepas de *S. meliloti* soportan concentraciones de hasta 300 mM de NaCl. Tomando en cuenta esta información crecimos las cepas de *S. meliloti* en medio LB en el que la concentración de NaCl es 171.2 mM, no hubo crecimiento en este medio y por lo tanto se consideró como un parámetro que permite reconocer la presencia de contaminaciones.

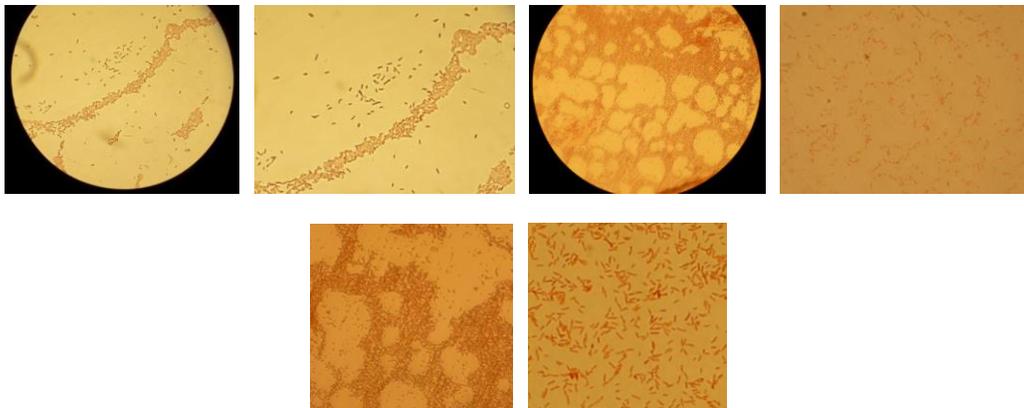


Figura 18. Morfología microscópica de *S. meliloti* (tinción de Gram) observada mediante microscopio óptico Carl-zeiss Modelo Axiostar Plus. Aumento 40 y 100X.



Figura 19. Morfología de *S. meliloti* en cultivo en caja con medio PY, el tiempo de incubación fue de 48 hrs a 30°C. Aumento 10 X.

c. Determinación de manitol por el método colorimétrico de azúcares totales

El método propuesto por Dubois *et al.*, (1952) se basa en la reacción del ácido sulfúrico y fenol con extremos reductores libres o potenciales en los azúcares. Las ventajas de este método radican en que la reacción ocurre en un tiempo muy corto, los reactivos son estables y de bajo costo, la generación de residuos puede llegar a ser mínima y el equipo requerido es fácilmente disponible.

Aunque este método no ha sido reportado para la cuantificación de manitol, se decidió ensayar el método por las ventajas que representa. La absorbancia leída a 490 nm corresponde a la longitud de onda utilizada para las hexosas. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de azúcar presente. La curva estándar es perfectamente reproducible y solo necesita ser preparada en una ocasión para ser utilizada. La linealidad se cumple hasta concentraciones de 12 mg_{manitol}/mL. La coloración de la reacción coincide con lo reportado por Dubois *et al.*, (1956) siendo amarillo-naranja.

Sin embargo, al llevar a cabo el ensayo con el medio de cultivo YEM sin inocular, hubo un aumento de 0.6 unidades de absorbancia (u.a.), respecto de la curva estándar elaborada sólo para manitol. Al analizar las muestras en cultivo la variación de las lecturas de absorbancia fueron irregulares sin mostrar alguna tendencia de la disminución de la fuente de carbono. Sugerimos que esto se debe a que en el medio de cultivo hubo presencia de otros compuestos que son más sensibles a la reacción con el ácido sulfúrico y fenol que el manitol. Como lo refiere Sánchez (1998) en los sistemas biológicos existen interferencias por otros carbohidratos que en nuestro caso pudieron ser secretados por la misma bacteria.

d. Determinación de PHB por el método de Law & Slepecky modificado

Han sido varios los métodos utilizados para cuantificar el PHB, esto debido a la demanda que implica el desarrollo y optimización de procesos biotecnológicos, donde este polímero es un factor relevante de las células microbianas (Montiel-Rivera *et al.*, 2007).

La cuantificación se puede llevar a cabo por métodos como: la gravimetría, donde el PHB se extrae del resto de los componentes celulares y se aprovecha su solubilidad en cloroformo caliente (Lemoigne, 1926); la espectroscopia de infrarrojo (Kansiz *et al.*, 2000); cromatografía de gases después de una esterificación hidrolítica en un solvente clorado (Braunegg *et al.*, 1978); cromatografía líquida por conversión a ácido crotónico (Karr *et al.*, 1983) y espectrofotometría por previa conversión a ácido crotónico leída a 235 nm (Slepecky & Law, 1960).

El método utilizado en este ensayo fue el espectrofotométrico, por su fácil manejo y resultados reproducibles. La curva estándar cumple para concentraciones de hasta $6\mu\text{g}_{\text{PHB}}/\text{mL}_{\text{H}_2\text{SO}_4}$. La relación coincide con lo reportado por Slepecky & Law (1960).

Sin embargo, cabe aclarar que se llevó a cabo una modificación relevante de la metodología propuesta por Slepecky & Law (1960). En su ensayo la conversión de PHB a ácido crotónico se lleva a cabo a 100°C durante 10 min, mientras que en este ensayo se modificaron las condiciones de reacción a 70°C durante 4 h. Esto, a partir de los estudios previos de degradación del PHB. Este polímero puede ser sustituido por diferentes mecanismos y generar productos tales como el ácido crotónico (isómeros cis y trans) y mezclas de oligómeros (Ariffin H., *et al.*, 2008). Químicamente, la β sustitución de la molécula de PHB es la que permite la conversión a ácido crotónico (Ariffin H., *et al.*, 2008). Montiel-Rivera *et al.*, (2007), encontraron que el uso de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 70°C durante 4 h permite la conversión completa del PHB, donde el ácido crotónico es el único producto observado, después de probar con varias temperaturas y concentraciones de H_2SO_4 .

e. Cinética de crecimiento de *S.meliloti* en matraces agitados sin control pH

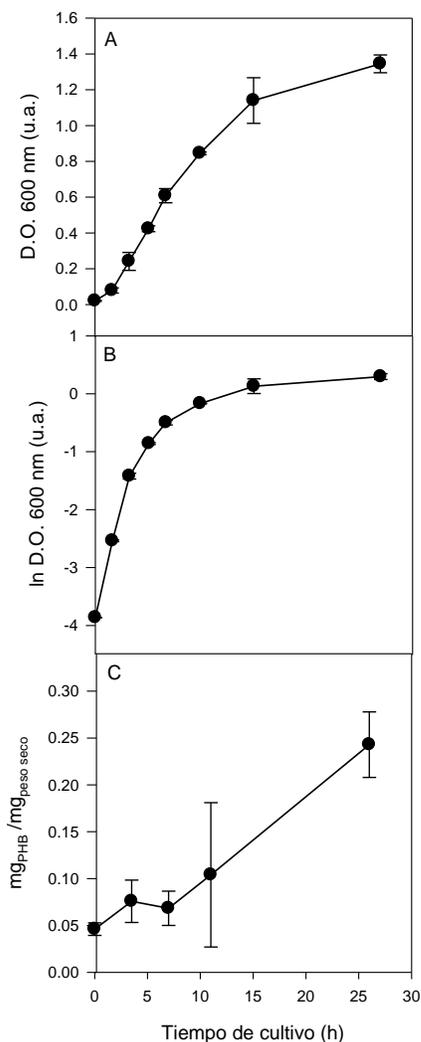


Figura 20. Resultados cinéticos del cultivo en matraz de *S. meliloti* (Cepa A) medio YEM, en matraz de 500 ml con 100 ml de volumen de llenado a 30°C, 200 rpm y sin control de pH a) Crecimiento seguido por densidad óptica b) Gráfico semilogarítmico del crecimiento c) Producción de polihidroxibutirato (PHB).



Figura 21. Cultivo en matraz de *S. meliloti* Cepa A, 30°C, 200 rpm, sin control de pH y medio YEM.

La figura 20 presenta los resultados cinéticos del cultivo sumergido de *S. meliloti* en matraces, con agitación orbital a 200 rpm, 30°C, sin control de pH y con un volumen de llenado de 100 mL. Este cultivo arranca en fase de crecimiento exponencial y se mantiene así hasta alrededor de las 10 h. Esto de acuerdo con Madigan *et al.*, (2009) se debe a que el inóculo utilizado fue crecido a las mismas condiciones y se encontraba en fase de crecimiento exponencial, por lo que no se observa retraso y el crecimiento sigue la misma tendencia. Se obtuvieron densidades ópticas máximas de 1.39 ± 0.08 UFC/mL a las 26 h de cultivo.

La producción de un inoculante requiere alcanzar una adecuada cuenta celular en el producto final. De acuerdo con Lupway *et al.*, (2000) una formulación debe alcanzar y soportar una población del orden 5×10^7 a 1×10^9 rizobios/g, mientras que Stephens & Rask (2000) proponen una concentración de 1×10^9 rizobios/mL rizobios. En el cultivo sumergido de *S. meliloti* en matraces agitados la viabilidad alcanzada a tiempo final fue de 9×10^8 UFC/mL. Además, la evaluación de un inoculante incluye pruebas como son la examinación al microscopio, siembra en placa y eficiencia en campo (Lupway *et al.*, 2000). En este sentido, evaluar el crecimiento del microorganismo por medio de la siembra en placa nos permitió reconocer sus características morfológicas y verificar que no existiera el desarrollo de microorganismos ajenos.

La generación de poli-β-hidroxibutirato (PHB) se presentó hacia el final de la fase exponencial (Figura 20-C). Representando hasta el 25% en peso de la célula. Se carece de reportes que muestren la cinética de producción de PHB en matraces agitados para el cultivo de *S. meliloti*. Esto debido a los problemas inherentes a su caracterización. Sin embargo, Tombolini & Nuti (1989) encontraron que la mayor acumulación de PHB en la cepa de *S. meliloti* Rm41 se presenta hacia el final de la fase exponencial, en cultivo en biorreactor y medio con manitol.

f. Cinética de crecimiento de *S. meliloti* en biorreactor con control de pH 5

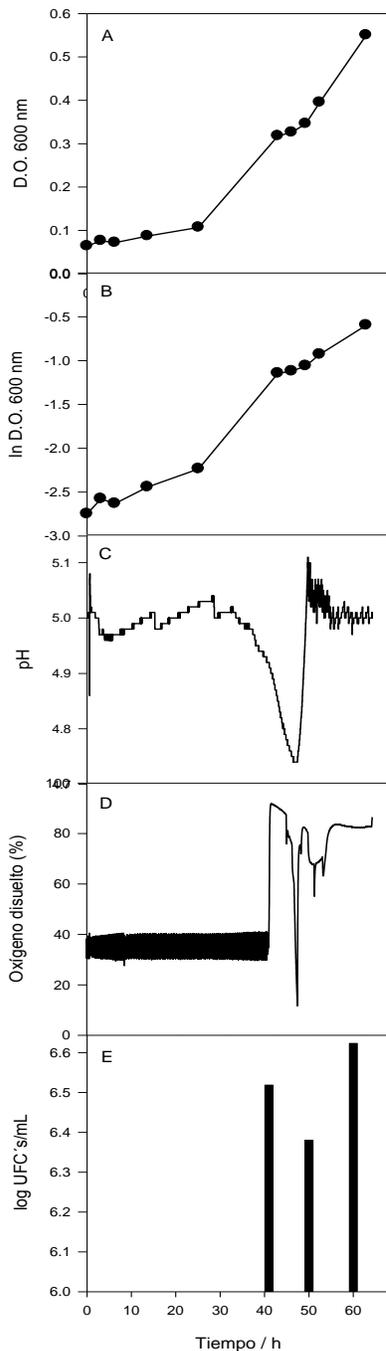


Figura 22. Resultados cinéticos del cultivo de *S. meliloti* en biorreactor de 1 L con control de pH 5, 30°C, medio YEM y oxígeno disuelto al 35% a) Crecimiento seguido por densidad óptica b) Gráfico semilogarítmico del crecimiento c) Control de pH llevado a cabo con una solución ácida d) Control de oxígeno disuelto e) Viabilidad en unidades formadoras de colonia por mililitro.

El uso de matraces agitados dificulta el monitoreo y control de variables tales como el pH y el oxígeno disuelto. Por esta razón, las etapas subsecuentes en la experimentación se llevaron a cabo en biorreactores.

El cultivo sumergido de *S. meliloti* con control de pH 5 alcanzó una densidad óptica máxima de 0.55 unidades de absorbancia (u.a.) a las 60 h de cultivo. Reflejado en la viabilidad del cultivo representó una cuenta máxima de 4.2×10^6 UFC/mL. La densidad óptica a tiempo cero, una vez inoculado el reactor, fue de 0.065 u.a. Es un experimento único, puesto que en el duplicado de la fermentación no hubo crecimiento. *S. meliloti* es considerado un rizobio sensible a condiciones ácidas, estudios en suelo demuestran que suelos ácidos presentan muy bajas poblaciones de rizobios comparadas con suelos neutros o alcalinos (Brockwell *et al.*, 1991). Hellweg *et al.*, 2009 crecieron en cultivo sumergido a nivel matraz la cepa de *S. meliloti* 1021, primero con un buffer a pH 7 y cuando el cultivo alcanzó las 0.8 u.a., hicieron un cambio a pH de 5.75, el cambio en la velocidad específica de crecimiento comparado con el control (pH 7) fue evidente. Esto concuerda con lo observado, debido a que dentro de las primeras 40 h de cultivo el aumento en densidad óptica es prácticamente nulo. El cultivo se detuvo a las 60 h aunque, de acuerdo a la figura 22-B, la pendiente de crecimiento no llega a una etapa estacionaria. De Lucena *et al.*, (2010) reportan cinéticas con un buffer de pH 5.75 en matraz a 200 rpm y 30 °C con medio mineral, en donde la fase de crecimiento prestacionaria se prolonga hasta las 150 h de cultivo. La respuesta al estrés ácido envuelve la expresión diferencial de conjuntos completos de genes asociados con diversas funciones celulares, estas reacciones siguen un particular orden en el tiempo (Hellweg *et al.*, 2009). En este sentido se considera que la baja viabilidad se debe a una lenta adaptación del microorganismo en esta condición de pH.

El pH tuvo una caída de hasta 0.25 unidades en la misma hora en que disminuyó la concentración de oxígeno disuelto.

El oxígeno disuelto se controló durante las primeras 40 h al 35% (figura 22-D). Posteriormente se suprimió el control y se aireó con un flujo de 0.1 vvm. Lo anterior originó que la concentración de oxígeno disuelto aumentara hasta el 80%. Sin embargo, la pendiente de la densidad óptica en función del tiempo de cultivo no muestra cambio aparente.

g. Cinética de crecimiento de *S. meliloti* en biorreactor con control de pH 6

El cultivo de *S. meliloti* con control de pH 6 alcanzó una densidad óptica máxima de 0.78 unidades de absorbancia (u.a.), a las 46 h de cultivo (Figura 23-A). La viabilidad máxima obtenida fue de 6.3×10^6 UFC/mL a las 16 h. La densidad óptica inicial fue de 0.038 u.a. El experimento se hizo por triplicado pero sólo en uno de los cultivos hubo crecimiento. La fase lag tuvo una duración aproximada de casi 20 h. Es evidente que el crecimiento de *S. meliloti* se ve afectado a esta condición de pH.

La densidad óptica durante el cultivo presenta cambios significativos a partir de las primeras 20 h. Sin embargo, aunque existe un aumento en densidad óptica, este parámetro no está relacionado con el aumento de la cuenta celular y sí con la formación de exopolisacáridos (EPS) que inician su producción después de las 20 h. Alcanzando su máxima producción a las 40 h con una generación de $0.33 \text{ mg}_{\text{EPS}}/\text{mL}_{\text{cultivo}}$.

Los EPS I o succinoglicano son un grupo de heteropolisacáridos que puede ser secretado en dos fracciones, se reconocen los de alto y bajo peso molecular (Skorupska *et al.*, 2006). Su biosíntesis es sobreexpresada como respuesta a las condiciones ácidas. En este sentido, se sugiere que la célula trata de emplear un mecanismo de ahorro de energía (Hellweg *et al.*, 2009). Por esta razón, consideramos que la viabilidad no fue favorecida en el cultivo a control de pH 6, ya que la bacteria no posee los mecanismos para reproducirse en esta condición. Sin embargo, si existió la producción de EPS, lo que nos sugiere que efectivamente en condiciones de estrés ácido

S. meliloti tiende a producir estos polímeros, posiblemente como mecanismo de respuesta para la adaptación a su ambiente. Además, el inóculo fue crecido en condiciones de pH neutro, esta razón pudo sumar a que se presentara una fase lag extensa.

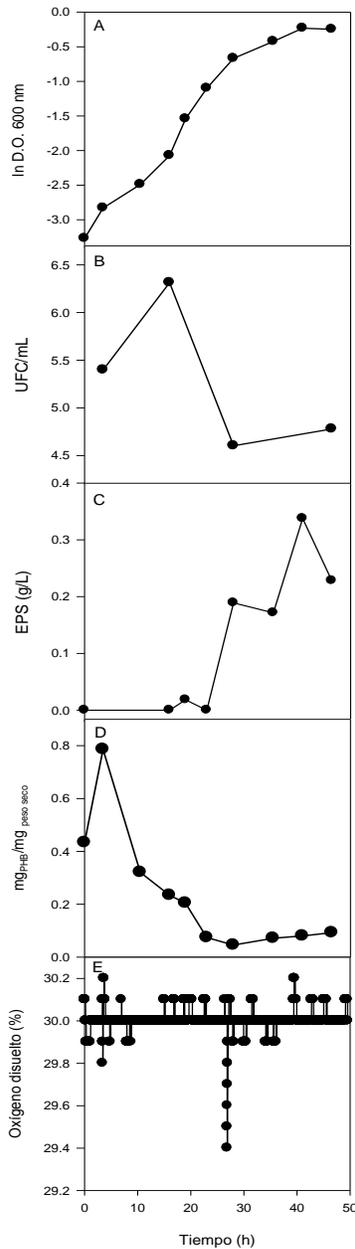


Figura 23. Resultados cinéticos del cultivo de *S. meliloti* en biorreactor de 1 L con control de pH 6, 30°C, medio YEM y oxígeno disuelto al 30% a) Gráfico semilogarítmico del crecimiento seguido por densidad óptica. b) Viabilidad en unidades formadoras de colonia por mililitro c) Producción de exopolisacáridos (EPS) d) Producción de polihidroxibutirato (PHB) e) Control de oxígeno disuelto.

Cunningha & Munns (1984) sugieren que los rizobios aislados de leguminosas donde las condiciones de suelo son ácidas producen significativamente más EPS que aquellas cepas sensibles a la acidez. Estos han demostrado ser un factor que le brinda tolerancia a *S. meliloti* ante condiciones de estrés ácido en su ambiente (Cunningha *et al.*, 1984). Lo que sugiere por un lado, si reconocemos que nuestra cepa es capaz de producir este polímero en condiciones de pH 6, cabe la posibilidad de que pueda generarlos para adaptarse a su ambiente ácido en el campo. Sin embargo, en el ensayo la cuenta celular es altamente afectada. Por lo tanto, esta condición de acidez no es viable para poder llevar a cabo el cultivo sumergido de *S. meliloti*, ya que afecta a uno de los principales criterios en la producción de biofertilizantes que es alcanzar un alto número de cuentas celulares (Lupway *et al.*, 2000, Stephens & Rask 2000).

La producción de PHB no fue favorecida con el control de pH 6. La Figura 23-D muestra, cómo en las primeras horas de cultivo la relación $w_{PHB}/w_{Biomasa}$ fue mayor y decreció a medida que transcurrió el tiempo. Probablemente esto se deba a que el reactor se inoculó de un cultivo tomado al inicio de la fase estacionaria, que fue crecido en las mismas condiciones en que se presentó el ensayo para matraces de 500 mL (Figura 20-C) por lo cual la relación $w_{PHB}/w_{Biomasa}$ fue alta en un inicio y decreció en el tiempo.

Respecto al oxígeno disuelto es apreciable solo una ligera caída de su concentración durante el cultivo alrededor de las 25 h. Esto coincidió con el inicio de la producción de EPS.

h. Cinética de crecimiento de *S. meliloti* en biorreactor sin control de pH

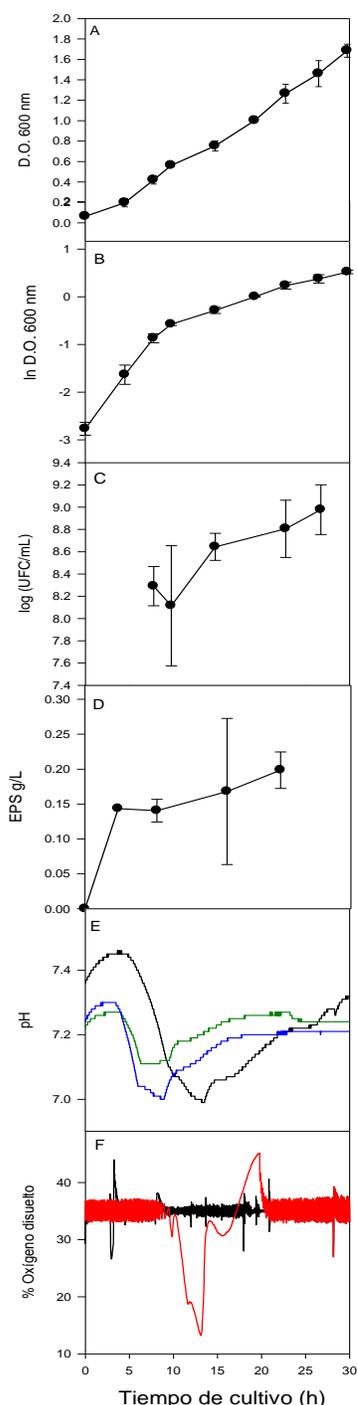


Figura 24. Resultados cinéticos del cultivo de *S. meliloti* en biorreactor de 1 L sin control de pH, 30°C, medio YEM y control de oxígeno disuelto al 35% a) Crecimiento seguido por densidad óptica b) Crecimiento seguido por densidad óptica (escala semilogarítmica) c) Viabilidad en unidades formadoras de colonia por mililitro (escala semilogarítmica) d) Producción de exopolisacáridos (EPS) e) Seguimiento de pH en el cultivo f) Control de oxígeno disuelto.

El cultivo de *S. meliloti* sin control de pH alcanzó una densidad óptica máxima de 1.68 ± 0.06 unidades de absorbancia (u.a.). La cuenta celular obtenida fue de $9.13 \times 10^9 \pm 0.16$ UFC/mL a las 26 h. La densidad óptica inicial fue de 0.063 ± 0.008 u.a. El experimento se hizo por triplicado. En ninguno de los cultivos se controló el pH, su valor inicial dependió del medio y fue de 7.29 ± 0.06 .

El crecimiento del microorganismo arrancó en fase exponencial. Esto debido a que el inóculo fue crecido en las mismas condiciones de pH, temperatura y nutrientes comparadas con el cultivo. La fase de crecimiento exponencial tuvo una duración de 10h (Figura 24-B). Posteriormente se observó una etapa prestacionaria que se extendió hasta las 30 h (Figura 24 B).

En las primeras 15 h de cultivo ocurrieron eventos relevantes en el metabolismo de *S. meliloiti*. Se presentó la mayor generación de EPS (Figura 24-D). El medio acidificó de 0.2 a 0.4 unidades de pH (Figura 24-E). Hubo perturbaciones del control de oxígeno disuelto, por lo que se sugiere que es en esta etapa cuando el sistema requiere las mayores cantidades de oxígeno para el crecimiento de la bacteria. Posteriormente durante el cambio de la pendiente en la curva de crecimiento, el pH recuperó sus valores iniciales y el control fue eficiente al 35% de oxígeno disuelto (O.D.).

En este cultivo no fue evaluada la concentración de PHB puesto que aún no se adecuaba la técnica analítica de Law & Slepecky (1960) cuando fue realizado.

i. Cinética de crecimiento de *S. meliloti* en biorreactor con control de pH 8

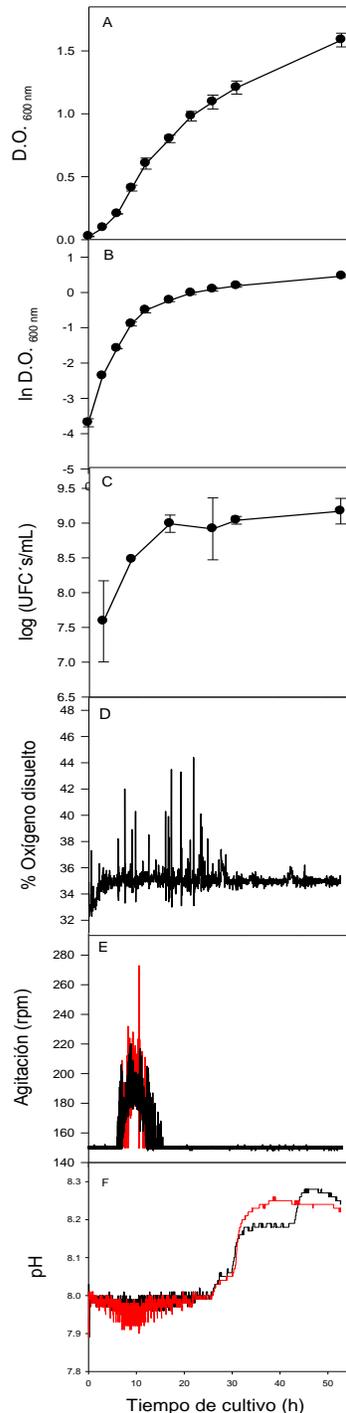


Figura 25. Resultados cinéticos del cultivo de *S. meliloti* en biorreactor de 1 L con control de pH 8, 30°C, medio YEM y control de oxígeno disuelto al 35% a) Crecimiento seguido por densidad óptica b) Crecimiento seguido por densidad óptica (escala semilogarítmica) c) Viabilidad en unidades formadoras de colonia por mililitro (escala semilogarítmica) d) Control de oxígeno disuelto e) Control de la agitación f) Control del pH.

La figura 25 muestra los resultados del cultivo de *S. meliloti* con control de pH 8.0 ± 0.3 . Este control se llevó a cabo con el suministro de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 0.5 N. Se alcanzaron cuentas celulares de hasta $1.55 \times 10^9 \pm 0.45$ UFC/mL. La densidad óptica máxima obtenida fue 1.58 ± 0.05 unidades de absorbancia (u.a.) a las 53 h de cultivo. El ensayo se llevó a cabo por duplicado. El cultivo presentó un comportamiento semejante al llevado a cabo sin control de pH. Arrancó en fase exponencial y hubo un cambio de pendiente alrededor de las 10 h, que representó su entrada a la fase estacionaria (Figura 25-B).

Después de las 20 h de cultivo no se observaron aumentos significativos de la cuenta celular. Sin embargo, sí hubo un aumento de la densidad óptica hasta las 53 h. En este período no se observó un decaimiento de la viabilidad (Figura 25-C). La cuenta celular en el cultivo cumple con lo reportado por Lupway *et al.*, (2000) y Stephens & Rask (2000), quienes proponen que la formulación debe tener cuentas de 5×10^7 a 1×10^9 UFC/mL para que pueda ser utilizada como biofertilizante.

Durante las primeras horas el cultivo tendió a acidificar. Sin embargo, la respuesta del control fue inmediata y agregó base para contrarrestar tal efecto. Mientras que en la fase estacionaria presentó una ligera basificación de 0.3 unidades de pH que se conservó hasta que el cultivo finalizó.

El control de oxígeno disuelto (O.D.) fue inestable durante las primeras 20 h (Figura 25-D). Posteriormente el equipo controló al 35 % O.D. En cuanto a la agitación, fue alrededor de las 10 h, en plena fase exponencial, cuando el equipo tuvo que incrementar las rpm para conservar la concentración de oxígeno en el cultivo (recordar que el control de O.D., se realizó por medio de un control en cascada por agitación y mezcla de gases).

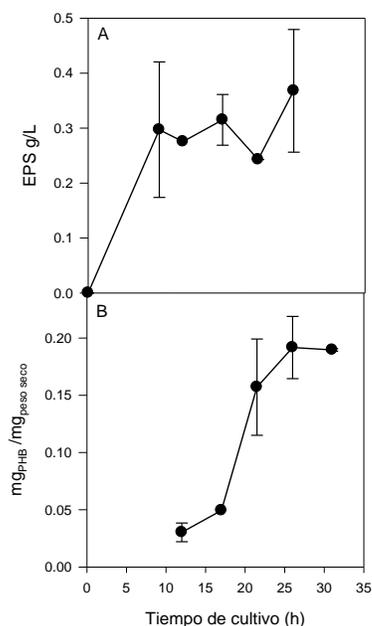


Figura 26. Resultados cinéticos de la producción de EPS y PHB en cultivo de *S. meliloti* en biorreactor de 1 L con control de pH 8, 30°C, medio YEM y control de oxígeno disuelto al 35% a) Producción de exopolisacáridos (EPS) por gravimetría b) Producción de polihidroxibutirato (PHB) por método de Law & Slepecky (1960) modificado.

La producción de EPS ocurrió en las primeras 10 h de cultivo, cuando este se encontró en plena etapa exponencial. Hacia la etapa estacionaria no se observó generación significativa de EPS. En este sentido, se sugiere que su generación está asociada al curso de las reacciones anabólicas o catabólicas que tienen lugar en la fase de crecimiento exponencial del crecimiento de *S. meliloti*.

La generación de PHB comenzó cuando el cultivo entró a fase estacionaria (Figura 26-B). Su generación es semejante al de una curva de crecimiento bacteriano. Tombolini & Nuti (1989) encontraron que la acumulación de PHB se incrementa tardíamente en la fase exponencial y decrece en la fase estacionaria de crecimiento en un cultivo sumergido de la cepa de *S. meliloti* Rm14 con medio YMB (K_2HPO_4 , 0.5; $MgSO_4 \cdot H_2O$, 0.2; NaCl, 0.1; manitol 10; extracto de levadura, 0.4; g/L, pH 6.8) llevado a cabo en un fermentador de 1.5 L, pH 6.8, 30°C, 500 rpm, manteniendo el oxígeno al 90% durante las primeras 30 h y posteriormente controlándolo a 50% de oxígeno disuelto (O.D.).

Tombolini & Nuti (1989) reportan que la máxima concentración PHB alcanzada fue del 50% ($w_{PHB}/w_{Biomasa}$) a las 90 h de cultivo. Sin embargo, cuando controlaron al 30% durante 150 h alcanzaron una acumulación de PHB del 55% ($w_{PHB}/w_{Biomasa}$). Existen similitudes con este ensayo, donde la generación de PHB fue también en la etapa tardía exponencial, pero la máxima producción sólo alcanzó el 20% ($w_{PHB}/w_{Biomasa}$) hasta las 30 h de cultivo, la pendiente de la curva de generación de PHB se mantiene constante después de las 25 h (Figura 26), lo cual sugiere que es la máxima cantidad de PHB acumulada por el cultivo en las condiciones descritas. Tombolini & Nuti (1989) también señalan que no existe mucho conocimiento acerca de la cantidad de PHB acumulado por diferentes especies de rizobios. De ahí la importancia de caracterizar la producción de PHB por la cepa de *S. meliloti* M7B46. Se sugiere que el cultivo necesita un suministro eficiente de oxígeno durante el crecimiento exponencial, para permitir el aumento de la cuenta celular y la consiguiente producción de EPS. Sin embargo, la producción de PHB no requiere de la misma cantidad de oxígeno, puesto que es en la fase estacionaria donde se produce y en esta etapa no se reconocieron inestabilidades en el control de O.D. (Figura 25-D). Esto va en acuerdo con lo reportado por Anderson & Dawes (1990), quienes señalan que la generación de PHB en algunas bacterias se presenta cuando existe limitación de nutrientes tales como nitrógeno, fósforo y oxígeno, que limitan el crecimiento celular pero favorecen la generación de PHB. Además, Tombolini & Nuti (1989) señalan que la síntesis de PHB mejora cuando el suministro de oxígeno es deficiente.

j. Cinética de crecimiento de *S. meliloti* en biorreactor con control de pH 9

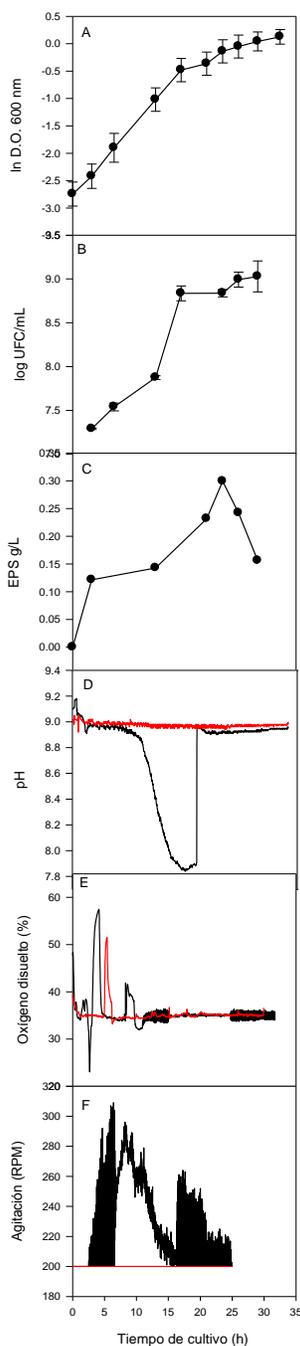


Figura 27. Resultados cinéticos del cultivo de *S. meliloti* en biorreactor de 1 L con control de pH 9, 30°C, medio YEM y control de oxígeno disuelto al 35% a) Crecimiento seguido por densidad óptica (escala semilogarítmica) b) Viabilidad en unidades formadoras de colonia por mililitro (escala semilogarítmica) c) Producción de exopolisacáridos (EPS) experimento único d) Control de pH e) Control de oxígeno disuelto f) Control de la agitación.

El cultivo de *S. meliloti* con control de pH 9 (Figura 27) alcanzó una densidad óptica de 1.13 ± 0.15 unidades de absorbancia (u.a.). A las 32 h, la cuenta celular máxima alcanzada fue de $1.25 \times 10^9 \pm 0.9$ UFC/mL, con una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.13 h^{-1} . Aunque esta última fue menor comparándola con los cultivos sin control de pH ($\mu=0.18 \text{ h}^{-1}$) y pH 8 ($\mu=0.26 \text{ h}^{-1}$). Fue alrededor de las 20 h donde el cultivo entró en fase estacionaria, como lo demuestra la curva de densidades ópticas o la de viabilidad. Posterior a la entrada en fase estacionaria y hasta las 30 h, el cultivo no presentó aumentos significativos de la cuenta celular. La generación de EPS (experimento único) alcanzó su máxima producción alrededor de las 23 h de cultivo y durante la fase estacionaria disminuyó su cantidad.

El experimento se realizó por duplicado, sin embargo en unos de los sistemas el control de pH fue ineficiente. Esto porque el sistema permitió la acidificación del medio hasta un pH de 7.8. El segundo controlador mantuvo el pH 9 a lo largo de todo el cultivo (Figura 27-D). La acidificación del medio ocurrió en plena etapa exponencial, anterior y posterior a ella el control de ambos sistemas fue pH 9. Al hacer una comparación entre la cuenta celular de ambos sistemas, se observó que la caída del pH no representó una variación en la viabilidad del cultivo (Figura 27-B).

El control de oxígeno disuelto presenta perturbaciones del sistema en las primeras 10 h de cultivo, posteriormente se mantiene al 35%. La agitación en el sistema aumentó las rpm en las primeras 15 h para compensar el oxígeno disuelto consumido por el microorganismo durante la etapa exponencial.

En este cultivo no fue evaluada la concentración de PHB puesto que aún no se adecuaba la técnica analítica de Law & Slepecky (1960) cuando fue realizado.

k. Cinética de crecimiento de *S. meliloti* cepas A, B, D en bioreactores de 10 L

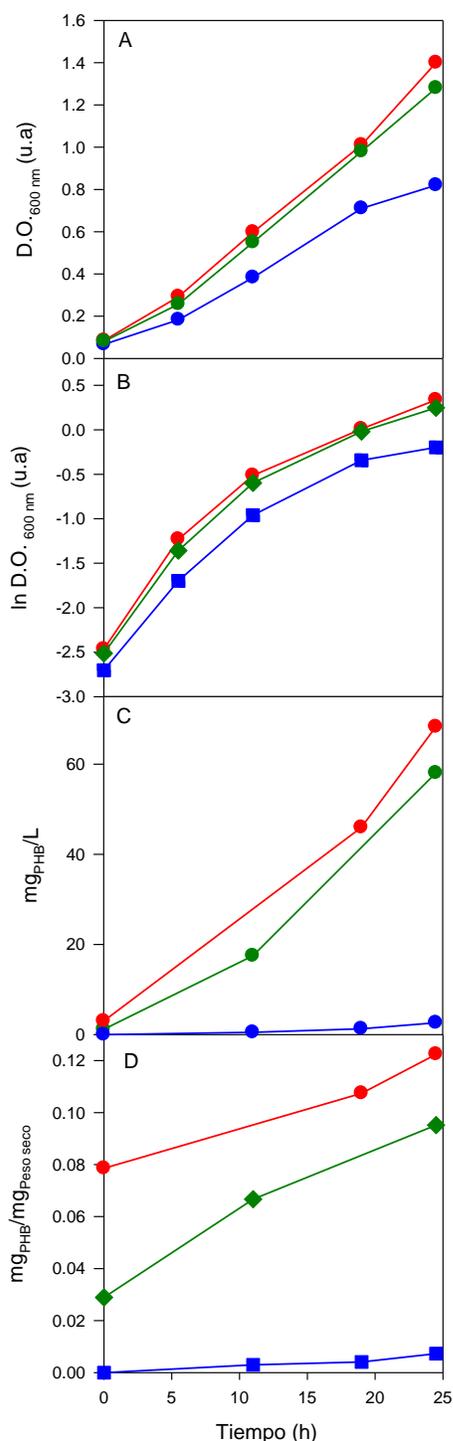


Figura 28. Resultados cinéticos del cultivo de *S. meliloti* en bioreactor de 10 L para las cepas A (♦) B (■), D (•), 30 °C, sin control de pH ni de oxígeno disuelto a) Crecimiento seguido por densidad óptica b) Crecimiento seguido por densidad óptica (escala semilogarítmica) c) Producción de PHB por volumen de cultivo d) Producción de PHB por peso seco de cultivo.

En el ensayo en biorreactor de 10 L para las cepas de *S. meliloti* A, B y D, se obtuvieron velocidades específicas de crecimiento de 0.17, 0.15 y 0.17 h⁻¹ respectivamente (Figura 28). Se partió de un inóculo de cada cepa crecido en matraz Fern-bach de 3 L, con 1 L de volumen de llenado en medio YEM, sin control de pH a 30°C y 200 rpm. La densidad óptica inicial de cada cultivo en biorreactor fue de 0.085 (cepa A), 0.067 (cepa B), 0.081 (cepa D) unidades de absorbancia (u.a.).

Las mayores densidades ópticas alcanzadas fueron para las cepas A y D, mientras que la cepa B alcanzó una densidad óptica de 0.82 u.a. El tiempo de cultivo fue de 25 h. Estos ensayos se realizaron una sola vez.

La cepa D es la que produce mayores cantidades del polímero PHB hasta un 15% más a las 25 h en comparación con la cepa A. Mientras que la cepa B prácticamente no lo produce. La cantidad de nitrógeno necesario para un control de oxígeno disuelto por mezcla de gases, encarece el proceso de producción en reactores con este volumen de trabajo. Por esta razón, el cultivo se llevó a cabo sin control de oxígeno disuelto. Sin embargo, la generación de PHB fue menor si la comparamos con la cantidad del polímero obtenida en el cultivo en biorreactor de 1 L a control de pH 8, donde hubo una producción de hasta el 20% en peso en tiempos y densidades ópticas de cultivo similares (Figura 26).

Este ensayo sugiere que el cultivo sumergido requiere de un control de oxígeno disuelto en condiciones microaerobias para que se produzcan mayores cantidades de PHB. Una estrategia para maximizar los rendimientos, sería bajar la concentración de oxígeno disuelto hacia el final de la fase exponencial que es donde se está llevando cabo su producción (Figura 28).

I. Velocidad específica de crecimiento de *S. meliloti* en función de la condición de pH en cultivo sumergido en biorreactor

Cada microorganismo tiene un rango de pH dentro del cual es posible su crecimiento y normalmente posee un pH óptimo bien definido (Madigan *et al.*, 2009). En la figura 29 se observa que la velocidad específica de crecimiento depende de la condición de pH donde se crezca a *S. meliloti* en cultivo sumergido con medio YEM. El pH interno de *S. meliloti* según lo reportado por algunos autores está entre las 7.6 a 8 unidades de pH (Graham, 1991). Por esta razón, se propone que hubo mayores velocidades de crecimiento en el pH sin control y ligeramente alcalino (pH 8). Debido a que el pH extracelular fue muy próximo al intracelular. *S. meliloti* es sensible a condiciones ácidas (Hellweg *et al.*, 2009), lo cual es evidente tanto en la velocidad de crecimiento (Figura 29) así como en los resultados de la cuenta celular (Tabla 5).

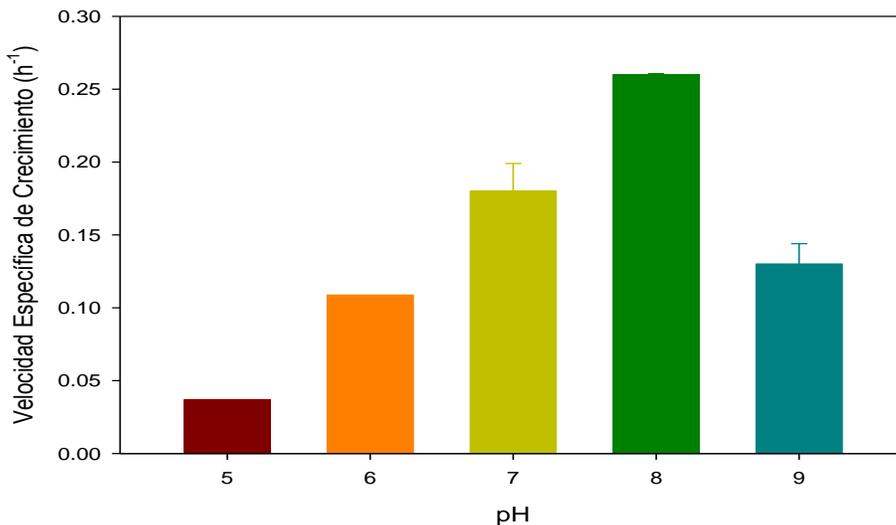


Figura 29. Velocidades específicas de crecimiento en función del pH para el cultivo sumergido de *S. meliloti* en biorreactor de tanque agitado (1 L), con medio de cultivo YEM.

Tabla 5. Resumen de resultados del cultivo sumergido de *S. meliloti* en biorreactor de tanque agitado (1L) con medio de cultivo YEM.

pH	Densidad óptica (u.a.)	Cuenta celular (UFC/mL)	Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)	Exopolisacáridos (g/L)
5	0.55	4.20E+06	0.03	-
6	0.78	2.00E+06	0.108	0.33
Sin control	1.68 ± 0.06	1.35E+09 (±0.4)	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.02
8	1.2 ± 0.05	1.1E +09 (±0.1)	0.26	0.36 ± 0.1
9	1.13 ± 0.15	1.25E+09 (± 0.9)	0.13 ± 0.01	0.15

La nodulación efectiva de leguminosas con formulaciones de microorganismos es función de múltiples factores bióticos y abióticos en el ambiente (Toro, 1996). Existen diferentes condiciones en el suelo que pueden resultar desfavorables para el rizobio. Sin embargo, una de las más importantes es el pH (Lupway *et al.*, 2000). Existen factores que sugieren que una adaptación del rizobio al ambiente puede llegar a incrementar su competitividad en campo, de ahí el sentido de caracterizar nuestra formulación respecto a variables como la viabilidad celular, la generación de polímeros intra y extra celulares, tales como el poli- β -hidroxibutirato (PHB) y los exopolisacáridos (EPS). En el caso del PHB, Anderson & Dawes, 1990 proponen que puede servir como almacén de energía cuando el sustrato es limitado, de este modo una mayor generación del polímero probablemente reditúe en una mayor vida de anaquel del producto, además de mejorar la eficiencia en la nodulación, por la protección que brinda a la enzima nitrogenasa cuando se encuentra en ambientes oxidantes. Jones (2012) sugiere que el nivel de producción de EPS es uno de los factores envueltos en la eficiencia de la nodulación bacteria-leguminosa. Durante el ensayo se encontró que con un control del cultivo a pH 8, *S. meliloti* generó mayor cantidad de EPS comparado con el resto de las condiciones de pH.

En la producción de un biofertilizante es relevante considerar la pureza del cultivo. Se encontró que la cepa de *S. meliloti* M7B46 crece en placa con medio PY en las primeras 72 h de incubación, formando colonias circulares, convexas, con dimensiones de 2-4 mm de diámetro. Su morfología es de bacilos cortos Gram negativos que no crecen en medio Luria Bertani (LB).

Respecto a la viabilidad celular encontramos que nuestra cepa es altamente sensible a las condiciones ácidas de cultivo con control de pH 5 y 6, puesto que la cuenta celular alcanzada no fue más allá de 10^6 UFC/mL. Mientras que las condiciones neutras y alcalinas sí favorecieron su crecimiento alcanzando cuentas de hasta 10^9 UFC/mL. Otro parámetro observado fue la velocidad específica de crecimiento (μ) que tuvo una alta dependencia respecto de la condición de pH. A pesar de que el cultivo a pH 9 llegó a una alta densidad celular (10^9 UFC/mL), la μ decreció un 50% comparada con la condición de pH 8 cuya μ fue de 0.26 h^{-1} . La viabilidad del cultivo en biorreactor superó a la alcanzada en matraz a las mismas condiciones de pH, en el primero se alcanzó una cuenta de hasta 1.35×10^9 UFC/mL, mientras que en el segundo se alcanzó una de hasta 9×10^8 UFC/mL. Sin embargo, la cuenta celular más alta se alcanzó en el cultivo en biorreactor con control de pH 8 que fue de 1.55×10^9 UFC/mL.

La generación de EPS en la condición de acidez a pH 6 se presentó después de las 20 h de cultivo, en este caso la densidad óptica fue aumentó por la generación de estos polímeros y no por un aumento de la cuenta celular, que por otro lado disminuyó. La cantidad máxima generada de EPS fue de hasta 0.3 g/L en el control a pH 6, una producción similar a la encontrada con la condición de pH 8 cuya máxima fue de $0.36 \text{ g/L} \pm 0.11$. La mayor producción de los EPS se presenta en la etapa de crecimiento exponencial, donde la exigencia de oxígeno en el sistema es mayor (Figuras 23-F; 24-D; 25-D) acompañado de una acidificación del medio (Figuras 23-E; 25-D). Por ello proponemos que la acidificación del medio está relacionada con la producción de EPS,

puesto que se ha identificado que estos polímeros son de naturaleza ácida (Jones, 2012). Pasada la etapa exponencial no hubo generación importante de los mismos.

En cuanto a la producción de PHB, se observó que su generación se presenta en la fase tardía exponencial (Figuras 19-C; 25-A). Su comportamiento es semejante a una curva de crecimiento bacteriano. En la condición de pH 6 no hubo producción del mismo. En el cultivo con control a pH 8 *S. meliloti* produjo hasta 20% $W_{PHB}/W_{Peso\ seco}$ controlando el oxígeno disuelto al 35%. Mientras que en matraz se generó hasta casi el 25% $W_{PHB}/W_{Peso\ seco}$. Sin embargo, en el cultivo en biorreactor de 10L, sin control de oxígeno disuelto la producción obtenida fue alrededor del 9% $W_{PHB}/W_{Peso\ seco}$. En este sentido, se observó que a medida que se incrementó el volumen de cultivo se generó menor cantidad de este polímero en las células a las condiciones descritas. Sugerimos que este efecto está determinado por el suministro de oxígeno en cada sistema.

XII. CONCLUSIONES

1. El coeficiente de transferencia de oxígeno (K_{La}) cumple una relación proporcional respecto de la agitación aplicada en el sistema. Sin embargo, altos flujos de aireación no promueven mayores valores de K_{La} .
2. Las condiciones ácidas (pH 5 y 6) no son favorables para el crecimiento en cultivo sumergido de *S. meliloti*. Sólo se alcanzaron cuentas celulares de 10^6 UFC/mL, mientras que en el caso de las condiciones neutras y alcalinas se obtuvieron cuentas del orden de 10^9 UFC/mL. Además, la velocidad específica de crecimiento se ve altamente afectada en las condiciones ácidas, a pH 6 disminuyó un 60%, mientras que a pH 5 disminuyó 89% comparado con la condición óptima a pH 8 cuya velocidad de crecimiento fue de 0.26 h^{-1} .
3. La producción de exopolisacáridos (EPS) está asociada con el crecimiento del microorganismo, su mayor generación se presentó durante la fase exponencial. Se propone que la acidificación que se presentó en el cultivo sumergido de *S. meliloti* durante la etapa exponencial de crecimiento se debe a la generación de EPS en el sistema. La condición a pH 8 permitió obtener los más altos rendimientos de EPS.
4. El poli- β -hidroxibutirato es un producto que se genera en el cultivo sumergido de *S. meliloti* durante la fase de crecimiento tardía exponencial. Su producción más alta se observó con el ensayo a control de pH 8 representando hasta el 20% del peso celular.
5. El método de Law & Slepecky (1960) modificado permite cuantificar con precisión la cantidad de poli- β -hidroxibutirato en el cultivo de *S. meliloti*. Dicha modificación consiste en aumentar a condiciones más drásticas la reacción de degradación de este polímero.

XIII. PERSPECTIVAS

1. Cuantificar el consumo de sustrato en cultivos de *S. meliloti* por medio de métodos enzimáticos y/o HPLC.
2. Valorar la viabilidad y el consumo de PHB de muestras almacenadas a temperatura ambiente en función del tiempo.
3. Estudiar el motivo por el cual el cultivo entra a fase estacionaria (limitación por nutrientes o por densidad celular).
4. Generar células con altos contenidos de PHB por medio de estrategias de limitación de oxígeno y evaluar sus efectos en campo y vida de anaquel.
5. Mantener la cantidad de PHB generado en las células a lo largo del proceso de escalamiento.
6. Ensayar estrategias de cultivo que permitan superar las cuentas celulares de 10^9 .

XIV. BIBLIOGRAFÍA

Aguirre Medina , J., Irizar Garza, Durán Pedro, A., Grageda Cabrera, O., Peña del Río, M., Loredó Ostil, y otros. (2009). Los Biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México , 65: 86.

Anderson A.J., and Dawes E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalcanoates. *Microbiological Reviews*. 54(4): 450-472.

Alegret S., Del Valle M., Merkoci A. (2004) Sensores electroquímicos. En: *Materials*. Barcelona: Servei de Publicacions, 60-61.

Becker A., Rüberg S., Baumgarth B., Bertram-Drogatz P.A., Quester I., Pühler A. (2002) Regulation of succinoglycan and galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4(3): 187-190.

Becker A., Rüberg, S., Küster H., Roxlau A.A., Keller M., Ivashina T., Cheng H.P., Walker G.C. & Pühler, A. (1997) The 32-kilobase exp gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. *J. Bacteriol.* 179: 1375-1384.

Bergersen F.J. & Turner G.L. (1990) Bacteroids from soybean root nodules: respiration and N₂ fixation in flow-chamber reactions with oxyleghaemoglobin. *Proc. R. Soc. Lond.* 238: 295-320.

Bernal, G., & Graham , P. (2011) La diversidad del *Rhizobium* asociado con *Phaseolus vulgaris* en Ecuador y comparaciones con el *Rhizobium* de México. VIII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo, (13 p). Ecuador.

Bohlool B. B., Ladha J. K., Garrity D. P., George T. (1992) Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. *Plant Soil.* 141: 1-11.

Breedveld M.W., Zevenhuizen L.P., Zehnder J.B. (1990) Osmotically induced oligo and polysaccharide synthesis by *Rhizobium meliloti* SU-47. *J. Gen. Microbiol.* 136: 2511-2519.

Brewin N.J. (2004) Plant cell Wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Sci.* 23(4): 293-316.

Brockwell J. & Bottomley P.J. (1995) Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biol. Biochem.* 27: 683-697.

Brockwell J., Pilka A., Holliday R.A. (1991) Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils in central New South Wales. *Austral. J. Experim. Agriculture* 31: 211-19.

Caballero-Mellado, J. & Martínez Romero E. (1999) Soil fertilization limits the genety diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis* 26: 111-121.

Chenu, C., and Roberson, E. B. (1996). Diffusion of glucose in microbial extracellular polysaccharide as affected by water potential. *Soil Biol. Biochem.* 28 (7): 877-884.

Cleveland C. C., Townsend A. R., Schimel D. S., Fisher H., Howarth R. W., Hedin L. O., Perakis S. S., Latty E. F., Von Fischer J. C., Elseroad A. and Wasson M. F. (1999) Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochem. Cy.* 13(2): 623–645.

Corzo J., León-Barrios M., Hernando-Rico V., Gutiérrez-Navarro A.M. (1994) Precipitation of metallic cations by the acidic exopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium* (*Chamaecytisus*) Strain BGA-1. *Appl. and Environm. Microbiol.* 60(12): 4531-4536.

Costerton J. W., Irvin, R.T. & Cheng, K.J. (1981) The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 35: 299-324.

Creus S. A. (2005) *Instrumentación Industrial*. 7ª ed. Marcombo. Barcelona, España. 750 pp.

Crison (2005) Catálogo Aguas-Industria. Disponible en: http://www.crison.it/pdfs/indu/03/crison_3_3.pdf, (10 de enero de 2013).

Cunningha, S.D., & D.N. Munns (1984) The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in *Rhizobium*. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 48:1273-1276.

De Los Ángeles & Pérez A. (2004) *Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general*. Serie Publicaciones CBS UAM Iztapalapa México D.F. 116pp.

de Lucena K.C., Pühler A., Weidner S. (2010) The role of sigma factor RpoH1 in the pH stress response of *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Microbiology* 10: 265.

Dubois Michel, Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith Fred (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28 (3): 350–356.

Dunn M.F. (1998) Tricarboxylic acid cycle and anaplerotic enzymes in rhizobia. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 105-123.

Dusha I., Oláh B., Szegletes, Erdei L., Kondorosi A. (1999) syrM is involved in the determination of the amount and ratio of the two forms of the acidic exopolysaccharide EPS I in *Rhizobium meliloti*. *The Am. Phytopathol. Soc.* 12(9): 755-756.

Encarnación S., Dunn M., Willms K., Mora J. (1995) Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 177(1): 3058.

Erismann J.W., Sutton M.A., Galloway J., Klimont Z., Winiwarter W. (2008) How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nature Geosci.* 1: 636-639.

FAO e IFA (2002). Los fertilizantes y su uso. 4^a ed. Roma. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/agl/agll/docs/fertuso.pdf>, (24 de octubre de 2013).

Fassbender H.W. & Bornemisza E. (1994) Química de los suelos con énfasis en los suelos de América Latina, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura Eds., San José, 420.

Fuentes R. & Caballero M. (2005) Bacterial biofertilizers. En: PGRP: Biocontrol and Biofertilization. Springer, Dordrecht, The Netherlands 143-172.

Graham P.H. (1991) Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. Can. J. Microbiology 38: 475-484.

Hartmann A., Rothballer M., Schmid M. (2008) Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. Plant and soil 312: 7-14.

Hellweg C., Pühler A. & Weidner E. (2009) The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. BMC Microbiol. 9:37.

Hernández A., Alfaro I., Arrieta R. (2003) Microbiología industrial. Editorial Universidad Estatal a Distancia San José. Costa Rica. 296 pp.

Hirsch A.M., Long S.R., Bang M., Haskins N., Ausubel F.M. (1982). Structural studies of alfalfa roots infected with nodulation mutants of *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 151(1):411–419.

Howieson J.G., Robson A.D., Abbott L.K. (1992) Calcium modifies pH Effects on the Growth of Acid-tolerant and Acid-sensitive *Rhizobium meliloti*. Aust. J. Agric. Res. 43: 765-772.

Harris D.C. (2007) Análisis Químico Cuantitativo. 3^a ed. Reverté. España. 579 pp.

Jenkinson, D. (2001). The impact of humans on the nitrogen cycle, with focus on temperate arable agriculture. Plant soil, 228: 25-38.

Jensen E.S., Hauggaard-Nielsen (2003) How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment. Plant and Soil 252: 177-186.

Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E., Walker G.C. (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* Model . Nature Rev. Microbiol. 5:619-633.

Jones K.M., (2012) Increased production of the expolysaccharide succinoglycan enhances *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiosis with the host plant *Medicago Truncata*. J. Bacteriol. 196(16): 4322-4331.

Kim S.A., Copeland L. (1996) Enzymes of poly-(beta)-hydroxybutyrate metabolism in soybean and chickpea bacteroids. App. Environm. Microbiol. 62: 4186–4190.

Kremer R.J. & Peterson H.L. (1983) Effects of carrier and temperature on survival of *Rhizobium* spp. in legume inocula: development of an improved type of inoculant. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(6): 1790.

Kuykendall, D., Young, J., Martínez Romero, E., Kerr, A., Sawada, H. (2005). *Rhizobium*. En: B. D.H., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer Georgia EUA 1246 pp.

Law J.H. & Slepecky R.A. (1960) Assay of Poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* 82(1): 33.

Ledley T.S., Sundquist S.E., Schwartz, Hall D.K. (1999). Climate change and greenhouse gases. *EOS*, 80 (39): 453-461.

Lupway N.Z., Olsen P.E Sande E.S., Keyser H.H., Collins M.M., Singleton P.W., Rice W.A. (2000) Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Res.* 65: 259-270.

Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V., Clark D.P. (2009) Brock. *Biología de los microorganismos*. Pearson Educación 1296 pp.

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

Martínez A., Salvador M., Galindo E. (1992) Consumo de potencia en fermentadores de 14 litros: Implicaciones del uso de turbinas y aspersores de aire no estándar. *BioTecnología*, 2: 173-190.

Martínez Scott, M., Hernández, V., Palomo Gil, A., Vázquez Arroyo, J. (2002) Diversidad genética de *Rhizobia* asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. *Chapingo, Serie Zonas Áridas* 3(1):9-18.

Mendrygal K.P. & González J.E. (2000) Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 182(3): 599-606.

Miller K.J., Kennedy E.P., & Reinhold V.N. (1986) Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science* 231: 48-51.

Mosier A.R. (2001) Exchange of gaseous nitrogen compounds between agricultural systems and the atmosphere. *Plant Soil* 228, 17-27.

Muñoz M.V., Rojas J. (2004) *Metrología e Instrumentación. Manual de laboratorio*. Editorial de la Universidad de Costa Rica 24-25.

Murphy P.J., Wexler W., Grzemsky W., Rao J.P., and Gordon D (1995) Rhizopines-Their role in symbiosis and competition *Soil Biology & Biochem.* 27(4/5) 525-529.

Pedraza López Andrés (1999) Caracterización de un ADNc de fresa específico de frutos maduros que presenta homología con péptido de metionina sulfóxido reductasas, España. Trabajo de grado (Doctor en Ciencias Biológicas). Universidad de Córdoba.

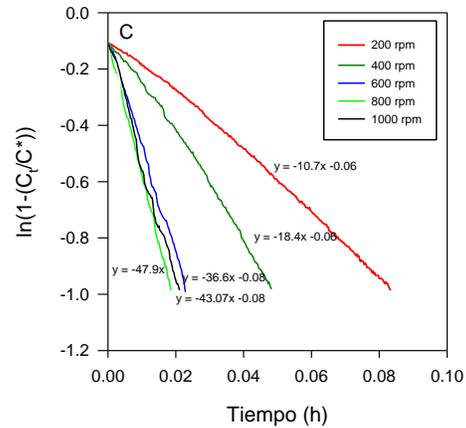
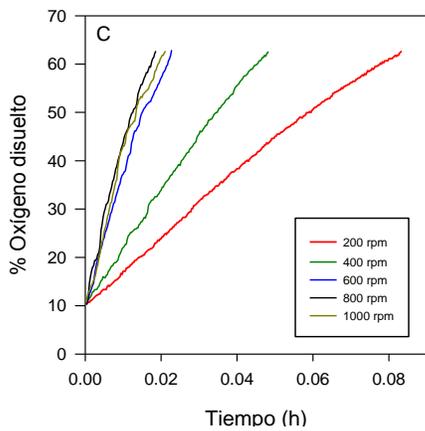
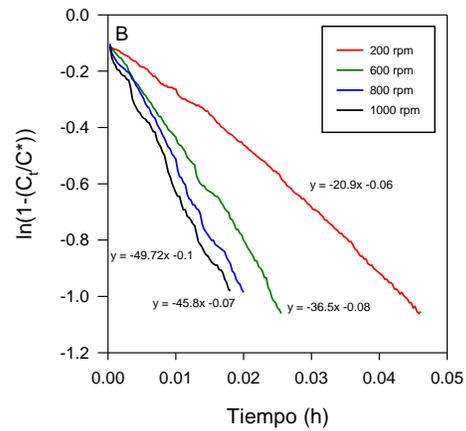
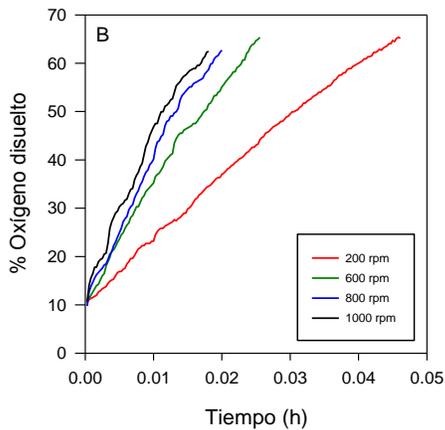
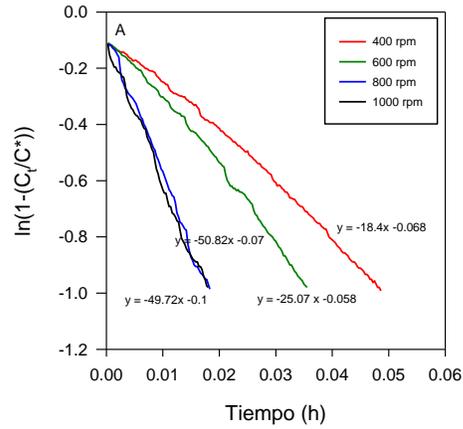
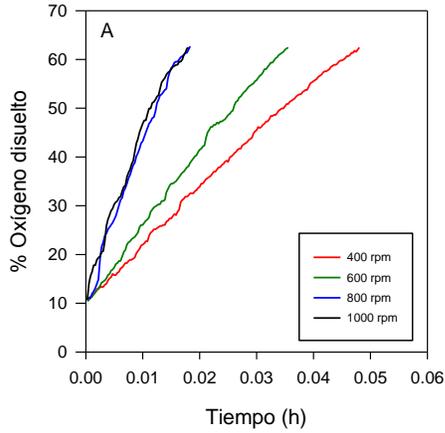
- Perret X., Staehelin C., Broughton W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(1): 180-201.
- Perry R.H. (2003) Ingeniería Bioquímica. Manual del Ingeniero Químico Vol. 4. Mc Graw Hill. Madrid España. 30-46 pp.
- Philips D.A. & Streit W.R (1997) Applying plant-microbe signaling concepts to alfalfa: roles for secondary metabolites. En: B.D. Mc Kersie D.C.W. Brown, *Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes*. CAB International, Wallingford. USA. pp. 319-342.
- Povolo S. & Casella S. (2000) A critical role for *aniA* in energy-carbon flux and symbiotic nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.* 174: 42-49.
- Quintero R. R., (1993) Ingeniería Bioquímica, Teoría y aplicaciones. Alhambra Mexicana. México. 331 pp.
- Raven J. A. (1986) Biochemical disposal of excess H⁺ in growing plants? *New Phytol.* 104: 175–206.
- Rebah F., Prévost D., Yezza A., Tyagi R. (2007) Agro-industrial waste materials and waste water sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Biores. Tech.* 98: 3535-3546.
- Reichmann L.G., Osvaldo E. S., Peters P.C. (2013) Water controls on nitrogen transformations and stocks in an arid ecosystem. *Ecosphere* 4(1): 1-17.
- Rice W.A., Penney D.C. & Nyborg M.N. (1976) Effects of soil acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa by red clover. *Can. J. Soil Sc.* 57: 197-203.
- Rico Junco Christian, (2012) Mejoramiento de las condiciones de cultivo sumergido para *Sinorhizobium meliloti* en matraces agitados, México. Trabajo de grado (Químico de alimentos). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Instituto de Investigaciones Biomédicas.
- Roberson, E. B., and Firestone, M. K. (1992). Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in soil *Pseudomonas sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (4): 1284-1291.
- Robson A.D. & Loneragan J.F. (1970) Nodulation and growth of *Medicago truncala* on acid soils. II Colonization of acid soils by *Rhizobium meliloti*. *Aust. J. Agric. Res.* 21: 435-45.
- SAGARPA, P. (2009). Diseño de estrategias de mercado, logísticas y de adecuación de productos para la integración de la alfalfa Mexicana en el comercio global de forrajes. (Disponible en: <www.sagarpa.gob.mx/.../Estudios_promercado/ALFALFA.pdf>).
- Saranya Devi, E., Vijayendra, S., & Shamala, T. (2012). Exploration of rice bran, an agro-industry residue for the production of intra-and extra-cellular polymers by *Sinorhizobium meliloti* MTCC 100. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 80-84.
- Shuler M.L. & Filkret K. (2002) *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. 2 ed. USA: Prentice Hall PTR pp 553.

- Singleton P., Keyser H., Sande E. (2002) Developmental and Evaluation of Liquid Inoculants. En: Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam. PK Editorial Services. Brisbane, Australia. pp 52-66.
- Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A. & Krol J. (2006) Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial Cell Factories* 5:7.
- Smil Vaclav (1999) Nitrogen in crop production: an account of global flows. *Global Biogeochemical Cycles*. 13(2): 647-662.
- Smith R.S. (1992) Legume inoculant formulation and application. *Can. J. Microbiol.* 38: 485-492.
- Stephens J.H. & Rask H.M. (2000) Inoculant production and formulation. *Fields Crop Res.* 65:249-258.
- Tombolini R. & Nuti M.P. (1989) Poly (β -hydroxualcanoate) biosynthesis and accumulation by different *Rhizobium* species *FEMS Microbiol. Lett* 60: 299-304.
- Toro A. (1996) Nodulation competitiveness in the Rhizobium-legume symbiosis. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 12(2) 157-162.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2007) Introducción a la microbiología. Panamericana. Madrid España. 988 pp.
- Trainer M.A. & Charles T.C. (2006) The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 377 – 386.
- Treybal R.E. (1981) Operaciones de transferencia de masa. Mc Graw Hill. México 858 pp.
- Vance C.P. & Graham P.H. (1995) Nitrogen fixation in agriculture: application and perspective. En: Spaink Herman P., Kondorosi Adam, Hooykaas Paul J. J. *The rhizobiacease* Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers pp. 530-555.
- Vance Carroll P. (1998) Legumes symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. En: Spaink Herman P., Kondorosi Adam, Hooykaas Paul J. J. *The rhizobiacease* (509-530 pp). Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Vollenweider, R.A. *et al.* 1980. Conclusions of the OECD Cooperative Programme on Eutrophication. En *UNESCO Nature and Resources* 16(3).
- Wang T., Martínez Romero J., López L.I. (2013) Rhizobium y su destacada simbiosis con las plantas. En: *Microbios en línea*. UNAM CCG. Disponible en: <<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>> (6 de julio de 2013).
- Willis L.B., Walker G.C. (1998) The *phbC* (poly-3-hydroxybutyrate synthase) gene of *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* and characterization of *phbC* mutants. *Can. J. Microbiol.* 44(6): 554–564.

Zhang H.J., Lee C.C., Leigh J.A. (1991) Induction of the second exopolysaccharide (EPSb) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. J.Bacteriol. 173(22): 7391-7394.

XV. ANEXOS

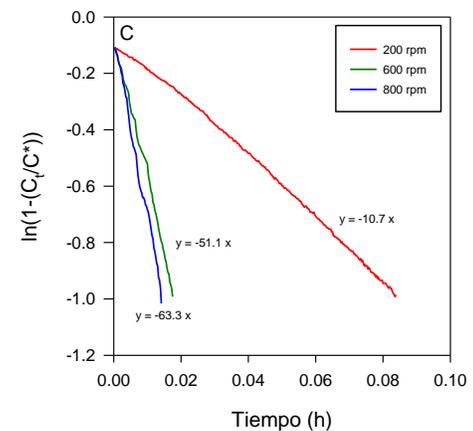
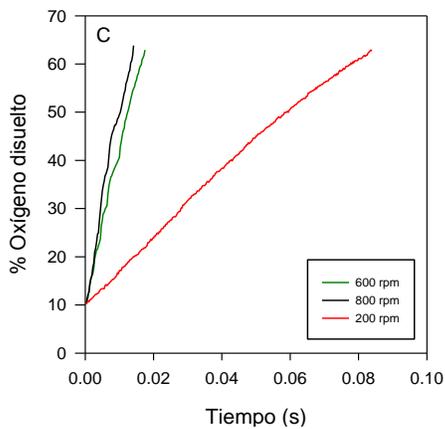
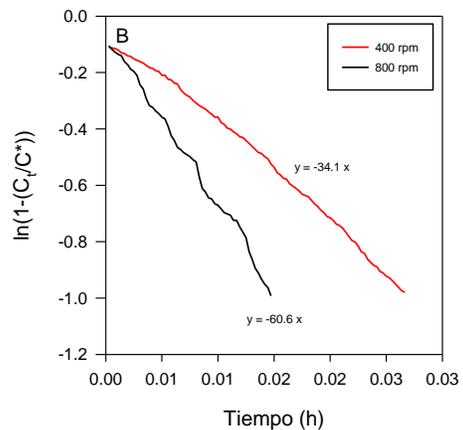
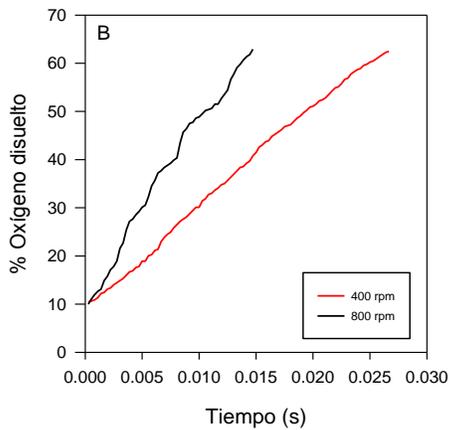
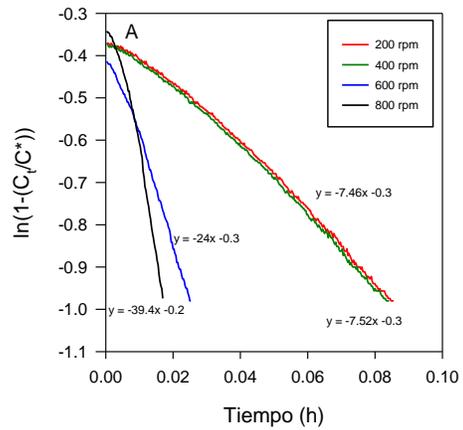
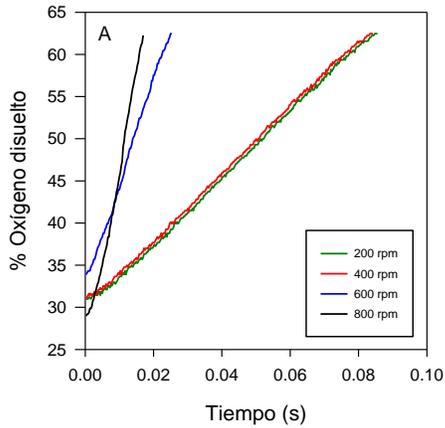
Anexo 1. Caracterización del biorreactor Applikon Biotechnology (1 L) por medio del cálculo del coeficiente de transferencia de masa ($k_L a$) para agua destilada a través de la técnica de eliminación de gases a diferentes condiciones de aireación y agitación.



Recuperación de la concentración de oxígeno disuelto, para obtener el valor de $K_L a$ por medio de la técnica de eliminación de gases en biorreactor Applikon Biotechnology con volumen de trabajo de 1 L a diferentes condiciones de aireación y agitación. a) Flujo de aire 0.3 vvm b) Flujo de aire 0.5 vvm c) Flujo de aire 1 vvm.

Cálculo de $k_L a$ en biorreactor Applikon Biotechnology con volumen de trabajo de 1 L por medio de la técnica de eliminación de gases a diferentes flujos de aireación y agitación a) Flujo de aire 0.3 vvm b) Flujo de aire 0.5 vvm c) Flujo de aire 1 vvm

Anexo 2. Caracterización del biorreactor Applikon Biotechnology (1 L) por medio del cálculo del coeficiente de transferencia de masa (k_La) para medio YEM a través de la técnica de eliminación de gases a diferentes condiciones de aireación y agitación.



Recuperación de la concentración de oxígeno disuelto, para obtener el valor de K_La por medio de la técnica de eliminación de gases en biorreactor Applikon Biotechnology con volumen de trabajo de 1 L a diferentes condiciones de aireación y agitación. a) Flujo de aire 0.3 vvm b) Flujo de aire 0.5 vvm c) Flujo de aire 1 vvm.

Cálculo de k_La en biorreactor Applikon Biotechnology con volumen de trabajo de 1 L por medio de la técnica de eliminación de gases a diferentes flujos de aireación y agitación a) Flujo de aire 0.3 vvm b) Flujo de aire 0.5 vvm c) Flujo de aire 1 vvm

XVI. GLOSARIO

Ácido desoxirribonucleico. Ácido nucleico que contiene información genética necesaria para el desarrollo y funcionamiento de los organismos vivos conocidos.

Bacteria. Grupo de células procariontes filogenéticamente relacionadas y distinto del dominio arquea.

Biota. Conjunto de especies de plantas, animales y otros organismos que ocupan un área dada.

Célula procariota. Célula que carece de un núcleo delimitado por una membrana nuclear y de otros orgánulos.

Cepa. Grupo de organismos con características taxonómicas similares como las bacterias, hongos o virus, cuya ascendencia común es conocida.

Cultivo microbiano. Formulación en la que se crece a uno o varios microorganismos mediante condiciones controladas.

Cultivo sumergido. Los nutrientes se encuentran en solución líquida y los microorganismos se desarrollan flotando libremente o forman agregados (pellets) en el caso de los hongos.

Escala de pH. Representa la medida de acidez o alcalinidad de una solución en valores que van desde 0 hasta 14, donde el 7 representa el equilibrio entre especies H^+ y OH^- , es decir la neutralidad.

Espectrofotómetro. Instrumento que permite medir la cantidad de luz absorbida a una longitud de onda específica.

Exopolisacáridos. Grupo de polímeros de monosacáridos que rodean la estructura externa de la célula.

Factores abióticos. Elemento de los ecosistemas que carece de vida en el cual habitan los seres vivos. Ejemplo: agua, temperatura, luz, pH, suelo, humedad, etc.

Factores bióticos. Son los seres vivos que son parte de un ecosistema.

Factores nod. Son factores de nodulación (oligosacáridos) producidos por bacterias llamadas rizobios que intervienen durante la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las leguminosas.

Fases de crecimiento. Modelación del crecimiento de un cultivo de microorganismos suponiendo cuatro fases de crecimiento, una fase de adaptación, estacionaria, exponencial y una de declive.

Fase lag. Etapa que representa la adaptación de los microorganismos a su medio de cultivo, donde existe un metabolismo activo sin cambios aparentes en su crecimiento.

Fase estacionaria. Período que sigue a la fase de crecimiento exponencial, caracterizado por una velocidad de crecimiento de una población igual a cero.

Fase exponencial. Etapa en el cual el crecimiento de una población se incrementa de forma exponencial.

Fijación Biológica de nitrógeno. Reducción de N_2 a NH_3 por medio de la enzima nitrogenasa, parte constitutiva de algunos microorganismos.

Formulación. Representación de la composición de una sustancia.

Gen. Segmento de ADN o (ARN en algunos virus) específico para una proteína, o cadena polipeptídica, un RNA de transferencia o un RNA ribosómico.

Genes nod . Genes responsables de la nodulación en la planta por parte de la bacteria.

Gram-negativo. Célula procariota cuya pared celular contiene mínimas cantidades de peptidoglicano y presenta una membrana externa compuesta por lipopolisacárido, lipoproteínas y otras macromoléculas complejas. Las células al microscopio se tiñen rosas cuando se les aplica una tinción de Gram.

Híbrido. Organismo proveniente de organismos de especies distintas o con algunas cualidades diferentes.

Inoculante. Concentrado de microorganismos específicos producidos en cultivo que son introducidos en el ambiente.

Ion. Partícula cargada eléctricamente constituida por uno o más átomos.

Lipopolisacárido. Lípido que contiene oligosacáridos, polisacáridos y proteína que es el compuesto mayoritario de la pared celular de las bacterias Gram Negativas.

Lixiviación. Proceso por el que se extraen uno o varios solutos de un sólido, mediante un disolvente líquido. En el caso de la lixiviación de los compuestos de los fertilizantes químicos el disolvente suele ser el agua.

Longitud de onda. Representa la distancia de la propagación de una perturbación en un intervalo de tiempo.

Meristemo. Tejido vegetal responsable del crecimiento celular en la planta.

Metabolismo. Conjunto de reacciones catabólicas y anabólicas en la célula.

Microbiota. Microorganismos presentes en sistemas específicos en el ambiente.

Nitrogenasa. Complejo enzimático capaz de reducir el nitrógeno atmosférico a amoníaco en el proceso de fijación biológica de nitrógeno.

Nódulo primordio. Aglomerado de células cercano a la rizodermis de la planta, formado por la infección de bacterias en el hospedero.

Pellet. Denominación genérica, utilizada para referirse a pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido

pH. Medida de la acidez o alcalinidad de una sustancia, conocido como potencial de hidrógeno. Es el valor negativo del logaritmo de la concentración de iones hidrógeno $[H^+]$ de una solución. $pH = -\log [H^+]$.

Poli- β -hidroxibutirato. Material de reserva nutritiva presente en procariontas compuesto por un polímero de β -hidroxibutirato.

Polímero. Macromolécula formada por unidades repetitivas de moléculas semejantes denominadas monómeros.

Proteína. Compuesto formado por cadenas de aminoácidos. Es un polímero estructuralmente compuesto por unidades repetitivas denominadas monómeros.

Proteobacteria. Grupo grande de bacterias Gram negativas relacionadas filogenéticamente.

Quitina. Polisacárido compuesto de unidades de N-acetilglucosamina. Es uno de los polímeros naturales con mayor presencia. Usado en floculación para tratamiento de agua, agente en la curación de heridas, como espesante y estabilizador en medicamentos y medicinas.

Rizobacteria. Bacteria capaz de colonizar y formar nódulos en las raíces de las plantas, con el objeto de obtener una relación benéfica entre ambas. Se encuentran de manera natural en la rizosfera.

Rizobio. Bacteria capaz de fijar nitrógeno atmosférico a partir de una relación endosimbiótica con la raíz de las plantas.

Rizosfera. Región inmediata adyacente a las raíces de las plantas.

Simbiosis. Asociación de organismos de diferentes especies.