

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**  
**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA**  
**DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA**



**Efecto de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno y Halófilas en la**  
**Promoción del Crecimiento de Plántulas de Tomate**  
**(*Lycopersicon esculentum* Mill.)**

**POR:**

**HUGO BALTAZAR RIVERA CRUZ**

**TESIS**

**Presentada como requisito para obtener el título de:**

**INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA**

Saltillo, Coahuila, México

Febrero, 2012

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**  
**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA**  
**DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA**

Efecto de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno y Halófilas en la Promoción del  
Crecimiento de Plántulas de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Por:

**HUGO BALTAZAR RIVERA CRUZ**

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA**

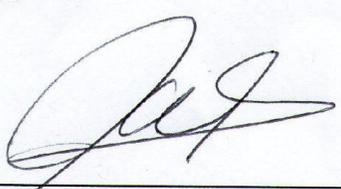
Aprobada



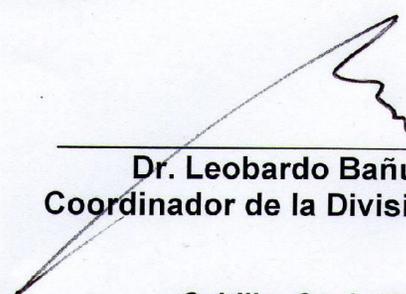
**Dr. Valentín Robledo Torres**  
**Asesor Principal**



**MC. José Omar Cárdenas Palomo**  
**Coasesor**



**MC. Juan Antonio Villareal Sánchez**  
**Coasesor**



**Dr. Leobardo Bañuelos Herrera**  
**Coordinador de la División de Agronomía**



Coordinación  
de Agronomía  
Saltillo, Coahuila, México

Febrero, 2012

## ***DEDICATORIAS***

**A DIOS:** Porque siempre está con migo nunca me deja solo, me ayuda a superar mis problemas y por darme la oportunidad de ser alguien en la vida.

### **A MIS PADRES:**

**A Bernardina Cruz Santiago y Vicente Rivera Moreno**, por haberme educado, por haber estado conmigo en las buenas y en las malas, por su confianza que pusieron en mí y sobre todo por el cariño que siempre me ha brindado.

### **Mis Hermanos:**

Carlos Enrique Rivera Cruz, Guadalupe Rivera Cruz y Rodrigo Hernández Rivera: estoy orgulloso de tener unos hermanos ejemplares, por el apoyo que me han brindado durante mis estudios, por la amistad, por el cariño que nos tenemos y por la comunicación que siempre tuvieron con migo.

**A mis Abuelos:** ya que siempre se han preocupado por mí, agradezco por el amor que me han brindado, en especial a mi abuelo **Baltazar Rivera** (†)

**A Rosivel Ángel Bautista:** le dedico este trabajo a mi novia, que pasó de ser una de mis mejores amigas, donde encontré con quien intercambiar ideas, apoyo mutuo.

**En especial a mis sobrinas: Karla Nayara, Paola Monserrat**, mis sobrinas a quienes le dedico especialmente esta tesis, por el cariño que les tengo y que me tienen, por ser unas buenas niñas, por convivir conmigo cuándo estoy con ellas y por darme la alegría de tenerlas.

A mi “ALMA TERRA MATER” Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro: por el buen aprendizaje que adquiriré de mi escuela.

## ***AGRADECIMIENTOS***

**MC. José Omar cárdenas Palomo:** le agradezco por el gran apoyo que me brindo, por la confianza que puso en mi para poder formar parte de su proyecto, pero sobre todo por la amistad que me brindo y sus buenos consejos

**DR. Valentín Robledo Torres:** le agradezco por a verme dado la oportunidad de formar parte de su proyecto, por las asesorías que me brindo y por el apoyo moral. Y sobre todo por las cosas nuevas que aprendí con sus asesorías.

**MC. Antonio Villareal Sánchez:** por la participación que tiene en el proyecto, por su apoyo en la revisión de tesis y por formar parte del jurado.

**Ing. Eustaquio Domínguez Rivera:** siempre estuvo dispuesto para brindarme su apoyo, y por sus buenos consejos como un buen amigo, le agradezco su amistad.

**A Palau Bioquim:** le agradezco a la empresa por su apoyo que me brindaron en la realización de mi tesis y sobre todo al ingeniero Benito Canales

**A mis primos:** Juan Domínguez Rivera, Roxana Leiva Rivera, Iván Leyva Rivera. Por brindarme de su amistad, por la buena comunicación que tenemos.

**Al Lic. Jairo Domínguez Rivera:** por su gran apoyo en el manejo del sas y asesoría en interpretación de datos.

**Ing. Rosendo Martínez Hernández:** le agradezco por enseñarme a usar el programa estadístico SAS, y amistad.

**A mis amigos: a Noki, Miriam, Toño Domínguez, Alfredo Pérez, Eliseo, Chepe, Toño Cabrera, Jovan, Saúl, luz, Rodrigo, Kone, Huber, Aricelda Uribe, Luis Zaragoza, Elizandro, Isidro, Lupe:** les agradezco su amistad, su ayuda y buenos consejos.

## INDICE DE CONTENIDOS

	<b>PAG.</b>
DEDICATORIAS.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE DE CUADROS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
RESUMEN.....	VIII
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Clasificación botánica.....	3
Valor nutritivo.....	4
Características generales de la planta.....	5
Raíz.....	5
Tallo.....	5
Hojas.....	6
Flores.....	7
Frutos.....	8
Semillas.....	8
Requerimientos climáticos.....	8
Temperatura.....	9
Humedad relativa.....	9
Luminosidad.....	10
Microorganismos en el suelo.....	10

Disponibilidad de nutrientes.....	11
La fertilización.....	11
Importancia del nitrógeno para las plantas.....	12
Fijación de nitrógeno.....	12
Bacterias fijadoras de nitrógeno.....	13
Proceso de fijación.....	15
Azotobacter ssp.....	16
Azospirillum spp.....	17
Posible efecto fitohormonal de las bacterias fijadoras de nitrógeno.....	18
Microorganismos halófilas.....	19
Bacterias halófilas.....	19
Ambiente para su desarrollo.....	20
Adaptación de las bacterias halófilas.....	21
Aplicación de las bacterias halófilas.....	21
El uso de microorganismos de bacterias halófilas en la industria.....	22
Enzimas.....	22
Polímeros.....	22
Producción de solutos compatibles.....	23
Actinomicetos halófilos.....	24
Que son las Enzimas.....	25
Algaenzims.....	26
Efecto en las plantas.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Ubicación del experimento.....	28
Descripción de tratamientos.....	29
Establecimiento del experimento.....	30
Siembra.....	30

Riegos.....	30
Fertilización.....	31
Aplicación de los tratamientos.....	31
Variables evaluadas.....	32
Trabajo de laboratorio.....	32
Peso fresco de plántula.....	32
Diámetro de tallo.....	33
Altura de plántula.....	33
Peso fresco de raíz.....	33
Longitud de raíz.....	33
Peso seco de plántulas.....	34
Peso seco de raíz.....	34
Spad.....	34
Diseño experimental.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
Comparación de medias del peso fresco de plántula.....	36
Comparación de medias de la altura de plántula.....	37
Comparación de medias del diámetro de tallo.....	38
Comparación de medias de la longitud de raíz.....	39
Comparación de medias del peso fresco de raíz.....	41
Comparación de medias del peso seco de plántula.....	42
Comparación de medias del peso seco de raíz.....	43
Comparación de medias de las unidades spad.....	44
Contrastes ortogonales.....	45
CONCLUSIONES.....	50
LITERATURA CITADA.....	51
APÉNDICE.....	55

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Compuestos orgánicos e inorgánicos de fruto ( <i>Lycopersicon esculentum</i> mil).....	4
2. Descripción de los tratamientos a base de bacterias fijadoras de nitrógeno y halófilas aplicados a plántulas de tomate. ....	29
3. Cuadros medios del análisis de varianza aplicado a variables, PFP, AP, DT, LR.....	35
4. Cuadros medios del análisis de varianza aplicado a variables, PFR, PSP, PSR, SPAD.....	40
5. Contrastes ortogonales de la media de Algaenzims contra la media de los tratamientos restantes.....	46
6. Contrastes ortogonales de la media de Bacterias Halófilas contra la media de los tratamientos restantes.....	46
7. Contrastes ortogonales de la media de Bacterias Fijadores de Nitrógeno contra la media de los tratamientos restantes.....	47
8. Contrastes Ortogonales de la Media de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno contra la media de los tratamiento Bacterias Halófilas.....	48
9. Contrastes Ortogonales de la media de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno contra la de los tratamientos con Algaenzims.....	49

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Valores medios del peso fresco de plántulas obtenidos en los tratamientos bajo estudio en el cultivo de tomate.....	36
2. Comparación de medias de altura de plántulas de tomate estudiada con aplicación de tratamientos de microorganismos benéficos.....	37
3. Comparación de medias de diámetro de tallo de plántulas de tomate con aplicación de tratamientos de microorganismos benéficos.....	38
4. Comparación de medias de la longitud de raíz de plántulas de tomate con aplicación de tratamientos de microorganismos benéficos.....	39
5. Comparación de medias del peso fresco de raíz de tomate con aplicación de tratamientos de microorganismos benéficos.....	41
6. Comparación de medias del peso seco de plántulas de tomate con aplicación de tratamientos de microorganismos benéficos.....	42
7. Comparación de medias del peso seco de raíz de tomate con aplicación de tratamientos de microorganismos benéficos.....	43
8. Comparación de medias de las medidas Spad en plántulas de tomate con aplicación de tratamientos de microorganismos benéficos.....	44

## RESUMEN

### **Bacterias Fijadoras de Nitrógeno y Halófilas**

Se evaluaron los efectos de bacterias fijadoras de nitrógeno y halófilas, divididas en 11 tratamientos en la ciudad de Saltillo, Coahuila. Se trabajó a nivel plántula con 10 tratamientos y 1 testigo con 9 repeticiones. Se utilizó un diseño estadístico con bloques completamente al azar, para lo cual se utilizaron 11 charolas donde cada una tenía un tratamiento, se hicieron 2 aplicaciones de las diferentes soluciones, la primera aplicación se hizo a los 6 días de germinación y la segunda a los 25 días. La primera toma de datos se realizó a los 25 días después de la siembra y la segunda a los 45 días después de la siembra y se tomaron las variables: peso fresco de plántula (PFP), altura de plántula (AP), diámetro de tallo (DT), longitud de raíz (LR), peso fresco de raíz (PFR), peso seco de plántula (PSP), peso seco de raíz, unidades Spad (SPAD). El experimento se llevó bajo invernadero, con riego manual, y utilizando fertilización con triple 20, se hicieron 3 aplicaciones durante los 45 días.

El objetivo fue estudiar el efecto que tienen las bacterias fijadoras de nitrógeno y halófilas en la promoción del crecimiento en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), bajo condiciones de invernadero.

En el análisis de varianza que se realizó para los 11 tratamientos y las 8 variables, se encontraron diferencias altamente significativas para las variables: AP, DT, LR, PFR, PFP, PSP y SPAD, a excepción de (PSR). Las bacterias

fijadoras de nitrógeno tienen un efecto significativamente superior al resto de los tratamientos en las variables bajo estudio y promovieron el desarrollo de variables como altura de planta, diámetro de tallo, longitud de raíz, peso fresco de raíz y contenido de clorofila.

**Palabras clave:** Bacterias Halófilas, Bacterias Fijadoras de Nitrógeno, Invernadero, Desarrollo, Fertilización.

## INTRODUCCIÓN

En México, el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) está considerado como una especie hortícola muy importante por la superficie sembrada. A esta hortaliza de fruto se le encuentra en los mercados durante todo el año y se consume tanto fresco como procesada, además es una fuente rica de vitaminas.

El tomate ocupa un lugar preponderante con relación al desarrollo económico y social de la agricultura a nivel nacional. En los últimos años, la producción mundial se ha mantenido estable, con un nivel promedio anual que sobrepasa los 110 millones de toneladas, en el periodo comprendido entre el 2000 a 2005 (FAO, 2005). El tomate mexicano se identifica por su notoria participación entre los países exportadores, detrás de España y Holanda.

Las cifras parciales disponibles para el año 2009, indican que las exportaciones globales de tomates frescos llegaron a los US\$ 3,976.92 millones, siendo Holanda, México y España los países que registran las mayores ventas al extranjero (Prochile, 2010).

A través del tiempo el hombre se ha visto en la necesidad de hacer más eficientes los sistemas de producción, para obtener el mayor rendimiento posible y así satisfacer las demandas del mercado en cuanto a cantidad y calidad, con la mínima inversión. Entre las tecnologías que se utilizan destacan la agroplasticultura; con técnicas como el acolchado del suelo, riego por goteo, uso de macrotúneles, invernaderos, uso eficiente de fertilizantes, o la aplicación

de bacterias fijadoras de nitrógeno. Por otro lado ha surgido la necesidad de sustituir la agricultura a base de agroquímicos por una forma de cultivo orgánico, esto ha llevado a la investigación y el desarrollo de nuevos productos con un impacto mínimo para el ambiente y que permita mantener o aumentar los rendimientos de los cultivos.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno han sido el objetivo de numerosos estudios, en diversos cultivos de importancia agronómica, estas se han utilizado para aumentar la germinación y crecimiento. (Zaady and Perevolotsky, 1995)

Otros organismos en los cuales se ha desarrollado investigación, son las bacterias halófilas, aunque se tiene muy poca información de aplicaciones en cultivos (Kamekura *et al.*, 1982). Las bacterias halófilas son aquellas que requieren cierta concentración de NaCl para su desarrollo y crecimiento, pertenecen al grupo de microorganismos extremófilos capaces de vivir en ambientes salinos, ofrecen una multitud de aplicaciones en varios campos de la biotecnología (Margesin, 2001). Éstas bacterias podrían ser una opción para reducir los problemas de salinidad de suelos agrícolas y la respuesta de plantas hortícolas a su aplicación, sin embargo es muy reducida la investigación en éste sentido, por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue; conocer el efecto de la aplicación de bacterias fijadoras de nitrógeno y halófilas, en plántulas de tomate, bajo la hipótesis de que por lo menos un tratamiento con éstas bacterias inducirá el desarrollo superior de la plántula, en comparación con plántulas sin tratamiento de bacterias.

## REVISIÓN DE LITERATURA

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una planta cuyo origen se localiza en la región andina que se extiende desde el Sur de Colombia, al Norte de Chile y desde la Costa del Pacífico (incluidas las islas Galápagos) a las estribaciones orientales de los Andes, comprendiendo los países de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995). El vocablo tomate procede del náhuatl tomatl, aplicado genéricamente para las plantas con frutos globosos o vallas, con muchas semillas y pulpa acuosa. (Williams, 1990). México está considerado a nivel mundial como el centro más importante de domesticación del tomate. En principio se cree que fue utilizada como planta ornamental y su introducción en Europa se realizó en el siglo XVI, se sabe que a mediados del siglo XVIII ya era cultivada con fines alimenticios, principalmente en Italia (Moroto, 1995).

### Clasificación Botánica

Cedaf (1993), menciona que el tomate es clasificado de la siguiente manera:

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanácea
Especie	<i>Lycopersicon</i>

## Valor Nutritivo

Valor nutritivo del tomate (Cuadro 1), los valores de los siguientes compuestos orgánicos e inorgánicos a base de 100 gr. de parte comestible de frutos (Cedaf, 1993).

Cuadro 1. Compuestos orgánicos e inorgánicos del fruto de *Lycopersicon esculentum* Mill.

Compuestos orgánicos e inorgánicos	% en fruto
Agua	95.0 %
Proteínas	1.1 gr
Carbohidratos	4.7 gr
Ca	13.mg
P	27 mg
Fe	0.5 mg
Na	3.0 mg
K	244.0 mg
Acido ascórbico	23.0 mg
Tiamina (B2)	0.06 mg
Riboflavina (B2)	0.04 mg
Vitamina A	900 UI

## **Características Generales de la Planta**

### **Raíz**

El cultivo se compone de una raíz principal de las que surgen raíces laterales que forman un conjunto de un radio de 1.5m la mayor parte del sistema radical se ubica entre los 5 y 45 cm. de profundidad (Cedaf, 1993).

El sistema radicular del tomate consta de una raíz principal y gran cantidad de ramificaciones secundarias. En los primeros 20 cm de la capa de suelo se concentra el 70% de la biomasa radical. No obstante, bajo condiciones de cultivo sin suelo se le confina en contenedores de diferente volumen, geometría y disposición. Usualmente se utiliza un volumen de 5 a 10 lts por planta. La fibra de coco, en general confiere a las plantas gran ramificación de raíces y vigor a la planta, por lo que hay que tener cuidado con las variedades vigorosas. Las raíces de cultivos en sustratos, prácticamente carecen de pelos absorbentes y las raíces tienden a ser más gruesas y gran parte de estas se encuentran en torno a la salida del emisor y la parte baja de los contenedores (Muños y Castellanos, 2003).

### **Tallo**

El tallo es herbáceo, en su etapa de desarrollo es erecto y cilíndrico, cubierto de pelos glandulares que expulsan una sustancia de color verde amarillo con un olor característico que desempeña el papel de repelente para algunos insectos. El tamaño es determinado por características genéticas así como por otros factores (Cedaf, 1993).

La planta de tomate es herbácea, perene y relativamente de vida corta, cultivada es anual, es ramificada, de tallo sarmentosos y pubescente en toda su superficie, semileñosos sin dominancia apical, con crecimiento indeterminado o determinado por un racimo floral, predominando el primero. El tallo es el eje sobre el cual se desarrollan las hojas, flores y frutos, por ello es importante vigilar su vigor y sanidad; el diámetro puede ser de 2 a 4 cm y el porte puede ser de crecimiento determinado (tallos que al llegar de cierto número de ramilletes detienen su crecimiento) e indeterminado (tallos que no detienen su crecimiento). En las axilas de las hojas del tallo principal surgen de los tallos secundarios que son eliminados mediante poda para una buena conformación de la planta. El desbrote debe ser oportuno, cuando los brotes desarrollen unos 5 cm., de esta manera las cicatrices son pequeñas y con ello un menor riesgo de enfermedades. Por cuestiones hormonales en la planta, el brote inmediato inferior al racimo es más vigoroso, y por ello hay que vigilar que su desbrote sea oportuno (Muñoz y Castellanos, 2003).

## **Hojas**

Son sencillas, pecioladas de limbo muy hendido, parecen compuestas sin serlo, de foliolos lobulados, ovales y acuminados, con bordes dentados, de color verde intenso en el haz y verde claro en el envés. Sobre el tallo las hojas surgen de modo alterno. Al igual que el tallo, también están recubiertas de pelos glandulares. Normalmente aparecen tres hojas por simpodio, es decir entre ramilletes. Las hojas son las responsables de la fotosíntesis por lo que deben tener una buena disposición para una mayor intercepción de la radiación. Por

ello es importante que el emparrillado para entutorado quede simétricamente establecido y además para que no interfiera con las labores de manejo del cultivo (Muñoz y Castellanos, 2003).

## **Flores**

Las flores son pequeñas, pedunculadas de color amarillo, formando corimbos axilares: el cáliz tiene 5 pétalos, corola soldada inferiormente, con 5 pétalos que conforman un tubo pequeño, los 5 estambres están soldados en estilo único que a veces sobresale de los estambres, el ovario contiene muchos óvulos (Muñoz y Castellanos, 2003).

El número de flores depende del tipo de tomate, en tomate de grueso calibre el ramillete tiene de 4-5 flores; en tomates de calibre mediano aumenta de 10-12 flores por ramillete y en los tomates tipo cereza o cherry no es extraño que se desarrollen hasta 100 flores por racimo. Hoy en día, hay una tendencia a comercializar los frutos en ramillete. Ejemplo de ellos son las variedades pitensa, durinta y otras, donde la estructura de ramillete y la disposición de las flores son perfectas. En estos casos la poda de frutos juega un papel importante, dejando únicamente de 5 o 6 frutos por ramillete (Muñoz y Castellanos, 2003).

## **Frutos**

Los frutos de tomate son bayas carnosas con diferencias en formas (lisos, asurcado, aperado, etc.) e intensidad de coloración; de rojiza o amarillo en caso de ciertas variedades de tomate cherry, con cavidades o lóculos internos variables, en donde se desarrollan las semillas de forma reniforme y aplanadas (Muñoz y Castellanos, 2003).

## **Semillas**

Las semillas del tomate es de forma lenticular con dimensiones aproximadas de 5x4x2 mm y está constituida por el embrión, el endospermo y la testa o cubierta seminal. El embrión lo forman una yema apical, dos cotiledones, el hipocótilo y la radícula. La testa o cubierta seminal es de tejido duro e impermeable. La germinación de las semillas ocurre de manera relativamente fácil (Muñoz y Castellanos, 2003).

## **Requerimientos Climáticos**

A la planta de tomate le favorecen los climas cálidos, sin embargo, bajo condiciones de baja luminosidad, las temperaturas de la noche y del día se deben mantener bajas, de lo contrario, se tendrá una planta raquílica y de floración pobre, como consecuencia de que la energía que proporciona la fotosíntesis es inadecuada para la velocidad de crecimiento. Una planta joven utiliza productos disponibles de la fotosíntesis, en primer lugar para mantenimiento y crecimiento, y en segundo, para las raíces y tercero para formar el fruto (León, 2001).

## **Temperatura**

La temperatura influye en todas las funciones vitales de la planta, como son la transpiración, fotosíntesis, germinación, etc., para el tomate las temperaturas óptimas son; nocturnas de 15 a 18<sup>0</sup>C, diurnas de 24 a 25<sup>0</sup>C y para su desarrollo vegetativo entre 22 y 23<sup>0</sup>C, aunque el cultivo de tomate se adapta a climas con temperaturas entre los 18 y 26<sup>0</sup>C y las temperaturas optimas durante el día y las noches son de 22 y de 16<sup>0</sup>C respectivamente y el tomate no resiste las heladas (Burgueño, 2001).

Sade (1998) menciona que con temperaturas entre 10<sup>0</sup>C y 15<sup>0</sup>C se originan problemas en el desarrollo y germinación. A temperaturas superiores a 25<sup>0</sup>C, e inferiores a los 12<sup>0</sup>C, la fecundación es defectuosa o nula. La maduración del fruto está influenciada por la temperatura en lo referente tanto a la precocidad como a la coloración, valores cercanos a los 10<sup>0</sup>C y superiores a los 30<sup>0</sup>C originan tonalidades amarillentas en el fruto.

Quinteros (1998), cita que la temperatura tiene un gran efecto sobre la tasa de crecimiento final de la planta.

## **Humedad Relativa**

La humedad relativa influye sobre el crecimiento de los tejidos, transpiración, fecundación de las flores, siendo preferible la humedad media no superior al 50% y suelos no encharcados.

Burgueño, (2001) señala que cuando la humedad relativa esta en exceso existente un menor desarrollo vegetativo por que se disminuye la transpiración, además de un incremento en el aborto de flores, se aumenta la incidencia de

enfermedades y persistiendo una condensación de humedad provocando el goteo.

### **Luminosidad**

La producción y distribución de los fotoasimilados es un factor esencial en el desarrollo de la planta. La iluminación es, con frecuencia, un factor limitante en invierno en los cultivos en invernadero. El factor que más afecta el desarrollo vegetativo es la iluminación diaria total, mientras que la calidad de la luz y el fotoperiodo desempeñan un papel secundario. La luz es un requisito esencial para el desarrollo de la planta ya que mediante la fotosíntesis la energía de la luz es utilizada para fijar el CO<sub>2</sub> de la atmosfera y el agua para producir azúcares, almidón y carbohidratos que se utilizan en la formación de materia seca (Bringas, 2004).

### **Microorganismos en el Suelo**

Se conocen muchos microorganismos del suelo, y se pueden distinguir claramente en procariotas (bacterias y algas azul verdosas) y eucariotas (hongos, algas y protozoos). Son los componentes más importantes del suelo, constituyen su parte viva y son los responsables de la dinámica de transformación y desarrollo. Entre los beneficios del uso de microorganismo en la agricultura están su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, la descomposición de residuos orgánicos, la desintoxicación con plaguicidas, la supresión de enfermedades en las plantas, el aporte de nutrientes al suelo y la

producción de compuestos bioactivos como vitaminas y hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas (Martínez, 2002).

### **Disponibilidad de Nutrientes**

La disponibilidad de los 16 elementos de importancia para la nutrición de las plantas, así como de algunos específicos como el cobalto y el silicio, puede ser afectada por factores ligados al suelo como el pH, el tipo de arcilla, el contenido de materia orgánica y las formas de humus que predominen, la actividad de microorganismos, el contenido de agua y la fuente de fertilizante aplicada (Kass, 1998).

### **La Fertilización**

Con la fertilización se busca aumentar la producción agrícola, e igual objetivo tienen otras técnicas agronómicas. Es muy importante recordar que los fertilizantes contribuyen, en promedio, en un 50% al aumento de la producción. La gran mayoría de los fertilizantes minerales no dejan residuos tóxicos, ni en el suelo ni en la planta, como sucede en el caso de los plaguicidas. Los fertilizantes pueden ejercer algún daño en semillas, raicillas y población microbiana, debido a efectos secundarios de acidez, alcalinidad o salinidad, pero son efectos localizados (Pineda, 1996).

## **Importancia del Nitrógeno para las Plantas**

El nitrógeno es importante porque actúa en forma específica en procesos metabólicos en las plantas y en forma estructural. En las plantas existen formas nitrogenadas además de los aminoácidos y proteínas en las que se incluyen: vitaminas, hormonas, pigmentos, purinas y pirimidinas. Es además componente esencial de la clorofila. El nitrógeno estimula el crecimiento vegetativo, incrementa la masa protoplasmática y aumenta la succulencia foliar. Cuando el aporte de nitrógeno es insuficiente, las plantas se observan raquílicas, delgadas y mal desarrolladas. El crecimiento es lento y hay clorosis generalizada. Si la deficiencia es severa, las hojas adquieren un color pardo oscuro y mueren (Kass, 1998).

## **Fijación de Nitrógeno**

Es necesario indicar que la fijación de nitrógeno es un proceso que consume mucha energía, y que los fijadores simbióticos de nitrógeno obtienen esta energía del cultivo al que están asociados, lo que en un principio provoca algunas pérdidas en la producción vegetal. Además parece que los organismos no simbióticos pueden funcionar eficazmente a temperaturas altas del suelo, pero (salvo el *Azotobacter spp.*) no son eficaces en condiciones templadas. Muchos suelos, en especial los suelos ácidos, no poseen poblaciones activas de estas bacterias y se ha determinado ampliamente que la inoculación bacteriana puede aumentar los rendimientos (FAO, 1996).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno pueden asociarse a raíces como por ejemplo: una asociación entre la gramínea tropical *Paspalum notatum* y una especie de *Azotobacter*, donde el microorganismo vive en la rizosfera de la planta protegido por un mucílago y proporcionando una fijación de unos 20 kilogramos de nitrógeno por hectárea al año (Pérez y Torralba, 1997). También podemos encontrar asociaciones importantes entre bacterias del género *Azospirillum* y varias gramíneas. Estas bacterias tienen un amplio rango de hospederos, entre los que se encuentran el maíz y el sorgo, por lo que se ha sugerido su utilización en agricultura. Se ha observado igualmente que las gramíneas tropicales de metabolismo C4 inducen una mayor fijación (Pérez y Torralba, 1997).

Otras asociaciones de este tipo se dan entre el arroz y bacterias del género *Klebsiella*, la caña de azúcar y *Beijerinckia* entre algunas plantas acuáticas y *Campylobacter*. Pero también se pueden asociar en la superficie de las hojas, ya que es un buen hábitat para desarrollarse. *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Klebsiella* proliferan en las hojas de plantas tropicales como el algodón, el café y las gramíneas, para satisfacción de los agricultores. Sin embargo, la aportación de nitrógeno en este caso es escasa, apenas 1 kilogramo por hectárea al año (Pérez y Torralba, 1997).

### **Bacterias Fijadoras de Nitrógeno**

En las últimas décadas se han desarrollado un creciente interés por el conocimiento y aislamiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno y por el estudio de su efecto sobre el crecimiento vegetal. El empleo de la

biofertilización nitrogenada como alternativas de los fertilizantes minerales tradicionales, permitirá disminuir el riesgo de contaminación derivados de los aportes nitrogenados inorgánicos, contribuyendo al establecimiento de metodologías no contaminantes acordes con una agricultura ecológica. Así, mientras que los fertilizantes nitrogenados inorgánicos aplicados al suelo se pierden en gran parte por procesos naturales de lixiviación, con riesgo de contaminación de aguas subterráneas, lagos y ríos, causando daños ecológicos graves, con el empleo de biofertilizantes nitrogenados se consigue que nitrógeno fijado en el suelo por las bacterias se encuentre disponible justo en el lugar donde es requerido por la planta (rizosfera), evitándose las pérdidas por lixiviación. Dado el efecto estimulador sobre el desarrollo de los cultivos ejercido por las bacterias fijadoras de nitrógeno, se ha pretendido potenciar este efecto mediante inoculos bacterianos que aumenten el número de estos microorganismos en el medio de cultivo.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno son componentes muy importantes del suelo, para desarrollar la fertilidad del mismo. En las condiciones ambientales adecuadas, las bacterias fijadoras de nitrógeno producen enzimas que toman el nitrógeno en su forma gaseosa de la atmósfera, y con los azúcares que obtienen de la planta, fijan el nitrógeno dentro de la biomasa bacteriana. Si las bacterias satisfacen sus necesidades de nitrógeno, entonces el nitrógeno pasa a la planta y pueden observarse niveles elevados de proteína en la planta. Este nitrógeno elevado no se libera al suelo hasta que muere la planta, o se exuda del suelo a la rizosfera.

Se dan dos grandes divisiones de bacterias fijadoras de nitrógeno: las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas y las bacterias fijadoras de nitrógeno asociativas. Las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticas, tales como el *Rhizobium*, se dan en las legumbres. Estas bacterias forman nódulos en las raíces de las plantas y estos nódulos son fáciles de contar. Las bacterias fijadoras de nitrógeno asociativas ocupan los espacios entre las células de las raíces de la planta, y no alteran la arquitectura de la raíz en absoluto.

### **Proceso de Fijación**

En el proceso de fijación del  $N_2$  se reduce a amoníaco, que es convertido a forma orgánica. El proceso de reducción este es catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa, que consta de dos proteínas distintas llamadas dinitrogenasa y reductasa de la dinitrogenasa. Ambos componentes contienen hierro y la dinitrogenasa también contiene molibdeno. En la dinitrogenasa el hierro y el molibdeno forman parte de un cofactor conocido como FeMo-co, que es el centro donde ocurre la reducción real del nitrógeno. El FeMo-co, está ubicado en el sitio activo de la enzima nitrogenasa, es responsable último de la fijación biológica del nitrógeno, un proceso que transforma el  $N_2$  inerte de la atmósfera en amonio, que puede ser metabolizado por los organismos vivos (Madigan, Martinko y Parker; 1999).

### ***Azotobacter spp***

Las bacterias *Azotobacter spp* son bacilos grandes que pueden poseer un diámetro de 2 a 4  $\mu\text{m}$ . Son bacterias Gram negativas y aeróbicas estrictas. Algunas cepas presentan motilidad por flagelos peritricos. En medios con carbohidratos, las bacterias de vida libre forman capsulas formadas de gruesas capas de mucílago (Madigan, Martinko y Parker; 1999).

Las bacterias del género *Azotobacter* crecen bien en medios de cultivo que contengan como fuente de carbono: manitol, glucosa, sacarosa o ácidos orgánicos (Rao, 1984).

*Azotobacter vinelandii* contiene pigmentos verdes fluorescente cuya producción es incrementada en un medio limitado de hierro y el cual se ha identificado como hecho de 2 componentes fenólicos. En el caso de *A. chrocoocum* se producen pigmentos verde oscuro. El *Azotobacter spp* presenta formas resistentes llamados cistes y son diferenciados en presencia de algunas fuentes de carbono como el butanol y el  $\beta$ -hydroxybutyrato (Rao, 1984).

Estos cistes presentan una respiración endógena mínima y resisten la desecación, la desintegración mecánica y las radiaciones ultravioleta e ionizantes. No obstante, no son resistentes al calor y oxidan rápidamente las fuentes de energía exógena (Madigan, Martinko y Parker; 1999). La especie *A. chrocoocum* fue la primera que demostró que podía crecer a partir de nitrógeno atmosférico en ausencia total de molibdeno pero en presencia de vanadio. Sin embargo las tasas de reducción del sustrato son considerablemente menores. (Madigan, Martinko y Parker; 1999).

### ***Azospirillum spp***

Esta especie fue descubierta en 1922 por Beijerinck y se le llamó inicialmente *Spirillum lipoferum*. Estas bacterias son bacilos ligeramente curvados y a menudo con puntos en los extremos, Gran negativos, presentan motilidad, es microaerofílica y su diámetro celular es de 1  $\mu\text{m}$ , el pH del medio debe estar entre 6.8 y 7.8 (Rao, 1984).

Se ha descubierto que establece una relación simbiótica laxa con plantas herbáceas tropicales y con cereales cultivados. También puede ser de vida libre o asociado con plantas tuberosas. (Madigan, Martinko y Parker; 1999).

El caldo nutritivo es un medio muy completo, sin embargo, *Azospirillum lipoferum* crece en presencia de varios azúcares incluyendo glucosa así como ácidos orgánicos y requiere biotina. En el caso de *A. brasilense* no crece en glucosa ni otros azúcares, pero utilizan ácidos orgánicos como el malato. La mayoría de esta especie son desnitrificantes (liberan  $\text{N}_2$  a la atmósfera) en condiciones anaeróbicas. La fijación ocurre en estadios tempranos del crecimiento por un período corto de tiempo antes de la asimilación del amonio resultando en la reducción a nitrato (Rao, 1984).

Todas las especies reducen el nitrato a nitrito en condiciones aeróbicas (Krieg y Dobereiner, 1984). *Azospirillum lipoferum* es capaz de acidificar un medio con glucosa o fructosa en condiciones anaeróbicas. La glucosa es utilizada por todas las especies de *A. lipoferum* y por unas pocas de *A. brasilense*, sin embargo, ésta última no puede utilizar la glucosa como fuente de carbono en crecimiento dependiente de  $\text{N}_2$  (Krieg y Dobereiner, 1984).

## **Posible Efecto Fitohormonal de las Bacterias Fijadoras de Nitrógeno**

Son numerosos los experimentos, tanto de campo como de laboratorio, realizados en este sentido, a si como los productos comerciales que han aparecido en el mercado. Sin embargo dada la complejidad de factores que afectan tanto a la supervivencia y desarrollo de los microorganismos en sistemas naturales como a su actividad, los resultados obtenidos en estos estudios han sido muy variados y a veces contradictorios. Diferentes experimentos han puesto de manifiesto que la inoculación de semillas de trigo con bacterias fijadoras de nitrógeno produce un incremento en el rendimiento de grano y en la cantidad total de nitrógeno (Baldani *et al.*, 1987).

Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual las bacterias fijadoras de nitrógeno contribuyen a la mejora del desarrollo de las plantas y a su producción es todavía desconocido. Las bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Azotobacter*, *Rizobium* y *Azospirillum* han sido las más empleadas en agricultura como biofertilizantes y existe cada vez una mayor evidencia de que, aparte de la posible fijación de nitrógeno, el efecto positivo de estas bacterias sobre la longitud, numero, y área superficial de las raíces es debido a la secreción por las mismas, de sustancias estimuladoras del crecimiento (fitohormonas), tales como auxinas, giberelinas y compuestos fenolicos (Murty y Ladha, 1988).

En la mayoría de las especies vegetales estudiadas la colonización tiene lugar en la zona de elongación de las raíces, estimulando la densidad y longitud de los pelos radiculares. Los efectos producidos sobre su morfología y fisiología

determinan una mayor absorción de agua y nutrientes, dando lugar a un mayor crecimiento vegetal.

Ocon y Labandera-Gonzales (1994) han indicado que *Azospirillum* estimula la densidad y longitud de los pelos radiculares, así como el crecimiento de raíces secundarias y la superficie radicular. La intensidad de estos efectos sobre la raíz depende de la especie vegetal y del cultivar empleado, y sobre todo de la concentración de inoculo en el medio. En la mayoría de los casos la concentración óptima es de 10<sup>7</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) por semilla o plántula. Según estos autores, este microorganismo influye en la concentración de ácido indol acético y de ácido indol-3-butírico, así como en la velocidad de la respiración específica y en la actividad de enzimas relacionados con el ciclo de ácidos tricarboxílicos, y también la ruta de glicólisis en las raíces de maíz y de otras plantas.

Hernández *et al.* (2005) menciona que las bacterias fijadoras de nitrógeno ejercen un efecto positivo dentro de un determinado rango de concentración, el cual desaparece por encima o por debajo de dicho rango, llegando a ejercer incluso, un efecto inhibitorio fuera de estos límites.

## **Microorganismos Halófilos**

### **Bacterias Halófilas**

Bacterias halófilas son aquellas que requieren cierta concentración de NaCl para su desarrollo y crecimiento. Pueden ser clasificados en función de la cantidad de sal que requieren.

Las bacterias halófilas, al pertenecer al grupo de microorganismos extremófilos capaces de vivir en ambientes salinos, ofrecen una multitud de aplicaciones en varios campos de la biotecnología. Los microorganismos no halófilos capaces de crecer tanto en ausencia como en presencia de sal son llamados halotolerantes. (Margesin, 2001).

De acuerdo a la definición de Kushner, es posible distinguir entre halófilos débiles, como lo son la mayoría de los organismos marinos, considerando que el agua de mar contiene cerca del 3% (w/v) de NaCl; halófilos moderados, cuyo crecimiento óptimo se encuentra en un rango del 3 al 15% (peso/volumen) de sal, y halófilos extremos, que presentan un crecimiento óptimo al 25% (peso/volumen) de NaCl. (Kushner, 1978).

### **Ambiente para el desarrollo de Bacterias Halófilas**

La diversidad de los microorganismos halófilos es muy variada. Muchos de estos microorganismos han sido aislados de hábitats que presentan alta salinidad ubicados en diferentes puntos geográficos del planeta (Ventosa *et al.*, 1998).

Los ambientes extremadamente salinos son raros, la mayoría se encuentra en zonas calientes y secas, como son lagos salinos (Gran Lago Salado de Utah y el Mar Muerto), suelos salados y alimentos salados principalmente. Las salinas marinas son también buenos hábitat para los procariotas halófilos extremos. Se han aislado halófilos extremos en alimentos con alta concentración de sal, con salmueras, salsa de soya y pescado. (Madigan, Martinko y Parker 2003).

## **Adaptación de Bacterias Halófilas**

La membrana citoplasmática constituye una barrera que separa el citoplasma del medio externo en el que pueden producirse cambios en la concentración de sales, por lo que debe jugar un papel importante en la respuesta de la célula a dichos cambios. Se ha demostrado que la adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares frente a una nueva situación de estrés osmótico incluye modificaciones en el tipo de fosfolípidos existentes en las membranas y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos (Russell, 1993).

La principal estrategia que desarrollan los microorganismos halófilos para adaptarse al estrés osmótico se basa en la acumulación masiva de compuestos en el citoplasma para compensar la presión osmótica del medio externo. Los compuestos acumulados pertenecientes a los géneros *Natronobacterium* y *Natronococcus* requieren condiciones alcalinas para su crecimiento (Das Sarma, 1995).

## **Aplicación de Bacterias Halófilas**

Desde que se inició su estudio, las bacterias halófilas han demostrado ser un grupo de extremófilos con un gran potencial biotecnológico, no sólo producen compuestos de enorme interés industrial, como enzimas, biopolímeros o solutos compatibles, sino que además presentan unas propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial. Por ejemplo, son microorganismos fáciles de cultivar y con escasos requerimientos nutricionales,

pudiendo utilizar una gran variedad de compuestos como única fuente de carbono y energía (Ventosa y Nieto, 1995).

Además, su tolerancia a elevadas concentraciones salinas reduce al mínimo los riesgos de contaminaciones en el laboratorio, lo que permitiría su explotación como fábricas celulares alternativas a *Escherichia coli* para la producción de proteínas recombinantes (Ventosa, 1988.)

## **El Uso de Microorganismos de Halófilas en la Industria**

### **Enzimas**

Muchos procesos industriales se desarrollan bajo condiciones extremas, lo que ofrece un campo de aplicación para las enzimas producidas por microorganismos extremófilos, capaces de actuar a valores extremos de temperatura, pH o salinidad. La mayoría de las haloenzimas extra e intracelulares que se han aislado y caracterizado hasta el momento, provienen de bacterias halófilas moderadas. Así, se han descrito varias hidrolasas de interés industrial del tipo de las amilasas, proteasas, nucleasas y nucleotidasas, producidas por diferentes bacterias halófilas (Kamekura y Hamawata, 1982).

### **Polímeros**

Los polímeros bacterianos tienen gran importancia en la industria petrolera, gracias a sus propiedades surfactantes y emulsionantes pueden aumentar la eficacia de los procesos de extracción de crudo del subsuelo, incrementando la viscosidad del agua que se inyecta alrededor de las bolsas, disminuyendo así su tensión superficial. Las bolsas de petróleo suelen

presentar una elevada salinidad, lo que hace especialmente interesante la utilización directa de bacterias halófilas moderadas productoras de biopolímeros (Ventosa, 1988).

### **Producción de Solutos Compatibles**

Las bacterias halófilas moderadas acumulan en su citoplasma determinados compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que no interfieren con el metabolismo celular, por lo que se denominan solutos compatibles, que constituyen la base fundamental de la tolerancia a la sal de estos microorganismos. Dichos compuestos osmoprotectores han despertado un enorme interés a nivel industrial, ya que poseen un alto poder estabilizador y protector de enzimas, ácidos nucleicos, membranas e incluso células enteras, contra la congelación, la desecación, la desnaturalización por calor y la alta salinidad (Louis *et al.*, 1994). Algunos solutos compatibles, como la ectoína y la hidroxiectoína han demostrado poseer un marcado efecto protector sobre las enzimas lábiles, como el lactato deshidrogenasa y la fructoquinasa. Así, en diversos estudios en los que se comparó el efecto protector sobre estas enzimas de distintos solutos compatibles (glicina-betaína, trehalosa, glicerol, prolina, ectoínas y azúcares), se puso de manifiesto que las ectoínas fueron los mejores agentes protectores del calor y los procesos de congelación y descongelación. Hasta la fecha, estos compuestos sólo pueden obtenerse biológicamente, lo que ha aumentado considerablemente el interés a nivel industrial de las bacterias halófilas moderadas productoras de estos solutos compatibles.

(Frings *et al.*, 1995) descubrieron un método de obtención de ectoína e hidroxiectoína a partir de una cepa halófila moderada de *Marinococcus*. Posteriormente se ha desarrollado un proceso industrial mejorado de obtención de ectoína a partir de una cepa de *H. elongata*, dicho proceso, conocido como “bacterial milking” (“ordeñado”).

El proceso consiste en someter a la bacteria, a cambios bruscos en la salinidad del medio de cultivo. Con un primer choque hiperosmótico se induce la acumulación citoplasmática de los solutos compatibles y a continuación se elimina la sal del medio, de manera que la bacteria expulsa el contenido citoplasmático, con los solutos compatibles, para compensar el choque hipoosmótico. (Sauer y Galinski, 1998).

### **Actinomicetos Halófilos**

En la actualidad está creciendo el interés por conocer mejor la gran diversidad de microorganismos halófilos, y cada vez es mayor el número de investigaciones relacionadas con el tema. Tal es el caso de los actinomicetos, organismos productores de una amplia variedad de metabolitos secundarios. Los actinomicetos halófilos representan un reducido grupo de microorganismos que, al combinar su capacidad productora con su resistencia a las condiciones extremas de salinidad, resultan microorganismos de gran interés como fuente productora de productos industriales, tanto en el campo farmacéutico como en el cosmético y el biotecnológico.

El número de actinomicetos halófilos que se conocen actualmente es muy reducido; en los últimos años se han reportado muy pocos géneros de

actinomicetos halófilos, de modo que el estudio de la biología de actinomicetos halófilos, incluyendo su aislamiento, identificación y caracterización, empieza a mostrar la diversidad de estos microorganismos en varias partes del mundo.

En 1975 se dio a conocer por vez primera el reporte de un actinomiceto capaz de crecer en altas concentraciones de salinidad, *Actinopolyspora halophila* (Gochnauer, 1975), dieciséis años más tarde, en 1991, se reporta el segundo actinomiceto halófilo, *A. mortivallis* (Yosida *et al.*, 1991).

En los años siguientes, y hasta 2003, se reportaron 13 especies más, existiendo en la actualidad 15 miembros conformando este grupo, que son los siguientes; *Actinopolyspora halophila*, *Actinopolyspora iraqiensis*, *Actinopolyspora mortivallis*, *Friedmanniella lacustris*, *Nocardioides aquaticus*, *Nocardiopsis halophila*, *Nocardiopsis kunsanensis*, *Nocardiopsis lucentensis*, *Nocardiopsis xinjiangensis*, *Prauserella halophila* y *Prauserella alba*, *Saccharomonospora halophila*, *Saccharomonospora paurometabólica*, *Streptomonospora alba*, *Streptomonospora salina*.

### **¿Que son las Enzimas?**

Los seres vivos sintetizamos enzimáticamente, entre otros compuestos complejos para la vida: las proteínas. Por lo general, las enzimas son proteínas, pero no todas las proteínas son enzimas. Las enzimas tienen la facultad de provocar y/o activar reacciones bioquímicas catalíticas reversibles a la temperatura del organismo vivo. (Canales López Benito, 1997)

## **Algaenzims**

Es un potenciador orgánico elaborado a base de macro y microalgas marinas, mediante un proceso patentado tal, que conserva todos los elementos y sustancias sin perder sus atributos por lo que las enzimas sintetizadas por las algas permanecen activas (vivas) aun dentro del producto envasado. Los microorganismos que contiene ALGAENZIMSMR, inclusive las microalgas cianofitas fijadoras del Nitrógeno del Aire aun en las plantas no leguminosas, conservan su viabilidad, su capacidad de propagarse en el medio agrícola donde se aplican, aumentando poderosamente la acción de las dosis aplicadas, ya sea en la planta o en el suelo. Las microalgas, con el pleamar, a veces están en el agua, ya veces en el suelo de la playa. Se han encontrado fósiles de microalgas cianofitas en rocas sedimentarias de origen marino de más de dos mil millones de años. Este tiempo de evolución les ha dado “experiencia” como especie para adaptarse al suelo con el flujo y el reflujo de humedad entre riego y riego. El hombre como especie tiene apenas 4.1 millones de años. El mar, en los lugares donde se desarrollan las algas, es una solución rica en nutrientes donde, por el proceso de homogenización y con el paso del tiempo, se encuentran todos los elementos necesarios para la vida, a diferencia del suelo, donde, por su heterogeneidad, pueden haber extremos en deficiencias y toxicidades. (Canales López Benito, 1997).

### **Efectos en las plantas:**

Más vigor a las plántulas y a las plantas, más resistencia a: heladas, calor, sequía y heridas, más resistencia a plagas y enfermedades, las plántulas

sufren menos al estrés del trasplante, fija el nitrógeno del aire, aun en las no leguminosas, más rendimientos, más calidad de las cosechas, con mejor presentación, más ricas en nutrimentos, más vida de anaquel, en su caso. (Canales López Benito, 1997).

**En el suelo:**

Mejora la textura, mejora la estructura, mejora el ph, incrementa la materia orgánica, incrementa la vida microbiana, hace poroso el suelo, descompacta suelos compactos, da cuerpo a los suelos livianos, desaliniza, desodifica, da más eficiencia a los fertilizantes, ahorro de fertilizantes, da más eficiencia en los riegos, ahorro de agua, ahorro de labranza, en su caso. (Canales López Benito, 1997)

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Ubicación del Experimento**

El experimento fue realizado en el 2011 en plántulas de tomate (Rio Grande) bajo invernadero propiedad de la empresa PALAU BIOQUIM S.A DE C.V., ubicada en la zona Centro de Saltillo, Coahuila. Saltillo es la capital y ciudad más grande del estado de Coahuila de Zaragoza, México. El municipio de Saltillo se localiza en el sureste del estado de Coahuila, El mapa general mexicano señala que el municipio de Saltillo presenta coordenadas geográficas de latitud norte 25° 26' 00" y de longitud oeste 101° 00' 10", a una altura de 1,600 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con los municipios de Ramos Arizpe, Arteaga y General Cepeda, al sur con los estados de Nuevo León y Zacatecas, al oeste con el estado de Zacatecas y los municipios de Parras y General Cepeda; al este con el municipio de Arteaga y el Estado de Nuevo León.

Cuenta con una superficie de 6,837 kilómetros cuadrados, que representan un 3.7 por ciento del total de la superficie del Estado, Respecto al uso del suelo; 40,265 hectáreas son utilizadas para la producción agrícola. A la explotación pecuaria se dedican 250,159 hectáreas y a la forestal 266,076 hectáreas. La superficie urbana ocupa 127,200 hectáreas. En cuanto a la tenencia de la tierra, predomina el régimen de tipo ejidal.

## Descripción de Tratamientos

El presente trabajo consistió de 11 tratamientos usando diferentes tipos de bacterias fijadoras de nitrógeno y halófilas (Cuadro 1). Cada tratamiento fue aplicado a una charola de germinación diferente.

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos a base de bacterias fijadoras de nitrógeno y halófilas aplicados a plántulas de tomate.

Tratamiento	Bacterias Fijadoras de Nitrógeno y Halófilas	Agua	Dosis	UFC/ml	UFC/ml
1	Algaenzims	1 lt	10ml		
2	Halo 2	1 lt	10ml	$3.83 \times 10^{10}$	38'300'000'000
3	T. Comercial	1 lt	10ml		
4	Halo 4	1 lt	10ml	$2.05 \times 10^4$	20'500
5	Halo 5	1 lt	10ml	$1.49 \times 10^6$	1490'000
6	N <sub>2</sub> 1	1 lt	10ml	$6.4 \times 10^5$	640'000
7	N <sub>2</sub> 2	1 lt	10ml	$1.0 \times 10^8$	100'000'000
8	N <sub>2</sub> 3	1 lt	10ml	$2.3 \times 10^5$	230'000
9	N <sub>2</sub> 4	1 lt	10ml	$1.0 \times 10^6$	1'000'000
10	N <sub>2</sub> 5	1 lt	10ml	$4.9 \times 10^9$	4'900'000'000
11	Testigo	1 lt	10ml		

Halo 2: bacterias Halófilas, N<sub>2</sub>1: Bacterias Fijadoras de Nitrógeno, T. Comercial: Biospiril, UFC: unidades formadoras de colonias.

## **Establecimiento del Experimento**

### **Siembra**

La siembra se realizo en charolas el 22 de junio del 2011, utilizando 11 charolas de 200 cavidades cada una, una charola por tratamiento. Como medio de germinación se utilizo peat-moss el cual se le agregó agua hasta poner la mezcla a capacidad de campo, después se sembró la semilla manualmente, una vez terminada la siembra, se le colocó una ligera capa de peat-moss encima de las charolas para evitar que las semillas quedaran descubiertas.

Una vez terminada la siembra, las charolas se colocaron en el invernadero, haciendo dos tarimas de 6 charolas cada una, después se taparon con un polietileno con la finalidad de que las charolas no perdieran humedad y se aumentara calor para favorecer la germinación de la semilla. Las charolas tardaron 4 días empalmadas y tapadas con el polietileno, posteriormente se descubrieron debido a que el 50% de las semillas ya iniciaban la germinación.

### **Riego**

El primer riego fue ocho días después de la siembra y cuatro después de la germinación, fue un riego suave para no sacar la semilla con el agua. Posteriormente el riego se realizó todas las mañanas utilizando un *aspersor pacto 8* haciendo aplicaciones de 1lt de agua por charola en los primeros 15 días posteriores a la germinación, después de los 15 días se regó dos veces

por día, uno por la mañana y el otro por la tarde. Después de 30 días transcurridos desde el primer riego, se aumento la cantidad de agua por charola y se aplicaron 2 lts de agua, regando en la mañana y en la tarde, y así hasta los 45 días después de la ultima toma de datos. Cabe mencionar que el agua fue un factor muy importante en el desarrollo y crecimiento de las plantas ya que las temperaturas en esas fechas eran muy elevadas por lo que las plantas requerían de un buen riego todos los días.

### **Fertilización**

En esta investigación se realizaron tres aplicaciones de fertilización, desde la siembra hasta antes de los 45 días del trasplante. Esto con el objetivo de promover un adecuado crecimiento de las plántulas. La fertilización consistió en la aplicación de triple 20 (N-P-K) en tres ocasiones durante los 45 días. La aplicación se llevo a cabo vía foliar con un aspersor. La primera aplicación fue 15 días después de la siembra y fue de 2 gr/1lt agua, la segunda aplicación fue a los 25 días con una cantidad de 3gr/1lt agua y la última aplicación fue a los 35 días con una cantidad de 4gr/1lt agua.

### **Aplicación de los Tratamientos**

Se hicieron marcos de madera cubiertos de polietileno de 70cm de largo y 37 de ancho, las charolas se colocaron sobre polietileno, donde se aplico una solución al 1% (1lt de agua/10 mm bacterias) de las bacterias y de los

productos evaluados, ya que las charolas habían absorbido la solución, posteriormente se retiraron de los marcos.

La primera aplicación se realizó el 28 de junio del 2011 (a los 6 días de germinado) entre 9:00am y 10am para evitar la evaporación del ingrediente activo, esto se realizó cuando las semillas estaban completamente germinadas. La segunda aplicación fue el 22 de julio del 2011 (25 días después de la primera aplicación) entre 9:00am y 10:00am, en esta fecha ya se había realizado la primer toma de datos.

## **Variables Evaluadas**

### **Trabajo de laboratorio**

El trabajo de laboratorio fue realizado en el CIQA y en PALAU BIOQUIM, las evaluaciones fueron el 14 de julio, 18 de julio, 4 de agosto y 8 de agosto del 2011, y las variables estimadas fueron:

### **Peso Fresco de Plántula (PFP)**

Se pesó cada planta de manera separada utilizando una balanza electrónica marca SCOUT PRO y los resultados obtenidos se reportaron en gramos (gr).

### **Diámetro de Tallo (DT)**

El diámetro se le tomo a cada uno de los tallos de la planta, para esto se utilizo un vernier digital con escala en milímetros (mm), se tomo unas sola lectura por tallo y posteriormente se reportaron en mm.

### **Altura de Plántula (AP)**

La altura de tallo se estimo desde la base de la plántula hasta la primera ramificación del tallo. Para esto se utilizo una regla de 50 cm y la altura se reporto en centímetros (cm).

### **Peso Fresco de Raíz (PFR)**

La raíz se separo del tallo para posteriormente medirla, para esto se tuvo que lavar con agua eliminando cualquier residuo de sustrato posteriormente se colocaron sobre papel periódico para retirar el exceso de humedad y obtener solo el peso fresco de raíz. Los datos fueron reportados en gr.

### **Longitud de Raíz (LR)**

Una vez ya limpias y secas a las raíces se les tomo la longitud con una regla graduada de 50 cm y posteriormente se reportaron las medidas en cm.

### **Peso Seco Parte Aérea de la Plántula (PSP)**

Las plántulas en forma individual se colocaron en bolsas de papel y fueron llevadas a un cuarto caliente con temperatura promedio de 65°C. Estas permanecieron cuatro días en el cuarto caliente, posteriormente se sacaron las plántulas y se pesaron en una balanza electrónica de precisión. Los datos fueron reportados en gr.

### **Peso Seco de Raíz (PSR)**

Se realizó el mismo procedimiento del punto anterior.

### **SPAD**

Se tomo el porcentaje de clorofila con un aparato de nombre SPAD, la lectura se tomo en las hojas de la planta. A cada repetición se le tomo 6 lecturas y posteriormente se saco la media. Los datos se reportaron como unidades SPAD.

## **Diseño Experimental**

Los 11 tratamientos se establecieron bajo un diseño de bloques completos al azar con nueve repeticiones con el programa estadístico SAS y se utilizo la comparación de medias, mediante la prueba de Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de varianza (ANVA) para las variables; peso de planta, altura de plántula, diámetro de tallo y longitud de raíz, se observa que hubo diferencias estadísticas altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) entre tratamientos, indicando que éstas variables respondieron de forma diferente por lo menos a la aplicación de un tratamiento (Cuadro 3). Para la fuente de variación repetición no se presentaron diferencias estadísticas significativas en ninguna de las variables estudiadas.

Cuadro 3. Cuadrados medios del análisis de varianza aplicado a variables obtenidas en plántulas de Tomate con tratamientos de bacterias fijadoras de nitrógeno y halófilas en invernadero.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrados medios			
		PFP	AP	DT	LR
Tratamiento	10	0.0742**	3.7932**	0.0513**	2.1409**
Repetición	8	0.0243	1.0217	0.0127	0.4243
Error	80	0.0169	0.7169	0.0169	0.3767
C.V. (%)		12.612	10.6450	6.6773	7.9856

C.V. = Coeficiente de Variación, PFP = Peso Fresco de Plántula, AP = Altura de Plántula, DT = Diámetro de Tallo, LR = longitud de Raíz; \*\* = Altamente Significativo ( $p \leq 0.01$ ).

### Comparación de Medias del Peso Fresco de Plántula

Al realizar la prueba de Tukey se encontraron diferencias altamente significativas para la variable peso fresco de plántula, obteniendo como resultado que el tratamiento 6 ( N<sub>2</sub>1) fue el que tuvo el peso fresco más elevado, seguido del tratamiento 11 (Testigo), 7 (N<sub>2</sub>2) son los mejores tratamientos (figura 1) ya que se ubicaron en el primer grupo de significancia, y fueron estadísticamente diferentes del tratamiento 3 (T. Comercial: Biospiril).



Figura 1. Valores medios del peso fresco de plántula obtenidos en los tratamientos bajo estudio en el cultivo de tomate.

El resultado obtenido puede ser por lo que menciona Kass del nitrógeno en las plantas. (Kass, 1998). Menciona que el nitrógeno estimula el crecimiento vegetativo, incrementa la masa protoplasmática y aumenta la succulencia foliar.

### Comparación de Medias de la Altura de Plántula

Al realizar la prueba de Tukey se encontró que el tratamiento 11 (Testigo) fue el que presentó el valor más alto, aunque fue estadísticamente igual a siete tratamientos más, mientras que el peor tratamiento fue el 3 (T. Comercial: Biospiril) que tuvo un valor estadísticamente inferior a cinco tratamientos, la Figura 2 muestra que Testigo tuvo el valor más alto.

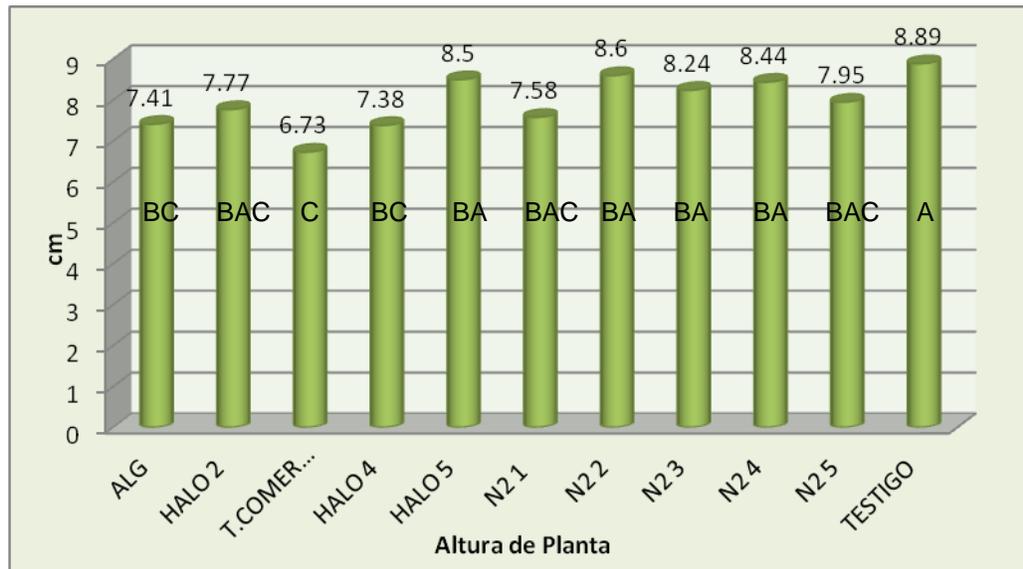


Figura 2. Comparación de medias de altura de plántula de tomate estudiada con aplicación de tratamientos de microorganismos benéficos.

Una de las razones por lo que el testigo salió muy alto, es por lo siguiente. Hernández *et al.* (2005) mencionan que las bacterias fijadoras de nitrógeno ejercen un efecto positivo dentro de un determinado rango de concentración, el cual desaparece por encima o por debajo de dicho rango, llegando a ejercer incluso, un efecto inhibitor fuera de estos límites.

### Comparación de medias del Diámetro de Tallo

Al realizar la prueba de Tukey se encontró que el tratamiento 6 (N<sub>2</sub>1) fue estadísticamente igual a ocho tratamientos, pero superior estadísticamente a dos tratamientos, el tratamiento con el valor más bajo fue el tratamiento 8 (N<sub>2</sub>2), seguido del tratamiento comercial. Lo cual se muestra en la Figura 3.

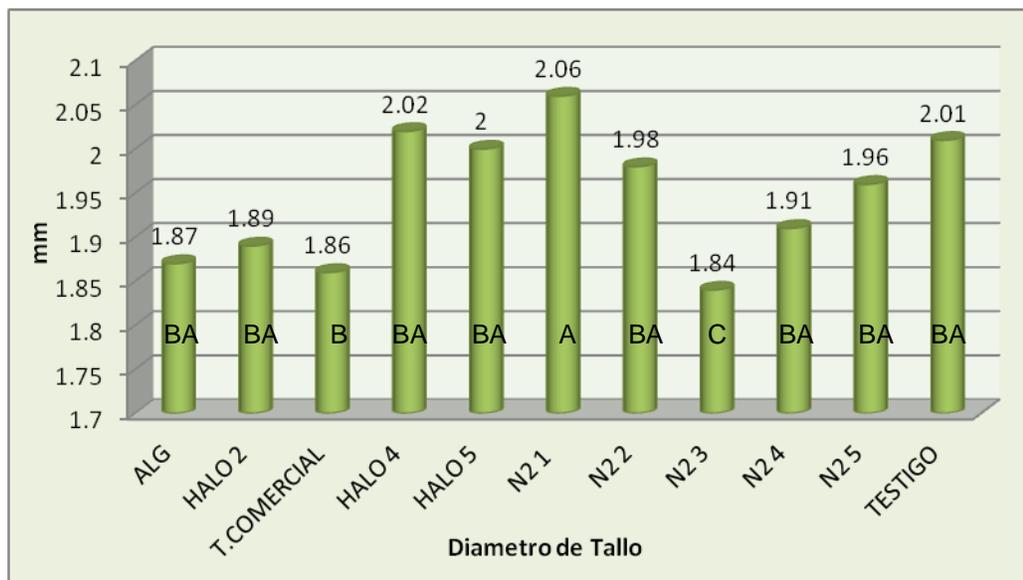


Figura 3. Comparación de medias de diámetro de tallo de plántulas de tomate con aplicación de tratamientos de microorganismos benéficos.

(Murty y Ladha, 1988) menciona que en un experimento realizado pudo observar que aparte de la posible fijación de nitrógeno, hay un efecto positivo de estas bacterias sobre la longitud de tallo, número, y área superficial de las raíces es debido a la secreción por las mismas de sustancias estimuladoras del crecimiento (fitohormonas), tales como auxinas, giberelinas y compuestos fenolicos.

### Comparación de medias de la Longitud de Raíz

Al realizar la prueba de Tukey se encontraron diferencias altamente significativas para la variable longitud de Raíz, donde el tratamiento 10 (N<sub>2</sub>5) fue estadísticamente igual a seis tratamientos, además este fue estadísticamente superior a cuatro tratamientos, entre éstos el tratamiento testigo fue el que presentó el valor más bajo, aunque fue estadísticamente igual a seis tratamientos, entre ellos el tratamiento con Algaenzims, lo cual se muestra en la Figura 4.

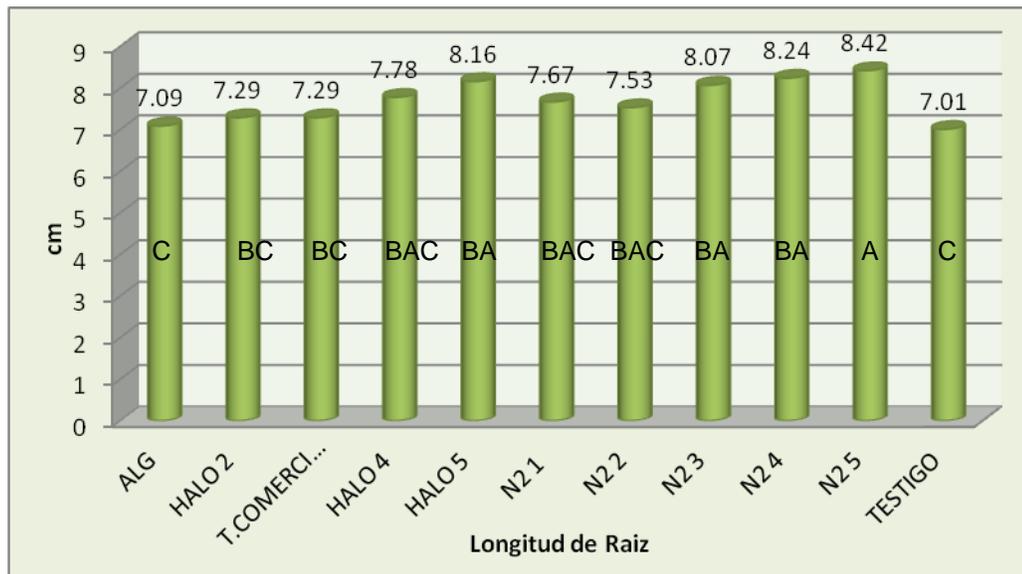


Figura 4. Comparación de medias de la longitud de raíz de plántulas de tomate con aplicación de tratamientos de microorganismos benéficos.

La posible causa de que las bacterias fijadoras de nitrógeno hayan tenido la mayor longitud de raíz es por lo siguiente. (Murty y Ladha, 1988) mencionan que en la mayoría de las especies vegetales estudiadas la colonización tiene lugar en la zona de elongación de las raíces, estimulando la densidad y longitud de los pelos radiculares.

El análisis de varianza aplicado a las variables peso seco de plántula, peso fresco de raíz y unidades SPAD, muestra que hubo diferencias estadísticas altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) entre tratamientos, indicando que éstas variables respondieron de forma diferente por lo menos a la aplicación de un tratamiento de bacterias (Cuadro 4), además indicando la gran diferencia que existe entre los tratamientos evaluados. Aunque no se encontraron diferencias estadísticas significativas en la variable peso seco de raíz, indicando que la aplicación de diferentes tipos de bacterias no afecta el comportamiento de ésta variable. Para la fuente de variación repetición no se presentaron diferencias estadísticas significativas para ninguna de las variables.

Cuadro 4. Cuadrados medios del análisis de varianza aplicado a peso seco, fresco y unidades de clorofila en plántulas de Tomate con tratamientos de bacterias fijadoras de nitrógeno y halófilas en invernadero.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrados medios			
		PFR	PSP	PSR	SPAD
<b>Tratamiento</b>	10	0.1834**	0.0014**	0.0006	20.7905**
<b>Repetición</b>	8	0.0834	0.0006	0.0001	7.0189
<b>Error</b>	80	0.0474	0.0006	0.0003	4.4062
<b>C.V.(%)</b>		28.038	13.758	24.881	5.465

CV = Coeficiente de Variación, PFR = peso fresco de raíz, PSP = Peso Seco de Plántula, PSR = peso seco de raíz, SPAD = Unidades de Clorofila; \*\* Significativo ( $p \leq 0.01$ ).

### Comparación de Medias del Peso Fresco de Raíz

Al realizar la prueba de Tukey se encontró que el tratamiento 6 (N<sub>2</sub>1) presentó el mayor peso fresco de raíz aunque fue estadísticamente igual a seis tratamientos más. Mientras que el tratamiento 3 (Comercial: Biospiril) fue el que presentó el menor valor y fue estadísticamente igual a los tratamientos 1,4, 5,7, 8,10 y 11 lo cual se muestra en la Figura 5.

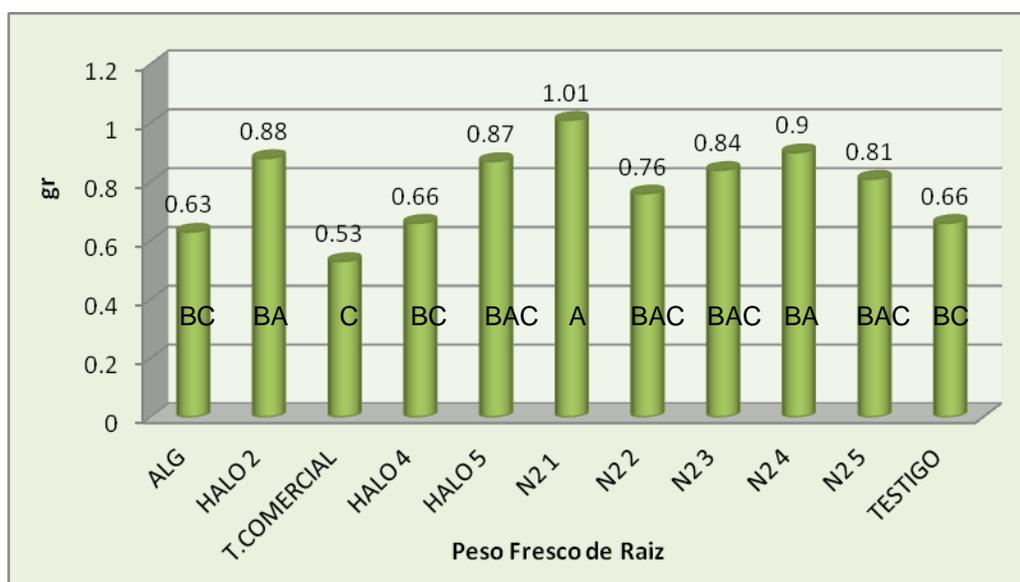


Figura 5. Comparación de medias del peso fresco de raíz de tomate con aplicación de tratamientos de microorganismos benéficos.

El posible efecto que las bacterias fijadoras de nitrógeno obtengan un mayor peso en raíz de tomate, es por lo siguiente. Ocon y Labandera-Gonzales (1994) han indicado que *Azospirillum* estimula la densidad y longitud de los pelos radiculares, a si como el crecimiento de raíces secundarias y la superficie radicular

### Comparación de Medias del Peso Seco de Plántula

Al realizar la prueba de Tukey se encontró que el tratamiento 10 (N<sub>2</sub>5) presentó el mayor peso seco de plántula aunque fue estadísticamente igual a siete tratamientos más, además este fue superior estadísticamente a dos tratamientos, entre estos esta el tratamiento Comercial: Biospiril y el tratamiento 4 (Halo 4) son estadísticamente iguales y fueron los que presentaron el valor más bajo, como se muestra en la Figura 6.

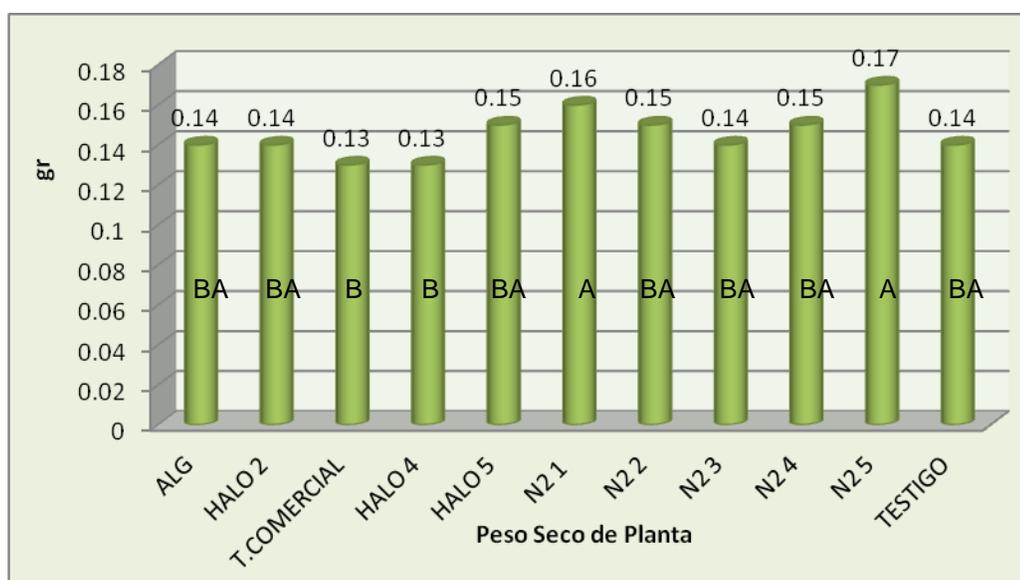


Figura 6. Comparación de medias del peso seco de plántulas de tomate con aplicación de tratamientos de microorganismos benéficos.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que las bacterias fijadoras de nitrógeno tuvieron el valor más alto, una de las posibles causas es debido a que la fijación o nutrición de nitrógeno permite favorecer el crecimiento vegetal por lo tanto induciendo.

### Comparación de Medias del Peso Seco de Raíz

Al realizar la prueba de Tukey se encontró que el tratamiento 7 (N<sub>2</sub>2) fue el que tuvo el mayor peso seco de raíz aunque fue estadísticamente igual a nueve tratamientos, fue estadísticamente superior al tratamiento testigo, que tuvo el valor más bajo dentro de los once tratamientos, como se muestra en la Figura 7.



Figura 7. Comparación de medias del peso seco de raíz de tomate con aplicación de tratamientos de microorganismos benéficos.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que las bacterias fijadoras de nitrógeno indujeron el valor más alto. Esto se puede deber a que en peso fresco estas obtuvieron el mayor peso, por la misma razón en la variable indicada.

### Comparación de Medias de las Unidades Spad

Al realizar la prueba de Tukey se encontró que el tratamiento 10 (N<sub>2</sub>5) tuvo el valor más alto aunque fue estadísticamente igual a seis tratamiento, además este fue estadísticamente superior a cuatro tratamientos, entre estos el tratamiento con el valor más bajo, que fue el tratamiento ocho y éste fue igual estadísticamente a ocho tratamientos, como se muestra en la Figura 8.

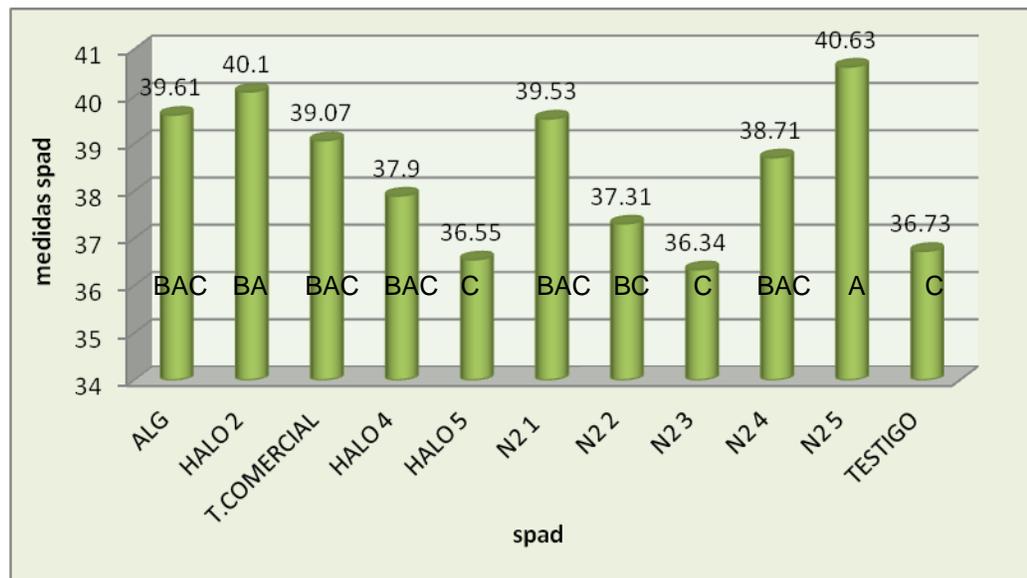


Figura 8. Comparación de medias de las medidas Spad en plántulas de tomate con aplicación de tratamientos de microorganismos benéficos.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede mencionar que la posible causa es por lo que menciona Baldani et al. (1987). diferentes experimentos han puesto de manifiesto que la inoculación de semillas de trigo con bacterias fijadoras de nitrógeno produce un incremento en la cantidad total de nitrógeno, entonces cuando las raíces de las plantas absorben el amoniaco o el nitrato que se formaron por fijación y nitrificación, estas e incorporan el nitrógeno en proteínas, ácidos nucleídos y clorofila. Puede ser la razón de que las bacterias fijadoras de nitrógeno tengan un mayor porcentaje de clorofila.

### **Contrastes Ortogonales**

De acuerdo a la prueba de contrastes ortogonales, se hizo la comparación de medias donde el contraste 1 (Algaenzims) se comparo contra todos los tratamientos, obteniendo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) para (AP) y (PFR), indicando que en éstos casos las algaenzims fueron superadas estadísticamente por el valor medio del resto de los tratamientos. En cambio el valor medio de la variable LR tratado con algaenzimas fue estadísticamente inferior al valor medio del resto de los tratamientos ( $p \leq 0.01$ ), como se muestra en el cuadro 5.

El Cuadro 6 muestra los contrastes ortogonales resultantes de comparar las bacterias (Halófilas) contra el resto de tratamientos, los resultados indican que las bacterias halófilas indujeron un diámetro de tallo significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ), al valor medio del resto de los tratamientos. Sin embargo en las variables PFP, AP y SPAD la media de todos los tratamientos presento un valor estadísticamente superior ( $p \leq 0.01$ ) al valor observado con la aplicación de las bacterias halófilas. Lo antes indicado permite deducir que las bacterias halófilas no favorecen el peso fresco de plántula, altura de plántula o contenido de clorofila, como se muestra en el Cuadro 6.

Cuadro 5. Contrastes ortogonales de la media de Algaenzims contra la media de los tratamientos restantes.

<b>Contraste 1</b>			
<b>Variable</b>	<b>Efecto medio de Algaenzims</b>	<b>Efecto medio del Resto de tratamientos</b>	<b>Pr &gt; F</b>
PFP (gr)	0.9944	1.0372	0.3506
AP (cm)	7.4089	8.0085	0.0461*
DT (mm)	1.8733	1.9528	0.0837
LR (cm)	7.0889	7.7455	0.0030**
PFR (gr)	0.6333	0.7911	0.0415*
PSP (gr)	0.1355	0.1461	0.1345
PSR (gr)	0.0711	0.0706	0.9426
SPAD (clorofila)	39.6178	38.2916	0.0745

PFP= peso fresco de plántula; AP= altura de plántula; DT= diámetro de tallo; LR= longitud de raíz; PFR= peso fresco de raíz; PSP= peso seco de plántula; PSR= peso seco de raíz; SPAD= contenido de clorofila; \* = Significativo ( $p \leq 0.05$ ) y \*\* = Significativo ( $p \leq 0.01$ ).

Cuadro 6. Contrastes ortogonales de la media de bacterias halófilas contra la media del resto de los tratamientos.

<b>Contraste 2</b>			
<b>Variable</b>	<b>Efecto medio de Bacterias halófilas</b>	<b>Efecto medio del Resto de tratamientos</b>	<b>Pr &gt; F</b>
PFP (gr)	0.9963	1.0472	0.0002**
AP (cm)	7.8899	7.9806	0.0011**
DT (mm)	1.9685	1.9370	0.0486*
LR (cm)	7.7407	7.6652	0.8494
PFR (gr)	0.8000	0.7680	0.3165
PSP (gr)	0.1407	0.1468	0.5806
PSR (gr)	0.0711	0.0705	0.6174
SPAD	38.1896	38.4956	<.0001**

PFP= peso fresco de plántula, AP= altura de plántula, DT= diámetro de tallo, LR= longitud de raíz, PFR= peso fresco de raíz, PSP= peso seco de plántula, PSR= peso seco de raíz, SPAD= medidas clorofila. \* Significativo ( $p \leq 0.05$ ) y \*\* Altamente Significativo ( $p \leq 0.01$ ).

El contraste 3 muestra la comparación del efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno contra el valor medio del resto de los tratamientos. Encontrando que en las variables (DT), (LR), (PFR) las B. Fijadoras de N superaron estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ) el valor medio de los demás grupos. En éste sentido Ocon y Labandera-Gonzales (1994), señalan que las bacterias fijadoras de nitrógeno estimulan la densidad y longitud de los pelos radiculares, a si como el crecimiento de raíces secundarias y la superficie radicular, por lo tanto teniendo mayor capacidad de exploración por agua y nutrientes, logrando con ello un mayor desarrollo de las plántulas. También las bacterias fijadoras de nitrógeno indujeron una producción de clorofila significativamente ( $p \leq 0.01$ ) mayor al valor medio observado en el resto de los tratamientos.

Cuadro 7. Contrastes ortogonales de la media de Bacterias fijadores de nitrógeno contra la media de los tratamientos restantes.

<b>Contraste 3</b>			
<b>Variable</b>	<b>Efecto medio de Bacterias fijadoras de N</b>	<b>Efecto medio del resto de tratamientos</b>	<b>Pr &gt; F</b>
PFP (gr)	1.0777	0.9962	0.1078
AP (cm)	8.1626	7.7801	0.2551
DT (mm)	1.9511	1.9411	0.0202*
LR (cm)	7.9866	7.4351	0.0252*
PFR (gr)	0.8644	0.7037	0.0406*
PSP (gr)	0.1546	0.1372	0.1381
PSR (gr)	0.0737	0.0681	0.3147
SPAD (clorofila)	38.5084	38.3320	0.0003**

PFP= peso fresco de plántula, AP= altura de plántula, DT= diámetro de tallo, LR= longitud de raíz, PFR= peso fresco de raíz, PSP= peso seco de plántula, PSR= peso seco de raíz, SPAD= medidas clorofila. \* Significativo ( $p \leq 0.05$ ) y \*\* Altamente Significativo ( $p \leq 0.01$ ).

La prueba de contrastes ortogonales, permitió la comparación de medias del efecto de las bacterias fijadoras de nitrógeno contra el efecto de las bacterias halófilas, encontrando que con las bacterias halófilas indujeron un DT estadísticamente ( $p \leq 0.05$ ) superior al efecto inducido por las fijadoras de nitrógeno. Las bacterias fijadoras de nitrógeno indujeron una respuesta significativamente mayor que las bacterias halófilas en las variables PFP, AP y SPAD (Cuadro 8). Lo antes indicado demuestra que las B. Fijadoras de N fueron mejores que las B. Halófilas, en éste sentido Baldani *et al.* (1987), encontró que la inoculación de semillas de trigo con bacterias fijadoras de nitrógeno, tuvieron o un incremento en la cantidad total de nitrógeno tomado por la planta.

Cuadro 8. Contrastes ortogonales de la media de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno contra la media de los tratamientos de Bacterias Halófilas.

Contraste 4			
Variable	Efecto medio de Bacterias fijadoras de N	Efecto medio de Bacterias halófilas	Pr > F
PFP (gr)	1.0777	0.9963	0.0012**
AP (cm)	8.1626	7.8899	0.0064**
DT (mm)	1.9511	1.9685	0.0177*
LR (cm)	7.9866	7.7407	0.2494
PFR (gr)	0.8644	0.8000	0.1090
PSP (gr)	0.1546	0.1407	0.2962
PSR (gr)	0.0737	0.0711	0.4286
SPAD (clorofila)	38.5084	38.1896	<.0001**

PFP= peso fresco de plántula; AP= altura de plántula; DT= diámetro de tallo; LR= longitud de raíz; PFR= peso fresco de raíz; PSP= peso seco de plántula; PSR= peso seco de raíz; SPAD= medida de clorofila; \* Significativo ( $p \leq 0.05$ ) y \*\* Altamente Significativo ( $p \leq 0.01$ ).

De acuerdo a la prueba de contrastes ortogonales, se hizo la comparación de medias donde el contraste 5 (Bacterias Fijadoras de N) se comparo contra Algaenzims. Obteniendo valores significativamente superiores ( $p \leq 0.05$ ) en las variables AP, DT y PFR con el tratamiento que recibió las bacterias fijadoras, en comparación con el efecto observado con las Algaenzims. En las variables LR y SPAD los efectos fueron similares ya que el tratamiento con bacterias fijadoras supero estadísticamente ( $p \leq 0.01$ ) al tratamiento con bacterias halófilas, lo observado con los tratamientos bajo estudio demuestra que las bacterias fijadoras de nitrógeno superaron al resto de los tratamientos bajo estudio.

Cuadro 9. Contrastes ortogonales de la media de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno contra la media de los tratamientos con Algaenzims.

<b>Contraste 5</b>			
<b>Variable</b>	<b>Efecto medio de Bacterias fijadoras de N</b>	<b>Efecto medio de Algaenzims</b>	<b>Pr &gt; F</b>
PFP (gr)	1.0777	0.9944	0.1948
AP (cm)	8.1626	7.4089	0.0381*
DT (mm)	1.9511	1.8733	0.0279*
LR (cm)	7.9866	7.0889	0.0012**
PFR (gr)	0.8644	0.6333	0.0173*
PSP (gr)	0.1546	0.1355	0.0809
PSR (gr)	0.0737	0.0711	0.8093
SPAD (clorofila)	38.5084	39.6178	0.0079**

PFP= peso fresco de plántula, AP= altura de plántula, DT= diámetro de tallo, LR= longitud de raíz, PFR= peso fresco de raíz, PSP= peso seco de plántula, PSR= peso seco de raíz, SPAD= medidas clorofila. \* Significativo ( $p \leq 0.05$ ) y \*\* Altamente Significativo ( $p \leq 0.01$ ).

## **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos permiten afirmar que las bacterias fijadoras de nitrógeno tienen un efecto significativamente superior al resto de los tratamientos en las variables bajo estudio.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno promueven el desarrollo de variables como altura de planta, diámetro de tallo, longitud de raíz, peso fresco de raíz y contenido de clorofila.

Las bacterias N2-1 y N2-5 fueron las que presentaron los mayores valores en mayor número de variables, por lo tanto se puede indicar que fueron las más sobresalientes en la promoción del crecimiento de las plántulas de tomate.

Es probable que el uso de las bacterias N2-1 y N2-5 en forma combinada pudieran tener una respuesta aún mayor a la observada en el presente trabajo.

## LITERATURA CITADA

- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. and Dobereiner, J. 1987. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. In Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, 4: 37-40.
- Burgueño, C. H. 2001. Técnicas de producción de solanáceas en invernadero, diapositivas 102-104. En: *Memorias del 1<sup>er</sup> Simposio Nacional de Técnicas Modernas en Producción de Tomate, papa y otras Solanáceas*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
- Bringas, G.L. 2004. Producción de Tomate en Climas Extremos. *Revista Productores de Hortaliza*. Agosto 2004. Editorial Richard Jones. México.
- Canales López Benito (1997). *Las Algas en la Agricultura Orgánica*. Ed. Consejo Editorial del Gobierno del Estado de Coahuila. 323 págs.
- Cedaf, 1993. Cultivo de tomate de mesa. Tomado de: <http://www.rediaf.net.do/publicaciones/guias/detalle.asp?Codigo=CU19>. Consultado 07 de diciembre 2011.
- DasSarma S. 1995. Halophilic arquea: An Overview. En: DasSarma S., Fleischmann E.M (eds), *Arquea a laboratory manual*. Cold spring Harbor Laboratory Press, USA, pp 3-11.
- Esquinas-Alcázar J. y Nuez F. 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. En: Nuez V., F., Rodríguez Del R., A., Tello, J., Cuartero, J. y Segura. B. (eds.). *El cultivo del tomate*, pp 11-42. Nuez F. ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- FAO, 1996. Fijación biológica del Nitrógeno. Desde el surco. Impresión Publingraf. Quito, Ecuador. p 54-56.
- FAO, 2005. Gerencia de inteligencia de mercados sub-gerencia Mercado al exportador. Tomado de: [http://www.cei-rd.gov.do/estudios\\_economicos/estudios\\_productos/perfiles/TOMATE\\_2007.pdf](http://www.cei-rd.gov.do/estudios_economicos/estudios_productos/perfiles/TOMATE_2007.pdf). Consultado el 2 de diciembre 2011

- Frings E, Sauer T, Galinski EA. Production of hydroxyectoine: high cell-densit. Cultivation and osmotic downshock of *Marinococcus* strain M52. *J Biotechnol* 1995; 43: 53-61.
- Hernández, C. García, J.A Pascual y M. Hernández. 2005. Posible efecto fitohormonal de las bacterias fijadoras de nitrógeno. *Revista Agropecuaria* 870: 62-66.
- Kamekura M, Hamawata T, Onishi H. Application of halophilic nuclease H from *Micrococcus varians* subs. *halophilus* to commercial pruction of flavoring agent 5'-GMP. *Appl Environ Microbiol* 1982; 44: 994-5.
- Kass, D. 1998. Fertilidad de los suelos. 1era impresión. EUNED. San José, Costa Rica. 233.
- Kushner DJ. 1978. Life in high salt and solute concentrations. In: Kushner D.J. (ed) *Microbial life in extreme enviroments*. Academic Press, London. pp 317-368.
- Krieg, N; Dobereiner, J. 1984. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Section 2. Volumen 1. Krieg, N; Holt, J (editores).
- León G., H. M. 2001. Manual para el cultivo de tomate en invernadero. Gobierno del Estado de Chihuahua.
- Louis P, Trüper HG, Galinski E. Survival of *Escherichia coli* during drying and storage in the presence of compatible solutes. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994; 41: 648-88.
- Madigan M.T., Martinko J.m., Parker J.2003. *Diversidad Procariotica: Archea*. En: Madigan M.T., Martinko J.M., Paeker J. (eds). *Brock Microbiología de los Microorganismos*. Tenth edition. Ed. Pearson-Prentice Hall, Madrid, pp 741-766.
- Madigan; Martinko, J; Parker, J. 1999. *Biología de los microorganismos*. Ed Prentice Hall Iberia, 8ava edición. Madrid, España. 986 p.
- Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 2001; 5: 73-83.
- Martínez, V R. 2002 *Biofertilizacion y producción agrícola sostenible. Retos y perspectivas*. XIII Congreso científico del INCA. Programa y resúmenes. La Habana.
- Moroto, J. 1995. *Horticultura herbácea especial*. Cuarta edición. Editorial Mundi Prensa. Madrid, España. 611p.

- Muños R.J.J. 2003. El cultivo de tomate en invernadero. P.26 En: J.J. Muñoz Ramos y J.Z. Castellanos (Eds). Manual de producción Hortícola en invernadero. INCAPA. México.
- Murty, M.G., and Ladha, J.K. 1988. Influence of Azospirillum inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plant and Soil*, 108: 281-285.
- Ocon y Labandera-Gonzalez. CA.1994. Agronomic application of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 1591-1601.
- Pérez, S.; Torralba, A. 1997.La fijación del Nitrógeno por los seres vivos. Seminario Fisiología Vegetal, 21.01. Facultad Biología Oviedo. Tomado de: <http://scriptusnaturae.8m.com/Articulos/FijN/asociativa.html>. Consultado 31 de octubre 2011.
- Pineda, R. 1996. A propósito de ecología, agricultura y fertilizantes. Desde el surco. Impresión Publingraf. Quito, Ecuador. p 43-51.
- Quintero, S.J. 1998 Invernaderos: Sistema Agrícola México.
- RAO, S. (editor), 1984. Current Developments in Biological Nitrogen Fixation. Gran Bretaña. 350 p.
- Russell N.J. 1993. Lipidos of halophilic and halotolerant microorganisms. En: R.H. Vreenland y L.I. Hochstein (eds). *The Biology of Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC press. USA, pp. 163-2010.
- Sade, A. 1998. Cultivos bajo condiciones forzados. Naciones Generales. Rejovot, Israel. P. 143.
- Sauer T, Galinski EA. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng* 1998; 57: 306-13.
- Subdepartamento Gestión de Información de ProChile 2010. Tomado: [http://www.prochile.cl/documentos/2010/MI\\_tomate\\_fresco.pdf](http://www.prochile.cl/documentos/2010/MI_tomate_fresco.pdf). Consultado 20 de octubre 2011.
- Ventosa A, Nieto JJ. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J Microb Biotechnol* 1995; 11: 85–94.
- Ventosa A. 1988. Taxonomy of moderately halophilic heterophilic eubacteria, p. 71-84. En F. Rodríguez-Valera (ed), *Halophilic Bacteria*. Boca Raton: CRC Press.
- Williams, D.E. 1990. A review of sources for the study of nahuatl plant classification. *Adv. Econ. Bot.* 8. pp. 249-270.

- Yosida M, Matsubara K, Kudo T, Horikoshi K. *Actinopolyspora mortivallis* sp. Nov; a moderately halophilic actinomycete. *Int J Syst Bacteriol* 1991; 15-20.
- Zaady, E. and Perevolotsky, A. (1995). Enhancement of growth and establishment of Oak (*Quercus ithaburensis* Decaine) seedling by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Forest Ecology Management* 72: 81-83.

## APÉNDICE DE ANALISIS ESTADISTICOS DE LOS 11 TRATAMIENTOS

### PESO FRESCO DE PLANTULA.

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

TUKEY AGRUPAMIENTO	MEDIA	N	TRAT
A	1.15556	9	T6
A	1.13889	9	TES
A	1.10556	9	T7
A	1.10000	9	T9
A	1.06667	9	T5
BA	1.03889	9	T10
BA	1.99444	9	ALG
BA	1.98889	9	T8
BA	1.96667	9	T4
BA	1.95556	9	T2
B	1.85556	9	TC

### ALTURA DE LA PLANTULA

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

<b>TUKEY AGRUPAMIENTO</b>	<b>MEDIA</b>	<b>N</b>	<b>TRAT</b>
<b>A</b>	8.8922	9	TES
<b>BA</b>	8.6044	9	T7
<b>BA</b>	8.4989	9	T5
<b>BA</b>	8.4367	9	T9
<b>BA</b>	8.2433	9	T8
<b>BAC</b>	8.9467	9	T10
<b>BAC</b>	8.7744	9	T2
<b>BAC</b>	8.5822	9	T6
<b>BC</b>	8.4089	9	ALG
<b>BC</b>	8.3756	9	T4
<b>C</b>	8.7311	9	TC

### DIAMETRO DE TALLO

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

TUKEY AGRUPAMIENTO	MEDIA	N	TRAT
A	2.06222	9	T6
BA	2.02000	9	T4
BA	2.01000	9	TES
BA	1.99667	9	T5
BA	1.98333	9	T7
BA	1.96222	9	T10
BA	1.91222	9	T9
BA	1.88889	9	T2
BA	1.87333	9	ALG
B	1.85778	9	TC
C	1.83556	9	T8

### LONGITUD DE RAIZ

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

<b>TUKEY AGRUPAMIENTO</b>	<b>MEDIA</b>	<b>N</b>	<b>TRAT</b>
<b>A</b>	8.4222	9	T10
<b>BA</b>	8.2444	9	T9
<b>BA</b>	8.1556	9	T5
<b>BA</b>	8.0667	9	T8
<b>BAC</b>	7.7778	9	T4
<b>BAC</b>	7.6667	9	T6
<b>BAC</b>	7.5333	9	T7
<b>BC</b>	7.2889	9	TC
<b>BC</b>	7.2889	9	ALG
<b>C</b>	7.0889	9	T2
<b>C</b>	7.0111	9	TES

### PESO FRESCO DE RAIZ

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

TUKEY	MEDIA	N	TRAT
<b>AGRUPAMIENTO</b>			
A	1.0111	9	T6
BA	0.9000	9	T9
BA	0.8778	9	T2
BAC	0.8667	9	T5
BAC	0.8444	9	T8
BAC	0.8111	9	T10
BAC	0.7556	9	T7
BC	0.6556	9	T4
BC	0.6556	9	TES
BC	0.6333	9	ALG
C	0.5333	9	TC

### PESO SECO DE PLANTULA

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

TUKEY AGRUPAMIENTO	MEDIA	N	TRAT
A	0.165556	9	T10
A	0.163333	9	T6
BA	0.154444	9	T5
BA	0.151111	9	T9
BA	0.148889	9	T7
BA	0.144444	9	T8
BA	0.137778	9	TES
BA	0.136667	9	T2
BA	0.135556	9	ALG
B	0.131111	9	T4
B	0.127778	9	TC

### PESO SECO DE RAIZ

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

TUKEY	MEDIA	N	TRAT
AGRUPAMIENTO			
A	0.087778	9	T7
BA	0.078889	9	T9
BA	0.073333	9	T4
BA	0.071111	9	ALG
BA	0.071111	9	T2
BA	0.070000	9	T6
BA	0.068889	9	T10
BA	0.068889	9	T5
BA	0.067778	9	TC
BA	0.063333	9	T8
B	0.056667	9	TES

### Medidas SPAD

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

TUKEY	MEDIA	N	TRAT
<b>AGRUPAMIENTO</b>			
A	40.6389	9	T7
BA	40.1078	9	T9
BAC	39.6178	9	T4
BAC	39.5389	9	ALG
BAC	39.0722	9	T2
BAC	38.7111	9	T6
BAC	37.9056	9	T10
BC	37.3111	9	T5
C	36.7333	9	TC
C	36.5556	9	T8
C	36.3422	9	TES