

# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**



**EVALUACION DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO, EN  
PLANTULAS DE MAIZ Y SORGO, AISLADAS DE DIFERENTES REGIONES  
DE MEXICO.**

**Presentada por:**

**RUTH BETSABE CUVAS LIMON**

**TESIS**

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

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**Buenavista, Saltillo Coahuila, México.**

**Mayo 2013**

"UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO"

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESIS

Evaluación de bacterias promotoras de crecimiento, en plántulas de maíz y sorgo,  
aisladas de diferentes regiones de México.

POR:

RUTH BETSABE CUVAS LIMON

Que se somete a la consideración del comité H. Jurado Examinador como Requisito  
Parcial para obtener el Título en:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

APROBACIÓN DE TESIS:

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Presidente

Dr. Julio Cesar Montañez Saenz

Vocal

Dra. Susana González Morales

Vocal

Dr. Rubén López Escobedo

Vocal

Dr. Ramiro López Trujillo

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL.



*DEDICATORIAS*

*A DIOS:*

*Per todas las bendiciones que ha derramado sobre mí, por la vida, por los padres tan maravillosos que me ha dado, por mis hermanos y por todas las metas que me ha permitido lograr, por darme la fortaleza, la fe y la sabiduría para afrontar cada reto.*

*A mis padres:*

*Juana Limón de la Vega y Manuel Cuvas Valdivia,*

*Por el apoyo incondicional que me han brindado y por su amor infinito, son mi fortaleza de cada día, y la razón más importante en mi vida, sin ustedes simplemente no sería nada, los amo.*

*A mis hermanos:*

*Jesús Manuel Cuvas Limón y Yaiza de Gpe. Cuvas Limón,*

*Que siempre me alentaron y me sacaron muchas sonrisas en los momentos más difíciles son mis niños consentidos, los amo.*

---

AGRADECIMIENTOS.

**AL DR. MARIO ALBERTO CRUZ HERNÁNDEZ**, por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por sus conocimientos compartidos, su apoyo, y sus consejos, eternamente agradecida.

**AL DR. JULIO CESAR MONTAÑEZ SAENS**, por la oportunidad, por el apoyo y los conocimientos brindados durante la realización de este trabajo.

**A LA DRA. SUSANA GONZALES MORALES**, por toda la paciencia que tuvo conmigo, por todo su apoyo, por los conocimientos brindados, agradezco infinitamente su colaboración.

**AL DR. ALEJANDRO** por sus conocimientos brindados.

**AL DR. RUBEN LOPEZ CERVANTES**, por el apoyo brindado para que este proyecto culminara.

**Y A LA EMPRESA FME** Por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto.

**A ANAHI Y MARY**, por sus enseñanzas, por su ayuda y por sus tips.

**A mis amigas, KATY, CARMEN, ALE, KAROL, ALE AGUILAR** que las quiero mucho, compartimos momentos increíbles, aprendí mucho de ustedes, eternamente agradecida por su linda amistad.

**A LUIS**, por estar siempre ahí, cuando más necesité palabras de aliento, por darme mil alegrías, y por tu cariño.

**A MIS COMPAÑEROS DE GENERACIÓN**, me quedo con lo mejor de cada uno.

**A TODOS MIS MAESTROS**, por sus conocimientos transmitidos, por su paciencia y motivación, por darme las herramientas para enfrentar el mundo laboral.

**A mi "ALMA MATER"**, por abrirme las puertas a esta maravillosa casa de estudios, por darme la oportunidad de cumplir esta meta, por todas las oportunidades que en ella encontré, orgullosamente egresada de la "UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO."

**Contenido**

RESUMEN.....	v
INTRODUCCION.....	6
JUSTIFICACION.....	9
OBJETIVOS.....	11
3.1 Objetivo general.....	11
3.2 Objetivos especificos.....	11
ANTECEDENTES.....	12
4.1 Definición e impacto de los biofertilizantes.....	12
4.2 El nitrógeno.....	15
4.3 Fijación biológica de Nitrógeno.....	16
4.4 Historia del uso de Biofertilizantes.....	17
4.5 Biofertilización en México.....	20
4.6 Fertilización en maíz y sorgo.....	29
4.7 Biofertilización en maíz y sorgo.....	31
4.8 <i>Bacillus megaterium</i> .....	35
4.9 <i>Vrgibacillus koreensis</i> .....	37
4.10 <i>Ensifer adhaerens</i> .....	38
4.11 <i>Brevibacterium frigitolerans</i> .....	39
4.12 Tratamiento de semillas con clotianidina.....	41
4.13 Características de la Clotianidina.....	42
METODOLOGIA.....	47
5.1 Localización del sitio experimental.....	47
5.2 Análisis de datos.....	47
5.3 Variables evaluadas.....	47
5.4 Material experimental.....	47
5.5 Material vegetativo.....	48

---

5.6 Material biológico.....	48
5.7 Aislamiento y conteo de presencia de microorganismos.....	48
5.8 Capacidad fijadora de nitrógeno. ....	49
5.9 Cultivo de microorganismos. ....	49
5.10 Tratamiento de la semilla.....	50
5.10.1 Sanitización de semillas. ....	50
5.10.2 Preparación de sustrato.....	50
5.11 Preparación de inóculo.....	50
5.12 Inoculación de semillas.....	50
5.13 Siembra. ....	53
5.14 Variables evaluadas .....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	55
6.1 Selección de cepas .....	55
6.2 Prueba de promoción de crecimiento en plántulas .....	56
6.2.1 Maíz sin clotianidina .....	56
6.2.2 Maiz con Clotianidina. ....	62
6.2.3 Sorgo sin Clotianidina.....	67
6.2.4 Sorgo con Clotianidina.....	74
6.3 Cepas con rendimientos mayores. ....	80
6.4 Evaluacion de la poblacion microbiana de la raiz. ....	83
CONCLUSIONES.....	85
REFERENCIAS BIBLIORAFICAS.....	86

**RESUMEN.**

A consecuencia de los abusos con los usos excesivos de los fertilizantes químicos en suelos, los cuales han quedado infértiles e improductivos, sin nombrar el daño que se causa al medio ambiente, se buscan tecnologías que permitan mejorar los rendimientos de los cultivos en la agricultura pero sin dañar los suelos. Con solución a esta problemática los biofertilizantes vienen a ser una alternativa muy prometedora, puesto que contrarrestan los problemas mencionados como se ha demostrado en varios estudios realizados

El presente trabajo se enfoca, en evaluar microorganismos con potencial de actuar como promotores de crecimiento en plántulas de maíz y sorgo. Las cuatro cepas evaluadas fueron: *Bacillus megaterium* strain IAN13418 aislada del estado de Tamaulipas, *Virgibacillus koreensis* strain BH30097 aislada del estado de Veracruz, *Ensifer adhaerens* strain LMG 20216 aislada del estado de Hidalgo y *Brevibacterium frigoritolerans* strain DSM 8801 aislada del estado de Coahuila. Dichas bacterias se evaluaron en plántulas de maíz y sorgo con clotianidina y maíz y sorgo sin poncho bajo condiciones de invernadero. Puesto que la clotianidina poncho es un insecticida que se agrega comúnmente a las semillas, era necesario evaluar si causa algún efecto en las bacterias promotoras de crecimiento.

Los resultados obtenidos indican que la cepa con mayor efecto biofertilizante fué *Ensifer adhaerens* strain LMG 20216 aislada del estado de Hidalgo, al presentar los valores más altos de los parámetros evaluados como altura de planta, altura de raíz, numero de hojas, peso fresco de tallo y raíz y peso seco de tallo y raíz en el cultivo de sorgo con clotianidina. Respecto al poncho se comprobó que no presenta efectos negativos en plántulas y bacterias promotoras de crecimiento, por el contrario el clotianidina beneficia el porcentaje de germinación.

## **CAPITULO I**

### **INTRODUCCION.**

En los últimos años la agricultura ha sido sometida al uso intensivo de fertilizantes químicos y plaguicidas, puesto que los fertilizantes son de gran importancia para el desarrollo y buen crecimiento de las plantas, además de que ofrecen un gran aporte en suelos caracterizados por ser arcillosos y pobres en materia orgánica, nitrógeno y fósforo, lo cual implica una limitante en la producción de los cultivos en estas zonas y para mantener altas producciones, sin tener en cuenta que se ocasiona destrucción del medio ambiente y de los mismos suelos, evidenciado principalmente en la pérdida de productividad, alteración de la calidad de los productos agrícolas, contaminación del ambiente y problemas de salud en la población.

Debido a esta problemática que enfrenta la agricultura de poder tener excelente productividad, incrementar los rendimientos pero a su vez no hacer más daños a la tierra sino por el contrario restaurar los suelos, ayudar a mejorar la ecología, es así como se buscan soluciones, alternativas en las tecnologías de la producción.

En busca de estos resultados se ha recurrido al uso de biofertilizantes para mejorar la absorción de nutrimentos, agua del suelo y para mantener una agricultura sostenible

Se denomina biofertilizante a un producto que contiene uno o varios microorganismos del suelo y puede ser aplicado a la semilla o al suelo con el fin de incrementar su número, asociarse directa o indirectamente al sistema radical de las plantas, favorecer su interacción e incrementar el desarrollo vegetal y reproductivo de la planta huésped.

Los biofertilizantes no provocan daño en la salud del hombre ni en el ambiente y pueden ser aplicados a diversos cultivos de interés económico y en casi todos los tipos de suelos, pero

con mayor respuesta en los de baja fertilidad. Son fáciles de transportar en comparación con los fertilizantes de origen químico.

Se ha reportado que los microorganismos fijadores de nitrógeno, juegan un papel fundamental en la promoción de crecimiento en las plantas. El proceso de fijación biológica del nitrógeno (FBN) es uno de los procesos de mayor importancia en la naturaleza, pues representa la utilización de un gas inerte como fuente para un grupo de microorganismos; el N fijado puede ser utilizado directa o indirectamente por plantas de interés agrícola y forestal, a través de su simbiosis con los microorganismos nitrofixadores y constituye el mecanismo de compensación de las pérdidas del elemento en forma gaseosa por los procesos microbianos de nitrificación, desnitrificación y volatilización del amoníaco.

Puesto que el nitrógeno es un elemento esencial para las plantas, ya que forma parte de los ácidos nucleicos, vitaminas, proteínas y moléculas que almacenan energía, por lo tanto; es elemental para el desarrollo de las plantas, condicionando la calidad de sus estructuras y los procesos en los que intervienen.

Además de que la biofertilización forma parte de un medio ecológicamente atractivo y económicamente aceptable puesto que suelen ser más económicos y facilitan la transportación, en comparación con los fertilizantes de origen químico sintético que utilizan los productores.

Los principales microorganismos utilizados comercialmente masivamente como biofertilizantes fijadores de nitrógeno son bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* y hongos micorrízicos. Las funciones principales de estas bacterias son la fijación del nitrógeno atmosférico y la producción de estimuladores de crecimiento en el sistema radical de las plantas; mientras que los hongos micorrízicos favorecen la exploración de un mayor volumen de suelo, transportan fósforo y agua a las plantas.

En este proyecto se evaluaron los biofertilizantes y la fertilización química, de esta manera se comprobó que los biofertilizantes pueden ser una alternativa para el caso de plantas de maíz y sorgo. Se probaron 4 bacterias diferentes, las cuales se les determinó la capacidad de fijar nitrógeno, y la promoción de crecimiento en plántulas, el experimento consistió en inocular con 4 cepas distintas semillas de maíz y sorgo con clotianidina y sin clotianidina, el cual es un insecticida, y se observó el desarrollo de las plántulas en invernadero.

---

## CAPITULO II

### JUSTIFICACION.

El presente trabajo es realizado con el fin de comprobar el efecto que tienen los microorganismos promotores de crecimiento a nivel invernadero en cultivos de maíz y sorgo y de esta manera, en un futuro la fertilización química pueda ser sustituida por la biofertilización, teniendo en cuenta las consecuencias que conlleva fertilizar los suelos con químicos para tener mayores rendimientos. Prácticamente en los años 2000 - 2004, en el 80% de la superficie agrícola del país se utilizaron fertilizantes químicos, causando efectos ecológicos irreversibles.

Los fertilizantes químicos, en particular los nitrogenados, se caracterizan por el bajo índice de aprovechamiento que tiene la planta de ellos. Se estima que del fertilizante químico que se aplica al suelo sólo es aprovechado por la planta entre un 30 y 40%, el resto no es utilizado, afectando. No sólo los indicadores de eficiencia económica, el problema más importante es la contaminación ambiental. El 60 o 70% de los fertilizantes nitrogenados que se aplica al suelo se filtra para contaminar los mantos freáticos, lo que provoca la contaminación de ríos y cuerpos de agua o se pierden como gases contaminantes a la atmósfera, contribuyendo a la destrucción de la capa de ozono y al calentamiento global de la tierra.

La abundancia de compuestos nitrogenados en el agua produce el fenómeno denominado de eutrofización, que es el crecimiento anormal de las bacterias que utilizan esta fuente de nitrógeno, agotando el oxígeno disuelto en el agua y provoca la muerte masiva de organismos como los peces y generando un círculo de destrucción de ecosistemas.

El óxido nitroso, gas que se desprende de los fertilizantes químicos mediante la evaporación, es uno de los contaminantes atmosféricos más dañinos en el mundo, ya que el potencial de calentamiento de este gas es de 296 veces superior al bióxido de carbono.

Otra de las consecuencias del uso de los fertilizantes químicos es que millones de hectáreas han quedado francamente improductivas o con altos niveles de contaminación, sin potencial agrícola; por otro lado, se ha agudizado otro de los grandes problemas nacionales: la erosión o la pérdida del suelo. Se estima que 80% del territorio nacional registra algún grado de erosión; 80 millones de hectáreas registran erosión severa, lo que generará que en un futuro inmediato se incrementen las zonas definidas como áridas y semiáridas en el país, que ya suman 30% del territorio nacional; por otro lado, se reducirá la participación de las zonas boscosas y de selva, que es de 28%.

Una alternativa de gran importancia, es el uso de biofertilizantes, aunque en países como Rusia, Brasil, India, Uruguay y Cuba el uso de esta alternativa para incrementar la productividad de los cultivos y reducir la cantidad de fertilizantes químicos es una práctica común, México se encuentra aún en fase de adopción.

La biofertilización posee muchos beneficios como mejorar los rendimientos de los cultivos, sin generar daños al medio ambiente, son regeneradores de la población microbiana; asimismo, estos productos tienen una función protectora del sistema radicular de la planta contra microorganismos patógenos, proporciona de manera natural los nutrientes que requiere la planta, puesto que la nutrición biológica de la planta es la forma más eficiente y económica de la alimentación vegetal, ya que permite el aprovechamiento del nitrógeno atmosférico, además de aprovechar de manera más intensiva los nutrientes disponibles en el suelo, ya que estimulan el desarrollo del sistema radicular y permiten mayor solubilidad y conductividad de nutrientes. Minimiza los gastos que genera una fertilización química en grandes hectáreas de siembra, en términos generales, se puede decir que los biofertilizantes tienen un costo para el consumidor final, para el productor, de sólo 10% del costo de la fertilización química.

Con todo lo mencionado en cuanto a daños refiere, la reducción de fertilizantes químicos es un buen comienzo para poder restaurar nuestro planeta, hacer uso de la biofertilización es una opción amigable con todo lo que respecta, concientizar que no solo es importante producir a grandes cantidades, dejando atrás lo más importante ¿En qué estamos produciendo?, de esta manera busquemos equilibrar el uso que hacemos con nuestro planeta.

## CAPITULO III

### OBJETIVOS.

#### 3.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto de promoción de crecimiento de cuatro cepas aisladas de diferentes regiones del país en plántulas de maíz y sorgo a nivel de invernadero.

#### 3.2 Objetivos específicos.

- \* Determinar la capacidad fijadora de nitrógeno de las cuatro cepas (*Bacillus megaterium*, *Virgibacillus koreensis*, *Ensifer adhaerens* y *Brevibacterium frigiditolerans*).
- \* Evaluar el efecto de promoción de crecimiento de las cuatro cepas en plántulas de maíz y sorgo tratadas con y sin clotianidina.
- \* Evaluar si la clotianidina causa algún efecto secundario en los cultivos inoculados con los biofertilizantes.

## CAPITULO IV

### ANTECEDENTES.

#### 4.1 Definición e impacto de los biofertilizantes.

Los biofertilizantes son un producto que contiene uno o varios microorganismos del suelo y puede ser aplicado a la semilla o al suelo con el fin de incrementar su número, asociarse directa o indirectamente al sistema radical de las plantas, favorecer su interacción e incrementar el desarrollo vegetal y reproductivo de la planta huésped.

Clasificación:

Dentro de los biofertilizantes se encuentran los fijadores de nitrógeno, son microorganismos que tienen la capacidad de fijar nitrógeno, fósforo, y otro tipo de nutrientes. Entre los más conocidos están las bacterias (*Rhizobium*) que son las que se utilizan para infectar las semillas de leguminosas y en el caso particular de las gramíneas, se utilizan micorrizas.

Solubilizadores de potasio. La actividad de ciertos microorganismos que habitan el suelo es de vital importancia en los ciclos de carbono, nitrógeno, azufre y fósforo; también para la movilización de potasio, magnesio y otros minerales, siendo aprovechados por las plantas. El potasio se encuentra retenido en la solución del suelo. Puede formar iones, estar en forma cambiante, inmovilizado entre las láminas de filosilicatos o formando parte de las estructuras minerales tales como feldspatos o micas. El Área de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Extremadura (2006), indica que este elemento también puede hallarse en forma orgánica en los restos vegetales y en células microbianas.

Los microorganismos capaces de destruir las estructuras minerales que contienen potasio son diversos. Entre ellos se encuentran bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, y *Clostridium* y hongos tales como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor*. Estos microorganismos

actúan de varias formas solubilizando el potasio de distintos minerales (Delgado Higuera, 2002). Bacterias como *Bacillus mucilaginosus* y *Bacillus siliceus* atacan la biotina, moscovita, ortoclasas (Urbano, 2003). Otro microorganismo que se destaca en la solubilización de potasio es *Pseudomonas fluorescens* (Delgado Higuera, 2002).

Promotores de crecimiento. Las bacterias promotoras de crecimiento en plantas (BPCP) son un grupo de diferentes especies de bacterias que pueden incrementar el crecimiento y productividad vegetal. Entre los organismos más conocidos están las especies pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, y *Azospirillum*. Las BPCP pueden clasificarse en dos grupos: (i) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas, donde la bacteria afecta a las plantas suprimiendo otros microorganismos. Los mecanismos que estas bacterias utilizan pueden ser a través de su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, hormonas o fijando nitrógeno), afectando directamente el metabolismo de la planta (incrementando la toma de agua y minerales), mejorando el desarrollo radicular, incrementando la actividad enzimática de la planta o “ayudando” a otros microorganismos benéficos para que actúen de mejor manera sobre las plantas (Bashan y Holguin, 1998). (ii) Bacterias promotoras de crecimiento en plantas con capacidad de control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta al suprimir los fitopatógenos. Este capítulo tratará exclusivamente sobre bacterias promotoras de crecimiento en plantas con capacidad de control biológico y la bacteria promotora de crecimiento en plantas *Azospirillum*.

Captación de fósforo. Otro grupo de microorganismos, ampliamente conocidos y estudiados, tienen la capacidad de aumentar el área de captación y absorción de nutrientes, principalmente fósforo, a través de las raíces, como las micorrizas, que es la asociación simbiótica donde la micorriza aumenta la velocidad de captación de P y otros nutrientes (N, Fe y Cu).

Algunas inoculantes que se componen de múltiples (más de un tipo) microorganismos con lo cual se fija además de nitrógeno, fósforo, hierro, boro, molibdeno y otros nutrientes importantes para el desarrollo de los cultivos.

Los biofertilizantes poseen una serie de ventajas contra los fertilizantes químicos, como por ejemplo:

- No presentan toxicidad residual en el producto.
- No son contaminantes del medio ambiente.
- El costo por hectárea es muy bajo.
- Aseguran mejor estado fitosanitario del cultivo.
- Se obtiene mayor rendimiento en producto del que se lograría sin inocular.
- Existe la teoría, aún no verificada, de que permite frenar el desgaste de los suelos produciendo los nutrientes necesarios para el desarrollo de los cultivos.

Este proceso es llevado mediante microorganismo con la capacidad de fijar nitrógeno y proporcionarle otros nutrientes, dentro de las bacterias asociadas se encuentran *Azospirillum brasilense*, que además de fijar N- atmosférico produce sustancias reguladoras de crecimientos vegetal; estimula la tasa de aparición de pelos radiculares, aumentando la superficie específica de las raíces, lo cual le permite absorber más agua y minerales, afectando la tasa de respiración y actividades enzimáticas específicas. En trigo, el *A. brasilense*, estimula el desarrollo de la planta al aportar nitrógeno, aun en suelos pobres, y por producir ácido indol-acético, que es un promotor del crecimiento en las plantas, además de que no es peligroso para el medio ambiente o para la salud de las plantas.

La inoculación con *A. brasilense* es altamente benéfica en gramíneas como: maíz, caña de azúcar, pastos y sorgo, pues aporta de 30 a 50% de los requerimientos de nitrógeno de dichos cultivos (Martínez-Morales *et al.*, 2003; Viviene *et al.*, 2004).

Diversos estudios demuestran la factibilidad de mejorar el comportamiento agronómico del maíz mediante el uso de biofertilizantes (Fallik y Okon 1996a; Fulchieri y Frioni, 1994; Purcino *et al.*, 1996) desde la reducción del tiempo de germinación y aumento de los porcentajes de germinación y establecimiento de las plántulas hasta incrementos sustanciales en los rendimientos finales del cultivo. Se menciona que del 13 al 20 por ciento del contenido

de nitrógeno en maíz puede ser atribuido a la actividad fijadora de nitrógeno de bacterias tales como *Azotobacter* (Soliman y Abdel Monem, 1994).

#### 4.2 El nitrógeno.

El nitrógeno molecular ( $N_2$ ) es la única reserva de nitrógeno (N) accesible en la biosfera. Prácticamente ilimitada esta reserva no es directamente utilizada por los vegetales y animales. El N es un constituyente esencial de moléculas fundamentales de todos los seres vivos: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, coenzimas, fosfolípidos y clorofilas, entre otras moléculas y es uno de los principales factores que limitan el crecimiento de las plantas.

Las fuentes de nitrógeno utilizadas por las plantas son el  $NH_4^+$  y el  $NO_3^-$ , este último la forma de nitrógeno combinado más abundante en los suelos.

Las raíces de las plantas absorben  $NO_3^-$  y  $NH_4^+$  del suelo. Las leguminosas noduladas por bacterias colectivamente llamadas rizobios, pueden además usar el  $N_2$  atmosférico dado que los rizobios son capaces de reducir el  $N_2$  a  $NH_4^+$ . Este proceso es conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN).

El  $NH_4^+$ , proveniente de la reducción del  $NO_3^-$  o de la FBN es asimilado, es decir, pasa a formar parte de moléculas orgánicas.

Las plantas absorben  $NO_3^-$  desde el suelo y son capaces de mantener concentraciones mayores de este ion en sus células o en la savia xilemática. Para esto, el  $NO_3^-$  atraviesa la membrana plasmática de las células epiteliales de la raíz mediante transportadores específicos con gasto de ATP.

La asimilación de nitrógeno consiste en la incorporación del  $\text{NH}_4^+$  a moléculas orgánicas. El  $\text{NH}_4^+$  puede ser absorbido como tal, de la reducción del  $\text{NO}_3^-$  que las plantas absorben, o del  $\text{N}_2$  atmosférico que bacterias asociadas a plantas son capaces de reducir.

La capacidad de fijar nitrógeno está restringida a un número escaso de procariotas que reducen enzimáticamente el  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_4^+$ , proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno o diazotrofia. Este proceso lo realizan bacterias en simbiosis con leguminosas como los rizobios, o “en vida libre” como muchas cianobacterias y *Azotobacter* entre otras bacterias.

#### **4.3 Fijación biológica de Nitrógeno.**

La fijación biológica del nitrógeno (FBN) es uno de los procesos de mayor importancia en la naturaleza, ya que representa la utilización de un gas inerte como fuente para un grupo de microorganismos; el N así fijado puede ser utilizado directa o indirectamente por plantas de interés agrícola y forestal, a través de su simbiosis con los microorganismos nitro fijadores y constituye el mecanismo de compensación de las pérdidas del elemento en forma gaseosa por los procesos microbianos de nitrificación, desnitrificación y volatilización del amoníaco.

La fijación biológica aporta; globalmente, con la mitad del nitrógeno utilizado por los cultivos. La otra mitad procede casi en su totalidad del amonio sintetizado vía Haber Bosch, con un gasto energético que requiere del 1% de la energía consumida a nivel mundial.

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso metabólico exclusivo de algunos microorganismos que produce amonio ( $\text{NH}_3$ ) a partir de gas nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) presente en el aire.

Los microorganismos capaces de fijar nitrógeno están equipados con un complejo enzimático llamado nitrogenasa, formado por la Fe-proteína y la Fe-Mo-proteína. Este complejo procesa el nitrógeno gaseoso en sucesivos ciclos que lo reducen hasta amoniaco.

La nitrogenasa de todos los organismos fijadores aparentemente es la misma, o muy similar ya que se ha logrado la fijación en sistemas de células libres donde la Fe-proteína era de una bacteria y la Fe-Mo-proteína de otra bacteria diferente.

La fijación biológica es altamente demandante de energía. En los sistemas de fijación simbiótica, como los de *Rhizobium*-leguminosa, esta energía proviene del sol, vía fotosíntesis realizada por la planta; mientras que los fijadores de vida libre como *Azospirillum*, *Azotobacter* y otros deben extraer la energía de la materia orgánica del medio, que no siempre abunda. De ahí deriva la diferencia en la fijación. Se estima que los sistemas simbióticos fijan entre 75 y 300 kg de N/ha año, mientras que los no simbióticos no superarían los 15 kg de N/ha. A pesar de estas diferencias, la fijación libre, sola, representa a nivel global algo menos de la mitad de los 200-250 millones de toneladas de N<sub>2</sub> fijado por año, ya que la simbiótica está limitada a unas pocas especies vegetales, entre ellas las leguminosas.

#### **4.4 Historia del uso de Biofertilizantes.**

El conocimiento de la existencia y los beneficios que poseen los microorganismos en el desarrollo de las plantas se remonta a la edad media, en la Roma antigua, pero su evolución y progreso aumentaron con el invento del microscopio y las técnicas microbianas durante el periodo de 1891 – 1919 (Freire, 1975).

Los campesinos sabían de manera empírica que una forma de mejorar las cosechas era mezclar el suelo que quedaba de cosechas anteriores de leguminosas con suelo en el cual no habían crecido leguminosas.

A finales del siglo XIX, la práctica de mezclar suelos inoculados “de manera natural” con semillas, se convirtió en un método recomendado para inocular legumbres en Estados Unidos. Una década después, se registró la primera patente (Nitragin) para inocular plantas con *Rhizobium* sp.

Se conocían importantes procesos microbiológicos, como la fijación de nitrógeno atmosférico, la formación de nódulos por microorganismos en las leguminosas, y el aislamiento de organismo responsable de la formación del nódulo por Beijerinck.

Por otro lado, en 1913, Fritz Haber (1868 – 1934) descubre un proceso para la síntesis de amoníaco por combinación directa del nitrógenos y el hidrogeno y en 1930 Carl Bosch (1874 – 1940) lo adopto en forma comercial. El proceso actual de producción de fertilizante nitrogenado se conoce como Haber Bosch y se caracteriza por requerir altas cantidades de energía para lograr fijar en materiales inertes el nitrógeno, y de esta forma, ser utilizado por los productores. La energía utilizada deriva fuentes no renovables, como petróleo, gas y carbón. Döbereiner (1977) consigna que la energía requerida para producir una tonelada de fertilizante nitrogenado es la equivalente a 7 barriles de petróleo y Tilak (1998) refiere que la energía necesaria para elaborar 1 kg de ferlizante nitrogenado son 80 MJ o 11.2 kWh; para fosforo 12MJ o 1.1 kWh y para potasio 8 MJ o kWh. Los microorganismos realizan el mismo proceso; en el caso del nitrógeno a través de las bacterias fijadoras de nitrógeno y/o mediante el transporte de P y K con los hongos micorrizas, pero en ambos casos, la energía utilizada deriva del proceso fotosintético de las plantas.

Este hecho influyo en la rizosfera de la mayoría de los terrenos de productores en México. Es así, que solo en años muy recientes se ha iniciado la inoculación semi-comercial a gran escala con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y bacterias promotoras de crecimiento en plantas (BPCP) del género *Azospirillum*.

De esta manera en condiciones naturales o con bajo nivel de disturbio en la vegetación original, se ha demostrado que la interdependencia planta – microorganismo ha contribuido al mantenimiento, funcionamiento y la estabilidad de los ecosistemas (Read, 1998).

Estos biofertilizantes son usados principalmente en el noreste mexicano y Argentina. Aunque se han investigado otras especies bacterianas, estas raras veces han alcanzado las prácticas agrícolas. Los dos descubrimientos más importantes para la tecnología de inoculación de plantas se dieron a finales de los años 70's; por un lado, se encontró que *Azospirillum* mejoraba el crecimiento de plantas no leguminosas, afectando directamente el metabolismo de la planta.

Por otra parte, se iniciaron estudios intensivos en bacterias como agentes de control biológico de plagas, principalmente *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida*. En años recientes han sido evaluados varios géneros de BPCP tales como *Bacillus*, *Flavobacterium*, varios microorganismos relacionados con *Azospirillum* y bacterias endófitas tales como *Gluconobacter*.

Aunque los inoculantes de *Rhizobium* han estado en el mercado por cerca de un siglo, sólo recientemente han aparecido las primeras preparaciones comerciales de BPCP y HMA.

En la actualidad, ha habido una producción nacional de inoculantes (INIFAP) apoyada inicialmente por el gobierno mexicano y ahora por productores o gobiernos estatales, que está disponible a mayor escala para los agricultores a lo largo del país.

A pesar de este positivo desarrollo, la aplicación a gran escala de inoculantes microbianos encara serias dificultades en la mayoría de países en desarrollo, incluido México. Las prácticas agrícolas en países en desarrollo o bajo condiciones semiáridas son dos ejemplos en los cuales los inoculantes bacterianos pueden encontrar sus mayores retos.

#### 4.5 Biofertilización en México.

En México se empezó a usar los fertilizantes químicos sintéticos a mediados del siglo XX y rápidamente se convierten en elementos indispensables en los campos agrícolas. Su bajo costo y amplia distribución nacional entre los productores, dados que eran subsidiados por el gobierno federal constituyeron una barrera para el aprovechamiento de los recursos biológicos del suelo; lo anterior, la aplicación de los biofertilizantes fue muy exigua durante la llamada de la crisis energética mundial de los 70's. Al desaparecer Fertimex, la adquisición de fertilizantes industriales se tornó difícil para los pequeños y medianos agricultores, pero su utilización por más de 50 años había generado cambios en la microbiota del suelo. Una evidencia de esta condición es la documentada por Caballero – Mellado y Martínez (1999) quienes encontraron que las aplicaciones de fertilizantes nitrogenado ocasionan la disminución de la diversidad genética de los rizobios en nódulos de frijol.

El uso de fertilizantes en México data de 1950, creció de manera ininterrumpida hasta llegar a 4.5 millones de toneladas el consumo nacional, a mediados de los noventa. La fertilización química ha llegado a jugar un papel muy importante en la agricultura, pero con todas las consecuencias mencionadas, debemos buscar nuevas alternativas para mejorar los suelos y el medio ambiente, sin dejar atrás los rendimientos de producción.

Los estudios acerca de biofertilizantes han sido tema de investigación en diversas regiones del mundo desde principio del siglo pasado, teniendo como principal objeto de investigación el proceso de fijación de nitrógeno, particularmente en la relación simbiótica que establecen las bacterias del género *Rhizobium* con las leguminosas; sin embargo, en la década de los veinte, ya se habían desarrollado investigaciones con otro tipo de bacterias, como el caso del *Azospirillum*, lográndose su aislamiento y evaluación en la nutrición vegetal.

Todo apuntaba que el futuro de los biofertilizantes era promisorio en el desarrollo de la agricultura del siglo XX, sin embargo, el acelerado proceso de industrialización y urbanización que se da después del primer tercio del siglo pasado llevó, por su parte, a una acelerada demanda de materias primas y alimentos. Es aquí donde la aparición de los fertilizantes químicos, que son capaces de generar una rápida respuesta productiva, le ganó la carrera a los biofertilizantes, relegando su importancia hasta caer en el olvido del mundo científico.

En la década de los setenta, cuando la fertilización química se había convertido en un gran problema ambiental y económico, se inicia el “redescubrimiento” de los biofertilizantes, y vuelve a ser tema de investigación en diversos centros de vanguardia.

En México, la UNAM constituyó el Centro de Investigación sobre la Fijación de Nitrógeno, que tomó este tema como eje de sus investigaciones científicas. En los años noventa, este Centro ya había construido un prestigio y reconocimiento mundial en materia de biofertilizantes, incluso logró patentar internacionalmente el *Rhizobium etli*, específico para el frijol, que tiene la capacidad de fijar 100% más nitrógeno atmosférico para la alimentación de esa planta.

Por otro lado, este Centro fue de los primeros en el mundo que iniciaron los trabajos de investigación sobre la bacteria *Azospirillum brasilense*, que tiene efecto en gran variedad de cultivos, acumulando un conocimiento amplio y sólido sobre esta bacteria, que lo colocan a la vanguardia mundial.

Aunque esto ocasionó una contrariedad del poco interés que en este país merece la investigación, ya que contando con un centro de investigación reconocido y ponderado en el mundo como vanguardia en el tema de los biofertilizantes, éstos eran desconocidos en el país.

Sin embargo, por una situación un tanto fortuita, la máxima autoridad gubernamental en materia agrícola conoce de los trabajos del Centro de Investigación sobre la Fijación de Nitrógeno, con relación a los biofertilizantes, se despierta su interés en difundirlos en el agro nacional, y establece un convenio con este Centro. Así, estos biofertilizantes fueron aplicados

masivamente en el país. En 1999 y 2000 fueron incorporados al programa de Alianza para el Campo, de la SAGARPA, y se utilizaron en cerca de tres millones de hectáreas en los más diversos cultivos en el territorio nacional. El seguimiento y evaluación de este programa estuvo a cargo del INIFAP. Los resultados obtenidos fueron altamente significativos en referencia a los testigos de promedios nacionales. Todo indicaba que México se incorporaba a la era de los biofertilizantes.

Cultivo	Azospirillum	Micorriza	Azos + mico
Maíz	10.5%	11.5%	26.0%
Sorgo	22.9%	10.8%	28.3%
Cebada	46.6%	20.7%	61.7%
Avena Forraje	10.8%		
Avena Grano	43.3%		
	Rhizobium	Micorriza	Rhizo + Mico
Frijol	30.6%	22.1%	46.0%

Fuente: INIFAP.

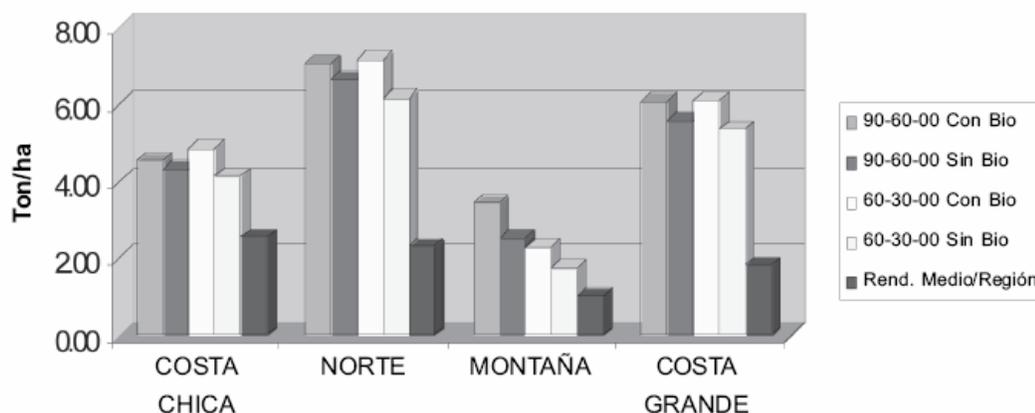
**Figura1.** Incrementos medios de rendimiento con biofertilizantes con relación a un testigo absoluto.

Después de 2003, cuando se retoma el proyecto de difusión de los biofertilizantes como iniciativa particular, se han logrado avances importantes, como el hecho de que los gobiernos de Guerrero y Michoacán, establecieron sendos programas de biofertilización, permitiendo una amplia difusión de este producto con resultados satisfactorios para los productores, generando un rápido incremento en la superficie fertilizada. Por ejemplo, en el estado de

Guerrero, que inició el programa con una superficie de 30 mil hectáreas en el 2006, para el 2007, dicha superficie llegó a las 300 mil hectáreas.

En esa entidad, el INIFAP evaluó el efecto del biofertilizante (*Azospirillum* más Micorriza) aplicándolo con la dosis recomendada del fertilizante químico y disminuyendo éste en 34% del nitrógeno y 50% el fósforo. Estos resultados se compararon con el rendimiento medio en la región.

En todos los casos, los mayores rendimientos se registraron en aquellos tratamientos donde se usó el biofertilizante, incluso, la conclusión es que al reducir el químico y aplicar el biofertilizante se obtienen resultados superiores que en uso del químico sin biofertilizante.



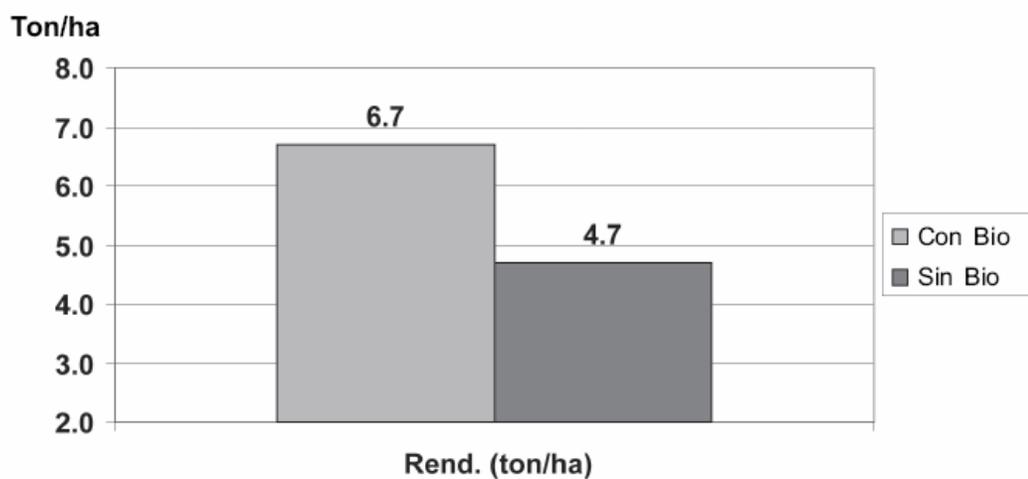
Fuente: INIFAP, Iguala Gro.

**Figura 2.** Resultados en diversas regiones del estado de Guerrero. Rendimiento medio de maíz y sin biofertilizante primavera-verano 2006.

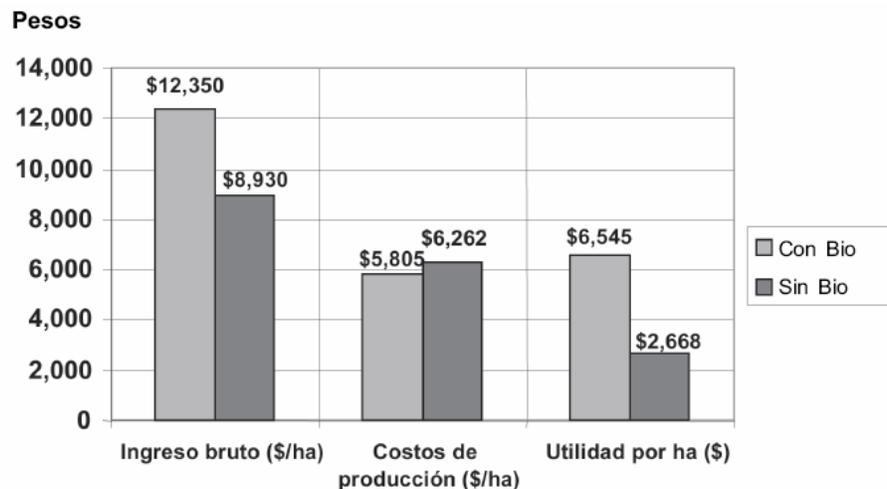
En el estado de Michoacán, el mismo INIFAP evaluó los biofertilizantes en diversos cultivos, llegando al análisis económico del efecto.

En el caso del trigo se registró un incremento en los rendimientos de 42% cuando se aplicó el biofertilizante respecto al testigo, que aplicó la dosis recomendada de fertilizante químico. Sin embargo, en términos de la utilidad obtenida por el productor, ésta se incrementó en 145%, ya que los costos de producción disminuyeron 10%.

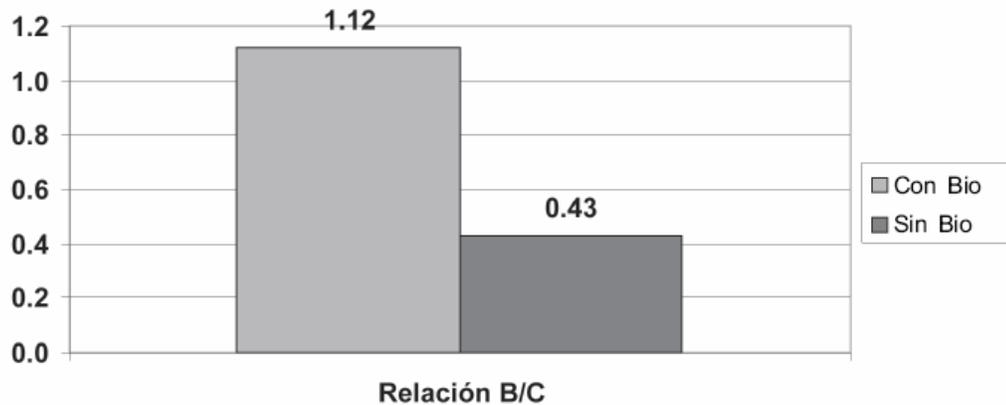
En el cultivo de lenteja, los resultados fueron más espectaculares, llegando casi a triplicarse los rendimientos, al pasar de un rendimiento en el testigo de 0.66 toneladas a 1.88 toneladas; estos resultados se tradujeron en que el productor, de tener una pérdida del orden de 3 mil pesos por hectárea (esto en consideración de los costos reales y totales del productor, donde se incluye renta de la tierra y mano de obra familiar, que normalmente no contabiliza el productor), obtuvo una utilidad de más de 4,500 pesos.



**Figura 3.** Rendimiento por hectárea de parcelas de trigo 0-I, 2006-2007



**Figura 4** Análisis económico de parcelas de trigo 0-I, 2006-2007.



**Figura 5.** Relación beneficio-costos de parcelas de trigo, 0-I, 2006-2007.

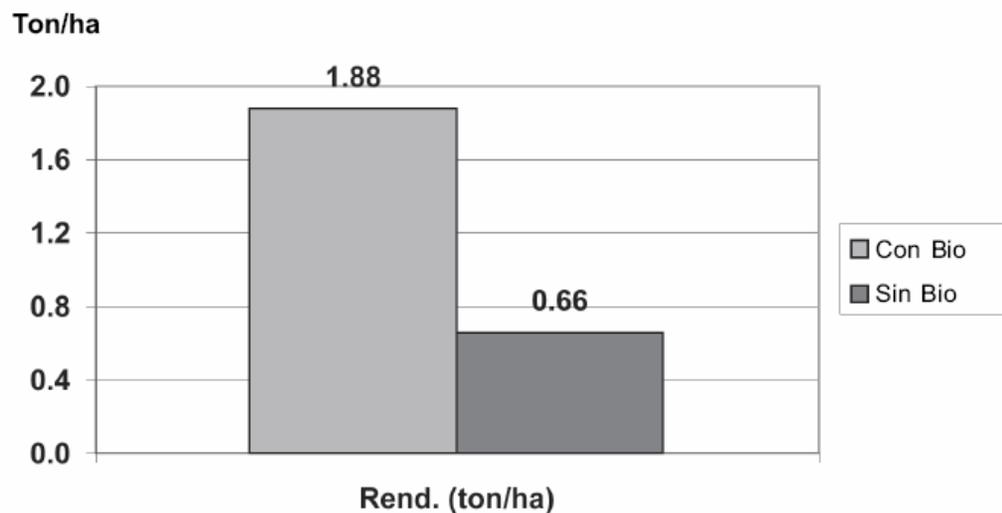


Figura 6. Rendimiento por hectárea de parcelas de lenteja, 0-I, 2006-2007.

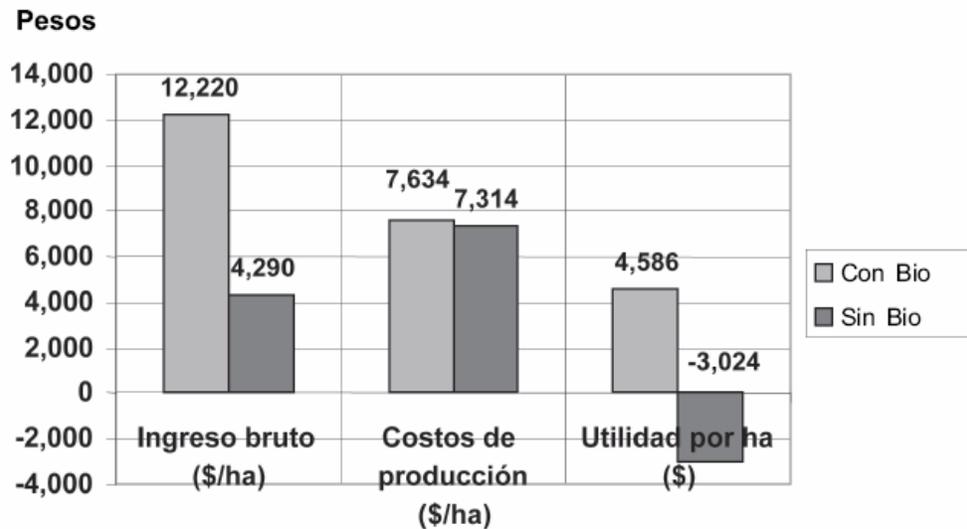
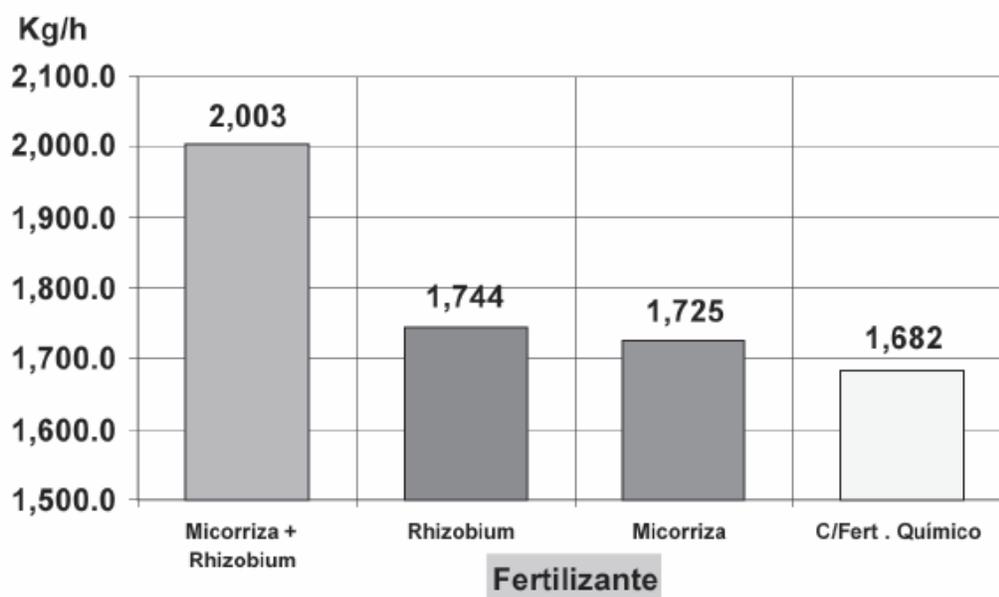


Figura 7. Análisis económico de parcelas de lenteja, 0-I, 2006-2007.

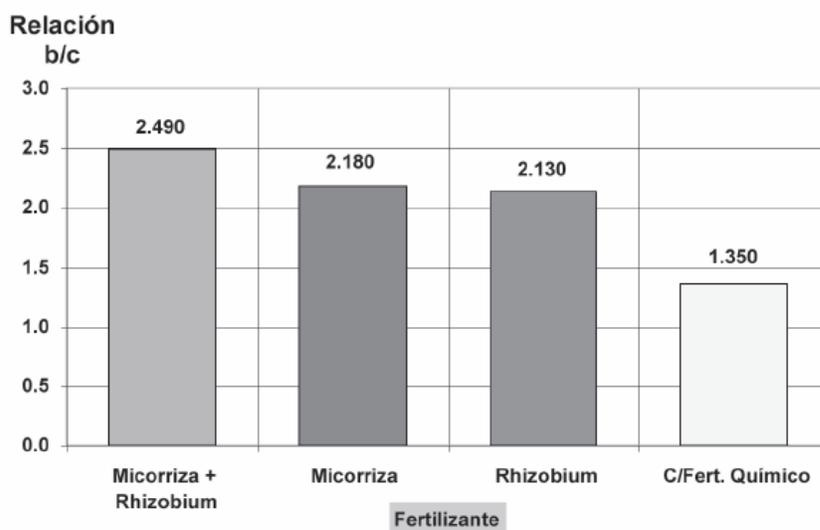
En el caso del frijol inoculado con biofertilizante con la bacteria *Rhizobium etli* y la Micorriza, se han obtenido importantes resultados en diversas regiones del país. Tan solo en el estado de Durango, se obtuvieron resultados muy superiores respecto a la fertilización química.

En este caso, se probó el efecto del biofertilizante combinado (*Rhizobium* y Micorriza) de manera individual, eliminando 100% del fertilizante químico, y se comparó con el tratamiento donde se aplicó la dosis recomendada. El resultado fue que la combinación del biofertilizante registró rendimientos superiores en cerca de 20% respecto al tratamiento del químico y en un porcentaje similar en referencia al uso aislado del *Rhizobium* y la Micorriza.

Como el uso del biofertilizante, en cuanto a costos de producción refiere se puede comprobar que es mucho menor a la fertilización química, es decir según las estadísticas se encuentra una relación beneficio-costos, en los biofertilizantes que es superior hasta en 80% respecto al uso del químico.



**Figura 8.** Media del rendimiento de frijol en temporal con aplicaciones de *Rhizobium etli* y Micorriza versus fertilizante.

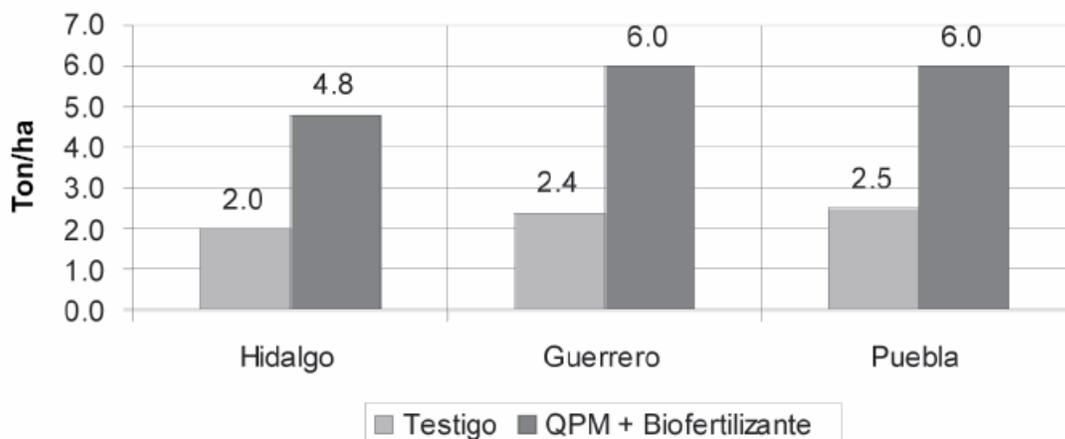


Fuente: Investigación directa en el estado de Durango.

**Figura9.** Media de la relación de frijol en temporal con aplicaciones de *Rhizobium etil* y *Micorriza versus* fertilizante.

Por último, un dato impactante en la producción de maíz, con base en el uso de biofertilizante (*Azospirillum* más *Micorriza*) y una variedad de semilla QPM (Quality Proteine Maiz), que es un maíz de alta calidad de proteína, ya que posee 100% más lisina y triptofano, aminoácidos esenciales para el desarrollo y crecimiento, y cuyo contenido en los maíces comunes es restringido, generando que su proteína sea de muy mala calidad. Estos resultados se obtuvieron en los estados de Puebla, Guerrero e Hidalgo, con pequeños productores que tienen al autoconsumo como esencial en su producción de maíz y en zonas marginales.

Los rendimientos obtenidos duplicaron los rendimientos medios de la zona, donde se siembra semilla criolla y sin fertilizantes. De un promedio de 2 a 2.5 toneladas se pasó de 5 a 6 toneladas.



**Figura 10.** Rendimiento promedio de QPM con biofertilizante en tres estados de República, frente a los criollos de cada lugar.

#### 4.6 Fertilización en maíz y sorgo.

La producción mundial de sorgo es de 53.8 millones de toneladas; los principales países productores son Estados Unidos, India, Nigeria, México y China, quienes participan con el 69% de la producción. El sorgo de grano se utiliza principalmente para la elaboración de alimentos balanceados. México participa con el 10.6% de la producción mundial de sorgo; al año produce 5 millones 688 mil 924 toneladas de grano; si su consumo es de 10.7 millones de toneladas, cada año debe importar 5.01 millones de toneladas. El consumo nacional de sorgo se destina a la elaboración de alimentos balanceados para aves, cerdos, ganado vacuno y otros (Gallardo, 2007).

Para producir una tonelada de grano de sorgo se requiere aplicar al suelo 24 kilogramos de nitrógeno, 12.5 kilogramos de fósforo y 24.5 kilogramos de potasio; pero si su meta de rendimiento es de 3.5 toneladas por hectárea, entonces se aplica 84 kilogramos de nitrógeno por hectárea, 43.75 kilogramos de fósforo y 85.75 kilogramos de potasio por hectárea.

Se sugiere aplicar el 80% de nitrógeno en presembrado y el 20% cuando la planta tenga aproximadamente 30 centímetros de altura (si las lluvias lo permiten).

En caso de que el análisis de suelo indique aplicar fósforo y potasio, estos (debido a su lenta movilidad) se deben emplear en presiembra. Para producir 3.5 toneladas de grano de sorgo por hectárea y se tiene la certeza de que en el suelo existe respuesta a las aplicaciones de fósforo y potasio, entonces se sugiere la siguiente fertilización: aplicar en presiembra 100 kilogramos de urea por hectárea, 100 kilogramos de fosfato monoamónico y 150 kilogramos de sulfato de potasio por hectárea en el momento de la marca; en el cultivo, aplicar 50 kilogramos de urea por hectárea.

Con la fertilización anterior se aportan al suelo 80 kilogramos de nitrógeno por hectárea, 52 kilogramos de fósforo, 75 kilogramos de potasio y 25.5 kilogramos de azufre por hectárea.

El maíz requiere alrededor de 20 a 25 kg/ha de nitrógeno (N) por cada tonelada de grano producida. Las posibles pérdidas de nitrógeno son contempladas en la eficiencia de uso, normalmente oscila alrededor del 50 %, con máximos de 70 %, si se aplica durante los momentos de máxima capacidad de absorción, dosis no excesivas, proporcionales a su utilización y con fuentes de bajo potencial de volatilización como amoníaco. El maíz comienza su mayor consumo de nitrógeno alrededor de seis hojas completamente expandidas (V-6 a V-7), por lo que antes de comenzada esta etapa fenológica, el cultivo debería de disponer de una oferta de nitrógeno adecuada para satisfacer su demanda para crecimiento.

A diferencia de lo que ocurre con el nitrógeno, al abordar la fertilización fosfatada en maíz hay que considerar que el funcionamiento del fósforo (P) en el sistema suelo-planta es totalmente diferente al del nitrógeno. Desde el punto de vista del manejo nutricional, el principal aspecto a considerar es su baja movilidad en el suelo, lo hace principalmente por difusión, y la presencia de retención específica de los fosfatos en las arcillas, cuya magnitud depende de la cantidad y mineralogía de esta fracción. Por otro lado, el pH es un factor que impacta considerablemente sobre la disponibilidad de fósforo. La mayor disponibilidad ocurre con pH's entre 5.5 y 6.5, mientras que valores fuera de este rango su concertación en la solución del suelo se reduce significativamente.

#### 4.7 Biofertilización en maíz y sorgo.

El maíz constituye, la base de la alimentación de los mexicanos. Su producción se desarrolla en aproximadamente 7.5 millones de hectáreas, de las cuales seis corresponden a zonas de temporal con altos riesgos de siniestralidad, relacionados principalmente con los cambios climáticos como las sequías, heladas atípicas.

Para mejorar sus rendimientos, es necesario fertilizar y aprovechar al máximo los suelos, pero para llevar a cabo una fertilización sin causar daños a los suelos y medio ambiente como se ha demostrado, se sugiere biofertilizar, como en varios estudios han revelado rendimientos redituables en cultivos de maíz.

Diversos estudios demuestran la factibilidad de mejorar el comportamiento agronómico del maíz mediante el uso de biofertilizantes (Fallik y Okon 1996a; Fulchieri y Frioni, 1994; Purcino *et al.*, 1996) desde la reducción del tiempo de germinación y aumento de los porcentajes de germinación y establecimiento de las plántulas hasta incrementos sustanciales en los rendimientos finales del cultivo. Se menciona que del 13 al 20 por ciento del contenido de nitrógeno en maíz puede ser atribuido a la actividad fijadora de nitrógeno de bacterias tales como *Azotobacter* (Soliman y Abdel Monem, 1994).

Estudios realizados en plantas de maíz biofertilizadas con *Azospirillum brasilense* (Woodward y Bly, 2000) y *Pseudomonas fluorescens* (Shaharoon *et al.*, 2006) muestran que los mayores incrementos en este cultivo por efecto de la inoculación se observaron en parcelas con dosis de fertilización nitrogenada subóptimas.

Santillana (2006) encontró que plantas de maíz, inoculadas con tres dosis de *Pseudomonas* sp. mostraron un mayor desarrollo de vástago y raíz que plantas control no inoculadas.

Vikram *et al.* (2007) muestra incrementos en el desarrollo de raíz y vástago de plantas de maíz por efecto de la inoculación con *Pseudomonas fluorescens*. Este efecto benéfico se potenció cuando las plantas de maíz fueron co-inoculadas con dos cepas distintas de *Bradyrhizobium*, una bacteria con actividad fijadora de nitrógeno. Nezarat and Gholami

(2009) encontraron, por su parte, incrementos de hasta un 18.5 por ciento en la germinación de maíz inoculado con diversas cepas de *Pseudomonas* y *Azospirillum*.

Nadeem *et al.* (2009) refieren los beneficios que el empleo de *Pseudomonas* puede tener en suelos con elevadas concentraciones de sal, problema que día a día cobra más importancia en nuestro país por el abatimiento de los mantos acuíferos.

La mayoría de los estudios sobre la asociación *Azospirillum*-planta se han realizado en cereales y pastos, los resultados obtenidos han demostrado incrementos en peso seco total, concentración de nitrógeno en follaje y grano, número total de espigas, espigas fértiles y mazorcas, floración y aparición de la espiga más temprana, incremento en el número de espigas y granos por espiga, plantas más altas e incremento en el tamaño de la hoja y tasas de germinación más altas (Albrecht *et al.*, 1981; Bashan, 1986; Fulchieri y Frioni, 1994; Stancheva *et al.* 1992). Además se ha observado un incremento en el desarrollo del sistema de raíces, tanto en longitud como en volumen (Bashan *et al.*, 1996) y una promoción del crecimiento vegetativo (Kapulnik *et al.*, 1982, 1983).

La inoculación con *Azospirillum* puede afectar positiva o negativamente algunos parámetros de las raíces y del follaje, que están atribuidos a efectos positivos en la absorción de minerales por parte de la planta. Se ha indicado que la absorción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> y Fe<sup>+2</sup> inducida por *Azospirillum* es el factor responsable en incrementar la materia seca foliar y la acumulación de minerales en tallos y hojas (Barton *et al.*, 1986; Lin *et al.*, 1983, Murty y Ladha, 1988; Sarig *et al.*, 1988).

El cultivo de sorgo, también un cultivo forrajero fuerte en México, presenta la misma situación ante suelos pobres en nutrientes, tan solo en primavera-verano 2005-2005, de 241 mil 151 hectáreas sembradas con sorgo sólo se cosecharon 42 mil 115, con rendimientos de 1.06 toneladas por hectárea (SAGARPA, 2006).

El norte de Tamaulipas, México, es una planicie semiárida, donde el sorgo, *Sorghum bicolor* (L.) Moench, se ha cultivado en una superficie anual de 600 a 700 mil hectáreas, principalmente de temporal o secano, con un rendimiento medio de grano de 2.4 t/ ha1 (Williams-Alanís et al. 2006). Este rendimiento ha representado una rentabilidad de producción crítica, con una relación beneficio-costo de 1.3 (Salinas-García 2002).

Esta problemática motiva a los productores a buscar nuevas tecnologías que ofrezcan mayores rendimientos.

En diferentes estados de la República Mexicana, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha obtenido buenos resultados al tratar la semilla con biofertilizantes (como bacterias del género *Azospirillum* y hongos micorrízicos).

A partir del 2000, en el Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional se han aislado y caracterizado cepas de *A. brasilense*, nativas del norte de Tamaulipas, y se ha determinado su potencial biofertilizante en condiciones controladas de invernadero.

Los biofertilizantes son microorganismos del suelo que se asocian directa o indirectamente al sistema radical de las plantas para favorecer su nutrición mediante la fijación de nitrógeno, la absorción de fósforo (entre otros nutrimentos) y agua; estas acciones inducen un mayor desarrollo vegetal y reproductivo de la planta.

La inoculación con *A. brasilense* es altamente benéfica en gramíneas como: maíz, caña de azúcar, pastos y sorgo, pues aporta de 30 a 50% de los requerimientos de nitrógeno de dichos cultivos (Martínez-Morales et al., 2003; Viviene et al., 2004).

La inoculación con hongos micorrízicos arbusculares ha mejorado la productividad de diversos cultivos en condiciones de estrés hídrico (Al-Karaki y Clark 1998; Kaya *et al.* 2003; Al-Karaki *et al.* 2004; Díaz-Moreno *et al.* 2007).

El impacto de la colonización de hongos micorrízicos arbusculares se ha manifestado en un mejor aprovechamiento de agua y de los nutrientes inmóviles del suelo como fósforo, zinc y cobre, en el incremento de longitud y profundidad radical y el desarrollo de hifas externas.

Además, la colonización de hongos micorrízicos arbusculares ha favorecido la acción protectora contra algunos patógenos del suelo (Alarcón y Ferrera- Cerrato 2000; Jeffries *et al.* 2003).

La rizobacteria promotora del crecimiento, *Azospirillum brasilense* , ha incrementado la productividad de diversos cultivos en ambientes de secano (Dobbelaere *et al.* 2001; Irizar *et al.* 2003; Loredó-Osti *et al.* 2004; Díaz-Franco *et al.* 2005). Lo anterior se debe a las actividades biosintéticas de *A. brasilense*, manifestadas en su capacidad de fijar nitrógeno, de solubilizar el fósforo, de producir siderófos y de sintetizar fitohormonas y enzimas que regulan los niveles de las enzimas (Martínez *et al.* 2003; Loredó-Osti *et al.* 2004).

El efecto de *A. brasilense* en la morfología de la raíz depende del genotipo y de la concentración de bacterias, cuyo número óptimo oscila entre 105 y 107 bacterias por semilla (Dobbelaere *et al.* 2002).

En condiciones semiáridas, esta rizobacteria promotora del crecimiento, *A. brasilense*, incrementó el rendimiento de grano de sorgo entre 5 y 23% (Mendoza-Herrera *et al.* 2008).

Los beneficios de biofertilizar semillas, son importantes en estos cultivos como son: mayor desarrollo radical, incremento del rendimiento y calidad del forraje. Se propone la Biofertilización de esta gramínea forrajera, como una estrategia para mejorar su

establecimiento y producción y propiciar así, una mejor alimentación del ganado en las zonas semiáridas.

#### **4.8 *Bacillus megaterium*.**

La especie fue descrita por A. de Bary en 1884, que lo llamó *Bacillus megaterium*, pero no dio una etimología, sin embargo, algunos autores posteriores llamaron *B. megaterio* suponiendo que el nombre estaba mal escrito.

Esta bacteria corresponde al género de *Bacillus*, es gram positiva, posee flagelos y puede formar endosporas las cuales pueden llegar a contaminar. *B. megaterium*, es una de las mayores Eubacteria, se encuentra en el suelo, y de ahí el nombre "mega" significa "relativamente grande" es un suelo común saprofito. *B. megaterium* también es capaz de sobrevivir en condiciones extremas, tales como ambientes desérticos debido a las esporas que forma.

En el ambiente del suelo las bacterias se convierten metabólicamente activas, cuando los sustratos para su crecimiento están disponibles, y forman esporas cuando sus nutrientes se agotan. Esta es una estrategia utilizada por otros microbios en el suelo del hábitat, incluidos los hongos filamentosos y actinomicetos, que también predominan en el hábitat de suelo aeróbico. Estos grupos de microbios viven en el suelo y producen antibióticos en relación con sus procesos de esporulación. Puesto que muchas especies formadoras de endosporas efectivamente puede degradar una serie de biopolímeros (proteínas, almidón, pectina), se supone que juegan un papel importante en los ciclos biológicos de carbono y nitrógeno. De esta forma se considera a *B. megaterium* como una especie de bacteria usada como un inoculante de suelo en la agricultura y la horticultura.

En el estudio realizado por Xuan *et al.*(2012) se evaluaron los efectos de la co-inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfatos (PSB) y bacterias fijadoras de nitrógeno (NFB) y la solubilización de la roca fosfórica (RP) en el efecto sobre el crecimiento, promoción y la

absorción de nutrientes por las plantas de semillero de nogal. Dos cepas de *Pseudomonas chlororaphis* PSB *B. megaterium*, y dos cepas NFB *Arthrobacter pascens* y *Burkholderia cepacia*, fueron seleccionados para investigar la interacción entre PSB y NFB en medio líquido. La concentración máxima de soluble fósforo (P) se determinó en el cultivo de mezcla de *P. chlororaphis* y *A. pascens*.

Se encontró entre el pH y la concentración de P soluble, así como la producción total de ácido orgánico y P solubilización. Co-inoculación con *P. chlororaphis* y enmienda *A. pascens* con RP dio lugar a la mayor altura de planta, brotes y las raíces de peso seco, P y nitrógeno (N) la absorción de las plántulas de nogal, y los importes máximos de P disponible y N en suelos bajo condiciones de casa sombra. Sin embargo, se mezcló la inoculación con *B. megaterium* y *A. pascens*. Los resultados demostraron que la co-inoculación con PSB y modificación NFB con RP podría ser una alternativa prometedora y opción para utilizar esta fuente potente como fertilizante de P en plantas de nuez y mantener una mayor nutriente disponibilidad en los suelos.

**Cuadro 1.** Clasificación científica de *B. megaterium*

<b>Phylum:</b>	<i>Firmicutes</i>
<b>Class:</b>	<i>Bacilli</i>
<b>Order:</b>	<i>Bacillales</i>
<b>Family:</b>	<i>Bacillaceae</i>
<b>Genus:</b>	<i>Bacillus</i>
<b>Species:</b>	<i>B. megaterium</i>
<i>Binomial name</i>	
<i>Bacillus megaterium</i>	

#### 4.9 *Virgibacillus koreensis*

El género *Virgibacillus* fue propuesto por primera vez por Heyndrickx *et al.* (1998).

El género *Virgibacillus* comprende 11 especies reconocidas, que comprende a *Virgibacillus olivae* (Quesada *et al.*, 2007) y *Virgibacillus halophilus* (An *et al.*, 2007) siendo recientemente descrita la especie *Virgibacillus pantothenicus* (Heyndrickx *et al.*, 1998).

Durante un estudio reciente de la diversidad microbiana del lago Keke sal en la cuenca Qaidam de la provincia de Qinghai, en el noroeste China, se encontraron bacterias halófilas en forma de vara, designada cepa YIM kknly16T, se aisló a partir de una solución de lodo salina.

La caracterización fenotípica y taxonómica junto con el análisis filogenético basado en secuencias de rRNA 16S genes, mostraron que la cepa YIM kknly16T estaba relacionada con los miembros del género *Virgibacillus*, pero representa una nueva especie.

Las células son estrictamente aerobios, móviles y son bacilos Gram-positivos.

**Cuadro 2.** Clasificación Científica de *Virgibacillus Koreensis*

<b>Phylum:</b>	<i>Firmicutes</i>
<b>Class:</b>	<i>Bacilli</i>
<b>Order:</b>	<i>Bacillales</i>
<b>Family:</b>	<i>Bacillaceae</i>
<b>Genus:</b>	<i>Virgibacillus</i>
<b>Species:</b>	<i>Virgibacillus carmonensis</i> <i>Virgibacillus dokonensis</i> <i>Virgibacillus halodenitrificans</i>

<i>Virgibacillus koreensis</i>
<i>Virgibacillus marismortui</i>
<i>Virgibacillus necrópolis</i>
<i>Virgibacillus pantothenicus</i>
<i>Virgibacillus proomii</i>
<i>Virgibacillus salexigens</i>

#### 4.10 *Ensifer adhaerens*

El género *Ensifer* y el género *Sinorhizobium*, fueron reconocidos recientemente formando un único clado filogenético (Balkwill, 2005; Willems *et al.*, 2003) y ahora pertenecen al mismo género, por lo que todas las especies del género *Sinorhizobium* se han transferido al género *Ensifer*, de conformidad con el artículo 38 del Código bacteriológicas (Young, 2003, la Comisión Judicial, 2008).

El género *Ensifer*, en la actualidad incluye once especies (Wang *et al.*, 2002.; Wei *et al.*, 2002.; Young, 2003; Toledo *et al.* 2003). Dos especies nuevas, *Ensifer mexicanus* y *Sinorhizobium chiapanecum*, han sido descritas, pero los nombres no han sido aún publicado válidamente (Lloret *et al.* 2007.; Rincón-Rosales *et al.*, 2009.).

Martens *et al.* (2007, 2008) demostraron recientemente que el poder discriminativo del MTAS para la identificación de especies y la delimitación es superior al gen 16S rRNA, realizando análisis de secuencias de ADN e hibridación del ADN- dentro del género *Ensifer*. *Ensifer adhaerens* es una bacteria del suelo que es capaz de adherirse a otras bacterias y lisar suelo, aunque no es un depredador obligado y no es nutricionalmente exigente (Casida, 1982). Debido a esta inusual actividad depredadora y otras características morfológicas, principalmente del organismo se consideró como más similar a la gemación, como lo indica el Manual appendaged bacterias sensu Determinativa de Bergey Bacteriología, 8<sup>a</sup> edición (Buchanan y Gibbons, 1974).

Se determinó que *Sinorhizobium / Ensifer* es un género de bacterias fijadoras de nitrógeno (Rhizobium).

Se observó que *E. adhaerens* es no simbiótica, pero posee la capacidad de nodular como *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena leucocephala* cuando se les proporciona plásmidos simbióticos de *Rhizobium tropici* CFN 299 (Rogel *et al.*, 2001), esta evidencia sugiere que *E. adhaerens* representa a un grupo de rizobios no simbióticos. Su notable actividad depredadora y el hecho de que los métodos filogenéticos no se utiliza ampliamente en el momento han contribuido al hecho que no se había reconocido fácilmente como Rhizobium cuando se aisló por primera vez. (Casida, 1982).

**Cuadro 3.** Clasificación científica de *Ensifer adhaerens*

<b>Phylum:</b>	<i>Proteobacteria</i>
<b>Class:</b>	<i>alphaproteobacteria</i>
<b>Order:</b>	<i>Rhizobiales</i>
<b>Family:</b>	<i>Rhizobiaceae</i>
<b>Genus:</b>	<i>Ensifer</i>
<b>Species:</b>	<i>E. adhaerens</i>

#### 4.11 *Brevibacterium frigoritolerans*

El género *Brevibacterium* ha sido difícil para los taxonomistas de clasificar debido a su estrecha similitud morfológica a otros géneros. Desde que fue propuesto en 1953, el género a menudo ha sido redefinido.

*Brevibacterium* es un género de bacterias del orden de los Actinomycetales. Son organismos Gram-positivos del suelo. Es el único género en la familia Brevibacteriaceae.

*Brevibacterium* (América brevis, corto y griego bajsggia, varilla) tiene especies que son estrictamente aeróbicas, organotróficas y quimio-bacterias pertenecientes a la familia *Brevibacteriaceae*.

Durante su crecimiento el microorganismo presenta una forma distinta en varilla joven y forma de coco. Las células son por lo tanto variables en longitud. Muchas de las células están dispuestas en un ángulo para dar formas de V. Ambas formas, cocoides y de varilla son Gram-positivas, pero algunas cepas tienen mayor facilidad de decolorar.

El color de las colonias varía de naranja (*B. megaterium*), pasando por el gris-blanco (*B. epidermis.*, *B. casei*) y púrpura (*B. iodinum*). La pigmentación naranja (carotenoides) de este tipo de cepa a menudo depende de la luz. La coloración púrpura de *B. iodinum* es como resultado de la producción y secreción de cristales de color púrpura de un derivado de fenazina, llama iodinina (Jones y Keddie 1986).

*Brevibacterium* muestra un crecimiento en un medio completo (peptona-extracto de levadura agar) con un pH neutro. La temperatura óptima de crecimiento es 20 -30°C o 37 °C dependiendo de la especie y la tensión.

Todas las cepas estudiadas toleran o son a veces estimuladas por la adición de NaCl al medio. Se requiere un pH mínimo de 6,0 para el crecimiento.

Varios estudios han informado sobre la producción de los aminoácidos L-lisina y el ácido L-glutámico por la especie de *Brevibacterium*, incluyendo *B. flavum* y *B. lactofermentum* (Shiio *et al.* 1963, y Momose Takagi 1978, Das *et al.* 1995, Shiratsuchi *et al.* 1995, Leuchtenberger 1996).

**Cuadro 4.** Clasificación científica de *Brevibacterium frigoritolerans*

<b>Kingdom:</b>	<b>Bacteria</b>
-----------------	-----------------

<b>Phylum:</b>	<i>Actinobacteria</i>
<b>Order:</b>	<i>Actinomycetales</i>
<b>Suborder:</b>	<i>Micrococccineae</i>
<b>Family:</b>	<i>Brevibacteriaceae</i> <i>Breed 1953</i>
<b>Genus:</b>	<i>Brevibacterium</i> <i>Breed 1953</i>
<b>Type species</b>	
<i>Brevibacterium linens</i>	
Species	
<i>B. acetyliticum, B. albidum, B. antiquum,</i> <i>B. aurantiacum, B. avium, B. casei, B. celere, B. divaricatum, B. epidermidis,</i> <i>B. frigoritolerans, B. halotolerans, B. immotum, B. iodium, B. linens, B. luteolum, B. luteum, B. mcbrellneri, B. otitidis, B. oxydans, B. paucivorans, B. permense, B. picturae, B. samyangense</i> <i>B. sanguinis, B. stationis</i>	

#### 4.12 Tratamiento de semillas con clotianidina.

El tratamiento de semillas, a pesar de ser una práctica tan antigua en la agricultura, se ha convertido en una práctica de gran importancia como herramienta de control, gracias a la introducción de nuevos fungicidas e insecticidas formulados específicamente para el tratamiento de semillas.

Dentro del mercado de tratamiento de semillas, con la introducción de la clotianidina (nombre

comercial Poncho) en el año 2004 en los Estados Unidos, se dio un cambio tecnológico que vino a revolucionar el mercado de la protección de plagas en maíz y otros cultivos, se ha convertido en un producto líder.

En un estudio realizado por *Karnataka, (2007)*, donde se evaluó la eficacia biológica de Clotianidina (Poncho 600 FS) en tratamiento de semillas a diferentes dosis, junto con aparadores de semillas populares contra las plagas del algodón, como chupadores tempranos en algodón de secano durante dos temporadas. Los resultados del análisis agrupado indicó que el tratamiento de semillas con Clotianidina (Poncho 600 FS) en 9 ml / kg tuvo una protección de las tres plagas del algodón (trips, pulgones, Jassids) plagas chupadores de temporada.

Significativamente hubo mayor rendimiento de semilla de algodón (11,23 q / ha) que fue recolectada de los tratamientos con cloianidina (Poncho) 600 FS 9 ml / kg parcelas tratadas que fue seguido de cerca por Imidacloprid 70 WS 10 g / kg semillas. No hubo fitotoxicidad del clotianidina (Poncho) 600 FS tratamientos sobre el algodón híbrido DHH-11.

#### 4.13 Características de la Clotianidina.

La Clotianidina es clasificada como insecticida. Su ingrediente activo es de acción sistémica y de contacto, que ofrece la máxima protección sistémica de la semilla y la plántula. Posee excelente residualidad es altamente efectivo y seguro en el control de insectos de suelo.

**Cuadro 5.** Descripción de poncho.

<b>Modo de acción</b>	Sistémica, de ingestión y de contacto.
<b>Grupo Químico:</b>	Nitroguanidina
<b>Principios Activos</b>	Clotianidina = 600 g/l
<b>Formulación</b>	Suspensión concentrada para tratamiento de semillas (FS).

<b>Mezclas y restricciones</b>	Se aplica exclusivamente de manera preventiva antes de la siembra. Se debe lograr una aplicación exacta de la dosis recomendada por semilla lo cual se logra únicamente en instalaciones diseñadas para tal fin y bajo un tratamiento profesional. Debe ser un equipo especial para lograr la calibración recomendada, diseñados para su utilización en Plantas de Tratamiento Profesional de Semillas.
<b>Cultivos</b>	Maíz, Sorgo, Pasturas gramíneas (Festuca, Agropiro, Pasto Ovillo, Avena, Falaris, Rye Grass).
<b>Plagas que controla en maíz.</b>	Bicho torito o Bicho candado ( <i>Diloboderus abderus</i> ), Cascarudorubio ( <i>Cyclocephala</i> spp.), Gusano alambre ( <i>Discynerus agates</i> ), Gusano blanco o Vaquita tornasolada ( <i>Colaspis</i> spp.), Gusanos alambre ( <i>Agriotes</i> spp.), Gusanos blancos ( <i>Maecolaspis</i> sp.), Hormigas podadoras ( <i>Acromyrmex</i> spp.), Orugas cortadoras ( <i>Agrotis</i> spp.), Salta Perico ( <i>Conoderus</i> sp.).
<b>Plagas que controla en sorgo.</b>	Bicho torito o Bicho candado ( <i>Diloboderus abderus</i> ), Cyclocéfalas ( <i>Cyclocephala</i> spp), Colaspis ( <i>Colaspis</i> spp), Maecolaspis ( <i>Maecolaspis</i> spp), Gusano alambre ( <i>Discynerus gagates</i> ), Gusano alambre ( <i>Agriotes</i> spp), Gusano alambre ( <i>Conoderus</i> spp), Pulgón del maíz ( <i>Rhopalosiphum maidis</i> ), Pulgón verde de los cereales ( <i>Schizaphis graminum</i> ), Hormigas podadoras ( <i>Acromyrmex</i> spp), Hormigas podadoras ( <i>Atta</i> spp), Orugas cortadoras ( <i>Agrotis</i> spp).
<b>Pasturas y gramíneas</b>	Bicho torito ( <i>Diloboderus abderus</i> ), <i>Cyclocephala</i> ( <i>Cyclocephala</i>

	signiaticollis), Gusano alambre (Conoderus spp), Pulgón verde (Schizaphis graminis), Pulgón amarillo (Metopholodium dirhodums).
<b>Dosis</b>	<b>Maíz:</b> 0,3 i 0,5 cc/ 1.000 unidades de semilla. <b>Sorgo:</b> 300 i 500 cc/ 100 kg de semilla.
<b>Clase toxicológica</b>	Clase II (producto moderadamente peligroso)

La doble vía de acción (sistémica y de contacto), sumada al gran espectro de control y residualidad, brinda la máxima protección insecticida, tanto a la semilla como a la plántula, durante todo el período de implantación.

Este insecticida crea una "Celda de Máxima Seguridad", según estudios revelados por © Bayer CropScience Argentina. Es decir la semilla tratada con clotianidina (Poncho) que construye su propia "Celda de Máxima Seguridad" en tres fases.

1. Primera fase: Inmediatamente después de la siembra, clotianidina (Poncho) se activa con la humedad del suelo y comienza a difundirse rápidamente alrededor del grano, formando la "celda de máxima seguridad".

2. Segunda fase: Durante la germinación y el desarrollo de la plántula, la "celda de máxima seguridad" comienza a expandirse por la zona radicular. La alta concentración de ingrediente activo disuelto en el suelo es absorbido por las raíces y comienza a distribuirse uniformemente en todos los tejidos vegetales (raíces y parte aérea).

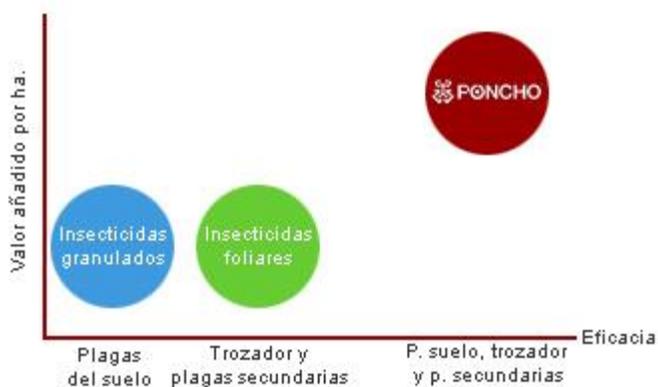
3. Tercera fase: La "celda de máxima seguridad" se extiende a toda la zona radicular y se estabiliza (Comportamiento en el suelo), manteniéndose activa por varias semanas.

Comportamiento en el suelo:

El adecuado balance de Clotianidina entre solubilidad en agua y adsorción a la fracción orgánica del suelo, protege al insecticida aplicado "en origen" de eventuales problemas de lixiviación (lavado por exceso de humedad del suelo) y le otorga una excelente estabilidad en la zona de la rizosfera; asegurando una prolongada protección de insecticida tanto a la semilla, como a la joven plántula (raíz, cuello, tallo y hojas).

Este insecticida posee una serie de ventajas para el tratamiento de semillas. Posee máxima protección sistémica de la semilla y la plántula y residualidad extendida al período de implantación.

Con esta tecnología, se han podido mejorar los costos, los rendimientos y los ingresos de los productores de maíz. Este producto ha mejorado la productividad de la producción de maíz y su aportación de valor representa una ventaja competitiva para los productores y la industria semillera.



**Figura11.** Funciones de clotianidina.

Ferraris et al., (2008) estudió el efecto de los insecticidas curasemillas (poncho) sobre la eficiencia de estos microorganismos y se evaluó la respuesta agronómica a un promotor de crecimiento conteniendo Micorrizas en su formulación. Donde los resultados mostraron que la respuesta agronómica a los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM) no es afectada por el uso conjunto de fungicidas e insecticidas curasemillas.

---

## CAPITULO V

### METODOLOGIA

#### 5.1 Localización del sitio experimental.

Para la realización de esta investigación, el experimento *in vivo* se desarrolló en el invernadero y laboratorio del departamento de alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, (U.A.A.A.N.), en Buenavista, Saltillo Coahuila, ubicada a los 25° 22' de latitud norte y 101° 00' de longitud oeste, con una altitud de 1742 msnm; y presenta una precipitación media anual de 298.5mm

#### 5.2 Análisis de datos.

El análisis estadístico consistió en realizar un análisis de varianza (ANVA) y la comparación de medias con el programa estadístico MINITAB 16.

#### 5.3 Variables evaluadas.

Los parámetros que se evaluaron fueron aspectos como Altura de Planta (AP), Número de Hojas (NH), Peso Fresco de Tallo (PFT),, Peso Fresco de Raíz (PFR), Peso Seco de Tallo (PST), y Peso Seco de Raíz (PSR).

#### 5.4 Material experimental.

El material utilizado en el experimento fue el siguiente:

- \* Vasos de unisel con capacidad de 900ml donde se colocó el sustrato de siembra.
- \* 8 Bandejas de plástico donde se preparó el inóculo.

- \* Balanza analítica digital (OHAUS) modelo TS120 expresada en gramos, la cual fue usada para pesar cada una de las muestras obtenidas.
- \* Estufa de aire caliente marca MAPSA modelo HDP334.

### **5.5 Material vegetativo.**

Como material vegetativo se usaron semillas de maíz y sorgo con poncho y maíz y sorgo sin poncho. Las cuales fueron proporcionados por la empresa. El maíz fue blanco y el sorgo

### **5.6 Material biológico.**

Las cepas usadas en el experimento, se aislaron de muestras colectadas de suelos de diferentes lugares del México, Veracruz, Hidalgo, Tamaulipas y Coahuila.

Las bacterias utilizadas fueron:

*Bacillus egaterium* strain IAM 13418 aislada del estado de Tamaulipas del maíz.

*Virgibacillus Koreensis* strain BH 30097, aislada del estado d Veracruz, del café.

*Ensifer Adhaerens* strain LMG 20216, aislada del estado de Hidalgo del frijol.

*Brevibacterium Frigori Tolerans* strain DSM 8801 aislada del estado de Coahuila del cactus.

### **5.7 Aislamiento y conteo de presencia de microorganismos.**

Se tomó un gramo de tierra el cual se diluyó en 9ml de agua destilada, se realizaron 3 diluciones ( $1 \times 10^3$ ). De la tercera dilución se tomaron 100 ul los cuales se sembraron en agar rojo congo, y se incubaron a 30°C durante 48 y hasta 96 horas. Posteriormente se identificaron las bacterias y se realizó el conteo.

### **5.8 Capacidad fijadora de nitrógeno.**

Para la cuantificación de la capacidad fijadora de nitrógeno se llevó mediante la técnica de Berthelot.

### **5.9 Cultivo de microorganismos.**

Las cuatro cepas bacterianas aisladas fueron conservadas en un medio crioprotector compuesto de glicerol y leche descremada (20%-5%), y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realizó la identificación molecular de las cepas bacterianas. La identificación molecular se realizó mediante la empresa Macrogen, Corea. Las cepas se enviaron para su identificación en criotubos de 2 ml, donde contenía la bacteria en medio líquido y un 20% de glicerol. Se utilizó una hielera de nieve seca con hielo seco para el transporte de las muestras a Macrogen. La identificación se llevó a cabo mediante la secuenciación del gen del 16s del ARNr. Los iniciadores utilizados para la amplificación del gen del 16s ARNr fueron el 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y el 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) clasificados como iniciadores universales. Para la secuenciación del amplificado se utilizaron los iniciadores 518F (CCAGCAGCCGCGTAATACG) y 800R (TACCAGGGTATCTAATCC). Una vez teniendo los resultados de la secuencia del gen del 16s del ARNr de cada bacteria, se analizaron las secuencias en el programa Nucleotide Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se utilizó la base de datos 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) de NCBI para realizar homología de las secuencias.

Después de haber conservado los microorganismos. Con un asa se resembró en cajas Petri en agar rojo congo dejándolas incubar de 48 a 72 horas. Para cultivarlos se tomó colonias de la resiembra la cual fue depositada en caldo nutritivo (100ml) en matraces Erlenmeyer, los cuales fueron sometidos en un shaker durante 48 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  y 150 rpm.

## 5.10 Tratamiento de la semilla

### 5.10.1 Sanitización de semillas.

Para la sanitización de semillas, se hizo una selección, donde se descartó aquellas que presentaran lesiones físicas..

Se sumergieron en etanol durante 3 min con agitación, después se enjuagaron con agua destilada estéril.

### 5.10.2 Preparación de sustrato.

Se codificaron vasos de unisel con capacidad del litro, según el orden de los 6 tratamientos con sus 15 repeticiones, los cuales fueron llenados con peatmoss y perlita con una relación 70:30.

## 5.11 Preparación de inóculo.

Para la inoculación de semillas (maíz y sorgo), se preparó una solución de 1300 ml con agua destilada estéril y el inóculo ( $1 \times 10^{-8}$ ) de cada una de las cuatro cepas. Se le dio uniformidad a la concentración de las cepas ajustando la absorbancia a 1 a una longitud de onda de 600 nm.

**Cuadro 6.** Preparación de inóculo.

Cepa	Inóculo	H2O
<i>Virgibacillus koreensis</i>	507ml	793ml
<i>Ensifer adhaerens</i>	48ml	1252ml
<i>Bacillus megaterium</i>	1288ml	12ml
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	616ml	684ml

## 5.12 Inoculación de semillas.

Las semillas previamente sanitizadas se sumergieron en charolas las cuales contenían la solución de cada cepa, se inocularon por separado las semillas (maíz y sorgo) con clotianidina, y semillas sin clotianidina. El tiempo de inoculación fue de 1 hora.

**Figura 12.** Inoculación de semillas.

*Virgibacillus koreensis*



**Figura 13.** Inoculación de semillas.

*Ensifer adhaerens*



**Figura 14.** Inoculación de semillas

*Bacillus megaterium*



**figura 15.** Inoculación de semillas

*Brevibacterium frigori tolerans*



Los tratamientos evaluados se muestran en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Tratamientos.

Tratamientos	Maíz y sorgo con cloianidina	Maíz y sorgo sin clotianidina
<b>C1</b>	Control de fertilización química (semillas sin inocular, regadas con fertilizante químico)	Control de fertilización química (semillas sin inocular, regadas con fertilizante químico)
<b>C2</b>	Testigo absoluto (semillas sin inocular regadas solo con agua)	Testigo absoluto (semillas sin inocular regadas solo con agua)
<b>C3</b> <b>UFC(1x10<sup>8</sup>)</b>	Semillas inoculadas con la cepa <i>Virgibacillus koreensis</i> y regadas solo con agua	Semillas inoculadas con la cepa <i>Virgibacillus koreensis</i> y regadas con agua
<b>C4</b> <b>UFC(1x10<sup>8</sup>)</b>	Semillas inoculadas con la cepa <i>Ensifer adhaerens</i> y regadas solo con agua.	Semillas inoculadas con la cepa <i>Ensifer adhaerens</i> y regadas solo con agua.
<b>C5</b> <b>UFC(1x10<sup>8</sup>)</b>	Semillas inoculadas con la cepa <i>Bacillus megaterium</i> y regadas solo con agua.	Semillas inoculadas con la cepa <i>Bacillus megaterium</i> y regadas solo con agua.
<b>C6</b> <b>UFC(1x10<sup>8</sup>)</b>	Semillas inoculadas con la cepa <i>Brevibacterum frigoritolerans</i> y regadas solo con agua.	Semillas inoculadas con la cepa <i>Brevibacterum frigoritolerans</i> y regadas solo con agua.

Una vez establecidos los tratamientos se procedió a sembrar, respetando maíz con clotianidina los 6 tratamientos, maíz sin clotianidina con sus respectivos tratamientos, también se hizo lo mismo con sorgo. Cabe mencionar que por cada tratamiento se sembraron 15 repeticiones, para los 4 cultivos.

En los tratamientos, una vez sembrado el control químico positivo se manejó con fertilización química usando sulfato de amonio mediante el riego, donde se adicionaban 200 ml del preparado el cual consistía en agregar 0.3g de sulfato de amonio en 10 L de agua.

### 5.13 Siembra.

Para llevar a cabo la siembra, se colocaron 3 semillas en cada vaso, antes preparados con sustrato y por último se regó. Es importante mencionar que el riego fue cada tercer día.

**Figura 16.** Siembra.



**Figura 17.** Siembra.



### 5.14 Variables evaluadas

**Altura de planta.** Para conocer este parámetro se utilizó una cinta métrica, tomando a la planta desde su base hasta la punta de su última hoja en formación.

**Numero de hojas.** El conteo se realizó en los cultivos de maíz y sorgo tomándolas con cuidado para evitar algún tipo de daño.

**Peso fresco de tallo y raíz.** El procedimiento que se llevó a cabo para conocer estas variables fue el siguiente: se inició lavando completamente la raíz para quitarle el exceso de tierra, después con una navaja separamos el tallo de la planta para iniciar el pesado.

**Peso seco de tallo y raíz.** De igual forma para estas variables el procedimiento fue el mismo que en peso fresco solo que para conocerlas, se dejaron ambas muestras en una estufa de aire caliente a una temperatura de 60°C.

**Figura 18.** Medición de muestras.



**Figura 19.** Medición de muestras en fresco.



## CAPITULO VI

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 6.1 Selección de cepas

En el aislamiento de microorganismos se seleccionaron colonias que presentaban morfología relacionada a la literatura. Como se muestra en el cuadro 8.

**Cuadro 8.** Morfología macroscópica de cepas seleccionadas.

Microorganismo	Elevación	Borde	Color	Forma	Textura
<i>Virgibacillus koreensis</i>	Elevada	Entero	Rojo	Circular	Suave
<i>Ensifer adhaerens</i>	Elevada	Entero	Rojo	Circular	Mucoide
<i>Bacillus megaterium</i>	Plana	Entero	Rojo brillante	Circular	Suave
<i>Brevibacterium frigori tolerans</i>	Plana	Enrollada	Rojo fuerte	Circular	Pegajosa

Las cepas seleccionadas por presentar un rendimiento mayor en fijación de nitrógeno *in vitro* fueron:

*Bacillus megaterium* strain IAM 13418 aislada del estado de Tamaulipas del maíz.

*Virgibacillus Koreensis* strain BH 30097, aislada del estado de Veracruz, del café.

*Ensifer Adhaerens* strain LMG 20216, aislada del estado de Hidalgo del frijol.

*Brevibacterium Frigori Tolerans* strain DSM 8801 aislada del estado de Coahuila del cactus.

## **6.2 Prueba de promoción de crecimiento en plántulas**

En cuanto al cultivo de microorganismos después de haber transcurrido el tiempo en agitación, los matraces presentaban un color turbio y se almacenaba biomasa al fondo lo cual indicaba que había buen crecimiento bacteriano.

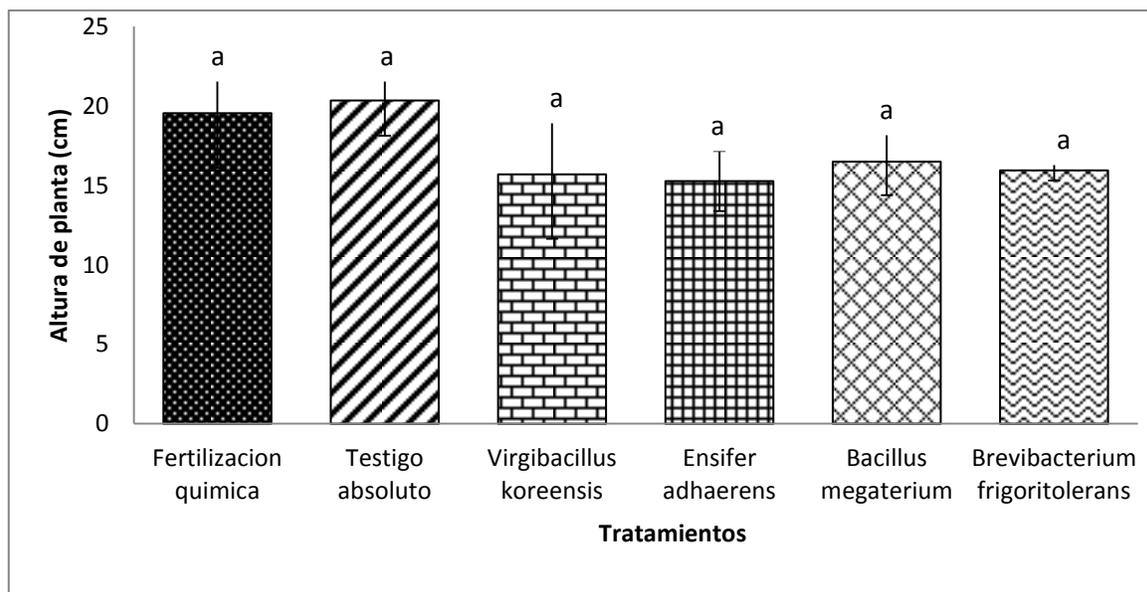
Después de la Sanitización, las semillas de maíz cambiaban un poco de color tornándose amarillo blanco.

La inoculación de semillas tratadas con poncho perdía un poco el color rosa del clotianidina poncho.

Los resultados de promoción de crecimiento se muestran en las gráficas siguientes:

### **6.2.1 Maíz sin clotianidina**

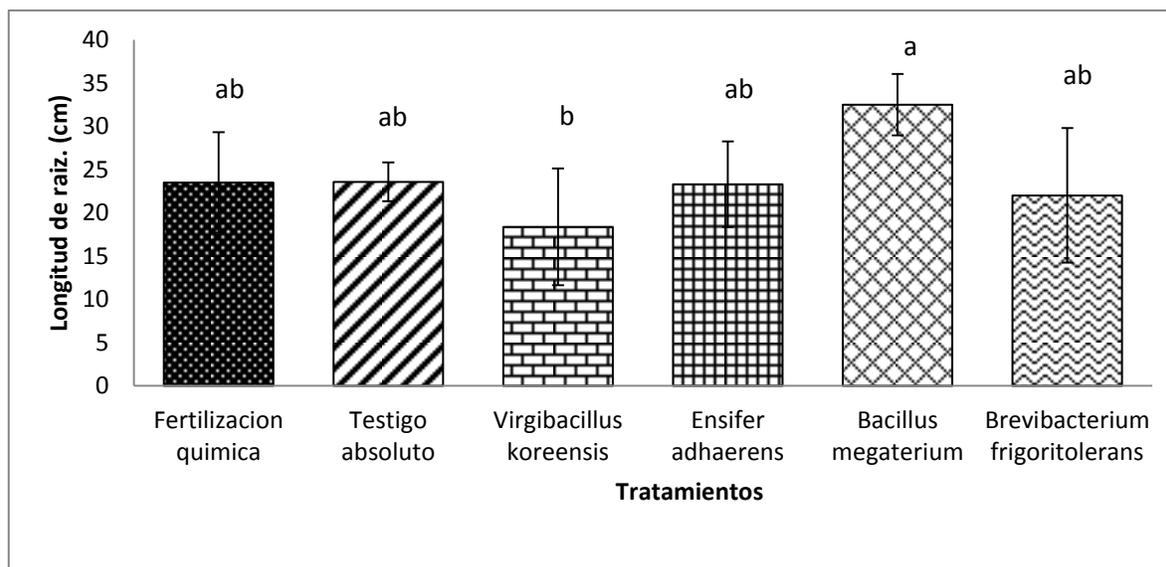
En la figura 20 se muestra la altura de planta, donde el testigo absoluto, que consta de riego con agua fue quien tuvo los mayores rendimientos con promedio de 20.35 cm en altura de planta en maíz sin poncho. Lo cual significa que al aplicar biofertilizantes en cultivo de maíz, al evaluar la altura de la planta, no existe aportación de efectos favorables por las cepas.



**Figura 20.** Altura de planta en maiz sin clotianidina. . En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

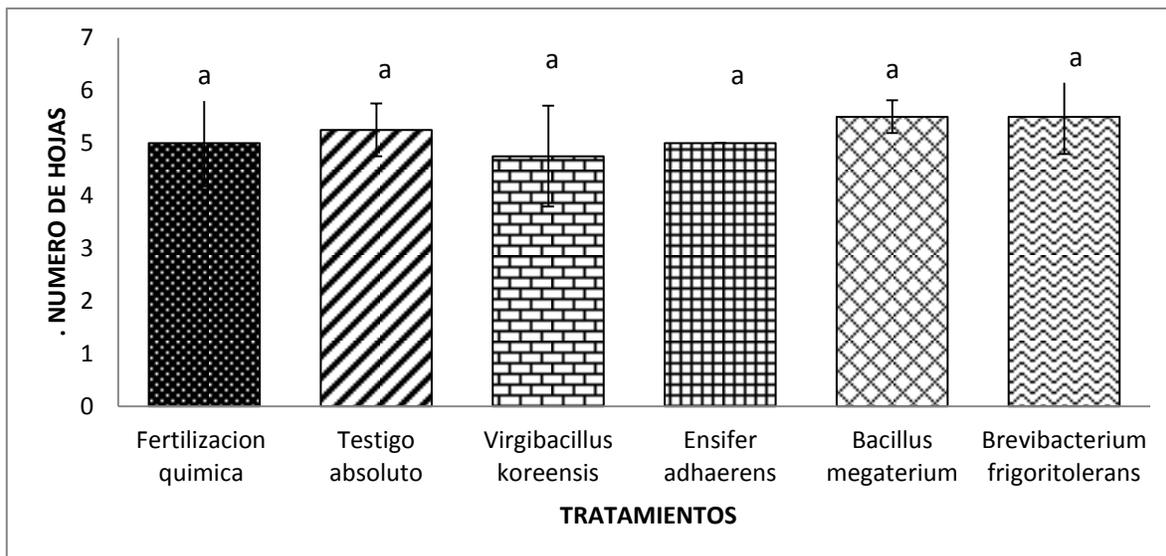
En la Figura 21 se muestra la longitud de raíz, donde denota que la cepa *B. megaterium* fue la cepa que presentó efecto positivo en cuanto al parámetro evaluado con un promedio de 32.5cm. Con una diferencia de 37% lo cual indica que la cepa en este caso sí ejerce un efecto al aumentar la longitud de la raíz en cultivo de maíz.

En el estudio realizado por Xuan *et al.*(2012) se evaluaron los efectos de la co-inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfatos (PSB) y bacterias fijadoras de nitrógeno (NFB) y la solubilización de la roca fosfórica (RP) en el efecto sobre el crecimiento, promoción y la absorción de nutrientes por las plantas de semillero de nogal. Dos cepas de *Pseudomonas chlororaphis* PSB *Bacillus megaterium*, y dos cepas NFB *Arthrobacter pascens* y *Burkholderia cepacia*, fueron seleccionados para investigar la interacción entre PSB y NFB en medio líquido. La concentración máxima de soluble fósforo (P) se determinó en el cultivo de mezcla de *P. chlororaphis* y *A. pascens*. Concluyendo también que estas cepas podrían aumentar la altura de planta y el peso seco de la raíz.



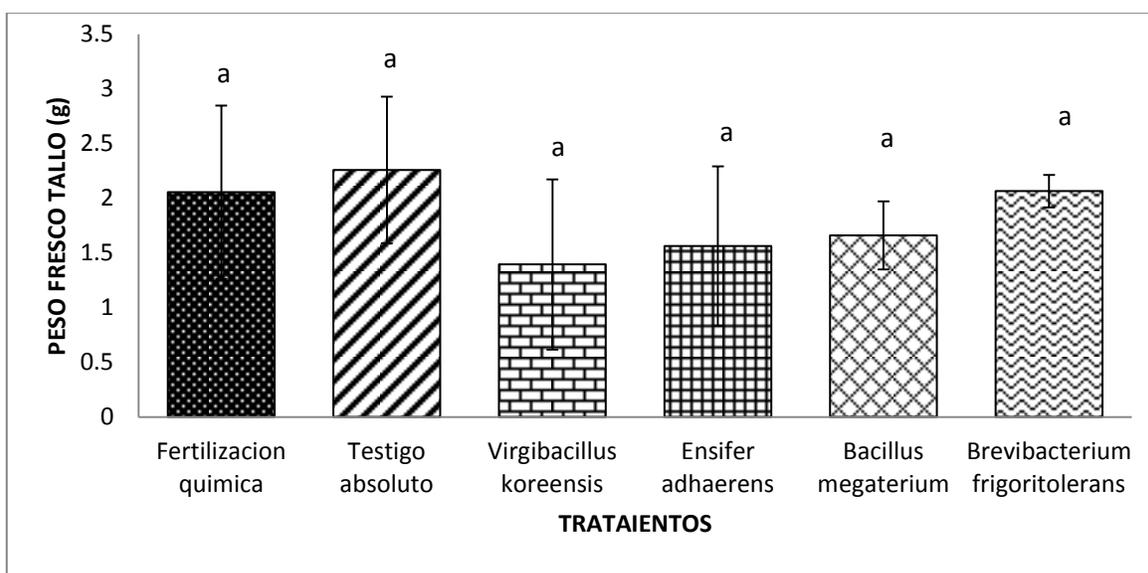
**Figura 21.** Longitud de raíz en maíz sin clotianidina. En este tratamiento se muestran diferencias significativas, al haber tres grupos con letras distintas (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En el número de hojas (figura 22), podemos observar que los tratamientos con las cepas *Bacillus megaterium* y *Brevibacterium frigoritolerans* tuvieron el mismo rendimiento en cuanto a número de hojas con promedio de 5.5, demostrando el mayor rendimiento en este parámetro, donde los testigos no superan a estos tratamientos con diferencia de 4.76%, evidenciando que hay un efecto al aplicar biofertilizantes en cultivos de maíz.



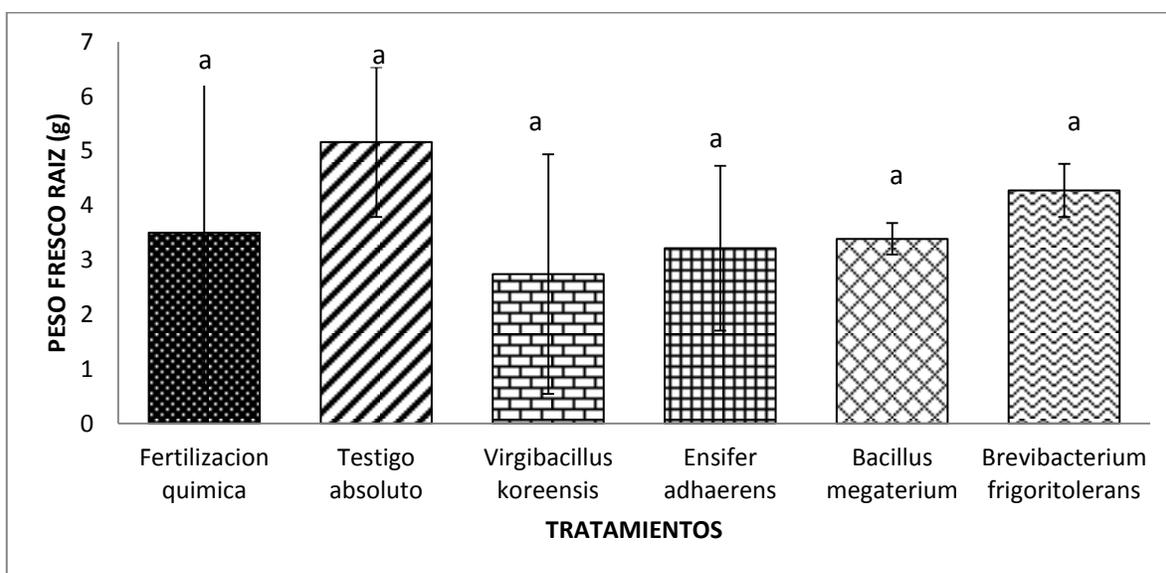
**Figura 22.** Numero de hojas en maiz sin clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con fertilizante químico obtuvo los mayores rendimientos en peso fresco tallo con promedio de 2.25g, evidenciando que en este parámetro las cepas no tuvieron efecto positivo, aunque se encuentra muy seguida la cepa *Brevibacterium frigoritolerans* con promedio de 2.065. Figura 23



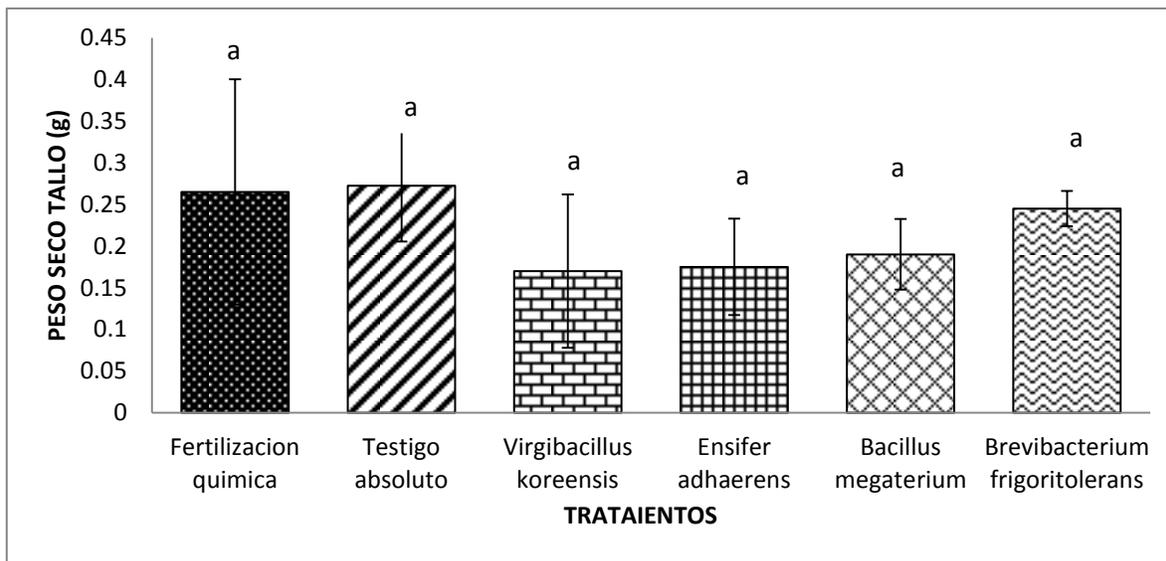
**Figura 23** Peso Fresco Tallo en maíz sin clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 24 Con los resultados por el analisis de varianza (ANVA) indican que en este parametro evaluado, el testigo absoluto obtuvo los mayores rendimientos en peso fresco raiz con promedio de 5.16 g. en este tratamiento las cepas no muestran efecto positivo, puesto que no superan al testigo absoluto.



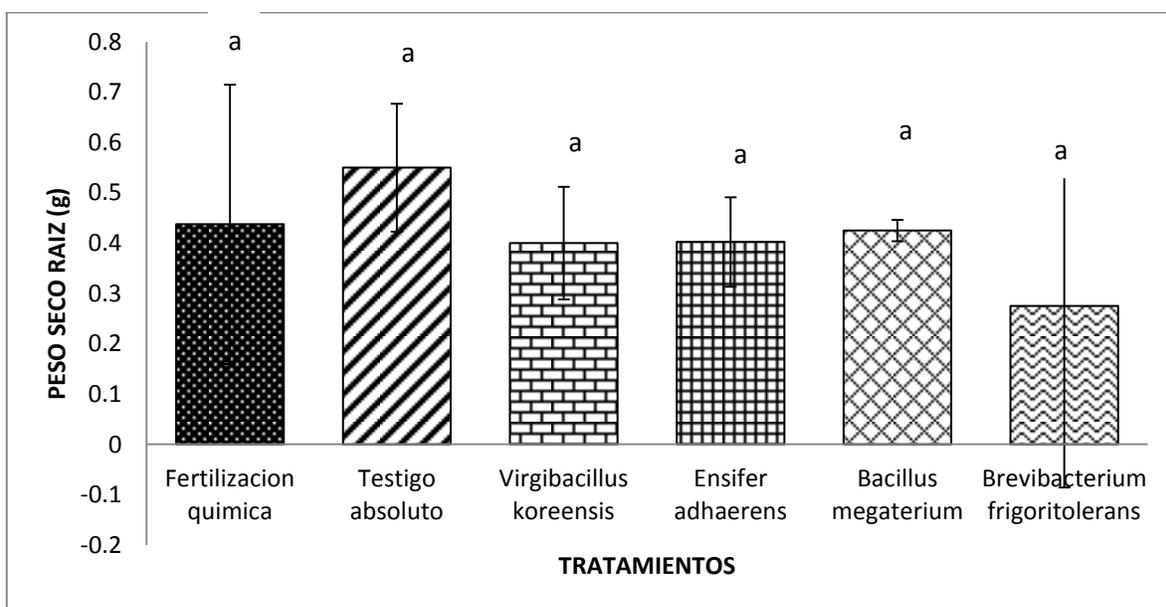
**figura 24.** Peso Fresco Raiz en maíz sin clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16)

El testigo absoluto que consta de riego con agua obtuvo los mayores rendimientos con promedio de 0.27g, en este parametro las cepas no obtuvieron efectos potivos puesto que ninguna cepa supera a los testigos. Figura. 25



**figura 25.** Peso Seco Tallo en maiz sin clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

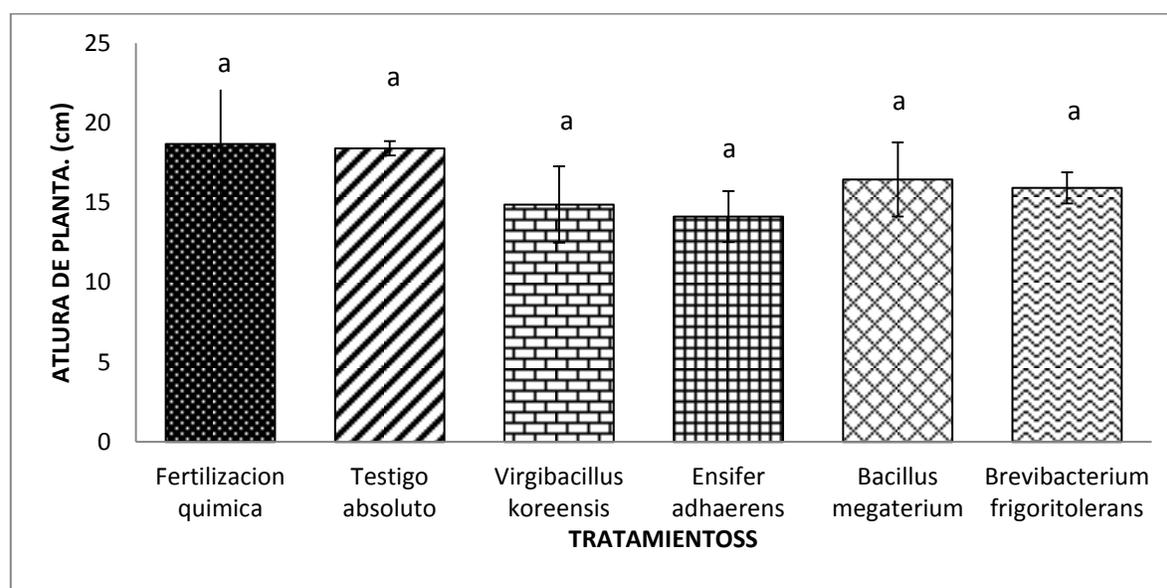
Nuevamente los resultados arrojan que el testigo absoluto obtuvo los mayores rendimientos con promedio de 0.55g, en en cuanto a la variable evaluada ninguna de las cepas muestra efecto, por lo que las diferencias o efectos de biofertilizantes aplicados en cultivos de maiz son nulas.



**Figura 26.** Peso Seco Raiz en maiz sin clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16). Figura 26.

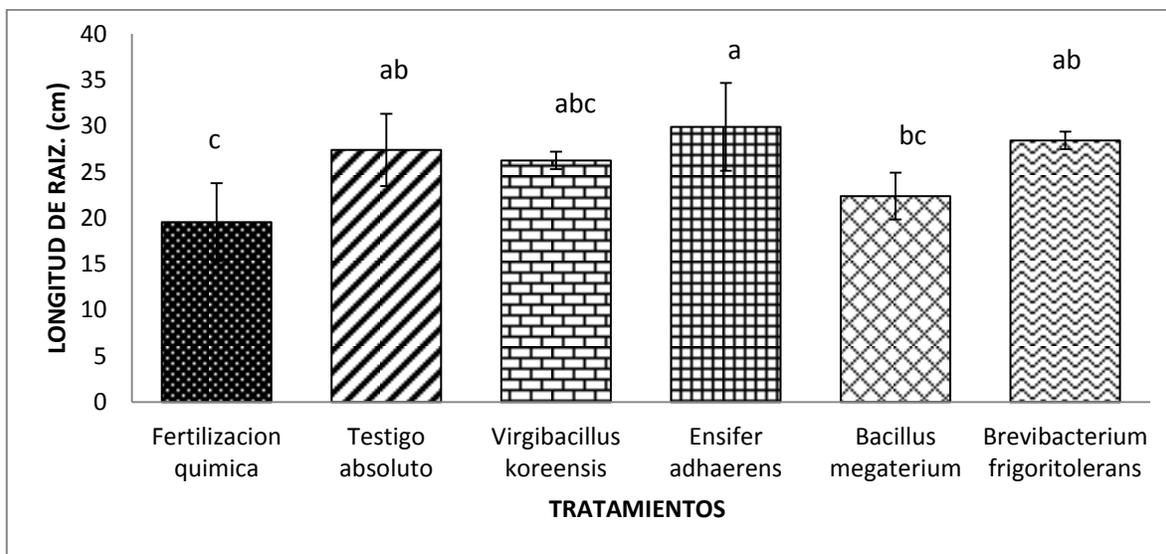
### 6.2.2 Maiz con Clotianidina.

En maiz con poncho el tratamiento que consta de riego con fertilizacion quimica, sulfato de amonio, obtuvo los mayores rendimientos en altura de planta con un promedio de 18.6cm, lo cual indica que ninguna cepa tuvo efectos positivos para este tratamiento, descartando efectos de cepas promotoras de crecimiento. Figura 27.



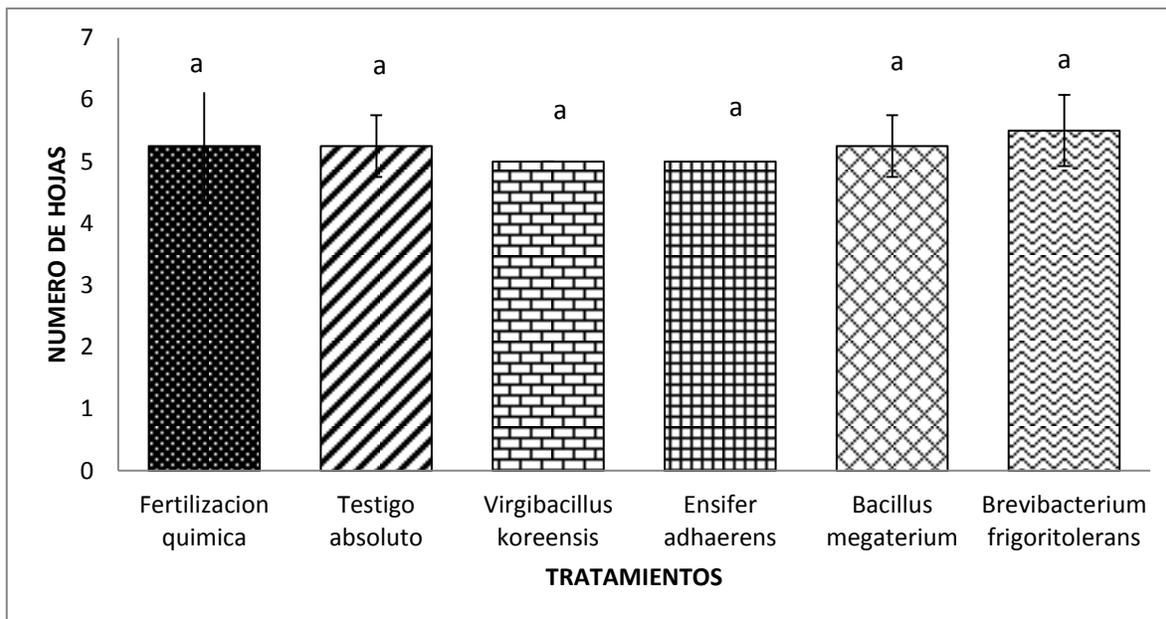
**Figura 27.** Altura de Planta maiz con clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 28. Al analizar la longitud de raíz, denota que la cepa *E. adhaerens* obtuvo los mayores rendimientos con promedio de 29.9cm, marcando una diferencia de 93.65% con el testigo absoluto. Se prueba que hay efectos positivos al aplicar biofertilizantes puesto que se supera a los testigos.



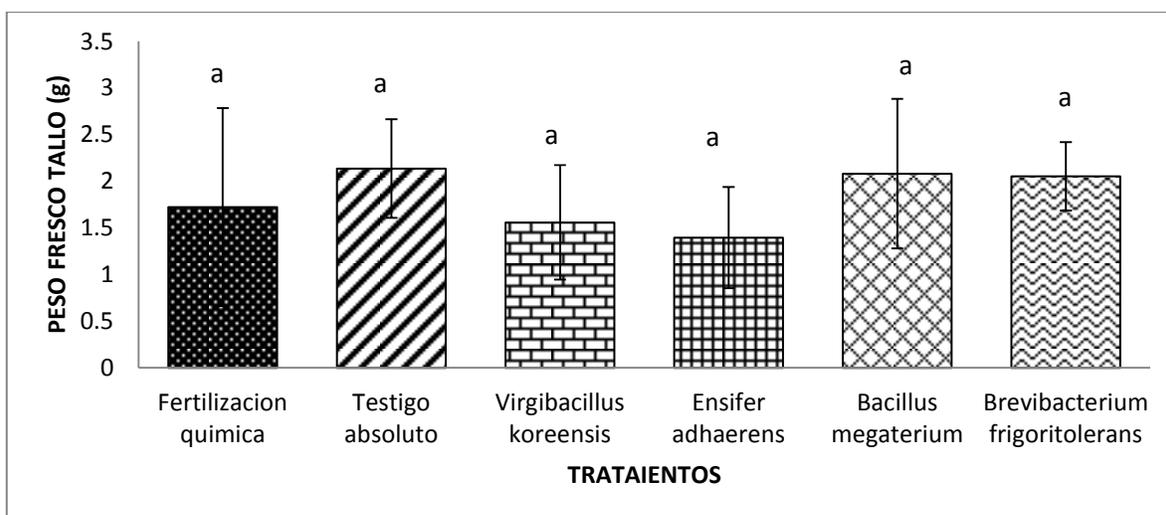
**Figura 28.** Longitud de Raíz maíz con clotianidina. En este tratamiento se muestran diferencias significativas, al haber cinco grupos con letras distintas (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 29 podemos observar que la cepa *Brevibacterium frigori tolerans*, presenta rendimientos mayores al superar a los testigos con un promedio de 5.5 hojas, con diferencias de 4.76% en comparacion con el valor absoluto. en esta variable se prueba que la cepa actuó, obteniendo asi mejores rendimientos. Diversos estudios demuestran la factibilidad de mejorar el comportamiento agronómico del maíz mediante el uso de biofertilizantes (Fallik y Okon 1996a; Fulchieri y Frioni, 1994; Purcino *et al.*, 1996) desde la reducción del tiempo de germinación y aumento de los porcentajes de germinación y establecimiento de las plántulas hasta incrementos sustanciales en los rendimientos finales del cultivo. Se menciona que del 13 al 20 por ciento del contenido de nitrógeno en maíz puede ser atribuido a la actividad fijadora de nitrógeno de bacterias tales como *Azotobacter* (Soliman y Abdel Monem, 1994).



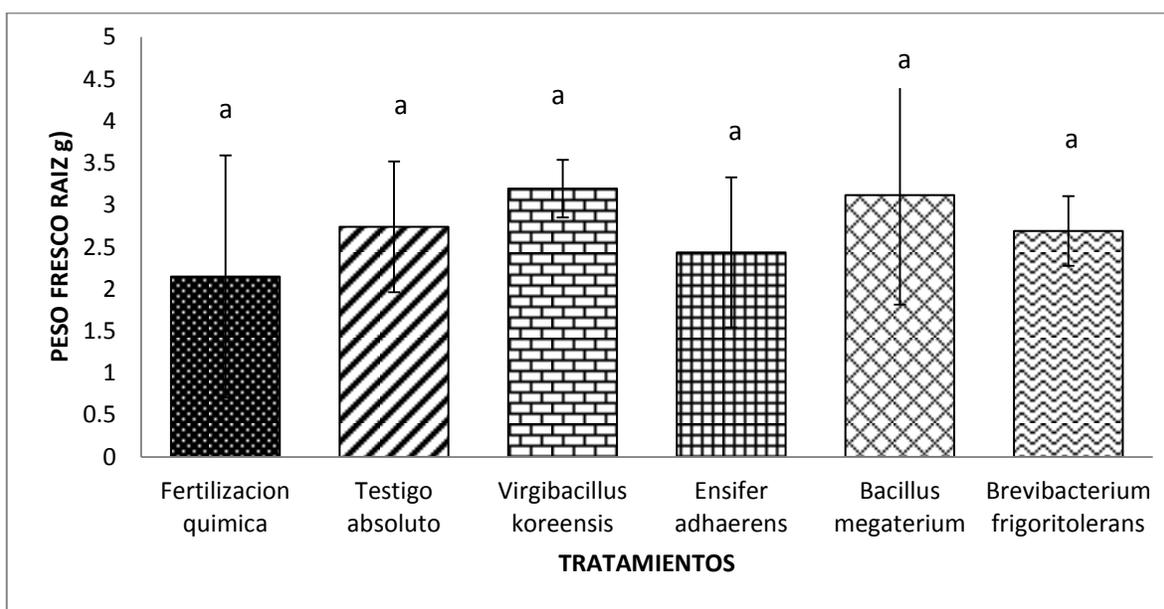
**Figura 29** Nueero de Hojas en maiz con clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 30 el testigo absoluto, tuvo los mayores rendimientos al presentar el promedio más alto de 2.01g, sin embargo los efectos de las cepas en la variable evaluada son nulos al no superar a los testigos. Los biofertilizantes no muestran efecto para este cultivo. Figura 30.



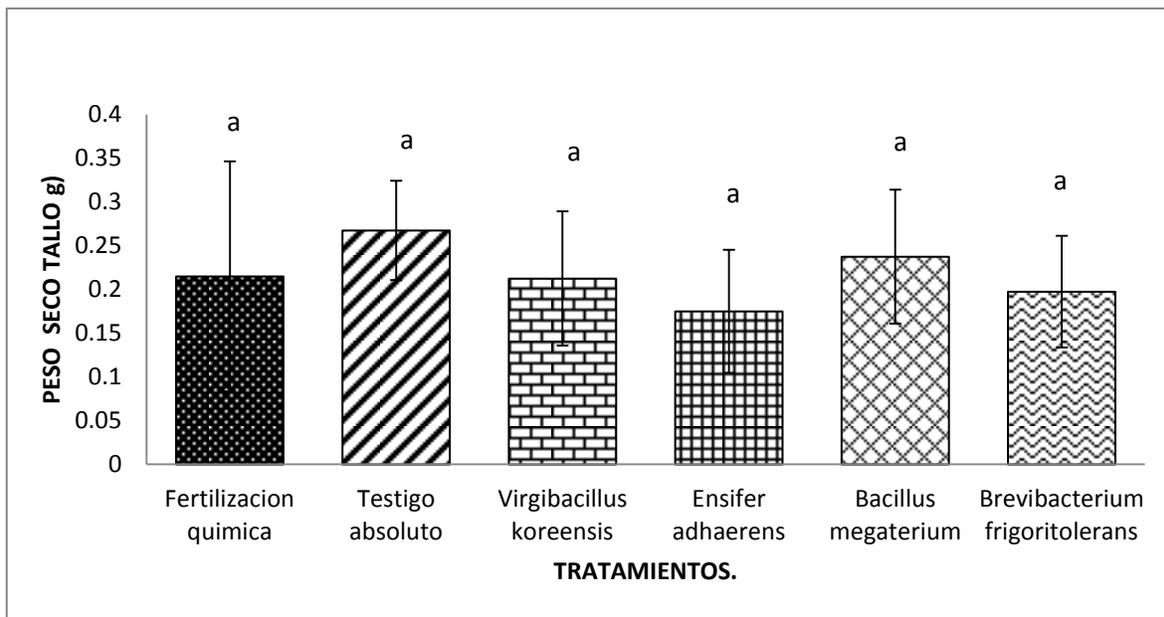
**Figura 30.** En peso fresco tallo de maíz con clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 30. La cepa de mayor rendimiento es *Virgibacillus Koreensis* con un promedio de 3.1g, se puede probar que existe diferencia del 13.13% con la aplicación de la cepa puesto que son superados los testigos. Vikram *et al.* (2007) muestra incrementos en el desarrollo de raíz y vástago de plantas de maíz por efecto de la inoculación con *Pseudomonas fluorescens*. Este efecto benéfico se potenció cuando las plantas de maíz fueron co-inoculadas con dos cepas distintas de *Bradyrhizobium*, una bacteria con actividad fijadora de nitrógeno. Nezarat and Gholami (2009) encontraron, por su parte, incrementos de hasta un 18.5 por ciento en la germinación de maíz inoculado con diversas cepas de *Pseudomonas* y *Azospirillum*.



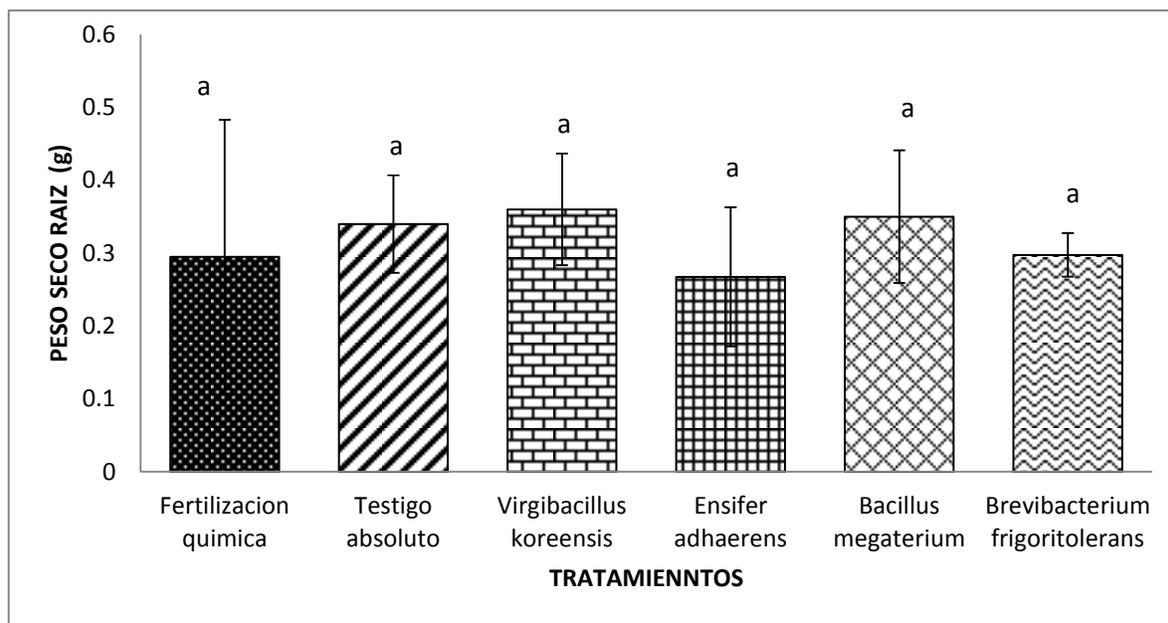
**Figura 30.** Peso Fresco Raiz maiz con clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 31 testigo absoluto obtuvo los mayores rendimientos al presentar el promedio más elevado de 0.26g, se denota que en este parámetro no hay diferencias puesto que con la aplicación de los fertilizantes puesto que los tratamientos no superan a los testigos.



**figura 31.** Peso Seco Tallo maiz con clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

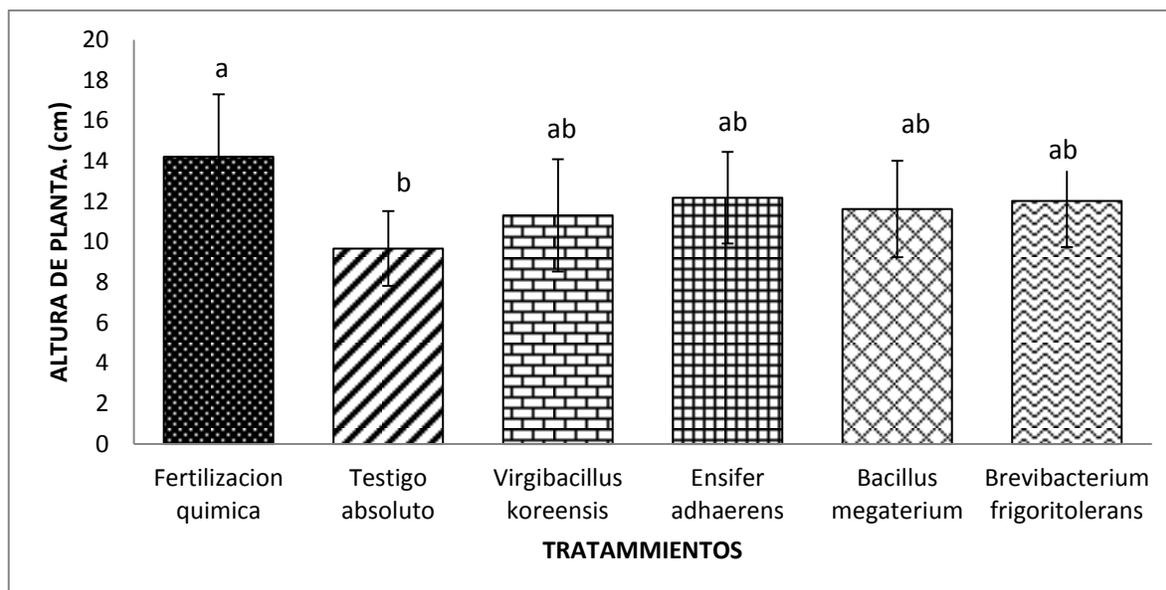
En la figura 32 existe diferencias de 5.88% contra el testigo absoluto, por el efecto de la cepa *Virgibacillus koreensis* al presentar el proedio mas alto de 0.36g, con estos resultados se demuestra que hay efectos por cepas promotoras de crecimiento, puesto que los testigos no superan a los tratamientos. La inoculación con *Azospirillum* puede afectar positiva o negativamente algunos parámetros de las raíces y del follaje, que están atribuidos a efectos positivos en la absorción de minerales por parte de la planta. (Barton et al., 1986).



**Figura 32.** Peso Seco Raiz maiz con clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

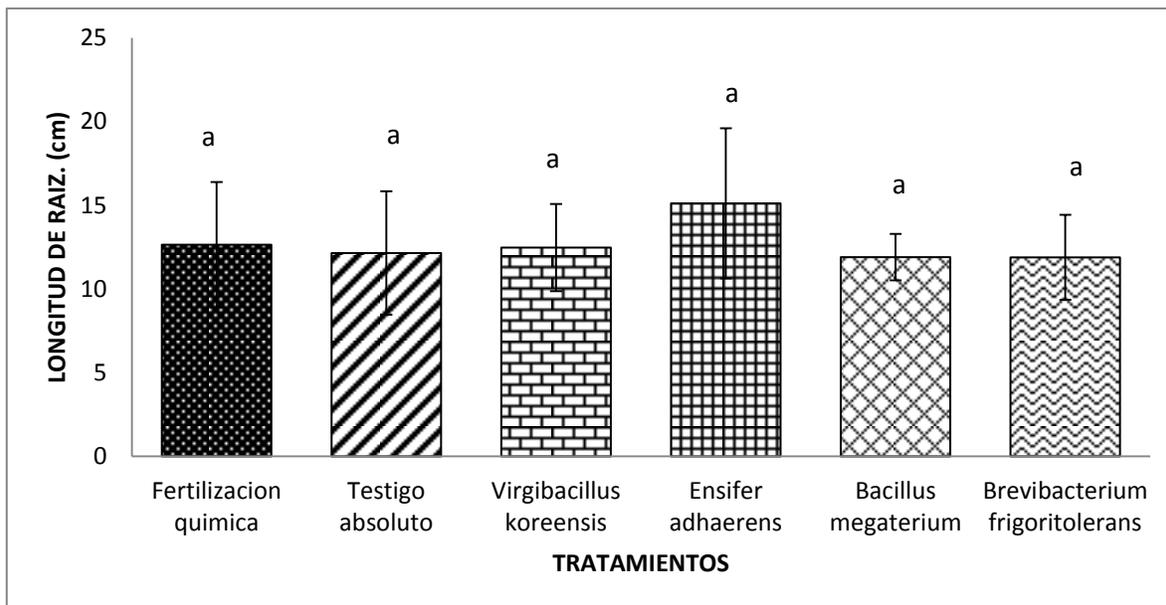
### 6.2.3 Sorgo sin Clotianidina.

En la figura 33 el tratamiento con fertilización química, obtuvo los mayores rendimientos por encima de los demás tratamientos con la aplicación de biofertilizantes, pues presentó un promedio de 14.21 cm.



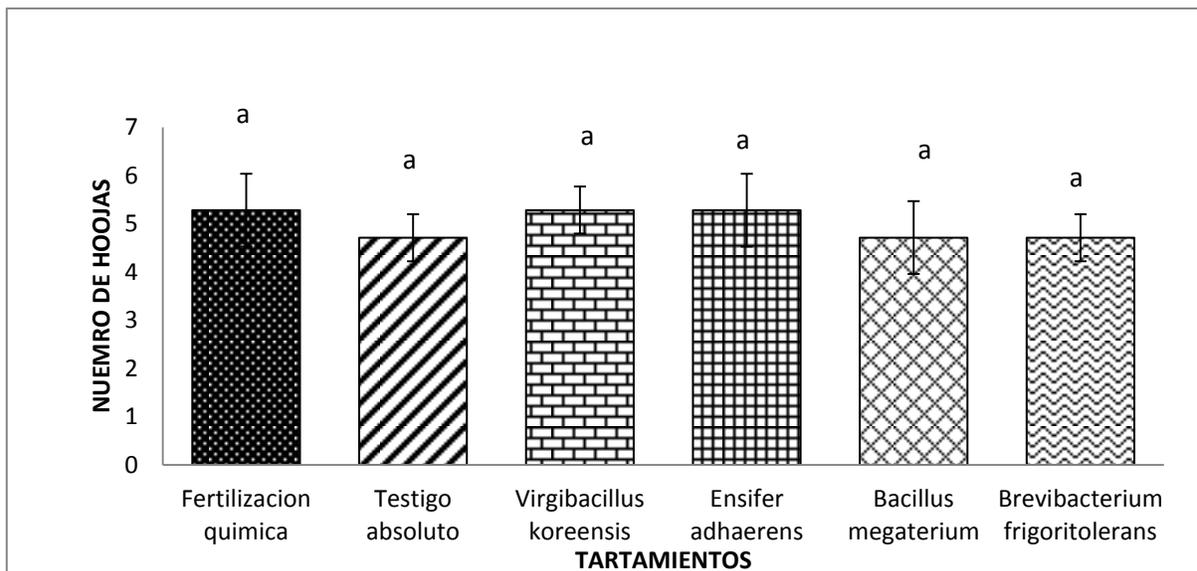
**Figura 32.** Altura de Planta sorgo sin clotianidina. En este tratamiento se muestran diferencias significativas, al haber tres grupos con letras distintas, donde (a) es el grupo mayor (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 33 existe diferencias del 24.46% de la cepa *Ensifer Adherens* con el testigo absoluto, puesto que denota mayor rendimiento con un promedio 15.11cm, muy por encima de los demas trataientos y superando a los testigos, probando que existe efecto con las cepas fijadoras de nitrogeno para el cultivo de sorgo sin poncho. La inoculación con *A. brasilense* es altamente benéfica en gramíneas como: maíz, caña de azúcar, pastos y sorgo, pues aporta de 30 a 50% de los requerimientos de nitrógeno de dichos cultivos (Martínez-Morales *et al.*, 2003; Viviene *et al.*, 2004).



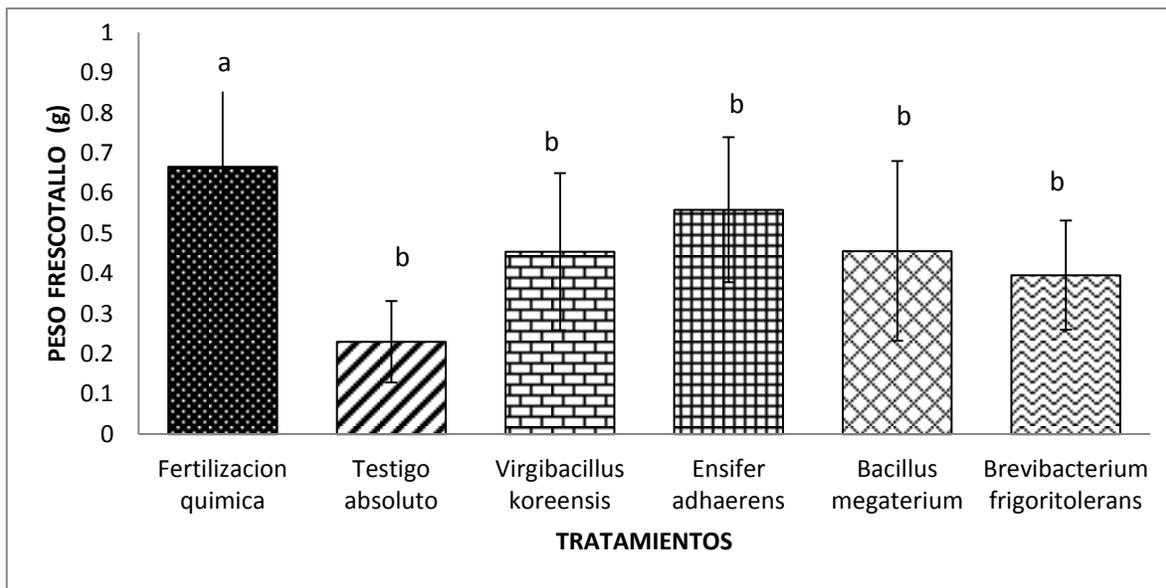
**Figura 33.** Longitud de Raiz sorgo sin clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 34, existe efecto positivo al aplicar biofertilizantes para el cultivo de sorgo, puesto que los mayores rendimientos obtenidos fueron proporcionados por las cepas *Virgibacillus koreensis* con promedio de 5.28 hojas y la cepa *Ensifer adhaerens* con promedio de 5.28 hojas ambas cepas obtuvieron el mismo valor con deiferencia del testigo absoluto de 12.10% superandolo. Se observa que al aplicar biofertilizantes al cultivo de sorgo aumenta el porcentaje de follaje. Esto indica que en realidad existe muy poca diferencia con la aplicación de biofertilizantes y los testigos.



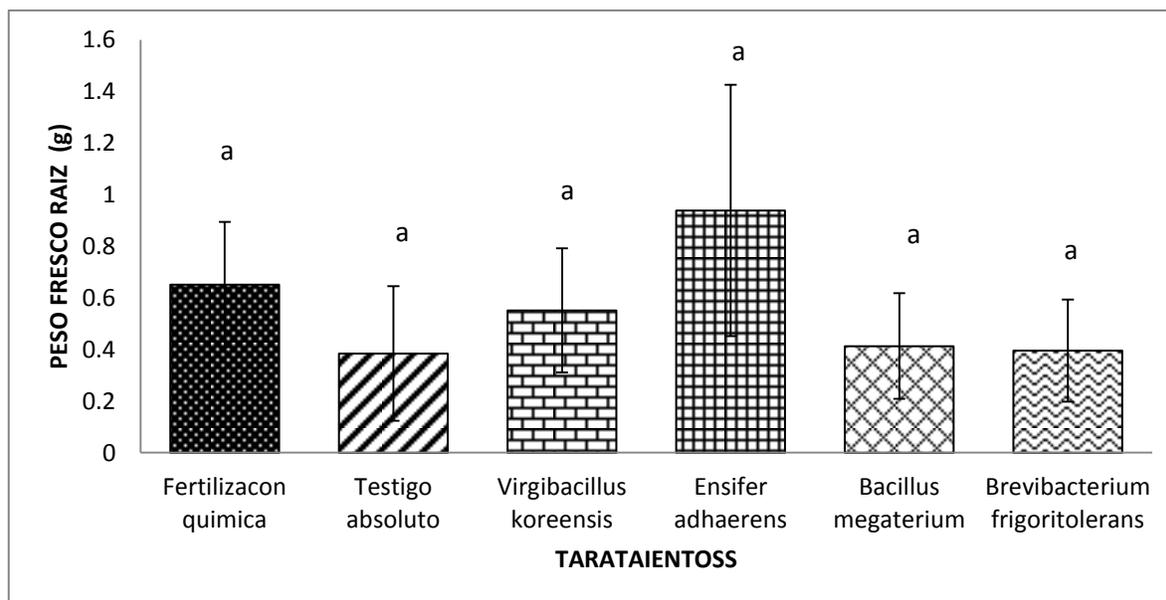
**Figura 34.** Numero de Hojas sorgo sin clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

Los resultados arrojados por el análisis de varianza (ANVA), muestra que el tratamiento con fertilización química, obtuvo los mayores rendimientos con promedio de 0.66g por encima de los tratamientos con cepas promotoras de crecimiento. En este parámetro no se muestra que la aplicación de biofertilizantes mejore el desarrollo de las plántulas de sorgo. Figura 35.



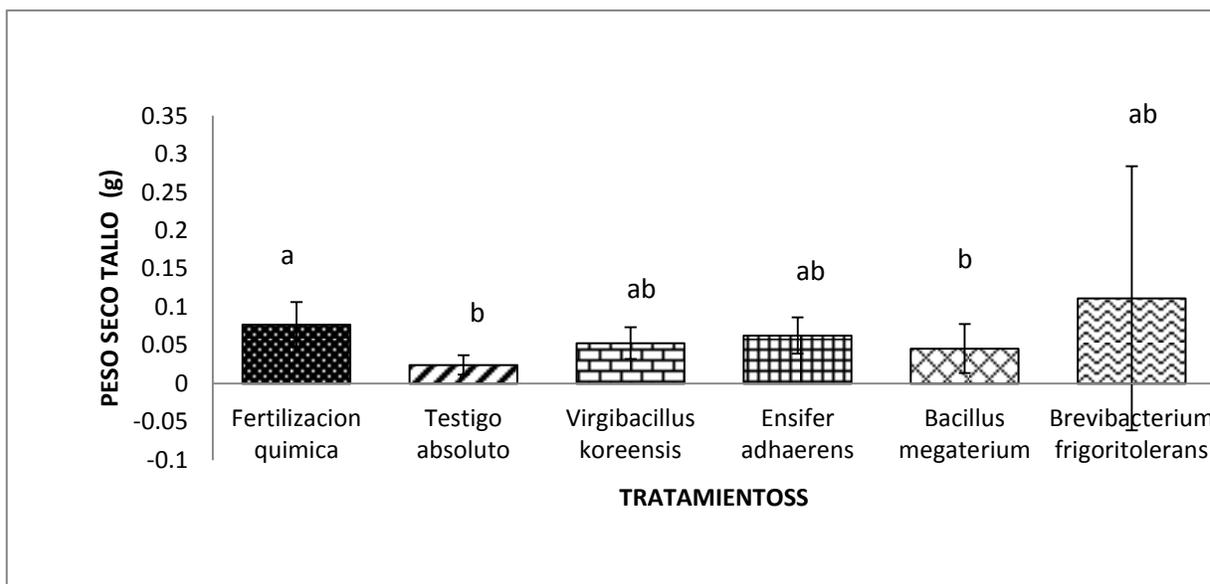
**Figura 35.** Peso Fresco Tallo sorgo sin clotianidina. En este tratamiento se muestran diferencias significativas, al haber tres grupos con letras distintas (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 36 se muestran efectos positivos al aplicar bacterias promotoras de crecimiento, la cepa *E. Adhaerens* es quien muestra los mayores rendimientos por encima de los demás tratamientos con promedio de 0.93g, puesto que la cepa supera al testigo absoluto denotando que los biofertilizantes actúan en el cultivo de sorgo. La inoculación con *A. brasilense* es altamente benéfica en gramíneas como: maíz, caña de azúcar, pastos y sorgo, pues aporta de 30 a 50% de los requerimientos de nitrógeno de dichos cultivos (Martínez-Morales *et al.*, 2003; Viviene *et al.*, 2004).



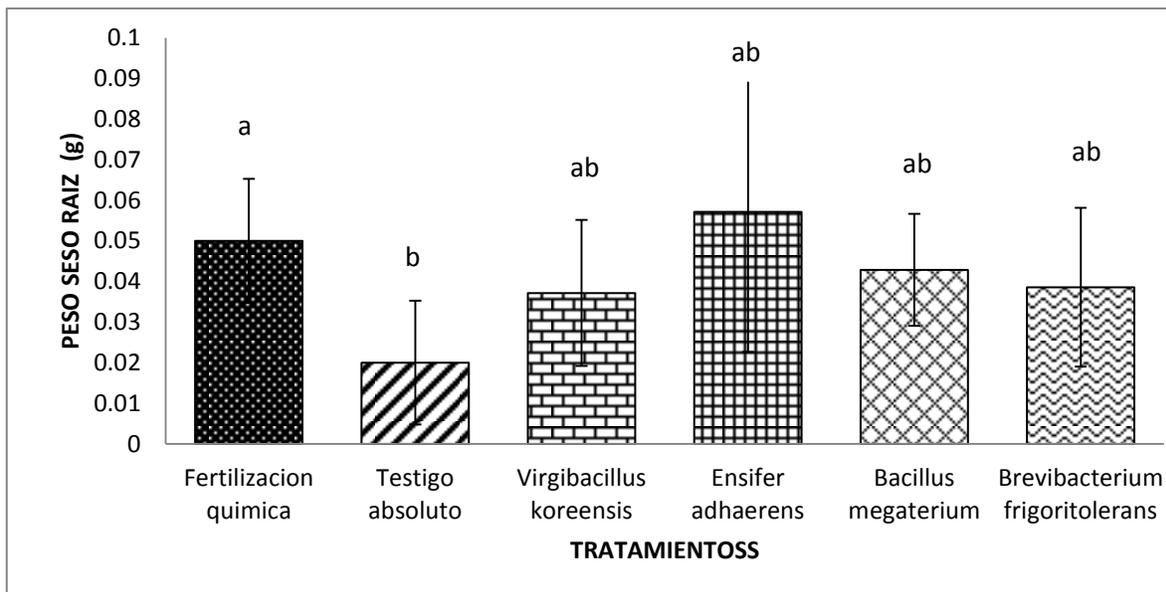
**Figura 36.** Peso Fresco Raiz sorgo sin clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 37 se muestra un efecto de la cepa *B. frigoritolerans* con un promedio de 0.11g, y con una diferencia de 450% muy por encima de los tratamientos con las demás cepas y superando al testigo absoluto. Evidentemente se muestra que los biofertilizantes si causan un efecto, aumentado el peso seco del cultivo. La rizobacteria promotora del crecimiento, *Azospirillum brasilense*, ha incrementado la productividad de diversos cultivos en ambientes de secano (Dobbelaere et al. 2001; Irizar et al. 2003; Loredó-Ostí et al. 2004; Díaz-Franco et al. 2005). Lo anterior se debe a las actividades biosintéticas de *A. brasilense*, manifestadas en su capacidad de fijar nitrógeno, de solubilizar el fósforo, de producir sideróforos y de sintetizar fitohormonas y enzimas que regulan los niveles de las enzimas (Martínez et al. 2003; Loredó-Ostí et al. 2004).



**figura 37.** Peso Seco Tallo sorgo sin clotianidina. En este tratamiento se muestran diferencias significativas al presntarse 3grupos con letras diferentes (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

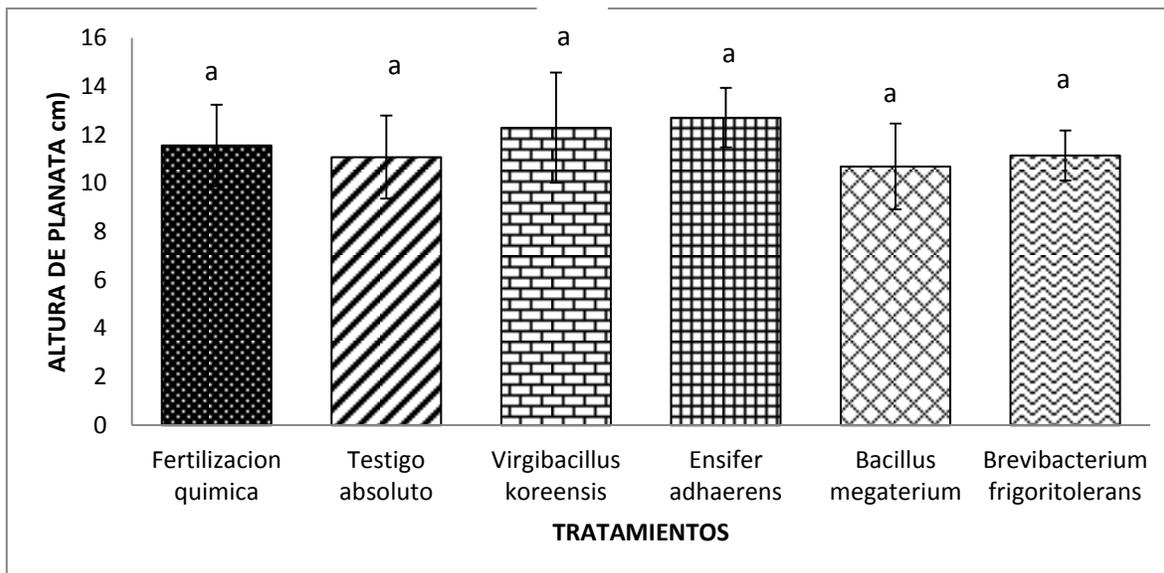
En la figura 38 se muestran los resultados en los tratamientos inoculados analizados con ANVA, indican variación para peso seco de raíz. Al ser la cepa *E. Adhaerens* quien muestra los mejores rendimientos al presentar el mayor promedio de 0.57g, superando al testigo absoluto con una diferencia de 2850%. La mayoría de los estudios sobre la asociación *Azospirillum*-planta se han realizado en cereales y pastos, los resultados obtenidos han demostrado incrementos en peso seco total, concentración de nitrógeno en follaje y grano, número total de espigas, espigas fértiles y mazorcas, floración y aparición de la espiga más temprana, incremento en el número de espigas y granos por espiga, plantas más altas e incremento en el tamaño de la hoja y tasas de germinación más altas (Albrecht *et al.*, 1981; Bashan, 1986; Fulchieri y Frioni, 1994; Stancheva *et al.* 1992). Además se ha observado un incremento en el desarrollo del sistema de raíces, tanto en longitud como en volumen (Bashan *et al.*, 1996) y una promoción del crecimiento vegetativo (Kapulnik *et al.*, 1982, 1983).



**figura 38.** Peso Seco Raiz sorgo sin clotianidina. En este tratamiento se muestran diferencias significativas al presentarse 3 grupos con letras diferentes (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

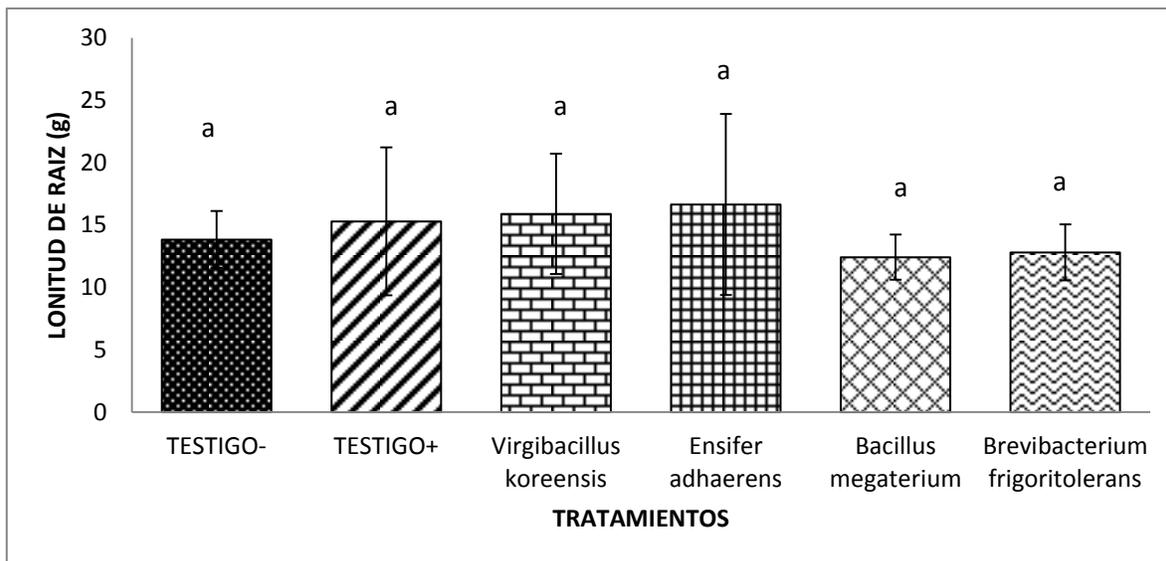
#### 6.2.4 Sorgo con Clotianidina.

En la figura 39 se muestran los resultados obtenidos y analizados con el ANVA, y se puede observar diferencia bajo los efectos de *E. adhaerens* al presentar el promedio más alto de los tratamientos con 12.7cm, evidenciando que hay efecto con las bacterias fijadoras de nitrógeno, al ser superado el testigo absoluto con una diferencia de 14.72%. En un estudio realizado por M. Antonio y col. (2001) donde utilizaron a *E. adhaerens* como fijadora de nitrógeno y denotaron cambios en el aumento del crecimiento de la planta *Leucaena*.



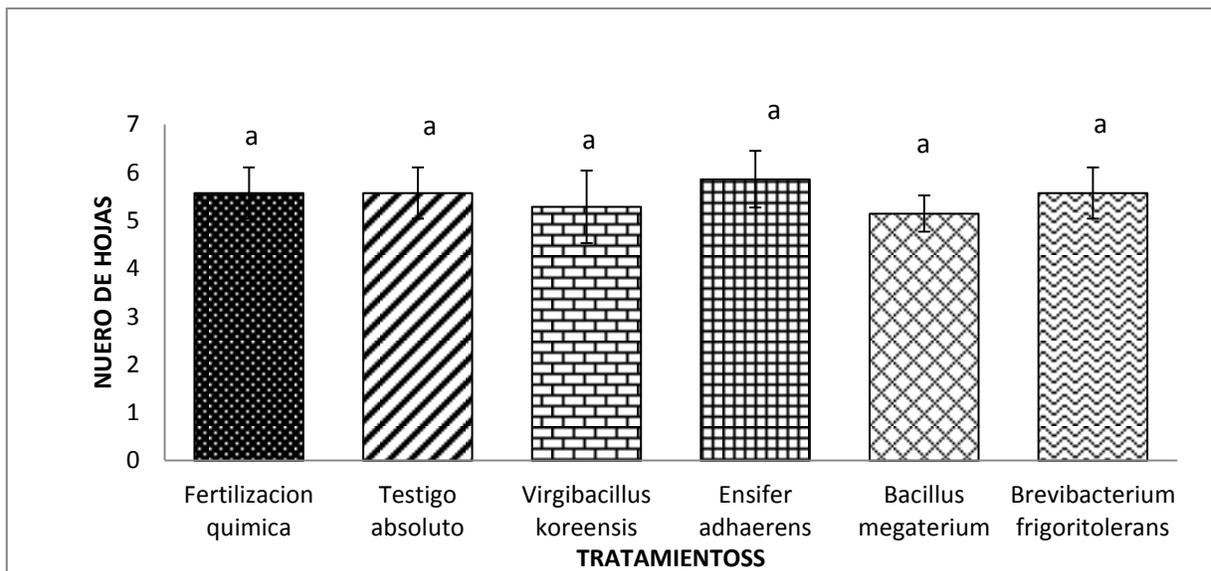
**Figura 39.** Altura de Planta sorgo con clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 40 y mediante el ANVA se comprueba que hay efectos para esta variable evaluada, al presentar mayor promedio la cepa *E. adhaerens* con 16.64 cm mostrando los mayores rendimientos con una diferencia del 8.90% con el testigo absoluto. En este parámetro los testigos fueron superados, y se observa el efecto de los biofertilizantes aplicados en el cultivo de sorgo. Santillana (2006) encontró que plántulas, inoculadas con tres dosis de *Pseudomonas* sp. mostraron un mayor desarrollo de vástago y raíz que plantas control no inoculadas.



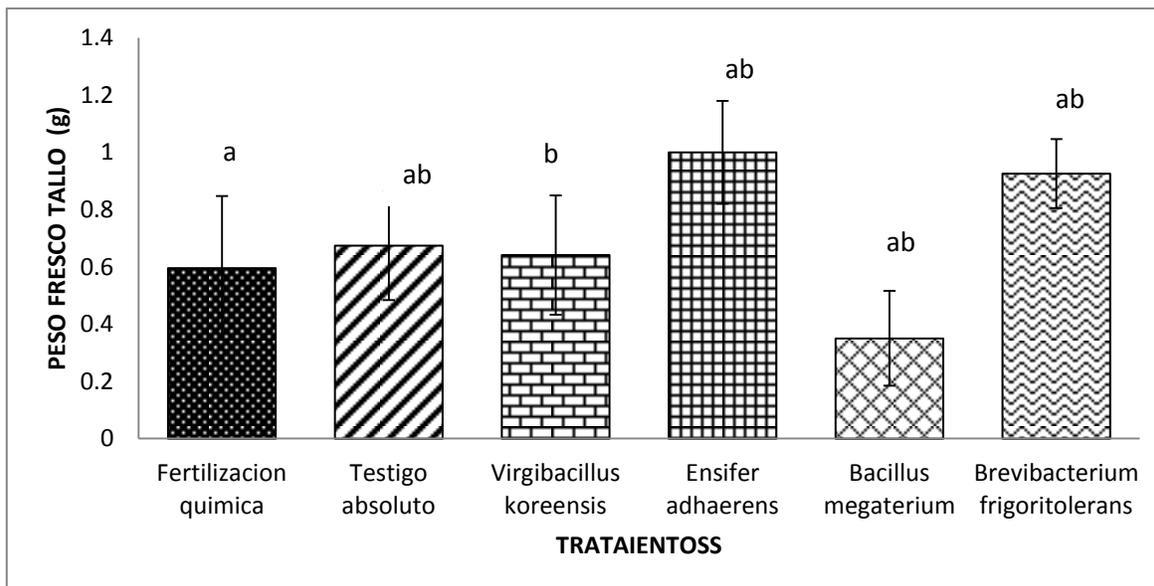
**figura 40.** Longitud Raíz sorgo con clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 41, los resultados arrojan que existen efectos al aplicar la cepa *E. adhaerens*. En este parametro la cepa tiene un rendimiento superior al testigo absoluto con una diferencia de 5.02% con un promedio de 103.57 hojas.



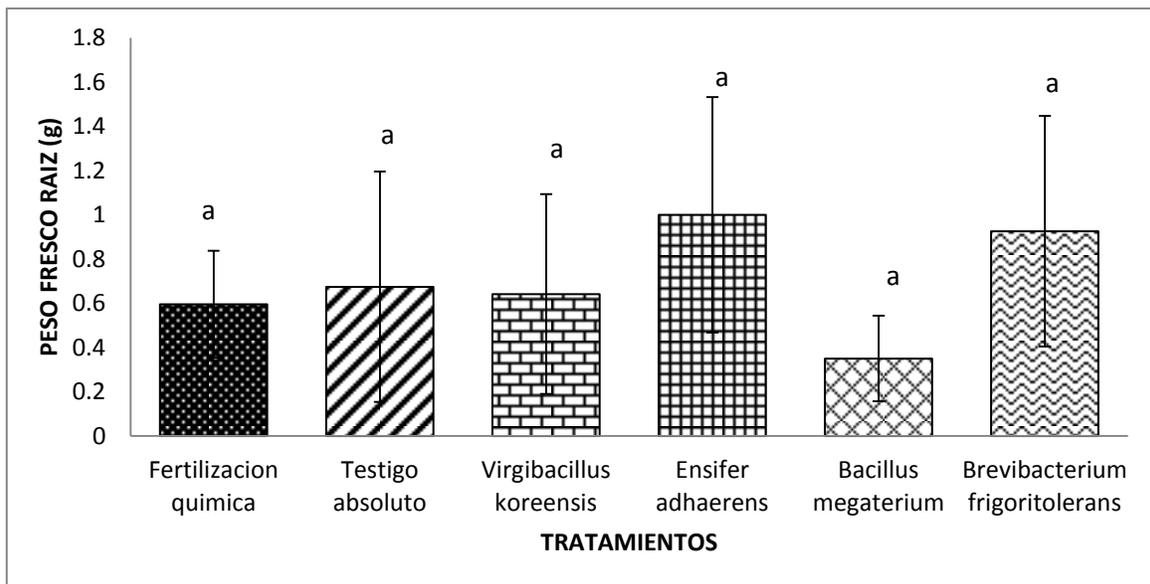
**figura 41.** Numero de Hojas sorgo con clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 42, los resultados arrojados por el ANVA, denotan que existe diferencia de 49.25% al ser superado el testigo absoluto, al aplicar la cepa *E. adhaerens* mostrando mayor rendimiento con promedio de 1g. Nuevamente se observa que la aplicacion de biofertilizantes aumenta y mejora el desarrollo de las plantulas de sorgo.



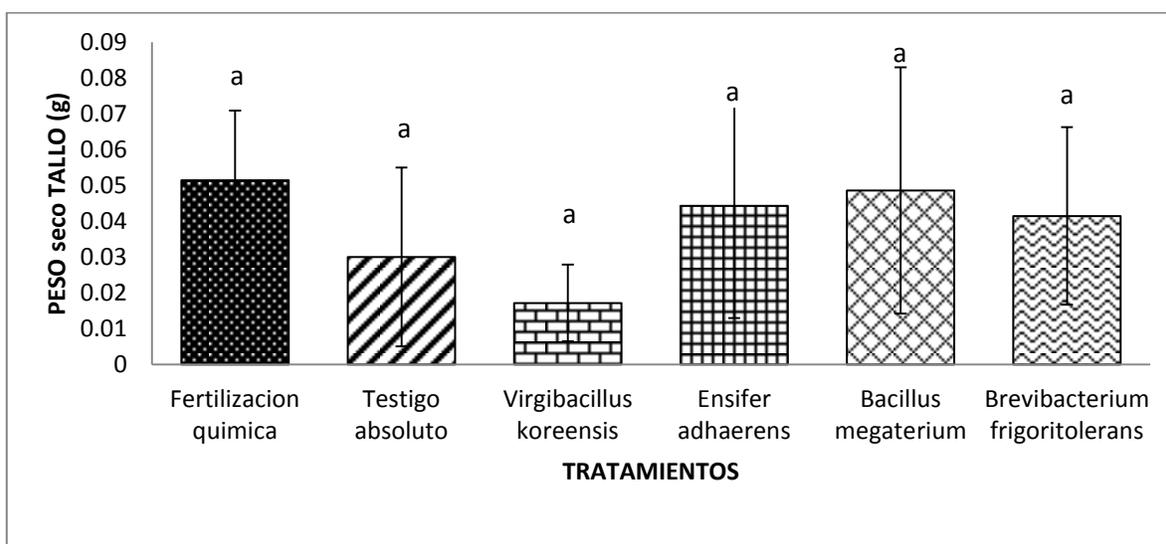
**figura 42.** Peso Fresco Tallo sorgo con clotianidina. En este tratamiento se muestran diferencias significativas, al haber tres grupos con letras distintas (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16)

En la figura 43 los resultados obtenidos por el ANVA podemos denotar nuevamente que la cepa *E. adhaerens*, muestra los mayores rendimientos al obtener el promedio mas alto para este parametro con promedio de 1g, mostrando que existe efecto al aplicar esta cepa puesto que muestra una diferencia de 49.25%. Se ha indicado que la absorción de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Fe}^{+2}$  inducida por *Azospirillum* es el factor responsable en incrementar la materia seca foliar y la acumulación de minerales en tallos y hojas (Murty y Ladha, 1988; Sarig et al., 1988).



**figura 43.** Peso Fresco Raiz sorgo con clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 44 no se muestra diferencia puesto que el tratamiento de fertilizacion quimica con sulfato de amonio supera a los tratamientos que contenian cepas promotoras de crecimiento, el tratamiento muestra el promedio mas alto de 0.051g.



**Figura 45.** Peso Seco Tallo sorgo con clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

En la figura 46. Nuevamente el rendimiento mas alto corresponde al tratamiento con fertilizacion quimica con sulfato de amonio, evidenciando que los tratamientos con biofertilizantes no superan a los testigos, puesto que el tratamiento muestra un promedio de 0.051g.

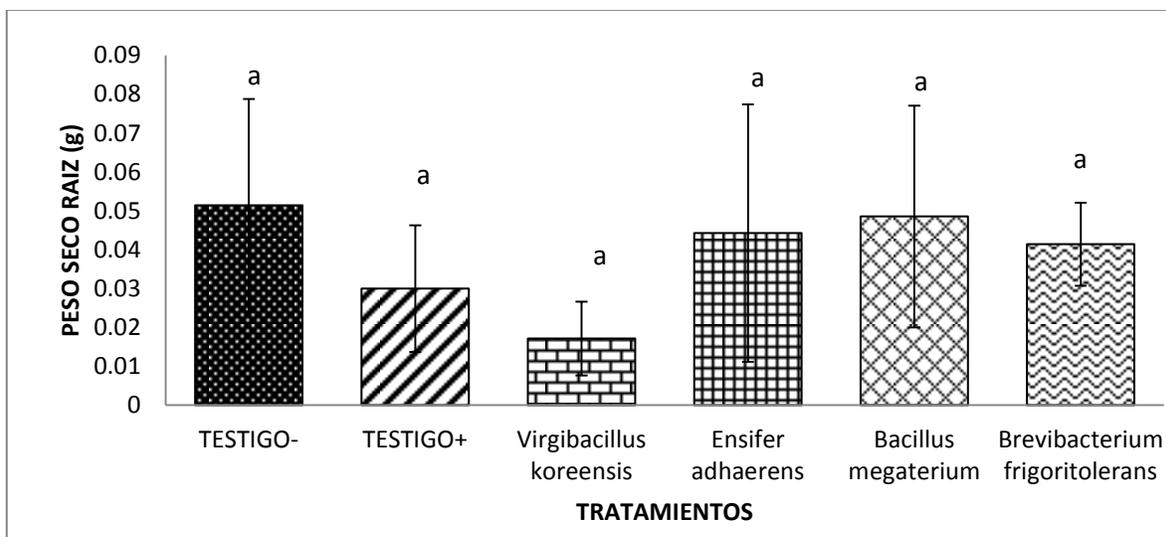


figura 46. Peso Seco Raiz sorgo con clotianidina. En cada figura, medias con letras iguales no difieren estadísticamente (ANOVA, Tuckey,  $p > 0.05$ , MINITAB 16).

### 6.3 Cepas con rendimientos mayores.

En los siguientes cuadros podemos observar el resumen de las graficas, de ambos cultivos con sus respectivas variables.

Cudro 9. Resumen de graficas con los nombres de las cepas.

	Maíz con clotianidina	Maíz sin clotianidina	Sorgo con clotianidina	Sorgo sin clotianidina
Altura planta				<i>Ensifer adhaerens</i>
Altura raíz	<i>Bacillus</i>	<i>Ensifer</i>	<i>Ensifer</i>	<i>Ensifer</i>

	<i>megaterium</i>	<i>adhaerens</i>	<i>adhaerens</i>	<i>adhaerens</i>
<b>Número de hojas</b>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Brevibacterium Frigori tolerans</i>	<i>Ensifer adhaerens</i>	<i>Ensifer adhaerens</i>
<b>Peso fresco tallo</b>			<i>Ensifer adhaerens</i>	<i>Ensifer adhaerens</i>
<b>Peso fresco raíz</b>		<i>Virgibacullus Koreensis</i>	<i>Ensifer adhaerens</i>	<i>Ensifer adhaerens</i>
<b>Peso seco tallo</b>			<i>Brevibacterium Frigori tolerans</i>	
<b>Peso seco raíz</b>		<i>Virgibacullus Koreensis</i>		

En los cuadros 10 y 11 se muestran tablas con los promedios de ambos cultivos con sus respectivas variables pudiendo notar la diferencia que existe.

**Cuadro 10.** Parámetros evaluados con mejor promedio de maíz.

Cultivo	Maíz sin clotianidina			Maíz con clotianidina		
	Fertilización química	Testigo absoluto	Muestra con mayor promedio	Fertilización química	Testigo absoluto	Muestra con mayor promedio
<b>Altura planta</b>	19.55	20.35	16.5	18.67	18.4	14.87
<b>Altura raíz</b>	23.5	23.5	32.5	19.5	27.4	29.9
<b>Número de hojas</b>	5	5.2	5.5	5.2	5.2	5.5
<b>Peso fresco tallo</b>	2.05	2.25	1.66	1.72	2.13	1.55
<b>Peso fresco raíz</b>	3.5	5.16	3.38	2.1	2.7	3.1

<b>raíz</b>						
<b>Peso seco tallo</b>	0.26	0.27	0.19	0.21	0.26	0.21
<b>Peso seco raíz</b>	0.43	0.55	0.42	0.29	0.34	0.36

Cuadro 10. Podemos notar que el tratamiento con fertilización química, en maíz sin clotianidina no supera a los demás tratamientos, y en maíz con clotianidina solo una vez supero al resto de los tratamientos.

**Cuadro 11.** Parametros evaluados con mejor promedio en sorgo. En esta tabla se observa claramente que en sorgo con poncho la fertilizacion quimica no supera a los tratamientos y en sorgo sin poncho solo en 2 ocasiones fue mas alto.

<b>Parametro</b>	<b>Sorgo sin clotianidina</b>			<b>Sorgo con clotianidina</b>		
	Fertilización química	Testigo absoluto	Muestra con mayor promedio	Fertilización química	Testigo absoluto	Muestra con mayor promedio
<b>Altura planta</b>	14.21	9.67	12.18	11.55	11.07	12.7
<b>Altura raíz</b>	12.64	12.14	15.11	13.82	15.28	16.64
<b>Número de hojas</b>	5.2	4.7	5.2	5.5	5.5	5.8
<b>Peso fresco tallo</b>	0.66	0.23	0.55	0.59	0.67	1
<b>Peso fresco raíz</b>	0.6	0.3	0.9	0.5	0.6	1
<b>Peso seco tallo</b>	0.07	0.02	0.11	0.05	0.03	0.04
<b>Peso seco raíz</b>	0.05	0.02	0.5	0.05	0.03	0.04

#### 6.4 Evaluacion de la poblacion microbiana de la raiz.

Para corroborar que los microorganismos se encontraban en la raiz se realizo un conteo en placa de lo que se obtuvo.

Despues de haber tomado muestras para los analisis, tambien se tomo una cantidad de 2 g de sustrato el cual fue analizado en el laboratorio para corroborar que la bacteria se encontraba en el tratamiento, y tambien realizar el conteo de colonias, donde se obtuvieron estos resultados.

Las siguientes tablas muestran la presencia de las bacterias en los tratamientos de ambos cultivos.

**Cuadro 12.** Presencia de microorganismos en tratamiento con *Virgibacillus koreensis*.

Cepa	Presencia de microorganismos		UFC/g
	Si	No	
<i>Virgibacillus koreensis</i>			
Maiz sin poncho		✓	0
Maiz con poncho	✓		100, 000
Sorgo con poncho		✓	0
Sorgo sin poncho	✓		90, 000

**Cuadro 13.** Presencia de microorganismos en tratamiento con *Ensifer adhaerens*.

Cepa	Presencia de microorganismos		UFC/g
	Si	No	
<i>Ensifer adhaerens</i>			
Maiz sin poncho	✓		152, 500
Maiz con poncho	✓		87, 500
Sorgo con poncho	✓		96, 600
Sorgo sin poncho	✓		107,500

**Cuadro 14.** Presencia de microorganismos en tratamiento con *Bacillus megaterium*.

Cepa	Presencia de microorganismos		UFC/g
	Si	No	
<i>Bacillus megaterium</i>			
Maiz sin poncho	✓		112, 500
Maiz con poncho	✓		100, 000
Sorgo con poncho	✓		23, 300
Sorgo sin poncho	✓		55, 000

**Cuadro 15.** Presencia de microorganismos en tratamiento *Brevibacterium frigoritolerans*.

Cepa	Presencia de microorganismos		UFC/g
	Si	No	
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>			
Maiz sin poncho	✓		55, 000
Maiz con poncho	✓		100, 000
Sorgo con poncho	✓		20, 000
Sorgo sin poncho		✓	0

---

## CAPITULO VII

### CONCLUSIONES

La cepa *Ensifer Adhaerens* strain LMG 20216, obtenida del estado de Hidalgo del cultivo de frijol, fue la que en la mayoría de las variables analizadas, realizó incremento significativo comparado con los demás tratamientos y la clotianidina no realizó ningún efecto negativo hacia esta cepa.

La adición de los biofertilizantes, superaron a la aplicación de los fertilizantes químicos, porque los valores obtenidos en las variavles medidas, superaron en gran manera a estos últimos compuestos. Lo anterior quiere decir que, en ambos cultivos donde se agregó la clotianidina, no se presentó efecto negativo e inclusive hay aumento de germinación.

Al aplicar la bacteria *Ensifer Adharens*, mezclada con clotianidina, se presentó mayor efecto en la germinación el cultivo de sorgo, que en el maíz.

Cuando se agregó el insecticida clotianidina, éste no causó efecto secundario en las semillas biofertilizadas, sino por el contrario, podemos concluir que las semillas tratadas con este compuesto y el biofertilizante, tienen un por ciento de germinacion más elevado que semillas sin clotianidina.

Los biofertilizantes son una alternativa favorable para la promoción de crecimiento en plantas, como resultado de esto se pueden aumentar los rendimientos sin depender en gran medida de los fertilizantes quimicos, los cuales al ser utilizado de manera inadecuada causan daños ecológicos, ambientales y problemas de salud en animales y humanos.

---

## CAPITULO VIII

### REFERENCIAS BIBLIORAFICAS.

- Balandreau, J. and R. Knowles. (1978). The rhizosphere. In: Interactions between non – pathogenic soil microorganisms and plants. Y. R. Dommergues and S. V. Krupa (eds). Elsevier. The Netherlands. p. 243 – 268.
- Balkwill, D. L. (2005). Genus VI. *Ensifer* Casida 1982, 343VP. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2, part C, pp. 354–358. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.
- Bernard KA, Wiebe D, Burdz T, Reimer A, Ng B, Singh C, Schindle S, Pacheco AL (2010). "Assignment of *Brevibacterium stationis* (ZoBell and Upham 1944) Breed 1953 to the genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium stationis* comb. nov., and emended description of the genus *Corynebacterium* to include isolates that can alkalinize citrate". *International Journal of Systematic and Evolutionary Biology* **60** (4): 874.
- Buchanan, R. E.; Breed, R. S.; St. John-Brooks, R. (1951). "Opinion 1. The Correct Spelling of the Specific Epithet in the Species Name *Bacillus Megaterium* De Bary 1884: Approved by the Judicial Commission of the International Committee on Bacteriological Nomenclature". *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* **1**: 35–36.
- Caballero – Mellado, J. and E. Martinez – Romero. (1999) Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis*, 26:111- 121.
- DE BARY (A.): *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozen und Bacterien*. Wilhelm Engelmann, Leipzig, (1884).

- Deacon J. The microbial world: The nitrogen cycle and nitrogen fixation.
- [www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/nitrogen.htm](http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/nitrogen.htm)
  
- Delwiche. C.C. 1972. El ciclo del nitrógeno. En: La Biosfera. Scientific America- Alianza Editorial.
  
- Döbereiner, J. (1977). Present and future opportunities To improve the nitrogen nutrition of crops through Biological fixation. In: Biological nitrogen fixation In farming systems of the tropics. Ayanaba, A. y Dart, P. (eds) John Wiley and Sons. U.S.A. P. 3 – 12.
  
- Fallik, E. and Okon, Y. (1996). The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. World J. Microbiol. Biotech. 12:511-515.
  
- Freire, J. J. R. (1975) Microbiologia do solo. Departamento do solos. Faculdade de Agronomia de la Universidad Federal do Río Grande do Sol, Porto Alegre, Brasil, 234 p.
  
- Heyndrickx, M., Lebbe, L., Kersters, K., De Vos, P., Forsyth, G. & Logan, N. A. (1998). *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. Int J Syst Bacteriol 48, 99–106.

- J. Monza, A. Marquez. Metabolismo de nitrogeno en las plantas. Editorial Almuzara. (2004) Nelson y Cox, Lenhinger principios de bioquimica Editorial Omega. Ediciones varias.
- Lloret, L., Ormeñ o-Orrillo, E., Rincon, R., Martinez-Romero, J., Rogel-Hernandez, M. A. & Mart´inez-Romero, E. (2007). Ensifer mexicanus sp. nov. a new species nodulating Acacia angustissima (Mill.) Kuntze in Mexico. Syst Appl Microbiol 30, 280–290.
- Mart´ın, G. M. y Rivera R. Mineralizaci3n del nitr3geno incorporado con los abonos verdes y su participaci3n en la nutrici3n de cultivos de importancia econ3mica. Revisi3n Bibliogr´afica. *Cultivos Tropicales*, (2004), vol. 25, no. 3,p. 89-96.
- Mart´ınez-Medina, J. (2004). Respuesta de la biofertilizaci3n en el crecimiento y rendimiento de sorgo de grano en Linares, Nuevo Le3n. In: D´ıaz- Franco, A.; Mayek-P3rez, N.; Mendoza, A. y Maldonado-Moreno, N. (eds.). Memoria del Simposio de Biofertilizaci3n. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agr´ıcolas y Pecuarias, Campo Experimental R´ıo Bravo. R´ıo Bravo, Tamaulipas, M3xico. p. 42-52.
- Mart´ınez-Morales, L. J.; Soto-Urz´ua, L.; Baca, B. E. and S´anchez, J. A. (2003).Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett. 228(2):167-173.
- Medina C.S. (2003). Gu´ıa para la asistencia t3cnica agropecuaria para el 3rea de influencia del Campo Experimental Valle de Culiac´an. INIFAPFundaci3n Produce Sinaloa, A.C. 203-205 pp.
- Michiels K, Vanderley J, Gool AV. Azospirillum – plant root associations: A review. Biol Fertil Soils 1989; 356-368.

- Montes-García, N. y J.I. Aguirre-Rodríguez. (1992). Sorgo. Pp -63. *In: Manual de Cultivos del Norte de Tamaulipas. Patronato para la Investigación Fomento y Sanidad Vegetal, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Cd. Victoria, Tamaulipas, México. Los biofertilizantes. Una alternativa productiva, económica y sustentable. Marcel Morales Ibarra impacto.*
- Neves M.C & Franco A. (1990). Fixação biológica e metabolismo de nitrogênio em plantas. En: I Simposio brasileiro sobre nitrogênio em planta UFRRJ – Departamento de solos. EMBRAPACNPBiologia do Solo.
- Okon Y, Labandera C. Agronomic applications of Azospirillum: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem* 1994; 26: 1951-1601. Burdman S, Okon Y, Jurkevitch E. Surface characteristics of Azospirillum brasilense in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Critical Rev Microb* 2000; 26(2):91-110.
- Peña, J. J. Introducción. En: La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: el aporte de las técnicas isotópicas. Acuerdo Regional para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nucleares en América Latina y el Caribe (ARCAL). Irapuato: IMPROSA de CV, 2000, p. 1.
- Purcino, A.A.C., Paiva, E., Silva, M.R. and de Andrade, S.R.M. (1996). Influence of *Azospirillum* inoculation and nitrogen supply on grain yield, and carbon- and nitrogen assimilating enzymes in maize. *J. Plant Nutr.* 19:1045- 1060.
- Read, D. (1998). Plants on the web. *Nature.* 396: 22 – 23.

- Soliman, S. and Abdel Monem, M. (1994). Influence of  $^{15}\text{N}$  labeled urea and Azotobacter on corn yield and nitrogen budget as affected by organic matter. Proceeding of the 2nd Arab Conference on the Peaceful Uses of Atomic Energy. 5-9 November, Cairo, pp. 683-694.
- Sylvia D. Mycorrhizal symbioses. En: Sylvia D, FuhurmannJ, Hartel PG, Zuberer D editores. Pinciples and applications of soli microbiology. Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice Hall Inc.; 1999: 408- 425.
- Tilak, K.V.B.R. 1998. ICAR NEWS – A science and Technology newsletter. 4(2): 19 – 20.
- Toledo, I., Lloret, L. & Martínez-Romero, E. (2003). *Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico *Syst Appl Microbiol* 26, 54–64.
- Treto, E. Avances en el manejo de los suelos y la Nutrición orgánica. En: Transformand el campo cubano. Avances de la Agricultura Sostenible. (2001), 167-190 p.
- Wang, E. T., Tan, Z. Y., Willems, A., Fernandez-Lopez, M., Reinhold- Hurek, B. & Martinez-Romero, E. (2002). *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *Int J Syst EvolMicrobiol* 52, 1687–1693.
- Willems, A., Fernandez-Lopez, M., Munoz-Adelantado, E., Goris, J., De Vos, P., Martínez-Romero, E., Toro, N. & Gillis, M. (2003). Description of new *Ensifer*

---

strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1207–1217

- Young, J. M. (2003). The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer* Casida 1982. Is the combination *Sinorhizobium adhaerens* (Casida 1982) Willems et al., 2003 legitimate? Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 2107–2110
- Zaady E, Okon Y, Perevolotsky A. GROWTH response of Mediterranean herbaceous swards to inoculations with *Azospirillum brasilense*. *J Rnge Manage* 1994;47:12-15.