

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA



Evaluación de la Supervivencia de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo Mediante
el Uso de Lioprotectores Durante el Proceso de Liofilización

Por:

EMILIO XICOHTENCATL DEL RAZO PEREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

Evaluación de la Supervivencia de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo Mediante
el Uso de Lioprotectores Durante el Proceso de Liofilización

Por:


EMILIO XICOHTENCATL DEL RAZO PÉREZ

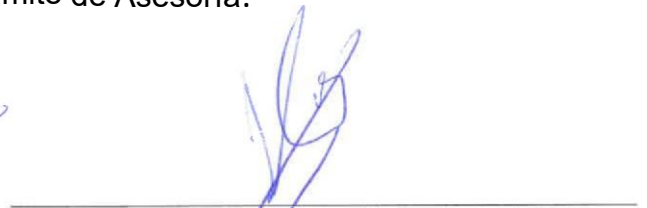
TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:


INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal
Asesor Principal


M.C. Raúl Alejandro Ramos Salazar
Asesor Principal Externo


Dr. Valentín Robledo Torres
Coasesor


M.C. Verónica Elizabeth Niño Villanueva
Coasesor


Dr. Alberto Sandoval Barcen
Coordinador de la División de Agronomía



Saltillo, Coahuila, México
Diciembre 2025

DECLARACION DE NO PLAGIO

El autor principal quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos: Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes. Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.



Emilio Xicohténcatl Del Razo Pérez

AGRADECIMIENTOS

Gracias a dios por permitirme disfrutar a mi familia y tenerla presente en mi vida y a mis padres para darme la fuerza para continuar con mi formación académica.

Gracias a mis hermanos Erik, Zach, Gilberto, Nacho y Abraham por ser mis maestros de vida.

Todos mis tíos, primos, cuñadas y sobrinos gracias por mostrarme su amor y apoyo todos estos años.

Agradezco a mis amigos de la infancia Alberto, Juan, Brandon, Logan y Donato que nunca me dejaron solo para cumplir mis metas, a mis amigos y compañeros que hice en la universidad; Ricardo, Daniel, Jafet, Diana, Tania, Milthon, Bucio, Alfredo, Carolina, Christian y Monserrat de los cuales recibí apoyo incondicional y viví los mejores momentos de esta etapa.

Sin olvidar agradecer desde lo más profundo de mi corazón a mi Alma Terra Mater, la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por dejarme ser parte de ella y brindarme todo el conocimiento profesional y social que desarrolle en la escuela.

Llevare los colores amarillo y negro que son representativos de esta institución como bandera en el corazón, gracias por todo.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este proyecto a mis padres Amalia y Misael, a Dios que han sido mi guía y fortaleza para seguir adelante, así como a mi tía Leticia y mi hermana Alejandra por ser mi pilar de apoyo en todo sentido a lo largo de este camino para culminar mi etapa universitaria.

Su fuerza e inspiración estuvieron y están presentes día con día para lograr los objetivos que me he propuesto a lo largo de estos años. Ustedes dedicaron amor, esfuerzo y tiempo para forjarme paso a paso para llegar a ser la persona que soy actualmente.

A todos mis docentes que participaron en mi formación profesional dentro y fuera de esta hermosa universidad, en especial a la Dra. Laura Raquel Luna García, a la Dra. Rosalinda Mendoza Villareal por permitirme desarrollar esta tesis y al Dr. Raúl Alejandro Ramos Salazar por ser mi asesor y brindar su apoyo en este trabajo, gracias por confiar en mí.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	2
III. HIPÓTESIS	2
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
4.2 Biofertilizantes.....	4
4.3 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal	6
4.4 Mecanismos de acción de las RCPV	7
4.5 Fijación Biológica de Nitrógeno.....	9
4.6 Solubilización de Fósforo	10
4.7 Género <i>Bacillus</i>	11
4.8 Liofilización de cepas microbianas.....	12
V. MATERIALES Y METODOS	15
5.1 Lugar del experimento	15
5.2 Material biológico	15
5.3 Solubilización de Fósforo	15
5.4 Crecimiento bacteriano	18
5.5 Proceso de lioprotección y liofilización	18
5.6 Análisis estadístico.....	20
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
6.1 Crecimiento bacteriano	21
6.2 Solubilización de fósforo	23
6.3 Supervivencia de las cepas al proceso de liofilización.....	27
VII. CONCLUSIONES.....	29
VIII. REFERENCIAS.....	30

RESUMEN

El desarrollo de bioinoculantes microbianos efectivos requiere la selección de cepas con alta funcionalidad agronómica y la implementación de protocolos de conservación que garanticen su viabilidad a largo plazo. En este estudio, se evaluaron cinco cepas del género *Bacillus* en dos aspectos: la capacidad de solubilización de fósforo y la supervivencia a la liofilización. El análisis de crecimiento reveló que *B. mycooides* y *B. megaterium* las cepas con mayor viabilidad inicial, un factor crucial para la estabilidad del inóculo. Los resultados de la solubilización de fósforo mostraron una alta significancia y una marcada interacción entre Cepa, Fuente de Fósforo y Tiempo, destacando la especificidad enzimática de las cepas. *B. cereus* fue el más eficiente solubilizando Fosfato a corto plazo, mientras que *B. subtilis* y *B. mycooides* exhibieron un alto rendimiento en Ácido Fosfórico. La eficiencia solubilizadora fue dinámicamente variable, con *B. licheniformis* destacándose en la Roca Fosfórica a las 48 horas. Estos hallazgos confirman que la aplicación de biofertilizantes de *Bacillus* debe ser específica a la composición del suelo. A pesar de la alta funcionalidad demostrada, el estudio concluyó una protección nula en la conservación: la supervivencia post-liofilización fue del 0% en todas las cepas y métodos lioprotectores evaluados. El potencial agronómico de estas cepas solo podrá ser explotado mediante la optimización de protocolos de conservación con lioprotectores específicos para la estructura Gram positiva, asegurando así su viabilidad comercial.

Palabras clave: *Bacillus*, liofilización, lioprotectores, solubilización de fósforo.

ABSTRACT

The development of effective microbial bioinoculants requires the selection of strains with high agronomic functionality and the implementation of preservation protocols that guarantee their long-term viability. In this study, five strains of the *Bacillus* genus were evaluated based on two aspects: phosphorus solubilization capacity and freeze-drying (lyophilization) survival. Growth analysis revealed *B. mycooides* and *B. megaterium* as the strains with the highest initial viability, a crucial factor for inoculum stability. Phosphorus solubilization results showed high significance and a marked interaction among Strain, Phosphorus Source, and Time, highlighting the enzymatic specificity of the strains. *B. cereus* was the most efficient at solubilizing Phosphate in the short term, while *B. subtilis* and *B. mycooides* exhibited high performance in Phosphoric Acid. Solubilization efficiency was dynamically variable, with *B. licheniformis* excelling in Rock Phosphate at 48 hours. These findings confirm that the application of *Bacillus* biofertilizers must be specific to the soil composition. Despite the high functionality demonstrated, the study concluded a null protection in preservation: post-lyophilization survival was 0% across all strains and cryoprotectant methods evaluated. The agronomic potential of these strains can only be exploited through the optimization of preservation protocols with cryoprotectants specific to the Gram-positive structure

Keywords: *Bacillus*, *Lyophilization*, *Cryoprotectants*, *Phosphorus solubilization*.

I. INTRODUCCIÓN

Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RCPV, o por sus siglas en inglés PGPR) son microorganismos que emplean mecanismos que provocan efectos benéficos para el crecimiento de las plantas (Ikan *et al.*, 2024) o como control biológico ante patógenos (Figiel *et al.*, 2025), lo que los convierte en un factor importante en la agronomía moderna, teniendo un impacto directo en prácticas agrícolas sostenibles para los suelos a largo plazo (Alves de Andrade *et al.*, 2023), siendo más respetuosos con el medio ambiente y pueden ser utilizados para reemplazar parcialmente a algunos productos de origen químico, los cuales tienden a ser más costosos y además pueden causar efectos adversos a los ecosistemas (Shi *et al.*, 2022).

A pesar de que las RCPV son una alternativa prometedora para los productores, actualmente éstas se encuentran relegadas en el mercado agronómico, y esto puede deberse a la calidad general de los productos, específicamente, la vida de anaquel, que resulta muy corta comparación de los productos de origen químico. A raíz de esto se empezaron a estudiar métodos de conservación de RCPV, uno de estos métodos es la liofilización, proceso de secado que consiste en congelar un producto y eliminar el agua por medio de sublimación (Assegehegn *et al.*, 2019), siendo una forma de alargar la vida de anaquel de las células, sin embargo este método no es del todo eficaz, ya que durante este proceso se puede deteriorar la membrana por la formación de cristales y destruir la célula (Quintero-Rodríguez *et al.*, 2023). Ante esto se buscan alternativas para proteger la célula durante este proceso. Una de estas alternativas es el uso de lioprotectores, sustancias como la

glucosa, lactosa, tetralactosa, manitol, entre otras, que le confieren resistencia a la célula al regular la deshidratación, lo que puede ayudar a la estabilidad química y biológica durante la liofilización (Bellali *et al.*, 2020).

Estudios como el de Hernández Tenorio (2018) donde se analizó la supervivencia de una cepa bacteriana (*Bradyrhizobium* sp. MS22) utilizando sacarosa y comparándola a esta misma cepa sin protector o el de Quintero-Rodríguez y colaboradores (2023) donde agentes lipoprotectores como glucosa y *sacarosa* mantuvieron la supervivencia de las células en especies como *Pseudomonas aureginosa*, *Haemophilus influenzae* y *Escherichia coli* después del proceso de liofilización.

Por lo anterior, el presente estudio se planteó lo siguiente.

II. OBJETIVOS

- Cuantificar la solubilización de fósforo *in vitro* de las cinco cepas del género *Bacillus*.
- Evaluar la supervivencia de cinco cepas del género *Bacillus* al proceso de liofilización, ante la aplicación de diferentes lioprotectores.

III. HIPÓTESIS

Al menos un lioprotector, mantendrá la supervivencia celular de una o más cepas del género *Bacillus* tras el proceso de liofilización.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Fertilizantes químicos convencionales

Los fertilizantes químicos convencionales son productos sintéticos que le aportan los macronutrientes y micronutrientes necesarios a las plantas para que éstas puedan llevar a cabo su ciclo de vida. Por ejemplo, para lograr un mayor rendimiento de diversos cultivos, se utilizan fertilizantes nitrogenados tradicionales, sin embargo, éstos contribuyen a la contaminación de los suelos (Hungria *et al.*, 2016).

Sin embargo, los fertilizantes representan un alto costo monetario, se estima que solo la fertilización nitrogenada en el cultivo de maíz representa un 40% del costo total de producción. Además, de que estos, como anteriormente se mencionó tienen un alto potencial contaminante, con graves consecuencias para el medio ambiente, y su fabricación requiere grandes cantidades de productos no renovables (Bijay-Singh & Craswell, 2021). Al aplicarse al suelo, los fertilizantes químicos suelen perderse por lixiviación y volatilización, causando efectos adversos al medio ambiente. El uso habitual de altas cantidades de fertilizantes, ya sean nitrogenados o amoniacales, provoca en el suelo el aumento de la acidez y un desbalance de bases, como el calcio, magnesio y potasio. Esta situación afecta la calidad y salud del suelo, y a su vez, impacta negativamente en la productividad de los cultivos. El uso intensivo de insumos ha hecho que los agroecosistemas sean más susceptibles a las condiciones ambientales adversas, aumentando la fluctuación de los costos productivos y disminuyendo la rentabilidad de cultivos (Ortega *et al.*, 2022).

Con base a esto es preciso desarrollar alternativas amigables que permitan mejorar la productividad de los cultivos y consecuentemente la estabilidad de los

ecosistemas a largo plazo, ya que la sustentabilidad de la producción de alimentos y la salud ambiental para una población humana en constante crecimiento requiere una reducción significativa del uso de fertilizantes sintetizados químicamente (Sánchez *et al.*, 2021).

4.2 Biofertilizantes

El uso de abonos orgánicos tiene una larga historia en la agricultura, incluyendo los primeros intentos del hombre por mejorar el crecimiento de las plantas. Sin embargo, la teoría de la nutrición mineral de Von Liebig en el siglo XIX sugirió que los abonos orgánicos podían ser sustituidos por fertilizantes minerales, lo cual revolucionó la agricultura. Con el tiempo, el excesivo uso de fertilizantes inorgánicos y malas prácticas agrícolas ocasionaron efectos negativos en la agricultura y los ecosistemas (Varela, 2007).

El término biofertilizante hace referencia a sustancias que contienen microorganismos vivos involucrados en varias actividades del suelo (Nagananda *et al.*, 2010), los cuales, al ser aplicados a semillas, plantas o suelos, colonizan la rizosfera o el interior de las plantas (Vessey, 2004) y dan lugar a un mejor rendimiento de los cultivos (Boraste *et al.*, 2009). El término biofertilizante, no obstante, es una palabra que aún genera confusión, ya que fácilmente se identifica con extractos de plantas, residuos urbanos compostados, mezclas microbianas con constituyentes indefinidos y formulaciones de fertilizantes químicos suplementados con compuestos orgánicos (Boraste *et al.*, 2009).

La importancia que tienen los microorganismos en la naturaleza y en sus relaciones con el hombre es cada día más evidente. Cuando la agricultura tiene la necesidad

de adoptar medidas conservacionistas, los microorganismos utilizados como biofertilizantes tienen un papel sustancial. El desarrollo y uso de los biofertilizantes se contempla como una importante alternativa para la sustitución parcial o total de los fertilizantes minerales (Grageda-Cabrera *et al.*, 2012).

Los biofertilizantes pueden ser de gran importancia económica, ya que podrían reemplazar parcialmente a otros productos agroquímicos que son costosos. Por último, el desarrollo de biofertilizantes responde a la demanda creciente de prácticas agrícolas más respetuosas con el medioambiente y sostenibles (Bhattacharjee y Dey, 2014).

Bhattacharjee y Dey (2014) mencionan que los biofertilizantes microbianos funcionales se han utilizado en algunos países tropicales durante más de medio siglo, tanto en pequeñas como en grandes explotaciones. Dentro de los principales beneficios de uso de este tipo de bioinoculantes observados por los investigadores y desarrolladores de productos está la fijación biológica de nitrógeno, la promoción del crecimiento vegetal, la solubilización del fósforo. Para el mejor aprovechamiento de estos procesos biológicos deberían considerarse el uso óptimo de los sistemas de fijación de nitrógeno conocidos y el desarrollo de nuevas asociaciones de microorganismos y plantas para la fijación de nitrógeno (Olivares *et al.*, 2013).

El principal problema de la producción de los biofertilizantes es su calidad, debido a que la mayoría de las agencias productoras privadas que suministran estos productos no se preocupan por cumplir con los parámetros pertinentes. Así, la disponibilidad de biofertilizantes de buena calidad para los agricultores es el

principal obstáculo para su implementación exitosa. Existe al respecto una falta de coordinación entre los agentes de extensión y los científicos. Por ello, se requiere prestar atención a los principales bioinoculantes comerciales, como *Azotobacter*, *Azolla*, *Acetobacter* y *Azospirillum* y su aplicación en diversos cultivos de cereales y hortalizas (Pathak y Kumar, 2016).

La biofertilización surge como una alternativa biotecnológica de interés ecológico y ambiental, por ejemplo Obando (2012) y Aguado (2012) realizaron estudios sobre los efectos positivos de *Rhizobium*, *Azotobacter* y otras rizobacterias estimuladoras del crecimiento demostrando que aumentan significativamente el número y peso de nódulos, mayor fijación de nitrógeno, aumento del contenido de macronutrientes y micronutrientes, en comparación con la inoculación individual de *Rhizobium sp.* (CIAT, 1987; Zúñiga, 2012 y Gonzales, 2013).

4.3 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal

Las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV) son un grupo de microorganismos promisorios y ampliamente estudiados como una de las formas posibles para reducir los costos de producción en la agricultura moderna (de Souza *et al.*, 2015). La expresión Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) fue acuñada por J. W. Kloepper y M. N. Schroth en 1978, para describir las bacterias que habitan la rizósfera y que afectan positivamente el desarrollo de las plantas (Labra-Cardón, *et al.*, 2012).

Las RCPV poseen efectos benéficos para el crecimiento de las plantas y para facilitar la disponibilidad de elementos presente en el suelo, como control biológico de diferentes patógenos (Álvarez. *et al* 2021). Así mismo, las PGPB desempeñan

un papel importante en el alivio del estrés por sequía en plantas ya que estos microorganismos benéficos colonizan la rizosfera/endorizosfera de las plantas e imparten tolerancia a la sequía al producir exopolisacáridos (EPS), fitohormonas, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, compuestos volátiles, induciendo la acumulación de osmolitos, antioxidantes, regulación ascendente o descendente de genes sensibles al estrés y alteración en la morfología de la raíz en la adquisición de tolerancia a la resecación (Beltrán, *et al.* 2023).

Las RCPV pueden ser de vida libre o asociativas, aerobias, anaerobias o anaerobias facultativas (Rodríguez, 1995). Las RCPV se han aislado en suelos donde predomina la vegetación de gramíneas, como pastos tropicales (Döbereiner y Day, 1975) y pastos de zonas templadas (Kole *et al.*, 1988).

4.4 Mecanismos de acción de las RCPV

Los mecanismos de las RCPV pueden ser de acción directa o indirecta. Los mecanismos directos ocurren cuando los metabolitos producidos por algunas cepas de rizobacterias son utilizados como reguladores de crecimiento o precursores de éstos por parte de la planta (Gutierrez-Manero *et al.*, 2001; Patten & Glick, 2002), tienen acción similar a las fitohormonas aplicadas a las semillas y plantas, con una mayor proliferación de pelos radiculares, que incrementan y mejoran la eficiencia de absorción mineral de nitrógeno, fósforo y hierro (Fulchieri & Frioni, 1994; García *et al.*, 1995).

Los mecanismos directos de promoción vegetal encierran distintos procesos en los cuales, las RCPV pueden alterar el desarrollo de la planta (Ahmad *et al.*, 2006; Leisinger y Margraff, 2979M Matheron, 2001; Wildermuth *et al.*, 2002). Estos

mecanismos son muy diversos y en algunos casos poco estudiados, uno de ellos consiste en la producción de sustancias orgánicas, producto del metabolismo secundario de las RCPV, que son capaces de promover respuestas fisiológicas específicas en las células vegetales (Camelo *et al.*, 2011).

Otro de los mecanismos directos de estas rizobacterias es la producción de la enzima ácido 1- aminociclopropano-1-carboxílico o ACC desaminasa que se encarga de controlar los niveles de etileno en la planta (Bal, H. B., Nayak, L., Das, S., y Adhya, T. K., 2013) el cual en altas concentraciones induce cambios en las características de la planta y la lleva a la muerte (Lucas, J. A., García-Cristobal, J., Bonilla, A., Ramos, B., & Gutierrez-Manero, J, 2014).

También la síntesis de Ácido indol acético (IAA) es un mecanismo directo. Este metabolito ayuda en la producción de raíces más largas con mayor número de pelos radiculares y laterales que están implicados en la absorción de nutrientes de la planta (Mohite, B. 2013).

Los mecanismos indirectos ocurren cuando los metabolitos producidos por las RCPV pueden funcionar como antagónicos involucran aspectos de control biológico, suprimen o inhiben el crecimiento de microorganismos perjudiciales (fitopatógenos) para el desarrollo de las plantas, vía producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas (glucanasas, quitinasas) o inducción de mecanismos de resistencia (Bashan, 1998; Gutierrez-Manero *et al.*, 2001).

4.5 Fijación Biológica de Nitrógeno

La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es un proceso microbiológico esencial para la agricultura sostenible, mediante el cual ciertos microorganismos, como bacterias simbióticas (*Rhizobium*) y de vida libre (*Azotobacter*), convierten el nitrógeno atmosférico (N_2) en amoníaco (NH_3), una forma asimilable por las plantas (Soumare *et al.*, 2020; Wickramasinghe *et al.*, 2021). Este proceso es fundamental dado que el nitrógeno es un nutriente esencial cuya absorción directa del aire es imposible para los vegetales (Wickramasinghe *et al.*, 2021).

La clave enzimática de la FBN reside en el complejo nitrogenasa, exclusivo de ciertos procariontes (Timofeeva *et al.*, 2023). Este complejo cataliza la reducción de N_2 a NH_3 en un estricto ambiente anaeróbico (Warmack *et al.*, 2023), ya que la presencia de O_2 inactiva la enzima (Ibáñez *et al.*, 2023).

El complejo nitrogenasa se compone de dos metaloproteínas principales:

- Dinitrogenasa reductasa (Fe-proteína): Transfiere electrones.
- Dinitrogenasa (MoFe-proteína): Contiene el FeMo-cofactor, esencial para la reducción de N_2 (Daniel *et al.*, 2022; Nosheen *et al.*, 2021).

En leguminosas, la FBN ocurre una simbiosis con el género *Rhizobium* en nódulos radiculares. La planta proporciona azúcares y un ambiente O_2 limitado. La leghemoglobina, una proteína vegetal, regula la concentración de oxígeno en el nódulo, asegurando que sea suficiente para el metabolismo bacteriano sin inactivar la nitrogenasa (Demir *et al.*, 2023; Ibáñez *et al.*, 2023).

También en microorganismos de vida libre, como *Azotobacter*, desarrollan mecanismos de protección contra la exposición al O₂, incluyendo la formación de cápsulas o la regulación de la respiración para crear condiciones anaeróbicas transitorias, permitiendo la función de la nitrogenasa (Barron *et al.*, 2024; Dzvene & Chiduza, 2024).

4.6 Solubilización de Fósforo

Algunas bacterias de tipo RCPV presentan la capacidad de solubilizar fosfatos a partir de compuestos inorgánicos u orgánicos, utilizando enzimas como: las fosfatasas no específicas, fitasas, fosfonatasas y C-P-liasas (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Las enzimas C-P-liasas solubilizan fósforo a partir de componentes orgánicos del suelo, éstas cortan el enlace carbono-fósforo de los compuestos organofosforados. La liberación de las formas solubles a partir del fósforo mineral, se realiza con la producción de ácidos orgánicos como el ácido glucónico o 2-cetoglucónico, la bioproducción de estos ácidos depende de la fuente de carbono disponible en la rizósfera (Ahemand *et al.*, 2012).

Un mecanismo alternativo para la obtención de este nutriente es la liberación de ácidos orgánicos, capaces de quelar el fósforo biodisponible en el suelo utilizando sus radicales hidroxilo y carboxilo (Vyas & Gulati 2009).

Algunos ejemplos de bacterias de tipo RCPV que cuentan con la capacidad de solubilizar fosfatos están dentro de los géneros *Achromobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Microbacterium* sp., *Serratia*, *Beijerinckia* sp., asimismo diferentes especies tienen

esta capacidad, tales como *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus circulans*, *Cladosporium harbarum*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Rhizobium leguminosarum* (Rodríguez & Fraga 2006).

4.7 Género *Bacillus*

El género *Bacillus*, perteneciente a las bacterias Gram positivas, es uno de los géneros de microorganismos más ampliamente estudiado para la promoción del crecimiento de las plantas (Pérez-Montaña *et al.*, 2014). Se sabe que estas bacterias colonizan rápidamente la rizosfera y suprimen los patógenos del suelo en la superficie de las raíces (Rangarajan *et al.*, 2003).

Algunas de estas especies estimulan directamente el crecimiento de las plantas, ya sea mediante la mejora de la adquisición de nutrientes o la estimulación de los mecanismos de defensa de la planta huésped antes de la infección; otras especies pueden inhibir o suprimir las poblaciones de microorganismos patógenos o plagas (Kumar *et al.*, 2011).

Especies de *Bacillus* tienen la capacidad de solubilizar el fosfato, lo que estimula el crecimiento vegetal mediante una mejor nutrición con P, además incrementa la absorción de N, potasio (K) y hierro (Abbasdokht y Gholam, 2010). También se ha demostrado que estas bacterias poseen características que les permiten su utilización como promotores del crecimiento vegetal y antagonistas de fitopatógenos (Gobelak *et al.*, 2015).

Diferentes estudios prueban que este género es beneficioso para los cultivos hortícolas, por ejemplo Chen y colaboradores (2024) mostraron que *Bacillus*

velezensis KHH13 promueve el crecimiento vegetal en el cultivo de repollo, además de disminuir la incidencia de patógenos como *Fusarium*. *Bacillus megaterium* incrementa el rendimiento de brócoli, así como la concentración mineral de la inflorescencia (Demir *et al.*, 2023). También se ha comprobado una mejora en el crecimiento de cultivos como cempasúchil y lechuga al utilizar *Bacillus* spp. (Ramos Salazar *et al.*, 2022; Shao *et al.*, 2023).

4.8 Liofilización de cepas microbianas

La Biotecnología se fundamenta en el aprovechamiento de la rápida capacidad de crecimiento y el cultivo a gran escala de microorganismos para la producción eficiente de compuestos de interés industrial (Blanco y Brown, 2010). No obstante, para mantener la productividad y aplicabilidad de estas cepas, es crucial garantizar su viabilidad y la integridad genética y bioquímica a largo plazo.

El mantenimiento de la estabilidad microbiana requiere mitigar factores que puedan inducir cambios morfológicos, variación en los componentes celulares y mutaciones espontáneas (Blanco y Brown, 2010). Por ello, es imperativo implementar métodos de conservación de cepas que aseguren la pureza genética, preserven los niveles de productividad inicial y salvaguarden todas sus propiedades bioquímicas (Metrix Laboratorios, 2015).

La selección de la técnica de conservación adecuada no es trivial, ya que debe ser específica al tipo de cultivo, a la susceptibilidad del microorganismo y al tiempo de preservación requerido (Metrix Laboratorios, 2015). Actualmente, existe una escasez de información sobre el impacto de las metodologías de conservación en

las características metabólicas de las bacterias de interés, lo que subraya la necesidad de investigación en este campo (Escobar *et al.*, 2005).

La liofilización (secado por congelación) es la técnica más utilizada y eficaz para el resguardo, transporte y almacenamiento de microorganismos a largo plazo, permitiendo la conservación de cepas por más de 20 años a temperatura ambiente (Morales-García, 2010; Muñoz, 2018). El proceso consiste en la sublimación del agua congelada bajo condiciones de alto vacío, pasando directamente del estado sólido al gaseoso, sin afectar la estabilidad de la sustancia (Adams G., 2007; Muñoz, 2018).

A pesar de su eficacia, la liofilización puede inducir daño biológico en las células, incluyendo deterioro de la membrana, desnaturalización de proteínas y afectación al ADN (Leslie *et al.*, 1995).

Los principales mecanismos de daño están relacionados con:

- Cambios en el estado físico de los lípidos: Durante el proceso, la membrana celular experimenta una transición de fase de cristal líquido a gel (Leslie *et al.*, 1995).
- Ruptura de la Membrana: Al rehidratar la membrana seca en fase de gel, el paso a la fase de cristal líquido puede provocar la ruptura celular (Leslie *et al.*, 1995).

Para mitigar estos efectos, es esencial el uso de un lipoprotector (o crioprotector) que evite la transición a la fase de gel y mantenga la membrana en fase de cristal líquido, incluso a temperatura ambiente (Leslie *et al.*, 1995).

La supervivencia de las cepas a la liofilización es altamente dependiente del lioprotector utilizado, y no existe un lioprotector universal para todas las cepas bacterianas (Burguet *et al.*, 2014; Morgan *et al.*, 2006). Por lo tanto, la optimización del proceso requiere una evaluación específica de:

- Mecanismos de daño.
- Condiciones de liofilización (temperatura, presión y tiempo).
- Agentes lioprotectores (Shu *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020; Barley, 2021).

Los lioprotectores son el factor más crítico, ya que su función es reducir el daño celular durante el secado y la rehidratación, manteniendo la actividad fisiológica y la estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo (Zhang *et al.*, 2020). Es necesario determinar el porcentaje de supervivencia de cada microorganismo, ya que la efectividad de los lioprotectores varía en función de la cepa a conservar (Ávila *et al.*, 2015; Burguet *et al.*, 2014). Se ha investigado el uso de carbohidratos como manitol, glucosa, lactosa, xilitol, trehalosa y galactosa en concentraciones de 1% a 10% para mejorar la supervivencia bacteriana en la liofilización (Zhan *et al.*, 2012; Abadias *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2018; Prakash *et al.*, 2013).

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Lugar del experimento

El experimento se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, Coahuila.

5.2 Material biológico

Se utilizaron cinco cepas aisladas de la rizósfera de tomatillo silvestre, en un perfil de 0.30 m de profundidad, en área natural no cultivada de las localidades de Músquiz y Progreso en el estado de Coahuila. Las bacterias se identificaron molecularmente previamente y son las siguientes:

Cuadro 1. Cepas bacterianas utilizadas.

Género	Especie
<i>Bacillus</i>	<i>Subtilis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Mycooides</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Cereus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Licheniformis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Barbaricus</i>

5.3 Solubilización de Fósforo

Se hicieron cultivos con las cepas aisladas en medio líquido Pikovskaya modificado con diferentes fuentes de Fósforo: CaHPO_4 (Cuadro 3), roca fosfórica (Cuadro 4) y

H₃PO₄ (Cuadro 5), a un pH de 6.5 a 7.5, utilizando NaOH al 2% para ajustar pH en caso de ser necesario. Se incubaron a 30 °C con agitación de 120 rpm. A las 24 y 48 horas se filtró una porción del medio con ayuda de un filtro de poro ultra-fino. Se midió el fósforo por medio de colorimetría (Sadzawka *et al*, 2007).

Cuadro 2. Medio Pikovskaya líquido modificado con CaHPO₄ como fuente de fósforo.

Reactivo	g L ⁻¹
Glucosa	10
CaHPO ₄	4.71
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
NaCl	0.2
MgSO ₄	0.1
KCl	0.2
Extracto de levadura	0.25
MnSO ₄	0.1

Cuadro 3. Medio Pikovskaya líquido modificado con Roca fosfórica como fuente de fósforo.

Reactivo	g L ⁻¹
Glucosa	10
Roca fosfórica (22% de P)	4.54
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
NaCl	0.2
MgSO ₄	0.1
KCl	0.2
Extracto de levadura	0.25
MnSO ₄	0.1

Cuadro 4. Medio Pikovskaya líquido modificado con H₃PO₄ como fuente de fósforo.

Reactivo	g L ⁻¹
Glucosa	10
H ₃ PO ₄	3.72
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
NaCl	0.2

MgSO ₄	0.1
KCl	0.2
Extracto de levadura	0.25
MnSO ₄	0.1

5.4 Crecimiento bacteriano

Las bacterias aisladas se pusieron a crecer en medio líquido Luria Bertani (Cuadro 2) a 30 °C y 120 rpm en una incubadora durante 48 horas. Posteriormente se cuantificaron en un Espectrofotómetro UV-vis mediante la técnica de McFarland.

Cuadro 5. Composición del medio líquido Luria Bertani.

Reactivo	g L ⁻¹
Peptona de caseína	5
Sacarosa	5
Extracto de levadura	5
NaCl	5

5.5 Proceso de lioprotección y liofilización

El proceso de lioprotección y liofilización se inició con la preparación del inóculo microbiano. El cultivo bacteriano fue ajustado a una concentración de 1×10^9

Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC ml⁻¹) utilizando agua destilada estéril como diluyente. Seguidamente, se procedió a la obtención de la biomasa mediante la centrifugación de 10 ml de la suspensión celular en tubos Falcon (15 ml) a 10,000 g durante 10 minutos. Tras la decantación del sobrenadante, la biomasa resultante fue pesada para después ser re-suspendida en 1 ml de los agentes lioprotectores en estudio, previamente diluidos en agua destilada estéril, con la excepción de la leche descremada.

Cuadro 6. Tratamientos lioprotectores evaluados.

Tratamiento	g L ⁻¹
Trehalosa	50
Miel de abeja natural	50
Leche en polvo descremada	50
Leche descremada	-

La suspensión celular en el agente lioprotector fue sometida a congelación ultrarrápida por inmersión directa en nitrógeno líquido. Posteriormente, las muestras congeladas fueron transferidas a un liofilizador (Labconco, modelo FreeZone 2.5 l) para el secado por sublimación durante un periodo de 72 horas. Finalmente, para evaluar la viabilidad post-liofilización, el polvo liofilizado fue rehidratado en 10 ml de

solución salina estéril (0.2%), sembrado en medio Rennie sólido e incubado a 30 °C por 48 horas, procediendo luego al conteo manual de las colonias.

5.6 Análisis estadístico

Se analizaron los datos en un diseño completamente al azar, con tres repeticiones por unidad experimental. Se realizó un análisis de varianza ANOVA y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p > 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico InfoStat 2016 (Di Rienzo *et al.*, 2016).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Crecimiento bacteriano

En el Cuadro 7 se observan los resultados de la producción de biomasa (g) y el crecimiento bacteriano (UFC ml⁻¹) de las cinco cepas de *Bacillus*. En cuanto a la producción de biomasa, aunque se observó una variación, donde el valor máximo se presentó en *B. subtilis* (0.303 g) y el mínimo de *B. megaterium* (0.147 g), estas diferencias no fueron significativas estadísticamente, lo que sugiere que la cantidad de biomasa generada por las diferentes especies no difiere bajo las condiciones de cultivo evaluadas.

Cuadro 7. Producción de biomasa y crecimiento de cinco cepas bacterianas en medio Luria Bertani.

Bacteria	Producción de biomasa g	Crecimiento 10 ⁹ UFC ml ⁻¹
<i>B. subtilis</i>	0.303	2.6332 c
<i>B. mycooides</i>	0.296	10.0602 a
<i>B. cereus</i>	0.254	4.6429 bc
<i>B. licheniformis</i>	0.228	1.1478 c
<i>B. megaterium</i>	0.147	7.9632 ab
<i>p valor</i>	ns	0.0001

Medias con la misma letra dentro de columnas son iguales estadísticamente (Tukey; $p \leq 0.05$); ns, no significancia.

Por el contrario, los resultados medición del crecimiento bacteriano presentaron una diferencia altamente significativa ($p=0.0001$). Esta diferencia indica que la

capacidad de replicación y viabilidad de las distintas cepas difieren ampliamente. En específico, *B. mycoides* mostró el mayor crecimiento (10.0602×10^9 UFC ml⁻¹), superando a la mayoría de las otras cepas, a excepción de *B. megaterium* (7.9632×10^9 UFC ml⁻¹).

B. subtilis es la cepa que genera la mayor biomasa en términos de gramos, pero paradójicamente, presenta uno de los niveles de crecimiento (células viables) más bajos. Este fenómeno sugiere que una gran parte de su biomasa puede estar compuesta por células no viables, células en estado de esporulación que no se desarrollaron como colonias en el conteo, o por la excreción de metabolitos extracelulares (como polisacáridos o biopelículas) que añaden peso molecular al inóculo pero no contribuyen a la unidad formadora de colonias (Feliatra *et al.*, 2021). En contraste con *B. mycoides* y *B. megaterium* que, sin producir una biomasa significativamente superior en masa, demostraron una eficiencia de replicación y viabilidad celular notablemente mayor.

Para el desarrollo de un bioinoculante o para la implementación exitosa de una técnica de lioconservación, es indispensable seleccionar cepas con la máxima viabilidad. Una cepa con un alto UFC inicial, como *B. mycoides* o *B. megaterium*, garantiza una mayor concentración de inóculo activo para el proceso y, teóricamente, una mejor tasa de supervivencia al estrés de la liofilización. La baja viabilidad de cepas como *B. subtilis* y *B. licheniformis* podría requerir una optimización más rigurosa de los protocolos de lioprotección para mantener su funcionalidad, a pesar de su capacidad para generar una gran cantidad de biomasa inicial (Catone *et al.*, 2024).

6.2 Solubilización de fósforo

Los resultados de la solubilización e índice de solubilización de fósforo a las 24 horas por las cinco cepas de *Bacillus* demostraron ser altamente significativos ($p < 0.0001$) para todas las fuentes de fósforo evaluadas: Fosfato, Roca Fosfórica y Ácido Fosfórico, como se muestra en el Cuadro 8. Este nivel de significancia indica que la capacidad de las cepas para liberar y solubilizar el fósforo difiere intrínsecamente entre ellas y en función de la fuente que se les proporciona.

Cuadro 8. Solubilización e índice de solubilización de fósforo de cinco cepas del género *Bacillus* con tres diferentes fuentes de fósforo a las 24 horas.

Bacteria	Fosfato	Roca	Ácido	Fosfato	Roca	Ácido
		fosfórica	fosfórico		fosfórica	fosfórico
		mg l ⁻¹			%	
<i>B. subtilis</i>	231.07 d	339.21 a	814.84 a	23.12 d	33.92 a	81.48 a
<i>B. mycoides</i>	213.42 e	273.46 b	835.80 a	21.34 e	27.35 b	83.58 a
<i>B. cereus</i>	520.89 a	191.10 c	391.82 c	52.09 a	19.11 c	39.18 c
<i>B. licheniformis</i>	452.24 b	199.41 c	641.82 b	45.22 b	19.94 c	64.18 b
<i>B. megaterium</i>	417.63 c	346.13 a	375.81 c	41.73 c	34.61 a	37.85 c
<i>p valor</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Medias con la misma letra dentro de columnas son iguales estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

La respuesta de las cepas varió drásticamente en función de la fuente. Frente al fosfato, *B. cereus* presentó la mayor capacidad solubilizadora (520.89 mg l⁻¹), siendo significativamente superior a las demás cepas, mientras que *B. mycoides* tuvo el

desempeño más bajo (213.42 mg l⁻¹). Por otro lado, al emplear la roca fosfórica, *B. subtilis* y *B. megaterium* se destacaron como los solubilizadores de fósforo más eficientes (339.21 y 346.13 mg l⁻¹, respectivamente). Sin embargo, en el caso del ácido fosfórico, *B. subtilis* y *B. mycooides* mostraron los valores más altos (814.84 y 835.80 mg l⁻¹, respectivamente), mientras que *B. cereus* y *B. megaterium* mostraron las menores capacidades de solubilización (391.82 y 375.81 mg l⁻¹, respectivamente).

Estos patrones se reflejaron de manera consistente en el Índice de Solubilización de Fósforo (%), lo cual refuerza la selectividad de las cepas por la fuente de fósforo. Frente al Fosfato, *B. cereus* mantuvo el índice más alto (52.09%), con *B. mycooides* nuevamente en el valor mínimo (21.34%). Para la Roca Fosfórica, *B. subtilis* (33.92%) y *B. megaterium* (34.61%) fueron los más eficientes. Finalmente, en presencia de Ácido Fosfórico, *B. subtilis* (81.48%) y *B. mycooides* (83.58%) volvieron a mostrar los índices de solubilización más altos. Esta marcada interacción entre la cepa y la fuente de fósforo subraya que la capacidad de solubilización no es una característica universal para cada *Bacillus*, sino que está influenciada por la composición química del sustrato fosforado, lo cual es crucial para la selección de bioinoculantes específicos en agronomía.

Cuadro 9. Solubilización e índice de solubilización de fósforo de cinco cepas del genero *Bacillus* con tres diferentes fuentes de fósforo a las 48 horas.

Bacteria	Fosfato	Roca fosfórica	Ácido fosfórico	Fosfato	Roca fosfórica	Ácido fosfórico
----------	---------	----------------	-----------------	---------	----------------	-----------------

	mg l ⁻¹			%		
<i>B. subtilis</i>	473.22 c	163.42 c	650.97 b	47.32 c	16.34 c	65.10 b
<i>B. mycooides</i>	497.52 b	148.19 d	701.27 a	49.75 b	14.82 d	70.13 a
<i>B. cereus</i>	512.31 b	160.65 c	503.48 c	51.23 b	16.06 c	50.35 c
<i>B. licheniformis</i>	622.45 a	207.71 a	504.63 c	62.24 a	20.77 a	50.46 c
<i>B. megaterium</i>	499.25 b	193.87 b	427.26 d	49.92 b	19.29 b	42.73 d
<i>p valor</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Medias con la misma letra dentro de columnas son iguales estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

La solubilización aumentó generalmente a las 48 horas (Cuadro 9), pero los patrones de eficiencia de las cepas cambiaron, indicando una interacción significativa entre la Cepa y la Fuente de Fósforo. En el medio con Fosfato, *B. licheniformis* mostró la mejor solubilización (622.45 mg l⁻¹; 62.24%), lo que implica un mecanismo de solubilización que se activa o intensifica con el tiempo. En la Roca Fosfórica, *B. licheniformis* también mostró la mayor capacidad (207.71 mg l⁻¹ y 20.77%), mientras que *B. mycooides* fue la menos efectiva (148.19 mg l⁻¹ y 14.82%), demostrando que la Roca Fosfórica sigue siendo la fuente más difícil de solubilizar. Finalmente, en Ácido Fosfórico, *B. mycooides* se consolidó como la más eficiente (701.27 mg l⁻¹ y 70.13%), a diferencia de *B. megaterium* (427.26 mg l⁻¹ y 42.73%) que mostró la menor capacidad a las 48 horas.

La actividad solubilizadora no es homogénea entre las cepas de *Bacillus* sino que está finamente regulada por la disponibilidad y el tipo de compuesto fosforado. Esta especificidad sugiere que cada cepa puede poseer o regular diferencialmente la

expresión de enzimas clave, como la fosfatasa ácida/alcalina para liberar fósforo de compuestos orgánicos como el Fosfato y los ácidos orgánicos para quelar cationes metálicos que mantienen el fósforo inorgánico, como la Roca Fosfórica y el Ácido Fosfórico, compuestos insolubles (Luo *et al.*, 2024). La Roca Fosfórica, al ser una fuente inorgánica menos insoluble, exige una mayor secreción de ácidos orgánicos (ej. málico, glucónico) para la disociación (Zamora y Ninavia, 2024), lo cual explica por qué las cepas presentan valores de solubilización consistentemente menores en este medio que en el Ácido Fosfórico o el Fosfato.

La cepa *B. cereus* fue la más eficiente a las 24 horas, pero a las 48 horas, *B. licheniformis* fue más eficiente. Este cambio de solubilización indica una inducción tardía de los mecanismos de solubilización de compuestos orgánicos en *B. licheniformis*, sugiriendo que su sistema de fosfatasas podría activarse en etapas más avanzadas de la curva de crecimiento, cuando la disponibilidad de fósforo soluble es crítica (Mosquera *et al.*, 2024).

La alta solubilización observada en el Ácido Fosfórico confirma que, de las tres fuentes, esta fue la más fácilmente asimilable o desintegrable. Las cepas *B. subtilis* y *B. mycooides* mostraron la mejor eficiencia a ambos tiempos, lo que podría deberse a una alta tolerancia a la acidez o una producción robusta de quelantes que facilitan la liberación del fósforo. La capacidad casi uniforme de solubilización del Ácido Fosfórico sugiere que la limitación no es enzimática, sino probablemente la disociación inicial o la resistencia al bajo pH generado (Rios Sosa, 2022).

La Roca Fosfórica mostró los valores absolutos más bajos, lo que refleja su dificultad. A las 24 horas, *B. subtilis* y *B. megaterium* lideraron la solubilización, pero

a las 48 horas, *B. licheniformis* se convirtió en la más eficiente, mientras que la mayoría de las otras cepas disminuyeron su índice. Esto podría deberse a que la secreción de ácidos orgánicos de *B. licheniformis* alcanza su pico máximo y más sostenido a las 48 horas, superando a la de las otras cepas que quizás ya hayan agotado sus recursos metabólicos o hayan experimentado una inhibición por el pH (Mosquera *et al.*, 2024).

6.3 Supervivencia de las cepas al proceso de liofilización

Se presentó una ausencia total de supervivencia de las cepas de *Bacillus* en los cuatro tratamientos con lioprotectores, resultando en un 0% de viabilidad después de la rehidratación e incubación por 48 horas, lo que indica la nula protección de la célula por los distintos tratamientos utilizados. Las cepas de *Bacillus* son Gram positivas, caracterizadas por una pared celular gruesa de peptidoglicano y una única membrana citoplasmática (Zamora y Toro, 2021), mientras que otros estudios realizados han utilizado cepas Gram negativas, como *Pseudomonas aureginosa*, *Haemophilus influenzae* y *Escherichia coli* (Quintero Rodriguez *et al.*, 2023).

Las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa adicional que ofrece una barrera de protección, por lo que en las células Gram positivas evaluadas es probable que no haya mitigado el estrés osmótico, el daño mecánico por los cristales de hielo, y la desestabilización lipídica que sufren las células.

Este fallo se debe a que la vulnerabilidad de la membrana interna en las Gram positivas es directamente expuesta al estrés de la desecación. Los lioprotectores utilizados, al no ser específicos o no estar en la concentración óptima para *Bacillus*, no lograron evitar la transición de fase de cristal líquido a gel en la bicapa lipídica

durante el secado ni protegieron contra la ruptura osmótica durante la rehidratación, lo cual ha sido documentado como el principal mecanismo de daño letal (Leslie *et al.*, 1995). El resultado es un daño irreversible en la membrana y la desnaturalización de proteínas esenciales, llevando a la pérdida total de la viabilidad celular. Este fracaso es particularmente notorio considerando que algunas de las cepas (*B. mycooides* y *B. megaterium*) demostraron una alta viabilidad inicial, confirmando que el factor letal no fue la baja calidad del inóculo, sino el proceso de conservación mismo.

VII. CONCLUSIONES

Se confirmó la variabilidad inherente en las características fisiológicas y de interés agronómico de las cinco cepas de *Bacillus* evaluadas. La capacidad de solubilización de fósforo reveló una compleja interacción entre la cepa, la fuente de fósforo y el tiempo. Esta especificidad muestra que la eficiencia solubilizadora no es universal. *B. cereus* lideró en la solubilización de Fosfato a corto plazo, *B. licheniformis* y *B. subtilis* mostraron una eficiencia superior en Roca Fosfórica y Ácido Fosfórico respectivamente, con cambios notorios en el desempeño a las 48 horas. Esta selectividad es crucial para la selección del biofertilizante más eficaz según el tipo de sustrato fosforado disponible en el suelo.

No obstante, la aplicación biotecnológica de estas cepas altamente funcionales se vio truncada por un fallo crítico en la conservación a largo plazo, ya que ninguna cepa sobrevivió al proceso de liofilización con 4 fuentes energéticas como lioprotectores por lo que requiere mayor estudio en el *Bacillus*.

VIII. REFERENCIAS

- Abadias, M., Benabarre, A., Teixidó, N., Usall, J., & Viñas, I. (2014). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 173–182.
- Adams G. (2007). The Principles of Freeze-Drying 368:15–38.
- Aguado, G. (2012). Introducción al uso y manejo de los fertilizantes en la agricultura. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Secretaria de agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. INIFAP/SAGARPA
- Ahemand M, Khan M (2012) Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] using fungicide-tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain. *Saudi J. Biol. Sci.* 19: 451-59.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. (2006). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 36:1-9
- Álvarez, J., Ficher, G., & Velez, J. (2021). Analysis of the production of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) in the greenhouse with different irrigation levels during the harvest cycle. *Revista De La Academia Colombiana De Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 45(174), 109–121. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1239>
- Alves de Andrade, L., Barbosa Santos, C. H. B., Teciano Frezarin, E., Ramos Sales, L., & Cid Rigobelo, E. (2023). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for

Sustainable Agricultural Production. *Microorganisms*, 11(4).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11041088>

Assegehegn, G., Brito de la Fuente, E., Franco, J. M., y Gallegos, C. (2019). The Importance of Understanding the Freezing Step and Its Impact on Freeze-Drying Process Performance. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(4), 1378-1395. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.11.039>

Bal, H. B., Nayak, L., Das, S., y Adhya, T. K. (2013). Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant and soil*, 366(1-2), 93-105.

Barron, S., Mus, F., Peters, J. W., Mus, F., & Peters, J. W. (2024). Nitrogen-fixing gamma proteobacteria *Azotobacter vinelandii*—A blueprint for nitrogen-fixing plants? *Microorganisms*, 12(10), 2087.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12102087>

Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth promoting bacteria for use in agriculture. *Biotech. Advances* 16: 729-770

Bellali, S., Bou, J., Fontanini, A., Raoulta, D., y Lagiera, C. (2020). A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying. *Microbiological Research*, 236, 126454. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126454>

Beltrán, M. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Científica CORPOICA. *Tecnol. Agropecu.* 101 - 113p.

- Bhattacharjee, R. y Dey, U. (2014). Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 8 (24), 2332-2343.
- Bijay-Singh, & Craswell, E. (2021). Fertilizers and nitrate pollution of surface and ground water: an increasingly pervasive global problem. *SN Applied Sciences*, 3(4), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s42452-021-04521-8>
- Blanco PJ, Brown PH (2010). Nutrición de las plantas para el desarrollo sostenible y la salud mundial. *Ana. Larva del moscardón*. 105: 1073-1080.
- Boraste A, Vamsi K, Jhadav A, Khairnar Y, Gupta N, Trivedi S, Patil P, Gupta G, Gupta M, Mujapara AK, *et al.* (2009). Biofertilizers: a novel tool for Agriculture. *Int J Microbiol*. 1(2):23-31.
- Burguet, N., Sierra, N., & Acosta, M. (2014). Evaluación de una formulación para la conservación de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 45(1), 51–56.
- Burguet, N., Trimiño, J., & Sierra, N. (2014). Evaluación del cultivo liofilizado de *Candida albicans* utilizado en esquemas de certificaciones de calidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 321–329
- Camelo R., Mauricio; Vera M., Sulma Paola; Bonilla B., Ruth Rebeca Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal Corpoica. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, vol. 12, núm. 2, julio-diciembre, 2011, pp. 159-166 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Cundinamarca, Colombia

- Catone, S., Iannantuono, S., Genovese, D., Von Hunolstein, C., & Franciosa, G. (2024). Viability-PCR for the selective detection of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in live bacteria-containing products. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1400529. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1400529>
- Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. (1987). Simbiosis Leguminosa – Rizobio. Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico. Cali, Colombia.
- Chen, T. Y., Tzean, Y., Chang, T. De, Wang, X. R., Yang, C. M., & Lin, Y. H. (2024). Characterization of biofertilization and biocontrol potential of *Bacillus velezensis* KHH13 from organic soils. *Agronomy*, 14(6), 1135. <https://doi.org/10.3390/agronomy14061135>
- Daniel, A. I., Fadaka, A. O., Gokul, A., Bakare, O. O., Aina, O., Fisher, S., Burt, A. F., Mavumengwana, V., Keyster, M., & Klein, A. (2022). Biofertilizer: The future of food security and food safety. *Microorganisms*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061220>
- De Souza, R.; Ambrosini, A. y Passaglia, L.M.P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*. 38(4):401-19. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Demir, H., Sönmez, İ., Uçan, U., & Akgün, İ. H. (2023). Biofertilizers improve the plant growth, yield, and mineral concentration of lettuce and broccoli. *Agronomy*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/agronomy13082031>

- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., TabladaM., & Robledo, C. W. (2016). InfoStat 2016. FCA Universidad Nacional de Cordoba. <http://www.infostat.com.ar>
- Döbereiner, J. y J.M. Day. (1975). Nitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. pp. 39-56. In: Stewart, W.D.P. (ed.). *Nitrogen fixation by free-living microorganisms*. International Biological Prog. Cambridge University Press. Cambridge, UK
- Dzvene, A. R., & Chiduzza, C. (2024). Application of biofertilizers for enhancing beneficial microbiomes in push – pull cropping systems : A review. *Bacteria*, 3(4), 271–286. <https://doi.org/10.3390/bacteria3040018>
- Escobar, L. P. B., Ríos, D. M. F., Gómez, M. O., & Franco, M. (2016). Colección de cepas microbianas usadas en formación y proyectos de investigación aplicada en el centro para la formación cafetera SENA Regional Caldas. *Revista Nova*, 2(1), 8- 15.
- Feliatra, F., Batubara, U. M., Effendi, I., & Adelina, A. (2021). Optimization of an effective growth medium for biomass production of *Bacillus cereus*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 869, No. 1, p. 012009). IOP Publishing.
- Figiel, S., Rusek, P., Ryszko, U., & Brodowska, M. S. (2025). Microbially enhanced biofertilizers: Technologies, mechanisms of action, and agricultural applications. *Agronomy*, 15(5), 1191. <https://doi.org/10.3390/agronomy15051191>

- Fulchieri, M. & Frioni, L. (1994). *Azospirillum* inoculation on maize effect of yield in field experiment in central Argentina. *Soil Biol. Biochem.* 26: 921-923.
- García MD & Uruburu F. (2005). La conservación de cepas microbianas. *Act SEM*; 30:12-6
- García, G.; Moreno, P.; Peña-Cabriales, J. & Sanchez-Yañez, J. M. (1995). Respuesta del maíz (*Zea mays*, L.) a la inoculación con bacterias fijadoras de N₂. *TERRA* 13: 71-79.
- Glick, BR (1995) Mejora del crecimiento vegetal mediante bacterias de vida libre. *Revista Canadiense de Microbiología*, 41, 109-117.
- Gonzales, E. (2013). Estudio de la diversidad de cepas de *Rhizobium* provenientes de nódulos de tres variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Tesis para optar el Título de Biólogo). Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria la Molina).
- Grageda-Cabrera, O. A., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J. J., & Vera-Nuñez, J. A. (s. f.). *et al* (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342012000600015&script=sci_arttext
- Grobelak, A., Napora, A. y Kacprzak, M. (2015). Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth. *Ecological Engineering*. 84: 22-8.
- Gutierrez-Manero, F.; Ramos-Solano, B.; Probanza, A.; Mehouchi, J.; Tadeo, F. & Talon, M. (2001). The plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus*

and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.* 111: 206-211.

Hamid A, Ahmaj G (2010). The effect of seed inoculation (*Pseudomonas putida* + *Bacillus lentus*) and different levels of fertilizer on yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.) activities world academy of science. *Eng. Technol.* P. 68.

Hernández Tenorio, A. (2018). Preservación efectiva mediante liofilización de cepas del inoculante multi-especies EMMIM-1 Tesis de maestría en ciencias en microbiología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/7830>

Hungría, M., Gomez, D. & Filho, A. (Eds.)(2016). XXVII Reunión Latinoamericana de Rizobiología: fortaleciendo as parcerias Sul-Sul. Curitiba, Brasil: Núcleo Estadual Paraná (NEPAR)

Ibáñez, A., Garrido-Chamorro, S., Vasco-Cárdenas, M. F., & Barreiro, C. (2023). From lab to field: Biofertilizers in the 21st century. *Horticulturae*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/horticulturae9121306>

Ikan, C., Soussani, F. E., Ouhaddou, R., Ech-Chatir, L., Errouh, F., Boutasknit, A., Assouguem, A., Ali, E. A., Ullah, R., Ait Barka, E., Lahlali, R., & Meddich, A. (2024). Use of biofertilizers as an effective management strategy to improve the photosynthetic apparatus, yield, and tolerance to drought stress of drip-irrigated wheat in semi-arid environments. *Agronomy*, 14(6), 1316. <https://doi.org/10.3390/agronomy14061316>

- Kole, M.M., W.J. Page e I. Altosaar. (1988). Distribution of *Azotobacter* in Eastern Canadian soils and in association with plant rhizospheres. *Can. J. Microbiol.* 34: 815-817.
- Kumar, A., Prakash, A., Johri, B.N. (2011). Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem. In: Maheshwari, D. (eds) *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_2
- Labra-Cardón, D., Guerrero-Zúñiga, L. A., Rodríguez-Tovae, A. V., Montes-Villafán, S., Pérez-Jiménez, S. y Rodríguez-Dorantes, A. (2012). Respuesta de crecimiento y tolerancia a metales pesados de *Cyperus elegans* y *Echinochloa polystachya* inoculadas con una rizobacteria aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 28(1), 7-16.
- Leisinger T, Margraff R. (1979). Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol Rev* 43(3):422-442.
- Leslie SB, Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol* 61:3592–3597.
- Lucas, J. A., García-Cristobal, J., Bonilla, A., Ramos, B., & Gutierrez-Manero, J. (2014). Beneficial rhizobacteria from rice rhizosphere confers high protection against biotic and abiotic stress inducing systemic resistance in rice seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 44-53

- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-56.
- Luo, D., Shi, J., Li, M., Chen, J., Wang, T., Zhang, Q., Yang, L., Zhu, N., & Wang, Y. (2024). Consortium of Phosphorus-Solubilizing Bacteria Promotes Maize Growth and Changes the Microbial Community Composition of Rhizosphere Soil. *Agronomy*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/agronomy14071535>
- Matheron M. (2001). Modes of action for plant disease management chemistrie. En: *The University of Arizona*, <http://ag.arizona.edu/crops/diseases/papers/dischemistry.html>
- Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13(3), 638-649.
- Morales-García Y-E, Duque E, Rodríguez-Andrade O, de la Torre J, Martínez-Contreras R-D, Pérez R, Muñoz-Rojas J. (2010). Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. *Bio Tecnol* 14:11–29
- Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; A review. *J Microbiol Methods* 66:183–193
- Mosquera, A. T., Gálvez, D. T., Rendón, G. S., Jiménez, H. J. R., Rodas, P. P., Varón, R. C., & Barón, H. S. (2024). Biodisponibilidad del fósforo en la rizosfera de café y cultivos alimentarios por actividad bacteriana. *Temas agrarios*, 29(1), 22-39.

- Muñoz-López, Cinthia, Urrea-García, Galo R., Jiménez-Fernández, Maribel, Rodríguez-Jiménes, Guadalupe del C., & Luna-Solano, Guadalupe. (2018). Efecto de las condiciones de liofilización en propiedades fisicoquímicas, contenido de pectina y capacidad de rehidratación de rodajas de ciruela (*Spondias purpurea* L.). *Agrociencia*, 52(1), 1-13. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952018000100001&lng=es&tlng=es
- Nagananda GS, Das A, Bhattacharya S, Kalpana T. (2010). In vitro studies on the effects of biofertilizers (*Azotobacter* and *Rhizobium*) on seed germination and development of *Trigonella foenum-graecum* L. using a novel glass marble containing liquid medium. *Int J Botany*. 6(4):394-403
- Nosheen, S., Ajmal, I., & Song, Y. (2021). Microbes as biofertilizers, a potential approach for sustainable crop production. *Sustainability*, 13(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/su13041868>
- Obando, D. (2012). Respuesta fisiológica del frijol caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) a la co-inoculación de bacterias diazotróficas de los géneros *Azotobacter* y *Rhizobium* en suelos del departamento del cesar (Tesis para optar el grado de Magister en Ciencias Agrarias). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Olivares, J.; Bedmar, E. J. & San Juan, J. (2013). Biological Nitrogen Fixation in the context of Global Change. *American Phytopathological Society*. 26: 486-494.

- Orozco Aceves, M., Calvo Araya, JA, Gamboa Tabares, JA, Peraza Padilla, W., Varela Rodríguez, O., & Orozco Rodríguez, R. (2017). Efecto de dos fertilizantes orgánicos sobre las redes tróficas de suelos cultivados con mora. *Agronomía Mesoamericana*, 28 (3), 619–628. <https://doi.org/10.15517/ma.v28i3.25861>
- Ortega, M., Torres, P., Segura, R., Echeverría, F., & Uribe, L. (2022). Aislamientos de *Bacillus cereus* sobre el crecimiento y el contenido de nitrógeno en banano (*Musa AAA*). *Agronomía Mesoamericana*, 33(3), 49614. <https://doi.org/10.15517/am.v33i3.49614>
- Pathak, D.V. y Kumar, M. (2016). Microbial inoculants as biofertilizers and biopesticides. En D. P. Singh et ál. (eds.), *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity* (pp.197-209). Nueva Delhi: Springer India.
- Patten, C. L. & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indolacetic and indevelopment of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 98: 3795–3801.
- Pérez-Montaño, F.; Alías-Villegas, C.; Bellogín, R.A.; del Cerro, P.; Espuny, M.R.; Jiménez-Guerrero, I.; *et al.* (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*. 169:325-36.
- Prakash, O., Nimonkar, Y., & Shouche, Y. S. (2013). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters*, 339(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034>

- Quintero-Rodríguez, M. P., Montoya-Arango, D., Restrepo-Posada, D. C., & González-Gil, D. M. (2023). Conservación de bacterias por liofilización en la Colección de Microorganismos CM-EM-UDEA, Medellín, Colombia. *Biota colombiana*, 24(2). <https://doi.org/10.21068/2539200x.1127>
- Ramos Salazar, R. A., Villarreal Mendoza, R., Robledo Torres, V., & Hernández Pérez, A. (2022). Efecto de rizobacterias solubilizadoras de calcio en caracteres agronómicos y minerales de *Tagetes erecta*. *Biotecnia*, 24(2), 149–154. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i2.1621>
- Rangarajan, J., Peters, N., Vaughn, J. (2003). Mecanismos moleculares putativos para la regulación antisentido de la expresión del gen 4f-rnp en *D. melanogaster*. *A. Dros. Res. Conf.* 44 :382A.
- Reis, V. M.; Baldani, J. I.; Valdani, V.L.D. & Dobereiner, J. (2000). Biological dinitrogen fixation in grammineae and palm trees. *Crit. Rev. Plant. Soil* 19: 227- 247
- Ríos Sosa, Á. (2022). Aislamiento, identificación y caracterización fisiológica de bacterias del género *Bacillus* (Christian Gottfried Ehrenberg, 1835) productoras de polihidroxicanoatos (Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Rodríguez H, Fraga R, González T, Bashan Y (2006) Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* 287: 15- 21.

- Rodríguez M., M.N. 1995. Microorganismos libres fijadores de nitrógeno. pp. 105-126. In: Ferrera-Cerrato R. y J. Pérez M. (eds.). Agromicrobiología: Elemento útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados. Montecillo, estado de México.
- Ruiz-Ramírez, Santiago, Sánchez-Lucio, Roberto, Zelaya-Molina, Lily X., Chávez-Díaz, Ismael Fernando, Cruz-Cárdenas, Carlos Iván, & Valdivia-Bernal, Roberto. (2021). Germinación y vigor de semillas de especies hortícolas, inoculadas con biofertilizantes y soluciones salinas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12 (7), 1199-1208.
- Sadzawka, R., Grez, R., Carrasco, M. & Mora, M. (2007). Métodos de análisis de tejidos vegetales. Comisión de Normalización y Acreditación. Sociedad chilena de la ciencia de suelo. 7-8, 19-21, 25-30.
- Shao, Z., Arkhipov, A., Batool, M., Muirhead, S. R., Harry, M. S., Ji, X., Mirzaee, H., Carvalhais, L. C., & Schenk, P. M. (2023). Rhizosphere bacteria biofertiliser formulations improve lettuce growth and yield under nursery and field conditions. *Agriculture*, 13(10), 1911.
<https://doi.org/10.3390/agriculture13101911>
- Shi, K., Lu, T., Zheng, W., Zhang, X., & Zhangzhong, L. (2022). A review of the category, mechanism, and controlling methods of chemical clogging in drip irrigation system. *Agriculture*, 12(2), 202.
<https://doi.org/10.3390/agriculture12020202>

- Shu, G., Wang, Z., Chen, L., Wan, H., & Chen, H. (2018). Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. *LWT - Food Science and Technology*, 90(2018), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt>
- Soumare, A., Diedhiou, A. G., Thuita, M., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Gopalakrishnan, S., & Kouisni, L. (2020). Exploiting biological nitrogen fixation: A route towards a sustainable agriculture. *Plants*, 9(8), 1011. <https://doi.org/10.3390/plants9081011>
- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2023). Plant growth-promoting soil bacteria: Nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore production, and other biological activities. *Plants*, 12(24), 4074. <https://doi.org/10.3390/plants12244074>
- Vargas, LV (2025). Efecto de *Bacillus* y *Pseudomonas* en la germinación y el crecimiento vegetal de *Physalis peruviana*. Recuperado de: <https://hdl.handle.net/20.500.14625/41711>
- Vessey J. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*. 255(2):571-586.
- Vyas P, Gulati A (2009) Organic acid production *in vitro* and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiol*. 9: 174-89.

- Wang, Guangqiang, Yu, X., Lu, Z., Yang, Y., Xia, Y., Lai, P. F. H., & Ai, L. (2019). Optimal combination of multiple cryoprotectants and freezing-thawing conditions for high lactobacilli survival rate during freezing and frozen storage. *LWT - Food Science and Technology*, 99(September 2018), 217–223.
- Warmack, R. A., Rees, D. C., & Warmack, R. A. (2023). Nitrogenase beyond the resting state : A structural perspective nitrogenase. *Molecules*, 28(24), 7952. <https://doi.org/10.3390/molecules28247952>
- Wickramasinghe, W., Girija, D., Gopal, K. S., & Kesevan, S. (2021). Multi-phasic nitrogen fixing plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer for rice cultivation. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 12(2), 399–404.
- Wildermuth M, Dewdney J, Wu G, Ausubel F. 2002. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414:562-565.
- WSI Consultoría Digital. Elección de la técnica adecuada. Metrix Laboratorios (2015) Recuperado de <http://www.metrixlab.mx/no-cat/preservacion-de-microorganismos/>
- Yamada Y, Yukphan P (2008). Géneros y especies en ácido acético las bacterias. En t. J. Microbiol Alimentos. 125: 15-24.
- Zamora, G., & Ninavia, R. B. (2024). Estudio técnico y económico de la obtención de ácido fosfórico a partir de roca fosfórica del yacimiento de Capinota-Cochabamba-Bolivia. *Revista de Medio Ambiente y Minería*, 9(2), 37-46.

- Zamora-Ramírez, C. M., & Toro-Huamanchumo, C. J. (2021). Actividad antibiótica del *Eucalyptus globulus* frente a bacterias Gram positivas: un artículo de revisión. *Revista Médica Vallejana/Vallejian Medical Journal*, 10(2), 93-104.
- Zhan, Y., Xu, Q., Yang, M. M., Yang, H. T., Liu, H. X., Wang, Y. P., & Guo, J. H. (2012). Screening of freeze-dried protective agents for the formulation of biocontrol strains, *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 and *Pantoea agglomerans* 2Re40. *Letters in Applied Microbiology*, 54(1), 10–17. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03165.x>
- Zhang, Z., Yu, Y., Wang, Y., Wei, X., Liao, M., Rong, X., & Chen, J. (2020). Development of a new protocol for freeze-drying preservation of *Pseudoalteromonas nigrifaciens* and its protective effect on other marine bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology*, 44, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt>.
- Zúñiga, D. (2012). Manual de Microbiología Agrícola: *Rhizobium*, PGPRs, Indicadores de Fertilidad e Inocuidad. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.