

Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

en Sistemas de Agricultura Sostenible

Ruth Bonilla Buitrago
Luz Estela González de Bashan
Raúl Osvaldo Pedraza
Editores científicos

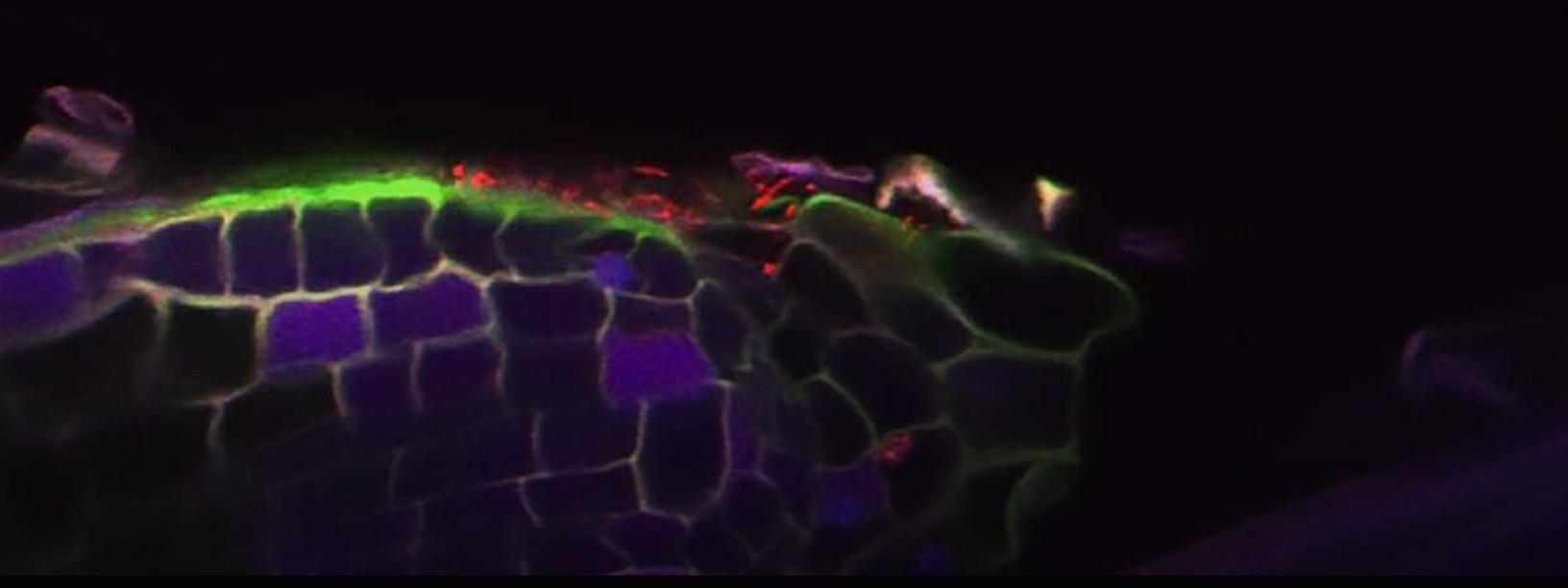
AGROSAVIA
EDITORIAL



Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

en Sistemas de Agricultura Sostenible

Ruth Bonilla Buitrago
Luz Estela González de Bashan
Raúl Osvaldo Pedraza
Editores científicos



AGROSAVIA
Corporación colombiana de investigación agropecuaria



Entidades financiadoras:



Centros Investigación que contribuyeron a los resultados:

Motilonia

Turipaná

Nataima

Tibaitatá

Entidades de Investigación aliadas:



Bacterias promotoras de crecimiento vegetal; en Sistemas de Agricultura Sostenible. / Corporación colombiana de investigación agropecuaria – Mosquera (Colombia) : AGROSAVIA, 2021.

372 páginas (Colección Análisis y reflexiones en torno al sector agropecuario.)

Incluye fotos, tablas y gráficos

ISBN E-book: 978-958-740-501-9

ISBN: 978-958-740-500-2

1. Biofertilizantes 2. Inoculación 3. Investigación 4. Sistemas de producción
5. Gestión ambiental 6. Aplicación de abonos.

Palabras clave normalizadas según Tesauro Multilingüe de Agricultura Agrovoc

Catalogación en la publicación – Biblioteca Agropecuaria de Colombia

Ruth Bonilla Buitrago
Luz Estela González de Bashan
Raúl Osvaldo Pedraza
Editores científicos

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA

Centro de Investigación Tibaitatá. Kilómetro 14 vía Mosquera-Bogotá, Mosquera, Cundinamarca. Código postal 250047, Colombia.

Esta publicación es resultado del proyecto cooperación entre los grupos de investigación “Sistemas agropecuarios sostenibles”, de AGROSAVIA, y “Microbiología ambiental” del CIBNOR.

Jorge Mario Díaz Luengas
Director Ejecutivo

Rodrigo Alfredo Martínez Sarmiento
Director de Investigación

Juan Diego Palacio Mejía
Director C.I. Tibaitatá

Grupo de investigación Sistemas Agropecuarios Sostenibles

Fecha de recepción: 1 de noviembre de 2020

Fecha de evaluación: 30 de noviembre de 2020

Fecha de aceptación: 10 de febrero de 2021

Primera edición, diciembre de 2021

Preparación Editorial
Astrid Verónica Bermúdez Díaz
Líder Editorial - AGROSAVIA

Punto aparte
Editores

www.puntoaparte.com.co

Dirección editorial
Andrés Barragán

Dirección de Arte
María Paula Leiva

Diseño y diagramación
Cristine Villamil
Valeria Cobo
Andrea Ríos

Ilustraciones
Iván Cortés
Steven Pinzón

Fotografía de cubierta
Luz González de Bashan,
Proyecto AGROSAVIA-CIBNOR

Fotografías
Cap. 3: Luisa Fernanda Posada Uribe
www.shutterstock.com

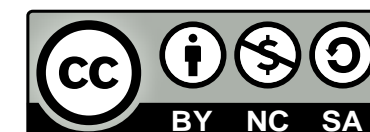
Citación sugerida: Bonilla Buitrago, R. González de Bashan, L. E., & Pedraza, R. O. (2021). *Rol de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal en sistemas de agricultura sostenible*. <https://doi.org/>

Cláusula de responsabilidad: AGROSAVIA no es responsable de las opiniones e información recogidas en el presente texto. Los autores asumen de manera exclusiva y plena toda responsabilidad sobre su contenido, ya sea este propio o de terceros, y declaran, en este último supuesto, que cuentan con la debida autorización de terceros para su publicación; igualmente, declaran que no existe conflicto de interés alguno en relación con los resultados de la investigación propiedad de tales terceros. En consecuencia, los autores serán responsables civil, administrativa o penalmente, frente a cualquier

reclamo o demanda por parte de terceros relativa a los derechos de autor u otros derechos que se hubieran vulnerado como resultado de su contribución.

DOI: <https://doi.org/10.21930/agrosavia.analisis.7405019>

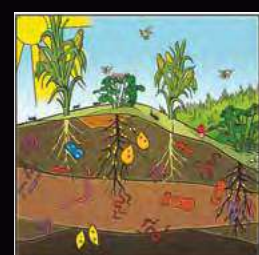
Línea de atención al cliente: 018000121515
atencionalcliente@agrosavia.co
<http://www.agrosavia.co>



https://co.creativecommons.org/?page_id=13

Contenido

- Lista de figuras 09
- Lista de tablas 12
- Editores científicos 14
- Los autores 15
- Agradecimientos 24
- Reconocimientos 26
- Prólogo 28



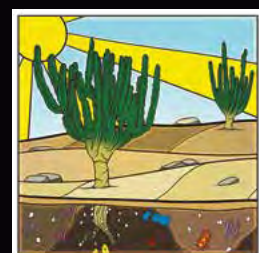
1 Los biofertilizantes y su relación con la sostenibilidad agrícola 32



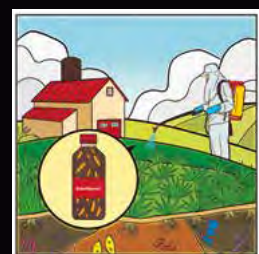
2 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: filogenia, microbioma, y perspectivas. 46



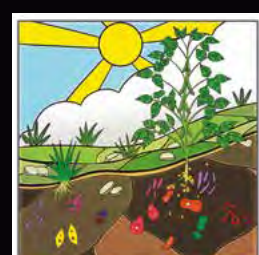
3 Mecanismos de promoción de crecimiento de las PGPB 78



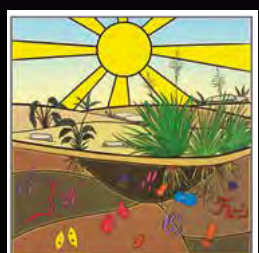
7 Métodos de aplicación de biofertilizantes bacterianos 176



6 Producción de biofertilizantes 158



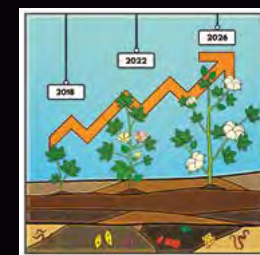
5 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por rizobios simbióticos y asimbióticos 140



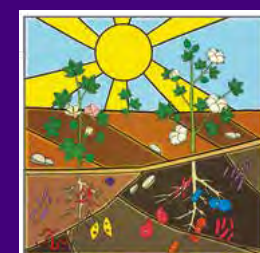
4 Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la mitigación de estreses 106



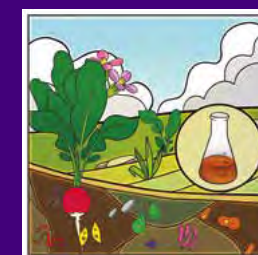
8 Normativa Colombiana y Brasileña 198



9 El mercado de los biofertilizantes 226



10 Algodón (*Gossypium hirsutum*) 252



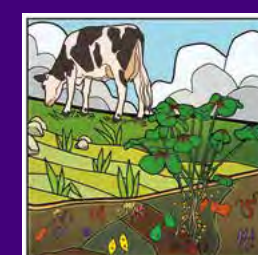
15 Desarrollos en biofertilizantes 346



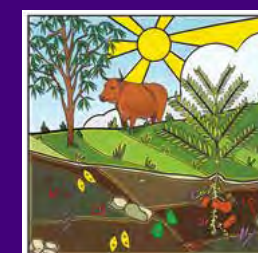
14 Tomate (*Solanum lycopersicum*) 334



13 Frijol para ensilaje 318



12 Sistemas Silvopastoriles Trópico Alto 304



11 Sistemas Silvopastoriles Trópico Bajo 280

EXPERIENCIAS AGROSAVIA



Lista de figuras

- **Figura 1.1.** Origen de los fertilizantes nitrogenados y fosfatados consumidos en Colombia, 2013-2017 38
- **Figura 2.1.** Descripción macroscópica de una colonia de *Azotobacter* sp. en medio de cultivo LG con azul de bromotimol 55
- **Figura 2.2.** Descripción macroscópica de una colonia de *Bacillus* sp. en medio de cultivo CASO 57
- **Figura 2.3.** Descripción macroscópica de una colonia de *Azospirillum* sp. en medio de cultivo DYGS 60
- **Figura 2.4.** Descripción macroscópica de una colonia de *Herbaspirillum* sp. en medio de cultivo DYGS 62
- **Figura 2.5.** Descripción macroscópica de rizobios 65
- **Figura 3.1.** Mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal y capacidades de las PGPB para facilitar la activación de estos mecanismos en la planta 82
- **Figura 3.2.** Mecanismos inorgánicos y orgánicos de solubilización de fosfatos por microorganismos 85
- **Figura 3.3.** Vías principales de biosíntesis de ácido indolacético (AIA) dependientes de triptófano en bacterias 90
- **Figura 4.1.** Efecto del estrés por metales pesados en plantas 121
- **Figura 4.2.** Efecto de los estreses por salinidad y déficit hídrico sobre el desarrollo de las plantas 125
- **Figura 4.3.** Modelo de la forma como una PGPB que produce ACC-desaminasa y AIA puede facilitar el crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés 127
- **Figura 5.1.** Procesos que dan lugar a la formación de nódulos por parte de rizobios en leguminosas 144
- **Figura 5.2.** Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por rizobios simbióticos (con leguminosas) y no simbióticos (con no leguminosas). 1. Mecanismos directos; 2. Mecanismos indirectos 140
- **Figura 6.1.** Precio de la urea, 2001-2021 161
- **Figura 6.2.** Etapas requeridas en el proceso de diseño y desarrollo de una formulación para un biofertilizante 167
- **Figura 6.3.** Control de calidad de *Rhizobium* sp. AC1 y *Agrobacterium pusense* AC10 171

| | |
|---|-----|
| ■ Figura 7.1. Inmovilización de dos microorganismos en el suelo | 184 |
| ■ Figura 7.2. Soluciones que ofrecen las microesferas a problemas de las macroesferas | 186 |
| ■ Figura 8.1. Proceso de registro de inoculantes en Colombia | 211 |
| ■ Figura 8.2. Evolución normativa sobre los inoculantes en Brasil | 213 |
| ■ Figura 10.1. Influencia de la inoculación y la coinoculación de AC1 y AC10 con diferentes dosis de urea en el crecimiento del cultivo de algodón | 260 |
| ■ Figura 10.2. Experimento en invernadero | 262 |
| ■ Figura 10.3. Altura de la parte aérea de las plantas de algodón | 264 |
| ■ Figura 10.4. Biomasa seca de la mota, la semilla y la fibra del cultivo de algodón (correspondiente a 50 motas) | 265 |
| ■ Figura 10.5. Rendimiento del cultivo de algodón (kg ha ⁻¹) | 266 |
| ■ Figura 10.6. Experimento establecido en campo | 268 |
| ■ Figura 10.7. Influencia de la inoculación de las cepas SP20, N8, N9, G56, G58 y B02 con roca fosfórica en el crecimiento del algodón | 272 |
| ■ Figura 10.8. Evaluación de bacterias solubilizadoras de fósforo en invernadero | 274 |
| ■ Figura 11.1. Sistema silvopastoril establecido en Agustín Codazzi (Cesar) | 283 |
| ■ Figura 11.2. Pastura de pasto guinea establecida en Agustín Codazzi (Cesar) | 285 |
| ■ Figura 11.3. Actividad de reducción de acetileno de las cepas aisladas de <i>Megathyrus maximus</i> | 287 |
| ■ Figura 11.4. Producción de indoles de las cepas aisladas de <i>M. maximus</i> | 287 |
| ■ Figura 11.5. Eucalipto establecido en el ssp en Agustín Codazzi (Cesar) | 289 |
| ■ Figura 11.6. Actividad de reducción de acetileno a etileno en diferentes aislamientos bacterianos de <i>Eucalyptus</i> sp. | 290 |
| ■ Figura 11.7. Producción de compuestos indólicos en diferentes bacterias aisladas del cultivo de <i>Eucalyptus</i> sp. | 291 |
| ■ Figura 11.8. Establecimiento de <i>Leucaena leucocephala</i> en el ssp en Agustín Codazzi (Cesar) | 292 |
| ■ Figura 11.9. Producción de compuestos indólicos en las cepas aisladas de <i>L. leucocephala</i> en los departamentos del Cesar y La Guajira | 294 |
| ■ Figura 11.10. Actividad de reducción de acetileno en las cepas aisladas de <i>L. leucocephala</i> en los departamentos del Cesar y La Guajira | 294 |

| | |
|---|-----|
| ■ Figura 11.11. Arreglo silvopastoril | 295 |
| ■ Figura 11.12. Nódulos en plantas de <i>L. leucocephala</i> | 299 |
| ■ Figura 12.1. <i>Acacia decurrens</i> en un sistema silvopastoril del Trópico Alto Colombiano | 307 |
| ■ Figura 12.2. Cepa RS04 en medio de cultivo YMA suplementado con rojo Congo | 308 |
| ■ Figura 12.3. Fijación biológica de nitrógeno de bacterias aisladas a partir de nódulos de <i>A. decurrens</i> | 309 |
| ■ Figura 12.4. Producción de compuestos indólicos en bacterias aisladas a partir de nódulos de <i>A. decurrens</i> | 310 |
| ■ Figura 12.5. Pradera de pasto kikuyo en el Trópico Alto Colombiano | 311 |
| ■ Figura 12.6. Plantas de <i>Trifolium pratense</i> inoculadas con cepas presuntivas de rizobios | 313 |
| ■ Figura 12.7. Cepa T88 | 314 |
| ■ Figura 12.8. Producción de compuestos indólicos en las cepas aisladas de <i>T. pratense</i> en Cundinamarca y Nariño | 316 |
| ■ Figura 13.1. Actividad de reducción de acetileno como indicador de la fijación biológica de nitrógeno de los aislamientos del Cesar | 323 |
| ■ Figura 13.2. Producción de compuestos indólicos por el aislamiento G58A, de La Guajira | 323 |
| ■ Figura 13.3. Planta de fríjol | 326 |
| ■ Figura 13.4. Gel de electroforesis, en agarosa, para análisis del gen 16S rARN de la cepa G58A | 326 |
| ■ Figura 13.5. Fríjol establecido en campo | 328 |
| ■ Figura 13.6. Producción de forraje verde y de heno de <i>Vigna unguiculata</i> con y sin inoculación con la cepa G58A | 329 |
| ■ Figura 13.7. Ganancia diaria de peso en novillos alimentados con pasto guinea cv. Tanzania, pasto guinea cv. Tanzania más heno de <i>V. unguiculata</i> inoculado con <i>Rhizobium</i> sp. G58A y sin inocular | 330 |
| ■ Figura 14.1. Producción de tomate durante un ciclo de cultivo | 339 |
| ■ Figura 14.2. Recuento de microorganismos totales (bacterias, hongos y actinobacterias) | 341 |
| ■ Figura 14.3. Evaluación de los tomates en poscosecha | 342 |

| | |
|---|-----|
| ■ Figura 15.1. Pérdida de viabilidad de tres prototipos de formulación (suspensiones acuosas) almacenados a 8 ± 2 °C y 18 ± 2 °C durante 4 meses | 352 |
| ■ Figura 15.2. Resultados del ensayo de reducción de acetileno (ARA) bajo condiciones de laboratorio | 355 |
| ■ Figura 15.3. Curvas de estabilidad acelerada de la cepa AC1 en dos soportes sólidos y a dos temperaturas diferentes | 356 |
| ■ Figura 15.4. Esquema de un impulsor tipo Rushton y sus relaciones geométricas características | 361 |
| ■ Figura 15.5. Estabilidad de los prototipos de formulación almacenados a 35 ± 2 °C | 365 |

Lista de tablas

| | |
|--|-----|
| ■ Tabla 1.1. Clasificación de algunos biofertilizantes | 35 |
| ■ Tabla 1.2. Limitaciones para el uso de biofertilizantes | 43 |
| ■ Tabla 3.1. Producción de ácidos orgánicos por bacterias solubilizadoras de fosfato | 84 |
| ■ Tabla 4.1. Funciones y localización celular de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos | 112 |
| ■ Tabla 6.1. Ejemplos de microorganismos con capacidad biofertilizante escalados | 165 |
| ■ Tabla 8.1. Comparación de los requisitos de calidad exigidos para los inoculantes biológicos en Colombia y Brasil | 215 |
| ■ Tabla 8.2. Comparación de los requisitos exigidos para las etiquetas de los inoculantes biológicos en Colombia y Brasil | 219 |
| ■ Tabla 9.1. Principios activos de los biofertilizantes registrados en Colombia | 237 |
| ■ Tabla 9.2. Principales empresas del mercado de biofertilizantes en el mundo | 238 |
| ■ Tabla 9.3. Empresas referentes del mercado de biofertilizantes y su portafolio | 239 |
| ■ Tabla 10.1. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de AC1 y AC10 | 256 |
| ■ Tabla 10.2. Síntesis de enzimas hidrolíticas | 257 |
| ■ Tabla 10.3. Compatibilidad de Monibac con los agroquímicos utilizados en el cultivo del algodón | 258 |
| ■ Tabla 10.4. Resultados de calidad de fibra en el cultivo de algodón | 267 |
| ■ Tabla 10.5. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de las cepas SP20 y B02 | 276 |
| ■ Tabla 11.1. Rendimiento de materia seca por hectárea en tres ciclos de evaluación | 297 |
| ■ Tabla 11.2. Producción de forraje de los componentes del sistema silvopastoril | 298 |

| | |
|--|-----|
| ■ Tabla 11.3. Altura, diámetro basal y diámetro a la altura del pecho (DAP) de <i>Eucalyptus tereticornis</i> inoculado y no inoculado | 300 |
| ■ Tabla 12.1. Caracterización de la promoción del crecimiento <i>in vitro</i> de las cepas 4K y 5B | 312 |
| ■ Tabla 12.2. Resultados de fijación biológica de nitrógeno (FBN) en las cepas aisladas de <i>Trifolium pratense</i> | 315 |
| ■ Tabla 13.1. Resultados de la evaluación de las variables agronómicas en planta después de la nodulación con aislamientos obtenidos a partir de muestras de suelo y nódulos | 325 |
| ■ Tabla 13.2. Calidad nutricional con fraccionamiento de proteínas para el heno, con y sin inoculación, en porcentaje | 330 |
| ■ Tabla 14.1. Tratamientos para la evaluación del biofertilizante Monibac en el cultivo de tomate bajo condiciones de invernadero | 337 |
| ■ Tabla 14.2. Variables asociadas a la respuesta de la planta | 338 |
| ■ Tabla 15.1. Tiempo de supervivencia de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ICA J01 y <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> ICA T13 (log UFC g ⁻¹) sobre dos tipos de turba Fuente: Munévar (1989) | 349 |
| ■ Tabla 15.2. Composición y características de los prototipos de formulación (suspensiones acuosas) a base de <i>B. japonicum</i> (J96) | 351 |
| ■ Tabla 15.3. Comparación de la producción de biomasa entre el medio de cultivo convencional y el medio Agrícola para <i>Rhizobium</i> sp. AC1 y <i>Agrobacterium pusense</i> AC10 | 355 |
| ■ Tabla 15.4. Condiciones de fermentación durante el desarrollo de la producción de <i>Rhizobium</i> sp. AC1 y <i>A. pusense</i> AC10 | 358 |
| ■ Tabla 15.5. Parámetros de eficiencia y cinéticos durante el desarrollo de la producción de <i>Rhizobium</i> sp. AC1 y <i>A. pusense</i> AC10 | 359 |
| ■ Tabla 15.6. Caracterización geométrica de los biorreactores de tanque agitado (STR) empleados para la estrategia de escalamiento para la fermentación de <i>Rhizobium</i> sp. AC1 y <i>A. pusense</i> AC10 | 360 |
| ■ Tabla 15.7. Comparación de los resultados obtenidos en el proceso de ajuste y escalamiento de la producción de <i>Rhizobium</i> sp. AC1 y <i>A. pusense</i> AC10 con respecto a la línea base | 363 |
| ■ Tabla 15.8. Tratamientos evaluados en la selección de prototipos de las cepas <i>Rhizobium</i> sp. AC1 y <i>A. pusense</i> AC10 bajo condiciones de laboratorio | 364 |
| ■ Tabla 15.9. Tiempo de almacenamiento teórico de los prototipos de formulación para alcanzar una concentración de 1 × 10 ⁸ UFC mL ⁻¹ a diferentes temperaturas | 367 |



Editores científicos

Ruth Rebeca Bonilla Buitrago

rbonilla@agrosavia.co

Orcid: 0000-0003-2542-0194

Google Scholar: Ruth Bonilla

Doctora en Ciencias Agrícolas y máster en Química Agrícola de la Universidad de Agricultura de Varsovia. Licenciada en Química y Biología de la Universidad de La Salle. Actualmente es investigadora Ph.D. sénior de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), donde es líder del grupo de investigación Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Ha formulado y desarrollado proyectos de investigación y transferencia nacionales e internacionales en el área de biofertilización. Posee más de 60 publicaciones en revistas de alto impacto y ha generado productos para el sector agropecuario: Monibac y el Álbum Élite de microorganismos caracterizados fenotípicamente y genotípicamente. Ha contribuido con la formación de recursos humanos a nivel de pregrado, maestría y doctorado. Es revisora de revistas científicas de Springer y Frontiers. Es integrante del Comité Científico de Porkcolombia.

Luz Estela González de Bashan

luz@bashanfoundation.org

Orcid: 0000-0002-1809-4469

Google Scholar: Luz de-Bashan

Doctora en Microbiología Ambiental y de Suelo de la Universidad Laval (Quebec, Canadá), máster en Sistemática de Microalgas de la Universidad Nacional de Colombia, y bióloga de la Pontificia Universidad Javeriana.

Es investigadora titular C y líder del Grupo de Microbiología Ambiental del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (México). Sus campos de investigación son la interacción entre las bacterias promotoras de crecimiento vegetal y las microalgas, la restauración de suelos degradados utilizando estas bacterias y el desarrollo de inoculantes sintéticos. Cuenta con 74 publicaciones en revistas de alto impacto y es miembro del Consejo Editorial de la revista *Biology and Fertility of Soils*, editora de sección en la revista *Plant and Soil* y editora asociada de la revista *Stresses*, de MDPI.

Raúl Osvaldo Pedraza

rpedraza@herrera.unt.edu.ar

Orcid: 0000-0002-1861-2860

Google Scholar: Raúl Osvaldo Pedraza

Doctor en Agronomía e ingeniero agrónomo. Profesor titular de cátedra en Microbiología Agrícola en la Facultad de Agronomía y Zootecnia (FAZ) de la Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Argentina, y profesor de Ecología del Suelo en la Maestría en Ciencias Agrarias de la misma facultad, de la que es, además, miembro titular del Consejo Directivo. Es director de la *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*. Es miembro del Comité Académico de la Maestría en Ciencias Agrarias, miembro del cuerpo docente del Doctorado en Bioquímica y exmiembro del Comité Académico del Doctorado en Ciencias Biológicas de la UNT. Es exmiembro del Comité Académico de la Maestría en Producción Animal de la UNT y la Universidad Nacional de Santiago del Estero. Es miembro de The Bashan Foundation y miembro honorario de The Asian PGPR Society for Sustainable Agriculture.

Los autores

Germán Andrés Estrada Bonilla

gaestrada@agrosavia.co

Orcid: 0000-0001-8742-5957

Google Scholar: German Estrada-Bonilla

Doctor en Agronomía (Suelos y Nutrición de Plantas) de la Escuela Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", de la Universidad de São Paulo. Es máster en Ciencias Agropecuarias (Fitotecnia) de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro y microbiólogo de la Pontificia Universidad Javeriana. Es investigador en el área de microbiología de suelos en AGROSAVIA y presidente de la Asociación Latinoamericana de Rizobiología (ALAR) en Colombia. Desarrolla proyectos en el área de suelo-microorganismo-planta-ambiente, buscando, específicamente, mejorar la eficiencia de la fertilización y modular la respuesta de los cultivos al estrés abiótico. Tiene experiencia en el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés) y residuos orgánicos en cultivos agroindustriales. Su objetivo es mejorar la competitividad de la agricultura en Colombia, utilizando la microbiología del suelo como eje de innovación.

Sergio Pardo Díaz

spardo@agrosavia.co

Orcid: 0000-0002-3873-1891

Google Scholar: Sergio Pardo Diaz

Máster en Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Javeriana y microbiólogo agrícola y veterinario de la misma universidad. Sus principales áreas de experiencia están enfocadas en microbiología de suelos, biorremediación y biología molecular relacionada con ecología microbiana. Actualmente se desempeña como investigador máster en el Centro de Investigación Tibaitatá de AGROSAVIA, donde desarrolla su investigación en la diversidad microbiana en suelos de cultivos de interés agrícola y en producción de enmiendas orgánicas para disminuir el impacto generado por la aplicación de fertilizantes de síntesis química.

Diana Carolina Mazo Molina

dcm286@cornell.edu

Orcid: 0000-0001-7507-4037

Google Scholar: Carolina Mazo-Molina

Doctora en Fitopatología de la Universidad de Cornell, máster en Ciencias Biológicas de la Universidad de los Andes y microbióloga industrial de la Pontificia Universidad Javeriana. Científica postdoctoral del Instituto Boyce Thompson asociado a la Universidad de Cornell en Ithaca, Nueva York. Actualmente, su investigación se enfoca en el estudio de los mecanismos moleculares de la interacción planta-patógeno, con énfasis en proteínas de virulencia bacteriana y genes de resistencia en plantas. Mediante el uso de herramientas de biología molecular y bioquímica, busca entender cómo el sistema inmune de las plantas responde ante el ataque de los microorganismos, y el uso de proteínas de resistencia como alternativa natural para la protección de cultivos de relevancia económica.

Daniel Fernando Rojas Tapias

dfrojas@agrosavia.co

Orcid: 0000-0002-4051-7907

Google Scholar: Daniel F. Rojas-Tapias

Doctor en Microbiología Molecular de la Cornell University, máster en Ciencias Biológicas de la Universidad de los Andes y microbiólogo industrial y matemático de la Pontificia Universidad Javeriana. Realizó su entrenamiento posdoctoral en el Programa de Enfermedades Infecciosas y Microbioma del Broad Institute of MIT and Harvard. Sus principales áreas de experticia son la microbiología, la interacción huésped-hospedero y la biología molecular. Actualmente se desempeña como investigador Ph.D. en el Centro de Investigación Tibaitatá de AGROSAVIA, donde enfoca su investigación en los aspectos moleculares de la interacción planta-microorganismo y en la bioprospección y aprovechamiento de la diversidad microbológica del suelo para la recuperación de suelos agrícolas impactados por estreses abióticos.

Luisa Fernanda Posada Uribe

luisaf_posada@javeriana.edu.co

Orcid: 000-0001-7051-9746

Google Scholar: Luisa Fernanda Posada Uribe

Doctora y máster en Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia e ingeniera de procesos de la Universidad Eafit, de Medellín. Es posdoctora en el área de evaluación de la microbiota de las plantas de banano Williams y Calcutta 4 con miras al desarrollo de bioproductos para el sector bananero. Tiene amplia experiencia en PGPB-PGPR, específicamente en *Bacillus*. Su trabajo doctoral fue "Promoción de crecimiento vegetal de *Bacillus subtilis* EA-CB0575, colonización rizosférica y potencial genómico y bioquímico". Trabajó en el desarrollo de bioinsumos para el sector bananero por diez años, en proyectos de la Universidad Eafit y Augura. Actualmente es docente de planta de la Pontificia Universidad Javeriana, sede Bogotá, en el Departamento de Ingeniería Industrial, donde trabaja en agricultura sostenible y proyectos de bioingeniería.

Andrés Eduardo Moreno Galván

aemoreno@agrosavia.co

Orcid: 0000-0002-9264-6663

Google Scholar: Andrés Eduardo Moreno Galván

Máster en Ciencias con énfasis en microbiología de la Universidad Nacional de Colombia y microbiólogo industrial de la Pontificia Universidad Javeriana. Cuenta con experiencia en investigación enfocada en la mitigación de estreses abióticos en plantas mediante bioestimulación bacteriana. Dentro de sus áreas de experiencia se encuentran microbiología, bioprospección de diversidad microbiana y fisiología vegetal de la interacción planta-microorganismo. En la actualidad, se desempeña como Investigador Máster en AGROSAVIA, Centro de Investigación Tibaitatá, adelantando proyectos enfocados en la mitigación de efectos del cambio climático en la agricultura mediante el estudio de la interacción suelo-planta-microorganismo-ambiente.

Marilyn Tatiana Santos Torres

msantost@unal.edu.co y msantos410@hotmail.com

Orcid: 0000-0001-7288-7913

Google Scholar: Marilyn Tatiana Santos Torres

Máster en Ciencias con énfasis en microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, especialista en Gerencia de Proyectos e ingeniera de producción biotecnológica de la Universidad Francisco de Paula Santander. Asesora empresas agroindustriales, ambientales e industriales en procesos de innovación y desarrollo tecnológico (EcoAgris S.A.S.). Se ha desempeñado como profesional de apoyo a la investigación y tesista de maestría en AGROSAVIA, jefe de producción en plantas de abonos orgánicos-minerales e industriales, gestora de proyectos en el manejo de residuos orgánicos agroindustriales y en iniciativas de proyectos investigativos. Sus áreas de investigación son la biotecnología agrícola, la microbiología del suelo y el mejoramiento de la nutrición vegetal.

Sandra Lucía Cortés Patiño

slcortesp@unal.edu.co

Orcid: 0000-0002-4054-4972

Google Scholar: Sandra Lucía Cortés Patiño

Máster en Biología de la Universidad Nacional de Colombia e ingeniera en Biotecnología de la Universidad Francisco de Paula Santander. Se ha desempeñado como profesional de apoyo a la investigación en AGROSAVIA, en el laboratorio de microbiología agrícola, durante siete años. Su área de estudio es la interacción planta-microorganismos, con énfasis en la regulación de las respuestas fisiológicas de las plantas a estreses mediante el uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Sus trabajos han sido realizados principalmente en gramíneas y leguminosas de uso común en alimentación animal.

Jonathan Alberto Mendoza Labrador

amendoza@agrosavia.co

Orcid: 0000-0002-5863-6365

Google Scholar: Jonathan Alberto Mendoza Labrador

Máster en Ciencias con énfasis en microbiología de la Universidad Nacional de Colombia e ingeniero en Biotecnología de la Universidad Francisco de Paula Santander. Actualmente es profesional de apoyo a la investigación en el Centro de Investigación Tibaitatá de AGROSAVIA. Cuenta con experiencia en la caracterización fenotípica y la formulación de bioproductos inmovilizados en microesferas de alginato a base de bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Carlos José Bécquer Granados

cjbecquerg@gmail.com

Orcid: 0000-0002-3330-0777

Google Scholar: Carlos J. Bécquer Granados

Doctor en Ciencias Biológicas con énfasis en ecología microbiana y máster en Ciencias Biológicas de la Universidad de la Habana. Máster en Ciencias Agrícolas del Instituto Zooveterinario de Járkov, Ucrania, e ingeniero zootecnista del mismo instituto. Investigador científico sénior y líder de grupo en el Instituto de Investigación de Pastos y Forrajes (Cuba). Tiene más de 20 años de experiencia en el área de ecología microbiana del suelo, con énfasis en la caracterización y uso de rizobacterias en agricultura como fuente de nitrógeno, compuestos promotores de crecimiento y tolerancia a factores de estrés. Su principal objetivo es aplicar combinaciones exitosas de microorganismos para el desarrollo de pastos y forrajes en ambientes hostiles. Es autor de publicaciones científicas en varias revistas indexadas.

Blanca Estela Romero López

bromero@cibnor.mx y blanca.er.lopez@gmail.com

Orcid: 0000-0001-6844-6293

Google Scholar: Blanca Lopez

Doctora y máster en Uso, Manejo y Preservación de Recursos Naturales y licenciada en Agronomía. Posdoctorada en interacción bacteria-microalga. Cuenta con experiencia en el estudio de interacciones entre algas o plantas y bacterias promotoras de crecimiento vegetal, las cuales ha abordado mediante aproximaciones microbiológicas, eco-fisiológicas y moleculares. Se desempeña como Investigador asociado al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (México) y The Bashan Institute of Science (USA), realizando investigación encaminada a restauración de suelos asistida por plantas y su microbioma nativo.

Getzabeth González Gutiérrez

getzabethgg@gmail.com

Orcid: 0000-0003-1608-9866

Doctora en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, máster en Uso y Manejo de Recursos Naturales del Centro de Investigaciones

Biológicas del Noroeste (México) y licenciada en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana (México). Actualmente se desempeña como investigadora asociada del Grupo de Microbiología Ambiental del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, donde realiza investigación dirigida al estudio del microbioma asociado a manglares y su papel para fines de restauración.

Andrés Díaz García

adiaz@agrosavia.co

Orcid: 0000-0002-8638-7968

Google Scholar: Andrés Díaz-García

Máster en Ingeniería Bioquímica e ingeniero químico de la Universidad Nacional de Colombia. Cuenta con veinte años de experiencia investigativa en AGROSAVIA; su trabajo científico abarca el diseño de medios de cultivo, la estandarización y optimización de procesos de fermentación, el análisis de operaciones unitarias y el modelamiento y diseño de experimentos a diferentes escalas. Actualmente se desempeña como investigador máster asociado del área de fermentaciones líquidas en la Planta Piloto de Bioproductos de AGROSAVIA, con énfasis en la estandarización y escalamiento de bioprocesos a nivel piloto. Ha colaborado como docente de posgrado en el área de diseño de bioprocesos en la Universidad de La Sabana y la Universidad Militar Nueva Granada, y ha publicado artículos científicos en revistas especializadas a nivel nacional e internacional.

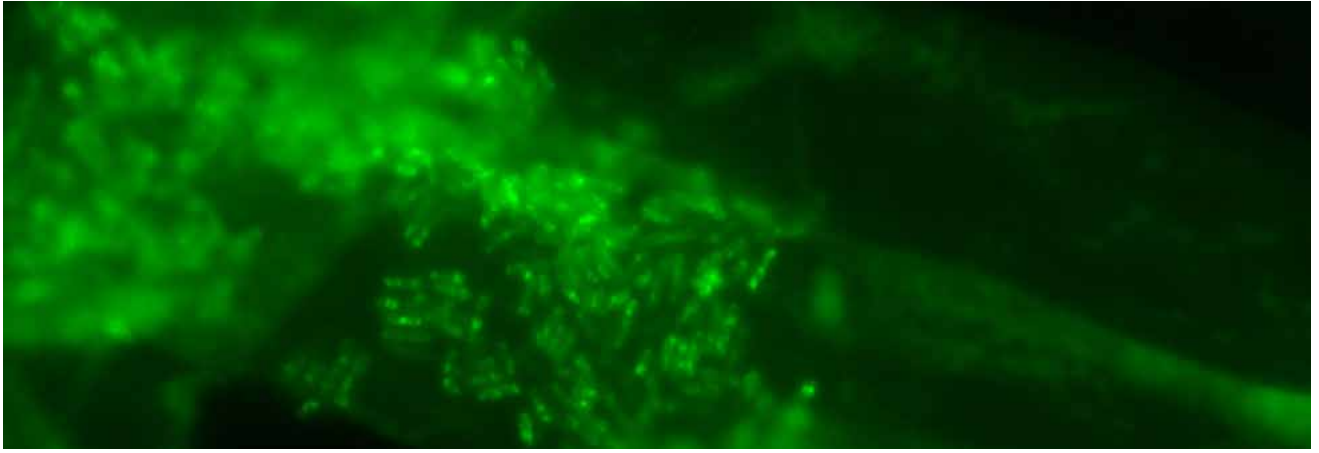
Martha Isabel Gómez Álvarez

mgomeza@agrosavia.co

Orcid: 0000-0003-4919-2747

Google Scholar: Martha Isabel Gómez Álvarez

Investigadora Ph.D. sénior con un doctorado en Bioquímica y Farmacia, una maestría en Formulación de Liposomas y especializaciones en Gerencia de Producción, Costos y Mercadeo. Tiene más de 25 años de experiencia en diseño, desarrollo, escalado, registro, mercadeo y transferencia de tecnología de bioproductos agrícolas y pecuarios. De 2001 a 2007 trabajó en Newbiotechnic España como responsable de producción de agentes de control biológico. Desde 2008 trabaja en AGROSAVIA, donde ha desarrollado proyectos de investigación en procesos productivos mediante fermentación sólida y líquida, diseño de formulaciones sólidas y líquidas (polvos, gránulos, suspensiones,



emulsiones y microencapsuladas) y escalado de procesos de fabricación y registro de bioproductos (bioplaguicidas, biofertilizantes y probióticos). Tiene experiencia en la producción y formulación de bacterias anaerobias y aerobias, hongos antagonistas y virus entomopatógenos. Actualmente se desempeña como directora del área de vinculación de AGROSAVIA.

Ginna Milena Quiroga Cubides

gquiroga@agrosavia.co

Orcid: 0000-0003-2138-2776

Google Scholar: Ginna Quiroga-Cubides

Máster en Microbiología Avanzada de la Universidad de Barcelona e ingeniera química de la Universidad Nacional de Colombia. Se enfoca en las áreas de biotecnología industrial y ambiental. Es integrante del grupo de investigación Bioproductos y Bioprocesos Agropecuarios, de AGROSAVIA, e investigadora máster de la corporación. Tiene experiencia en formulación, planeación y desarrollo de proyectos de base biotecnológica, operaciones unitarias aplicadas a la producción de bioinsumos e implementación de estrategias para la optimización de la productividad. Ha trabajado en el diseño de experimentos para la producción masiva (medios de cultivo en fermentación líquida y sólida), separación, recuperación y formulación de microorganismos mediante el análisis de procesos y operaciones unitarias, y en desarrollo e implementación de estrategias de escalamiento para procesos de fermentación y formulación.

Erika Paola Grijalba Bernal

egrijalba@agrosavia.co

Orcid: 0000-0001-7385-3408

Máster en Ciencias Biológicas, con énfasis en Microbiología, de la Universidad de los Andes y química farmacéutica de la Universidad Nacional de Colombia. Es investigadora máster sénior de AGROSAVIA, en el Departamento de Bioproductos. Cuenta con experiencia en diseño y desarrollo de productos biológicos a base de bacterias y hongos para el control de plagas agrícolas, biofertilizantes y nutrición y salud animal. Ha sido autora de varios artículos en revistas indexadas y capítulos de libro.

Mauricio Camelo Rusinque

mcamelo@agrosavia.co

Orcid: 0000-0001-8733-6655

Google Scholar: Mauricio Camelo Rusinque

Máster en Biología Aplicada de la Universidad Militar y microbiólogo industrial de la Pontificia Universidad Javeriana, se desempeña como investigador máster en el Centro de Investigación Tibaitatá de AGROSAVIA. Cuenta con 14 años de experiencia en investigación y desarrollo de bioproductos a base de bacterias promotoras del crecimiento vegetal. También posee amplia y reconocida experiencia en la formulación y ejecución de proyectos de investigación nacionales e internacionales que han tenido como objetivo demostrar la eficiencia y eficacia de los biofertilizantes en diferentes cultivos de interés agroindustrial.

Juan Pablo Hernández

jphernandezs@unbosque.edu.co

Orcid: 0000-0003-1175-0109

Google Scholar: Juan Pablo Hernandez

Máster en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, del Instituto Politécnico Nacional (México), y biólogo de la Pontificia Universidad Javeriana. Actualmente se desempeña como docente y coordinador del Laboratorio de Investigaciones de Biología (Inbibo), del programa de Biología de la Universidad El Bosque. Sus investigaciones se han centrado en el uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal con fines ambientales y para el tratamiento terciario de las aguas residuales domésticas, mediante el uso de la bacteria y microalgas inmovilizadas en esferas de alginato. También se interesa en la búsqueda de microorganismos en suelos de páramo con fines biotecnológicos para la recuperación, restauración y conservación de suelos de alta montaña, así como en el desarrollo y estandarización de técnicas de extracción de ADN para la identificación molecular y como aporte al código de barras de la vida (*DNA barcode*) de ejemplares preservados en museos. Sus líneas de investigación requieren del manejo de herramientas moleculares, como extracción, cuantificación y secuenciación de ADN y técnicas de FISH, DGGE, PCR de punto final y PCR en tiempo real, y técnicas en microbiología, como siembra en medios líquidos y sólidos, mantenimiento y conservación de bacterias y pruebas bioquímicas para la identificación y reconocimiento de microorganismos.

Manuel Moreno Legorreta

legoreta04@cibnor.mx

Google Scholar: Manuel Moreno Legorreta

Máster en Ciencias, especialista en Manejo de Recursos Marinos y licenciado en Biología Marina. Tiene amplia experiencia en bioinoculantes de segunda generación a base de bacterias promotoras de crecimiento vegetal para restauración de suelos de zonas áridas, reforestación de desiertos, biorremediación de aguas contaminadas y manipulación genética de *Azospirillum* para implante del gen *gfp*. Además, trabaja con biomarcadores en organismos

marinos sujetos a contaminación, en microbiología marina, en manejo de la calidad de agua y en alimento vivo en acuicultura. Ha participado en múltiples proyectos de aplicación de biofertilizantes. Es autor de varias publicaciones, en conjunto con el Grupo de Microbiología Ambiental del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, en revistas de alto impacto.

Radhakrishna Prabhu

prabhucochin@gmail.com

Google Scholar: M. Prabhu

Máster en Microbiología Agrícola de la Universidad Agrícola de Tamil Nadu (India). Después de más de una década de trabajo en el Servicio de Investigación Agrícola del Consejo Indio de Investigación Agrícola (ICAR), el Mtr. Prabhu ha estado trabajando en TerraBioGen Technologies (Canadá) como científico investigador principal. Sus principales intereses de investigación incluyen el valor agregado a los desechos orgánicos utilizando tecnologías microbianas, el aislamiento, caracterización y comercialización de bacterias benéficas para plantas difíciles de cultivar y el desarrollo de métodos de cultivo en masa microbianos simples y de bajo costo, entre otros.

Gregorio Salomón Zambrano Moreno

gzambrano@agrosavia.co

Orcid: 0000-0001-5939-0902

Google Scholar: Gregorio Zambrano Moreno

Máster en Economía con énfasis en Econometría y Economía Cuantitativa de la Universidad Externado de Colombia, especialista en Estadística Aplicada y economista de la Universidad Militar Nueva Granada. Su experiencia en investigación es en el área de socioeconomía de evaluación de impacto y adopción de tecnologías agropecuarias. Desde el 2014 trabaja en la Dirección de Planeación y Cooperación Institucional de AGROSAVIA en la Oficina de Seguimiento y Evaluación. Actualmente, pertenece al equipo base que lidera la Estrategia de Evaluación de Impacto y Balance Social de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.

Fabiola Moreno Martínez

fabimorenomartinez@gmail.com

Orcid: 0000-0003-2466-7654

Google Scholar: Fabiola Moreno Martínez

Bióloga de la Universidad Nacional de Colombia. Desde 2014 trabaja en la regulación de bioinsumos de uso agrícola y en el registro de empresas y productos, como profesional de registro en la Dirección Técnica de Inocuidad e Insumos Agrícolas del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), donde desarrolla actividades de revisión de protocolos de pruebas agronómicas, auditoría a las pruebas en campo, validación de resultados de estabilidad de productos y aprobación de procesos e instalaciones de las empresas. Lidera los procesos de actualización de las definiciones y normativas nacionales y regionales sobre el registro y comercialización de bioinsumos de uso agrícola.

Diana Corina Zambrano Moreno

corina_zambrano@yahoo.es

Orcid: 0000-0002-0089-2593

Google Scholar: DC Zambrano-Moreno

Doctora en Ciencias Naturales del Tecnológico de Costa Rica, máster en Diseño y Gestión de Procesos de la Universidad de La Sabana, y microbióloga industrial de la Pontificia Universidad Javeriana. Desde 2018 ejerce como vicepresidenta ejecutiva de Porkcolombia, donde fue directora de Investigación y Transferencia de Tecnología durante seis años. Además de sus cargos en el gremio porcicultor, se desempeñó como directora ejecutiva del Centro de Innovación de la Floricultura Colombiana (Ceniflores), asesora del subdirector general de Colciencias y especialista en tecnología e innovación en la oficina en Colombia del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA); además, trabajó en instituciones como AGROSAVIA, así como en proyectos de crédito del Banco Mundial y el Banco Interamericano de Desarrollo, entre otros.

Diana Marcela León Moreno

mdleon@agrosavia.co

Es especialista en Producción y Logística de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas e ingeniera industrial

de la Universidad Nacional de Colombia, con 9 años de experiencia en AGROSAVIA, donde ha trabajado, junto con el Departamento de Bioproductos, en proyectos de investigación en actividades asociadas al análisis de mercado y al manejo de proyectos comerciales de productos que tienen registro. Actualmente se desempeña como profesional en el Departamento de Desarrollo de Negocios, donde maneja los proyectos comerciales del Departamento de Bioproductos.

Erika Andrea Alarcón Torres

ealarcon@agrosavia.co

Máster en Administración de Negocios, especialista en Gerencia de Empresas y microbióloga industrial de la Pontificia Universidad Javeriana. Tiene 10 años de experiencia en AGROSAVIA en diseño, desarrollo, registro y mercadeo de bioproductos, en ejecución y análisis operativos y financieros de proyectos de I+D+i en temas relacionados con las demandas del sector agropecuario y en proyectos comerciales y diseño e implementación de estrategias de mercado y modelos de negocio para la transferencia y adopción de tecnologías agropecuarias. Actualmente se desempeña como asesora sénior de la Dirección de Vinculación.

Felipe Andrés Romero Perdomo

fromero@agrosavia.co

Orcid: 0000-0002-4277-1925

Google Scholar: Felipe Romero-Perdomo

Máster en Proyectos de Desarrollo Sostenible de la Universidad EAN y microbiólogo industrial de la Pontificia Universidad Javeriana. Tiene más de 8 años de experiencia en investigación y desarrollo en bioprospección agrícola en cultivos como algodón, arroz y maíz y en sistemas silvopastoriles para la generación de bioproductos. Cuenta con conocimientos en microbiología de suelos, nutrición vegetal, biotecnología industrial y economía circular. Es apasionado por la gestión de ciencia y tecnología, la sostenibilidad ambiental, la biodiversidad y recursos naturales, los servicios ecosistémicos y la conversión de residuos de biomasa en energía. Se interesa en promover la bioeconomía como modelo de desarrollo sostenible.

Ever Mauricio Barón Guaquetá

ebaron@agrosavia.co

Tecnólogo en Producción Agrícola y técnico en Cultivos Agrícolas. Tiene más de 30 años de experiencia en bioprospección de microorganismos con potencial biotecnológico y en el desarrollo de estrategias sostenibles para el manejo integrado del suelo. Cuenta con conocimientos en procesos de producción de biofertilizantes en laboratorio y en establecimiento y muestreo de experimentos de invernadero y campo tanto en AGROSAVIA como en fincas de productores. Cuenta con experiencia en el manejo agronómico de cultivos como algodón, soya, maíz, arroz, alverja, frijol y pastos de clima cálido como kikuyo, ryegrass y lupino, y en pastos de clima cálido y de clima frío.

Belisario Antonio Roncallo Fandiño

baroncallo@agrosavia.co

Orcid: 0000-0002-5018-1474

Candidato a doctor en Ciencias Agropecuarias de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey (Cuba), máster en Zootecnia de la Universidade Federal de Viçosa (Brasil) y médico veterinario y zootecnista de la Universidad de Caldas. Cuenta con amplia experiencia en implementación, desarrollo y análisis de investigaciones relacionadas con sistemas silvopastoriles para alimentación bovina y caprina, lo cual se ve reflejado en su producción científica.

Paola Jimena Criollo Campos

pcriollo@agrosavia.co

Orcid: 0000-0002-8623-2536

Google Scholar: Paola Jimena Criollo Campos

Candidata a máster en Ciencias Ambientales de la Universidad Jorge Tadeo Lozano y bióloga de la Universidad del Tolima. Actualmente se desempeña como profesional de apoyo a la investigación en el Banco de Germoplasma de Microorganismos, en el Centro de Investigación Tibaitatá de AGROSAVIA. Cuenta con amplia experiencia en el aislamiento, conservación y descripción de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno tipo rizobios y en la determinación enzimática de parámetros de calidad del suelo. Está capacitada en formulación y

ejecución de proyectos de investigación enfocados en mejorar las condiciones del agro colombiano.

Lady Rocío Molano Chávez

lmolano@agrosavia.co

Orcid: 0000-0002-8640-4051

Administradora de empresas de la Universidad Minuto de Dios y técnica en Producción Agropecuaria del Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA). Actualmente se desempeña como profesional de apoyo a la investigación en AGROSAVIA. Cuenta con experiencia en el seguimiento administrativo y ejecución presupuestal de proyectos de investigación a nivel nacional y de cooperación técnica internacional asociados al uso de herramientas biotecnológicas para el desarrollo de biofertilizantes. Tiene conocimientos en redacción científica, elaboración de inventarios de colecciones bacterianas, montajes experimentales en laboratorio-invernadero-campo, revisión de artículos sobre bacterias promotoras de crecimiento vegetal y procesos de obtención de registros ante el ICA.

Germán Orozco González

germanorozco@unicesar.edu.co

germanorozcog@hotmail.com

Especialista en Pedagogía Ambiental e ingeniero agrónomo de la Universidad del Tolima. Tiene experiencia en manejo de cultivos semestrales, de frutales y hortalizas. Se desempeña como director de la Unidad Municipal de Asistencia Técnica Agropecuaria (Umata) de Aguachica, Cesar; como docente de la Universidad Popular del Cesar, también de Aguachica, y como productor agropecuario.

Andrea del Pilar Villarreal Navarrete

avillarreal@agrosavia.co

Orcid: 0000-0001-9580-6936

Google Scholar: Andrea del Pilar Villarreal-Navarrete

Máster en Ciencias Agrarias, línea de investigación en fisiología de cultivos e ingeniera agrónoma de la Universidad Nacional de Colombia. Su experiencia profesional está dirigida al análisis fisiológico de la interacción planta-microorganismos (patogénicos y simbiontes). Actualmente es investigadora máster del C.I. Tibaitatá de AGROSAVIA.

Ingrid Marcela Preciado Monguí

ipreciado@agrosavia.co

Orcid: 0000-0002-9344-1619

Google Scholar: Ingrid Marcela Preciado Monguí

Estudiante de la Maestría en Ciencias Agrarias con énfasis en Fisiología de Cultivos, e ingeniera agrónoma de la Universidad Nacional de Colombia. Se desempeña como profesional de apoyo a la investigación y trabaja en producción de semilla prebásica de papa en el Plan Nacional de Semilla y en el Plan de Vinculación de Papa, en el Centro de Investigación Tibaitatá de AGROSAVIA. Tiene más de 15 años de experiencia en manejo integrado del cultivo de papa, y ha trabajado en formulación y ejecución de proyectos de investigación participativa en sistemas productivos y de transferencia de tecnología de papa y hortalizas.

Marco Steve Suárez Estrada

msuarez@agrosavia.co

Orcid: 0000-0002-7649-0128

Biólogo de la Universidad INCCA de Colombia. Su experiencia profesional se ha centrado, desde un principio, en AGROSAVIA, donde realizó sus prácticas profesionales y su trabajo de grado. En 2015 se vinculó como profesional de apoyo a la investigación y ha colaborado con proyectos de cultivo *in vitro* de plantas, con ensayos de manejo de tomate en invernadero por medio de la evaluación de estrategias de fertilización e inoculación de microorganismos y con procesos de elaboración de compostajes.

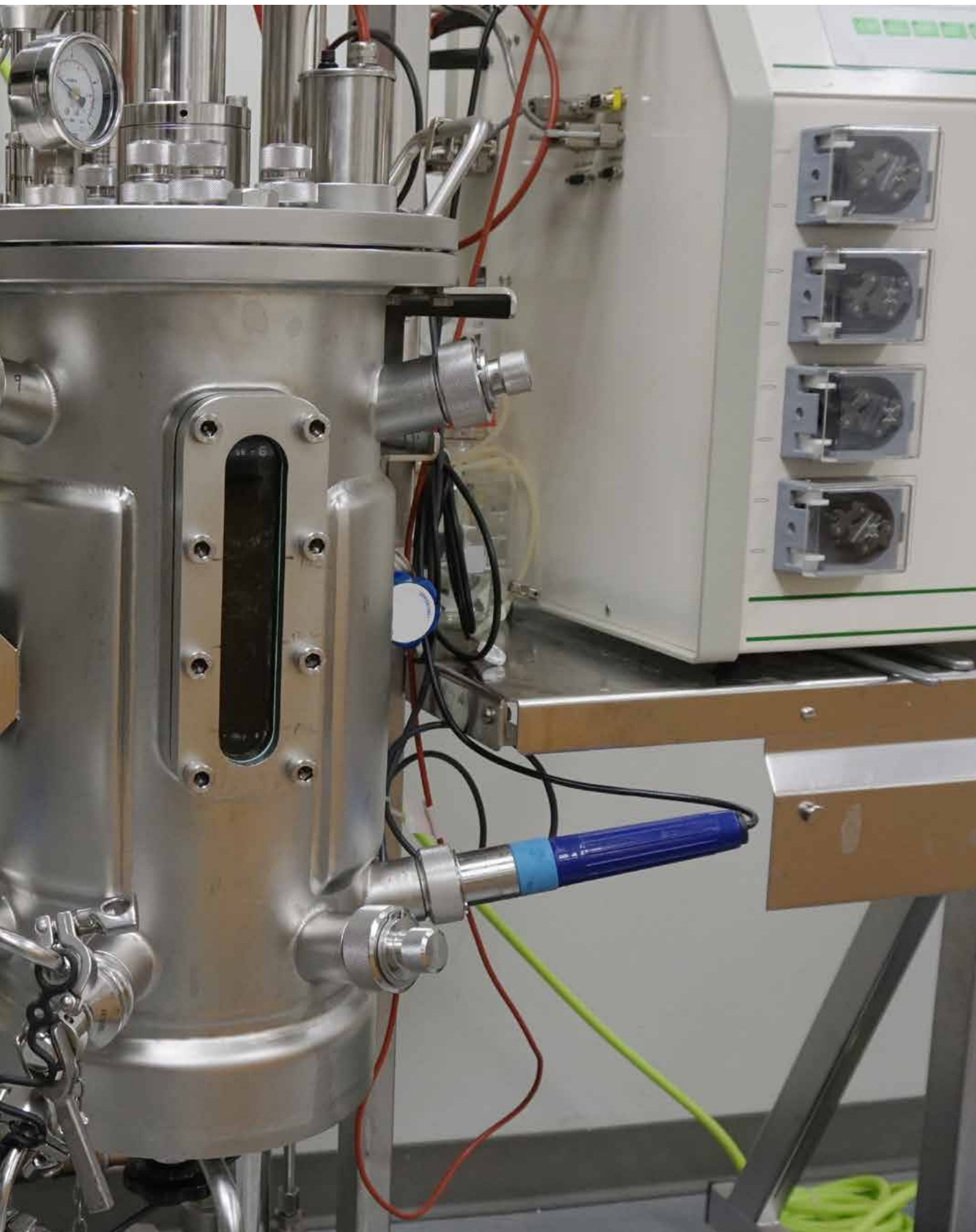
María Margarita Ramírez Gómez

mmramirez@agrosavia.co

Orcid: 0000-0002-7407-7321

Doctora en Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, máster en Studies of Genetic Variation of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii de la University of Wales e ingeniera agrónoma de la Universidad Nacional de Colombia. Empezó su carrera profesional como investigadora del Programa de Suelos en el ICA (1983-1993) y después llegó a AGROSAVIA, donde se ha desempeñado como coordinadora del Programa de Manejo Integrado de Suelos y Aguas (1994-1999), coordinadora del Programa de Recursos Biofísicos (1999-2006), investigadora máster principal (2006-2015) y, actualmente, como investigadora Ph.D. sénior. Su áreas de experiencia son el manejo integrado de suelos y aguas, los biofertilizantes y el impacto económico, social y ambiental de las tecnologías.





Agradecimientos

“El significado de la vida es descubrir tu don, el propósito de la vida es regalarlo.”
Pablo Picasso

Cuando hago un balance tan maravilloso y de tantos logros sobre lo que han sido estos treinta y tres años, desde que decidí seguir mi vocación científica, no puedo menos que volver la mirada agradecida a tantas entidades y personas que lo han hecho posible.

Fui feliz contribuyendo al avance científico del país. Fui feliz ayudando a resolver problemas en busca de un futuro más prometedor para Colombia.

Agradezco al Instituto Colombiano Agropecuario, a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria y a AGROSAVIA por apoyar y permitir mi realización como investigadora al servicio del sector agropecuario del país. A la Escuela de Agricultura de Varsovia donde me formé y bajo la dirección científica del profesor Stanislaw Moskal aprendí unas de las lecciones más eficaces para tener éxito en la investigación, que son la humildad y la ética, normas esenciales y no negociables.

Asimismo, desde el alma, agradezco a mis padres y hermanos por mantener la unión de la familia y de esta manera procurar un ambiente donde todo estudio, da frutos. Desde mi espíritu con mucha gratitud a mi esposo, hijos y nieto, por tolerar y contribuir pacientemente con mis largas faenas de labor incluyendo fines de semana, porque su comprensión fue necesaria y complementaria en los logros obtenidos.

Guardo inmenso cariño por personas que fueron importantes en mi desarrollo profesional y que ya no están, como el doctor Rene Novo, a quien destaco por su amistad y apoyo al iniciar las investigaciones sobre biofertilización; también el doctor Yoav Bashan, quien me enseñó a interrogar, a escuchar y a buscar la solución a muchos problemas del sector agropecuario en la microbiología de suelos; y a Katia Teixeira. Todos ellos me precedieron como investigadores convencidos de que mediante la ciencia y la tecnología se pueden solucionar problemas tangibles, como es el costo de los fertilizantes, rubro que hace insostenibles muchos sistemas de producción de interés económico. Paz y amor en sus tumbas.

No puede faltar el reconocimiento a los grupos de investigación de La Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria Agrobiología y Medio Ambiente (EMBRAPA), con los doctores Vera y José Ivo Baldani, Segundo Urquiaga e Itamar Soares de Melo. Universidad de Sao Paulo ESALQ. con la doctora Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso. Microbiología Ambiental en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C (CIBNOR) en México. A la red DIMIAGRI financiada por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), que contó con investigadores en siete países, con quienes impartimos capacitaciones



a estudiantes en cada región, para fortalecer el recurso humano y a la Asociación Latinoamericana de Rizobiología (ALAR). De esta manera crecimos como equipo ya que hicieron posible ampliar la visión de la línea de investigación de biofertilización, que además fue clave para lograr el objetivo del grupo Sistemas Agropecuarios Sostenibles. A todos ellos agradezco su paciencia y contribución sin la cual no hubiera sido posible generar tecnologías de impacto y de excelente calidad para el sector agropecuario colombiano.

Tuvieron que ver con los logros de los resultados la financiación de proyectos por parte del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), La Agencia Presidencial de Cooperación Internacional de Colombia (APC), La Agencia Brasileña de Cooperación (ABC), La Agencia Mexicana de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AMEXCID), contando siempre con el apoyo de Andrea Bernal, que es una funcionaria ejemplar y siempre con un sentido de pertenencia para mejorar la calidad de vida de los productores. Del mismo modo, las gobernaciones del Cesar y de Cundinamarca; Confederación Colombiana del Algodón (Conalgodón), Unidad Municipal de Asistencia Técnica Agropecuaria (UMATA) de Aguachica, y al doctor

Carlos Brigard por su aporte y experiencia al sector algodonero del país.

Dubys Alarcón, Edelberto Maestre, Lucy López y Stella Mendieta, me acompañaron, me colaboraron e hicieron posibles resultados tangibles con reconocimiento social, principalmente por los productores algodoneros y ganaderos.

Finalmente, en cuanto a la parte de edición, este libro no hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de Astrid Verónica Bermúdez, ella siempre en busca de la excelencia y Liliana Gaona, editoras de Agrosavia. Hago especial mención a los revisores Vera Lucía Baldani y Antonio Miranda por sus valiosos aportes. Agradezco al corrector de estilo y a la Editorial Punto Aparte por el diseño y el arte, de esta manera ellos le dieron realce e importancia al contenido del libro. Por último, expreso mi gratitud a nuestro Director Ejecutivo Jorge Mario Díaz Luengas, al doctor Juan Lucas Restrepo, a Rodrigo Martínez Sarmiento director de investigación y a Juan Diego Palacio director del C.I. Tibaitatá, por su respaldo incondicional a esta obra.

Memorias de la investigadora Ruth R. Bonilla

Reconocimientos

Capítulo 10

Influencia bacteriana sobre el desarrollo del algodón

Caso de estudio Agrosavia bajo condiciones de campo: Inoculante microbiano que reduce la fertilización mineral nitrogenada para la producción de algodón.

Colaboradores: Iván Javier Pastrana, Buenaventura Monje, José Gregorio Morales, Jorge Leonardo Abril Castro, Jorge Mario del Toro Aparicio.

Caso de estudio Agrosavia bajo condiciones de invernadero: Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias fosfato solubilizadoras sobre *Gossypium hirsutum*

Colaboradores: José Isidro Beltrán Medina, María Denis Lozano Tovar

Capítulo 11

Aislamiento y caracterización de cepas de *Azospirillum* sp. con potencial biofertilizante en pasto guinea (*Megathyrus maximus* jacq) en el Valle del Cesar”

Tomado y adaptado de: Diana María Cárdenas Caro, María Fernanda Garrido Rubiano, Vera Lucia Divan Baldani.

Aislamiento y caracterización de bacterias Fijadoras de Nitrógeno asimbióticas asociadas a *Eucalyptus* sp. en el municipio de Agustín Codazzi, Cesar.

Colaboradores: Dolly Melissa Obando Castellanos, Ludy Beatriz Burgos Zabala, María Fernanda Garrido Rubiano

Selección de cepas nativas de bacterias diazotróficas simbióticas, asociadas a *Leucaena leucocephala* WIT (LAM.) en el Valle del Cesar y La Guajira.

Colaboradores: Nancy Jackeline Sánchez Sandoval

Uso de biofertilizantes como facilitadores biológicos en sistemas silvopastoriles en el Caribe Seco Colombiano

Colaboradores: Vera Lucia Divan Baldani, Segundo Urquiaga

Capítulo 12

Aislamiento, selección y caracterización fenotípica de rizobios nativos asociados a *Acacia decurrens* en cuatro municipios de Cundinamarca (Colombia).

Colaboradores: María Fernanda Garrido Rubiano

Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense

Colaboradores: Dolly Melissa Obando Castellanos, Leonardo Sánchez Matta,

Aislamiento, selección y caracterización fenotípica de bacterias simbióticas asociadas a Trébol rojo (*Trifolium pratense*) en el Trópico Alto Colombiano.

Colaboradores: Angie Vanessa Osorio Olivos, Natalia Hincapie Escobar

Capítulo 13

Aislamiento y caracterización de rizobios asociados a *Vigna unguiculata* en el Valle del Cesar y la Guajira

Colaboradores: María Fernanda Garrido Rubiano, Jonathan Alberto Mendoza Labrador

Inoculación de *Vigna unguiculata* con cepas nativas de rizobios para evaluar la ganancia en peso de terneros de levante.

Colaboradores: José Edwin Mojica Rodríguez, Edwin Castro Rincón, María Fernanda Garrido Rubiano



Prólogo

Actualmente es cada vez más importante ajustar los sistemas productivos para que sean ambientalmente sostenibles y más viables económicamente, teniendo en cuenta el crecimiento acelerado de la población mundial.

Hace unas décadas, el uso de fertilizantes de síntesis química se vio como una gran solución para la intensificación de la producción agrícola, pero hoy, debido a sus efectos negativos sobre el medio ambiente y la salud humana, además de sus elevados costos de elaboración, es apremiante la necesidad de encontrar alternativas para la fertilización de los cultivos o, por lo menos, para reducir el uso de los fertilizantes químicos. Por esta razón, muchos investigadores empezaron a centrar sus estudios en una de esas alternativas: la biofertilización; lo han venido haciendo diversas instituciones en todo el mundo, y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), a la cabeza de este proceso en Colombia, no ha sido la excepción.

Es por esto que los profesionales Ruth Rebeca Bonilla Buitrago (AGROSAVIA, Colombia), Luz Estela González de Bashan (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México) y Raúl Osvaldo Pedraza (Universidad Nacional de Tucumán, Argentina), han editado (y escrito) *El papel de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal en sistemas de agricultura sostenible*. Su objetivo es mostrar, basados en su experiencia en diversas investigaciones dentro de la corporación, el papel que estas bacterias pueden desempeñar en la promoción del crecimiento de los cultivos de importancia económica para el país, y lo hacen por medio de quince capítulos que me permito describir a continuación:

En el primer capítulo, titulado “Los biofertilizantes y su relación con la sostenibilidad agrícola”, Ruth Rebeca Bonilla Buitrago, Germán Andrés Estrada Bonilla y Raúl Osvaldo Pedraza nos cuentan que las actuales estrategias de manejo de suelos dependen principalmente de la aplicación de fertilizantes inorgánicos de síntesis química, que, cuando son utilizados inapropiadamente, constituyen una seria amenaza para la salud humana y ambiental. En contraste, los biofertilizantes se han destacado como una alternativa para aumentar tanto la fertilidad del suelo como la producción de los cultivos. Así, el uso de microorganismos benéficos como biofertilizantes se ha vuelto sumamente importante para los sistemas productivos, debido a que son amigables con el medio ambiente y sostenibles en el tiempo.

Los autores buscan con este capítulo revisar el papel de los biofertilizantes en la agricultura sostenible, así como generar conocimiento para los productores y profesionales vinculados a la agricultura, para lo cual tratan aspectos generales y la clasificación de los biofertilizantes; hacen una comparación entre los fertilizantes de síntesis química y los biológicos; abordan la rizósfera como zona de interacciones entre las plantas, el suelo

y los microorganismos; describen los microorganismos utilizados para los biofertilizantes, y muestran sus ventajas y desventajas.

En el capítulo 2, “Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: filogenia, microbioma y perspectivas”, Sergio Pardo Díaz, Diana Carolina Mazo Molina y Daniel Fernando Rojas Tapias generalizan el concepto de asociación entre las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) y los cultivos de interés, para hablar de la composición del microbioma total de la planta. Este microbioma se define como la colección de microorganismos que habitan la superficie o el interior de las plantas, y su composición se estudia mediante técnicas de secuenciación masiva de ADN. Estas PGPB, las cuales hacen parte del microbioma de la planta, no se encuentran agrupadas filogenéticamente; no obstante, la mayoría pertenece al filo Proteobacteria. Los autores describen las características fisiológicas y genéticas de algunas de las PGPB más relevantes, y abordan las perspectivas en el estudio de la biología y ecología de estos organismos, así como la importancia de la comprensión de estos mecanismos para la formulación de nuevas estrategias y la optimización de las tecnologías existentes de promoción del crecimiento vegetal con PGPB. Finalmente, se hace un paralelo con el conocimiento que se tiene sobre uno de los fitopatógenos más estudiados, *Pseudomonas syringae*, y se establecen los campos de acción en los que debemos enfocarnos para entender en detalle la interacción entre las PGPB y las plantas, a un nivel mecanístico, y así establecer cómo la planta puede diferenciar entre unos y otros microorganismos a nivel molecular.

En el tercer capítulo, “Mecanismos de promoción de crecimiento por bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB)”, Luisa Fernanda Posada Uribe, Andrés Eduardo Moreno Galván, Marilyn Tatiana Santos Torres y Germán Andrés Estrada Bonilla presentan un acercamiento a los mecanismos de acción que las bacterias promotoras de crecimiento llevan a cabo en la planta con el fin de mejorar el desarrollo y la sanidad de los cultivos. Para ello, el capítulo inicia con una breve descripción histórica del uso de estos microorganismos, y profundiza posteriormente en los mecanismos directos e indirectos que son ejecutados para la nutrición vegetal o el control de fitopatógenos. Adicionalmente, los autores presentan una sección donde describen las formas de interacción entre la planta y las PGPB, considerando la

formación de la biopelícula, la producción de enzimas y el *quorum sensing*, la producción de metabolitos tipo lipopéptidos y la colonización bacteriana, que son los focos de esa interacción.

En el capítulo 4, “Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la mitigación de estreses”, sus autores, Andrés Eduardo Moreno Galván, Sandra Lucía Cortés Patiño, Jonathan Alberto Mendoza Labrador y Carlos José Bécquer Granados, resaltan el papel que desempeña la aplicación de PGPB como alternativa biotecnológica en la mitigación de los efectos de los principales estreses abióticos sobre las plantas, mediante un análisis de los principales mecanismos bacterianos implicados en esta interacción planta-ambiente-microorganismo.

Blanca Estela Romero López y Getzabeth González Gutiérrez describen, en el quinto capítulo, “Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por rizobios simbióticos y asimbióticos”, los mecanismos de los rizobios que contribuyen al crecimiento vegetal, entre los cuales se encuentran la fijación simbiótica de nitrógeno y la producción de fitohormonas, sideróforos, vitaminas y antibióticos, así como de otros metabolitos fitoefectivos. Dichos mecanismos de acción determinan el potencial de los rizobios en aplicaciones biotecnológicas como fitoestimulantes, biofertilizantes, bioplaguicidas y rizorremediadores.

En el sexto capítulo, “Producción de biofertilizantes”, Martha Isabel Gómez Álvarez, Andrés Díaz García, Ginna Milena Quiroga Cubides, Erika Paola Grijalba Bernal, Mauricio Camelo Rusinque y Ruth Rebeca Bonilla Buitrago abordan aspectos clave asociados a la producción de los biofertilizantes, desde el diseño y la optimización del medio de cultivo específico para la cepa de interés, usando herramientas de diseño de experimentos, incluyendo el escalamiento de los procesos de fermentación a nivel piloto o industrial para la obtención eficiente del ingrediente activo, hasta la estandarización de los procesos de formulación y empaque que otorgarán la estabilidad relacionada con la actividad del bioproducto final en condiciones de campo.

En el capítulo 7, “Métodos de aplicación de biofertilizantes bacterianos”, Luz Estela González de Bashan, Juan Pablo Hernández, Jonathan Alberto Mendoza Labrador, Manuel

Moreno Legorreta y Radhakrishna Prabhu explican que los aspectos centrales para el éxito de la inoculación de plantas con bacterias promotoras de crecimiento vegetal son la eficacia de la cepa bacteriana y la tecnología de aplicación. El capítulo analiza las características de los portadores ideales para inoculantes bacterianos y se enfoca en formulaciones superiores para el futuro, principalmente poliméricas y encapsuladas, y en nuevas ideas emergentes en el campo de la inoculación.

En el octavo capítulo del libro, “Normativas colombiana y brasileña aplicadas a la producción y registro de inoculantes biológicos para uso agrícola”, Gregorio Salomón Zambrano Moreno, Fabiola Moreno Martínez y Diana Corina Zambrano Moreno nos cuentan que, para garantizar que las tecnologías sean usadas de manera masiva en los procesos de producción agropecuaria, se requiere una comercialización justa y de calidad, lo que se logra a través de una reglamentación clara y ajustada a la naturaleza de los biofertilizantes y que establezca unos criterios mínimos de calidad respecto de su formulación y eficacia en los cultivos. Estos procesos normativos denotan también la adopción de estas tecnologías en las políticas agrarias, ambientales y de comercio de cada país, por lo cual este capítulo evalúa la normatividad sobre los biofertilizantes desde los aspectos de registro del producto, información de acceso a la diversidad biológica y patentes para Colombia y Brasil.

En el capítulo 9, “El mercado de los biofertilizantes”, Diana Marcela León Moreno, Erika Andrea Alarcón Torres y Martha Isabel Gómez Álvarez abordan el mercado de biofertilizantes, que se encuentra actualmente en crecimiento, desde una perspectiva mundial. Las autoras presentan las diferentes formas de segmentación que puede tener este mercado: por principio activo, actividad biológica, aplicación, formulación, cultivo y región, y también revisan las principales empresas del mercado y cómo es su dinámica, desde las debilidades y fortalezas hasta las principales estrategias de negocio. Finalmente, estudian el panorama latinoamericano, con algunos ejemplos de empresas líderes en este mercado, y analizan las perspectivas a futuro.

En el décimo capítulo, “Experiencia de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) en la Red de Innovación de Cultivos Transitorios y Agroindustriales: evaluación del potencial biofertilizante

de bacterias fijadoras de nitrógeno sobre algodón bajo condiciones de invernadero”, Felipe Andrés Romero Perdomo, Ever Mauricio Barón Guaquetá y Ruth Rebeca Bonilla Buitrago analizan el papel fundamental que los cultivos agroindustriales cumplen en la diversificación agrícola para los productos manufacturados, la seguridad alimentaria, el crecimiento económico y el desarrollo rural. Entre los cultivos agroindustriales de mayor impacto se encuentra el algodón, el producto agrícola no alimentario más importante del mundo, que se cultiva principalmente por su fibra, para productos textiles; por el uso de sus semillas, como fertilizante, y para la fabricación de aceites comestibles y jabones.

Los sistemas ganaderos bovinos en Colombia han evolucionado en arreglos integrados de producción agrícola, pecuaria y forestal dirigidos a obtener opciones tecnológicas diversas. Uno de estos sistemas es el silvopastoril, en el que se integran árboles, forrajes y pastoreo de ganado de una manera mutuamente beneficiosa. Así, la fertilización de las pasturas para el ganado con PGPB ha ganado terreno en las investigaciones actuales, por lo que los capítulos 11, “Experiencia de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) en la Red de Ganadería: sistemas silvopastoriles en el trópico bajo. Uso de biofertilizantes como promotores del crecimiento vegetal de arreglos silvopastoriles para sistemas ganaderos en Colombia”, y 12, “Experiencia de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) en la Red de Ganadería: sistemas silvopastoriles en el trópico alto. Sistema de producción ganadera en el Altiplano Cundiboyacense”, se interesan en el papel que estas bacterias pueden desempeñar en los sistemas silvopastoriles para reducir los daños ambientales que el ganado por sí solo le genera al planeta.

En el capítulo 13, “Experiencia de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) en la Red de Ganadería: fríjol para ensilaje. Uso de rizobios nativos en leguminosas forrajeras como biofertilizantes para el mejoramiento de la producción de ganado de carne en el Valle del Cesar”, Paola Jimena Criollo Campos, Felipe Andrés Romero Perdomo, Germán Orozco González y Ruth Rebeca Bonilla Buitrago analizan el papel que los biofertilizantes pueden cumplir para reducir o, idealmente, eliminar el uso de los fertilizantes de síntesis química en las pasturas, ya que los biofertilizantes formulados promueven el crecimiento

vegetal y aumentan la disponibilidad de nutrientes para el desarrollo de las plantas.

También al respecto de este tipo de bioinsumos, que son de vital importancia en cultivos como el tomate, bajo condiciones de invernadero, el capítulo 14, “Experiencia de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) en la Red de Hortalizas: evaluación del efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno sobre la producción de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo condiciones de invernadero”, de Mauricio Camelo Rusinque, Andrea del Pilar Villarreal Navarrete, Ingrid Marcela Preciado Monguí, Marco Steve Suarez Estrada, Sergio Pardo Díaz y Ruth Rebeca Bonilla Buitrago, muestra los resultados obtenidos, en cuanto a rendimientos de producción, al aplicar el biofertilizante Monibac sobre el cultivo del tomate, con el objetivo de disminuir la fertilización nitrogenada de síntesis química y, de esta forma, contribuir al mejoramiento de la nutrición de las plantas en este tipo de sistemas productivos.

Por último, el capítulo 15, “Desarrollo tecnológico de biofertilizantes en Colombia: experiencia en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

(AGROSAVIA)”, de Martha Isabel Gómez Álvarez, Andrés Díaz García, Ginna Milena Quiroga Cubides, Erika Paola Grijalba Bernal, María Margarita Ramírez Gómez, Mauricio Camelo Rusinque y Ruth Rebeca Bonilla Buitrago, compila cuatro casos de estudio ejecutados en AGROSAVIA que demuestran y dan valor a los conceptos, estrategias y herramientas presentadas en los capítulos previos. Todo este conocimiento fue aplicado al desarrollo tecnológico del bioproducto fijador de nitrógeno Monibac, desde la escala de laboratorio hasta la escala de planta piloto, y al análisis de sistemas de entrega o formulaciones tanto líquidas como sólidas para *Bradyrhizobium japonicum*.

Como se puede apreciar, este libro ofrece un conocimiento sistemático y analítico sobre los beneficios del uso de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal en los sistemas de agricultura sostenible, debido a que permiten reducir la no muy amigable fertilización de síntesis química. Su contenido, estoy seguro, será un referente para todos los productores y profesionales vinculados a la agricultura en el país. Por último, quisiera destacar el carácter colectivo de la publicación, pues resalta el trabajo en equipo y la interdisciplinariedad presente en nuestra corporación.

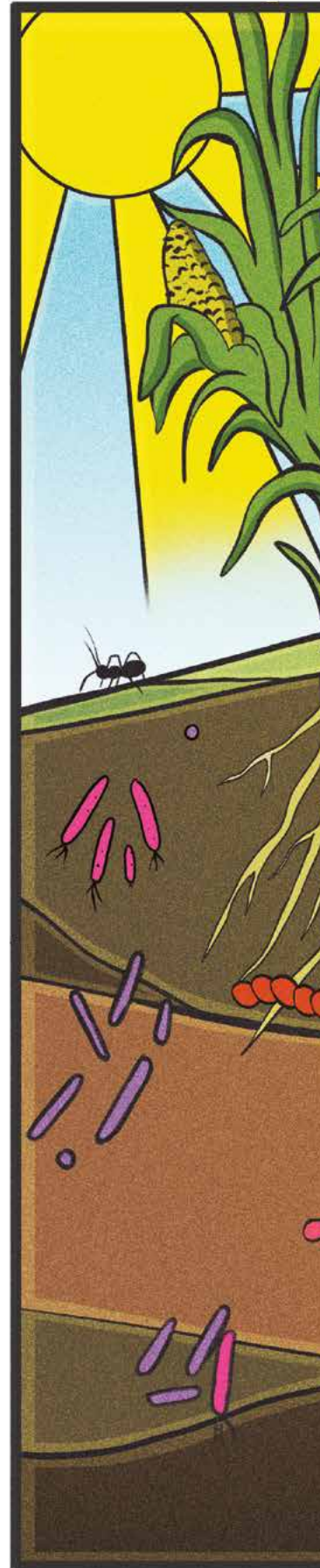
Jorge Mario Díaz Luengas
 Director ejecutivo
 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria
 (AGROSAVIA)

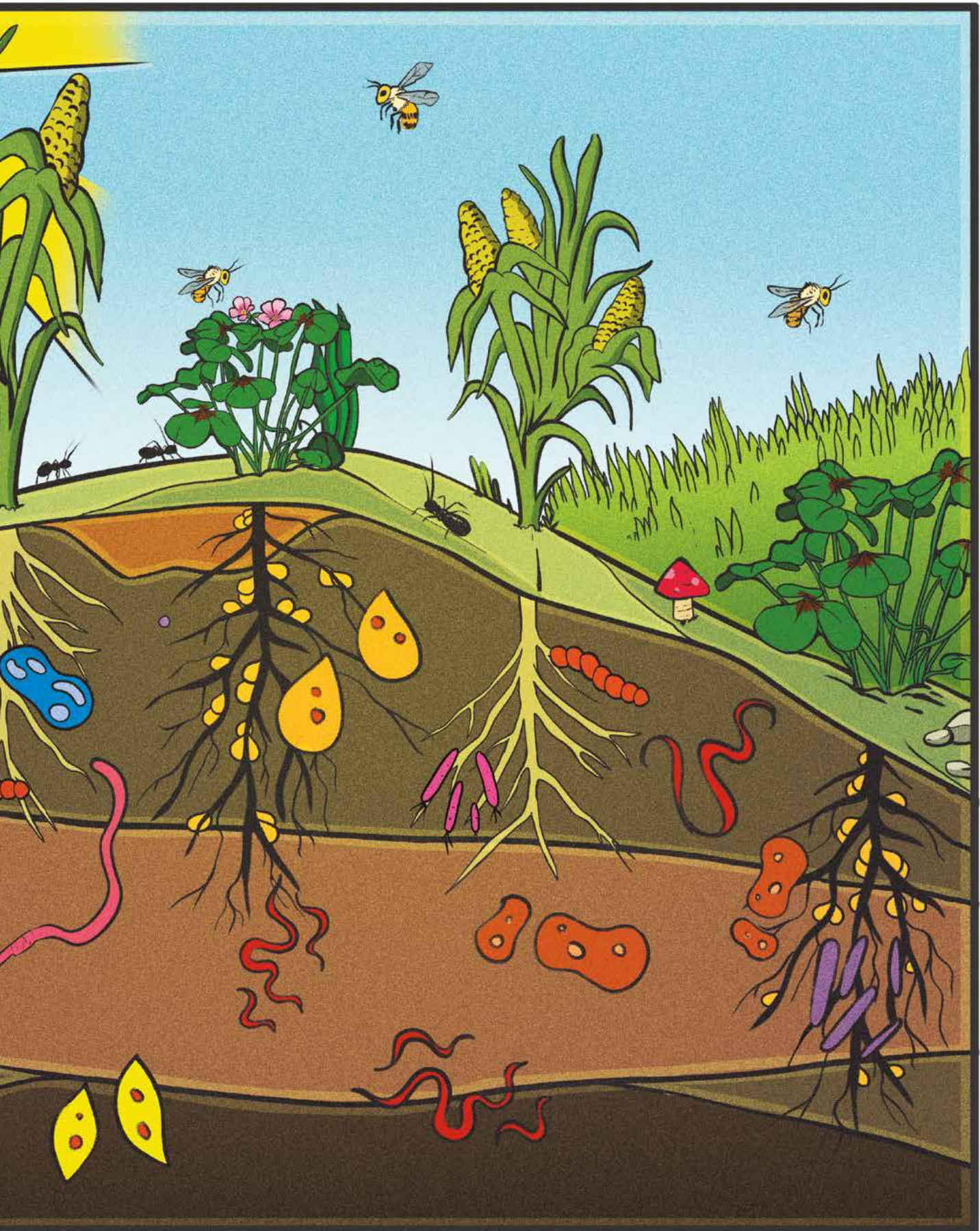
1

Los biofertilizantes y su relación con la sostenibilidad agrícola

Raúl Osvaldo Pedraza¹
German Andrés Estrada Bonilla²
Ruth Rebeca Bonilla Buitrago²

1. Universidad Nacional de Tucumán. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Argentina
2. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.





Introducción

El aumento en la demanda de alimentos por parte de la creciente población mundial traza el mayor desafío para la agricultura en las próximas décadas: incrementar la producción de alimentos en la misma área agrícola, por lo que el suelo, como recurso finito, adquiere un papel relevante.

Los suelos saludables y productivos son fundamentales para lograr el desarrollo de una agricultura sostenible, por lo que permiten sustentar nuestros sistemas alimentarios, filtrar y regular el flujo de agua dulce, almacenar vastas cantidades de carbono y sostener a millones de organismos. Sin embargo, lamentablemente, los suelos del mundo están cada vez más presionados por la mala gestión en el uso de la tierra y por el cambio climático, entre otros factores. En este contexto, la adecuada nutrición de las plantas y la manutención de la salud del suelo son esenciales para la producción de cultivos y alimentos saludables que permitan satisfacer las necesidades de toda la población mundial futura.

Las actuales estrategias de manejo de suelos dependen principalmente de fertilizantes inorgánicos de síntesis química, que, cuando son utilizados inapropiadamente, causan una seria amenaza para la salud humana y ambiental, además de que son, en la mayoría de los casos, recursos finitos. Contrariamente a esto, los biofertilizantes han sido identificados como una alternativa biotecnológica para aumentar la fertilidad del suelo y la producción de cultivos en la agricultura sostenible. La utilización de microorganismos benéficos como biofertilizantes ha adquirido actualmente una importancia capital en el sector agrícola, debido a su papel potencial en la seguridad alimentaria y la producción sostenible de los cultivos (Itelima et al., 2018).

Un biofertilizante es una sustancia o producto que contiene microorganismos vivos y que, al ser aplicado al suelo, las semillas o las raíces de las plantas, coloniza la rizósfera y promueve el crecimiento vegetal a través del incremento de la provisión o disponibilidad de nutrientes para la planta (Vessey, 2003). Básicamente, un biofertilizante es un producto que contiene cepas seleccionadas de microorganismos benéficos del suelo o de la planta, cultivadas artificialmente en laboratorio y formuladas en soportes adecuados que mejoran la fertilidad del suelo y la productividad de los cultivos (Mazid & Khan, 2015). En un sentido amplio, dicho término puede abarcar todos los recursos orgánicos que se utilicen de diferentes fuentes y formas para el crecimiento de las plantas, al estar disponibles para estas (Khosro & Yousef, 2012).

Distintos microorganismos benéficos han sido utilizados como biofertilizantes desde hace mucho tiempo. El conocimiento de la aplicación de inóculo microbiano data de mucho tiempo atrás y pasa de generación en generación entre los agricultores. Comenzó con el cultivo a pequeña escala con la aplicación de compost, lo que demostró su capacidad de actuar como biofertilizante (Khosro & Yousef, 2012). Este efecto se reconoce cuando los microorganismos aceleran la descomposición de los residuos orgánicos y los subproductos agrícolas a través

■ **Tabla 1.1.** Clasificación de algunos biofertilizantes

Fuente: Elaboración propia con base en Itelima et al. (2018)

| | |
|--|--|
| <p>1 Biofertilizantes fijadores de nitrógeno Microorganismos: <i>Rhizobium</i> spp., <i>Azospirillum</i> spp., <i>Herbaspirillum</i> spp. y <i>Azotobacter</i> spp. Actividad/efecto: Fijan el N₂ del aire y lo convierten en formas orgánicas disponibles para las plantas.</p> | <p>5 Biofertilizantes solubilizadores de potasio Microorganismos: <i>Bacillus</i> spp. y <i>Aspergillus niger</i> Actividad/efecto: Solubilizan silicatos y producen, así, ácidos orgánicos, lo que deja disponible el K para las plantas.</p> |
| <p>2 Biofertilizantes solubilizadores de fosfatos Microorganismos: <i>Bacillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp. y <i>Herbaspirillum</i> spp. Actividad/efecto: Solubilizan y mineralizan formas insolubles de P en el suelo.</p> | <p>6 Biofertilizantes movilizadores de potasio Microorganismos: <i>Bacillus</i> spp. Actividad/efecto: Movilizan formas inaccesibles de potasio (silicatos) en el suelo.</p> |
| <p>3 Biofertilizantes movilizadores de fósforo Microorganismos: Micorrizas Actividad/efecto: Captan fosfatos de las capas del suelo y movilizan P insoluble en el suelo al que se aplican.</p> | <p>7 Biofertilizantes oxidantes de azufre Microorganismos: <i>Thiobacillus</i> spp. Actividad/efecto: Oxidan el S a sulfatos que son utilizables por parte de las plantas.</p> |
| <p>4 Biofertilizantes promotores del crecimiento de las plantas Microorganismos: <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Azospirillum</i> spp. y <i>Herbaspirillum</i> spp. Actividad/efecto: Producen hormonas y metabolitos que favorecen el crecimiento de la raíz, lo que aumenta la captación de agua y nutrientes del suelo.</p> | |

de diversos procesos que dan como resultado productos saludables (Sánchez et al., 2017). La historia comercial de los biofertilizantes comenzó con el lanzamiento de Nitragin por Nobbe y Hilther en 1895. A esto le siguió el descubrimiento del género *Azotobacter*, de las algas verdeazuladas y de otros microorganismos que se están utilizando hasta la fecha como biofertilizantes (Itelima et al., 2018). Muchas veces, el término *biofertilizante* se confunde con el de *fertilizante orgánico*; sin embargo, técnicamente, hay una gran diferencia entre ellos. Deshwal y Chaubey (2014) señalan, por un lado, que los biofertilizantes son inoculantes microbianos que consisten en células vivas

de microorganismos como bacterias, algas y hongos — solos o combinados— que pueden ayudar a aumentar la productividad de los cultivos. En dichos casos, las actividades biológicas son notablemente mejoradas por las interacciones microbianas que se establecen en la rizósfera de las plantas. Por el otro lado, los fertilizantes orgánicos son los que se obtienen de fuentes animales, como el estiércol animal, o vegetales, como los residuos verdes.

La tabla 1.1 muestra la clasificación de algunos biofertilizantes, con ejemplos de microorganismos que los incluyen, y la actividad/efecto que proporcionan.



Sabemos que las prácticas agrícolas son determinantes del nivel de producción de alimentos y, principalmente, las responsables del estado de nuestro medio ambiente (Tilman et al., 2002). Por lo tanto, el escenario mundial actual exige no solo que la productividad de los cultivos sea aumentada para cubrir las necesidades de la creciente población, sino también que sea realizada de manera sostenible, de modo que prometa una mayor seguridad social, económica y ambiental. Para lograr tales objetivos, los investigadores deben esforzarse en identificar estrategias innovadoras para la productividad sostenible de los cultivos y en generar una mayor eficiencia de los insumos, además de asegurar la protección de los recursos naturales remanentes y de los agroecosistemas (Germer et al., 2011). No debemos olvidar que la sostenibilidad se basa en el hecho de que los recursos no deben utilizarse a velocidades superiores a la capacidad de la Tierra para sustituirlos (Godfray et al., 2010).

Este capítulo —así como los subsiguientes— tiene como objetivo revisar el papel actual de los biofertilizantes en la agricultura sostenible, para, así, satisfacer las necesidades cognitivas de los productores y de los profesionales vinculados a la agricultura.

Fertilizantes de síntesis química vs. biofertilizantes

Los fertilizantes inorgánicos de síntesis química son mundialmente utilizados porque son fácilmente asequibles y tienen la ventaja de una rápida acción debido a su inmediata liberación de nutrientes. Sin embargo, se ha investigado sobre las desventajas de tales fertilizantes y se ha revelado que estas no pueden pasarse por alto. La mayoría de los problemas asociados a los cultivos cosechados y parte de la contaminación de nuestro entorno natural se producen como resultado del uso inapropiado de fertilizantes inorgánicos (Ge et al., 2018). Los estudios han demostrado que la aplicación de fertilizantes nitrogenados en algunas condiciones climáticas provoca la emisión de óxido nitroso, que tiene un efecto de calentamiento global potencial 296 veces mayor que el de una masa igual de dióxido de carbono (Gruber & Galloway, 2008). Por otro lado, Zhang et al. (2016) observaron que en los últimos 110 años las emisiones globales de metano del cultivo de arroz aumentaron un 85%. La expansión de los campos de arroz fue el factor dominante para las tendencias crecientes en las emisiones de metano, seguido de una concentración elevada de dióxido de carbono y el uso de fertilizantes nitrogenados. Estos hallazgos han impulsado la necesidad de proporcionar un fertilizante respetuoso con el medio ambiente conocido como *biofertilizante*.

La demanda mundial de fertilizantes ha aumentado mucho en las últimas décadas. Según el Banco Mundial, la demanda de fertilizantes de síntesis química en Colombia se estima en $659 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$. La mayoría de los fertilizantes utilizados en Colombia son importados (figura 1.1), y debido al alto costo de importación y a la volatilidad del dólar estadounidense, el rubro de fertilización se vuelve muy costoso, lo que impide que los agricultores con pocos recursos económicos puedan acceder a ellos ("Colombia - Consumo de fertilizantes", 2017).

Aparte de su alto costo, cuando se aplican de manera incorrecta, excesiva o inoportuna, los fertilizantes inorgánicos de síntesis química tienen efectos negativos. Se conoce que la aplicación excesiva de fertilizantes conduce a daños por acumulación de

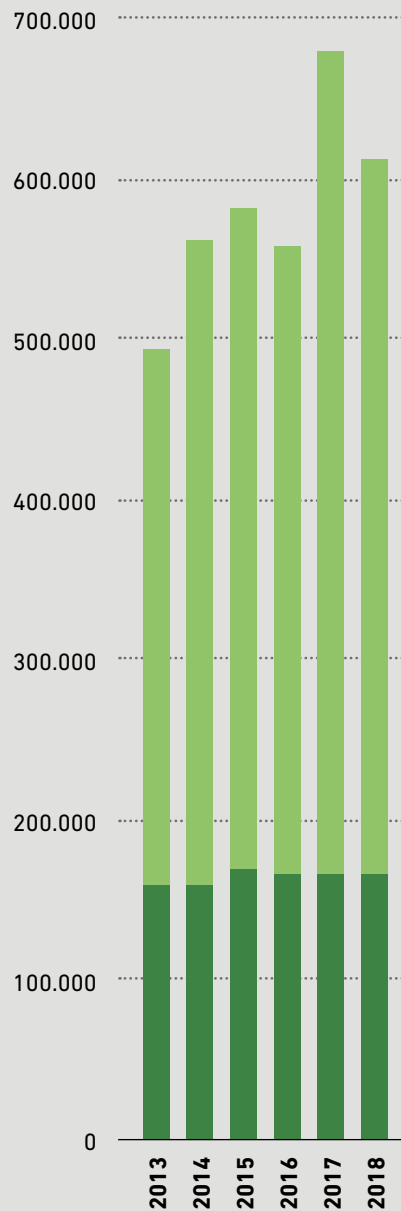
sales, y en la mayoría de los casos esto lleva a la muerte de plantas jóvenes (Almeida Machado & Serralheiro, 2017). Debido a que una gran mayoría de los fertilizantes de síntesis no son biodegradables, su uso a largo plazo produce la acumulación de sustancias nocivas y la acidificación/salinización del suelo, lo que provoca una disminución de la fertilidad química y biológica de este (Taylor, 1997). Debido a su alta solubilidad en el agua, muchos de estos fertilizantes podrían ser lixiviados profundamente en el suelo (donde las raíces de las plantas no los pueden alcanzar) y en el agua subterránea, lo que causa contaminación (Almeida Machado & Serralheiro, 2017). Sin embargo, gran parte de estos problemas pueden evitarse con el uso de fertilizantes que respeten el ambiente donde son aplicados; tal es el caso de los biofertilizantes.

Los biofertilizantes son amigables con el medio ambiente, y el riesgo de contaminación es muy bajo, a diferencia de los fertilizantes de síntesis, que a menudo se trasladan hacia cuerpos de agua a los que les pueden ocasionar eutrofización y en los humanos causa el "síndrome del bebé azul" (metahemoglobinemia adquirida) cuando el nivel de nitrato está por encima de 10 mg L^{-1} (Knobeloch et al., 2000). Además, se ha encontrado que los biofertilizantes ayudan a controlar enfermedades de las plantas, como la podredumbre de la raíz, causada por *Pythium*; la pudrición de la raíz, causada por *Rhizoctonia*; el marchitamiento por frío, y nematodos parásitos (Mahimaraja et al., 2008). El control de enfermedades con biofertilizantes se ha atribuido a distintos posibles mecanismos, como la competencia exitosa por nutrientes, la producción de antibióticos, la depredación exitosa de patógenos y la activación de genes resistentes a enfermedades (Liu et al., 2017). Sin embargo, también existe la posibilidad de utilizar conjuntamente fertilizantes de síntesis química y biofertilizantes, pues, aplicados correctamente, podrían provocar un aumento en la producción agrícola y mejorar la calidad microbiológica del suelo, debido a que así se pueden reducir las dosis de fertilizantes síntesis y mejorar su aprovechamiento por efecto de la actividad microbiana de los biofertilizantes.

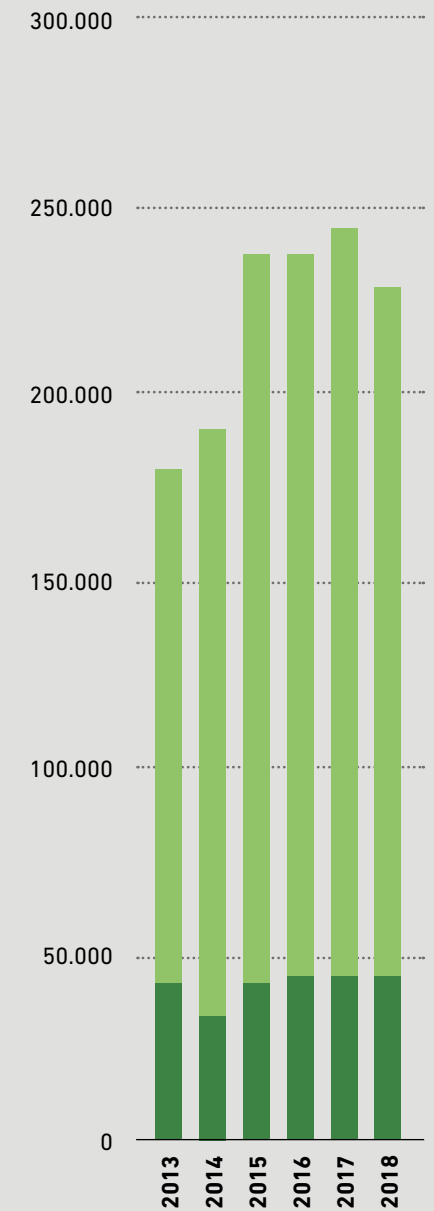
■ **Figura 1.1.** Origen de los fertilizantes nitrogenados y fosfatados consumidos en Colombia, 2013-2017.
Fuente: Faostat: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>



Toneladas
(N)



Toneladas
(P₂O₅)



■ Producción

■ Importación

La rizósfera: zona de interacciones

Dentro de los ecosistemas terrestres, una gran proporción de diversos organismos se encuentran en forma subterránea; allí desempeñan distintos y numerosos papeles en los servicios que brindan a los ecosistemas (Uzoh & Babalola, 2018). Se sabe que los microorganismos son importantes impulsores en el funcionamiento del ecosistema y de su sostenibilidad, teniendo en cuenta que la diversidad de ellos es extremadamente grande y que sus funciones también son diversas (Dighton, 2014). La actual demanda de un rendimiento sostenible y mayor de los cultivos ha revitalizado el estudio de los microorganismos que habitan en el suelo.

La rizósfera, definida por primera vez hace más de un siglo por Lorentz Hiltner (1904) y redefinida por Philippot et al. (2013), es la zona angosta del suelo que rodea y está influenciada por las raíces de las plantas; esta zona alberga una abrumadora cantidad de microorganismos e invertebrados y se considera una de las interfaces más dinámicas de la Tierra. Hay tres zonas distintas en la rizósfera: la endorrizósfera (región del tejido cortical de la raíz), el rizoplano (que abarca la epidermis de la raíz y el mucílago asociado) y la ectorrizósfera (el suelo más cercano a la raíz). En este ambiente, las interacciones entre las raíces de las plantas, el suelo y los microorganismos alteran significativamente las propiedades físicas y químicas del suelo, lo que a su vez altera la población microbiana en la rizósfera (Nihorimbere et al., 2011). Adicionalmente, los exudados de las raíces de las plantas median las interacciones entre estas raíces y las comunidades microbianas en la rizósfera (Chaparro et al., 2013). Las raíces de las plantas liberan del 20 al 40 % del carbono fijado fotosintéticamente como azúcares solubles, aminoácidos o metabolitos secundarios (Grayston et al., 1996), y estos son utilizados por las comunidades microbianas en la rizósfera.

Los exudados de raíz se han agrupado en dos clases: compuestos de bajo peso molecular, como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos fenólicos y otros metabolitos secundarios, y compuestos de alto peso molecular, como polisacáridos y proteínas (Badri &

Vivanco, 2009). La composición cualitativa y cuantitativa de los exudados radiculares está determinada por el cultivar, la especie de la planta, su etapa de desarrollo y diversos factores ambientales, incluidos el tipo de suelo, el pH, la temperatura y la presencia de microorganismos (Badri & Vivanco, 2009). Estas diferencias generan en la rizósfera comunidades microbianas que tienen un cierto grado de especificidad para cada especie de planta.

El suelo también influye en la planta y en la supervivencia microbiana. Además, los microorganismos determinan la fertilidad del suelo, por lo que influyen en el rendimiento de la planta. Según Chaparro et al. (2014), ahora se sabe que la planta modifica el microbioma en el entorno inmediato del suelo, así como la abundancia microbiana en la rizósfera; por lo tanto, las especies de plantas soportan una población microbiana única (Bais et al., 2006). El microbioma resultante es, pues, un producto de las diferencias en el tipo de exudados radiculares (Rasmann & Turlings, 2016) y de las tasas de captación de nutrientes por parte de las plantas (Bell et al., 2015). De lo anterior se desprende que todos los aspectos de las prácticas agrícolas requieren una mejor comprensión de los procesos de la rizósfera que faciliten el crecimiento de las plantas y la supresión de enfermedades. Así, estudiar la relación intrincada entre cultivos, suelos y microbios en la rizósfera es fundamental y necesario para mantener sistemas de producción saludables y de alto rendimiento.

En el pasado, el fitomejoramiento y los estudios microbianos se llevaban a cabo como entidades separadas, pero en los últimos tiempos la estrecha asociación de plantas y microorganismos se considera un nicho ecológico unificado conocido como *holobionte* (Vandenkoornhuyse et al., 2015). Las variaciones en los rasgos genéticos y fenotípicos de las plantas que sostienen el microbioma y que son beneficiosos para estas ofrecen una ventaja de aptitud física, por lo que la capacidad de la planta para mantener el microbioma beneficioso es un rasgo que debe seleccionarse en el fitomejoramiento (Uzoh & Babalola, 2018). Los

beneficios derivados del microbioma deben reemplazar al carbono y la energía que se obtienen de la planta. Se cree que el holobionte pudo haber sido la unidad seleccionada para guiar la evolución hacia los rasgos de las plantas que apoyaban el microbioma favorable, lo que constituye una nueva área de investigación, dado que el estudio holístico y mecanicista de las interacciones es muy pertinente. Así, se debe estudiar y diseñar toda la comunidad microbiana involucrada en la mejora del crecimiento y el desarrollo de un genotipo de planta específico, en un ambiente específico, bajo ciertas condiciones de manejo, para lograr un aumento de rendimiento máximo sostenible (Uzoh & Babalola, 2018). De esta manera, la producción de un biofertilizante ya no debería considerar una cepa de un microorganismo beneficioso, sino un consorcio de agentes biológicos específicos para cada uno o para grupos de genotipos de plantas bajo ciertas condiciones ambientales. La nueva área de investigación debe ser la producción de inóculo microbiano específica en el sitio y debe abordar los problemas específicos del suelo, que podrían incluir deficiencias y fijaciones de nutrientes, peligros y adaptaciones ambientales y resistencia a patógenos. Dicho consorcio microbiano debería ser adaptable para coexistir dentro de la rizósfera (Uzoh & Babalola, 2018).

Según Huang et al. (2014), en lugar de identificar qué microbios están presentes en la rizósfera, se debería identificar lo que están haciendo, pues esto proporcionaría más información sobre estas interacciones complejas. Más aún, la identificación de los compuestos presentes en los exudados de la raíz, que influyen en la estructura y la función de la comunidad microbiana del suelo, ayudaría a construir estrategias novedosas para mejorar el rendimiento de las plantas y para aumentar el rendimiento y la sostenibilidad de los cultivos.

Existe una gran cantidad de bibliografía que demuestra que las interacciones rizosféricas en el nivel uno a uno (planta-microbio) están mediadas directa o indirectamente por los exudados de la raíz (Uzoh & Babalola, 2018). Sin embargo, los desarrollos recientes en la tecnología de secuenciación de nueva generación les han permitido a los investigadores estudiar estas interacciones a nivel comunitario (Huang et al., 2014). Estos estudios se han centrado principalmente en identificar qué tipos de microbios están presentes en los diferentes ambientes.

Asimismo, se requieren estudios para analizar estas interacciones en el nivel funcional, para identificar las señales involucradas en las interacciones entre especies. La mayoría de los estudios analizan cómo los exudados de las raíces de las plantas atraen y regulan estas interacciones microbianas, pero se carece de conocimientos sobre cómo los microbios específicos modulan estas interacciones, especialmente a nivel comunitario, y sobre cómo las comunidades microbianas asociadas a las raíces influyen en la exudación de las raíces de las plantas (Huang et al., 2014).

Se necesita más investigación para identificar los factores microbianos que influyen en el proceso de exudación de la raíz del huésped, lo que, sin duda, ayudará a desarrollar estrategias mediadas por los microorganismos para manipular la exudación de la raíz de la planta y, a su vez, las comunidades microbianas en la rizósfera.

Microorganismos utilizados como biofertilizantes

El desarrollo de los biofertilizantes es una historia de éxito de la microbiología del suelo en su búsqueda por proporcionarles una fuente sostenible y efectiva de nutrientes a las plantas, particularmente con respecto a la fijación biológica de nitrógeno. Los microorganismos más antiguamente utilizados como biofertilizantes son los llamados *rizobios*, conocidos como diazotrofos por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Este grupo de bacterias es capaz de colonizar la rizósfera y de establecer nódulos en las raíces de las plantas hospederas, principalmente de especies de la familia Fabaceae. La simbiosis fabáceas-*rizobio* por medio del proceso de fijación biológica de nitrógeno puede llegar a suplir hasta el 100% de la demanda de N en algunas especies vegetales (Hungria et al., 2017). Otro grupo de bacterias diazotróficas ampliamente usadas como principio activo en biofertilizantes son las pertenecientes al género *Azospirillum*, que establecen relaciones menos directas con la planta huésped, pues consiguen reemplazar hasta el 50% de la fertilización nitrogenada en algunos cultivos.

La gran mayoría de los primeros biofertilizantes comercializados contenían solo una cepa microbiana, seleccionada en ensayos *in vitro*, la cual generalmente permitía los mejores resultados de inoculación en un cultivo en particular. Actualmente, cada vez se populariza más el desarrollo de biofertilizantes con diferentes cepas o inoculantes mixtos; su enfoque se basa en promover el crecimiento de las plantas mediante la combinación de distintos mecanismos de diferentes microorganismos. Los biofertilizantes con más de una cepa han mostrado excelentes resultados y

tienen el potencial de utilizarse cada vez más por parte de los agricultores (Sanchez Santos et al., 2019).

Los microorganismos mencionados anteriormente, entre otras bacterias diazotróficas y no diazotróficas, se denominan *bacterias promotoras del crecimiento de las plantas* (PGPB, por sus siglas en inglés: *plant growth promoting bacteria*) o *rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal* (PGPR, por sus siglas en inglés: *plant growth promoting rhizobacteria*), debido a su capacidad de ejercer efectos benéficos sobre el desarrollo de diferentes especies vegetales, ya sea por medio de mecanismos directos o indirectos (Glick, 2012). Estos microorganismos pueden optimizar el ciclaje de nutrientes en el suelo, con lo cual aumenta su disponibilidad y mejora la nutrición de las plantas; con este enfoque es posible reducir la fertilización mineral de síntesis (Adesemoye & Kloepper, 2009). Dependiendo del estado fisiológico del cultivo, los biofertilizantes pueden inducir el crecimiento de la planta por medio de mecanismos como la producción de fitohormonas (auxinas, ácido abscísico, citocininas, etileno y giberelinas), la solubilización de fosfatos, la producción de sideróforos y la inducción de la resistencia sistémica intrínseca de la planta al estrés biótico, entre otros (Malusá & Vassilev, 2014; Saad et al., 2020). Otros tipos de microorganismos son cada vez más demandados debido a su uso en la agricultura para el control biológico de plagas y enfermedades (Berg et al., 2017); no obstante, este libro abordará los biofertilizantes que promueven el crecimiento de las plantas. Todos serán denominados *microorganismos PGPB*, con diferentes mecanismos de acción, y los contenidos estarán basados en nuestras experiencias sobre este tópico.



Ventajas y limitaciones de los biofertilizantes

Los biofertilizantes desempeñan un papel importante en la mejora de la fertilidad del suelo. Además, la aplicación al suelo mejora su estructura y elimina el uso exclusivo de fertilizantes de síntesis química. En el trabajo de revisión realizado por Bhattacharjee y Dey (2014) se indica que, bajo condiciones de tierra baja, la aplicación de algas verdeazuladas más *Azospirillum* demostró ser significativamente beneficiosa para mejorar el rendimiento de grano de arroz. Asimismo, la aplicación de biofertilizantes a base de *Azotobacter*, *Rhizobium* o micorrizas arbusculares produjo el mayor aumento en la producción de paja y grano en plantas de trigo tratadas con roca fosfórica como fertilizante fosfatado. El estudio también señala que la producción y aplicación del alga *Azolla*, además de ser económica y ecológica, proporciona beneficios en términos de enriquecimiento de carbono y nitrógeno del suelo. Respecto al nitrógeno, los autores observan que los distintos géneros y especies bacterianas que fijan nitrógeno simbióticamente podrían

cubrir entre el 80 y el 90% de la demanda de este nutriente en plantas de soya.

El control biológico, un enfoque moderno en el manejo de enfermedades, es un papel importante que también pueden desempeñar los fertilizantes biológicos en la agricultura. Así, por ejemplo, se ha encontrado que los biofungicidas basados en *Trichoderma* prometen controlar la podredumbre de la raíz de frijol mungo (Bhattacharjee & Dey, 2014). Igualmente, también se ha observado un aumento significativo en los parámetros de crecimiento, rendimiento y calidad de ciertas plantas tratadas con biofertilizantes que contienen bacterias fijadoras de nitrógeno y bacterias solubilizadoras de fosfatos y potasio (Khosro & Yousef, 2012).

Entre las ventajas que ofrecen los biofertilizantes debido a los microorganismos benéficos que contienen, se destacan las siguientes:



Secreción de hormonas de crecimiento de las plantas.



Protección de las plantas contra el ataque de patógenos.



Mejora de la fertilidad del suelo.



Posible uso sin necesidad de habilidades especiales.



Reducción o eliminación del uso de fertilizantes químicos.



Rentabilidad en comparación con los fertilizantes sintéticos, pues son más económicos.



Restauración del ciclo natural de nutrientes del suelo y generación de materia orgánica en el suelo.



Protección contra la sequía.

No obstante los numerosos beneficios de la incorporación de los biofertilizantes en los sistemas agrícolas, se han informado ciertos obstáculos en el uso de estos bioinsumos, lo que reduce su aceptación entre los agricultores. La variabilidad de los resultados experimentada en el campo puede deberse a relaciones inespecíficas entre el huésped y el inoculante, a las

diferentes condiciones físicas y químicas edáficas, a la poca capacidad competitiva del biofertilizante contra las cepas nativas y a deficiencias en la obtención de una adecuada formulación (Lucy et al., 2004). También se señala que la limitación más importante de los biofertilizantes es su contenido de nutrientes, en comparación con los fertilizantes inorgánicos, lo que

podría dar lugar a síntomas de deficiencia nutricional en las plantas. No obstante, este problema puede ser reducido mediante la adición de desechos ricos en nutrientes, como harina de huesos (rica en fósforo), ceniza de madera, residuos de palma (ricos en potasio) u otras sustancias de origen natural, como compost con roca fosfórica, para enriquecer el fertilizante (Masuco Lopes et al., 2021). Mahimaraja et al. (2008) observaron que la adición de fósforo a los desechos vegetales hace que el biofertilizante sea más equilibrado y que disminuyan las pérdidas de nitrógeno. Adicionalmente, y considerando que los biofertilizantes poseen muchos aspectos positivos, su uso a veces no puede llevar a los resultados positivos esperados, posiblemente debido a su exposición a altas temperaturas o a condiciones hostiles antes del uso. El biofertilizante debe almacenarse a temperatura ambiente o en condiciones de almacenamiento en frío, alejado del calor o la luz solar directa. Otros factores que pueden limitar las propiedades de los biofertilizantes son el medio ambiente, los recursos humanos, el desconocimiento y la falta de disponibilidad tanto de cepas como de portadores adecuados, entre otros

(Bhattacharjee & Dey, 2014). La vida útil corta, la falta de material portador adecuado, la susceptibilidad a altas temperaturas, el transporte y el almacenamiento son cuellos de botella para los biofertilizantes que aún deben resolverse para obtener una inoculación efectiva. En la tabla 1.2 se presentan algunas de las limitaciones para el uso de los biofertilizantes, con sus correspondientes observaciones.

La ecología microbiana del suelo aparece como un complejo y mayormente desconocido escenario donde tienen lugar todas estas interacciones entre los microorganismos y las plantas. Por lo tanto, el estudio de la ecología microbiana del suelo y de su dinámica sin duda mejorará el desarrollo de nuevas y mejores tecnologías de biofertilizantes para el futuro de la agricultura. Debido a que las mismas funciones o mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas pueden ser realizados por muchos microorganismos diferentes, es de esperar que esta redundancia funcional en la diversidad microbiana del suelo pueda ser manejada a favor del desarrollo vegetal (Wall, 2015).

■ **Tabla 1.2.** Limitaciones para el uso de biofertilizantes

Fuente: Elaboración propia con base en Bhattacharjee y Dey (2014)

| | |
|---|---|
| <p>1 Falta de disponibilidad de cepas adecuadas Observaciones: Es una de las principales limitaciones en la producción de biofertilizantes. Las cepas seleccionadas deben ser capaces de sobrevivir en el portador del inóculo, colonizar rápidamente al hospedero y competir exitosamente con los factores bióticos y abióticos del ambiente.</p> | <p>3 Falta de conocimiento de los agricultores Observaciones: No todos los agricultores conocen los biofertilizantes y su utilidad para aumentar el rendimiento de los cultivos. Además, no todos son conscientes de los daños que causa la aplicación continua e inapropiada de fertilizantes inorgánicos en el ecosistema.</p> |
| <p>2 Falta de disponibilidad de un portador adecuado Observaciones: Si no se dispone del portador adecuado, es difícil mantener la vida útil del biofertilizante.</p> | <p>4 Recursos humanos inadecuados y personal inexperto Observaciones: En muchas ocasiones, los agricultores no calificados y el personal inexperto no reciben instrucciones adecuadas sobre la aplicación de los biofertilizantes.</p> |
| | <p>5 Restricciones ambientales Observaciones: El uso de los biofertilizantes es afectado por las características del suelo, como salinidad, acidez, sequía, etc.</p> |

Referencias

- Adesemoye, A. O., & Klopper, J. W. (2009). Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2196-0>
- Almeida Machado, R. M., & Serralheiro, R. P. (2017). Soil salinity: Effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization. *Horticulturae*, 3(2). <https://doi.org/10.3390/horticulturae3020030>
- Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, 32(6), 666-681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 233-266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Bell, T. H., Cloutier-Hurteau, B., Al-Otaibi, F., Turmel, M.-C., Yergeau, E., Courchesne, F., & St-Arnaud, M. (2015). Early rhizosphere microbiome composition is related to the growth and Zn uptake of willows introduced to a former landfill. *Environmental Microbiology*, 17(8), 3.025-3.038. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12900>
- Berg, G., Köberl, M., Rybakova, D., Müller, H., Grosch, R., & Smalla, K. (2017). Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix050>
- Bhattacharjee, R., & Dey, U. (2014). Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 8(24), 2.332-2.342. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6374>
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., Bakker, M. G., Sugiyama, A., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2013). Root exudation of phytochemicals in arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS ONE*, 8(2), artículo e55731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055731>
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The ISME Journal*, 8(4), 790-803. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.196>
- Colombia - Consumo de fertilizantes. (2017). *Index Mundi*. [https://www.indexmundi.com/es/datos/colombia/consumo-de-fertilizantes#:~:text=Consumo%20de%20fertilizantes%20\(kilogramos%20por,Colombia%20fue%20659.45%20en%202016](https://www.indexmundi.com/es/datos/colombia/consumo-de-fertilizantes#:~:text=Consumo%20de%20fertilizantes%20(kilogramos%20por,Colombia%20fue%20659.45%20en%202016)
- Deshwal, V. K., & Chaubey, A. (2014). Isolation and characterization of *Rhizobium leguminosarum* from root nodule of *Pisum sativum* L. *Journal of Academic Industrial Research*, 2(2), 2.278-5.213.
- Dighton, J. (2014). Introduction: Soils and their promotion of plant growth. En J. Dighton, & J. A. Krumsins (eds.), *Interactions in soil: Promoting plant growth* (pp. 1-26). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8890-8_1
- Ge, S., Zhu, Z., & Jiang, Y. (2018). Long-term impact of fertilization on soil pH and fertility in an apple production system. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 18(1), 282-293. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162018005001002>
- Germer, J., Sauerborn, J., Asch, F., de Boer, J., Schreiber, J., Weber, G., & Müller, J. (2011). Skyfarming an ecological innovation to enhance global food security. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 6(2), artículo 237. <https://doi.org/10.1007/s00003-011-0691-6>
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, artículo 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., & Toulmin, C. (2010). Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327(5.967), 812-818. <https://doi.org/10.1126/science.1185383>
- Grayston, S. J., Vaughan, D., & Jones, D. (1996). Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: The importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology*, 5(1), 29-56. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(96\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(96)00126-6)
- Gruber, N., & Galloway, J. N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451, 293-296. <https://doi.org/10.1038/nature06592>
- Hiltner, L. (1904). Über neuere erfahrungen und probleme auf dem debiete der bo denbakteriologie und unter besonderer berucksichtigung der grundund und brache. *Zbl. Bakteriol*, 2, 14-25.
- Huang, X.-F., Chaparro, J. M., Reardon, K. F., Zhang, R., Shen, Q., & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere interactions: Root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*, 92(4), 267-275. <https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0225>
- Hungria, M., Araujo, R. S., Silva Júnior, E. B., & Zilli, J. É. (2017). Inoculum rate effects on the soybean symbiosis in new or old fields under tropical conditions. *Agronomy Journal*, 109(3), 1.106-1.112. <https://doi.org/10.2134/agronj2016.11.0641>
- Itelima, J. U., Bang, W. J., Onyimba, I. A., Sila, M. D., & Egbere, O. J. (2018). Bio-fertilizers as key player in enhancing soil fertility and crop productivity: A review. *Direct Research Journal of Agriculture and Food Science*, 6(3), 73-83. <https://directresearchpublisher.org/drjafs/files/2019/07/Itelima-et-al.pdf>
- Khosro, M., & Yousef, S. (2012). Bacterial biofertilizers for sustainable crop production: A review. *APRN Journal of Agricultural and*

- Biological*, 7(5), 307-316. https://www.academia.edu/28274331/BACTERIAL_BIOFERTILIZERS_FOR_SUSTAINABLE_CROP_PRODUCTION_A_REVIEW
- Knobeloch, L., Salna, B., Hogan, A., Postle, J., & Anderson, H. (2000). Blue babies and nitrate-contaminated well water. *Environmental Health Perspectives*, 108(7), 675-678. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108675>
- Liu, K., McInroy, J. A., Hu, C.-H., & Kloepper, J. W. (2017). Mixtures of plant-growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens. *Plant Disease*, 102(1), 67-72. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0478-RE>
- Lucy, M., Reed, E., & Glick, B. R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1), 1-25. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e>
- Mahimaraja, S., Dooraisamy, P., Lakshmanan, A., Rajannah, G., Udayasoorian, C., & Natarajan, S. (2008). Composting technology and organic waste utilization. *Journal of Science*, 1(3), 332-560.
- Malusá, E., & Vassilev, N. (2014). A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6.599-6.607. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>
- Masuco Lopes, C., Miranda Silva, A. M., Estrada-Bonilla, G. A., Ferraz-Almeida, R., Vilela Vieira, J. L., Otto, R., Vitti, G. C., & Nogueira Cardoso, E. J. B. (2021). Improving the fertilizer value of sugarcane wastes through phosphate rock amendment and phosphate-solubilizing bacteria inoculation. *Journal of Cleaner Production*, 298, artículo 126821. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126821>
- Mazid, M., & Khan, T. A. (2015). Future of bio-fertilizers in Indian agriculture: An overview. *International Journal of Agricultural & Food Research*, 3(3). <https://www.sciencetarget.com/Journal/index.php/IJAFR/article/view/132>
- Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., & Thonart, P. (2011). Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 15(2), 327-337. https://www.researchgate.net/publication/297824614_Beneficial_effect_of_the_rhizosphere_microbial_community_for_plant_growth_and_health
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789-799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>
- Rasmann, S., & Turlings, T. C. J. (2016). Root signals that mediate mutualistic interactions in the rhizosphere. *Current Opinion in Plant Biology*, 32, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.017>
- Saad, M. M., Eida, A. A., & Hirt, H. (2020). Tailoring plant-associated microbial inoculants in agriculture: A roadmap for successful application. *Journal of Experimental Botany*, 71(13), 3.878-3.901. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa111>
- Sanches Santos, M., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: Reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9(1), artículo 205. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>
- Sánchez, Ó. J., Ospina, D. A., & Montoya, S. (2017). Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Management*, 69, 136-153. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.08.012>
- Taylor, M. D. (1997). Accumulation of cadmium derived from fertilisers in New Zealand soils. *Science of The Total Environment*, 208(1-2), 123-126. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(97\)00273-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(97)00273-8)
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418, 671-677. <https://doi.org/10.1038/nature01014>
- Uzoh, I. M., & Babalola, O. O. (2018). Rhizosphere biodiversity as a premise for application in bio-economy. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 265, 524-534. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.07.003>
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1.196-1.206. <https://doi.org/10.1111/nph.13312>
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Wall, L. G. (2015). Biofertilizers: Present and future use of transgenic micro-organisms. En OECD (ed.), *Biosafety and the environmental uses of micro-organisms: Conference proceedings* (pp. 23-34). <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264213562-5-enp df?expires=1616168293&id=id&accname=guest&checksum=B4D7187F16379F4F4DBB6371A130C9F2>
- Zhang, B., Tian, H., Ren, W., Tao, B., Lu, C., Yang, J., Banger, K., & Pan, S. (2016). Methane emissions from global rice fields: Magnitude, spatiotemporal patterns, and environmental controls. *Global Biogeochemical Cycles*, 30(9), 1.246-1.263. <https://doi.org/10.1002/2016GB005381>

2

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: filogenia, microbioma, y perspectivas

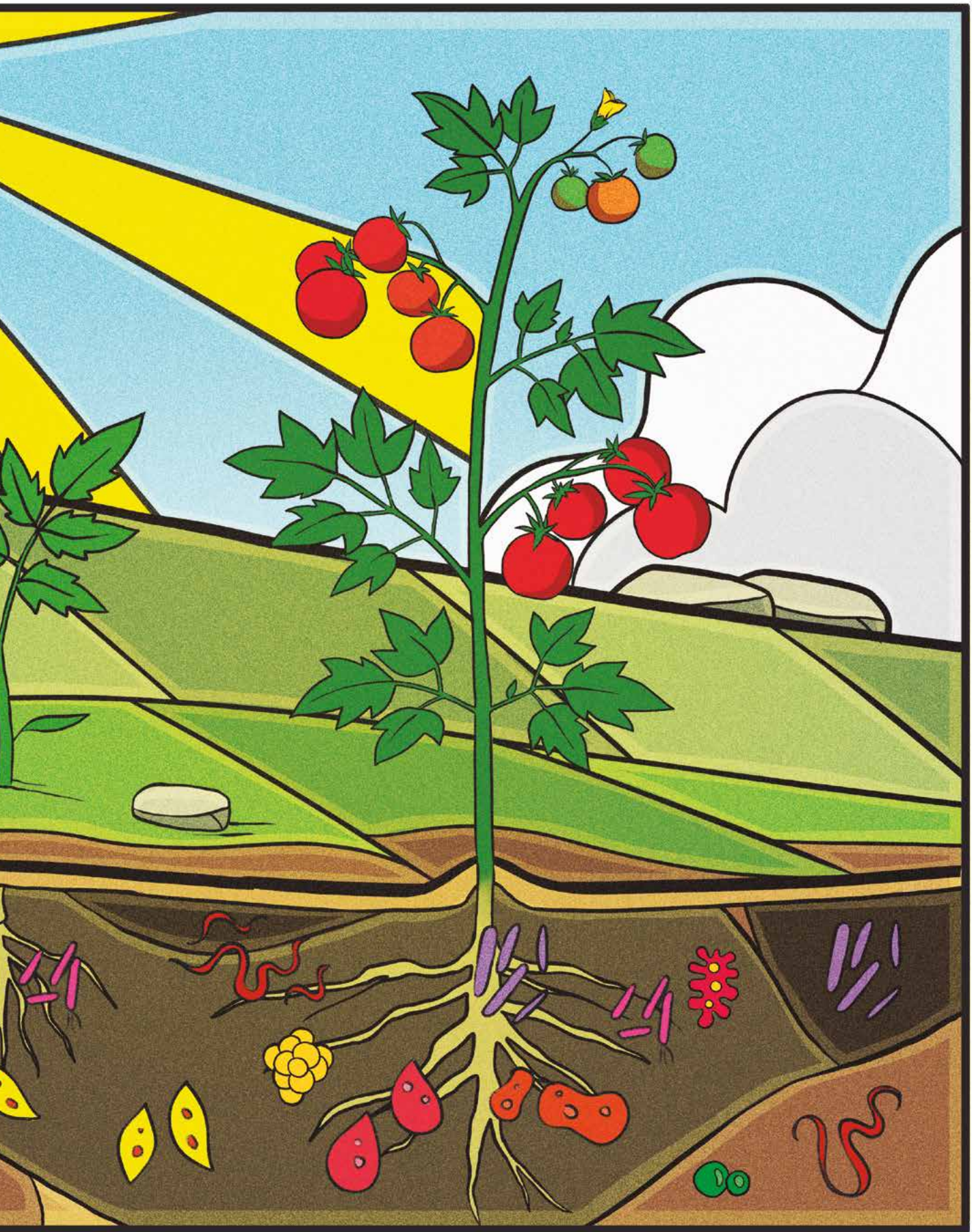
Sergio Pardo Díaz¹

Diana Carolina Mazo Molina²

Daniel Fernando Rojas Tapias¹

1. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.
2. Instituto Boyce Thompson asociado a la Universidad de Cornell en Ithaca, Nueva York.





Introducción

Los microorganismos del dominio Bacteria son seres vivos cosmopolitas y pueden vivir de manera libre o asociados a otros organismos. Debido a su importancia en los procesos biogeoquímicos, estos representan una pieza esencial de la vida en nuestro planeta.

Las bacterias son extremadamente versátiles metabólicamente, pues pueden tomar diversas fuentes de carbono para su multiplicación, respirar anaeróbicamente y usar múltiples donadores orgánicos e inorgánicos de electrones, entre otras capacidades. También son capaces de interactuar con especies mayores, como hongos, animales o plantas, y estas interacciones pueden ser positivas, neutras o negativas. En el caso específico de la interacción planta-bacteria, mucha investigación se ha dedicado al estudio de la interacción negativa o al estudio de fitopatógenos o microorganismos que causan enfermedades en las plantas, y hoy muchos de los mecanismos moleculares asociados son conocidos en detalle. No obstante, muchos otros microorganismos ejercen un efecto positivo en esta interacción, ya sea mediante acción directa sobre la planta, incrementando la disponibilidad de nutrientes en el suelo, por ejemplo, o de manera indirecta, previniendo la proliferación de ciertos fitopatógenos (Heredia-Acuña et al., 2018). Un análisis de este último grupo de microorganismos (los que influyen positivamente en el crecimiento de las plantas) es el objetivo de este capítulo.

Las bacterias que ejercen un efecto positivo sobre el crecimiento o desarrollo de las plantas se conocen de manera global como *bacterias promotoras del crecimiento vegetal* (PGPB, por sus siglas en inglés). El efecto positivo de estas bacterias se ha otorgado tradicionalmente a su capacidad para incrementar la disponibilidad de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y para sintetizar hormonas vegetales (ácido indolacético, giberelinas, etc.) (Compant et al., 2010; Glick, 2012). No obstante, en años recientes, el papel clave de estos microorganismos en la prevención y el alivio de condiciones de estrés como sequía, salinidad sódica o presencia de metales pesados sugiere que más mecanismos están en juego.

Como se discutirá en breve, de forma general, las PGPB no se encuentran agrupadas filogenéticamente. No existe un filo o una clase de bacterias con cualidades de PGPB, salvo una excepción: los rizobios. No obstante, sí existen algunas especies de las cuales múltiples cepas se han asociado con un efecto positivo sobre el crecimiento vegetal. Algunas de estas especies que contienen miembros con cualidades de PGPB son *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter chroococcum* y *Pseudomonas fluorescens*, las cuales, con diversos mecanismos, pueden afectar el crecimiento vegetal. *P. fluorescens* representa un caso particular, dado que algunas cepas de esta especie también pueden ser patógenas de plantas (Dominguez-Nuñez et al., 2014; Santoyo et al., 2016; Tsavkelova et al., 2006).

Debido a la importancia de este grupo de microorganismos en la ecología del suelo y en la promoción de cultivos de importancia económica y social, muchos esfuerzos están siendo realizados para la selección de organismos con potencial agrícola. La disminución en la aplicación de agroquímicos mediante el uso de estas tecnologías limpias puede contribuir significativamente al manejo responsable de los cultivos desde el punto de vista del calentamiento global y de la explosión demográfica. Adicionalmente,



el advenimiento de nuevas tecnologías en biología molecular abre la puerta a la generación de organismos modificados genéticamente, los cuales pueden presentar mayor potencial como insumo agrícola (Erturk et al., 2010; Ferreira et al., 2019). El uso de herramientas de biología molecular, no obstante, requiere un conocimiento profundo de los mecanismos moleculares asociados y de la ecología de los organismos en el suelo (Afzal et al., 2019). Por ejemplo, el descubrimiento de genes específicos asociados a la solubilización de fosfato podría permitir la generación de organismos que

promuevan el crecimiento de las plantas en suelos con baja disponibilidad de fósforo. Adicionalmente, un mayor conocimiento de la composición y de las interacciones del microbioma de la planta puede permitir la generación de cocteles de microorganismos que impacten en mayor medida el crecimiento de las plantas en comparación con el uso tradicional de especies individuales (Fadiji & Babalola, 2020). Los avances tecnológicos en biología molecular de los organismos y en el entendimiento de la ecología de la rizósfera prometen un cambio rentable y limpio en las técnicas de manejo de los cultivos.



Definición: bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB)

Las PGPB se refieren a las bacterias de vida libre en el suelo y a las que colonizan la rizósfera o el tejido de las plantas (PGPR: véase el capítulo 1); estas bacterias, al ser usadas como inoculante biológico, tienen un efecto positivo y medible sobre las plantas. Este efecto puede ser directo, a través del incremento en la disponibilidad de nutrientes o a través de la síntesis de moléculas que influyen benéficamente el desarrollo de la planta, o indirecto, mediante amensalismo o competencia con organismos potencialmente patógenos o mediante la prevención de estreses abióticos (Rojas-Tapias et al., 2012). El uso de PGPB en la agricultura sostenible se ha vuelto más importante en las últimas décadas, debido a sus efectos benéficos sobre el suelo y sobre la productividad de los cultivos, así como por su impacto en la reducción del uso de fertilizantes químicos, para cuya producción se emplean vastas cantidades de combustibles fósiles (Ramakrishna et al., 2019), por lo que la reducción en su uso está alineada con las políticas de conservación del medio ambiente y la desaceleración del cambio climático.

Dentro de la diversidad filogenética de microorganismos pertenecientes al grupo de las PGPB, los principales miembros están asociados a los filos Firmicutes y Proteobacteria (Chen et al., 2010; Dong et al., 2008; Rojas-Tapias et al., 2012). En el filo Firmicutes, por ejemplo, el género *Bacillus* cuenta con algunas especies con actividad promotora del crecimiento vegetal. En el filo Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, los

géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Pantoea*, *Psychrobacter*, *Enterobacter* y *Rahnella* han mostrado tener potencial, al igual que los géneros *Burkholderia* y *Achromobacter*, de la clase Betaproteobacteria (Batista et al., 2018).

Estos géneros bacterianos han sido ampliamente reportados en la literatura científica, ya que poseen diferentes actividades asociadas al desarrollo y crecimiento de distintas especies vegetales. Algunos de los mecanismos conocidos por los cuales las PGPB podrían ser benéficas para las plantas incluyen estrategias directas e indirectas; entre las primeras, encontramos: 1) fijación biológica de nitrógeno: proceso en el cual las bacterias reducen el nitrógeno atmosférico a amoníaco para su posterior asimilación por parte de las plantas; 2) solubilización y mineralización de fósforo: las bacterias pueden mineralizar fósforo orgánico o solubilizar sales insolubles de fosfato, y el fosfato liberado puede ser fácilmente asimilado por las plantas; 3) producción de sustancias estimuladoras: algunas bacterias pueden sintetizar moléculas que se asemejan a hormonas vegetales, las cuales pueden modular procesos de desarrollo en la planta, y algunos ejemplos incluyen ácido abscísico, ácido giberélico o ácido indolacético; 4) modulación de hormonas vegetales: mediante la acción de la enzima ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) desaminasa, las bacterias pueden disminuir los niveles de etileno y, por tanto, permitir un mayor crecimiento de la planta. Con respecto a las estrategias indirectas para estimular el crecimiento de las plantas, se encuentran las siguientes: 1) producción de sideróforos: estos compuestos se unen al hierro con alta afinidad, por lo que pueden ser empleados para aumentar la disponibilidad de hierro o para reducir el crecimiento de organismos patógenos; 2) producción de enzimas hidrolíticas y antibióticos: esta estrategia les permite a las bacterias prevenir o contrarrestar la actividad y efecto de organismos patógenos mediante la inhibición de su crecimiento; 3) producción de biopelículas: la producción de biopelículas sobre el tejido radicular puede disminuir el efecto negativo de una alta salinidad y sequía (Ahemad & Kibret, 2014; Etesami & Maheshwari, 2018).

El microbioma de la rizósfera

El advenimiento de las tecnologías de secuenciación masiva de ADN nos ha dado un mayor conocimiento de la distribución filogenética de las bacterias del suelo asociadas con plantas de interés agrícola. El análisis metagenómico de la rizósfera del maíz fue una de las primeras observaciones de la riqueza y abundancia relativa de las especies microbianas que habitan la rizósfera de las plantas. Al analizar la secuencia del gen 16S rARN y hacer su pirosecuenciación, Peiffer et al. (2014) observaron una variación significativa en términos de riqueza, diversidad y abundancia relativa de taxas bacterianas entre el suelo y la rizósfera del maíz, así como entre diferentes campos (Peiffer et al., 2014). Usando cuatro pares de cebadores de ADN, los autores encontraron una mayor abundancia de proteobacterias, seguidas por actinobacterias, bacteroidetes, acidobacterias y cianobacterias, entre otras. Estos resultados son, en cierta medida, consistentes con la identidad genética de los microorganismos comúnmente aislados de la rizósfera de plantas mediante técnicas convencionales de laboratorio.

Otro estudio, liderado por el mismo grupo, analizó la asociación entre plantas de maíz y su microbioma. Los resultados mostraron un efecto significativo entre el genotipo de las plantas y la diversidad microbiana asociada; igualmente, encontraron que la edad de la planta y los cambios en el clima tienen un efecto significativo sobre su composición. No obstante, esta variación contrastó con la asociación específica de ciertas especies con el genotipo de las plantas. En este estudio, en el cual se empleó la tecnología MiSeq, de Illumina, se analizó la región V4 del gen 16S rARN; el objetivo fue determinar el microbioma central asociado a las plantas de maíz, es decir, esas especies bacterianas que se encontraron asociadas en más del 80 % de las muestras de la rizósfera.





Los resultados mostraron aproximadamente 150 especies asociadas — independientemente de las variaciones ambientales—, las cuales resultaron ser filogenéticamente diversas.

La mayor parte de estas especies pertenecían a los filos Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria y Verrucomicrobia. En cuanto al filo Proteobacteria, la mayor parte de los organismos pertenecían a la clase Alphaproteobacteria, seguida por Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria y Deltaproteobacteria. Asimismo, miembros de Archaea también se encontraron asociados a la rizósfera de la planta (Walters et al., 2018).

Este estudio expone la asociación existente que se ha forjado durante el curso de la evolución entre ciertas especies microbianas y vegetales. Estas asociaciones, en algunos casos, se dan de manera neutral, es decir, sin beneficio para ambas partes, pero, en el caso de las PGPB, este efecto es benéfico para la planta y, presumiblemente, para la bacteria. Mientras la estrecha asociación entre algunos miembros de Proteobacteria y plantas de importancia agrícola ha sido claramente demostrada, poca información se tiene acerca de la interacción entre otros filos y la planta. Este hecho es explicado por el sesgo de la selección en medios de cultivo, que hace que algunas especies no se encuentren suficientemente representadas. Algunas especies anaerobias, por ejemplo, podrían desempeñar un papel importante en la nutrición de la planta, pero los métodos convencionales de aislamiento se hacen en condiciones aerobias o, a lo máximo, en condiciones de microaerofilia. Estos métodos de selección, por tanto, excluyen microorganismos anaerobios obligados, como aquellos pertenecientes a *Clostridium* spp., por ejemplo. La selección de otros microorganismos con potencial para la promoción del crecimiento vegetal, por tanto, debería realizarse en más medios de cultivo, en otras condiciones y con otras técnicas que permitan la selección de microorganismos con requerimientos nutricionales específicos o de aquellos que se encuentran en poca abundancia.



Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (canónicas)

La diversidad filogenética y funcional de las bacterias asociadas a la rizósfera de las plantas es extremadamente compleja, y su estudio nos proporciona un entendimiento más amplio de los procesos ecológicos que se dan en el suelo y de las especies que los están realizando (Compant et al., 2019; Ferreira et al., 2020), además de que provee una explicación sobre la discrepancia ocasionalmente observada entre las caracterizaciones *in vitro* del potencial de las bacterias como PGPB y los resultados en campo o invernadero. No obstante, ciertos géneros y especies microbianos tradicionalmente se han asociado a un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, y estos son el tema de esta sección. Un caso particularmente relevante es el de las bacterias con capacidad para formar nódulos con plantas leguminosas, bacterias que se encuentran principalmente, pero no de manera exclusiva, en el orden Rhizobiales del filo Proteobacteria y se conocen globalmente como *rizobios*. Estos rizobios, al poseer los mecanismos moleculares requeridos para el establecimiento de una relación simbiótica con leguminosas, en la mayoría de los casos van a tener un efecto benéfico sobre el crecimiento vegetal. De todas maneras, este grupo de organismos interactúa únicamente con un grupo definido de plantas, y por ello la investigación de otros grupos microbianos es necesaria para mejorar el crecimiento de otras especies vegetales de importancia agrícola.



Microorganismos de vida libre

Los microorganismos de vida libre son aquellos que viven en la rizósfera pero son incapaces de colonizar el tejido vegetal. Los microorganismos de vida libre, por lo tanto, exhiben un bajo grado de intimidad con la planta en comparación con los otros dos tipos de interacciones previamente mencionados: simbiosis y endofitismo mutualista. La asociación entre las bacterias de vida libre y la planta se mantiene porque los microorganismos pueden explotar las fuentes de carbono y otros nutrientes presentes en los exudados radiculares, y, en contraprestación, algunos de estos organismos pueden producir moléculas que afectan positivamente el crecimiento de la planta. Algunas de estas PGPB, por ejemplo, son capaces de producir exopolisacáridos y, por lo tanto, pueden adherirse firmemente a la raíz. La síntesis microbiana de este tipo de macromoléculas, por ejemplo, puede tener efectos positivos puesto que incrementa la intimidad de la interacción y, así, el efecto de las moléculas benéficas, además de que también puede ayudar a prevenir o aliviar estreses abióticos, como la presencia de metales pesados, la salinidad sódica o la sequía (Ahemad & Kibret, 2014; Etesami & Maheshwari, 2018; Rojas-Tapias et al., 2012).

Aunque muchas especies bacterianas caen en la categoría de *organismo de vida libre*, un enfoque especial se hará sobre dos géneros: *Azotobacter* y *Bacillus*. Este enfoque se fundamenta en la importancia de estos dos géneros como inoculantes biológicos, así como en los resultados del grupo de investigación Sistemas Agropecuarios Sostenibles, de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA), que ponen en evidencia su potencial.

Azotobacter

El género *Azotobacter* está conformado por siete especies, dentro de las cuales *A. vinelandii* y *A. chroococcum* revisten una particular importancia (Figura 2.1) multifactorial: 1) *A. vinelandii* ha sido ampliamente empleado como un organismo modelo en la fijación biológica de nitrógeno, debido a que exhibe altas tasas de fijación en condiciones aeróbicas y a que codifica en su genoma tres diferentes nitrogenasas; 2) ambas especies han mostrado ser importantes para promover el crecimiento de cultivos de interés agrícola (Rojas-Tapias et al., 2012), y 3) *A. vinelandii* tiene importancia industrial y académica, debido a su capacidad para sintetizar el polímero alginato.

- **Figura 2.1.** Descripción macroscópica de una colonia de *Azotobacter* sp. en medio de cultivo LG con azul de bromotimol.

Fuente: Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes, AGROSAVIA



El género *Azotobacter* está conformado por bacterias Gram-negativas con capacidad para formar una estructura de resistencia denominada *quiste*, la cual es estructuralmente diferente a las endosporas de *Bacillus* y otros Firmicutes y que le permite soportar condiciones adversas, como la desecación. Condiciones naturales como la limitación de nutrientes inducen el proceso de diferenciación de células vegetativas en quistes, los cuales poseen una morfología única y diferente a la de las células vegetativas. Esta estructura de resistencia está conformada por un cuerpo central y una cápsula que rodea las células: el cuerpo central se caracteriza por contener gránulos de polihidroxibutirato (PHB), mientras que la cápsula está compuesta por dos capas, llamadas *exina* e *intina* (Garrity et al., 2005).

*Otra particularidad del género *Azotobacter* es la producción de pigmentos. Aquí, es importante resaltar que la naturaleza y función de estos varía entre especies.*

A. vinelandii, por ejemplo, produce un pigmento verde y fluorescente (bajo exposición a luz ultravioleta) en medio de cultivo Ashby (Garrity et al., 2005). Este pigmento, de naturaleza proteica, es producido únicamente bajo condiciones de limitación de hierro. Debido a que se produce en respuesta a la falta de hierro y que se une a este metal con alta afinidad, se dice que actúa como sideróforo. *A. chroococcum*, por su parte, produce un pigmento de color café oscuro, el cual se identifica químicamente como una melanina. Debido a que su síntesis es inhibida bajo condiciones de limitación de oxígeno o de sus especies reactivas, se considera que la función principal de este pigmento es mediar la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés: *reactive oxygen species*), que se generan como subproducto de la respiración. En ambos casos, la producción de estos pigmentos (en ausencia de nitrógeno) permite el aislamiento y la identificación de estos organismos a partir de suelo rizosférico (Becking, 1981).



Filogenética y cromosoma

Azotobacter pertenece al subfilo γ -Proteobacteria y se encuentra relacionado con el género *Pseudomonas*. Como se mencionó anteriormente, este género consta de siete especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. nigricans*, *A. salinestris*, *A. armeniacus*, *A. beijerinckii* y *A. paspali*.

En la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), del National Center for Biotechnology Information (NCBI), actualmente se encuentra el genoma de cuatro especies de *Azotobacter*: *A. vinelandii*, *A. chroococcum*, *A. beijerinckii* y *A. salinestris*. Los cromosomas de estas especies son circulares, tienen un tamaño de ~5 Mb y cuentan con un contenido de GC del ~65%. Estas cepas, además, contienen entre 0 y 6 plásmidos. En *A. vinelandii* ha sido descrita la existencia de poliploidía, es decir, múltiples copias de un solo cromosoma en un organismo (Garrity et al., 2005).



Metabolismo

Azotobacter es un organismo organotrofo que usa azúcares o polioles como fuente de carbono. No requiere nitrógeno para crecer, dado que puede obtenerlo a través de la actividad de sus enzimas nitrogenasas. De hecho, altos niveles de nitrógeno en el medio regulan negativamente

la fijación de nitrógeno. El aislamiento de *Azotobacter*, por tanto, se hace en un medio con pocos nutrientes y que contenga manitol como fuente de carbono, fosfato y magnesio, además de altos niveles de carbonato de calcio, el cual afecta la producción de pigmentos, lo que permite hacer fácilmente la distinción de bacterias de este género en el proceso de selección (Camelo-Rusique et al., 2017).



Potencial para su uso en agricultura sostenible

El género *Azotobacter* se caracteriza por tener especies no patógenas y fijadoras de nitrógeno de vida libre; algunos aislamientos también tienen la capacidad de producir ácido indolacético, solubilizar fósforo inorgánico y producir sideróforos, por lo que este género representa una opción atractiva para el diseño de inoculantes biológicos y su aplicación en diferentes cultivos. Las especies más ampliamente usadas en inoculantes son *A. vinelandii* y *A. chroococcum*, pues son de crecimiento rápido y no tienen requerimientos metabólicos exigentes, lo que hace fácil su producción masiva. Aún más, su capacidad para formar quistes permite la generación de inoculantes de larga vida de almacenamiento.

En AGROSAVIA se ha demostrado el potencial de las cepas de *A. chroococcum* para influenciar positivamente el crecimiento de varios cultivos de interés agronómico, como el algodón, el ají y el tomate. De igual manera, se ha mostrado que algunas cepas de *A. chroococcum* disminuyen el efecto negativo de altos niveles de salinidad sódica sobre el crecimiento de las plantas, lo que tiene importancia en varios ecosistemas colombianos (Rojas-Tapias et al., 2012). Varios medios de cultivo han sido diseñados para la producción masiva de bacterias de *Azotobacter* a base de medios ya definidos o empleando residuos agroindustriales. Diferentes formulaciones con polímeros, arcillas, entre otros elementos, así como la inducción del proceso de enquistamiento para la generación de inoculantes de tiempo de almacenamiento extendido también han sido estudiadas (Camelo-Rusique et al., 2017; Moreno et al., 2011; Rojas-Tapias et al., 2012; Rojas-Tapias et al., 2013; Rojas-Tapias et al., 2015; Romero-Perdomo et al., 2015; Romero-Perdomo et al., 2017).

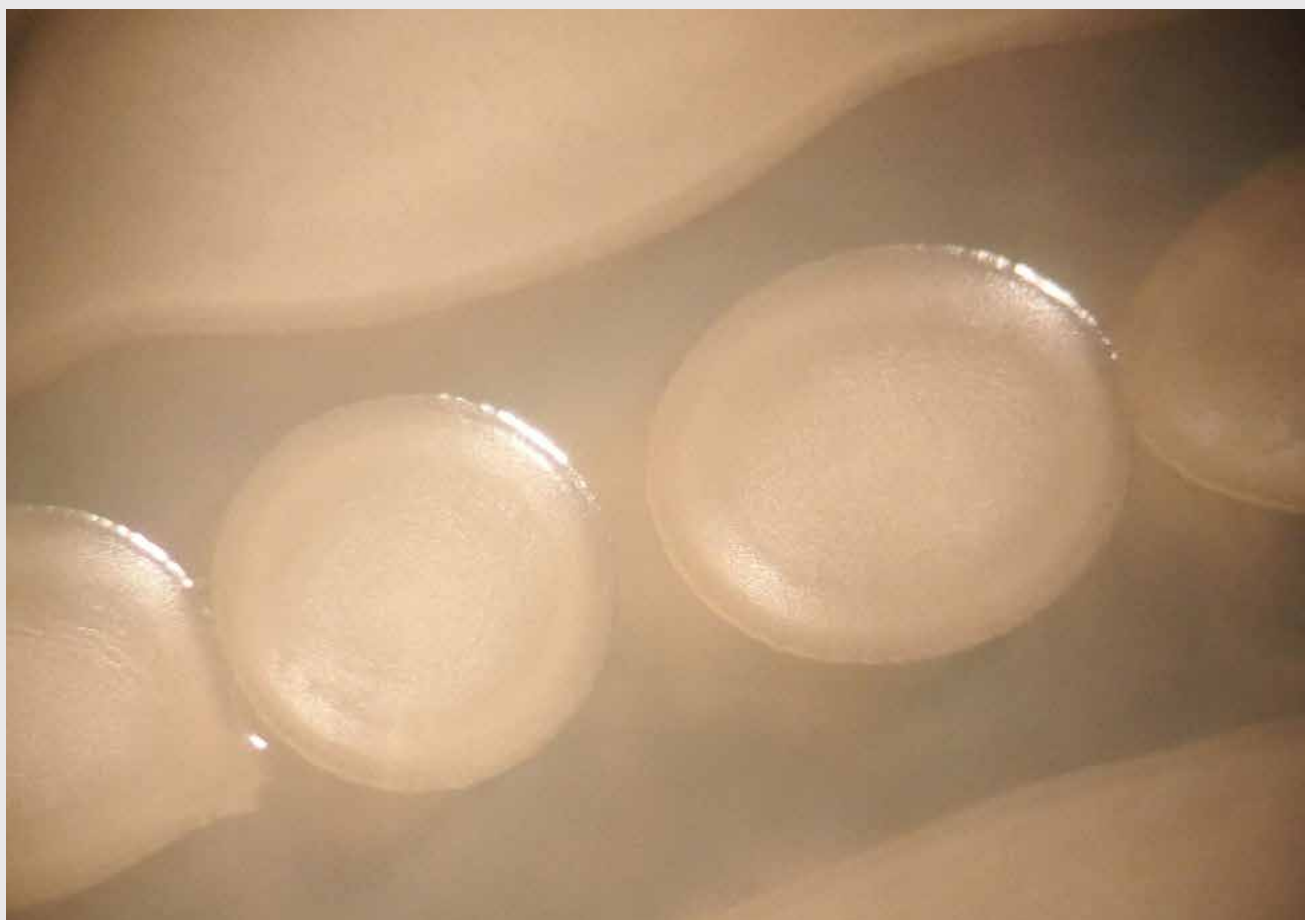
Bacillus

Este género forma parte del filo Firmicutes y consta de bacterias que tiñen positivo en la coloración de Gram. Además, es fenotípicamente diverso, pues sus células pueden ser bastones o filamentos esféricos, rectos, curvos o helicoidales, con o sin flagelos y con o sin endosporas resistentes al calor. Igualmente, son

aerobios, anaerobios facultativos o estrictos. Algunos miembros del género *Bacillus* son termófilos o halófilos (Figura 2.2). La mayoría son aislados del suelo, donde su diversidad es muy amplia, pero también se encuentran en aguas, alimentos y ambientes clínicos, y la mayoría se consideran no fitopatógenos, pues solo algunos están asociados a enfermedades humanas o animales (De Vos et al., 2009).

■ **Figura 2.2.** Descripción macroscópica de una colonia de *Bacillus* sp. en medio de cultivo CASO.

Fuente: Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes, AGROSAVIA



Filogenética y cromosoma

El género *Bacillus* pertenece a la clase Bacilli del filo Firmicutes. Este género incluye más de 200 diferentes especies, y por ello una descripción global de las propiedades de sus genomas no es conveniente. Aquí nos enfocaremos en dos de las especies del género *Bacillus* que han mostrado potencial como inoculantes biológicos: *B. subtilis* y *B. thuringiensis*. *B. subtilis* tiene un genoma de

~4,1 Mb y ~4.000 proteínas, y su contenido de GC es del 43,5%. *B. thuringiensis*, por su parte, tiene un genoma más grande, pues su tamaño promedio es de ~6,0 Mb y ~5.800 proteínas, y su contenido de GC es del 34,9%. A pesar de las considerables diferencias a nivel cromosomal, estas especies comparten ciertos determinantes moleculares, como los genes asociados al proceso de esporulación (Dworkin et al., 2006).

B. subtilis ha sido ampliamente empleado en estudios de biología molecular, y representa el modelo bacteriano por excelencia de bacterias Gram-positivas. Algunos procesos, como esporulación, formación de biopelículas, resistencia a metales y estrés oxidativo, han sido descritos en sorprendente detalle. Una de las cualidades que han permitido su clasificación como un organismo modelo es la facilidad con la que se puede manipular genéticamente (Wang et al., 2017). Recientes estudios de biología molecular de *B. subtilis* han mostrado que la formación de biopelículas por efecto del ácido málico es fundamental para el proceso de promoción del crecimiento vegetal.

Por su parte, *B. thuringiensis* ha sido ampliamente usado como agente insecticida biológico, y aunque no es clasificado como una rizobacteria, su uso está asociado a una mejora en el rendimiento de los cultivos. Este efecto positivo se debe a su capacidad para sintetizar inclusiones cristalinas o deltaendotoxinas, las cuales tienen actividad insecticida. Estas proteínas, que son producidas durante la parte tardía de la fase exponencial, son conocidas como las toxinas Cry y son codificadas por los genes cry, los cuales no residen en el cromosoma sino, normalmente, en plásmidos. La familia de genes cry es una gran familia de genes homólogos que codifica proteínas con actividad específica en contra de solo algunas especies de insectos. Cuando las proteínas son ingeridas por los insectos, son solubilizadas y modificadas, para convertirse, luego, en toxinas activas (Tabashnik, 1994).



Metabolismo

La mayoría de las bacterias del género *Bacillus* crecen de manera óptima en medios de cultivo rutinarios, como agar nutritivo, agar tripticasa de soya o agar sangre. Sin embargo, se han desarrollado medios químicamente definidos para facilitar su aislamiento específico o para optimizar procesos industriales. La mayoría de las especies utilizan glucosa como fuente de

carbono, aunque existen otras que tienen la versatilidad de utilizar otras fuentes de carbono, como ácidos orgánicos y aminoácidos. Asimismo, las bacterias del género *Bacillus* pueden usar fuentes inorgánicas y orgánicas de nitrógeno. Los rangos de temperatura para un crecimiento óptimo varían en este género, aunque la mayoría crece a 30 °C; sin embargo, también se han encontrado bacterias del género en ambientes con temperaturas extremas (entre 5 °C y 75 °C) (De Vos et al., 2009), y, de hecho, las termófilas son importantes en los procesos de compostaje.

Muchas especies del género *Bacillus* pueden usar nitrato como aceptor de electrones en ausencia de oxígeno, pero algunas otras, como *B. megaterium* y *B. pumilus*, no lo pueden hacer. *B. subtilis*, por ejemplo, puede usar amonio, nitrato, aminoácidos, algunas purinas, urea, ácido úrico, alantoina y péptidos como fuentes de nitrógeno.



Potencial para su uso en agricultura sostenible

El género *Bacillus* es sistemáticamente muy amplio, y por ello la selección de especies promotoras se basa en su identidad filogenética. Para su aislamiento selectivo, se suele aprovechar la termorresistencia de sus esporas. En particular, se buscan miembros de las especies *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* o *B. megaterium* para la formulación de inoculantes debido a su potencial demostrado para promover el crecimiento vegetal a través de diversos mecanismos, su aplicación segura, su rápido crecimiento y su fácil producción a gran escala, además de que forman una estructura de resistencia denominada *espora*. En AGROSAVIA se ha demostrado el potencial de consorcios de *Bacillus* en la disminución del estrés hídrico en ambientes secos en pasto guinea y en maíz (Moreno-Galván, Romero-Perdomo et al., 2020; Moreno-Galván, Cortés-Patiño et al., 2020). Asimismo, actualmente se estudia la bacteria *B. thuringiensis* para el control de insectos en varios cultivos.



Microorganismos endófitos

Se define como *microorganismo endófito benéfico* a aquel capaz de colonizar los tejidos de la planta y establecer una relación mutualista con esta. A diferencia de la interacción entre rizobios y leguminosas, la interacción entre endófitos y plantas no requiere mecanismos moleculares sofisticados y, más bien, se basa en la capacidad del microorganismo para invadir los tejidos vegetales sin causar enfermedad. La colonización endofítica del huésped por la bacteria está determinada por una combinación de diferentes rasgos bacterianos referidos colectivamente como *rasgos de colonización*, los cuales regulan todo el proceso de colonización de las plantas. Este proceso, que implica una comunicación compleja entre los dos socios, generalmente comienza desde las raíces y requiere el reconocimiento de compuestos específicos en los exudados de la raíz por parte de las bacterias endofíticas (Afzal et al., 2019; Elmerich & Newton, 2007; Hallmann et al., 1997).

*En este grupo se han clasificado varios microorganismos, entre los cuales *Azospirillum* y *Herbaspirillum* ocupan un lugar principal, por lo que serán descritos a continuación.*

Azospirillum

El género *Azospirillum* es una de las PGPB más ampliamente estudiadas y utilizadas comercialmente en la agricultura. Pertenece a la clase Alphaproteobacteria y es una bacteria fijadora de nitrógeno que ejerce un efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas y el rendimiento de muchos cultivos (Figura 2.3). El efecto de su inoculación sobre pastos, cereales y legumbres ha sido mostrado en gran

nivel de detalle. Por ejemplo, se ha evidenciado que su uso causa efectos morfológicos pronunciados en las raíces de las plantas, cambios principalmente asociados a la proliferación de los pelos radiculares, los cuales se asocian, a su vez, a la síntesis de hormonas de tipo vegetal por parte del microorganismo. La extensión del área radicular tiene un efecto directo sobre el crecimiento de las plantas, puesto que influye positivamente en la adquisición de nutrientes del suelo (Cassán & Diaz-Zorita, 2016).

- **Figura 2.3.** Descripción macroscópica de una colonia de *Azospirillum* sp. en medio de cultivo DYGS.
Fuente: Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes, AGROSAVIA



El género *Azospirillum* se caracteriza por tener forma de bacilo, ligeramente curvado y recto, y por teñir negativo en la coloración de Gram. Estas bacterias suelen contener gránulos intracelulares de poli- β -hidroxibutirato y son móviles tanto en medios de cultivo líquidos, mediante un único flagelo polar, como en medios sólidos, mediante flagelos laterales de longitud de onda más corta (Baldani et al., 2015).



Filogenética y cromosoma

El género *Azospirillum* consta de 15 especies fijadoras de nitrógeno y una no fijadora. Su estudio filogenético se ha basado primariamente en el análisis del gen 16S rARN. Los análisis iniciales, que incluyeron las primeras 5 especies descritas, indicaron que *A. brasilense*, *A. lipoferum* y *A.*

halopraeferens forman un linaje sólido, mientras que *A. amazonense* y *A. irakense* se segregan en un clado independiente. Con la adición de más especies a través de los años, los grupos *A. brasilense* y *A. lipoferum* crecieron en complejidad (Domingues Duarte et al., 2020), por lo que, como consecuencia, comúnmente se obtiene una baja confianza al definir las interrelaciones filogenéticas entre especies cercanas, particularmente dentro del grupo *A. lipoferum*, por medio de secuencias de 16S rARN. También se han encontrado inconsistencias al identificar nuevos aislamientos (Baldani et al., 2015).

Actualmente, en las bases del GenBank, del NCBI, se encuentran registrados 77 genomas asociados a *Azospirillum*, de los cuales *A. brasilense* es el más reportado. Este genoma presenta una longitud aproximada de 7 Mb y un contenido de gc del 64%-71% (Maroniche et al., 2017).



Metabolismo

Azospirillum puede metabolizar diversas fuentes de carbono, incluyendo ácidos orgánicos, carbohidratos, polioles, y aminoácidos. Esta versatilidad es crítica ya que le permite adaptarse fácilmente a diferentes nichos, incluyendo la rizósfera y el suelo.

Azospirillum es capaz de tomar el nitrógeno atmosférico y convertirlo en amonio gracias a la presencia del complejo nitrogenasa. A diferencia de *Azotobacter*, aquí la fijación biológica de nitrógeno únicamente ocurre bajo condiciones de microaerofilia, es decir, en presencia de bajas tensiones de oxígeno, pues altas concentraciones de este elemento afectan directamente el complejo nitrogenasa y suprimen su actividad. En el género *Azospirillum*, la fijación de nitrógeno también es afectada por la concentración de amonio en el ambiente: el mecanismo asociado es fascinante, puesto que involucra una ADP-ribosil transferasa, la cual, en presencia de altos niveles de amonio, modifica covalentemente la dinitrogenasa reductasa y la hace inactiva. Cuando la concentración de amonio disminuye, una enzima glucohidrolasa (específica para una de las subunidades de la dinitrogenasa reductasa) remueve el grupo inactivante y restaura la actividad de fijación biológica de nitrógeno (Baldani et al., 2015; Cassán & Diaz-Zorita, 2016; Pedrosa et al., 2019).

Azospirillum crece bien en sales de ácidos orgánicos, como malato, succinato, lactato y

piruvato, y azúcares, aminoácidos y alcoholes de azúcar también pueden funcionar como fuentes de carbono. Debido a su versatilidad para tomar diferentes fuentes de carbono y a su metabolismo asociado al nitrógeno, se adapta fácilmente a varias condiciones del suelo y es competente para colonizar la rizósfera y, en algunos casos, los tejidos vegetales internos, como se describió anteriormente. La fijación biológica de nitrógeno depende de condiciones microaerófilas, pero *Azospirillum* crece bien bajo una atmósfera de aire en presencia de una fuente de nitrógeno fijo, como amonio o sales de glutamato. Células previamente cultivadas en presencia de una fuente de nitrógeno inorgánico pueden fijar nitrógeno en aire siempre que se agote todo el nitrógeno agregado y la nitrogenasa se active (Cassán & Diaz-Zorita, 2016).

Para su aislamiento, se emplea un medio semisólido sin nitrógeno, el cual contiene ácido málico como fuente de carbono y pH neutro. Esta condición semisólida es importante para producir el ambiente microaerófilo que le permite al organismo sintetizar el complejo nitrogenasa e iniciar la fijación biológica de nitrógeno. El ácido málico, por su parte, es importante puesto que se encuentra asociado al exudado radicular de varias plantas, lo que ha mostrado ser determinante en la interacción entre el microorganismo y la planta (Baldani et al., 2015). Esta fuente de carbono ha mostrado influir sobre la composición microbiana de la rizósfera, y su importancia en la interacción planta-microorganismo es evidente por los mecanismos quimiotácticos empleados por las bacterias para detectar este compuesto.



Potencial para su uso en agricultura sostenible

Azospirillum representa un grupo de microorganismos con alto potencial para su uso como inoculante biológico, principalmente en gramíneas. Las especies de *Azospirillum* son usualmente ávidas productoras de ácido indolacético, y se caracterizan por ser endófitas. *Azospirillum* no tiene requisitos nutricionales exigentes, y por tanto su producción masiva se puede hacer con relativa facilidad. En AGROSAVIA se cuenta con una colección importante de bacterias de este género, recuperadas de diferentes pastos, maíz, caña de azúcar y otras gramíneas. Su potencial promotor se ha mostrado en diversos suelos y en diferentes condiciones climáticas (Cassán et al., 2020).

Herbaspirillum

Herbaspirillum es un género clasificado como PGPB que tiene la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fósforo y producir sideróforos, además de que modula el desarrollo radicular por medio de la producción de diferentes reguladores del crecimiento vegetal (Alves et al., 2015). *Herbaspirillum* pertenece a la clase Betaproteobacteria y normalmente se encuentra asociado a especies vegetales de gramíneas, incluyendo sorgo, arroz y pasturas (Figura 2.4). Algunos géneros se han aislado de nódulos en frijol, y también se han encontrado en plantas de musáceas y algunos frutales, como piña. Se han estudiado como inoculantes en cultivos de maíz, caña de azúcar, arroz y pasturas

asociadas a sistemas silvopastoriles en modo de interseembra. Adicionalmente, se han estudiado en procesos de fitorremediación, estimulando la fitoextracción de metales pesados por medio de la producción de compuestos asociados a la promoción del crecimiento vegetal (Govarthanan et al., 2016; Gu & Mitchell, 2006; Praburaman et al., 2017).

Herbaspirillum es un bacilo Gram-negativo de forma generalmente vibrioide, aunque algunas veces se puede observar en forma de espirilo; es un microorganismo con característica motil debido a sus flagelos polares. En presencia de azúcares como glucosa, galactosa, arabinosa, manitol o glicerol como única fuente de carbono, las células tienden a alargarse (Garrity et al., 2005).

- **Figura 2.4.** Descripción macroscópica de una colonia de *Herbaspirillum* sp. en medio de cultivo DYGS.
Fuente: Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes, AGROSAVIA





Filogenética y cromosoma

El género *Herbaspirillum* consta de 14 especies descritas hasta la fecha, algunas de las cuales son conocidas por colonizar tejidos de las plantas, y otras pueden ser patógenas humanas al producir fibrosis quística y leucemia linfoblástica, aunque la forma como se desarrollan estas enfermedades aún no es del todo clara (Monteiro et al., 2012).

El genoma de *Herbaspirillum seropedicae* Z67 tiene un tamaño de ~5,5 Mb y 4.804 genes, y su contenido de gc está entre el 60 % y el 65 %. Los genes estructurales que codifican para el complejo nitrogenasa se encuentran localizados en el operón *nifHDKENXHsero_2847Hsero_2846fdxA*. Dentro de los genes codificantes para la proteína estructural de la nitrogenasa se identificaron *nifHDK* y *nifDK*. Adicionalmente, se identificaron los genes *nifN*, asociados a la actividad de la nitrogenasa bajo crecimiento limitado por oxígeno. Por otra parte, se evidenciaron 27 genes asociados al transporte y metabolismo del hierro, el cual puede ser ventajoso en el momento de competir en suelos con limitaciones de este elemento, y se identificaron genes asociados a la biosíntesis de auxinas que ayudan a la producción de ácido indolacético a partir del precursor triptófano (Chubatsu et al., 2012; Garrity et al., 2005; Pedrosa et al., 2011).



Metabolismo

El cultivo *in vitro* de *Herbaspirillum* se realiza en un medio semisólido libre de nitrógeno y con bajas tensiones de oxígeno. Los medios más reportados para su aislamiento son JNFB y NFB, los cuales contienen, como única fuente de carbono, ácido málico; no obstante, *Herbaspirillum* tiene la versatilidad de utilizar varias fuentes de carbono, incluyendo ácidos orgánicos como el pirúvico, el succínico y el fumárico. La fijación de nitrógeno de *Herbaspirillum* ocurre bajo condiciones microaerobias y es estrechamente regulada por compuestos de nitrógeno, tanto a nivel de síntesis como de actividad. *Herbaspirillum seropedicae* puede asimilar o desasimilar nitrato a nitrito bajo limitación de oxígeno, pero sin crecimiento anaeróbico dependiente de nitrato (Gu & Mitchell, 2006).



Potencial para su uso en agricultura sostenible

Herbaspirillum sp. es un microorganismo muy versátil metabólicamente, y posee varios mecanismos asociados a la promoción del crecimiento vegetal, lo que lo hace un gran candidato para su uso en cultivos agrícolas. Estudios en diferentes especies vegetales, particularmente gramíneas, han demostrado resultados relevantes.

En AGROSAVIA se han llevado a cabo varios estudios con pasturas en sistemas silvopastoriles, utilizando Herbaspirillum sp. como un potencial microorganismo promotor de crecimiento asociado a la actividad de solubilización de fósforo, y se ha evidenciado una mejora en la calidad del forraje.



Microorganismos que forman estructuras especializadas: rizobios

La mayor parte de las especies de rizobios se encuentran agrupadas en la clase Alphaproteobacteria, y algunas otras especies no canónicas se encuentran en la clase Betaproteobacteria.

Debido a su importancia agrícola, este grupo de microorganismos ha sido ampliamente estudiado, y hoy en día provee uno de los mejores ejemplos a nivel molecular de los mecanismos que involucran una relación de simbiosis en la naturaleza. Esta simbiosis se basa en la formación de una estructura vegetal especializada denominada *nódulo*, la cual se localiza en las raíces de las plantas, aunque en algunas ocasiones se ha hallado asociada también a sus tallos. Esta estructura proporciona un ambiente privilegiado para el crecimiento de las bacterias, puesto que provee protección en condiciones medioambientales adversas y un suministro ilimitado de nutrientes provenientes de la planta; en contraprestación, la bacteria provee una fuente ininterrumpida de nitrógeno, el cual se adquiere mediante la fijación biológica de nitrógeno molecular (N_2) (Van Rhijn & Vanderleyden, 1995).

Rizobios

Los *rizobios* son microorganismos fijadores de nitrógeno capaces de formar una estructura especializada denominada *nódulo* con plantas leguminosas. La fijación de nitrógeno, no obstante, solamente puede ocurrir con el establecimiento de la simbiosis, cuando las células bacterianas se diferencian en bacteroides (Compant et al., 2010). El aislamiento de rizobios en laboratorio, por lo tanto, debe hacerse a partir de nódulos en un medio de cultivo que contenga nitrógeno en forma de sulfato de amonio, por ejemplo (Figura 2.5).

- **Figura 2.5.** Descripción macroscópica de rizobios. *a.* Colonias de *Bradyrhizobium* sp. en medio YMA con rojo Congo; *b.* Colonia de *Rhizobium* sp. en medio YMA con rojo Congo.

Fuente: Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes, AGROSAVIA



El proceso de establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa ha sido estudiado en detalle, e involucra complejos procesos de quimiotaxis, señalización y diferenciación celular.

Primero, la planta atrae a los rizobios por medio de los exudados radiculares, los cuales contienen fuentes de carbono que los rizobios pueden utilizar. Después, la planta secreta compuestos flavonoides, los cuales son específicamente detectados por la bacteria e inducen la formación del factor *Nod* por los rizobios. El factor *Nod* es un lipopolisacárido formado por subunidades de N-acetilglucosamina modificadas con cadenas lipídicas y que se encuentra codificado por los genes *nod*. La percepción del factor *Nod* por la planta conlleva a cambios en los pelos radiculares, los cuales permiten la invasión del rizobio. En algunos casos, la invasión también se puede dar a través de lesiones en la epidermis vegetal. Una vez que los rizobios han entrado a la planta, empiezan a dividirse e invadir el tubo de infección. Al mismo tiempo, el proceso de desarrollo del nódulo inicia en el córtex de la raíz, y eventualmente los rizobios son capaces de invadir el citoplasma de las células del nódulo, donde ocurre la diferenciación en bacteroides. Los rizobios diferenciados en bacteroides son capaces de fijar nitrógeno molecular, como se describió anteriormente. La interacción entre rizobios y leguminosas, que resulta en la formación del nódulo, es estrictamente mutualista. La bacteria le provee a la planta una fuente directa de nitrógeno, y, en contraprestación, la planta le provee carbono y energía en forma de ácidos dicarboxílicos (Van Rhijn & Vanderleyden, 1995).

La mayor parte de los rizobios se encuentra dentro de la clase Alphaproteobacteria y el orden Rhizobiales. Un total de seis géneros de rizobios se han descrito dentro de Alphaproteobacteria: *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Alorhizobium*, *Azorhizobium* y *Rhizobium*, los cuales poseen propiedades metabólicas diferentes, pero comparten su capacidad simbiótica. En los últimos años, no obstante, se han encontrado ejemplos de rizobios que no caben dentro del orden Rhizobiales o dentro de la descripción convencional de este grupo; algunos de ellos, por ejemplo, se han encontrado dentro de los géneros *Burkholderia* y *Pantoea*. Se cree que esto se debe a la transferencia horizontal de genes entre Rhizobiales y bacterias de otros géneros. En estas especies, los módulos de genes requeridos para el establecimiento de simbiosis se pueden encontrar alojados en plásmidos conjugativos (Brenner et al., 2005).



Filogenética y cromosoma

Los rizobios, como grupo, exhiben genomas de gran tamaño (5-10 Mb) en comparación con otras bacterias, lo que puede estar asociado con la amplia variedad de nichos en los que los rizobios son encontrados y con los procesos de infección del huésped y de diferenciación dentro del nódulo. Como se discutirá más adelante, los rizobios suelen ser capaces de usar una amplia diversidad metabólica, lo que les permite usar varias fuentes de carbono y nitrógeno, incluso en condiciones de baja disponibilidad. Dentro de sus genomas, muchos de los genes están dedicados al transporte, la regulación y el metabolismo; por ejemplo, algunos rizobios pueden contener más de 150 transportadores dependientes de ATP (en comparación con los cerca de 50 en *Escherichia coli*), lo que les permite usar un amplio rango de nutrientes en ambientes oligotróficos (Wang et al., 2019).

Adicionalmente, pueden contener uno o varios plásmidos, los cuales oscilan dramáticamente en tamaño, y pueden contener (o no) genes *core* (comunes entre un conjunto de genomas). *Sinorhizobium meliloti*, por ejemplo, contiene dos plásmidos: pSymA y pSymB, los cuales se conocen como megaplásmidos, con tamaños de 1,4 Mb y 1,7 Mb, respectivamente. El plásmido pSymA contiene los genes requeridos para la fijación biológica de nitrógeno y para la elaboración del factor *Nod*, mientras que pSymB contiene los genes requeridos para la infección del huésped y otros esenciales para el crecimiento de *S. meliloti* (Jiménez-Zurdo et al., 2020). En contraste, en los rizobios del género *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*, los genes de simbiosis se encuentran alojados en el cromosoma.

Los plásmidos que codifican proteínas de simbiosis son transferibles y, por tanto, pueden ser movilizados a otros microorganismos mediante conjugación. De la misma manera, los genes cromosomales de simbiosis y fijación de nitrógeno en algunas bacterias, como *Mesorhizobium*, pueden ser transferidos horizontalmente debido a que se encuentran localizados dentro de *elementos integrativos-conjugativos*. Estos elementos genéticos se consideran elementos movilizables puesto que se pueden escindir del cromosoma, circularizar y transferir a recipientes apropiados. Esta movilización es posible debido a que estos elementos contienen genes que codifican para

el sistema de secreción tipo IV, el cual permite la transferencia horizontal por conjugación. Además de genes de transferencia, estos elementos integrativos-conjugativos contienen otros genes (como los de simbiosis) que pueden proporcionar una ventaja competitiva tanto a la cepa donadora como a la receptora. En algunas especies, el proceso de transferencia puede ser inducido por señales específicas en los exudados radiculares o por *quorum sensing* (Wakimoto et al., 2020).



Metabolismo

El metabolismo en rizobios puede estudiarse desde dos diferentes ángulos. Primero, cuando se encuentran en la rizósfera, como microorganismos de vida libre, y segundo, cuando residen dentro del nódulo y están diferenciados en bacteroides. Este paralelo es posible porque los programas celulares de los rizobios en ambos estadios son remarcablemente diferentes. En el suelo, los rizobios habitan un ambiente oligotrófico, con gradientes de oxígeno y pH, y son biológicamente diversos. Además, allí la lucha por un nicho que provea las condiciones adecuadas para su proliferación es feroz, por lo que una capacidad metabólica amplia resulta ser una ventaja competitiva. Eso hacen los rizobios: son capaces de emplear una amplia variedad de fuentes de carbono y nitrógeno, lo que les permite proliferar y eventualmente alcanzar la raíz para iniciar el complejo proceso de infección y simbiosis. En contraste, la vida dentro del nódulo es altamente privilegiada. La planta les provee a las bacterias una fuente casi ilimitada de carbono en forma de ácidos orgánicos, y la bacteria, ahora diferenciada, tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, lo que le provee una fuente ilimitada de este elemento; además, tanto los gradientes químicos y físicos, tan comunes en el suelo, como la competencia con otros microorganismos desaparecen.

En general, los rizobios tienen la capacidad de metabolizar un amplio espectro de fuentes de carbono y nitrógeno, pero, como categoría, tienen representantes en al menos ocho diferentes géneros bacterianos. Como se mencionó antes, seis géneros se encuentran en la clase Alphaproteobacteria, y dos, en la clase Betaproteobacteria. La capacidad metabólica, por tanto, difiere significativamente entre los miembros de los rizobios. Uno de los ejemplos más relevantes de esta diversidad es dado por

algunos miembros de *Bradyrhizobium* que pueden realizar fotosíntesis, y otro ejemplo está en *Azorhizobium*, el cual puede fijar nitrógeno como organismo de vida libre (Brenner et al., 2005).

Tradicionalmente, los rizobios se han clasificado, con base en su velocidad de crecimiento, como rizobios de crecimiento rápido, intermedio y lento (Wang et al., 2019). Si bien estas diferencias en la velocidad de crecimiento no se asocian con su potencial para establecer simbiosis, sí tienen implicaciones importantes en la producción biotecnológica de productos a base de estos microorganismos. En general, el aislamiento de los rizobios se realiza en un medio de cultivo que contiene manitol como fuente de carbono, aunque estos organismos son generalmente versátiles y pueden crecer a expensas de otras fuentes de carbono. En la producción de inoculantes, incluso subproductos industriales pueden ser usados para promover el crecimiento de estos microorganismos. Los rizobios son generalmente aerobios, pero el hecho de que la tensión de oxígeno en el nódulo sea baja parece sugerir que condiciones de microaerofilia también permiten el crecimiento de este grupo (Wang et al., 2019). Adicionalmente, algunas especies pueden emplear nitrato como aceptor final de electrones, y, por lo tanto, algunos rizobios son anaerobios facultativos.



Potencial para su uso en agricultura sostenible

Entre todos los géneros de PGPB, los rizobios ocupan una posición prominente, debido a su indiscutible potencial como biofertilizantes, pues no solamente son capaces de formar una estructura especializada que provee a las plantas una fuente ilimitada de nitrógeno, sino que también pueden ser usados en otros cultivos debido a sus cualidades de promoción del crecimiento, incluyendo la solubilización de fosfatos y la producción de ácido indolacético, entre otras, y al hecho de que no son patógenos de humanos. Dado que su asociación con leguminosas es específica, la inoculación temprana de las plantas garantiza casi completamente el éxito de la infección y, por tanto, sus efectos benéficos. Adicionalmente, el grupo de las leguminosas incluye una vasta variedad de plantas de alta importancia económica y nutricional, lo que



hace a este grupo de plantas y a su interacción con rizobios particularmente relevantes. Como se mencionó anteriormente, los requerimientos nutricionales de los rizobios son simples, por lo que, de forma general, este grupo de bacterias es fácil de producir a gran escala. Una de las limitaciones, no obstante, es la velocidad de crecimiento de algunas especies, pues, en cultivo líquido, puede tomar cerca de una semana; sin embargo, la continua búsqueda de nuevas especies, así como la evaluación de nuevas técnicas de crecimiento y aditivos, prometen reducir estos tiempos.

En la Colección de Microorganismos con Interés en Biofertilizantes de AGROSAVIA se almacena una amplia colección de rizobios con diferentes especificidades de asociación. Estos han sido empleados para la fertilización de cultivos de consumo humano, como frijol, lenteja o arveja, entre otros; para cultivos de consumo animal, como alfalfa o trébol, y para la implementación de los elementos arbóreos en sistemas silvopastoriles, como leucaena o acacia. También se han logrado algunos avances en su producción masiva, incluyendo su producción a gran escala y su almacenaje a largo plazo. Por muchos años, AGROSAVIA ha comercializado productos a base de rizobios para su aplicación en diferentes cultivos (Rhizobiol Arveja); sin embargo, la investigación técnica continúa para su expansión a otros cultivos y una producción más eficiente (Rojas T. et al., 2009). Así, recientemente, el uso de rizobios ha sido expandido a cultivos de gramíneas en los que, a pesar de no establecerse una relación simbiótica como la previamente descrita, el efecto positivo de su aplicación es también indudable.

Mecanismos de interacción planta-microbio: lecciones desde el patosistema modelo de tomate-*Pseudomonas syringae*

En el curso de la evolución, las plantas han desarrollado y usado distintas formas de defensa ante el ataque de los microorganismos. Por ejemplo, la presencia de paredes celulares gruesas, de una capa cerosa de cutícula o de una capa externa de corteza que cubre el exterior del tallo es una estrategia de protección física que previene la entrada de microorganismos al interior de las células vegetales. No obstante, cuando un microorganismo atraviesa dichas barreras físicas, se activan, por parte de la planta, mecanismos de defensa adicionales llamados PTI (*pattern-triggered immunity*) y ETI (*effector-triggered immunity*) (Dangl & Jones, 2001; Jones & Dangl, 2006).

El proceso de reconocimiento inicial de los microorganismos por parte de las plantas, en general, se da por la presencia de ciertas características moleculares de las bacterias que las plantas pueden detectar mediante proteínas receptoras localizadas en la superficie de las células vegetales. La proteína flagelina (una subunidad del flagelo en organismos con motilidad flagelar) (Felix et al., 1999), el factor de elongación EF-Tu (una proteína abundante requerida para el proceso de traducción) (Kunze et al., 2004), el peptidoglicano (un componente esencial de la pared celular bacteriana en la mayor parte de las bacterias) (Büttner, 2016) o la quitina fúngica (componente de la pared en hongos) (Ito et al., 1997) son solo algunos ejemplos de estos patrones moleculares asociados a microbios, que se conocen como MAMP (*microbe-associated molecular patterns*). Debido al alto nivel de conservación de dichas características, tanto en bacterias patógenas como en PGPB, su reconocimiento produce la activación de una respuesta basal o PTI, la cual se describe a continuación. Como resultado de la inducción de esta primera capa de defensa, se incrementa la producción de ROS y se activan las cascadas de señalización tipo quinasa, entre otras respuestas, que logran restringir el crecimiento de los microorganismos (Zipfel, 2014).

La PTI es un mecanismo de resistencia basal que provee una respuesta inmune robusta ante el ataque

de muchos microorganismos; no obstante, algunos microorganismos patógenos han evolucionado para reprimir la PTI. Su estrategia consiste en producir y secretar proteínas de virulencia llamadas *efectores* en el interior de la célula vegetal, a través del inyectosoma o sistema de secreción tipo III (Büttner, 2016). En respuesta, las plantas han desarrollado una segunda capa de defensa incorporando proteínas receptoras intracelulares, las cuales detectan la actividad de los efectores una vez que son translocados al interior de la célula huésped durante el proceso de infección. El reconocimiento del efector por parte del receptor intracelular lleva a la activación de la ETI, la cual se asocia con la muerte celular del tejido vegetal infectado, lo que impide la multiplicación del patógeno y la colonización del huésped (Jones & Dangl, 2006).

Gracias al descubrimiento del sistema de secreción tipo III en bacterias patógenas de plantas y animales, se ha podido determinar su importancia en la interacción bacteria-huésped. Un ejemplo ampliamente estudiado es la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) (Roine et al., 1997). *Pst* DC3000 es una de las cepas mejor caracterizadas debido a su capacidad para infectar a la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, así como al tomate (*Solanum lycopersicum*) (Preston, 2000). *Pst* DC3000 cuenta con un total de 36 efectores, dentro de los cuales AvrPto es uno de los más estudiados (Buell et al., 2003; Ronald et al., 1992). En el momento de la infección, el sistema de secreción tipo III moviliza el efector AvrPto desde el citoplasma de la bacteria hacia el citoplasma de la célula vegetal huésped, donde el efector es detectado por el receptor intracelular Pto (Martin et al., 1993). La interacción proteína-proteína entre AvrPto y Pto recluta la proteína Prf, la cual reconoce este complejo de proteínas y cuya presencia confiere resistencia ante cepas de *Pst* que expresen el efector AvrPto (Pedley & Martin, 2003; Salmeron et al., 1996). Es así como *Pst* y *S. lycopersicum* conforman un patosistema que ha permitido el estudio de la especificidad huésped-patógeno.



Al igual que *Pst*, las PGPB, como *Rhizobium*, emplean el sistema de secreción tipo III para infectar a su planta hospedera (Schmeisser et al., 2009). Sin embargo, a diferencia de la actividad parasítica de *Pst* sobre el tomate, las PGPB interactúan de manera mutualista con el huésped, lo que indica la presencia de mecanismos de supresión de la respuesta inmune de la planta, y esto les permite a las PGPB evadir el reconocimiento por parte de la PTI e infectar exitosamente a su huésped. Por esta razón, la interacción planta-rizobio se ha establecido como un modelo para estudiar las estrategias empleadas por este endosimbionte para colonizar plantas leguminosas.

Las bacterias PGPB poseen ciertos patrones moleculares, como la presencia de flagelina y la secreción de exopolisacáridos (EPS) o lipoquitooligosacáridos (LCO), los cuales están asociados con la evasión de la detección de la bacteria por parte de la planta (Liang et al., 2013; Poole et al., 2018). Por ejemplo, la PGPB *Burkholderia phytofirmans*, cuya flagelina contiene el patrón molecular flg22, reconocido por la proteína receptora del huésped FLS2, provoca una respuesta inmune débil en comparación con la respuesta de otras bacterias fitopatógenas en plantas de mora (Trdá et al., 2014). Por otro lado, la percepción de *Rhizobium* por parte de las plantas leguminosas está asociada a la presencia de EPS. Con la identificación de la proteína receptora Epr3 en la planta leguminosa silvestre *Lotus japonicus*, se ha podido establecer que la unión de las moléculas de EPS con el receptor Epr3 contribuye a la supresión de la reacción inmune (Kawaharada et al., 2015). Por último, los LCO o factores *Nod* sintetizados por *Rhizobium* han demostrado tener la capacidad de bloquear la activación

de PTI en plantas como *Arabidopsis thaliana*, tomate, maíz y soya (Liang et al., 2013). En conclusión, las PGPB han desarrollado estrategias efectivas para modular la amplitud de la respuesta inmune en el nivel de la PTI, con el fin de asegurar un proceso de infección exitoso en las plantas.

El análisis de genomas y estudios de mutagénesis en rizobios han revelado la presencia de genes codificantes para el sistema de secreción tipo III. Si bien esta maquinaria es considerada exclusiva para patógenos de plantas y animales, su presencia en PGPB como *Rhizobium* sugiere una función en la interacción simbiótica entre la bacteria y la planta leguminosa (Marie et al., 2001; Tampakaki, 2014). Algunas otras bacterias en las que también se han reportado sistemas de secreción son *Sinorhizobium fredii* NGR234 (Viprey et al., 1998), *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (Krause et al., 2002) y *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (Okazaki et al., 2010). En *Rhizobium*, los genes codificantes del sistema de secreción se encuentran presentes en el plásmido pSym y se expresan en respuesta a la percepción de flavonoides liberados por la raíz de la planta (Tampakaki, 2014). No obstante, la presencia del sistema de secreción tipo III en algunos rizobios no indica que esta maquinaria sea ubicua entre ellos. Adicionalmente, la presencia de este sistema de secreción no se correlaciona con el rango hospedero de la bacteria simbiótica o con que dicha maquinaria sea funcional y secrete proteínas de virulencia durante el proceso simbiótico (Marie et al., 2001), de manera que aún se desconoce con exactitud cuál es la contribución del sistema de secreción tipo III en la simbiosis *Rhizobium*-planta.

Avances en el estudio de las proteínas efectoras, el sistema de secreción tipo III y su papel en la simbiosis han sido ampliamente reportados en las cepas *S. fredii* y *M. loti* NGR234. Las proteínas translocadas por el sistema de secreción tipo III en *Rhizobium* se han denominado *nops* (*nodulation outer proteins*), siguiendo el modelo de nomenclatura utilizado en *Yersinia* (Marie et al., 2001). Dichas proteínas han mostrado tener un efecto benéfico e inducir genes relevantes en la simbiosis con el objetivo de suprimir la respuesta inmune de la planta y de incrementar la eficiencia de nodulación. Además del transporte de las *nops* por parte del sistema de secreción tipo III de *Rhizobium*, se ha reportado la presencia de proteínas efectoras pertenecientes a las familias YopT y YopJ, las cuales tienen ortólogos en las bacterias *Erwinia* y *Pst* (Hotson & Mudgett, 2004; Marie et al., 2001). No obstante, a diferencia del caso de las bacterias fitopatógenas, el sistema de secreción tipo III en *Rhizobium* no es esencial para infectar la célula hospedera, ya que existen cepas capaces de formar nódulos en raíces de plantas leguminosas en ausencia de dicho sistema, aunque estudios con cepas de *Rhizobium* que sí expresan este sistema han demostrado que su presencia tiene un efecto benéfico en la formación de nódulos en distintas especies de plantas leguminosas (Tampakaki, 2014).

La secuenciación de genomas de bacterias simbióticas ha detectado la presencia de sistemas de secreción, así como de proteínas efectoras ortólogas, para bacterias patógenas (Nelson & Sadowsky, 2015), en otros modelos de simbiosis, como la interacción entre *Sinorhizobium* spp. y *Medicago* spp. A diferencia de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* posee un sistema de secreción tipo IV, el cual es usado por las bacterias patógenas para translocar moléculas de ADN, toxinas y proteínas efectoras (Berger & Christie, 1994). La secreción de estas moléculas hacia las células vegetales es clave para iniciar el proceso de infección en el hospedero.

Estudios de genética inversa han identificado genes putativos codificantes para proteínas efectoras en cepas de *Sinorhizobium meliloti* y *Sinorhizobium medicae*; un ejemplo es la proteína efectora TfeA, inyectada por el sistema de secreción tipo IV de *Sinorhizobium* spp. Análisis del impacto de un mutante en TfeA en la cepa de *Sinorhizobium* spp. establecieron una relación directamente proporcional entre la ausencia de esta proteína efectora y la disminución en el número de nódulos formados durante la simbiosis

con *Medicago truncatula* (Nelson et al., 2017). Por otro lado, estudios del efecto de la delección del sistema de secreción tipo IV en *Sinorhizobium* spp. establecieron una alta correlación entre su ausencia y la baja competitividad en la formación de nódulos con respecto a la cepa silvestre. Similarmente, este fenotipo ha sido observado en otros modelos de interacción planta-bacteria. Por ejemplo, la mutación del sistema de secreción tipo IV en *M. loti* o alguno de sus efectores ocasionó una reducción en el número de nódulos formados por su planta simbiótica *Lotus corniculatus* (Hubber et al., 2004). Así pues, en conjunto, estos resultados muestran cómo el sistema de secreción tipo IV o las proteínas efectoras translocadas a través de este modulan la interacción planta-bacteria durante la simbiosis.

En resumen, hay muchos factores que contribuyen en la interacción planta-bacteria. A lo largo de este capítulo hemos mostrado distintos escenarios en los que la presencia de proteínas efectoras o del sistema de secreción es requerida para la colonización de la planta huésped. No obstante, hay excepciones en las que, aun en ausencia de estos, la bacteria logra colonizar la planta e incluso generar un mayor número de nódulos. Estas diferencias en la respuesta presentada se deben a la presencia de genes de resistencia en las plantas, los cuales, al reconocer los MAMP o las proteínas efectoras translocadas por el sistema de secreción, inducen una respuesta inmune tipo PTI o ETI, respectivamente, con la que previenen la formación de nódulos en la planta (Hubber et al., 2004; Yasuda et al., 2016).

Finalmente, el estudio de la función de las proteínas efectoras transportadas por los sistemas de secreción en PGPB proporcionará más información sobre cómo las rizobacterias se comunican con el huésped para alterar la función de las células vegetales e incrementar la formación de nódulos. Aún quedan muchos interrogantes por resolver en la intersección de la microbiología de suelos y la fitopatología molecular. Preguntas enfocadas en conocer cómo las plantas pueden atraer microorganismos benéficos y al mismo tiempo evitar ser colonizadas por microorganismos patógenos presentes en el suelo, o cómo las interacciones microbio-microbio afectan las interacciones planta-microbio, abarcan áreas de investigación de interés actual en el campo de la biología molecular de plantas y microbios.



Perspectivas

El avance en las técnicas de secuenciación y edición génica prometen revolucionar diferentes campos de la biología, incluyendo la salud humana y la producción vegetal, ya sea mediante la modificación genética de las especies o mediante el mejoramiento de sus interacciones con sus microbiomas.

La composición de estos microbiomas puede desempeñar un papel determinante en la salud del hospedero, humano y vegetal, y por tanto el entendimiento de sus funciones e interacciones es clave para su uso racional. A continuación se presentan algunas de las perspectivas en el uso e implementación de tecnologías basadas en PGPB.

Biología mecanística en PGPB e ingeniería biomolecular

Aunque muchos de los mecanismos asociados a la promoción del crecimiento vegetal han sido descifrados, todavía muchas preguntas quedan por ser respondidas, algunas de las cuales están enfocadas en las bases moleculares de la interacción entre la planta y los microorganismos. Por ejemplo, ¿cómo la planta y los microorganismos se comunican?, ¿cómo la composición de los exudados conlleva cambios particulares en el perfil de expresión génica de las bacterias?, ¿cómo se da el proceso de colonización radicular en especies endófitas?, ¿cómo el microorganismo previene la acción del sistema inmune de la planta? En realidad, muchas de estas lecciones pueden ser extraídas del conocimiento existente de la interacción entre planta y fitopatógenos, como se describió previamente, pero más investigación es requerida para descifrar estas vías moleculares en organismos benéficos.

El conocimiento de los detalles moleculares que gobiernan la interacción entre PGPB y la planta es esencial. Primero, es crítico conocer las señales que emite la planta y la bacteria sensa para lograr la primera interacción. Estos mecanismos, por ejemplo, son bien entendidos en los rizobios, en los que los flavonoides exudados por la planta llevan a la síntesis bacteriana del factor *Nod*; la secreción de *Nod*, posteriormente, resulta en la modificación del perfil génico de la planta y en la formación de la estructura especializada conocida como *nódulo*. Si otros mecanismos asociados están involucrados en el establecimiento de otras interacciones planta-microorganismo, aún deben ser investigados con más detalle. Segundo, en el caso de que estos organismos sean capaces de invadir el tejido radicular, la identificación de las señales moleculares que le permiten al microorganismo ocultarse del sistema inmune de la planta es clave. Por ejemplo, las plantas pueden identificar la presencia de la proteína flagelina *flg22*; la existencia de variaciones en esta proteína, la cual es altamente conservada, o la sustitución de esta por otra proteína homóloga podrían evitar el reconocimiento por parte del huésped y, por tanto, favorecer el establecimiento de la interacción. Un conocimiento más profundo de estos detalles moleculares podría favorecer la selección de variantes microbianas con mayor potencial y, por tanto, el diseño de inoculantes más eficientes.

Adicionalmente, es importante entender los mecanismos que regulan algunas de las capacidades de promoción de crecimiento vegetal. Si bien algunos mecanismos, como la fijación de nitrógeno —simbiótica y asimbiótica—, son entendidos en alto detalle, otros, como la solubilización de fósforo —inorgánico u orgánico—, la producción de moléculas tipo fitohormona o los mecanismos a través de los cuales las bacterias protegen a las plantas de algunos estreses abióticos, como salinidad o sequía, son entendidos en menor grado. Con respecto a la solubilización de fósforo, es importante entender si en algunas especies el proceso se da de forma inducible, lo que se puede lograr mediante 1) el análisis de transcriptomas bacterianos en diferentes condiciones, 2) el uso de *screenings* insesgados de mutantes bacterianos generados con transposones o la tecnología CRISPR-Cas, 3) y el uso de herramientas tradicionales de biología molecular. El entendimiento de las vías moleculares asociadas puede permitir la selección de mejores cepas o el mejoramiento de las ya existentes. En el caso de la síntesis de compuestos tipo fitohormona, es importante identificar los genes asociados y su regulación, por medio de una estrategia similar a la

descrita para la solubilización de fósforo. Finalmente, es necesario entender la forma como las bacterias influyen positivamente sobre plantas que crecen en presencia de estreses abióticos debido a la disminución en el tamaño de las áreas cultivables por deforestación o cambio climático, y aunque los resultados de AGROSAVIA y otros grupos de investigación sugieren un papel fundamental de las bacterias en la prevención del estrés hídrico, los mecanismos involucrados aún no son entendidos completamente.

En resumen, un mayor conocimiento de la biología básica nos permitirá seleccionar mejores microorganismos y diseñar inoculantes más eficientes para diferentes cultivos, lo cual, junto al uso de herramientas integradas de manejo de los cultivos, puede impactar en los costos económicos de producción y, por tanto, en la competitividad del sector agrícola.

Diseño de comunidades bacterianas sintéticas

En el suelo, al igual que en otros ecosistemas, la competencia por nutrientes y nichos ecológicos es feroz. Para ganar acceso a recursos y colonizar un nicho, algunos microorganismos sintetizan antibióticos, catabolizan fuentes inusuales de carbono y otros nutrientes, respiran aceptores de electrones alternativos, usan estrategias sofisticadas para la colonización del hospedero, etc., y por ello no solo sus propiedades como PGPB pueden ser consideradas en el proceso de selección de inoculantes biológicos. Es por ello por lo que, en ocasiones, el efecto benéfico de estos organismos debe ser evaluado primero *in vivo*, para tomar decisiones más informadas acerca de su potencial para promover el crecimiento de especies vegetales.

Diversos estudios del microbioma de las plantas han revelado una diversidad de especies asociadas a la rizósfera más grande de lo que se estimaba, lo cual no solo refleja la complejidad de las interacciones que ocurren en este ecosistema, sino que también evidencia los retos que una bacteria con potencial demostrado para la promoción del crecimiento tiene que sobrellevar para ejercer un efecto sobre la planta. Adicionalmente, este contexto ilustra que la modulación de comunidades naturales o el diseño de comunidades sintéticas pueden garantizar una mayor probabilidad de éxito, puesto que suponen una mayor capacidad de colonización del nicho y, por tanto, de



efecto sobre la planta. Los aspectos técnicos para la elaboración de un inoculante biológico basado en el manejo de la comunidad microbiana de la rizósfera requieren, no obstante, de mucha investigación, puesto que el número de posibles interacciones bipartitas (en el caso mínimo) de un número n de microorganismos crece exponencialmente. Alternativamente, el uso de modelos estadísticos puede poner en evidencia el número mínimo de microorganismos de una colección de microorganismos que se requieren para afectar positivamente el crecimiento de las plantas. En todo caso, el entendimiento y la modelación de las complejas relaciones que ocurren en estos ambientes complejos permitirán diseñar inoculantes con precisión y, así, reducir los costos económicos y ambientales asociados al uso indiscriminado de agroquímicos.

El diseño de comunidades sintéticas puede ser elaborado de forma racional y podría involucrar la evaluación de las combinaciones factoriales de microorganismos con capacidad comprobada para la promoción de crecimiento vegetal con mecanismos complementarios. Es decir, se podría evaluar el uso de microorganismos capaces de modular los niveles de nitrógeno o fósforo disponibles en el suelo, sintetizar hormonas o proteger a la planta de patógenos, por ejemplo. La evaluación de estas capacidades requiere de herramientas en biología molecular que permitan aislar los mecanismos asociados y así poder seleccionar combinaciones sinérgicas.

Aún más, el conocimiento generado relacionado con el microbioma de las plantas sugiere que más géneros microbianos deben ser considerados en el proceso de aislamiento, de modo que el inoculante pueda representar de manera más cercana la composición original del microbioma de la planta. Futuras investigaciones permitirán determinar la importancia del microbioma inexplorado.

Referencias

- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, *221*, 36-49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, *26*(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Alves, G. C., Videira, S. S., Urquiaga, S., & Reis, V. M. (2015). Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. *Plant and Soil*, *387*(1-2), 307-321. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2295-2>
- Baldani, J. I., Krieg, N. R., Baldani, V. L. D., Hartmann, A., & Döbereiner, J. (2015). *Azospirillum*. *Wiley Online Library*. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00891>
- Batista, B. D., Lacava, P. T., Ferrari, A., Teixeira-Silva, N. S., Bonatelli, M. L., Tsui, S., Mondin, M., Kitajima, E. W., Pereira, J. O., Azevedo, J. L., & Quecine, M. C. (2018). Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. *Microbiological Research*, *206*, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>
- Becking, J.-H. (1981). The family *Azotobacteraceae*. En M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, & H. G. Schlegel (eds.), *The prokaryotes* (pp. 795-817). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_66
- Berger, B. R., & Christie, P. J. (1994). Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* virB operon: virB2 through virB11 are essential virulence genes. *Journal of Bacteriology*, *176*(12), 3.646-3.660. <https://doi.org/10.1128/JB.176.12.3646-3660.1994>
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Staley, J. T. (eds.). (2005). *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (vol. 2, parte B). Springer. <https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7>
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M. J., Haft, D. H., Nelson, W. C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., ... Collmer, A. (2003). The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(18), 10.181-10.186. <https://doi.org/10.1073/pnas.1731982100>
- Büttner, D. (2016). Behind the lines – actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiology Reviews*, *40*(6), 894-937. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw026>
- Camelo-Rusique, M., Moreno-Galván, A., Romero-Perdomo, F., & Bonilla-Buitrago, R. (2017). Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial como biofertilizante. *Revista Argentina de Microbiología*, *49*(3), 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.06.005>
- Cassán, F., Coniglio, A., López, G., Molina, R., Nieves, S., de Carlan, C. L. N., Donadio, F., Torres, D., Rosas, S., Pedrosa, F. O., de Souza, E., Díaz Zorita, M., de-Bashan, L., & Mora, V. (2020). Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biology and Fertility of Soils*, *56*, 461-479. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>
- Cassán, F., & Diaz-Zorita, M. (2016). *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*, *103*, 117-130. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>
- Chen, L., Luo, S., Xiao, X., Guo, H., Chen, J., Wan, Y., Li, B., Xu, T., Xi, Q., Rao, C., Liu, C., & Zeng, G. (2010). Application of plant growth-promoting endophytes (PGE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. *Applied Soil Ecology*, *46*(3), 383-389. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.10.003>
- Chubatsu, L. S., Monteiro, R. A., de Souza, E. M., de Oliveira, M. A. S., Yates, M. G., Wasseem, R., Bonatto, A. C., Huergo, L. F., Steffens, M. B. R., Rigo, L. U., & Pedrosa, F. de O. (2012). Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*, *356*(1-2), 197-207. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0819-6>
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(5), 669-678. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, *19*, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, *411*(6.839), 826-833. <https://doi.org/10.1038/35081161>
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (2009). *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (vol. 3). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>
- Domingues Duarte, C. F., Cecato, U., Biserra, T. T., Mamédio, D., & Galbeiro, S. (2020). *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, *11*(1), 223-240. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>
- Dominguez-Núñez, J. A., Delgado-Alvez, D., Berrocal-Lobo, M., Anriquez, A., & Albanesi, A. (2014). Controlled-release fertilizers combined with *Pseudomonas fluorescens* rhizobacteria inoculum improve growth in *Pinus halepensis* seedlings. *IForest*, *8*, 12-18. <https://doi.org/10.3832/ifer1110-007>
- Dong, X., Hong, Q., He, L., Jiang, X., & Li, S. (2008). Characterization of phenol-degrading bacterial strains isolated from natural soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *62*(3), 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.01.011>

- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E. (eds.). (2006). *The prokaryotes* (vol. 3). Springer. <https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5>
- Elmerich, C., & Newton, W. E. (eds.). (2007). *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Springer. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3546-2>
- Erturk, Y., Ercisli, S., Haznedar, A., & Cakmakci, R. (2010). Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. *Biological Research*, 43(1), 91-98. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602010000100011>
- Etesami, H., & Maheshwari, D. K. (2018). Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 225-246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>
- Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 170, artículo 105860. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105860>
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., & Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal*, 18(3), 265-276. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00265.x>
- Ferreira, C. M. H., Soares, H. M. V. M., & Soares, E. V. (2019). Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. *Science of The Total Environment*, 682, 779-799. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.225>
- Ferreira, D. A., da Silva, T. F., Pylro, V. S., Salles, J. F., Andreote, F. D., & Dini-Andreote, F. (2020). Soil microbial diversity affects the plant-root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01502-z>
- Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. (2005). Class I. Alphaproteobacteria class. nov. En D. J. Brenner, N. R. Krieg, & J. T. Staley (eds.), *Bergey's manual® of systematic bacteriology* (vol. 2, parte C, pp. 1-574). Springer. https://doi.org/10.1007/0-387-29298-5_1
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, artículo 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Govarthanan, M., Kamala-Kannan, S., Kim, S. A., Seo, Y.-S., Park, J.-H., & Oh, B.-T. (2016). Synergistic effect of chelators and *Herbaspirillum* sp. GW103 on lead phytoextraction and its induced oxidative stress in *Zea mays*. *Archives of Microbiology*, 198(8), 737-742. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1231-7>
- Gu, J.-d., & Mitchell, R. (2006). *The Prokaryotes*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/0-387-30741-9>
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Klopper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895-914. <https://doi.org/10.1139/m97-131>
- Heredia-Acuña, C., Almaraz-Suarez, J. J., Arteaga-Garibay, R., Ferrera-Cerrato, R., & Pineda-Mendoza, D. Y. (2018). Isolation, characterization and effect of plant-growth-promoting rhizobacteria on pine seedlings (*Pinus pseudostrubus* Lindl.). *Journal of Forestry Research*, 30, 1.727-1.734. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0723-5>
- Hotson, A., & Mudgett, M. B. (2004). Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: Identification of plant targets and activation of innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 384-390. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.003>
- Hubber, A., Vergunst, A. C., Sullivan, J. T., Hooykaas, P. J. J., & Ronson, C. W. (2004). Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Molecular Microbiology*, 54(2), 561-574. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04292.x>
- Ito, Y., Kaku, H., & Shibuya, N. (1997). Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *The Plant Journal*, 12(2), 347-356. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.12020347.x>
- Jiménez-Zurdo, J. I., Martínez-Abarca, F., Cobo-Díaz, J. F., López-Contreras, J. A., Fernández-López, M., & Toro, N. (2020). Complete genome sequence of *Sinorhizobium meliloti* strain AK21, a salt-tolerant isolate from the Aral sea Region. *Microbiology Resource Announcements*, 9(2), 18-19. <https://doi.org/10.1128/mra.01432-19>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7.117), 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M. W., Hjuler, C. T., Gysel, K., Muszyński, A., Carlson, R. W., Thygesen, M. B., Sandal, N., Asmussen, M. H., Vinther, M., Andersen, S. U., Krusell, L., Thirup, S., Jensen, K. J., Ronson, C. W., Blaise, M., Radutoiu, S., & Stougaard, J. (2015). Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature*, 523(7.560), 308-312. <https://doi.org/10.1038/nature14611>
- Krause, A., Doerfel, A., & Göttfert, M. (2002). Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(12), 1.228-1.235. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.12.1228>
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., & Felix, G. (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *The Plant Cell*, 16(12), 3.496-3.507. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026765>
- Liang, Y., Cao, Y., Tanaka, K., Thibivilliers, S., Wan, J., Choi, J., Kang, C. H., Qiu, J., & Stacey, G. (2013). Nonlegumes respond to rhizobial Nod factors by suppressing the innate immune response. *Science*, 341(6.152), 1.384-1.387. <https://doi.org/10.1126/science.1242736>
- Marie, C., Broughton, W. J., & Deakin, W. J. (2001). Rhizobium type III secretion systems: Legume charmers or alarmers? *Current Opinion in Plant Biology*, 4(4), 336-342. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00182-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00182-5)

- Maroniche, G. A., García, J. E., Salcedo, F., & Creus, C. M. (2017). Molecular identification of *Azospirillum* spp.: Limitations of 16S rRNA and qualities of *rpoD* as genetic markers. *Microbiological Research*, 195, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.11.009>
- Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M. W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. D., & Tanksley, S. D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262(5.138), 1.432-1.436. <https://doi.org/10.1126/science.7902614>
- Monteiro, R. A., Balsanelli, E., Wasseem, R., Marin, A. M., Brusamarello-Santos, L. C. C., Schmidt, M. A., Tadra-Sfeir, M. Z., Pankievicz, V. C. S., Cruz, L. M., Chubatsu, L. S., Pedrosa, F. O., & Souza, E. M. (2012). *Herbaspirillum*-plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects. *Plant and Soil*, 356(1-2), 175-196. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1125-7>
- Moreno-Galván, A., Romero-Perdomo, F. A., Estrada-Bonilla, G., Meneses, C. H. S. G., & Bonilla, R. R. (2020). Dry-Caribbean *Bacillus* spp. strains ameliorate drought stress in maize by a strain-specific antioxidant response modulation. *Microorganisms*, 8(6), artículo 823. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060823>
- Moreno-Galván, A. E., Cortés-Patiño, S., Romero-Perdomo, F., Uribe-Vélez, D., Bashan, Y., & Bonilla, R. R. (2020). Proline accumulation and glutathione reductase activity induced by drought-tolerant rhizobacteria as potential mechanisms to alleviate drought stress in Guinea grass. *Applied Soil Ecology*, 147, artículo 103367. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103367>
- Moreno, A. E., Rojas, D. F., & Bonilla, R. R. (2011). Aplicación de diseños estadísticos secuenciales en la identificación de fuentes nutricionales para *Azotobacter chroococcum* AC1. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 151-158. https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:226
- Nelson, M. S., Chun, C. L., & Sadowsky, M. J. (2017). Type IV effector proteins involved in the *Medicago-Sinorhizobium* symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(1), 28-34. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-16-0211-R>
- Nelson, M. S., & Sadowsky, M. J. (2015). Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00491>
- Okazaki, S., Okabe, S., Higashi, M., Shimoda, Y., Sato, S., Tabata, S., Hashiguchi, M., Akashi, R., Göttfert, M., & Saeki, K. (2010). Identification and functional analysis of type III effector proteins in *Mesorhizobium loti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(2), 223-234. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-2-0223>
- Pedley, K. F., & Martin, G. B. (2003). Molecular basis of *Pto*-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 215-243. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.121602.143032>
- Pedrosa, F. O., Monteiro, R. A., Wasseem, R., Cruz, L. M., Ayub, R. A., Colauto, N. B., Fernandez, M. A., Fungaro, M. H. P., Grisard, E. C., Hungria, M., Madeira, H. M. F., Nodari, R. O., Osaku, C. A., Petzl-Erler, M. L., Terenzi, H., Vieira, L. G. E., Steffens, M. B. R., Weiss, V. A., Pereira, L. F. P., ... Souza, E. M. (2011). Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics*, 7(5), artículo e1002064. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002064>
- Pedrosa, F. O., Oliveira, A. L. M., Guimarães, V. F., Etto, R. M., Souza, E. M., Furmam, F. G., Gonçalves, D. R. P., Santos, O. J. A. P., Gonçalves, L. S. A., Battistus, A. G., & Galvão, C. W. (2019). The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: A new alternative inoculant for maize. *Plant and Soil*, 451, 45-56. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04124-8>
- Peiffer, J. A., Romay, M. C., Gore, M. A., Flint-Garcia, S. A., Zhang, Z., Millard, M. J., Gardner, C. A. C., McMullen, M. D., Holland, J. B., Bradbury, P. J., & Buckler, E. S. (2014). The genetic architecture of maize height. *Genetics*, 196(4), 1.337-1.356. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.159152>
- Poole, P., Ramachandran, V., & Terpolilli, J. (2018). Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 291-303. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.171>
- Praburaman, L., Park, S.-H., Cho, M., Lee, K.-J., Ko, J.-A., Han, S.-S., Lee, S.-H., Kamala-Kannan, S., & Oh, B.-T. (2017). Significance of diazotrophic plant growth-promoting *Herbaspirillum* sp. GW103 on phytoextraction of Pb and Zn by *Zea mays* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(3), 3.172-3.180. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8066-2>
- Preston, G. M. (2000). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: The right pathogen, of the right plant, at the right time. *Molecular Plant Pathology*, 1(5), 263-275. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00036.x>
- Ramakrishna, W., Yadav, R., & Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. *Applied Soil Ecology*, 138, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.019>
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M., & He, S. Y. (1997). Hrp pilus: An hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7), 3.459-3.464. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3459>
- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61, 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.01.006>
- Rojas-Tapias, D., Ortega Sierra, O., Rivera Botía, D., & Bonilla, R. (2015). Preservation of *Azotobacter chroococcum* vegetative cells in dry polymers. *Universitas Scientiarum*, 20(2), 201-207. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-2.pacv>
- Rojas T., D. F., Garrido R., M. F., & Bonilla B., R. R. (2009). Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium* sp. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 10(1), 70-80. https://doi.org/10.21930/rcta.vol10_num1_art:131

- Rojas-Tapias, D., Ortiz-Vera, M., Rivera, D., Kloepper, J., & Bonilla, R. (2013). Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. *Universitas Scientiarum*, 18(2), 129-139. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-2.etmp>
- Romero-Perdomo, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galván, A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., & Bonilla, R. (2017). *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006>
- Romero-Perdomo, F. A., Moreno-Galván, A., Camelo-Rusínque, M., & Bonilla, R. (2015). Efecto de la carragenina sobre *Azotobacter chroococcum* en semillas de algodón peletizadas con un fungicida. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 35(1), 29-32. <http://www.scielo.org.ar/pdf/ranar/v35n1/v35n1a03.pdf>
- Ronald, P. C., Salmeron, J. M., Carland, F. M., & Staskawicz, B. J. (1992). The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *Journal of Bacteriology*, 174(5), 1.604-1.611. <https://doi.org/10.1128/JB.174.5.1604-1611.1992>
- Salmeron, J. M., Oldroyd, G. E. D., Rommens, C. M. T., Scofield, S. R., Kim, H.-S., Lavelle, D. T., Dahlbeck, D., & Staskawicz, B. J. (1996). Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell*, 86(1), 123-133. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80083-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80083-5)
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. del C., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- Schmeisser, C., Liesegang, H., Krysiak, D., Bakkou, N., Le Quéré, A., Wollherr, A., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Pommerening-Röser, A., Flores, M., Palacios, R., Brenner, S., Gottschalk, G., Schmitz, R. A., Broughton, W. J., Perret, X., Strittmatter, A. W., & Streit, W. R. (2009). *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 4.035-4.045. <https://doi.org/10.1128/AEM.00515-09>
- Tabashnik, B. E. (1994). Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 39(1), 47-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.39.1.47>
- Tampakaki, A. P. (2014). Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1-19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00114>
- Trdá, L., Fernandez, O., Boutrot, F., Héloir, M.-C., Kelloniemi, J., Daire, X., Adrian, M., Clément, C., Zipfel, C., Dorey, S., & Poinssot, B. (2014). The grapevine flagellin receptor VvFLS2 differentially recognizes flagellin-derived epitopes from the endophytic growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* and plant pathogenic bacteria. *New Phytologist*, 201(4), 1.371-1.384. <https://doi.org/10.1111/nph.12592>
- Tsavelkova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2006). Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 117-126. <https://doi.org/10.1134/S0003683806020013>
- Van Rhijn, P., & Vanderleyden, J. (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological Reviews*, 59(1), 124-142.
- Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W. J., & Perret, X. (1998). Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Molecular Microbiology*, 28(6), 1.381-1.389. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00920.x>
- Wakimoto, T., Nakagishi, S., Matsukawa, N., Tani, S., & Kai, K. (2020). A unique combination of two different quorum sensing systems in the *-Rhizobium Cupriavidus taiwanensis*. *Journal of Natural Products*, 83(6), 1.876-1.884. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00054>
- Walters, W. A., Jin, Z., Youngblut, N., Wallace, J. G., Sutter, J., Zhang, W., González-Peña, A., Peiffer, J., Koren, O., Shi, Q., Knight, R., del Rio, T. J., Tringe, S. G., Buckler, E. S., Dangl, J. L., & Ley, R. E. (2018). Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(28), 7.368-7.373. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800918115>
- Wang, D., Xu, A., Elmerich, C., & Ma, L. Z. (2017). Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions. *ISME Journal*, 11(7), 1.602-1.613. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.30>
- Wang, E. T., Tian, C. F., Chen, W. F., Young, J. P. W., & Chen, W. X. (eds.). (2019). *Ecology and evolution of rhizobia*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-32-9555-1>
- Yasuda, M., Miwa, H., Masuda, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., & Okazaki, S. (2016). Effector-triggered immunity determines host genotype-specific incompatibility in legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant and Cell Physiology*, 57(8), 1.791-1.800. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw104>
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in Immunology*, 35(7), 345-351. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>

3

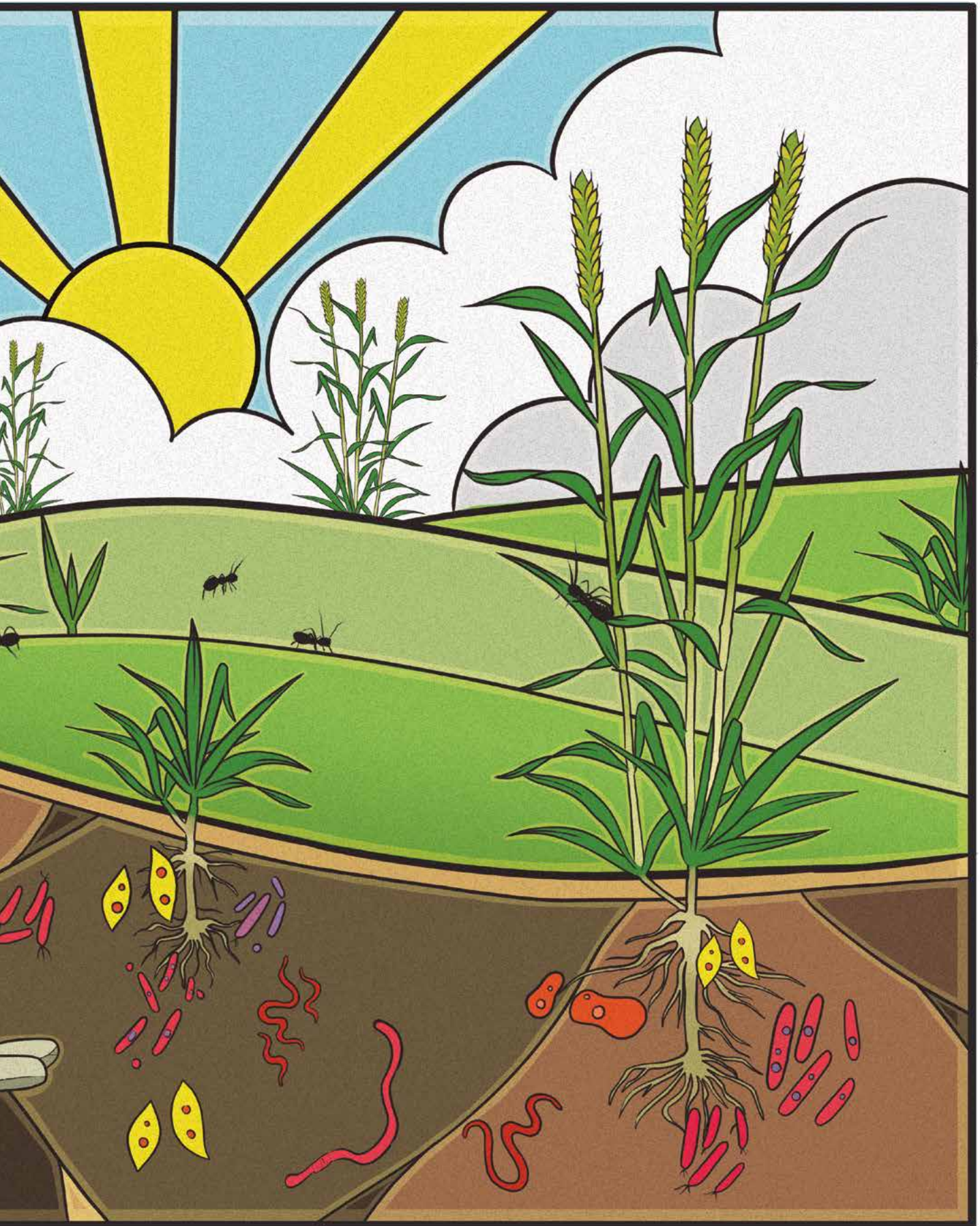
Mecanismos de promoción de crecimiento de las PGPB

Luisa Fernanda Posada Uribe¹
Andrés Eduardo Moreno Galván²
Marilyn Tatiana Santos Torres²
Germán Andrés Estrada Bonilla²

1. Grupo Zentech. Departamento de Ingeniería Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia .

2. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.





Introducción

La tendencia hacia cambios en los regímenes hídricos, alteraciones en la estabilidad y composición de los suelos y, en general, el cambio climático han generado efectos importantes en la productividad de los sistemas agrícolas, lo que ha requerido un aumento en el uso de agroquímicos de síntesis para lograr las metas y los estándares de producción (Tilman et al., 2002). De esta manera, pareciera que la premisa en el sector agrícola es producir más para satisfacer la demanda, sin importar las consecuencias del método que se emplee.

La mayoría de los métodos disponibles para el manejo y control de los cultivos se basa en el mejoramiento de las propiedades fisicoquímicas del suelo, dejando los factores biológicos como un tema de menor importancia (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2002). Sin embargo, el conocimiento de los factores biológicos del suelo se ha desarrollado por siglos, desde Teofrasto (372-287 a.C.), quien enunció la importancia de mezclar diferentes suelos para mejorar su riqueza, hasta la actualidad, cuando se conoce el uso de bioinsumos como una alternativa para una agricultura sostenible (Prasad et al., 2019). Sin embargo, los principios de la biología del suelo relacionada con la promoción del crecimiento de la planta solo se conocen desde un siglo atrás, cuando Hellriegel y Wilfarth iniciaron investigaciones sobre la fijación biológica de nitrógeno (N) atmosférico, y cuando Lorentz Hiltner, en 1904, descubrió que la capa de suelo inmediatamente aledaña a las raíces de las plantas es más rica biológicamente que el suelo que no tiene influencia radicular (Bhattacharyya & Jha, 2012).

En 1978, Kloepper y Schroth, de la Universidad de Berkeley, denominaron *PGPR* (*plant growth promoting rhizobacteria*) a las bacterias que se encuentran adyacentes a las raíces de las plantas y generan efectos positivos en su crecimiento, y se enfocaron principalmente en los mecanismos indirectos de

promoción del crecimiento vegetal (Kloepper et al., 1980; Kloepper & Schroth, 1978). De forma paralela pero independiente, el estudio de las bacterias que mejoraban el crecimiento vegetal por medio de mecanismos directos salió a la luz por investigaciones realizadas por Dobereiner y Day (1976) y Bashan et al. (1989), siendo estos últimos los encargados de estudiar los microorganismos benéficos de vida libre con efectos de promoción del crecimiento vegetal, a los que posteriormente Bashan y Holguin denominaron *PGPB* (*plant growth promoting bacteria*). Esta denominación no está relacionada solo con la rizósfera, sino que agrupa bacterias benéficas para el crecimiento de las plantas aisladas de diversas fuentes. A su vez, estos autores propusieron clasificar estos microorganismos en *PGPB*, para aquellos que actúan por mecanismos directos de promoción, y *biocontrol-PGPB*, para aquellos que actúan por mecanismos indirectos (Bashan & Holguin, 1998). Otros términos, como *YIB* (*yield increasing bacteria*) y *EPR* (*emergence-promoting rhizobacteria*), también se encuentran en la literatura, pero han tenido menor aceptación (Ramírez y Kloepper, 2012).

Los mecanismos de promoción de crecimiento que estos microorganismos emplean incluyen la síntesis de fitohormonas (Egamberdieva et al., 2017); el aumento en la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), entre otros (Mendes et al., 2013); la supresión de fitopatógenos como protozoos, virus, nematodos, bacterias y hongos, debido a la producción de compuestos antibióticos (Raaijmakers et al., 2009); la competencia por espacio y alimento, predación y parasitismo (Moreno Reséndez et al., 2018); ayuda para superar el estrés abiótico debido a exceso de sal en los sustratos, sequía y altas o bajas temperaturas (Viscardi et al., 2016), y la activación de las respuestas de defensa en las plantas (Pertot et al., 2013). Estos mecanismos están muy bien documentados para proteobacterias y firmicutes, especialmente de los géneros *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Bashan & de-Bashan, 2010; Tiwari et al., 2019).

Una característica importante de las PGPB, además de la promoción del crecimiento, es su habilidad para colonizar la rizósfera de la planta y mantener una relación estable con la superficie de las raíces (Bais et al., 2004).

El proceso de colonización requiere de diferentes pasos: reconocimiento, adherencia, colonización y crecimiento de la población. Cada uno de ellos se ve favorecido por diversas capacidades de producción de metabolitos de estas PGPB. Entre estas capacidades, se destaca la producción de biopelículas (Bais et al., 2004) de exopolisacáridos (EPS) (Branda et al., 2006), de enzimas (Hassan et al., 2019) o de lipopéptidos (Beauregard, 2015).

A continuación, en la Figura 3.1, se presentan, de forma detallada, los diferentes mecanismos de promoción de crecimiento vegetal, agrupados como directos e indirectos; además, se presentan las capacidades microbianas que favorecen la colonización de las raíces para que esta promoción se haga efectiva.

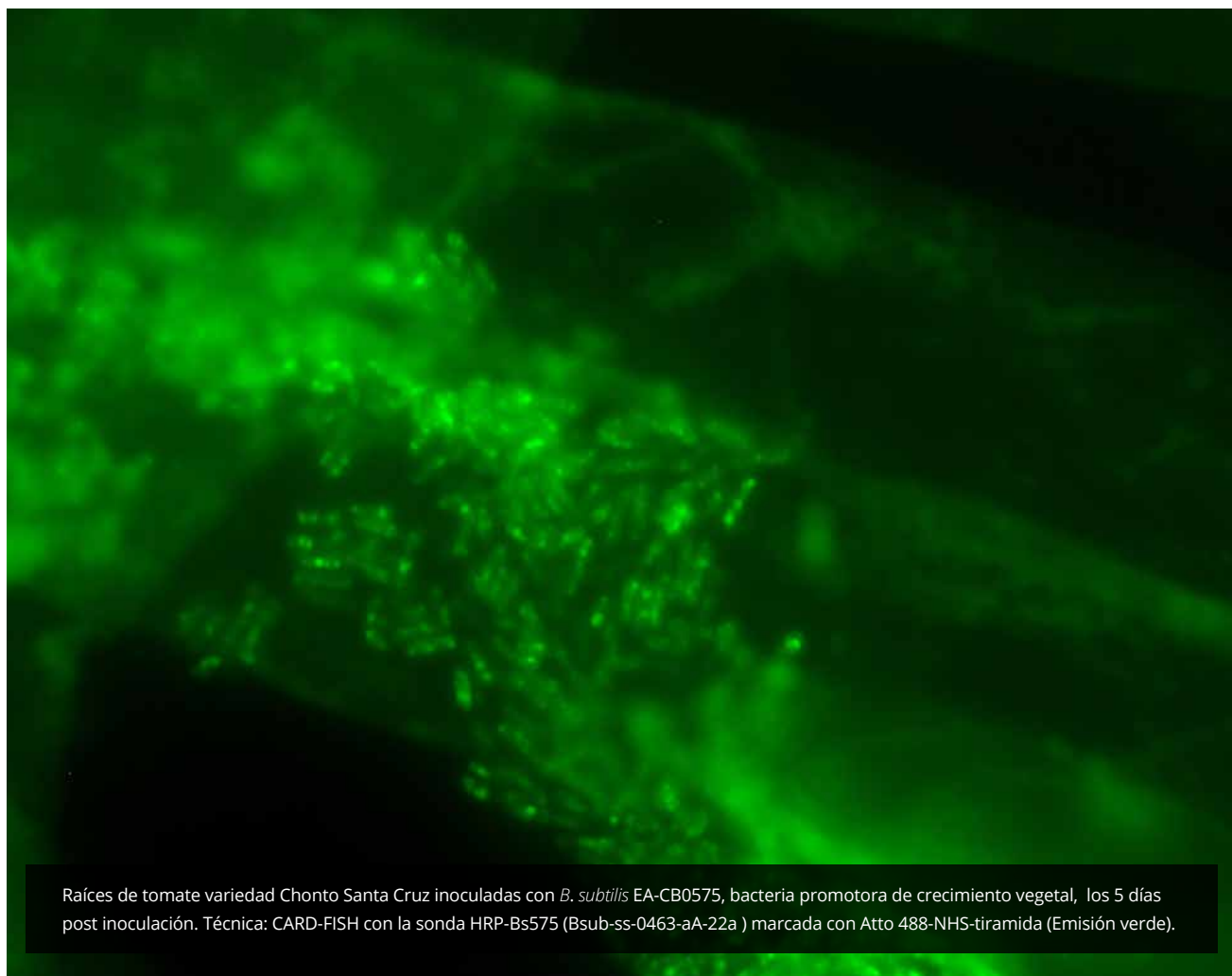
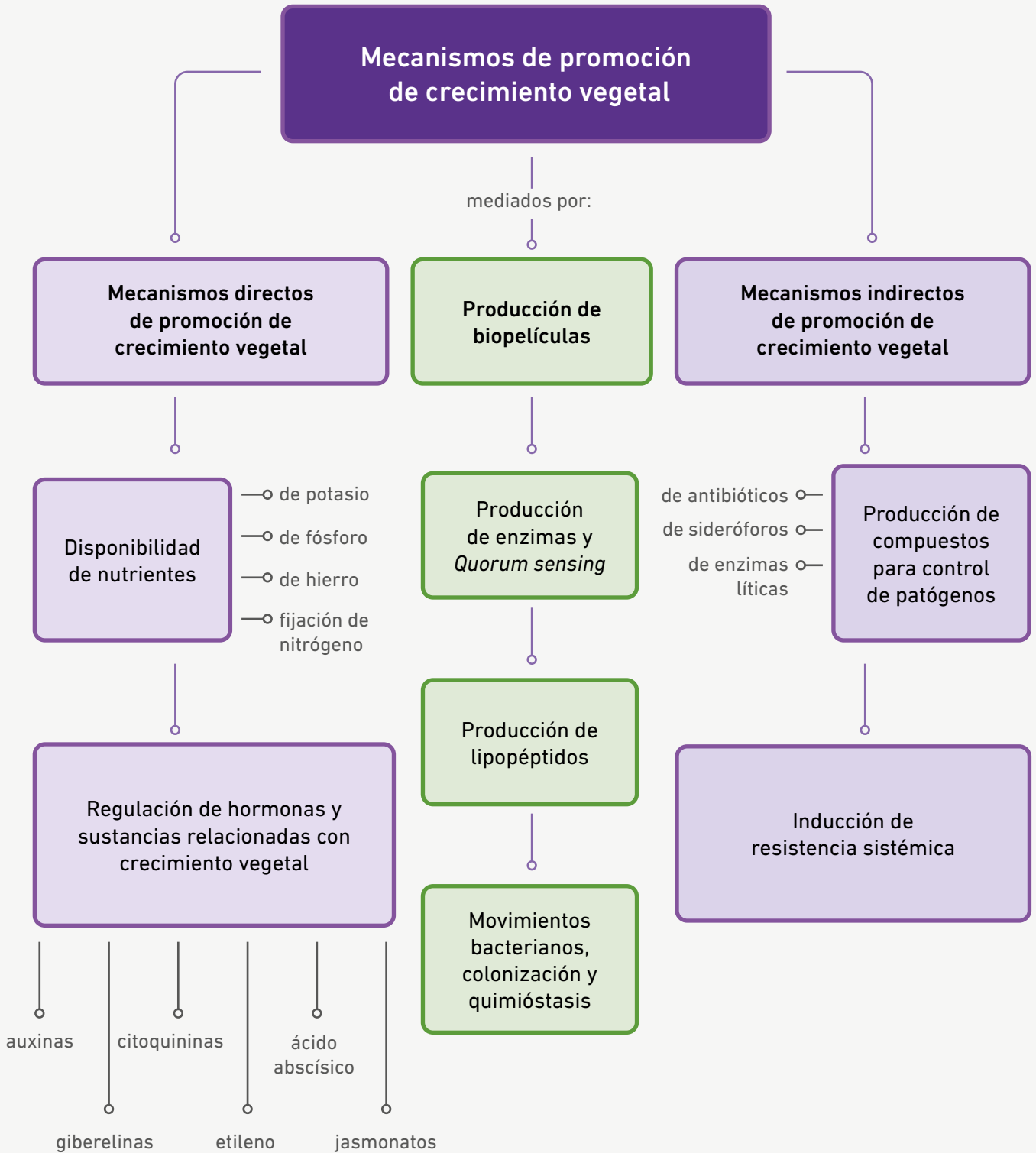


Foto: Luisa Fernanda Posada Uribe

■ **Figura 3.1.** Mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal y capacidades de las PGPB para facilitar la activación de estos mecanismos en la planta.
Fuente: Elaboración propia



Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal

Son diversos los mecanismos que pueden estar implicados en las interacciones entre planta y PGPB. Se considera que la comprensión de las formas de acción de las PGPB puede ayudar a seleccionar de forma eficiente los microorganismos promisorios para el desarrollo de productos para la agricultura (Bhattacharyya & Jha, 2012; Ramírez & Kloepper, 2012). Estos mecanismos se clasifican en dos grandes grupos: los directos, relacionados con la nutrición vegetal y la biofertilización de las plantas al ser inoculadas con los microorganismos PGPB, y los indirectos, relacionados con el control de patógenos que pueden afectar las plantas (Bashan & Holguin, 1998).

Mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal por PGPB

Solubilización o fijación de nutrientes

Algunas bacterias promotoras de crecimiento solubilizan o mineralizan el P del suelo, ya sea orgánico o inorgánico (Shrivastava et al., 2018), solubilizan el K (Gupta et al., 2015) o fijan el N atmosférico (Glick, 2012). Estos son mecanismos de promoción por solubilización-mineralización o fijación de nutrientes, y hacen disponibles nutrientes que no son asimilables o de fácil absorción para las plantas, por lo que mejoran su nutrición.

Solubilización de fósforo

Los bajos niveles de P en los suelos pueden limitar el crecimiento de las plantas. Los suelos contienen diferentes formas de P, pero, en su mayoría, no son disponibles para las plantas, las cuales solo pueden absorberlo en sus formas monobásica (H_2PO_4^-) o dibásica (HPO_4^{2-}) (Vessey, 2003). Algunos microorganismos promotores de crecimiento mineralizan o solubilizan el P del suelo convirtiéndolo a las formas asimilables, ya sea por producción de enzimas, como las fitasas, fosfomonoesterasa no específicas, fosfatonasas o C-P liasas, en caso de P orgánico; por producción de ácidos orgánicos, como ácido glucónico, oxálico, malónico, succínico, cítrico y propiónico, iones hidroxilo, CO_2 , sideróforos y protones (Rodríguez et al., 2006; Sharma et al., 2013), o por extrusión de protones (Lugtenberg & Kamilova, 2009), en caso de P inorgánico. Diversos géneros bacterianos, entre los que se encuentran *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Bacillus* spp., *Burkholderia* spp., *Enterobacter* spp., *Erwinia* spp., *Herbaspirillum* spp., *Flavobacterium* spp., *Microbacterium* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp. y *Rhizobium* spp., entre otros, han sido reportados como solubilizadores de fosfatos (Antoun & Prévost, 2006; Romero-Perdomo et al., 2021).

Se reporta la producción de ácidos orgánicos como el principal mecanismo de solubilización del fosfato inorgánico. Los ácidos orgánicos producidos por bacterias solubilizadoras de P tienen una acción directa en la acidificación del medio, la quelación, la precipitación y las reacciones de oxidación-reducción en la rizósfera (Kucey, 1988). Algunos ácidos producidos por estos microorganismos se presentan en la tabla 3.1, entre los cuales el glucónico ha sido considerado como el ácido clave para la solubilización de fosfato (Rashid et al., 2004).

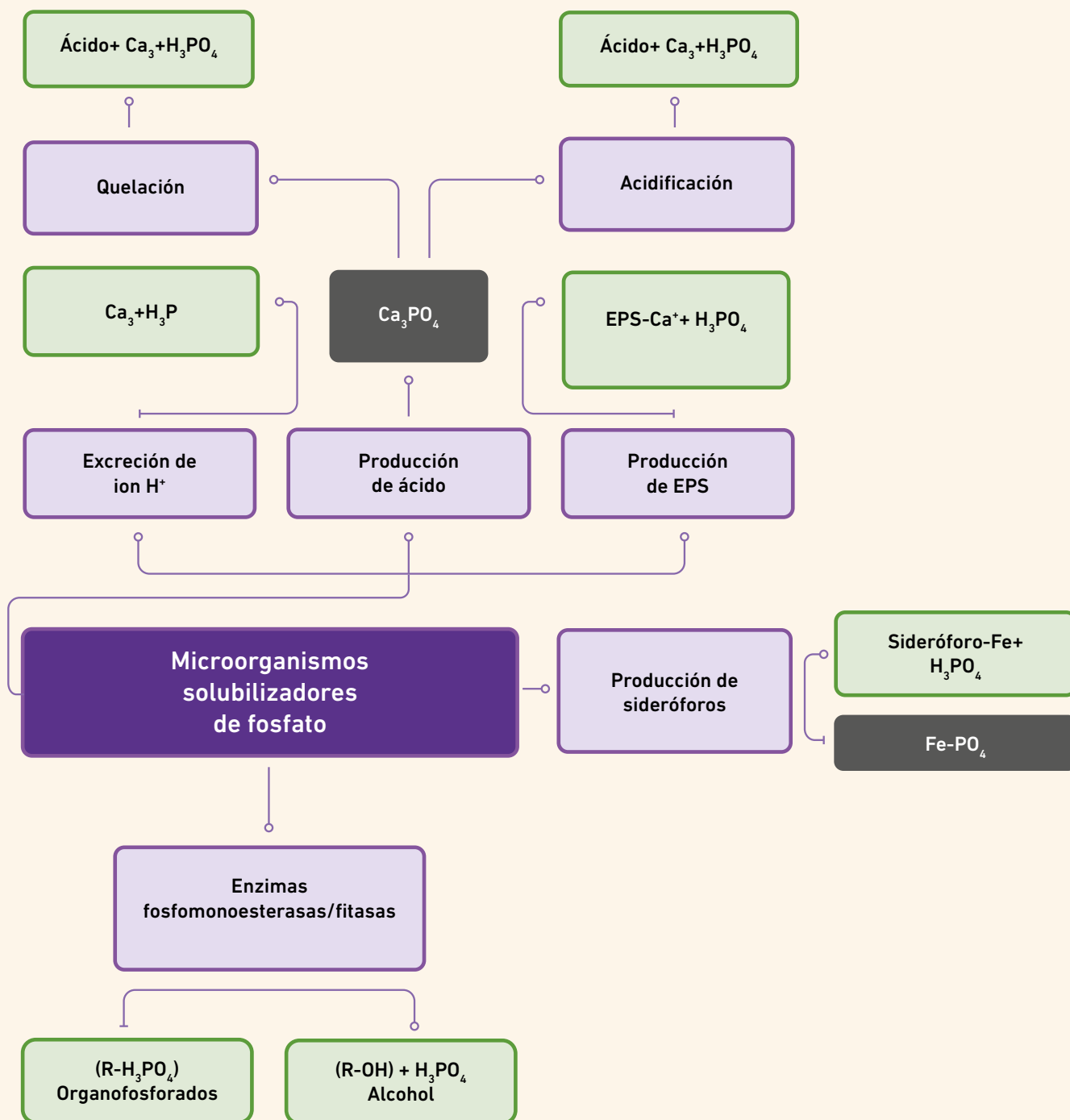
■ **Tabla 3.1.** Producción de ácidos orgánicos por bacterias solubilizadoras de fosfato
Fuente: Elaboración propia con base en Santos Torres (2020)

| | |
|--|--|
| <p>1 Ácido Acético Ruta biosintética: Oxidación incompleta de azúcares (fermentación acética) Bacteria: <i>Acetobacter acetii</i>, <i>Gluconobacter oxydans</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>. Referencia: Singh y Amberger (1998)</p> | <p>6 Ácido 2-cetoglucónico Ruta biosintética: Oxidación directa de la glucosa Bacteria: <i>Rhizobium leguminosarum</i>, <i>Rhizobium meliloti</i> y <i>Bacillus firmus</i> Referencia: Halder et al. (1990)</p> |
| <p>2 Ácido Oxálico Ruta biosintética: Ácidos tricarbóxicos Bacteria: <i>Pseudomonas fluorescens</i> Referencia: Singh y Amberger (1998)</p> | <p>7 Ácido Glucónico Ruta biosintética: Oxidación directa de la glucosa Bacteria: <i>Erwinia herbicola</i>, <i>Pseudomonas cepacia</i> y <i>Burkholderia cepacia</i> Referencia: Illmer y Schinner (1992), Liu et al. (1992) y Goldstein et al. (1993) Marra et al. (2015).</p> |
| <p>3 Ácido Succínico Ruta biosintética: Ciclo del glioxilato y ácidos tricarbóxicos Bacteria: <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> Referencia: Liu et al. (1992)</p> | <p>8 Ácido Málico, 2-cetogluconico, succínico/láctico Ruta biosintética: Oxidación directa de la glucosa Bacteria: <i>Rhizobium tropici</i> Referencia: Marra et al. (2015)</p> |
| <p>4 Ácido Málico Ruta biosintética: Ácidos tricarbóxicos Bacteria: <i>Bacillus megaterium</i> Referencia: Singh y Amberger (1997)</p> | <p>9 Ácido Fórmico Bacteria: <i>Burkholderia cepacia</i> Referencia: Li et al. (2010)</p> |
| <p>5 Ácido Propiónico Ruta biosintética: Ácidos tricarbóxicos Bacteria: <i>Bacillus megaterium</i> Referencia: Chen et al. (2006)</p> | <p>10 Ácido Glucónico Ruta biosintética: Oxidación directa de la glucosa (quinoproteína glucosa deshidrogenasa); oxidación directa de la glucosa (1-deshidrogenasa-pirroloquinolina quinona) Bacteria: <i>Rhizobium sp.</i> y <i>Herbaspirillum sp.</i> Referencia: Santos-Torres et al. (2021)</p> |

La acción de los ácidos orgánicos en la solubilización de minerales puede atribuirse a que disminuyen el pH y a que forman complejos estables con Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} y Al^{+3} (Figura 3.2). Estas reacciones similares ocurren

cuando se previene la fijación de fosfatos solubles añadidos al suelo como fertilizantes (Paredes-Mendoza & Espinosa-Victoria, 2010).

■ **Figura 3.2.** Mecanismos inorgánicos y orgánicos de solubilización de fosfatos por microorganismos.



Nota: R: Compuesto químico unido al grupo funcional generado en la reacción; eps: exopolisacáridos.

Fuente: Elaboración propia con base en Prabhu et al. (2019)

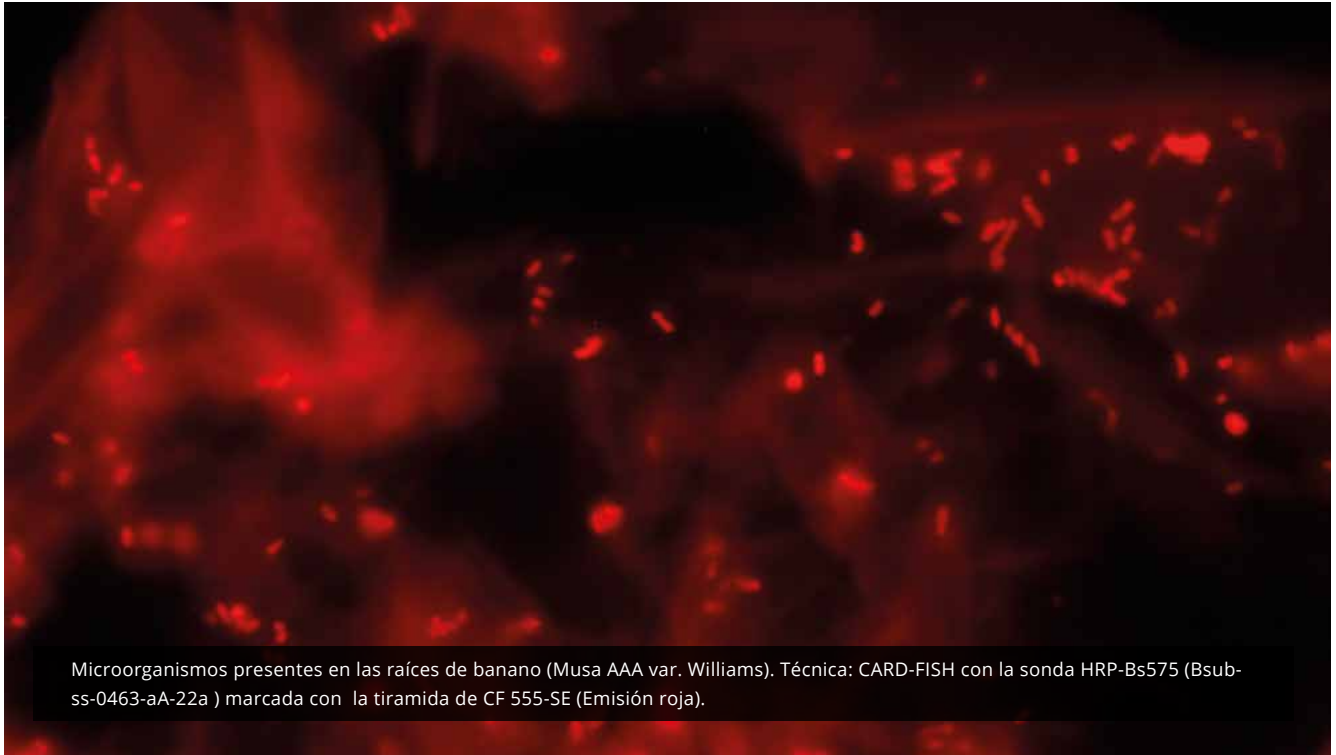


Foto: Luisa Fernanda Posada Uribe

La producción de ácidos inorgánicos como el ácido sulfúrico, el ácido nítrico y los ácidos carbónicos también ha sido reportada como un mecanismo de solubilización de fosfatos (Rodríguez et al., 2006). Estos ácidos reaccionan con compuestos de fosfato insolubles y los convierten en formas solubles, aunque se ha descrito que la efectividad de los ácidos inorgánicos en la liberación de ortofosfato parece ser menor que la de los ácidos orgánicos (Vazquez et al., 2000). También se ha reportado que la solubilización de fosfatos ocurre incluso sin producción de ácido, caso en el cual la acidificación del medio ocurre debido a la excreción de H^+ , que se presenta, así, como un mecanismo alternativo de solubilización de fosfato inorgánico. La excreción de H^+ se origina por la asimilación del NH_4^+ , la producción de H_2CO_3 en la respiración y la extrusión de aniones de ácidos orgánicos (Prabhu et al., 2019). La producción de EPS tiene un efecto indirecto en la solubilización de P. Estos EPS son producidos en gran parte por los microorganismos en respuesta al estrés ambiental. Los estudios sobre EPS microbianos han revelado su capacidad para unirse a metales en el suelo, por lo que pueden influir en la solubilidad de los fosfatos metálicos en el suelo (Ochoa-Loza et al., 2001). Asimismo, a la producción de sideróforos se le

ha atribuido su influencia indirecta en la solubilización de fosfatos de hierro en el suelo, ya que los sideróforos son sustancias secretadas por los microorganismos que muestran afinidad por la quelación del Fe.

En cuanto a la mineralización de fosfatos orgánicos en los suelos, como los presentes en los ácidos nucleicos, fosfolípidos, fosfonatos, ácido fítico, polifosfonatos y fosfatos de azúcar, se ha reportado su dependencia de enzimas microbianas como las fosfomonoesterasas o la fosfohidrolasa, las fitasas, la fosfonatasa y las C-P liasas. Las fosfomonoesterasas desfosforilan los enlaces fosfoéster o fosfoanhídrido de la materia orgánica liberando iones fosfato. En función de su pH óptimo, se dividen en fosfomonoesterasas ácidas o alcalinas, que pueden ser producidas por los microorganismos solubilizadores de fosfato dependiendo de las condiciones externas (Kim et al., 1998). Las enzimas fitasas hidrolizan compuestos de ácido fítico o mioinositol fosfato liberando el P (Estrada-Bonilla et al., 2021). La fosfonatasa y la C-P liasa hidrolizan los enlaces éster de los fosfonatos (ej., fosfoenol piruvato, fosfonoacetato) y convierten a estos últimos en hidrocarburos e iones fosfato para su asimilación (Prabhu et al., 2019).

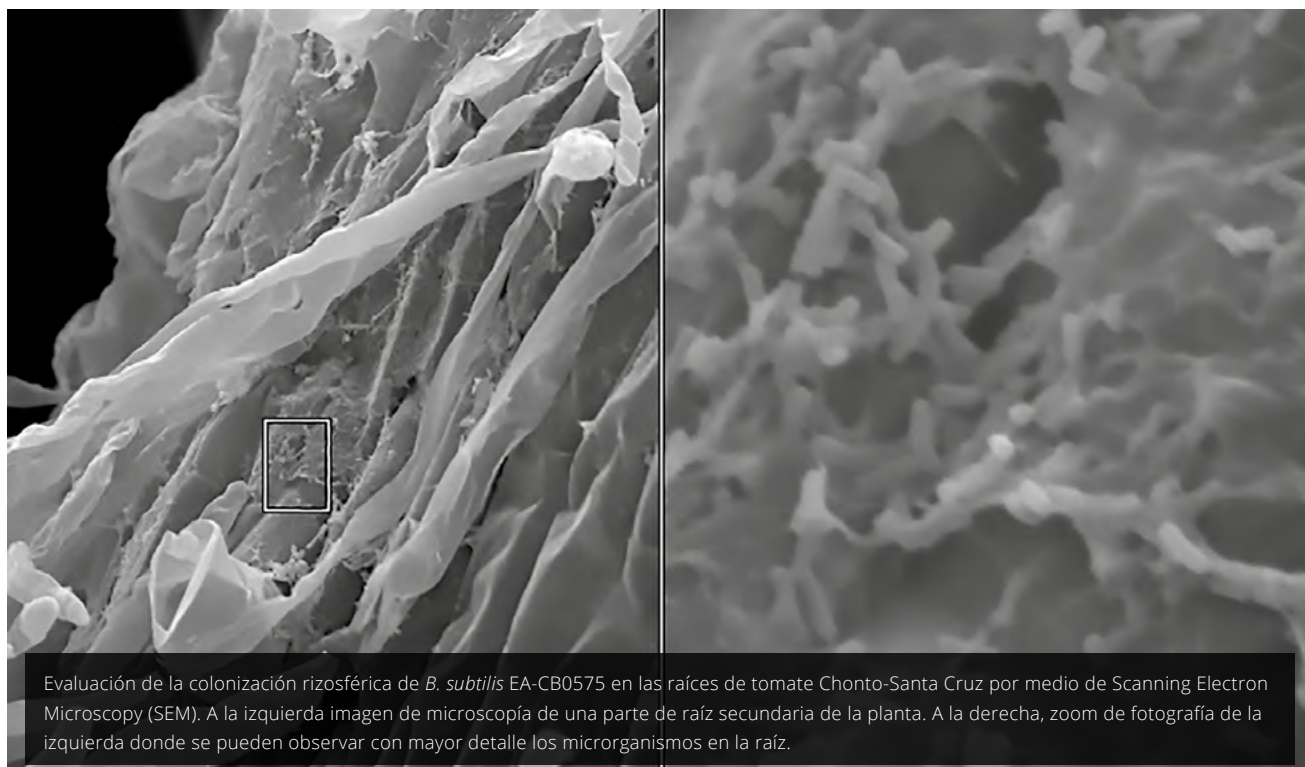
Solubilización de potasio

Aunque el K está presente en el suelo como un elemento abundante o se aplica en los campos como fertilizante natural o sintético, solo el 1 o 2 % de este está disponible para las plantas, pues el resto está unido a otros minerales y, por lo tanto, no está disponible. Los componentes del K en el suelo más comunes (90-98 %) son el feldespato y la mica (McAfee, 2008). Ciertos microorganismos (hongos y bacterias) son capaces de disolver el K insoluble y ponerlo a disposición de las plantas; estas poblaciones de microorganismos solubilizadores de K están presentes en el suelo rizosférico y promueven el crecimiento de las plantas (Meena et al., 2014). Se conoce una amplia gama de microorganismos solubilizadores de K que lo liberan y lo disponibilizan para la planta a partir de minerales que contienen este elemento en el suelo; los principales reportados son *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus edaphicus*, *Bacillus circulans*, *Paenibacillus* spp., *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Pseudomonas* spp., *Burkholderia* spp. (Basak & Biswas, 2012; Lian et al., 2002; Liu et al., 2012; Rajawat et al., 2011; Sheng et al., 2008; Singh et al., 2010), *Arthrobacter* sp. (Zarjani et al., 2013), *Enterobacter hormaechei* (KSB-8) (Prajapati et al., 2013) y *Paenibacillus mucilaginosus*

(Liu et al., 2012). En general, se ha aceptado que el mecanismo principal de la solubilización de K mineral es la acción de ácidos orgánicos sintetizados por estos microbios (Meena et al., 2014). Estos ácidos están acompañados por reacciones de intercambio de acidólisis y complexólisis, procesos clave atribuidos a su conversión en forma soluble (Uroz et al., 2009). Los mecanismos relacionados con la solubilización de K son una disminución en el pH o la mejora en la quelación de los cationes unidos al K; además, también se puede presentar acidólisis del área circundante de los microorganismos (Meena et al., 2014). De los diferentes ácidos orgánicos involucrados en la solubilización de K insoluble, los ácidos succínico, cítrico, glucónico, α -cetoglucónico y oxálico son los más prominentes liberados por las cepas microbianas (Archana et al., 2012; Zhang et al., 2013).

Fijación de nitrógeno atmosférico

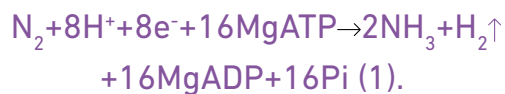
Este proceso es el primer paso en el ciclo del N desde la atmósfera hasta la biósfera, y es clave en la nutrición vegetal (Barea et al., 2005). Es un mecanismo de biofertilización, ya que por medio de este el N del aire, que se encuentra en una proporción aproximada del 78 %, es fijado por las bacterias y puede ser



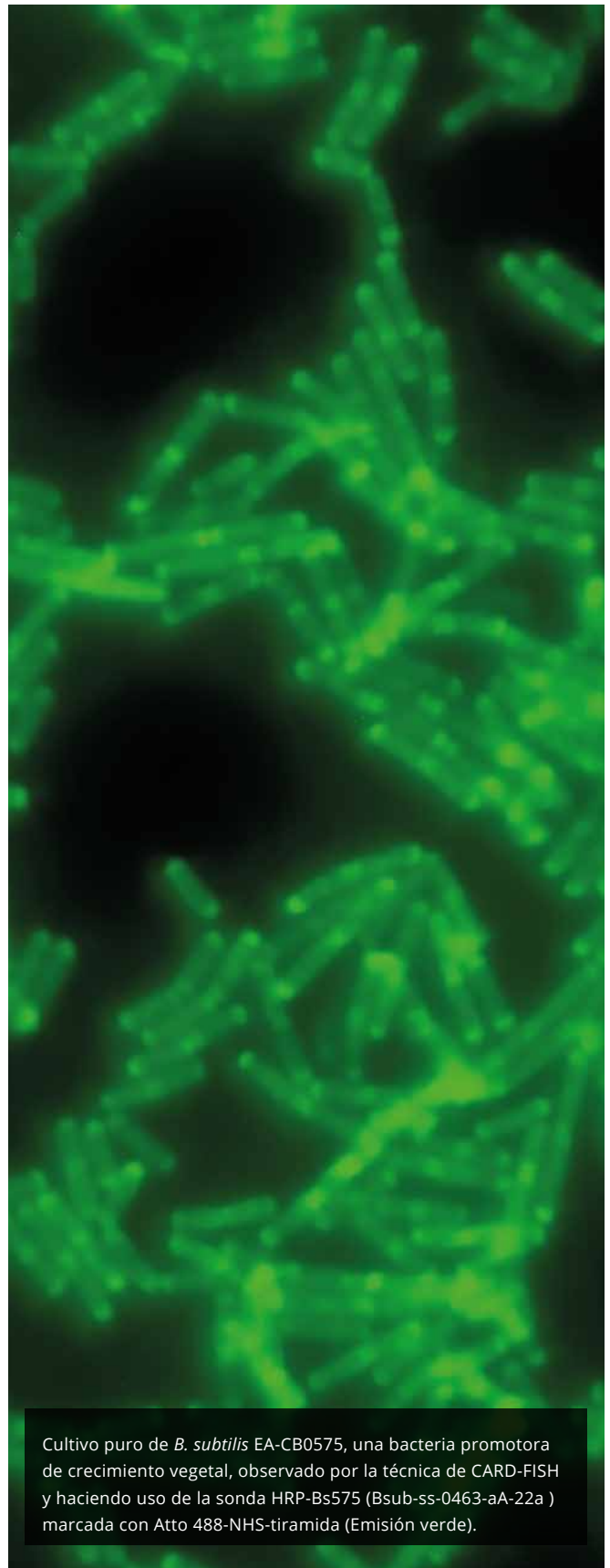
Evaluación de la colonización rizosférica de *B. subtilis* EA-CB0575 en las raíces de tomate Chonto-Santa Cruz por medio de Scanning Electron Microscopy (SEM). A la izquierda imagen de microscopía de una parte de raíz secundaria de la planta. A la derecha, zoom de fotografía de la izquierda donde se pueden observar con mayor detalle los microorganismos en la raíz.

Foto: Luisa Fernanda Posada Uribe

asimilado por las plantas para su nutrición (Ladha & Reddy, 2003). Los procariotas son los únicos organismos que producen la enzima nitrogenasa, la cual cataliza la reducción del N_2 atmosférico a amoníaco (Hoffman et al., 2014). Actualmente, este mecanismo suma alrededor del 65% del suplemento de N en los cultivos en el mundo, debido principalmente a las leguminosas. Este proceso es realizado por géneros bacterianos con la capacidad de formar nódulos (simbióticos) en la raíz, tales como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, entre otros, o por fijadores asimbióticos, como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia* y *Azospirillum* (Bashan & de-Bashan, 2010). Este proceso es molecular y genéticamente complejo, debido a que existen dos componentes sensibles al oxígeno que regulan la nitrogenasa; uno de ellos, el componente I, se compone de 2 subunidades de β -proteínas, 2 subunidades de α -proteínas, 24 moléculas de Fe, 2 moléculas de molibdeno y un cofactor de Fe y molibdeno, llamado FeMoCo. El componente II, por su parte, está conformado por 2 unidades de proteínas α asociadas a Fe; además, en este componente II se requiere de un complejo de magnesio y energía en forma de ATP para que la nitrogenasa actúe reduciendo el N_2 hasta NH_3 , tal como lo presenta la ecuación (1).



El proceso de fijación de N puede ser monitoreado debido a que, además de la reducción ya enunciada, la nitrogenasa reduce acetileno a etileno, y la detección de este último gas implica la presencia y acción de la enzima (Glick et al., 2010). Las bacterias fijadoras de N_2 simbióticas fijan el N dentro de los nódulos. A estos microorganismos no se los considera PGPR, pues no son bacterias de vida libre, pero sí se consideran parte de las PGPB, debido a su actividad benéfica en la planta. Los nódulos se forman como respuesta a un proceso de señalización iniciado cuando la planta secreta flavonoides que inducen la expresión de los genes *nod* y la producción de los factores *Nod*. A su vez, las bacterias secretan moléculas de lipoquitooligosacáridos (Lco) que dan señales a la planta para desencadenar la división



Cultivo puro de *B. subtilis* EA-CB0575, una bacteria promotora de crecimiento vegetal, observado por la técnica de CARD-FISH y haciendo uso de la sonda HRP-Bs575 (Bsub-ss-0463-aA-22a) marcada con Atto 488-NHS-tiramida (Emisión verde).

Foto: Luisa Fernanda Posada Uribe

mitótica en las raíces, penetrar en la corteza, formar los nódulos, reproducirse y producir el complejo de la nitrogenasa, que actúa a bajas concentraciones de oxígeno. Este es un proceso simbiótico, pues las bacterias entregan N atmosférico a la planta en formas asimilables y la planta brinda a la bacteria diversas fuentes de nutrientes (Hayat et al., 2010).

Sobre la genética de la fijación biológica de N, se conoce que los genes *nif* y *fix* están directamente implicados en el proceso, y han sido caracterizados de forma detallada para bacterias tanto simbióticas como asimbióticas (Bashan & de-Bashan, 2010; Merrick, 2005). Con base en estas investigaciones, se han realizado inserciones de los genes *nif* a diferentes especies de plantas, con el fin de mejorar la fijación de N y la nutrición vegetal. Los genes que deben transferirse para tal fin incluyen *nifH*, *nifD* y *nifK*, los cuales codifican tres polipéptidos de la enzima nitrogenasa, y los genes *nifB*, *nifN* y *nifE*, además de *nifV*, *nifM*, *nifS* y *nifU*, envueltos en la síntesis del cofactor de Fe-molibdeno y de la proteína de Fe activa (Ladha & Reddy, 2003).

Producción de hormonas y reguladores del crecimiento

La producción de hormonas de crecimiento vegetal es el mecanismo de promoción del crecimiento más estudiado. Las bacterias que se encuentran en la rizósfera pueden intervenir en el crecimiento vegetal por la producción de hormonas, tipo fitohormonas, como auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico (ABA), etileno y jasmonatos (JA) (Backer et al., 2018).

Producción de auxinas

La hormona vegetal más estudiada es el ácido indolacético (AIA), el cual se ha reportado como un inductor del crecimiento vegetal que facilita la iniciación de raíces, la división celular y la elongación (Kang et al., 2019). Esta hormona pertenece al grupo de las auxinas, las cuales ayudan a la proliferación, elongación y establecimiento de raíces cuando tienen contacto con la planta. Específicamente para el caso del AIA, se conoce que se asocia también con algunas patologías, como infecciones por *Agrobacterium tumefaciens* y diferentes patovares de *Pseudomonas syringae*, induciendo la formación de protuberancias en las plantas. El AIA es un compuesto de la familia de los indoles que, al estimular la raíz, mejora el anclaje de la planta en el suelo, la captación de nutrientes y la capacidad de supervivencia por parte de esta (Patten & Glick, 2002). Los efectos que se generan a nivel vegetal por este indol dependen de su concentración: a bajas concentraciones, puede estimular el crecimiento, pero a altas, puede ser inhibitorio (Ahmad et al., 2005). Se ha encontrado, además, que las auxinas ayudan a disminuir el nivel de etileno en las plantas por el ciclo propuesto por Glick et al. (1998).

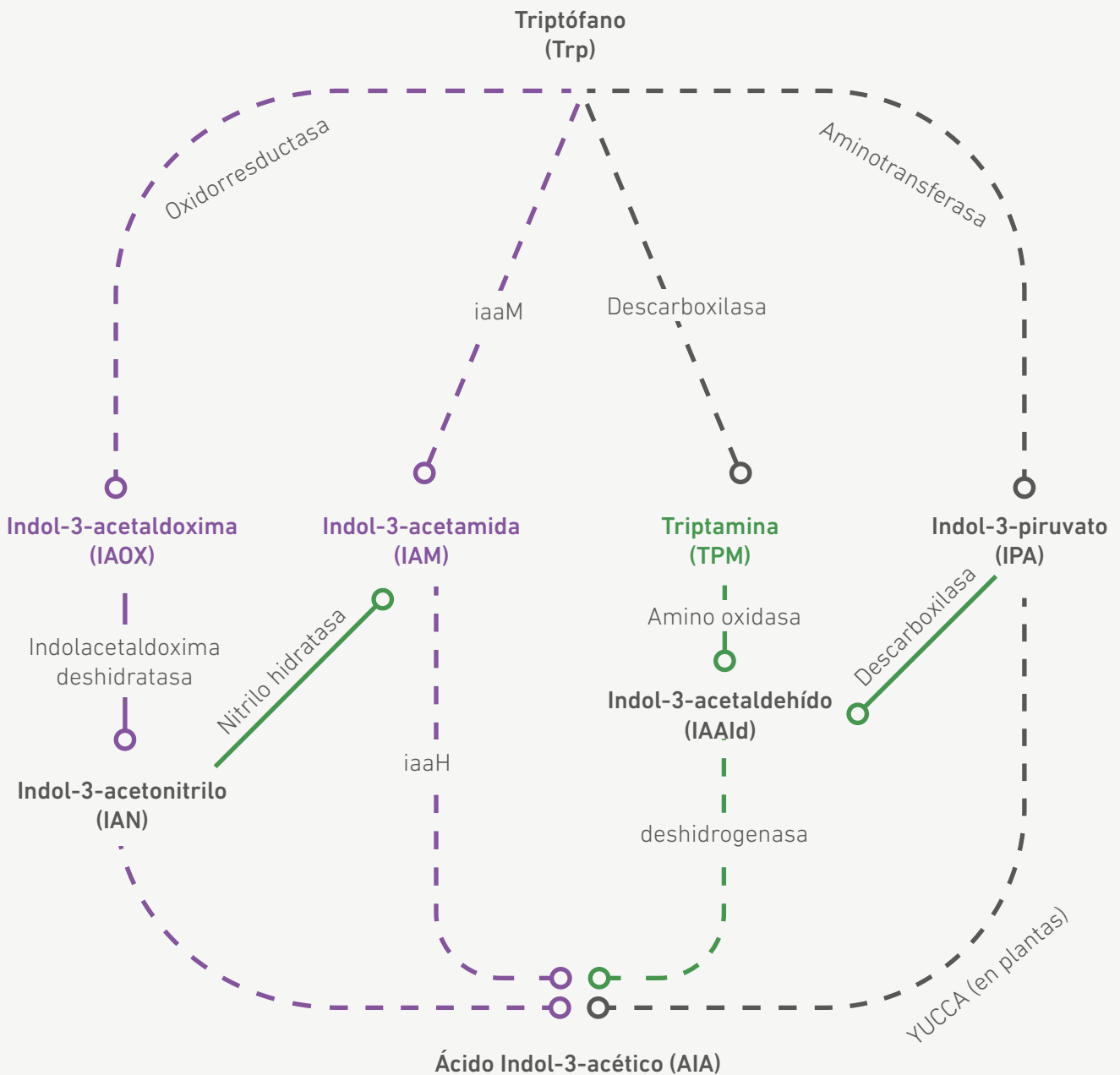
En bacterias, el AIA puede ser biosintetizado mediante dos vías: una dependiente y una independiente del L-triptófano (Patten & Glick, 1996); sin embargo, la vía independiente de triptófano todavía es elusiva en bacterias (Zhang et al., 2019).

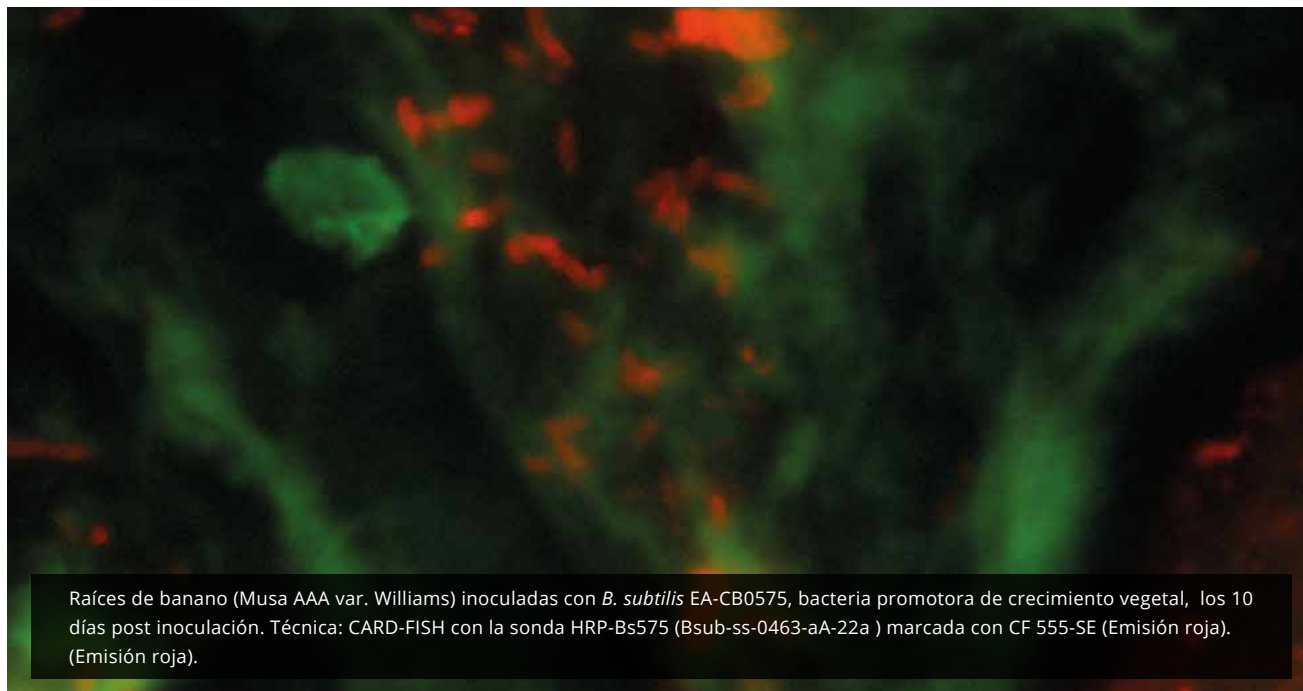
Entre las vías dependientes en bacterias, encontramos principalmente cuatro: indol-3-piruvato (IPA), triptamina (TPM), indol-3-acetonitrilo (IAN) e indol-3-acetamida (IAM), las cuales involucran diferentes enzimas, incluyendo oxidasas, descarboxilasas, hidratatasas, oxidorreductasas y nitrilasas (Figura 3.3) (Patten & Glick, 1996; Zhang

et al., 2019). La producción de compuestos indólicos a partir de triptófano ha sido reportada en PGPB como *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium* sp. y *Sinorhizobium meliloti*, entre otros (Moreno-Galván et al., 2020; Rojas-Tapias et al., 2012; Zhang et al., 2019).

■ **Figura 3.3.** Vías principales de biosíntesis de ácido indolacético (AIA) dependientes de triptófano en bacterias.

Fuente: Elaboración propia con base en Zhang et al. (2019)





Raíces de banano (*Musa* AAA var. Williams) inoculadas con *B. subtilis* EA-CB0575, bacteria promotora de crecimiento vegetal, los 10 días post inoculación. Técnica: CARD-FISH con la sonda HRP-Bs575 (Bsub-ss-0463-aA-22a) marcada con CF 555-SE (Emisión roja). (Emisión roja).

Foto: Luisa Fernanda Posada Uribe

Producción de giberelinas

Las giberelinas son otra hormona de crecimiento producida por PGPB como *Rhizobium meliloti*, *Bacillus* spp., *Azospirillum* spp., *Acetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum seropedicae*, y tienen como función el desarrollo vegetativo de la planta (Bottini et al., 2004; Masciarelli et al., 2014; Ullah et al., 2019; Vejan et al., 2016). Las giberelinas reciben su nombre del hongo *Gibberella fujikuroi* y fueron identificadas por primera vez en 1926 (Arteca, 1996). Su notación se realiza mediante el símbolo GA, seguido de su numeración (GA₁, GA₂, GA₃, etc.), siendo el ácido giberélico (GA₃) la forma más activa, usualmente encontrado en forma libre o unido a glicósidos (Duca, 2015). Las giberelinas son sintetizadas en plantas mayores, hongos y bacterias, y su estructura base son ácidos diterpenoides, que consisten en residuos de isoprenos (generalmente de cuatro anillos); existen aproximadamente 136 diferentes giberelinas identificadas y caracterizadas (Gamalero & Glick, 2011).

La importancia biológica de este grupo de hormonas radica en la estimulación de la elongación del tallo (Vejan et al., 2016), el estímulo del crecimiento de la fruta, la determinación de cambios en el fotoperiodo, la participación en el cese de la dormancia de brotes y semillas, y la participación en la florescencia. Estas

hormonas, además, han sido asociadas a la promoción del crecimiento radicular, debido a que regulan la abundancia de los pelos radiculares. Sin embargo, se ha determinado que interactúan con otras hormonas en los procesos mencionados, con el fin de alterar el balance hormonal y producir crecimiento (Gamalero & Glick, 2011). Las giberelinas se han vinculado a la producción de α -amilasas, algunas proteasas, fosfatasa ácida, β -gluconasa, α -glucosidasa y ribonucleasa. Asimismo, estimulan la división celular, controlan la actividad mitótica y activan las enzimas responsables de la biosíntesis de fosfolípidos (Duca, 2015; Spaepen, 2015; Sun et al., 2019).

Producción de citoquininas

Esta hormona es de baja concentración en la mayoría de las muestras biológicas y de difícil cuantificación. Tiene una gran importancia a nivel vegetal debido a que regula la citoquinesis y ayuda en el mejoramiento de la división celular, la producción de raíces y la formación de pelos absorbentes. A pesar de la dificultad en su medición, las técnicas de radiomarcación de citoquininas han permitido determinar su ruta metabólica, y el uso de técnicas como inmunoarreglos y la cromatografía de capa fina han ayudado a caracterizar su producción por microorganismos como *Pseudomonas fluorescens* (García de Salamone et al., 2001).

Producción de ácido abscísico (ABA)

El ABA es una hormona asociada con la inducción del cierre estomático, la maduración de frutos y la inhibición de la germinación de semillas. Adicionalmente, está vinculada con la dormancia de los brotes y las respuestas de protección contra estreses abióticos como sequía, estrés por salinidad y toxicidad por metales (Sharma et al., 2019; Spaepen, 2015; Ullah et al., 2019). Desde un punto de vista fisiológico, el ABA apoya el flujo del agua en las plantas, debido a su efecto regulatorio en los estomas, e incluso algunos autores han llegado a considerar al ABA como la verdadera señal bajo condiciones de estrés hídrico (Cassán et al., 2011).

La producción bacteriana de ABA ha sido reportada para cepas de *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Rhizobium* spp., *Bradyrhizobium japonicum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* y *Pseudomonas fluorescens*; sin embargo, sus vías biosintéticas siguen en estudio (Hayat et al., 2010; Ullah et al., 2019). Adicionalmente, bajo condiciones de estrés, la producción bacteriana de ABA podría sostener el pool interno de ABA en las plantas y, así, mitigar los efectos negativos generados por el estrés (Spaepen, 2015). Sin embargo, cabe resaltar que la cuantificación de ABA producido por bacterias solo se ha realizado en medios de cultivo en laboratorio (Ullah et al., 2019).

Producción de etileno

El etileno es otra de las hormonas que pueden ser producidas por PGPB. Este compuesto gaseoso es un potente regulador del crecimiento vegetal y afecta procesos como el desarrollo de raíces adventicias, la producción de pelos absorbentes y la germinación y senescencia de la planta; cuando esta hormona permanece en altas concentraciones aun después de la germinación, puede causar inhibición de la elongación radicular (Hayat et al., 2010). Glick et al. (1998) propusieron una estrecha interacción entre la concentración de AIA en las plantas y el AIA producido por las rizobacterias, la concentración de esta

hormona en la planta y la concentración de etileno, cuyo intermediario es el 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). En este sistema, las bacterias de la rizósfera que producen AIA generan grandes cantidades de esta hormona. Una parte del AIA se emplea para la elongación y proliferación vegetal, y el exceso restante activa la ACC-sintasa, encargada de la conversión de la S-adenosilmetionina en ACC. Si se produce un exceso de ACC en la planta, la enzima ACC-oxidasa la convierte en etileno, cuya presencia en la planta podría presentar efectos secundarios. Adicionalmente, algunas PGPB pueden producir la enzima ACC-deaminasa, la cual convierte el ACC en amoníaco y α -cetobutirato, evitando su conversión a etileno. En este modelo se plantea, de esta forma, que la sobreproducción de AIA conlleva un aumento en la concentración de etileno en la planta (Glick et al., 1998).

Producción de jasmonatos (JA)

Los JA son ésteres identificados y caracterizados a partir de la flor de jazmín (*Jasminum grandiflorum*), de donde fue extraído el metil jasmonato (MeJA). Estos modulan varias funciones esenciales en el desarrollo de las plantas, desde germinación hasta crecimiento vegetativo y senescencia. Adicionalmente, los JA activan los mecanismos de defensa de las plantas en respuesta a heridas producidas por insectos, ataques de patógenos y estreses ambientales como baja temperatura, salinidad y toxicidad por metales pesados (Sharma & Laxmi, 2016). Se ha reportado la producción microbiana de ácido jasmónico y su precursor, el ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), en bacterias endófitas aisladas tanto de girasol (Forchetti et al., 2007) como de la raíz del arbusto halófito *Prosopis strombulifera* (Piccoli et al., 2011), de lo cual es interesante que estos microorganismos hayan sido aislados bajo condiciones de estrés ambiental como déficit hídrico y salinidad, respectivamente. Lo anterior puede indicar que la producción de JA por estos endófitos puede estar relacionada con la mitigación de los efectos deletéreos de estreses abióticos, aunque no existe una investigación profunda sobre la biosíntesis de estos compuestos por microorganismos.

Mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal por PGPB

Las PGPB pueden reducir la acción de microorganismos fitopatógenos por medio de mecanismos como la producción de sustancias antibióticas, la producción de enzimas líticas, la producción de sideróforos o la activación de los genes de defensa, que a su vez tienen diferentes repercusiones en las actividades para enfrentar el ataque de los fitopatógenos. Estas se consideran las dos clases más importantes de mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal por PGPB (Olanrewaju et al., 2017).

Producción de antibióticos

La producción de antibióticos es posiblemente el mecanismo más poderoso que las PGPB tienen para el control de fitopatógenos. Estos microorganismos son capaces de producir una amplia gama de compuestos eficaces contra muchos patógenos (Bashan & de-Bashan, 2005). Entre los géneros de PGPB con mayor producción de antibióticos, están *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces*. Los compuestos de las familias de fenazinas, pirrolnitrinas, pioluteorina, floroglucinoles, lipopéptidos cíclicos y cianuro de hidrógeno han sido descritos para el género *Pseudomonas* (Raaijmakers et al., 2009). La zwittermicina A, el HCN (cianuro de hidrógeno), los lipopéptidos como las surfactinas, iturinas y fengicinas, además de compuestos antibióticos volátiles como el 2,3-butanodiol, son ejemplos de antibióticos producidos por microorganismos del género *Bacillus* (Ongena & Jacques, 2008), mientras que *Streptomyces* sp. produce antibióticos de la familia kasugamicina, una amplia gama de antibióticos bien reconocidos, y otros como estreptomicina, avermectina, milbemicina, etc. (De Lima Procópio et al., 2012).

Producción de enzimas líticas

Las bacterias promotoras de crecimiento pueden producir enzimas líticas como las glucanasas, quitinasas y celulasas, las cuales degradan las paredes de los patógenos. Se han reportado investigaciones con diversos aislados productores de β -1,3, β -1,4 y β -1,6 glucanasas (Compant et al., 2005), quitina (Kavino et al., 2010), celulasas (Bashan & de-Bashan, 2005; Glick, 2012), entre otras, con el fin de controlar una diversidad de patógenos, tales como *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, entre otros. Aunque algunas plantas son capaces de producir estas enzimas y lograr que funcionen como proteínas PR (relacionadas con la patogénesis), los microorganismos pueden ser una fuente importante de estas para el biocontrol (Ko et al., 2009).

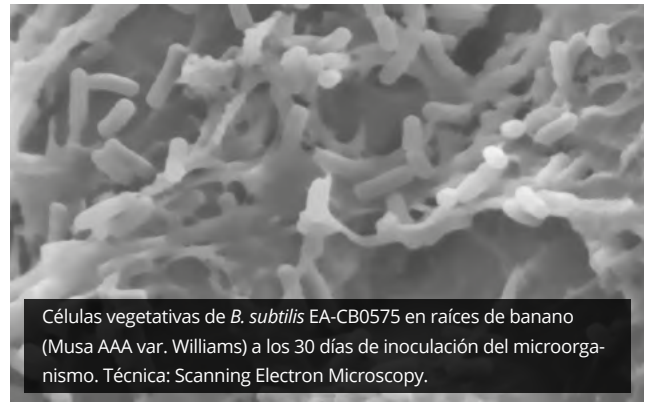
Otros metabolitos, como los compuestos volátiles acetoína y 2,3-butanodiol, además de promover el crecimiento vegetal, pueden generar biocontrol de patógenos debido a que son inductores de resistencia sistémica en la planta (Ryu et al., 2004).

Producción de sideróforos

Las plantas toman el Fe en forma de ion ferroso (Fe^{+2}), pero la forma comúnmente encontrada en el suelo es el ion férrico (Fe^{+3}) (Vessey, 2003). Algunas PGPB tienen la capacidad de solubilizar el Fe del suelo por la producción de compuestos quelantes, los cuales se denominan *sideróforos*. Estos compuestos, que son sintetizados por los microorganismos para sobrevivir, tienen pesos moleculares de entre 400 y 1.000 Da y poseen una alta afinidad con el Fe. Los sideróforos hacen disponible el Fe para el crecimiento microbiano y brindan este nutriente a la planta. Una consecuencia de este mecanismo es la reducción en la proliferación de patógenos por la competencia por nutrientes. El género más estudiado por la producción de este tipo de compuestos es *Pseudomonas* (Antoun & Prévost, 2006). Bashan y de-Bashan (2005) reportan un estudio con un mutante de *Pseudomonas putida* sobreproductor de sideróforos, el cual fue más eficiente que la bacteria silvestre en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* en tomate, lo que brinda indicios de que la producción de sideróforos es un método de biocontrol efectivo, además porque diversos estudios posteriores lo han corroborado (Chaiharn et al., 2009; Laslo et al., 2012). Para el género *Pseudomonas* se han dilucidado compuestos sideróforos como la pioverdina (Pvd), la ferropioverdina (Pvd con hierro) y la pseudobactina. Adicionalmente, en diversos estudios con mutantes no productores y con mutantes sobreproductores de estos compuestos se ha encontrado que hay un alto potencial de biocontrol por parte de las especies que los producen (Sasirekha & Srividya, 2016).

Inducción de resistencia sistémica

Las plantas han desarrollado mecanismos complejos para reconocer y defenderse de los ataques de fitopatógenos. Por medio de ellos, se producen moléculas elicitoras de diferentes rutas de señalización de defensa vegetal. En 1991, los científicos Kloepper (Auburn University, Estados Unidos) y Schippers (Baarn, Países Bajos) descubrieron de forma independiente un mecanismo al que denominaron *resistencia sistémica inducida* (ISR, por sus siglas en inglés), que consiste en el desencadenamiento de una ruta de señalización



Células vegetativas de *B. subtilis* EA-CB0575 en raíces de banano (Musa AAA var. Williams) a los 30 días de inoculación del microorganismo. Técnica: Scanning Electron Microscopy.

Foto: Luisa Fernanda Posada Uribe

que mantiene a la planta alerta ante la llegada de microorganismos patógenos. Esta activación disminuye la eficiencia con la que un patógeno puede llegar a la planta y, por tanto, ayuda a reducir o evitar la enfermedad (Walters & Heil, 2007). La inducción de la resistencia sistémica confiere a las plantas una mejora en su respuesta de defensa por periodos prolongados frente a ataques de fitopatógenos, sean bacterias, virus u hongos, o frente a estímulos químicos (Pieterse et al., 2014). Para que el mecanismo exista, en la planta deben estar presentes una serie de compuestos inductores diferentes a los patogénicos, entre los que se encuentran lipopolisacáridos, sideróforos y 2,3-butanodiol. Se han descrito rutas de señalización de este mecanismo y se han evaluado diversos determinantes bacterianos que disparan las respuestas de resistencia sistémica en la planta; sin embargo, hoy en día el tema es de interés y existe un campo de investigación grande que trata de responder diversos aspectos aún no comprendidos (Ramírez & Kloepper, 2012). Este mecanismo es fenotípicamente similar a la resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés), la cual es activada por la presencia de patógenos. Mientras que para la SAR se requiere de la acumulación de ácido salicílico, para la ISR se requiere de inductores como el etileno, el ácido jasmónico u otros previamente enunciados (Bhattacharyya & Jha, 2012). El principio de este fenómeno de ISR radica en que los mecanismos de defensa están activos antes de la infección del patógeno, y de esta manera la enfermedad puede ser reducida una vez el fitopatógeno llegue a infectar. La resistencia sistémica puede ser activada por lipopolisacáridos, sideróforos, lipopéptidos, antibióticos, acil-homoseril-lactonas (AHL), compuestos volátiles como 2,3-butanodiol y acetoina. Además, formas avirulentas de los patógenos o microorganismos no patógenos son también elicitores (Ongena & Jacques, 2008; Van Loon, 2007).

Mecanismos de interacción de las PGPB y la planta

Las plantas son colonizadas por un número increíble de microorganismos que pueden alcanzar densidades mayores a las mismas células vegetales, lo que genera un “pool” asombroso de genes en la rizósfera (Mendes et al., 2013).

Diversos estudios moleculares han demostrado la existencia de cerca de 4.000 especies de microorganismos por gramo de suelo, los cuales son ecológicamente versátiles y tienen fuertes interacciones con las plantas (Bhattacharyya & Jha, 2012). Desde este punto de vista, las plantas pueden verse como superorganismos que tienen la capacidad de depositar fotosintatos hacia la esfermósfera, la filósfera, la rizósfera o la micorrizósfera y que alojan poblaciones de microorganismos que son afectadas por los metabolitos presentes en los sustratos (Mendes et al., 2013). Algunos de esos microorganismos generan efectos deletéreos a nivel vegetal, es decir, pueden inhibir el crecimiento por producción de compuestos que alteran el ciclo productivo vegetal, como en el caso del etileno (Nehl et al., 1997); otros, denominados *neutros*, no producen un efecto significativo, y otros generan un efecto positivo en el crecimiento de la planta. Son estos últimos microorganismos en los que se enfoca este trabajo, pues promueven el crecimiento de la planta y pueden inducir su sanidad.

Las plantas exudan una gran cantidad de nutrientes por medio de sus raíces; por ejemplo, entre el 10 y el 44 % del carbono que las plantas consumen se libera al suelo. Estos exudados son en su mayor proporción ácido glutámico, ácido aspártico, leucina, isoleucina, lisina, entre otros aminoácidos; ácidos orgánicos como el ácido málico, cítrico, succínico, entre otros, y azúcares como glucosa y xilosa. Estos exudados atraen una gran cantidad de microorganismos que generan rizodepósitos alrededor de las raíces, con una concentración que puede llegar a ser 1.000 veces mayor que en el suelo (Bais et al., 2004; Lugtenberg & Kamilova, 2009). Allí, en estas zonas de alta concentración de nutrientes, las bacterias se desarrollan, colonizan las raíces y generan importantes interacciones con las plantas, entre las que se resalta la colonización de microorganismos promotores de crecimiento (como las PGPB), los cuales pueden producir aumento en el vigor, la sanidad o la productividad del cultivo, además de resistencia a diferentes condiciones de estrés biótico o abiótico (Bais et al., 2004). Asimismo, se ha reportado el efecto de muchos de los exudados de la raíz en la quimiotaxis con la planta, especialmente por ácidos orgánicos como el málico, pero existe una dependencia de los diferentes compuestos exudados y de la selección de la microbiota reclutada hacia la planta (Rudrappa et al., 2008). Una vez reclutados, estos microorganismos comienzan un proceso de colonización en el cual se forman biopelículas, que dependen de la secreción de compuestos orgánicos en forma diferencial en la longitud de la raíz.

La colonización de las raíces de las plantas por los microorganismos allí presentes incluye pasos de reconocimiento, adherencia, invasión, colonización y, finalmente, crecimiento de la población. En el caso del proceso de reconocimiento, las raíces de las plantas generan señales químicas que

son detectadas por los microorganismos, y estos desencadenan, a su vez, otras señales para el inicio de la colonización (Bais et al., 2006; Berg, 2009). La invasión, por su parte, se presenta solamente si el microorganismo que coloniza es un endófito o un patógeno. Existen diversos estudios de colonización de microorganismos en suelo y rizósfera; sin embargo, la gran mayoría se ha enfocado en bacterias Gram-negativas, como *Pseudomonas* spp., siendo menor la cantidad de los reportes en bacterias Gram-positivas, como *Bacillus* spp., aunque estos estudios ya están en desarrollo (Posada et al., 2018).

Los patrones de colonización o distribución de los microorganismos promotores del crecimiento han sido previamente estudiados para diversos sistemas planta-microorganismo (Dietel et al., 2013; Posada et al., 2016; Sharma et al., 2008), por medio de metodologías como inserción del gen de fluorescencia verde (GFP, por sus siglas en inglés) o sus derivados, o de genes reporteros, como el *LacZ*, para la β -galactosidasa, o el *GUS*, para la β -glucuronidasa (Choudhary & Johri, 2009; Fan et al., 2011; Liu et al., 2006). En el caso de los *Bacillus*, el uso de GFP también ha sido una alternativa; sin embargo, la falta de estabilidad del gen y la generación de mutantes con problemas en actividad han hecho que otras metodologías como FISH (*fluorescence in situ hybridization*) y RING-FISH (*recognition of individual genes-fluorescence in situ hybridization*) empiecen a ganar terreno (De-Bashan et al., 2010; Posada et al., 2018). Estas metodologías han permitido determinar que los microorganismos colonizan las raíces de las plantas principalmente en tres zonas: la punta de la raíz y las zonas de elongación, las zonas de emergencia de raíces laterales y los puntos de emergencia axiales en las raíces laterales. La punta de la raíz es la zona predominante de colonización, debido a la producción de una mayor cantidad de exudados carbonados a causa del desencapsulamiento en la cofia (Hawes et al., 2000). Sin embargo, estos patrones pueden variar de planta a planta y de acuerdo con los exudados que se encuentren en las raíces (Fan et al., 2011). Así, la formación de biopelícula se presentará en forma diferencial a lo largo de la raíz, debido a gradientes en la secreción de exudados (Rudrappa et al., 2008). La colonización rizosférica se da por medio de diferentes mecanismos, algunos de los cuales se presentan a continuación.

Producción de biopelícula

El mecanismo más importante de colonización en la rizósfera es la producción de biopelícula. Para entender el concepto, es necesario aclarar que nuestra percepción de *bacteria* está profundamente arraigada al paradigma del cultivo puro, pero las bacterias no se encuentran individualmente, sino en poblaciones o comunidades que cada día son más fáciles de visualizar para el hombre, debido a los avances en la microscopía y la biología molecular. Esto ha permitido determinar que las bacterias se comportan como un consorcio cooperativo, en el cual funcionan de forma coordinada y compleja (Davey & O'toole, 2000; Vlamakis et al., 2013). Este grupo o consorcio de microorganismos está asociado a productos extracelulares que permiten su anclaje en

Estas metodologías han permitido determinar que los microorganismos colonizan las raíces de las plantas principalmente en tres zonas: la punta de la raíz y las zonas de elongación, las zonas de emergencia de raíces laterales y los puntos de emergencia axiales en las raíces laterales.

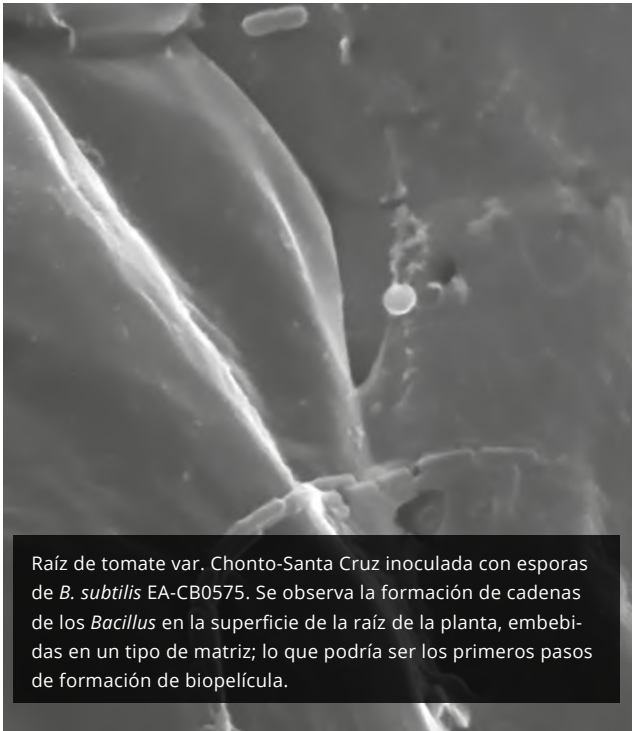
superficies bióticas o abióticas, y, en el caso específico de la rizósfera, las biopelículas suelen formarse en agregados de suelo o en las raíces de las plantas, donde las microcolonias son las unidades básicas de crecimiento (Seneviratne et al., 2011; Wang et al., 2019). La colonización de la superficie de las raíces es similar a la colonización de superficies abióticas, y, allí, la formación de la biopelícula es el fenómeno que permite la adherencia de estas microcolonias (Beauregard, 2015). La producción de biopelícula está directamente relacionada con la presencia de sustancias como proteínas, metabolitos secundarios, ácidos orgánicos y péptidos, que inician la cadena de señales para el desencadenamiento de la expresión génica (Berg, 2009). Las biopelículas microbianas están formadas por células que se encuentran embebidas en una matriz proteica, con exopolisacáridos (EPS) y ácidos nucleicos, como el ADN, la cual se forma por

los compuestos que las mismas bacterias producen. Los microorganismos que constituyen esta matriz son motiles, no motiles o esporas, y su presencia en la biopelícula les permite a las células expandirse en las superficies, extenderse, tomar nutrientes y, a su vez, continuar la producción de sustancias químicas, como las proteínas TasA y BslA, las cuales polimerizan fibras amiloides y brindan la naturaleza hidrofóbica a la superficie en la que se encuentran (Branda et al., 2006; Vlamakis et al., 2013). La producción de biopelícula se relaciona con la capacidad de diferentes cepas de *Bacillus* para colonizar las raíces de las plantas, y su relación ha sido previamente estudiada *in vitro* e *in vivo* (Zhang et al., 2015). Además, diferentes reportes bibliográficos indican que, al mutar genes relacionados con la formación de las biopelículas, se reduce o se pierde por completo la capacidad de colonizar las raíces (Bais et al., 2004; Zhou et al., 2016).



Raíz de banano (*Musa* AAA var. Williams) inoculada con esporas de *B. subtilis* EA-CB0575, las cuales se observan ya germinadas como células vegetativas en la raíz a los 15 días post inoculación. La zona donde se observan los microorganismos corresponde a la parte superior de una raíz primaria de banano. Se empleó la técnica CARD-FISH con la sonda HRP-Bs575 (Bsub-ss-0463-aA-22a) marcada con CF 555-SE (Emisión roja) y contraste con DAPI (emisión azul).

Foto: Luisa Fernanda Posada Uribe



Raíz de tomate var. Chonto-Santa Cruz inoculada con esporas de *B. subtilis* EA-CB0575. Se observa la formación de cadenas de los *Bacillus* en la superficie de la raíz de la planta, embebidas en un tipo de matriz; lo que podría ser los primeros pasos de formación de biopelícula.

Foto: Luisa Fernanda Posada Uribe

Producción de enzimas y *quorum sensing* (QS)

El proceso de producción de biopelícula se lleva a cabo por la comunicación química bacteriana existente en zonas como la rizósfera, donde se regula la expresión de diversos genes de acuerdo con la densidad poblacional de microorganismos, por un proceso denominado *quorum sensing* (QS) (Seneviratne et al., 2011). El QS afecta procesos como la transferencia horizontal de genes, la producción de toxinas y antibióticos, la maceración de tejidos y la ya enunciada producción de biopelícula. Este proceso está mediado por moléculas señal como la acil-homoseril-lactona (AHL), gama-butirolactonas y el ácido cis-11-metil-2-dodecanoico (DSF), en bacterias Gram-negativas, y por moléculas como oligopéptidos y gama-butirolactonas sustituidas, en bacterias Gram-positivas. Además, en ambos grupos se ha encontrado que la feromona LuxS es un intermediario común *sensing* (Seneviratne et al., 2011). En el caso de las bacterias presentes en la rizósfera, el tipo de suelo donde se inoculan suele ser determinante para que el QS se presente, debido a que

en algunos tipos de suelos se encuentran enzimas que pueden impedir este proceso al interrumpir la cadena de señalización por la degradación de las moléculas señal, proceso que se denomina *quorum quenching* (QQ). Enzimas como las acil-homoserin-lactonasas y las AHL acilasas tienen esta capacidad, ya sea por el rompimiento del anillo lactona de las moléculas señal AHL o por la degradación del enlace amida de las AHL. En el primer caso, se produce acil-homoserina, la cual tiene baja actividad biológica, y en el segundo, se generan homoserinlactona y ácidos grasos, también con poca actividad (Kumar et al., 2011).

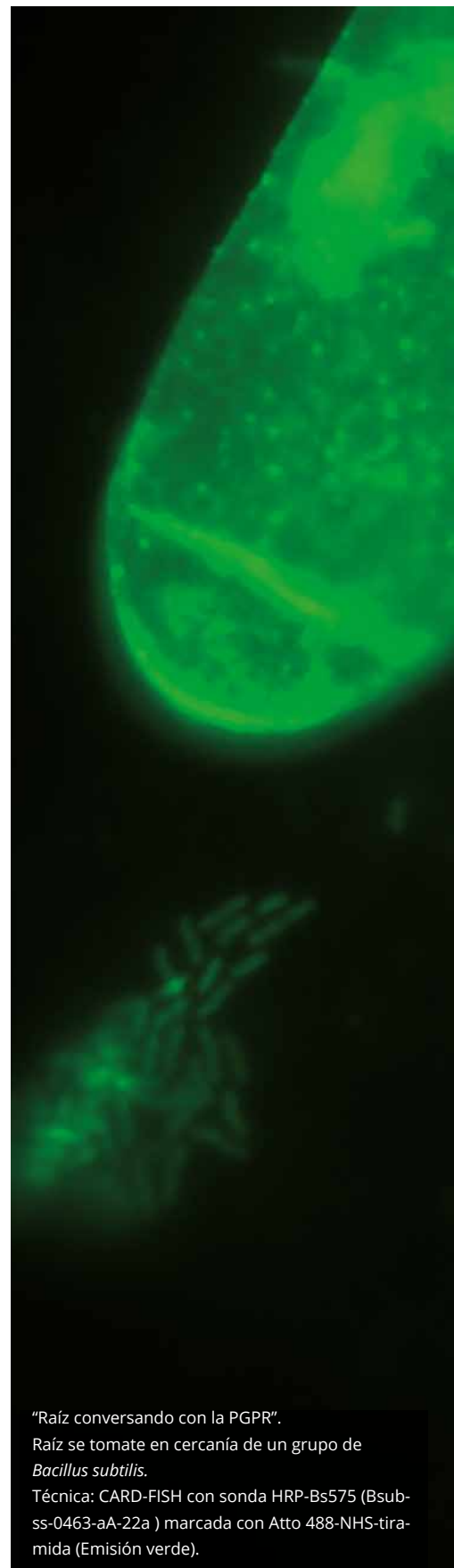
Producción de lipopéptidos

Diversas sustancias como los lipopéptidos también han sido relacionadas con la colonización de los microorganismos en la rizósfera. Varios reportes científicos han mostrado que los microorganismos del género *Bacillus* son muy versátiles en la producción de sustancias lipopeptídicas que median en la formación de biopelículas y en la colonización de la rizósfera, además de la activación de defensas en la planta. Estas moléculas están compuestas de un anillo cíclico-peptídico que a su vez se une a una cadena acil de carbonos lipídicos; de acuerdo con sus propiedades, los lipopéptidos se agrupan en tres familias principales: las surfactinas, las iturinas y las fengicinas, cada una de ellas con características bioquímicas y antimicrobiales diferentes (Ongena & Jacques, 2008). De estas familias, las surfactinas son predominantemente estudiadas en el campo de la colonización microbiana en la rizósfera (Bais et al., 2004; Nihorimbere et al., 2012; Pertot et al., 2013). Además, se conoce que, en general, la producción de lipopéptidos por el género *Bacillus* juega un rol muy importante en la habilidad de estos microorganismos para difundirse y colonizar las raíces de las plantas y otras superficies. Para la colonización microbiana en la rizósfera, el aporte de estos compuestos radica en la reducción de la tensión superficial del agua, lo que permite la movilidad de los microorganismos (Ongena & Jacques, 2008). En el agar, los microorganismos productores de estas sustancias generan movimientos

coordinados y patrones de crecimiento secuenciales y organizados que permiten ver colonias ordenadas y con crecimiento concéntrico (Rudrappa et al., 2008). Las surfactinas se han relacionado con los procesos de colonización por PGPB en la raíz de las plantas (Bais et al., 2004), y se ha encontrado, además, que ayudan a la motilidad de las células, especialmente en el desplazamiento de los microorganismos en sus nichos (Kearns et al., 2004). Asimismo, se ha reportado que estos lipopéptidos son reconocidos por las células vegetales y pueden mediar en procesos de defensa de las plantas ante fitopatógenos, razón por la cual se han incluido en el grupo de los MAMP (*microbe-associated molecular patterns*), junto con otros lipopéptidos como las fengicinas (Chandler et al., 2015). Además, se conoce que pueden elicitar procesos como la resistencia sistémica, en la cual se hace un *priming* en la planta, para estar preparados contra y contraponerse a la infección cuando los patógenos lleguen (Nihorimbere et al., 2012). Sin embargo, la detección de surfactinas —y en general de lipopéptidos— en el suelo es muy compleja, debido a la adsorción de metabolitos en las partículas del suelo, por lo que se prefieren estudios en hidroponía o en medio de cultivo sintético (Pertot et al., 2013).

Movimientos bacterianos, colonización y quimióstasis

Los movimientos que permiten el desplazamiento de las bacterias en la zona adyacente a la raíz y en el medio sintético son *swimming*, *swarming*, *twitching*, *gliding* y *spreading*, todos designados con palabras en inglés, pues permiten su recordación. La diferencia entre estos tipos de movimientos radica en la forma como la bacteria se mueve, el medio en el que lo hace y las estructuras que emplea. El *swimming* se da debido a un movimiento flagelar único en medio líquido o semilíquido; por su parte, el *swarming* hace referencia a un movimiento flagelar en medio sólido-semisólido; el *twitching* es un movimiento que se da debido a los pulsos que generan los direccionamientos de las fimbrias o cilias, en bacterias tanto flagelares como no flagelares; el *gliding* es un movimiento de bacterias sin pili, flagelos o fimbrias que se da por el deslizamiento del microorganismo en medios con componentes que permiten su desplazamiento, como los polisacáridos, y, finalmente, el *spreading* o *sliding* se presenta cuando las bacterias se resbalan al exterior de la colonia debido a la reducción de la tensión superficial en el medio, lo que genera patrones de crecimiento regulares y uniformes (Kearns, 2010). Estos movimientos permiten que los microorganismos se recluten en las raíces de las plantas y procedan a la colonización. La motilidad por *swarming* se ha identificado como un rasgo esencial del género *Bacillus* para la supervivencia en diversos ambientes, y se ha determinado que diversos ácidos orgánicos de los exudados mejoran la motilidad de los microorganismos y, de esta manera, su colonización en la rizósfera (Tan et al., 2013).



“Raíz conversando con la PGPR”.

Raíz se tomate en cercanía de un grupo de *Bacillus subtilis*.

Técnica: CARD-FISH con sonda HRP-Bs575 (Bsub-ss-0463-aA-22a) marcada con Atto 488-NHS-tiramida (Emisión verde).

Foto: Luisa Fernanda Posada Uribe

Referencias

- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology*, 29(1), 29-34. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/121463>
- Antoun, H., & Prévost, D. (2006). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En Z. A. Siddiqui (ed.), *PGPR: Biocontrol and biofertilization* (pp. 1-38). Springer. https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7_1
- Archana, D. S., Nandish, M. S., Savalagi, V. P., & Alagawadi, A. R. (2012). Screening of potassium solubilizing bacteria (KSB) for plant growth promotional activity. *Bioinfolet*, 9(4), 627-630. https://www.researchgate.net/publication/284757144_Screening_of_potassium_solubilizing_bacteria_KSB_for_plant_growth_promotional_activity
- Arteca, R. N. (1996). Historical aspects and fundamental terms and concepts. En R. N. Artica (ed.), *Plant growth substances: Principles and applications* (pp. 1-27). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2451-6_1
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9, artículo 1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Bais, H. P., Fall, R., & Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*, 134(1), 307-319. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028712>
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 233-266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Barea, J. M., Azcón, R., & Azcón-Aguilar, C. (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. En A. Varma, & F. Buscot (eds.), *Microorganisms in soils: Roles in genesis and functions* (pp. 195-212). Springer.
- Basak, B., & Biswas, D. (2012). *Modification of waste mica for alternative source of potassium: Evaluation of potassium release in soil from waste mica treated with potassium solubilizing bacteria (ksb)*. Lambert Academic Publishing.
- Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2005). Bacteria/plant growth-promotion. En D. Hillel (ed.), *Encyclopedia of soils in the environment* (vol. 1, pp. 103-115). Elsevier.
- Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2010). Chapter two - How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—A critical assessment. En D. L. Sparks (ed.), *Advances in agronomy* (vol. 108, pp. 77-136). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8), 1.225-1.228. <https://europepmc.org/article/agr/ind21969784>
- Bashan, Y., Singh, M., & Levanony, H. (1989). Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. *Canadian Journal of Botany*, 67(8), 2.429-2.434. <https://doi.org/10.1139/b89-312>
- Beauregard, P. B. (2015). Chapter one - Not just sweet talkers: How roots stimulate their colonization by beneficial bacteria. En H. Bais, & J. Sherrier (eds.), *Advances in botanical research* (vol. 75, pp. 1-20). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2015.07.001>
- Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11-18. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2092-7>
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1.327-1.350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Bottini, R., Cassán, F., & Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(5), 497-503. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1696-1>
- Branda, S. S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R., & Kolter, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1.229-1.238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05020.x>
- Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., & Luna, V. (2011). Basic and technological aspects of phytohormone production by microorganisms: *Azospirillum* sp. as a model of plant growth promoting rhizobacteria. En D. K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in agrobiology: Plant nutrient management* (pp. 141-182). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21061-7_7
- Chaiharn, M., Chunchaleuchanon, S., & Lumyong, S. (2009). Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), 1.919-1.928. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0090-7>
- Chandler, S., Van Hese, N., Coutte, F., Jacques, P., Höfte, M., & De Vleeschauwer, D. (2015). Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting induced immunity in rice (*Oryza*

- sativa* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 91, 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.05.010>
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W.-A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34(1), 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>
- Choudhary, D. K., & Johri, B. N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*, 164(5), 493-513. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4.951-4.959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847-867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>
- De Lima Procópio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., & de Araújo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(5), 466-471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- De-Bashan, L. E., Hernandez, J.-P., Bashan, Y., & Maier, R. M. (2010). *Bacillus pumilus* ES4: Candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. *Environmental and Experimental Botany*, 69(3), 343-352. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.04.014>
- Dietel, K., Beator, B., Budiharjo, A., Fan, B., & Borriss, R. (2013). Bacterial traits involved in colonization of *Arabidopsis thaliana* roots by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *The Plant Pathology Journal*, 29(1), 59-66. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.10.2012.0155>
- Dobereiner, J., & Day, J. M. (1976). Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. En W. E. Newton, & C. J. N. Nyman (eds.), *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation* (pp. 518-538). Washington State University Press.
- Duca, M. (2015). *Plant physiology* (5.ª ed.). Springer.
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd_Allah, E. F., & Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*, 8, artículo 2104. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104>
- Estrada-Bonilla, G. A., Durrer, A., Cardoso, E. J. B. N. (2021). Use of compost and phosphate-solubilizing bacteria affect sugarcane mineral nutrition, phosphorus availability, and the soil bacterial community. *Applied Soil Ecology*, 157, artículo 103760. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103760>
- Fan, B., Chen, X. H., Budiharjo, A., Bleiss, W., Vater, J., & Borriss, R. (2011). Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 151(4), 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.12.022>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2002). *Manual on integrated soil management and conservation practices*. <http://www.fao.org/3/x4799e/x4799e.pdf>
- Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D., & Abdala, G. (2007). Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): Isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 1.145-1.152. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1077-7>
- Gamalero, E., & Glick, B. R. (2011). Mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. En D. K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in agrobiología: Plant nutrient management* (pp. 17-46). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21061-7_2
- García de Salamone, I. E., Hynes, R. K., & Nelson, L. M. (2001). Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(5), 404-411. <https://doi.org/10.1139/w01-029>
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, artículo 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Glick, B. R., Pasternak, J. J., & Patten, C. L. (2010). *Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA* (4.ª ed.). ASM Press.
- Glick, B. R., Penrose, D. M., & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190(1), 63-68. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1997.0532>
- Goldstein, A. H., Rogers, R. D., & Mead, G. (1993). Separating phosphate from ores via bioprocessing. *Biotechnology*, 11, 1.250-1.254.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., & Singh, V. (2015). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 7(2), 96-102. <https://www.longdom.org/abstract/plant-growth-promoting-rhizobacteria-pgpr-current-and-future-prospects-for-development-of-sustainable-agriculture-11186.html>
- Halder, A. K., Mishra, A. K., Bhattacharyya, P., & Chakrabarty, P. K. (1990). Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 36(2), 81-92. <https://doi.org/10.2323/jgam.36.81>
- Hassan, M. K., McInroy, J. A., & Kloepper, J. W. (2019). The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: A review. *Agriculture*, 9(142). <https://doi.org/10.3390/agriculture9070142>

- Hawes, M. C., Gunawardena, U., Miyasaka, S., & Zhao, X. (2000). The role of root border cells in plant defense. *Trends in Plant Science*, 5(3), 128-133. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01556-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01556-9)
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- Hoffman, B. M., Lukoyanov, D., Yang, Z.-Y., Dean, D. R., & Seefeldt, L. C. (2014). Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: The next stage. *Chemical Reviews*, 114(8), 4.041-4.062. <https://doi.org/10.1021/cr400641x>
- Illmer, P., & Schinner, F. (1992). Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(4), 389-395. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90199-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90199-8)
- Kang, S.-M., Shahzad, R., Bilal, S., Khan, A. L., Park, Y.-G., Lee, K.-E., Asaf, S., Khan, M. A., & Lee, I.-J. (2019). Indole-3-acetic-acid and ACC deaminase producing *Leclercia adecarboxylata* MO1 improves *Solanum lycopersicum* L. growth and salinity stress tolerance by endogenous secondary metabolites regulation. *BMC Microbiology*, 19(1), artículo 80. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1450-6>
- Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravanakumar, D., & Samiyappan, R. (2010). Effect of chitinolytic PGPR on growth, yield and physiological attributes of banana (*Musa* spp.) under field conditions. *Applied Soil Ecology*, 45(2), 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.02.003>
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634-644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Kearns, D. B., Chu, F., Rudner, R., & Losick, R. (2004). Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility. *Molecular Microbiology*, 52(2), 357-369. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.03996.x>
- Kim, K. Y., Jordan, D., & McDonald, G. A. (1998). *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: Effect of carbon sources. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8-9), 995-1.003. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00007-8)
- Kloepper, J. W., & Schroth, M. N. (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. En Station de Pathologie Végétale et Phytobactériologie (ed.), *Proceedings of the IV International Conference on Plant Pathogenic Bacteria* (pp. 879-882). https://www.researchgate.net/publication/284682983_Plant_growth-promoting_rhizobacteria_on_radishes_IV_international_conference_on_plant_pathogenic_bacteria#:~:text=The%20term%20Plant%20growth%20promoting,Jha%20and%20Saraf%2C%202015
- Kloepper, J. W., Schroth, M. N., & Miller, T. D. (1980). Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, 70(11), 1.078-1.082. <https://doi.org/10.1094/Phyto-70-1078>
- Ko, H.-S., Jin, R.-D., Krishnan, H. B., Lee, S.-B., & Kim, K.-Y. (2009). Biocontrol ability of *Lysobacter antibioticus* HS124 against *Phytophthora* blight is mediated by the production of 4-Hydroxyphenylacetic acid and several lytic enzymes. *Current Microbiology*, 59(6), 608-615. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9481-0>
- Kucey, R. M. N. (1988). Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. *Canadian Journal of Soil Science*, 68(2), 261-270. <https://doi.org/10.4141/cjss88-026>
- Kumar, A., Prakash, A., & Johri, B. N. (2011). *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. En D. K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in agrobiolgy: Crop ecosystems* (pp. 37-59). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_2
- Ladha, J. K., & Reddy, P. M. (2003). Nitrogen fixation in rice systems: State of knowledge and future prospects. *Plant and Soil*, 252(1), 151-167. <https://doi.org/10.1023/A:1024175307238>
- Laslo, E., György, É., Gyöngyvér, M., Tamás, É., Ábrahám, B., & Lányi, S. (2012). Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. *Crop Protection*, 40, 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.05.002>
- Li, W. C., Ye, Z. H., & Wong, M. H. (2010). Metal mobilization and production of short-chain organic acids by rhizosphere bacteria associated with a Cd/Zn hyperaccumulating plant, *Sedum alfredii*. *Plant and Soil*, 326(1), 453-467. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0025-y>
- Lian, B., Fu, P. Q., Mo, D. M., & Liu, C.-Q. (2002). A comprehensive review of the mechanism of potassium releasing by silicate bacteria. *Acta Mineralogica Sinica*, 22(2), 179-183. https://www.researchgate.net/publication/284547861_A_comprehensive_review_of_the_mechanism_of_potassium_releasing_by_silicate_bacteria
- Liu, D., Lian, B., & Dong, H. (2012). Isolation of *Paenibacillus* sp. and assessment of its potential for enhancing mineral weathering. *Geomicrobiology Journal*, 29(5), 413-421. <https://doi.org/10.1080/01490451.2011.576602>
- Liu, S. T., Lee, L. Y., Tai, C. Y., Hung, C. H., Chang, Y. S., Wolfram, J. H., Rogers, R., & Goldstein, A. H. (1992). Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: Nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *Journal of Bacteriology*, 174(18), 5.814-5.819. <https://doi.org/10.1128/jb.174.18.5814-5819.1992>
- Liu, X., Zhao, H., & Chen, S. (2006). Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. *Current Microbiology*, 52(3), 186-190. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0162-3>
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 541-556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- Marra, L. M., de Oliveira-Longatti, S. M., Soares, C. R. F. S., de Lima, J. M., Olivares, F. L., & Moreira, F. M. S. (2015). Initial pH of medium affects organic acids production but do not affect phosphate solubilization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 367-375. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246246220131102>

- Masciarelli, O., Llanes, A., & Luna, V. (2014). A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. *Microbiological Research*, 169(7), 609-615. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.10.001>
- McAfee, J. (2008). Potassium, a key nutrient for plant growth. *Department of Soil and Crop Sciences*.
- Meena, V. S., Maurya, B. R., & Verma, J. P. (2014). Does a rhizospheric microorganism enhance K⁺ availability in agricultural soils? *Microbiological Research*, 169(5-6), 337-347. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.003>
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 634-663. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>
- Merrick, M. J. (2005). Regulation of nitrogen fixation in free-living diazotrophs. En W. Klipp, B. Masepohl, J. R. Gallon, & W. E. Newton (eds.), *Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria* (pp. 197-223). Springer. https://doi.org/10.1007/1-4020-2179-8_9
- Moreno Reséndez, A., García Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., & Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 68-83. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707>
- Moreno-Galván, A., Romero-Perdomo, F. A., Estrada-Bonilla, G., Meneses, C. H. S. G., & Bonilla, R. R. (2020). Dry-Caribbean *Bacillus* spp. strains ameliorate drought stress in maize by a strain-specific antioxidant response modulation. *Microorganisms*, 8(6), artículo 823. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060823>
- Nehl, D. B., Allen, S. J., & Brown, J. F. (1997). Deleterious rhizosphere bacteria: An integrating perspective. *Applied Soil Ecology*, 5(1), 1-20. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(96\)00124-2](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(96)00124-2)
- Nihorimbere, V., Cawoy, H., Seyer, A., Brunelle, A., Thonart, P., & Ongena, M. (2012). Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 176-191. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01208.x>
- Ochoa-Loza, F. J., Artiola, J. F., & Maier, R. M. (2001). Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. *Journal of Environmental Quality*, 30(2), 479-485. <https://doi.org/10.2134/jeq2001.302479x>
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), artículo 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Paredes-Mendoza, M., & Espinosa-Victoria, D. (2010). Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28(1), 61-70. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792010000100007
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 207-220. <https://doi.org/10.1139/m96-032>
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3.795-3.801. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002>
- Pertot, I., Puopolo, G., Hosni, T., Pedrotti, L., Jourdan, E., & Ongena, M. (2013). Limited impact of abiotic stress on surfactin production *in planta* and on disease resistance induced by *Bacillus amyloliquefaciens* S499 in tomato and bean. *FEMS Microbiology Ecology*, 86(3), 505-519. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12177>
- Piccoli, P., Travaglia, C., Cohen, A., Sosa, L., Cornejo, P., Masuelli, R., & Bottini, R. (2011). An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A₁ and A₃ and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. *Plant Growth Regulation*, 64(2), 207-210. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9536-z>
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 347-375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Posada, L. F., Alvarez, J. C., Hu, C.-H., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2016). Construction of probe of the plant growth-promoting bacteria *Bacillus subtilis* useful for fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 128, 125-129. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.029>
- Posada, L. F., Álvarez, J. C., Romero-Tabarez, M., de-Bashan, L., & Villegas-Escobar, V. (2018). Enhanced molecular visualization of root colonization and growth promotion by *Bacillus subtilis* EA-CB0575 in different growth systems. *Microbiological Research*, 217, 69-80. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.08.017>
- Prabhu, N., Borkar, S., & Garg, S. (2019). Chapter 11 - Phosphate solubilization by microorganisms: Overview, mechanisms, applications and advances. En S. N. Meena, & M. M. Naik (eds.), *Advances in biological science research* (pp. 161-176). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00011-2>
- Prajapati, K., Sharma, M. C., & Modi, H. A. (2013). Growth promoting effect of potassium solubilizing microorganisms on okra (*Abelmoschus esculentus*). *International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR)*, 3(1), 181-188. https://www.researchgate.net/publication/235943493_Growth_promoting_effect_of_potassium_solubilizing_microorganisms_on_okra_Abelmoschus_esculentus
- Prasad, M., Srinivasan, R., Chaudhary, M., Choudhary, M., & Jat, L. K. (2019). Chapter Seven - Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture: Perspectives and challenges. En A. K. Singh, A. Kumar, & P. K. Singh (eds.), *PGPR amelioration in sustainable agriculture* (pp. 129-157). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00007-0>

- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moëne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: A playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, 321(1-2), 341-361. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9568-6>
- Rajawat, M. V. S., Singh, S., Singh, G., & Saxena, A. (2011). *Isolation and characterization of K-solubilizing bacteria isolated from different rhizospheric soil* [presentación en conferencia]. 53rd Annual Conference of Association of Microbiologists of India, India.
- Ramírez, C., & Kloepper, J. W. (2012). Bacterias promotoras de crecimiento vegetal. En L. M. Hoyos Carvajal (ed.), *Enfermedades de las plantas: control biológico* (pp. 97-126). Universidad Nacional de Colombia.
- Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S., & Latif, F. (2004). Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(2), 187-196. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2004.187.196>
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287(1), 15-21. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9056-9>
- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61, 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.01.006>
- Romero-Perdomo, F., Beltrán, I., Mendoza-Labrador, J., Estrada-Bonilla, G., & Bonilla, R. (2021). Phosphorus nutrition and growth of cotton plants inoculated with growth-promoting bacteria under low phosphate availability. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, artículo 618425. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2020.618425/full>
- Rudrappa, T., Biedrzycki, M. L., & Bais, H. P. (2008). Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 64(2), 153-166. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00465.x>
- Ryu, C.-M., Farag, M. A., Hu, C.-H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(3), 1.017-1.026. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>
- Santos Torres, M. T. (2020). *Mejoramiento de la fertilización fosfatada en la asociación ryegrass y trébol rojo mediante el uso de bacterias solubilizadoras de fosfato* [tesis de maestría, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77905>
- Santos-Torres, M., Romero-Perdomo, F., Mendoza-Labrador, J., Gutiérrez, A. Y., Vargas, C., Castro-Rincon, E., Caro-Quintero, A., Uribe-Velez, D., & Estrada-Bonilla, G. A. (2021). Genomic and phenotypic analysis of rock phosphate-solubilizing rhizobacteria. *Rhizosphere*, 17, artículo 100290. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100290>
- Sasirekha, B., & Srividya, S. (2016). Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. *Agriculture and Natural Resources*, 50(4), 250-256. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.02.003>
- Seneviratne, G., Weerasekara, M. L. M. A. W., Seneviratne, K. A. C. N., Zavahir, J. S., Kecskés, M. L., & Kennedy, I. R. (2011). Importance of biofilm formation in plant growth promoting rhizobacterial action. En D. K. Maheshwari (ed.), *Plant growth and health promoting bacteria* (pp. 81-95). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2_4
- Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S. K., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., Handa, N., Kapoor, D., Bhardwaj, R., & Zheng, B. (2019). Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules*, 9(7), artículo 285. <https://doi.org/10.3390/biom9070285>
- Sharma, M., & Laxmi, A. (2016). Jasmonates: Emerging players in controlling temperature stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 6, artículo 1129. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01129>
- Sharma, S., Sharma, S., Singh, R. K., & Vaishampayan, A. (2008). Colonization behavior of bacterium *Burkholderia cepacia* inside the *Oryza sativa* roots visualized using green fluorescent protein reporter. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1.169-1.175. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9589-y>
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), artículo 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Sheng, X. F., Zhao, F., He, L. Y., Qiu, G., & Chen, L. (2008). Isolation and characterization of silicate mineral-solubilizing *Bacillus globisporus* Q12 from the surfaces of weathered feldspar. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(12), 1.064-1.068. <https://doi.org/10.1139/W08-089>
- Shrivastava, M., Srivastava, P. C., & D'Souza, S. F. (2018). Phosphate-solubilizing microbes: Diversity and phosphates solubilization mechanism. En V. S. Meena (ed.), *Role of rhizospheric microbes in soil. Volume 2: Nutrient management and crop improvement* (pp. 137-165). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0044-8_5
- Singh, C. P., & Amberger, A. (1997). Solubilization of rock phosphate by humic and fulvic acids extracted from atraw compost. *Agrochimica*, 41(5), 221-228. <https://mediatum.ub.tum.de/doc/1306532/1306532.pdf>
- Singh, C. P., & Amberger, A. (1998). Organic acids and phosphorus solubilization in straw composted with rock phosphate. *Bioresource Technology*, 63(1), 13-16. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00104-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00104-1)
- Singh, G., Biswas, D. R., & Marwaha, T. S. (2010). Mobilization of potassium from waste mica by plant growth promoting rhizobacteria and its assimilation by maize (*Zea mays*) and wheat

- (*Triticum aestivum* L.): A hydroponics study under phytotron growth chamber. *Journal of Plant Nutrition*, 33(8), 1.236-1.251. <https://doi.org/10.1080/01904161003765760>
- Spaepen, S. (2015). Plant hormones produced by microbes. En B. Lugtenberg (ed.), *Principles of plant-microbe interactions: Microbes for sustainable agriculture* (pp. 247-256). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_26
- Sun, L. R., Zhao, Z. J., & Hao, F. S. (2019). NADPH oxidases, essential players of hormone signalings in plant development and response to stresses. *Plant Signaling & Behavior*, 14(11), artículo 1657343. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1657343>
- Tan, S., Yang, C., Mei, X., Shen, S., Raza, W., Shen, Q., & Xu, Y. (2013). The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. *Applied Soil Ecology*, 64, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.10.011>
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418, 671-677. <https://doi.org/10.1038/nature01014>
- Tiwari, S., Prasad, V., & Lata, C. (2019). Chapter 3 - *Bacillus*: Plant growth promoting bacteria for sustainable agriculture and environment. En J. S. Singh, & D. P. Singh (eds.), *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 43-55). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64191-5.00003-1>
- Ullah, A., Nisar, M., Ali, H., Hazrat, A., Hayat, K., Keerio, A. A., Ihsan, M., Laiq, M., Ullah, S., Fahad, S., Khan, A., Khan, A. H., Akbar, A., & Yang, X. (2019). Drought tolerance improvement in plants: An endophytic bacterial approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7.385-7.397. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10045-4>
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., & Frey-Klett, P. (2009). Mineral weathering by bacteria: Ecology, actors and mechanisms. *Trends in Microbiology*, 17(8), 378-387. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.05.004>
- Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. En P. A. H. M. Bakker, J. M. Raaijmakers, G. Bloemberg, M. Höfte, P. Lemanceau, & B. M. Cooke (eds.), *New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research* (pp. 243-254). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6776-1_2
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M. E., Lopez-Cortes, A., & Bashan, Y. (2000). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30(5), 460-468. <https://doi.org/10.1007/s003740050024>
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Boyce, A. N. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—A review. *Molecules*, 21(5), artículo 573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Viscardi, S., Ventorino, V., Duran, P., Maggio, A., De Pascale, S., Mora, M. L., & Pepe, O. (2016). Assessment of plant growth promoting activities and abiotic stress tolerance of *Azotobacter chroococcum* strains for a potential use in sustainable agriculture. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16(3), 848-863. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162016005000060>
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugregard, P., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Sticking together: Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 157-168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2960>
- Walters, D., & Heil, M. (2007). Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(1-3), 3-17. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.09.008>
- Wang, D.-C., Jiang, C.-H., Zhang, L.-N., Chen, L., Zhang, X.-Y., & Guo, J.-H. (2019). Biofilms positively contribute to *Bacillus amyloliquefaciens* 54-induced drought tolerance in tomato plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6.271-6.287. <https://doi.org/10.3390/ijms20246271>
- Zarjani, J. K., Aliasgharzad, N., Oustan, S., Emadi, M., & Ahmadi, A. (2013). Isolation and characterization of potassium solubilizing bacteria in some Iranian soils. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 59(12), 1.713-1.723. <https://doi.org/10.1080/03650340.2012.756977>
- Zhang, A., Zhao, G., Gao, T., Wang, W., Li, J., Zhang, S., & Zhu, B. (2013). Solubilization of insoluble potassium and phosphate by *Paenibacillus kribensis* CX-7: A soil microorganism with biological control potential. *African Journal of Microbiology Research*, 7(1), 41-47. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1485>
- Zhang, N., Yang, D., Wang, D., Miao, Y., Shao, J., Zhou, X., Xu, Z., Li, Q., Feng, H., Li, S., Shen, Q., & Zhang, R. (2015). Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates. *BMC Genomics*, 16(1), artículo 685. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1825-5>
- Zhang, P., Jin, T., Sahu, S. K., Xu, J., Shi, Q., Liu, H., & Wang, Y. (2019). The distribution of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid synthesis pathways in bacteria unraveled by large-scale genomic analysis. *Molecules*, 24(7), 1-14. <https://doi.org/10.3390/molecules24071411>
- Zhou, H., Luo, C., Fang, X., Xiang, Y., Wang, X., Zhang, R., & Chen, Z. (2016). Loss of GltB inhibits biofilm formation and biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* Bs916 by altering the production of -Polyglutamate and three lipopeptides. *PLoS ONE*, 11(5), artículo e0156247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156247>

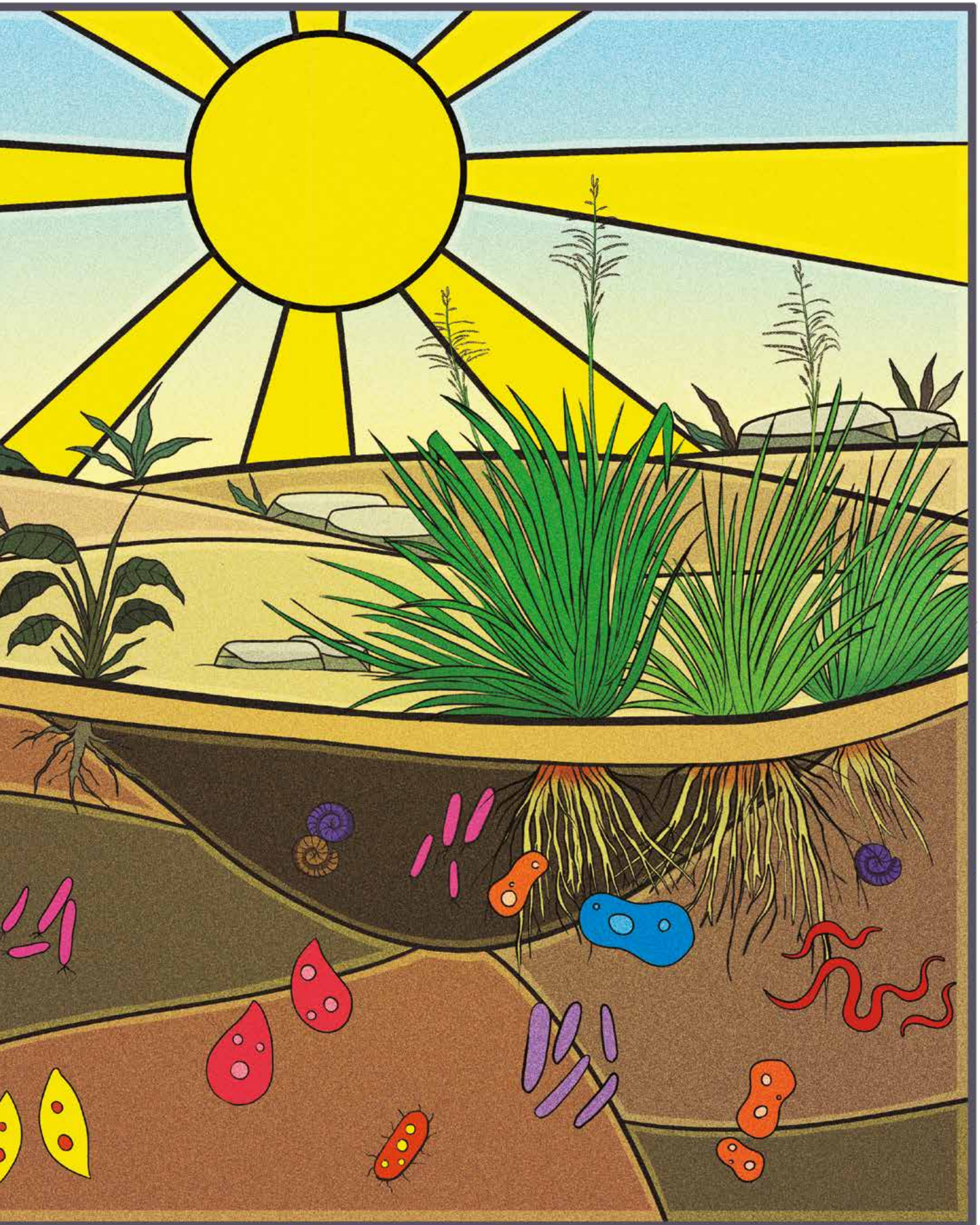
4

Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la mitigación de estreses

Andrés Eduardo Moreno Galván¹
Sandra Lucía Cortés Patiño¹
Jonathan Alberto Mendoza Labrador¹
Carlos José Bécquer Granados²

1. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.
2. Instituto de Investigación de Pastos y Forrajes de Sancti Spiritus. Cuba.





Introducción

Quizás uno de los grandes desafíos a los que nos enfrentamos actualmente son los continuos, múltiples y simultáneos cambios ambientales causados por el cambio climático.

Estos afectan y generan impactos negativos sobre patrones de biodiversidad y servicios ecosistémicos (sostenimiento y aprovisionamiento) que influyen sobre la productividad agrícola y, por ende, la seguridad alimentaria (Urban et al., 2016). Dicha productividad y el crecimiento de las plantas (de una gran diversidad de cultivos agronómicos) están restringidos intermitentemente por diversos factores ambientales que generan un gran número de estreses de tipo abiótico. Dentro de estos, se encuentran la salinidad, la toxicidad por la acumulación de metales pesados, las temperaturas extremas (altas y bajas) y el déficit hídrico provocado por las sequías (Aroca, 2012).

De todos estos tipos de estreses abióticos, los que más afectan la producción agrícola a nivel mundial son el déficit hídrico causado por las sequías y la salinidad en los suelos (Kole et al., 2010; Shrivastava & Kumar, 2015). La sequía disminuye el potencial hídrico del suelo, afectando la absorción de agua por parte del sistema radical de las plantas, lo que causa un estrés oxidativo e incrementa la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés: *reactive oxygen species*), que generan daños irreparables en las células vegetales (Vurukonda et al., 2016). De igual manera, esta condición de estrés implica daños en los procesos metabólicos que afectan la fotosíntesis y la asimilación y absorción de nutrientes, lo que produce efectos nocivos sobre el crecimiento y la productividad de los cultivos (Osakabe et al., 2014). Por estas razones, las sequías han ocasionado reducciones significativas en los rendimientos de cultivos como trigo, arroz, maíz y cebada (Miransari, 2014), y se espera que cause graves problemas de crecimiento en las plantas al afectar más del 50% de las tierras cultivables para 2050 (Kasim et al., 2013).

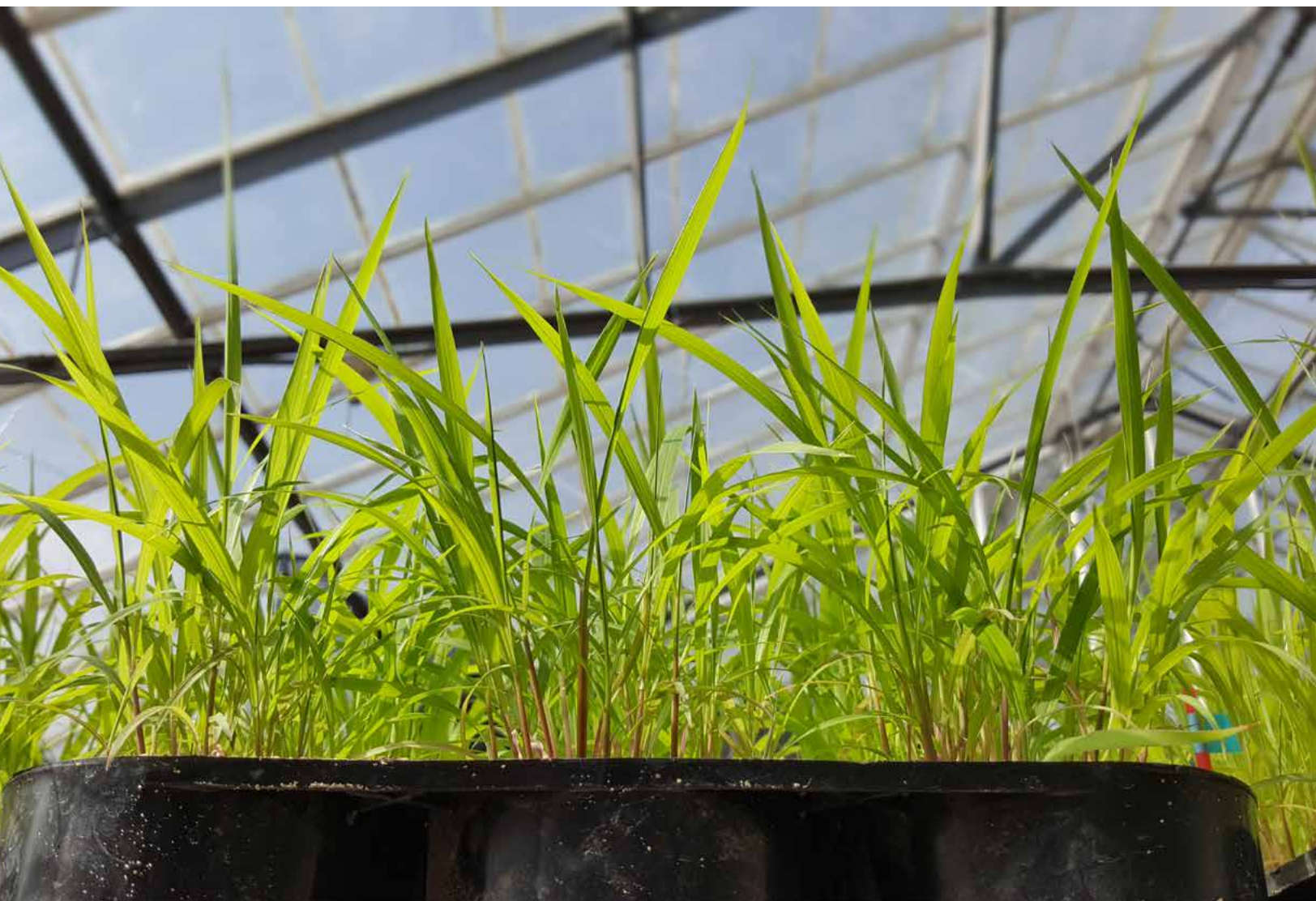
Entre tanto, la salinidad crea un estrés osmótico, que puede considerarse como una sequía fisiológica; sin embargo, una acumulación de sales más alta puede causar una toxicidad iónica que induce una senescencia de las hojas (Munns & Tester, 2008). La sequía y la salinidad producen efectos nocivos intracelulares y fisiológicos similares que causan la desaparición de la planta (Gill y Tuteja, 2010). Asimismo, la salinidad ha convertido tierras agronómicamente útiles en tierras improductivas, con una afectación del 20% a nivel mundial (Liu et al., 2020).

En la última década, la contaminación por metales pesados ha aumentado rápidamente y ha causado serios problemas ambientales, principalmente como consecuencia de la industrialización, la minería y la agricultura intensiva con el uso excesivo de fungicidas y herbicidas (Etesami & Maheshwari, 2018; Kong & Glick, 2017). Por estas actividades antropogénicas, el suelo se ha convertido en un depósito de altas concentraciones de una serie de metales pesados (Cd, Cu, Cr, Fe, Ni, Pb,

Zn) que pueden causar toxicidad en diversos cultivos, como trigo, maíz y arroz, entre otros, afectando su crecimiento (producción y germinación de semillas, desarrollo radical y producción de biomasa), fisiología (relación del agua, pigmentación y proceso de fotosíntesis) y metabolismo (ROS, peroxidación lipídica y degradación de proteínas) (Ahmad et al., 2019).

Una de las estrategias que se han adoptado en los últimos años para mejorar el crecimiento y rendimiento de las plantas en situaciones ambientales adversas es la utilización de microorganismos benéficos, como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) (Vurukonda et al., 2016). Se ha demostrado en varios estudios que las PGPB son capaces de mejorar la respuesta de la planta ante diversas condiciones de estrés abiótico (Etesami & Maheshwari, 2018; Grover et al., 2011; Rojas-Tapias et al., 2012). Por ejemplo, se ha demostrado que PGPB de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Azospirillum*, *Chryseobacterium*, *Achromobacter*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Aeromonas* y *Acetobacter* pueden generar mecanismos que inducen la tolerancia a estreses abióticos

como la salinidad y la sequía, así como aumentar la supervivencia de las plantas en condiciones de toxicidad por metales pesados (Etesami & Maheshwari, 2018; Kavamura et al., 2013; Khanna et al., 2019). Algunos de los mecanismos que promueven la tolerancia al estrés abiótico generada por las PGPB en las plantas incluyen la producción de fitohormonas, la producción de compuestos volátiles, la actividad Acc desaminasa, la acumulación de osmolitos compatibles, la producción de exopolisacáridos (EPS), la actividad enzimática antioxidante, la solubilización de fósforo, la producción de ácidos orgánicos, la producción de sideróforos, la producción de polímeros extracelulares, la reducción en la toma de metales pesados por parte de la planta, la inducción de genes de resistencia a metales pesados y la fijación biológica de nitrógeno (Etesami & Maheshwari, 2018; Yang et al., 2009). Recientemente, estudios bioquímicos, fisiológicos y moleculares de interacciones planta-microorganismo han revelado la existencia de respuestas de las plantas ante el estrés, inducidas por los microorganismos, que podrían activar su sistema de tolerancia inducido (STI) contra los estreses de tipo abiótico (Sangiorgio et al., 2020).



Principales respuestas de las plantas a estreses abióticos

Algunos de los mecanismos de respuesta de las plantas a estreses abióticos son compartidos debido a que diversos estreses pueden generar efectos similares.

Ajuste osmótico

Para mantener su crecimiento normal, las plantas deben reajustarse al incremento externo en la osmolaridad (Shabala, 2017). Esto puede realizarse al acumular una variedad de moléculas en el citoplasma para contrarrestar la presión osmótica externa. Esta acumulación puede suceder de tres formas.

- 1 Las plantas pueden acumular una gran cantidad de osmolitos orgánicos (o “solutos compatibles”) al incrementar su toma del medio externo; estos solutos pueden ser azúcares, polioles, aminoácidos o compuestos cuaternarios de amonio (Hasegawa et al., 2000).
- 2 Las plantas pueden sintetizar solutos compatibles *de novo*, principalmente glicina-betaína, prolina y polioles (Khan, Tanveer et al., 2020).
- 3 Las plantas pueden utilizar osmolitos inorgánicos y aumentar la acumulación de Na^+ , Cl^- y K^+ (Shabala & Shabala, 2011). Con respecto a este último proceso, cabe resaltar que los iones Na^+ y Cl^- pueden generar interrupciones en el metabolismo, por lo que la acumulación de Na^+ en las vacuolas para ajustar la presión osmótica es esencial. Este proceso es energéticamente menos costoso que la síntesis de compuestos orgánicos (Shabala, 2017).



Respuesta antioxidante

La acumulación de ROS genera efectos negativos en las células debido a la capacidad de estas especies de causar peroxidación lipídica en las membranas celulares, daño en el ADN, desnaturalización de proteínas, oxidación de carbohidratos, descomposición de pigmentos y desbalance en la actividad enzimática (Das & Roychoudhury, 2014). En la fotosíntesis, una limitación en la disponibilidad de CO_2 debido al cierre de estomas tiene como consecuencia la formación del anión superóxido (O_2^-) en el fotosistema I (PSI, por sus siglas en inglés) (Mehler, 1951), que puede convertirse en el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) —una especie extremadamente reactiva— mediante la reacción de Fenton/Haber-Weiss (Hossain & Dietz, 2016). Además, una insuficiente capacidad de disipar la energía absorbida por las hojas genera la producción de oxígeno singlete en el fotosistema II (PSII, por sus siglas en inglés) (Das & Roychoudhury, 2014). La generación de ROS se presenta en otros sitios diferentes a los cloroplastos, como el peroxisoma, debido al incremento en la fotorrespiración, que es el responsable del 70% del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido bajo estrés osmótico (Noctor et al., 2014); el apoplasto, siendo las peroxidasas y las amino-oxidasas de la pared celular una importante fuente de estas especies en condiciones de estrés (Hossain & Dietz, 2016), y la membrana plasmática, debido a la actividad de la enzima NADPH oxidasa (Shabala, 2017).

Como respuesta al estrés, las plantas producen ROS en exceso, y el resultado es un desbalance en la oxidación, que conlleva daños a nivel celular y metabólico, seguido de una eventual muerte celular (Hossain & Dietz, 2016).

La regulación en los niveles de estas especies se debe principalmente a la actividad antioxidante enzimática y no enzimática, que disminuye el estrés oxidativo (Numan et al., 2018). La maquinaria enzimática se puede dividir principalmente en dos grupos. El primero son las enzimas enfocadas en la detoxificación de ROS, la cual es llevada a cabo por algunas enzimas, como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y guaiacol peroxidasa (GPX), que transforman estas ROS en moléculas menos tóxicas, como H_2O_2 y agua, algunas de las cuales, como las POX, emplean sustratos de alto poder reductor (ácido ascórbico [AA] y glutatión reducido [GSH]) para llevar a cabo su función. El otro grupo son las enzimas encargadas de restaurar el poder reductor de estas moléculas luego de ser usadas, y entre ellas encontramos las enzimas glutatión reductasa (GR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) (Anwar Hossain et al., 2014; Das & Roychoudhury, 2014; Hossain & Dietz, 2016; Joshi & Chinnusamy, 2014; Noctor et al., 2016; Noctor et al., 2018).

Los principales antioxidantes no enzimáticos son AA, GSH, α -tocoferol, carotenoides, fenoles, flavonoides y prolina. En la tabla 4.1 se encuentra especificada la función de cada uno de estos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, además de su localización intracelular.



■ **Tabla 4.1.** Funciones y localización celular de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos

Fuente: Das y Roychoudhury (2014)

Antioxidantes enzimáticos

- 1 Superóxido dismutasa (SOD)**
Reacción catalizada:
 $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Localización: Peroxisomas, mitocondria, citosol y cloroplastos
- 2 Catalasa (CAT)**
Reacción catalizada: $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$
Localización: Peroxisoma y mitocondria
- 3 Ascorbato peroxidasa (APX)**
Reacción catalizada:
 $H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$
Localización: Peroxisomas, mitocondria, citosol y cloroplastos
- 3 Monodehidroascorbato reductasa (MDHAR)**
Reacción catalizada:
 $2MDHA + NADH \rightarrow 2AA + NAD$
Localización: Mitocondria, citoplasma y cloroplasto
- 4 Dehidroascorbato reductasa (DHAR)**
Reacción catalizada:
 $DHA + 2GSH \rightarrow AA + GSSG$
Localización: Mitocondria, citoplasma y cloroplasto
- 5 Glutación reductasa (GR)**
Reacción catalizada:
 $GSSG + NADPH \rightarrow 2GSH + NADP^+$
Localización: Mitocondria, citoplasma y cloroplasto
- 6 Guaiacol peroxidasa (GPX)**
Reacción catalizada:
 $H_2O_2 + DHA \rightarrow 2H_2O + GSSG$
Localización: Mitocondria, citoplasma, cloroplasto y retículo endoplasmático

Antioxidantes no enzimáticos

- 1 Ácido ascórbico (AA)**
Función: Desintoxica H_2O_2 vía acción de APX.
Localización: Citosol, cloroplasto, mitocondria, peroxisoma, vacuola y apoplasto
- 2 Glutación reducido (GSH)**
Función: Actúa como un cosustrato desintoxicante para enzimas como peroxidasas, GR y GST.
Localización: Citosol, cloroplasto, mitocondria, peroxisoma, vacuola y apoplasto
- 3 α -tocoferol**
Función: Protege contra y desintoxica de productos de la peroxidación lipídica de la membrana.
Localización: Mayormente en membranas
- 3 Carotenoides**
Función: Disipan el exceso de energía de los fotosistemas.
Localización: Cloroplastos y otros plástidos
- 4 Flavonoides**
Función: *Scavengers* directos de H_2O_2 , 1O_2 y $OH\cdot$
Localización: Vacuola
- 5 Prolina**
Función: *Scavenger* eficiente de $OH\cdot$ y 1O_2 ; previene daños causados por la peroxidación lipídica.
Localización: Mitocondria, citosol y cloroplasto

Regulación hormonal

Fitohormonas como el ácido abscísico (ABA), el etileno (ET), el ácido jasmónico (JA) y el ácido salicílico (SA) son importantes organizadoras de la defensa sistémica al estrés (He et al., 2018). El ABA ha sido reconocido como la hormona más importante para la respuesta al estrés abiótico, ya que no solo interactúa con las demás hormonas de crecimiento vegetal, sino que además es una importante molécula de señalización (Khan, Asaf et al., 2020). En respuesta a condiciones de estrés, los niveles de ABA se incrementan rápidamente en los tejidos vegetales, activando vías de señalización y modificando los niveles de expresión de genes asociados a la respuesta al estrés (Wani et al., 2016). Esta

señalización resulta, eventualmente, en la reducción de la transpiración y en la disminución de la expansión foliar (Wilkinson et al., 2012). Además, componentes bioquímicos del sistema de defensa al estrés pueden ser movilizados por ABA, incluyendo las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés), prolina, antioxidantes no enzimáticos y enzimas antioxidantes (He et al., 2018). Esta hormona también está implicada en las modificaciones estructurales de las raíces en condiciones de estrés (Giuliani et al., 2005). Aunque el ABA tiene un papel principal en la respuesta al estrés, datos experimentales demuestran de forma inequívoca que las interacciones entre fitohormonas permiten integrar mecanismos de señalización y respuesta que ayudan a las plantas a tolerar las condiciones adversas (Wani et al., 2016).



Producción de óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico (NO) es una pequeña molécula volátil que está implicada en varios procesos de regulación en el crecimiento y desarrollo vegetal (Fancy et al., 2017), y es, además, una molécula de señalización de estrés (Khan, Tanveer et al., 2020; Numan et al., 2018). El NO desencadena directa e indirectamente la expresión de genes regulados por reacciones redox. Esta molécula reacciona con radicales lipídicos y previene la oxidación lipídica ejerciendo un efecto protector al eliminar el radical superóxido y formar peroxinitrito, que puede ser neutralizado por otros procesos celulares. También ayuda en la activación de enzimas antioxidantes como GR, APX y CAT (Fancy et al., 2017). La aplicación de NO en plantas en condiciones de estrés ha demostrado tener un efecto de mitigación (Siddiqui et al., 2011).

Desde hace aproximadamente una década, se planteó la hipótesis de los “múltiples mecanismos”, que considera que no se puede adjudicar el efecto promotor de crecimiento a un solo mecanismo de promoción por parte de las PGPB, sino que, en la inoculación, la combinación de mecanismos es responsable del efecto benéfico en la respuesta de las plantas (Bashan & Levanony, 1990).

La inoculación con PGPB ha demostrado tener un efecto en la respuesta fisiológica y bioquímica de las plantas a estreses abióticos en diversos cultivos. Kim et al. (2012) propusieron el término *inducción de la tolerancia sistémica* (IST, por sus siglas en inglés) para referirse a los cambios físicos y químicos en plantas inducidos por la inoculación con PGPB y que resultan en un aumento en la tolerancia al estrés abiótico.

Estrés por cambios en la temperatura

Naturalmente, la temperatura afecta tanto el crecimiento de las plantas como su desarrollo y distribución geográfica, así como la calidad y productividad de los cultivos (Ding et al., 2020). Cada planta tiene un rango propio de temperaturas óptimas, lo que implica que temperaturas adecuadas para algunas plantas resultan en efectos negativos para otras (Mahajan & Tuteja, 2005). Las plantas, como organismos, son raramente afectadas por factores individuales, y el estrés por cambios en la temperatura es usualmente acompañado por otros estreses, como déficit hídrico, salinidad y, en consecuencia, estrés oxidativo (Żróbek-Sokolnik, 2012).

Las plantas se adaptan continuamente a cambios climáticos en la temperatura mediante la optimización de su desarrollo y crecimiento, entendiendo *crecimiento* como la ganancia neta de biomasa seca, y *desarrollo*, como el incremento en número o dimensión de órganos por división o expansión celular en hojas, ramas, brotes, raíz apical, etc. (Żróbek-Sokolnik, 2012). El desarrollo de las plantas tiende a ser controlado principalmente por la temperatura, siendo menos sensible a otros factores medioambientales. Algunas de las respuestas dependientes de la temperatura son el termoperiodismo, la termomorfogénesis, la vernalización y estratificación por frío y la respuesta a temperaturas extremas (Ding et al., 2020; Żróbek-Sokolnik, 2012).

Cuando hablamos de estrés por cambios en la temperatura, debemos observar dos escenarios: el estrés por bajas temperaturas, denominado LTS (*low-temperature stress*), y el estrés por altas temperaturas, conocido como HTS (*high-temperature stress*) (Arun-Chinnappa et al., 2017).



Estrés por bajas temperaturas (LTS)

El LTS afecta a las plantas a nivel tanto morfológico como fisiológico y celular, por lo que estas pueden exhibir efectos como acumulación de antocianinas, retraso en el crecimiento, marchitez, reducción en el tamaño de las hojas y deformidad, clorosis y hasta necrosis (Bhandari & Nayyar, 2014; Żróbek-Sokolnik, 2012). Al respecto, este fenómeno puede observarse de forma marcada en plantas de climas tropicales y subtropicales, como maíz, soya, garbanzo, arroz, algodón, tomate, berenjena, chile, banano y varios cultivos de cereales, que rápidamente expresan síntomas de daño cuando son expuestos a bajas temperaturas (Bhandari & Nayyar, 2014; Mahajan & Tuteja, 2005). El LTS afecta a las plantas mayormente en sus primeros estadios de desarrollo, principalmente el de plántula, y puede clasificarse en dos categorías: el estrés por *enfriamiento (chilling)* y el estrés por *congelamiento (freezing)* (Arun-Chinnappa et al., 2017; Bhandari & Nayyar, 2014).

El estrés por enfriamiento (*chilling*) es causado por la exposición de las plantas a bajas temperaturas (0-15 °C), lo que causa que estas sufran lesiones, pero no ocurre la formación de cristales de hielo. Los síntomas fenotípicos asociados pueden resumirse en reducción de la expansión foliar, marchitez, clorosis y, en algunos casos, necrosis del tejido (Arun-Chinnappa et al., 2017; Bhandari & Nayyar, 2014; Mahajan & Tuteja, 2005). Uno de los daños principales asociados con el enfriamiento es la pérdida de fluidez de la membrana debido al estrés oxidativo producido, el cual resulta en la producción de H₂O₂ y el aumento del contenido de malondialdehído (MDA) por la peroxidación de lípidos, lo que produce fuga de electrolitos y afecta, así, la respiración y la fotosíntesis (Awasthi et al., 2015).

El estrés por congelamiento (*freezing*), por su parte, es causado por la exposición de las plantas a temperaturas bajo 0 °C, lo cual causa lesiones por la formación de cristales de hielo (Arun-Chinnappa et al., 2017; Bhandari & Nayyar, 2014). Este estrés produce pérdida de la integridad de la membrana, lo cual lleva a la fuga de solutos intracelulares y afecta, también, la integridad de organelos y la compartimentalización celular, lo que reduce la fotosíntesis, el ensamblaje de proteínas y, en general, los procesos metabólicos de manera similar a como ocurre en el enfriamiento (Mahajan & Tuteja, 2005; Żróbek-Sokolnik, 2012).

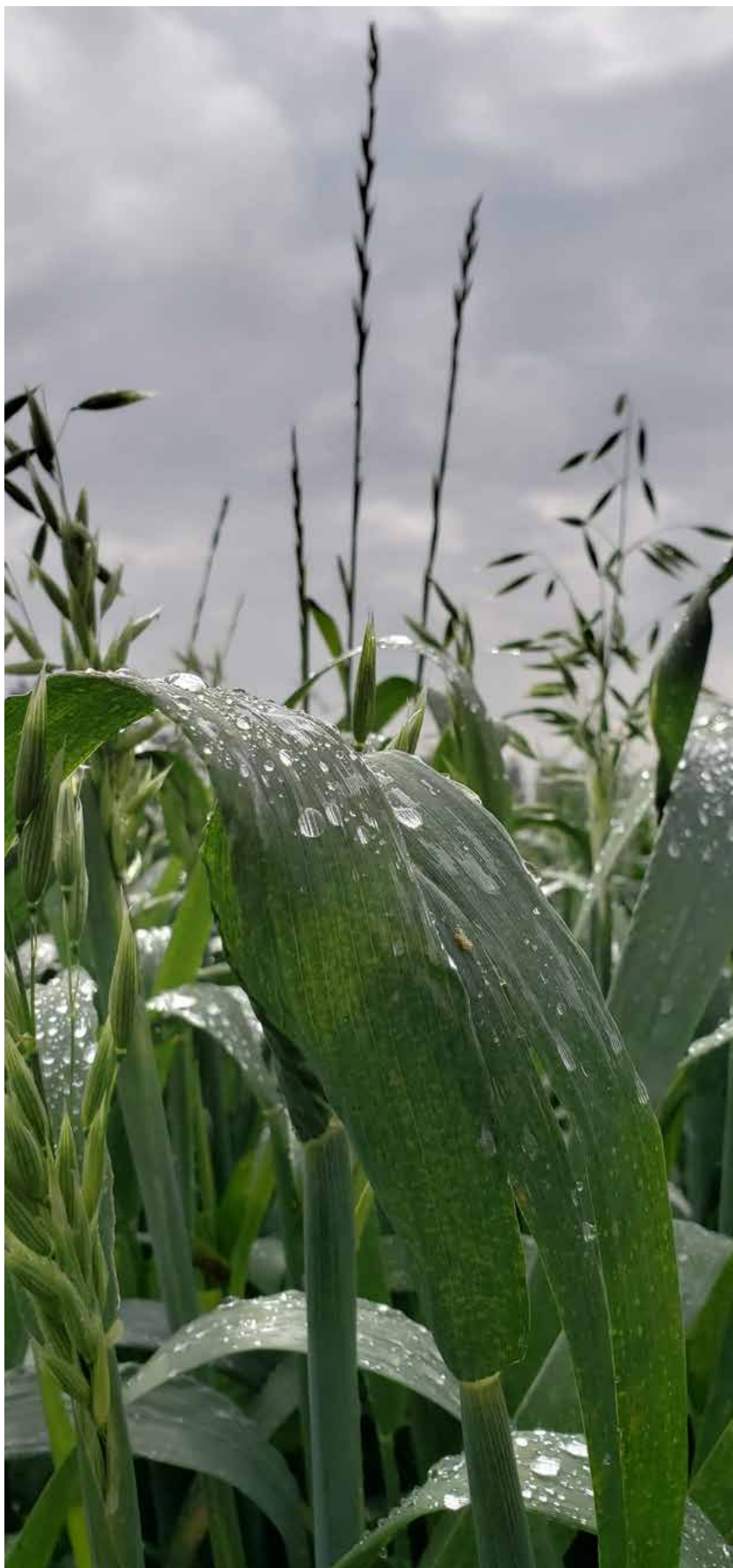
El efecto más severo asociado al congelamiento es el daño de la membrana debido a una deshidratación aguda y a la formación de cristales de hielo que le producen daño mecánico (Arun-Chinnappa et al., 2017). La membrana está constituida por dos tipos de ácidos grasos: los saturados y los insaturados. Los saturados son ricos en átomos de hidrógeno (-CH₂-CH₂-), mientras que los insaturados presentan uno o más dobles enlaces carbono-carbono (-CH=CH-), y es bien conocido que los ácidos saturados se solidifican más fácilmente a bajas temperaturas que los insaturados.

Las plantas sensibles y resistentes tanto a congelamiento como enfriamiento difieren en la proporción de ácidos grasos, donde las sensibles poseen más ácidos grasos saturados mientras las resistentes más insaturados (Mahajan & Tuteja, 2005; Żróbek-Sokolnik, 2012).

Estrés por altas temperaturas (HTS)

El HTS afecta a las plantas en diferentes estadios del crecimiento, generando una limitación fisiológica y reduciendo, así, el crecimiento. Estas altas temperaturas pueden llevar eventualmente a la pérdida excesiva de agua, desencadenando un evento de estrés por déficit hídrico en las plantas (Awasthi et al., 2015). La iteración de este estrés entre periodos de tiempo cortos y largos puede afectar tanto la morfología como la fisiología e inducir cambios bioquímicos en las plantas, dependiendo de su estadio de desarrollo, llegando hasta la disminución del crecimiento y de la productividad (Arun-Chinnappa et al., 2017).

Varios daños a nivel fisiológico se han observado en plantas bajo elevadas temperaturas, como quemado de hojas y tallos, abscisión y senescencia de hojas, inhibición del desarrollo foliar y radicular, y daño de frutos, lo que finalmente se asocia con la disminución en la productividad (Bita & Gerats, 2013). Las altas temperaturas inducen cambios tanto en la respiración como en la fotosíntesis, lo que llega a producir daños en la clorofila y, en casos excesivos, a disminuir la concentración de pigmentos fotosintéticos, lo que finalmente acorta el ciclo de vida de la planta (Arun-Chinnappa et al., 2017; Bita & Gerats, 2013). Asimismo, el HTS afecta la salud reproductiva de los cultivos durante la floración, lo que reduce su fertilidad, ya que limita el desarrollo tanto del polen como del ovario (Arun-Chinnappa et al., 2017; Żróbek-Sokolnik, 2012).



Estrés por déficit hídrico (sequía)

El estrés por déficit hídrico (sequía) es uno de los más comunes y con más altos impactos sobre la agricultura, debido a que genera, junto con otros estreses abióticos, disminuciones cercanas al 50 % en la productividad de diferentes cultivos de interés agroeconómico que deben suplir la creciente demanda global de alimentos (Sharma et al., 2019; Ullah et al., 2019). La deshidratación celular y el desbalance osmótico durante el déficit hídrico dan paso a los principales efectos fisiológicos asociados con la sequía, como cierre estomático, disminución de la fotosíntesis, daño a la membrana, disminución del crecimiento y desarrollo de la planta, acumulación de osmolitos y respuesta antioxidante para el control de ROS (Duca, 2015; Mahajan & Tuteja, 2005; Sharma et al., 2019).

Una de las primeras respuestas de la planta frente a la sequía es el cierre estomático, para prevenir la pérdida de agua por transpiración, proceso que es regulado principalmente por ROS, ABA y potasio. Esta respuesta impacta significativamente la fotosíntesis, debido a que disminuye la concentración de CO₂ intracelular y, por lo tanto, la fijación de CO₂ por parte de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco). Esto conduce a una reducción química de varios componentes que resulta en la producción de ROS, que pueden desencadenar procesos de fotooxidación celular en diferentes niveles, incluyendo la membrana (Duca, 2015; Mahajan & Tuteja, 2005). La sequía genera deshidratación de la membrana, lo que interrumpe su estructura y desestabiliza la bicapa lipídica, y esto aumenta su porosidad. Lo anterior desencadena el desplazamiento de las proteínas alojadas en la membrana, induciendo la pérdida de integridad y selectividad, y desestabilizando la compartimentalización celular, lo que disminuye las actividades enzimáticas asociadas con la membrana (Ahmad et al., 2014; Duca, 2015).

La reducción del crecimiento vegetativo durante el estrés por sequía (en particular el crecimiento del tallo) se asocia con la reducción de la actividad quinasa dependiente de ciclina (CDK, por sus siglas en inglés: *cyclic-dependent kinase*), induciendo una reducción en la velocidad de la división celular y generando la inhibición del crecimiento (Chen & Xiong, 2012; Mahajan & Tuteja, 2005; Shrivastava & Kumar, 2015). En relación con esto, el crecimiento foliar es mucho más sensible que el radicular, debido a que la reducción de la expansión foliar (ajuste del área foliar) es un mecanismo empleado por las plantas para minimizar el área expuesta, disminuyendo así la transpiración y la pérdida de agua. De hecho, en algunos casos, el crecimiento de la raíz puede aumentar debido a que una expansión del sistema radicular facilita la extracción de agua localizada en capas más profundas del suelo (Mahajan & Tuteja, 2005).

El ajuste osmótico en respuesta a la deshidratación en las plantas se realiza reduciendo el potencial osmótico celular mediante la acumulación de solutos, dentro de los cuales encontramos compuestos como prolina, glutamato, glicina-betaína, azúcares, polioles, oligosacáridos e iones inorgánicos, como el potasio, cuya función general es ayudar a mantener el estado de hidratación celular, generando resistencia a la deshidratación celular, y esto se debe a que su característica principal es que no interfieren con los procesos metabólicos normales de la planta. La mayoría están implicados en los procesos de señalización del estrés y protección de macromoléculas y estructuras celulares contra las ROS (Sharma et al., 2019; Waśkiewicz et al., 2014).

Debido a la generación de ROS, se activan mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para eliminar el exceso de ROS y prevenir los daños celulares. Los principales mecanismos del sistema antioxidante fueron detallados en la sección "Respuesta antioxidante".

Estrés por salinidad

La salinidad de los suelos es uno de los estreses abióticos que más limitan la producción agrícola a nivel mundial (Munns & Tester, 2008).

Aproximadamente el 7% del total de la tierra cultivable (1.000 millones de hectáreas) y el 20% de la tierra cultivable irrigada presentan niveles de estrés por salinidad (Wang et al., 2003).

Estos porcentajes irán en aumento en los próximos años, debido a las malas prácticas de manejo de suelos y al uso indiscriminado de agroquímicos para satisfacer las necesidades nutricionales de las plantas y, de esta forma, las demandas en los rendimientos de los cultivos (Kamran et al., 2020). Como consecuencia, se estima que para 2050 más del 50% de la tierra cultivable presentará algún grado de salinización debido al aumento en la salinidad de los suelos y a los periodos de sequía en muchas regiones (Wang et al., 2003).

Los suelos salinos se definen como aquellos en los que la conductividad eléctrica del extracto de saturación (ECe) es mayor o igual a 4 dS m^{-1} (Tanji & Wallender, 2012). Dependiendo de su origen, la salinidad de los suelos puede clasificarse como primaria o secundaria. La salinidad primaria (o natural) se refiere al desarrollo de suelos salinos debido a procesos geológicos, hidrológicos y pedológicos naturales, mientras que la salinidad secundaria implica procesos antropogénicos, principalmente relacionados con métodos inadecuados de irrigación, uso de agroquímicos y procesos de deforestación y sobrepastoreo (Safdar et al., 2019). Los cationes comúnmente asociados con la salinidad son el sodio (Na^+), el calcio (Ca^{+2}) y el magnesio (Mg^{+2}), y los aniones más comunes son el cloro (Cl^-), el sulfato (SO_4^{2-}) y los carbonatos (HCO_3^-). Sin embargo, los iones Na^+ y Cl^- son considerados los más importantes debido a que son tóxicos para las plantas, y el Na^+ , en particular, es agente dispersante, es decir, provoca el deterioro de la estructura física del suelo (Safdar et al., 2019).



Efecto del estrés por salinidad en el crecimiento y desarrollo de las plantas

Con base en su respuesta a altas concentraciones de sales, las plantas pueden dividirse en dos grupos: plantas *halófitas* y plantas *glicófitas*. Las plantas halófitas son nativas de suelos salinos y completan su ciclo de vida en ese ambiente, mientras que las glicófitas (literalmente “plantas dulces”), por su parte, no son capaces de resistir las concentraciones de sales de la misma forma que las halófitas. Usualmente hay un umbral de concentración de sal sobre el cual las glicófitas empiezan a mostrar signos de inhibición de crecimiento, clorosis y pérdida de biomasa seca (Lazar, 2003). El efecto inhibitorio del estrés salino depende de factores como la concentración, el tiempo de exposición, la especie vegetal y la variedad, el estadio de desarrollo vegetal y las condiciones ambientales (Kamran et al., 2020). La mayoría de los cultivos son tolerantes al estrés salino durante la germinación, incluyendo algunas especies clasificadas como “susceptibles”, que son sensibles durante la emergencia y las etapas de desarrollo vegetativo tempranas, y se vuelven más tolerantes en las últimas etapas de este (Tanji & Wallender, 2012).

La presencia de altas concentraciones de sal en el suelo genera un estrés osmótico que, de la misma forma que el déficit hídrico, produce una disminución en el crecimiento foliar y, en menor medida, radical (Shabala, 2017). El efecto principal de este estrés osmótico se observa en la disminución en la tasa de emergencia y expansión de hojas, en la inactivación o disminución del desarrollo de ramificaciones laterales en plantas dicotiledóneas y en la disminución en el número de macollas en cereales (Munns & Tester, 2008). Con una exposición prolongada a altas concentraciones de sales en los suelos, el contenido de estas aumenta gradualmente, generando un estrés por toxicidad de iones. Las células de las hojas jóvenes acomodan rápidamente la sal dentro de sus vacuolas en expansión, así que las sales no inhiben directamente su crecimiento (Munns, 2002), pero el transporte continuo de las sales a las hojas viejas (que no se están expandiendo y, por lo tanto, no pueden diluir la concentración de las sales como las hojas más jóvenes) eventualmente resulta en altas concentraciones de Na^+ y Cl^- , por lo que aumenta la tasa de senescencia en hojas viejas (Shabala, 2017). Si la tasa a la cual las hojas viejas mueren es mayor que la tasa a la cual las hojas nuevas son producidas, la capacidad fotosintética de la planta no podrá suplir los requerimientos de carbohidratos de las hojas jóvenes, lo que reduce su tasa de crecimiento (Munns & Tester, 2008).



Efecto del estrés por salinidad en la fotosíntesis, el metabolismo y la nutrición vegetal

La exposición a altas concentraciones de sales en el suelo (por fuera de las raíces) tiene un efecto claro en la disminución de la apertura estomática (Shabala, 2017). Además, en algunas especies vegetales se ha observado que, en presencia de este estrés, hay una disminución en la eficiencia cuántica fotoquímica del fotosistema II, que se correlaciona con el envejecimiento foliar y el aumento en las concentraciones de Na^+ y Cl^- foliares (James et al., 2002; Negrão et al., 2016). Luego del cierre de estomas, la reducción del CO_2 interno disminuye la actividad de diferentes enzimas, incluyendo la Rubisco (Chaves et al., 2008), lo que limita la carboxilación y reduce la tasa de fotosíntesis (Negrão et al., 2016).

Además del efecto sobre la fotosíntesis, la toxicidad del Na^+ impone un desbalance iónico en el citosol. Debido a la similitud en las propiedades fisicoquímicas del Na^+ y el K^+ , el ion Na^+ compite con el K^+ por los sitios de unión en procesos metabólicos en el citoplasma, como reacciones enzimáticas, síntesis de proteínas y funciones del ribosoma (Pardo & Rubio, 2011). Con más de 50 enzimas citoplasmáticas que son activadas por el K^+ , la disrupción del metabolismo es severa, tanto en las raíces como en los tejidos foliares. La salinidad también afecta la capacidad de las plantas de adquirir y metabolizar otros nutrientes esenciales, como el calcio, el nitrógeno, el fósforo y el magnesio (Loupassaki et al., 2002). La reducción en la tasa de fotosíntesis y la disrupción de los procesos metabólicos causadas por el

estrés osmótico y la toxicidad del Na^+ en el tejido vegetal generan un estrés secundario, el estrés oxidativo (Khan, Tanveer et al., 2020; Shabala, 2017) (véase, más atrás, la sección "Respuesta antioxidante").

Principales mecanismos de tolerancia al estrés por salinidad

Las plantas utilizan varios mecanismos fisiológicos y bioquímicos para evitar el daño y sobrevivir bajo estas condiciones de estrés. Debido a la naturaleza del estrés salino, las plantas deben generar estrategias para enfrentar los estreses osmótico, iónico y oxidativo producidos por la alta concentración de sales en el suelo (Lazar, 2003). Algunos de los principales mecanismos de respuesta son el ajuste osmótico, la respuesta antioxidante y la regulación hormonal, que se encuentran explicados con mayor detalle en la sección "Respuesta antioxidante". Sin embargo, existe una respuesta específica ante la toxicidad de iones Na^+ y Cl^- y que es necesaria para el aumento en la tolerancia de las plantas a estas sales: la homeostasis iónica. Para mantener la homeostasis, las plantas utilizan mecanismos como los siguientes: 1) la expulsión del Na^+ del citosol, 2) el secuestro de este ion en las vacuolas y 3) su acumulación en hojas viejas para proteger el crecimiento de las plantas en condiciones de salinidad (Khan, Tanveer et al., 2020; Numan et al., 2018). Además, debido al desbalance en la proporción Na^+/K^+ generado por la entrada de Na^+ a las células, estas deben activar mecanismos para la retención de K^+ en el citosol y prevenir las alteraciones metabólicas por la fuga de este ion (Assaha et al., 2017; Shabala, 2017; Shabala & Cuin, 2008).



Metales pesados

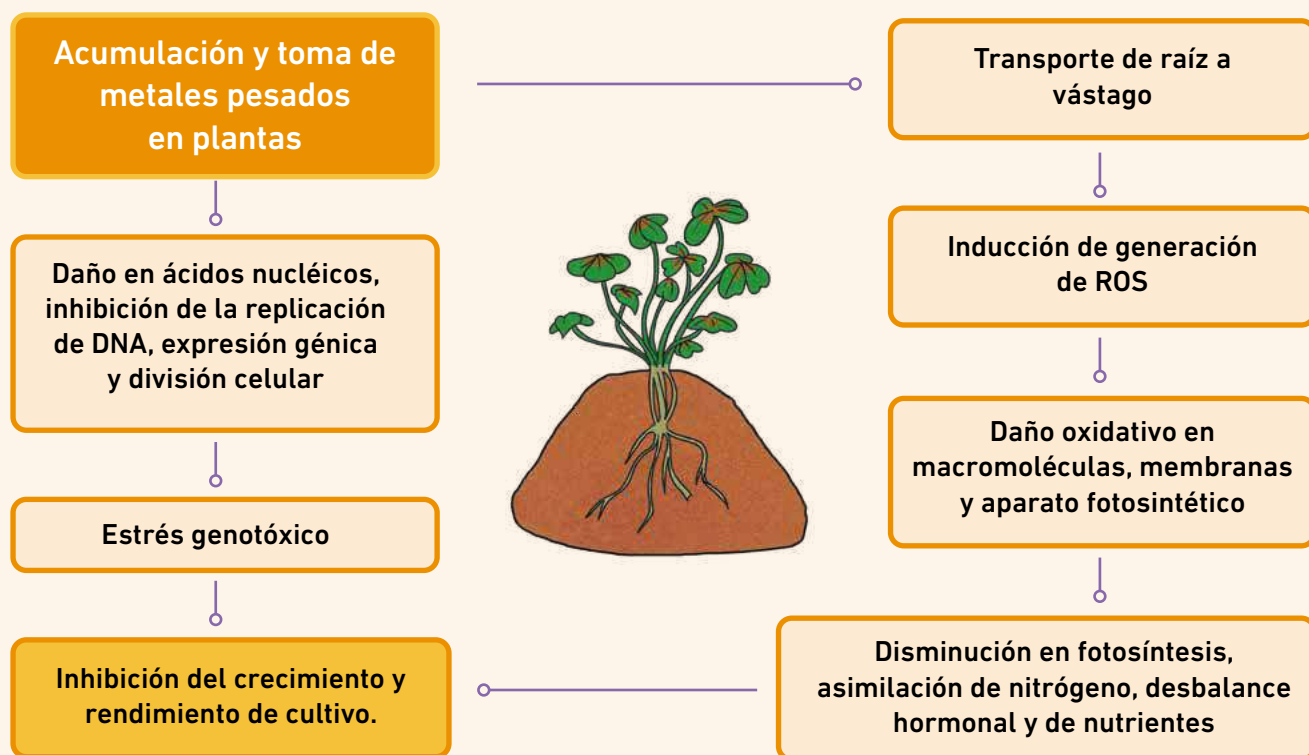
Los metales pesados son elementos que poseen cinco veces la gravedad específica del agua ($> 5 \text{ g/cm}^3$) (Singh et al., 2016). Son constituyentes naturales de la corteza terrestre, pero, debido a actividades humanas y al aumento en los residuos industriales, la contaminación de los suelos y las fuentes hídricas han resultado en una problemática importante en los ecosistemas, pues estos metales no son biodegradables y se mantienen en el ambiente de forma indefinida (Singh & Prasad, 2011). La polución por metales pesados se debe principalmente a las industrias en crecimiento, la minería, la fundición, la eliminación de desechos industriales, las aplicaciones de fertilizantes y pesticidas en cultivos, los abonos compostados, la irrigación de cultivos con aguas residuales no tratadas o lodos, las plantas de energía, la deposición atmosférica, el refinado y el derrame de petroquímicos (Gangwar et al., 2014).

Estos metales pueden entrar en la cadena alimenticia como resultado de su absorción por parte de las plantas (Gangwar et al., 2014). Por esto, cuando se encuentran

en el suelo, implican un riesgo para el desarrollo vegetal y para la salud humana (Singh et al., 2010). Entre los metales pesados se encuentran algunos que son esenciales para el desarrollo vegetal; sin embargo, a elevadas concentraciones, pueden afectar la fisiología y bioquímica de las plantas (Dubey et al., 2018; Gangwar et al., 2014). La toma y translocación de estos metales puede variar de forma considerable y depende de la especie vegetal y el tipo de metal (Dutta et al., 2018). Metales como el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el níquel (Ni), el zinc (Zn) y el cobre (Cu) son esenciales y cofactores necesarios para muchas reacciones enzimáticas (Fox & Guerinot, 1998). Los metales pesados no esenciales (Cr, As, Cd, Pb, Hg), por su parte, no son requeridos por los organismos e interfieren en procesos fisiológicos al alterar reacciones enzimáticas debido a su reactividad con los grupos tiol y otros grupos funcionales (Dubey et al., 2018), como se observa en la Figura 4.1. Por esta razón, las plantas deben adquirir mecanismos especializados para percibir, transportar y mantener metales esenciales dentro de los límites fisiológicos y para controlar la acumulación excesiva de metales no esenciales (Gangwar et al., 2014).

■ Figura 4.1. Efecto del estrés por metales pesados en plantas.

Fuente: Elaboración propia con base en Dutta et al. (2018)



Efecto de los metales pesados en el crecimiento, la fisiología y la bioquímica vegetales

Los metales acumulados en los tejidos vegetales pueden causar efectos tóxicos, especialmente cuando se translocan a los tejidos aéreos (Gangwar et al., 2014). La disminución en el crecimiento, la necrosis foliar, la disminución en la tasa de germinación y la pérdida de turgencia son las consecuencias más comunes del estrés por metales pesados (Sharma & Dubey, 2007). Esto se debe a sus efectos sobre la fisiología vegetal en procesos como la fotosíntesis, la toma y el transporte de agua, la transpiración, la nutrición mineral y la toma de elementos esenciales (Gangwar et al., 2014). Además, los iones metálicos pueden interactuar con el núcleo celular y causar daños en el ADN, como la modificación de bases, la depurinación y la alteración en el ciclo y división celular (Hossain et al., 2012).

Con respecto al efecto de la presencia de estos metales sobre el aparato fotosintético, algunos estudios han reportado disminuciones en la actividad del fotosistema II (PSII) y el rendimiento cuántico (Ventrella et al., 2009). Estos iones metálicos interfieren con las reacciones de luz y causan disminuciones significativas en la asimilación de CO₂, mediante la inhibición de la actividad RUBP carboxilasa o la afectación de la estabilidad estructural de esta a través de la interacción con los grupos tiol (Dutta et al., 2018). Además del aparato fotosintético, los metales pesados alteran el metabolismo vegetal. Con respecto al nitrógeno, los metales inhiben la actividad de las enzimas clave en los procesos de metabolismo y asimilación de amonio y nitrato, como nitrato reductasa, nitrito reductasa, glutamina sintetasa, glutamina oxoglutarato aminotransferasa y glutamina deshidrogenasa, respectivamente (Chiraz et al., 2003). El As(V), al ser químicamente similar a los fosfatos, puede ser transportado por proteínas transportadoras de fosfatos al interior de la membrana plasmática, generando un desbalance en el suministro de fosfatos (Dubey et al., 2018). Durante reacciones de fosforilación, el As(V) puede competir con los fosfatos y desacoplar la fosforilación oxidativa al desplazar el fosfato durante la síntesis de ATP (Finnegan & Chen, 2012).

El estrés por metales pesados también induce la acumulación excesiva de ROS, como el anión superóxido (O₂^{•-}), el radical hidroxilo (OH•) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), dentro de las células (Shahid et al., 2014). En los tejidos vegetales, las ROS pueden ser directamente producidas por Cu, Pb, Cr y As, y de forma indirecta por Cd, debido a que este metal puede producir ROS a través de la inactivación enzimática y la estimulación de la expresión de lipoxigenasas (Dubey et al., 2018).

En muchas especies vegetales se ha reconocido que los metales pesados inducen la peroxidación lipídica, reducen el nivel de ácidos grasos saturados y aumentan el contenido de ácidos grasos insaturados en las membranas (Dubey et al., 2018; Hossain et al., 2012).



Sistemas de detoxificación en plantas

Las raíces de las plantas pueden prevenir el ingreso de los metales al interior de la planta al precipitar los iones metálicos presentes en el suelo mediante exudados radicales como el malato, el oxalato y el citrato (Hossain et al., 2012). Una vez están en el interior de la planta, las células pueden utilizar proteínas de transporte para excluir los metales hacia el apoplasto, disminuyendo su concentración en el interior celular (Dubey et al., 2018). Además de la exclusión, existen otros mecanismos para restringir la toma y transporte de metales pesados, como la formación de complejos en la interfase pared celular-membrana plasmática y la distribución espacial de los metales, en la que estos se acumulan en las raíces para prevenir el daño en tejidos foliares (Hossain et al., 2012). Una vez en el interior de las células, la quelación y el secuestro en las vacuolas son los mecanismos más importantes en la detoxificación de metales pesados (Dubey et al., 2018). Moléculas de bajo peso molecular específicas con el GSH, las fitoquelatinas (PC, por sus siglas en inglés) y las metalotioneínas (MT) se unen a los metales pesados para facilitar su transporte hacia las vacuolas (Dubey et al., 2018; Jain et al., 2018). Además, algunos reportes indican el papel de aminoácidos como la prolina en el incremento de la resistencia al estrés por metales pesados en las plantas, no solo de forma indirecta, al contribuir al ajuste osmótico celular, sino también con la formación de complejos prolina-metal, que previenen daños enzimáticos (Sharma & Dietz, 2006; Viehweger, 2014).

Debido a la generación de ROS, se activan mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para eliminar su exceso y prevenir los daños celulares (véase, más atrás, la sección “Respuesta antioxidante”).

Papel de las PGPB en la mitigación del estrés abiótico

La mitigación de estreses abióticos en las plantas mediante la aplicación de PGPB integra diferentes mecanismos que afectan tanto el crecimiento como el desarrollo de estas. Estos mecanismos pueden actuar de manera sinérgica, mitigando los efectos deletéreos que producen los diversos estreses abióticos a los cuales se enfrentan las plantas durante su ciclo de vida (Ullah et al., 2019).

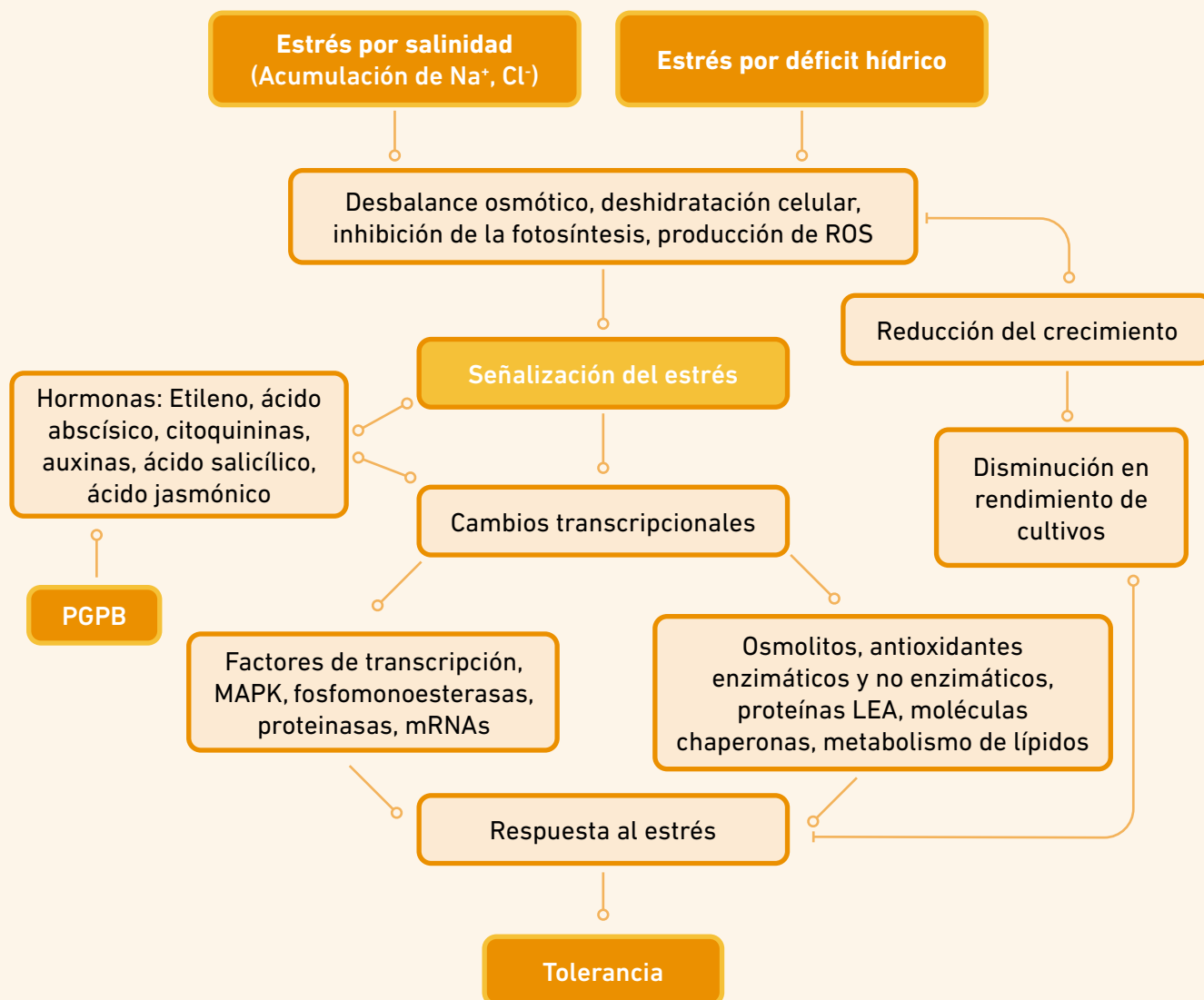
Las PGPB utilizan diversos mecanismos para influenciar el comportamiento de la planta bajo condiciones de estrés abiótico; uno de ellos es el uso de sustancias reguladoras del crecimiento, como las auxinas, de las cuales el ácido indolacético (AIA) induce la estimulación de la división celular tanto en el tallo como la raíz, lo cual mitiga la pérdida de biomasa debida al retardo del crecimiento por causa del estrés abiótico (Riemann et al., 2015). Este compuesto también ha sido relacionado con el aumento de fenoles totales, el contenido de calcio intracelular y la actividad de la enzima polifenol oxidasa en las plantas bajo estrés, factores que benefician la mitigación de estos estreses abióticos (Ahmad et al., 2008; Chowdhury, 2003; Ullah et al., 2019).

Moléculas como el AIA, las giberelinas y las citoquininas producidas por las PGPB (ya sea en la rizósfera o en los tejidos de las plantas) generan el aumento de la división celular, estimulando también la extensión de la raíz y la generación de pelos radicales, lo cual incrementa la toma de nutrientes debido a una mayor superficie de captación para la planta (Qin et al., 2016). Plantas inoculadas con PGPB han demostrado aumentar la toma de nutrientes como fósforo y potasio bajo condiciones de estrés abiótico, lo cual se ha visto vinculado a la mitigación de este (Moreno-Galván, Romero-Perdomo et al., 2020; Rojas-Tapias et al., 2012; Tiwari et al., 2018). En la Figura 4.2 se puede observar, de forma general, el efecto de las PGPB en la respuesta a algunos estreses abióticos.



- **Figura 4.2.** Efecto de los estreses por salinidad y déficit hídrico sobre el desarrollo de las plantas.

Fuente: Forni et al. (2017)



La producción de exopolisacáridos (EPS) también ha sido asociada con la mitigación de estreses abióticos, ya que estos, además de incrementar grandemente el volumen de los macroporos y los agregados de suelo rizosféricos, favorecen la adhesión a la superficie radicular y, al estar involucrados en la formación de biopelículas, pueden producir zonas de microhidratación a nivel radicular, lo que favorece el intercambio de nutrientes y protege a la raíz frente a la desecación en medios con un bajo contenido de agua (Dimkpa et al., 2009; Kavamura & de Melo, 2014; Moreno-Galván, Cortés-Patiño et al., 2020; Timmusk & Nevo, 2011; Upadhyay et al., 2011; Yegorenkova et al., 2001).

Todos estos mecanismos nombrados anteriormente trabajan de forma indirecta sobre la promoción del crecimiento vegetal bajo condiciones climáticas favorables y no favorables, como lo son los estreses abióticos. Sin embargo, existe una actividad enzimática llamada ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa (ACC-desaminasa), la cual, cuando está presente en los microorganismos, ha demostrado producir un impacto importante sobre la mitigación del estrés abiótico en las plantas (Glick, 2014).



Efecto de la ACC-desaminasa bacteriana en la mitigación de estreses abióticos

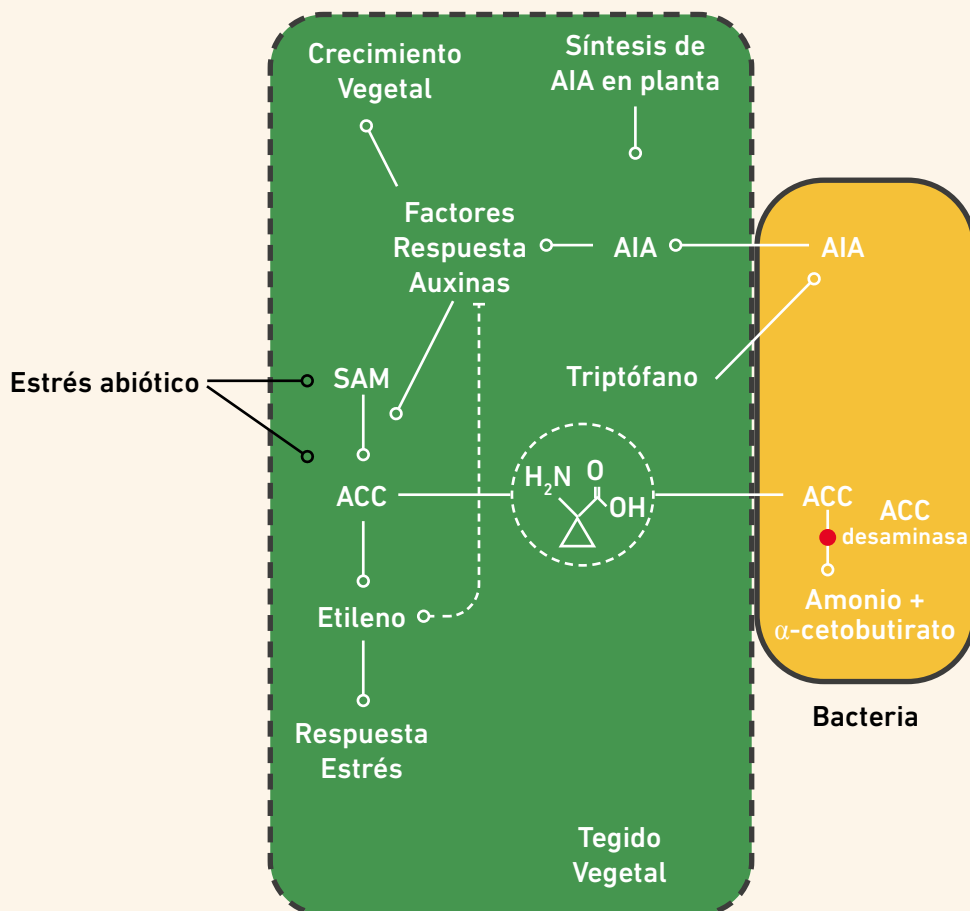
El aumento en la producción de etileno en las plantas es un indicador de susceptibilidad ante varios tipos de estrés ambiental (Glick, 2014; Müller & Munné-Bosch, 2015). Este compuesto es una hormona vegetal relacionada con la regulación de varios procesos fisiológicos en las plantas, pero su producción asociada a estreses abióticos conduce a una reducción significativa en el crecimiento y desarrollo vegetal, razón por la cual, si no es controlado correctamente, puede iniciar la señalización celular apoptótica, que genera la muerte de la planta (Dubois et al., 2018; Iqbal et al., 2017).

Las plantas biosintetizan el etileno a partir de la S-adenosilmetionina (SAM), la cual es convertida por la 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintetasa (ACS) en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), el cual es convertido, finalmente, en etileno por la ACC-oxidasa (Glick et al., 2007; Vurukonda et al., 2016). Al respecto, la incidencia de estreses abióticos ha demostrado aumentar la síntesis del precursor inmediato ACC, el cual es tan secretado por las plantas en sus exudados radicales que ha sido hallado en casi todas las plantas que crecen en condiciones ambientales estresantes (Abiri et al., 2017; Liu et al., 2015; Wang et al., 2013).

El papel que desempeña la ACC-desaminasa en plantas bajo estrés abiótico está relacionado con la reducción de la acción inhibitoria del etileno (Shaharoon et al., 2006). La presencia de dicha enzima en las bacterias es capaz de reducir la producción de etileno en las plantas (Yang et al., 2009), mediante la metabolización del ACC (presente en los exudados radicales), convirtiéndolo en γ -cetobutirato y amonio. Esto permite que el sistema radical se desarrolle sin la inhibición propia de dicho compuesto, propiciando así una mayor absorción de nutrientes (Glick, 2014; Glick et al., 2007). Existen muchos reportes sobre el mejoramiento en el desarrollo de la planta al inocular cepas bacterianas que son positivas a la producción de ACC-desaminasa durante estados de sequía (Sarma y Saikia, 2014), estrés por exceso de agua (Grichko & Glick, 2001), hipersalinidad (Nadeem et al., 2007; Stearns et al., 2005) y otros tipos de estrés. En la Figura 4.3 se observa cómo una bacteria con ACC-desaminasa y la producción de auxinas pueden favorecer el crecimiento de una planta bajo condiciones de estrés abiótico.

- **Figura 4.3.** Modelo de la forma como una PGPB que produce ACC-desaminasa y AIA puede facilitar el crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés.

Fuente: Elaboración propia con base en Glick (2014)



Nota: La única enzima señalada en la figura es la ACC-desaminasa. La SAM es convertida en ACC por la ACC-sintasa, y el ACC es convertido en etileno por la ACC-oxidasa. La biosíntesis de AIA tanto en plantas como en bacterias es un proceso complejo que implica múltiples enzimas y factores.

Ejemplos de mitigación del estrés por altas y bajas temperaturas mediante PGPB

Entre los posibles escenarios dados por la variabilidad climática se encuentran los extremos de temperatura, que afectan la fisiología de las plantas y disminuyen, así, la producción y el rendimiento de los cultivos; sin embargo, el uso de PGPB ha demostrado aumentar la tolerancia de las plantas a condiciones de altas y bajas temperaturas. Sarkar et al.

(2018) encontraron que, en dos cultivares de trigo (HT 41 y HT 15) expuestos a temperaturas de 40 °C, la inoculación con *Bacillus safensis* permitió un mayor contenido relativo de agua (RWC, por sus siglas en inglés) foliar, un menor contenido de ROS a nivel foliar (H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$), una menor peroxidación lipídica y una menor fuga de electrolitos. La regulación de la cantidad de ROS se correlacionó con el aumento en la actividad antioxidante de las enzimas APX, GR, SOD, CAT y POX, y con el aumento en la concentración de los antioxidantes no enzimáticos glicina-betaína y ácido ascórbico, así como con la disminución en el contenido de prolina. Con estos resultados, los autores sugieren la inoculación de semillas como una herramienta sencilla, efectiva y asequible para mejorar la respuesta de las plantas al estrés por altas temperaturas. La modulación en la actividad antioxidante también fue encontrada por Ali et al. (2011) en plantas de la variedad de trigo LOK-1, pero este autor encontró que la inoculación con *Pseudomonas putida* AKMP7 resultó en una disminución en la actividad enzimática antioxidante y en un aumento en la concentración de solutos compatibles. Esto resalta la importancia de las interacciones específicas entre plantas y PGPB, que pueden resultar en diferentes respuestas a las condiciones ambientales.

Bruno et al. (2020) observaron no solo un aumento en la tolerancia a altas temperaturas en plantas de sorgo, sino además un efecto de la inoculación con la cepa *Providencia rettgeri* TCR21 en presencia de Cr^{+6} , pues las bacterias no solo aumentaron la tolerancia a estos estreses combinados, sino que además disminuyeron la concentración foliar de este metal pesado. En combinación de estos estreses, los autores encontraron una disminución significativa de la concentración de prolina en las plantas inoculadas, así como un aumento significativo en la actividad enzimática antioxidante. Las plantas inoculadas presentaron una mayor tasa de producción de biomasa, longitud foliar y radical, y contenido de pigmentos fotosintéticos. En un trabajo que probaba la respuesta de las plantas inoculadas a diferentes estreses, Abd El-Daim et al. (2019) observaron la capacidad de la cepa *Bacillus velezensis* 5113 para mejorar la supervivencia de plantas de trigo a estrés por altas (40 °C) y bajas (5 °C) temperaturas, y encontraron

diferencias en la acumulación diferenciada de metabolitos entre las plantas inoculadas y las no inoculadas. En bajas temperaturas, la acumulación de metabolitos como sacarosa, prolina y piruvato disminuyó en las plantas estresadas, pero aumentó en las plantas inoculadas con la cepa 5113. Además, los autores encontraron que el efecto del estrés por frío en las vías metabólicas fue mayor en las plantas no inoculadas, pues se encontró la acumulación de metabolitos implicados en las principales vías metabólicas, como el metabolismo de azúcares y la síntesis de flavonoides, pero los metabolitos acumulados en las plantas inoculadas no fueron conectados con estas vías metabólicas.

Con respecto a la inoculación de PGPB para mejorar la respuesta a bajas temperaturas, se ha observado la capacidad de la cepa *Burkholderia phytofirmans* PsJN en plantas de vid. Ait Barka et al. (2006) encontraron que esta cepa promueve un mayor desarrollo de la raíz y una mayor producción de biomasa en plantas sometidas durante 14 días a 4 °C. Además, la inoculación con esta cepa incrementó los contenidos de almidón, prolina y compuestos indólicos en las plantas. Asimismo, Fernandez et al. (2012) encontraron que esta cepa tiene la capacidad de mitigar el efecto de bajas temperaturas (4 °C) en la fotosíntesis, y sugieren la modificación del metabolismo de carbohidratos como un mecanismo implicado en el efecto de esta cepa. Theocharis et al. (2011) encontraron, además, que esta cepa permite una respuesta más rápida y un aumento en la expresión de genes asociados a sistemas de defensa y actividad antioxidante. En general, esta cepa modifica diferentes mecanismos de respuesta en la planta que permiten una mejor tolerancia a las bajas temperaturas. En plantas de tomate, Chen et al. (2014) observaron que la inoculación con la bacteria endofítica TPs-04, con actividad ACC-desaminasa, resultó en un incremento en la actividad enzimática antioxidante y disminuyó de forma significativa la acumulación de H_2O_2 y la peroxidación lipídica en respuesta a bajas temperaturas nocturnas (6 °C). Igualmente, Saikia et al. (2018) encontraron que los niveles de prolina se incrementaron significativamente en *Vigna mungo* L. y *Pisum sativum* L. al inocularlas con un consorcio formado por diferentes PGPB.

Ejemplos de mitigación del estrés por déficit hídrico mediante PGPB

El efecto de la inoculación con PGPB bajo condiciones de déficit hídrico ha sido evaluado en diversos cultivos de importancia económica, y se ha encontrado, entre los efectos más importantes, la modulación de la producción de reguladores de crecimiento vegetal. Zhang et al. (2007) reportaron que la inoculación con la cepa *Bacillus subtilis* GB03 promovió el crecimiento de plantas de *Arabidopsis* mediante la regulación de la homeostasis de auxinas; específicamente, observaron una mayor expresión génica relacionada con la síntesis de auxinas en partes foliares de las plantas expuestas a la cepa GB03. Además, encontraron que esta síntesis es mediada por la producción de compuestos volátiles orgánicos (voc, por sus siglas en inglés) por parte de la bacteria. Cohen et al. (2009) demostraron que la inoculación con la cepa endofítica *Azospirillum lipoferum* USA 59b resultó en un aumento en la producción de ABA en plantas de maíz tratadas previamente con inhibidores de la síntesis de ABA y giberelinas y que fueron sometidas a dos periodos de 10 y 7 días de sequía, respectivamente. Este aumento permitió una mayor producción de materia seca foliar y radical, mayor altura, mayor área foliar y mayor RWC. Estos resultados resaltan el valor de la modulación hormonal en la respuesta a estrés por parte de estos microorganismos, pues esta modulación puede ser diferente dependiendo de cada microorganismo y de las condiciones experimentales. Curá et al. (2017) encontraron, por el contrario, que la inoculación de plantas de maíz con las cepas *Azospirillum brasilense* Sp7 o *Herbaspirillum seropedicae* Z-152 resultó en una disminución en el contenido de ABA y etileno, así como en una reducción en el contenido de prolina. Esto fue asociado con una menor percepción del estrés por parte de la planta, que resultó en una menor peroxidación de lípidos y en un mayor contenido de carbono, nitrógeno, clorofilas y RWC a nivel foliar, además de una mayor producción de biomasa.

Además de las respuestas a nivel foliar, la modulación hormonal generada por las PGPB también puede producir cambios y alteraciones en la morfología y estructura de la raíz, que resultan en un aumento en la toma de agua y

nutrientes, lo que genera un efecto positivo en condiciones de déficit hídrico (Ngumbi & Kloepper, 2016). Incrementos en la longitud y biomasa de las raíces de plantas sometidas a déficit hídrico han sido reportados en plantas de maíz (Curá et al., 2017; Naseem & Bano, 2014; Naveed et al., 2014), trigo (Timmusk et al., 2014), arroz (Filgueiras et al., 2020; Silva et al., 2020), vid (Rolli et al., 2015) y caña de azúcar (Moutia et al., 2010), entre otros cultivos. Vargas et al. (2014) encontraron que, al inocular plantas de caña de azúcar con la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, la colonización de las bacterias modificó la expresión de genes asociados a la respuesta al estrés y al metabolismo de hormonas en la planta, especialmente en las raíces, lo que sugiere que las raíces inoculadas no experimentan el mismo nivel de estrés que las raíces de plantas no inoculadas. Jochum et al. (2019), por su parte, demostraron el efecto superior de dos cepas de PGPB al aplicarlas en trigo y maíz en condiciones simuladas de estrés hídrico, al incrementarse significativamente variables relacionadas con la arquitectura de la raíz y la elongación de hojas y tallos, en comparación con el control no inoculado.

Otra de las respuestas frecuentemente observadas con la inoculación de PGPB en condiciones de déficit hídrico es una mejora en el estado hídrico foliar de las plantas inoculadas. Saikia et al. (2018) encontraron que, en plantas de frijol negro (*Vigna mungo* L.) y arveja (*Pisum sativum* L.), la inoculación con un consorcio de tres bacterias con actividad ACC-desaminasa (*Ochrobactrum pseudogrignonense* RJ12, *Pseudomonas* sp. RJ15 y *Bacillus subtilis* RJ46) resultó en un incremento en el RWC del 85 %, con respecto al control no inoculado, en las plantas, luego de 45 días bajo estrés osmótico simulado con polietilenglicol 600 (PEG-600). Además, en este trabajo se observó un efecto directo de la inoculación en la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y peroxidasa, así como una disminución en el contenido radical del ACC, precursor del etileno. El impacto que tiene una mejora en el RWC ha sido correlacionado con una mejor respuesta fotosintética de las plantas. Naveed et al. (2014) encontraron que la inoculación de plantas de maíz con las cepas *Burkholderia phytofirmans* PsJN y *Enterobacter* sp. FD17 resultó en un 30 % más de RWC en las plantas inoculadas, así como en mayores tasas de asimilación de CO₂, conductancia estomática y eficiencia fotoquímica del fotosistema II (PSII). Otros trabajos con

resultados similares han sido realizados en plantas de *Arabidopsis* (Bresson et al., 2013; Rangel de Souza et al., 2016), arroz (Filgueiras et al., 2020), soya (Bulegon et al., 2019) y *Populus* sp. (Khan et al., 2016). Timmusk et al. (2014) observaron, a través de microscopía electrónica, la formación de biopelículas en pelos radicales de plántulas de trigo en condiciones simuladas de estrés hídrico. Se determinó, en general, que la eficiencia del uso de agua en las plantas inoculadas con *Bacillus thuringiensis* AZP2 se incrementó en un 63% en comparación con las plantas control no inoculadas.

La capacidad de las PGPB para mejorar la respuesta en la eficiencia fotoquímica y en procesos fotosintéticos se relaciona con la modulación de la respuesta antioxidante en las plantas y con la acumulación de solutos para disminuir el efecto de bajos potenciales hídricos intracelulares. Sandhya et al. (2010) encontraron un mayor contenido de prolina, azúcares totales y aminoácidos, con respecto al control no inoculado, en plantas de maíz inoculadas con tres cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*. Además, observaron una menor actividad de las enzimas antioxidantes APX, CAT y GPX. Moreno-Galván, Romero-Perdomo et al. (2020) reportaron que, en plantas de maíz sometidas a 45 días bajo déficit hídrico al 30% de capacidad de campo, la inoculación con cepas del género *Bacillus* resultó en un aumento en la concentración de prolina, P, Ca²⁺ y K⁺ en el tejido foliar, así como en una disminución en la actividad ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa, lo que significó un mayor contenido de biomasa seca y una mayor altura foliar y radical. Con estas mismas

cepas, pero en otro modelo vegetal, pasto guinea, Moreno-Galván, Cortés-Patiño et al. (2020) encontraron también un incremento en la concentración de prolina y una disminución en la actividad de la enzima glutatión reductasa, por lo que proponen estos dos mecanismos como los principales responsables en la modulación de la respuesta al estrés por parte de estas PGPB. Sin embargo, otros autores han encontrado un aumento en la actividad enzimática en plantas inoculadas con PGPB en condiciones de déficit hídrico. Khan y Bano (2019) encontraron una disminución en el contenido de prolina y también una disminución en la actividad antioxidante en plantas de maíz, lo que resultó en una menor peroxidación lipídica y en una mayor producción de biomasa seca foliar y radical.

Enfoques agronómicos realizados por Bécquer, Ávila, Galdo et al. (2017) demostraron el efecto bioestimulante de la inoculación de *Bradyrhizobium* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de maíz cultivado bajo condiciones de sequía agrícola. Al respecto, otras investigaciones (Bécquer, Ávila, Puentes et al., 2017; Bécquer Granados et al., 2019; Bécquer-Granados et al., 2018) han demostrado resultados promisorios mediante la coinoculación de *Bradyrhizobium* sp. junto con otros microorganismos, particularmente *Trichoderma harzianum* y *Glomus cubense*, en diferentes gramíneas pratenses bajo condiciones de déficit hídrico, y se infiere la existencia de un consorcio entre estos microorganismos basado en una interacción microbiana positiva bajo estas condiciones de estrés abiótico.



Ejemplos de mitigación del estrés por salinidad mediante PGPB

Gupta y Pandey (2019), al inocular frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con cepas de *Aneurinibacillus aneurinilyticus* y *Paenibacillus* sp., altamente productoras de ACC-desaminasa, comprobaron su efecto, significativamente superior al presentado en el grupo de control, en condiciones simuladas de salinidad. Shukla et al. (2012) reportaron el efecto de PGPB halotolerantes en el crecimiento de plantas de *Arachis hypogaea* L., lo que mejoró significativamente su producción de biomasa y mostró una mayor relación K^+/Na^+ , así como un mayor contenido de Ca^{+2} , fósforo y nitrógeno. Rojas-Tapias et al. (2012) evaluaron cepas de *Azotobacter* C5 y C9 en plantas de maíz (*Zea mays* L.) bajo tres concentraciones de salinidad (0, 2,93 y 5,85 g de NaCl kg suelo⁻¹), y los resultados demostraron un incremento en la clorofila y los polifenoles, además de un crecimiento favorable en las plantas inoculadas en comparación con los controles de salinidad no inoculados. Ullah y Bano (2015) inocularon cepas de *Bacillus* sp. y *Arthrobacter pascens* capaces de solubilizar fósforo y producir sideróforos en plantas de maíz inducidas a estrés por salinidad, y observaron que la coinoculación mejoró significativamente la producción de biomasa, aumentó la acumulación de prolina e incrementó la respuesta de enzimas antioxidantes como SOD, CAT y APX. Sultana et al. (2019) demostraron un alivio al estrés por salinidad en plantas de arroz inoculadas con PGPB que tienen la capacidad de solubilizar fósforo, fijar nitrógeno y producir AIA. Orozco-Mosqueda et al. (2020), por su parte, publicaron la importancia de la actividad enzimática de la ACC-desaminasa como uno de los mecanismos más importantes para inducir la tolerancia al estrés salino en plantas junto con el efecto de rizobacterias del género *Bacillus*. Asimismo, Khan, Asaf et al. (2020) aislaron bacterias endófitas de plantas halotolerantes y evaluaron su efecto en plantas de arroz sometidas a estrés salino, y evidenciaron una reducción considerable de ABA endógeno; sin embargo, aumentó el contenido de azúcares totales y de GSH. Etesami y Glick (2020) hallaron los mecanismos de acción de las bacterias halotolerantes para aliviar el estrés salino en las plantas; entre estas bacterias se destacaron los géneros *Halomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Oceanobacillus* y *Pseudomonas*.

Varias investigaciones han demostrado que la mayoría de las bacterias halotolerantes con efectos de mitigación de salinidad en planta poseían ACC-desaminasa y la capacidad de sintetizar AIA.

Ejemplos de mitigación del estrés por metales pesados mediante PGPB

Azcón et al. (2010) mostraron que la cepa *Bacillus cereus*, al ser inoculada en plantas de *Trifolium repens*, disminuía la toxicidad por metales pesados como Fe, Mn, Zn y Cd y aumentaba tanto la producción de biomasa, al mejorar la toma de nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio, como la capacidad de producir AIA. Shilev et al. (2020) aislaron y caracterizaron 17 aislamientos de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, y encontraron que poseían la capacidad de producir ACC-desaminasa, sideróforos y AIA, lo que evidenció que la inoculación de consorcios

disminuyó la acumulación de Cd, Pb y Zn en plantas de *Spinacia oleracea* L. var. Matador, y esto aumentaba, a su vez, la producción de biomasa hasta en un 100% en comparación con el grupo de control no inoculado. Alka et al. (2020) publicaron recientemente, como una herramienta innovadora, el uso de PGPB para mitigar la contaminación por arsénico (As) en las plantas. Ma et al. (2015), por su parte, mostraron el alivio en la toxicidad de los metales pesados Cd, Pb y Zn en plantas de *Brassica napus* al ser inoculadas con una cepa de *Bacillus* sp. Asimismo, Konkolewska et al. (2020) mostraron que cultivos en interseembra de *Brassica juncea* (L.) Czern., *Zea mays* L. y *Medicago sativa* L., al ser inoculados con la cepa *Burkholderia phytofirmans* PsJN, aumentaron la eficiencia de la fitoextracción de Zn, Pb y Cd, evidenciaron un aumento en el rendimiento de biomasa seca e incrementaron la tasa de supervivencia de las plantas cultivadas en suelo contaminado.



Referencias

- Abd El-Daim, I. A., Bejai, S., & Meijer, J. (2019). *Bacillus velezensis* 5113 induced metabolic and molecular reprogramming during abiotic stress tolerance in wheat. *Scientific Reports*, 9(1), artículo 16282. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52567-x>
- Abiri, R., Shaharuddin, N. A., Maziah, M., Yusof, Z. N. B., Atabaki, N., Sahebi, M., Valdiani, A., Kalhori, N., Azizi, P., & Hanafi, M. M. (2017). Role of ethylene and the APETALA 2/ethylene response factor superfamily in rice under various abiotic and biotic stress conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 134, 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.10.015>
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>
- Ahmad, P., Jamsheed, S., Hameed, A., Rasool, S., Sharma, I., Azooz, M. M., & Hasanuzzaman, M. (2014). Chapter 11 - Drought stress induced oxidative damage and antioxidants in plants. En P. Ahmad (ed.), *Oxidative damage to plants: Antioxidant networks and signaling* (pp. 345-367). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00011-3>
- Ahmad, R., Hussain, S., Anjum, M. A., Khalid, M. F., Saqib, M., Zakir, I., Hassan, A., Fahad, S., & Ahmad, S. (2019). Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in plants under salt stress. En M. Hasanuzzaman, K. R. Hakeem, K. Nahar, & H. F. Alharby (eds.), *Plant abiotic stress tolerance* (pp. 191-205). Springer.
- Ait Barka, E., Nowak, J., & Clément, C. (2006). Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7.246-7.252. <https://doi.org/10.1128/AEM.01047-06>
- Ali, S. Z., Sandhya, V., Grover, M., Linga, V. R., & Bandi, V. (2011). Effect of inoculation with a thermotolerant plant growth promoting *Pseudomonas putida* strain AKMP7 on growth of wheat (*Triticum spp.*) under heat stress. *Journal of Plant Interactions*, 6(4), 239-246. <https://doi.org/10.1080/17429145.2010.545147>
- Alka, S., Shahir, S., Ibrahim, N., Chai, T.-T., Mohd Bahari, Z., & Abd Manan, F. (2020). The role of plant growth promoting bacteria on arsenic removal: A review of existing perspectives. *Environmental Technology & Innovation*, 17, artículo 100602. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100602>
- Anwar Hossain, M., Hoque, M. A., Burritt, D. J., & Fujita, M. (2014). Chapter 16 - Proline protects plants against abiotic oxidative stress: Biochemical and molecular mechanisms. En P. Ahmad (ed.), *Oxidative damage to plants: Antioxidant networks and signaling* (pp. 477-522). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00016-2>
- Aroca, R. (2012). *Plant responses to drought stress*. Springer.
- Arun-Chinnappa, K. S., Ranawake, L., & Seneweera, S. (2017). Impacts and management of temperature and water stress in crop plants. En P. S. Minhas, J. Rane, & R. K. Pasala (eds.), *Abiotic stress management for resilient agriculture* (pp. 221-233). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5744-1_9
- Assaha, D. V. M., Ueda, A., Saneoka, H., Al-Yahyai, R., & Yaish, M. W. (2017). The role of Na⁺ and K⁺ transporters in salt stress adaptation in glycophytes. *Frontiers in Physiology*, 8, artículo 509. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00509>
- Awasthi, R., Bhandari, K., & Nayyar, H. (2015). Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. *Frontiers in Environmental Science*, 3, artículo 11. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00011>
- Azcón, R., Perálvarez, M. del C., Roldán, A., & Barea, J.-M. (2010). Arbuscular mycorrhizal fungi, *Bacillus cereus*, and *Candida parapsilosis* from a multicontaminated soil alleviate metal toxicity in plants. *Microbial Ecology*, 59(4), 668-677. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9618-5>
- Bashan, Y., & Levanony, H. (1990). Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, 36(9), 591-608. <https://doi.org/10.1139/m90-105>
- Bécquer-Granados, C. J., Ávila-Cordoví, U., Nápoles-Gómez, J. Á., Galdo-Rodríguez, Y., Hernández-Obregón, M., Muir-Rodríguez, I., Álvarez-Figueroa, O., & Medinilla-Nápoles, F. (2018). Productivity of Tifton 85 bermudagrass, inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and *Trichoderma harzianum*, subject to agricultural drought stress. *Pastos y Forrajes*, 41(3), 182-188. <https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=article&op=download&path%5B%5D=2047&path%5B%5D=3791&inline=1>
- Bécquer, C. J., Ávila, U., Galdo, Y., Quintana, M., Álvarez, O., Puentes, A., Medinilla, F., & Mirabal, A. (2017). Selection of *Bradyrhizobium* sp. isolates due to their effect on maize under agricultural drought conditions in Sancti Spiritus, Cuba. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(1), 129-138. <http://www.cjasience.com/index.php/CJAS/article/view/693>
- Bécquer, C. J., Ávila, U., Puentes, A., Nápoles, J. A., Cancio, T., Medinilla, F., Muir, I., & Madrigal, Y. (2017). Respuesta de *Cenchrus ciliaris* L. (Buffel cv. Formidable), inoculado con *Bradyrhizobium* sp. y *Trichoderma harzianum*, bajo estrés de sequía. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(2), 231-240. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802017000200009
- Bécquer Granados, C. J., Reyes Rosseaux, R., Fernández Milanés, D., González Cañizares, P. J., & Medinilla Nápoles, F. (2019). Yield of Mulato II grass inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and *Glomus cubense* under agricultural drought conditions. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 53(3), 319-330. <http://scielo.sld.cu/pdf/cjas/v53n3/2079-3480-cjas-53-03-319.pdf>
- Bhandari, K., & Nayyar, H. (2014). Low temperature stress in plants: An overview of roles of cryoprotectants in defense. En P. Ahmad, & M. R. Wani (eds.), *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment* (vol. 1, pp. 193-265). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8591-9_9

- Bitá, C., & Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: Scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science*, 4, artículo 273. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00273>
- Bresson, J., Varoquaux, F., Bontpart, T., Touraine, B., & Vile, D. (2013). The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 200(2), 558-569. <https://doi.org/10.1111/nph.12383>
- Bruno, L. B., Karthik, C., Ma, Y., Kadirvelu, K., Freitas, H., & Rajkumar, M. (2020). Amelioration of chromium and heat stresses in *Sorghum bicolor* by Cr⁶⁺ reducing-thermotolerant plant growth promoting bacteria. *Chemosphere*, 244, artículo 125521. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125521>
- Bulegon, L. G., Guimarães, V. F., Battistus, A. G., Inagaki, A. M., & da Costa, N. V. (2019). Mitigation of drought stress effects on soybean gas exchanges induced by *Azospirillum brasilense* and plant regulators. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 49. <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632019v4952807>
- Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2008). Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, 103(4), 551-560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- Chen, H., & Xiong, L. (2012). Genome-wide transcriptional reprogramming under drought stress. En R. Aroca (ed.), *Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features* (pp. 273-289). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0_11
- Chen, L., Xu, M., Zheng, Y., Men, Y., Sheng, J., & Shen, L. (2014). Growth promotion and induction of antioxidant system of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.) by endophyte TPs-04 under low night temperature. *Scientia Horticulturae*, 176, 143-150. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.06.032>
- Chiraz, C., Houda, G., & Habib, G. M. (2003). Nitrogen metabolism in tomato plants under Cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition*, 26(8), 1.617-1.634. <https://doi.org/10.1081/PLN-120022372>
- Chowdhury, A. K. (2003). Control of sclerotium blight of groundnut by plant growth substances. *Crop Research (Hisar)*, 25(2), 355-359.
- Cohen, A. C., Travaglia, C. N., Bottini, R., & Piccoli, P. N. (2009). Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. *Botany*, 87(5), 455-462. <https://doi.org/10.1139/B09-023>
- Curá, J. A., Franz, D. R., Filosofía, J. E., Balestrasse, K. B., & Burgueño, L. E. (2017). Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. bacteria increases the tolerance of maize to drought stress. *Microorganisms*, 5(3), artículo 41. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030041>
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2, artículo 53. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
- Dimkpa, C., Weinand, T., & Asch, F. (2009). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell & Environment*, 32(12), 1.682-1.694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x>
- Ding, Y., Shi, Y., & Yang, S. (2020). Molecular regulation of plant responses to environmental temperatures. *Molecular Plant*, 13(4), 544-564. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.02.004>
- Dubey, S., Shri, M., Gupta, A., Rani, V., & Chakrabarty, D. (2018). Toxicity and detoxification of heavy metals during plant growth and metabolism. *Environmental Chemistry Letters*, 16(4), 1.169-1.192. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0741-8>
- Dubois, M., Van den Broeck, L., & Inzé, D. (2018). The pivotal role of ethylene in plant growth. *Trends in Plant Science*, 23(4), 311-323. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.01.003>
- Duca, M. (2015). *Plant physiology* (5.ª ed.). Springer.
- Dutta, S., Mitra, M., Agarwal, P., Mahapatra, K., De, S., Sett, U., & Roy, S. (2018). Oxidative and genotoxic damages in plants in response to heavy metal stress and maintenance of genome stability. *Plant Signaling & Behavior*, 13(8), artículo e1460048. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1460048>
- Etesami, H., & Glick, B. R. (2020). Halotolerant plant growth-promoting bacteria: Prospects for alleviating salinity stress in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 178, artículo 104124. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104124>
- Etesami, H., & Maheshwari, D. K. (2018). Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 225-246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.013>
- Fancy, N. N., Bahlmann, A.-K., & Loake, G. J. (2017). Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 40(4), 462-472. <https://doi.org/10.1111/pce.12707>
- Fernandez, O., Theocharis, A., Bordiec, S., Feil, R., Jacquens, L., Clément, C., Fontaine, F., & Barka, E. A. (2012). *Burkholderia phytofirmans* PsJN acclimates grapevine to cold by modulating carbohydrate metabolism. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(4), 496-504. <https://doi.org/10.1094/mpmi-09-11-0245>
- Figueiras, L., Silva, R., Almeida, I., Vidal, M., Baldani, J. I., & Menezes, C. H. S. G. (2020). *Gluconacetobacter diazotrophicus* mitigates drought stress in *Oryza sativa* L. *Plant and Soil*, 451(1), 57-73. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04163-1>
- Finnegan, P. M., & Chen, W. (2012). Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. *Frontiers in Physiology*, 3, artículo 182. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00182>

- Forni, C., Duca, D., & Glick, B. R. (2017). Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant and Soil*, 410(1), 335-356. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3007-x>
- Fox, T. C., & Guerinot, M. L. (1998). Molecular biology of cation transport in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49(1), 669-696. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.669>
- Gangwar, S., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Chauhan, D. K., Prasad, S. M., & Maurya, J. N. (2014). Chapter 10 - Plant responses to metal stress: The emerging role of plant growth hormones in toxicity alleviation. En P. Ahmad, & S. Rasool (eds.), *Emerging technologies and management of crop stress tolerance* (vol. 2, pp. 215-248). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800875-1.00010-7>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Giuliani, S., Sanguineti, M. C., Tuberosa, R., Bellotti, M., Salvi, S., & Landi, P. (2005). *Root-ABA1*, a major constitutive QTL, affects maize root architecture and leaf ABA concentration at different water regimes. *Journal of Experimental Botany*, 56(422), 3.061-3.070. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri303>
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with acc deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Glick, B. R., Cheng, Z., Czarny, J., & Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by acc deaminase-producing soil bacteria. En P. A. H. M. Bakker, J. M. Raaijmakers, G. Bloemberg, M. Höfte, P. Lemanceau, & B. M. Cooke (eds.), *New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research* (pp. 329-339). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6776-1_8
- Grichko, V. P., & Glick, B. R. (2001). Amelioration of flooding stress by acc deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(1), 11-17. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01212-2](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01212-2)
- Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A., & Venkateswarlu, B. (2011). Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1.231-1.240. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>
- Gupta, S., & Pandey, S. (2019). Acc deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in French bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Frontiers in Microbiology*, 10, artículo 1506. 10:1506. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01506>
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K., & Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51(1), 463-499. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.463>
- He, M., He, C.-Q., & Ding, N.-Z. (2018). Abiotic stresses: General defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9, artículo 1771. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01771>
- Hossain, M. A., Piyatida, P., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. (2012). Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: Central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*, 2012, artículo 872875. <https://doi.org/10.1155/2012/872875>
- Hossain, M. S., & Dietz, K.-J. (2016). Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress. *Frontiers in Plant Science*, 7, artículo 548. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00548>
- Iqbal, N., Khan, N. A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., & Khan, M. I. R. (2017). Ethylene role in plant growth, development and senescence: Interaction with other phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 8, artículo 475. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475>
- Jain, S., Muneer, S., Guerriero, G., Liu, S., Vishwakarma, K., Chauhan, D. K., Dubey, N. K., Tripathi, D. K., & Sharma, S. (2018). Tracing the role of plant proteins in the response to metal toxicity: A comprehensive review. *Plant Signaling & Behavior*, 13(9), artículo e1507401. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1507401>
- James, R. A., Rivelli, A. R., Munns, R., & von Caemmerer, S. (2002). Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. *Functional Plant Biology*, 29(12), 1.393-1.403. <https://doi.org/10.1071/FP02069>
- Jochum, M. D., McWilliams, K. L., Borrego, E. J., Kolomiets, M. V., Niu, G., Pierson, E. A., & Jo, Y.-K. (2019). Bioprospecting plant growth-promoting rhizobacteria that mitigate drought stress in grasses. *Frontiers in Microbiology*, 10, artículo 2106. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02106>
- Joshi, R., & Chinnusamy, V. (2014). Chapter 12 - Antioxidant enzymes: Defense against high temperature stress. En P. Ahmad (ed.), *Oxidative damage to plants: Antioxidant networks and signaling* (pp. 369-396). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00012-5>
- Kamran, M., Parveen, A., Ahmar, S., Malik, Z., Hussain, S., Chattha, M. S., Saleem, M. H., Adil, M., Heidari, P., & Chen, J.-T. (2020). An overview of hazardous impacts of soil salinity in crops, tolerance mechanisms, and amelioration through selenium supplementation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), artículo 148. <https://doi.org/10.3390/ijms21010148>
- Kasim, W. A., Osman, M. E., Omar, M. N., Abd El-Daim, I. A., Bejai, S., & Meijer, J. (2013). Control of drought stress in wheat using plant-growth-promoting bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(1), 122-130. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9283-7>
- Kavamura, V. N., & de Melo, I. S. (2014). Effects of different osmolarities on bacterial biofilm formation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 627-631. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200034>

- Kavamura, V. N., Santos, S. N., da Silva, J. L., Parma, M. M., Ávila, L. A., Visconti, A., Zucchi, T. D., Taketani, R. G., Andreote, F. D., & de Melo, I. S. (2013). Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research*, *168*(4), 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>
- Khan, M. A., Asaf, S., Khan, A. L., Adhikari, A., Jan, R., Ali, S., Imran, M., Kim, K.-M., & Lee, I.-J. (2020). Plant growth-promoting endophytic bacteria augment growth and salinity tolerance in rice plants. *Plant Biology*, *22*(5), 850-862. <https://doi.org/10.1111/plb.13124>
- Khan, N., & Bano, A. (2019). Exopolysaccharide producing rhizobacteria and their impact on growth and drought tolerance of wheat grown under rainfed conditions. *PLoS ONE*, *14*(9), artículo e0222302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222302>
- Khan, W.-u.-D., Tanveer, M., Shaukat, R., Ali, M., & Pirdad, F. (2020). An overview of salinity tolerance mechanism in plants. En M. Hasanuzzaman, & M. Tanveer (eds.), *Salt and drought stress tolerance in plants: Signaling networks and adaptive mechanisms* (pp. 1-16). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40277-8_1
- Khan, Z., Rho, H., Firrincieli, A., Hung, S. H., Luna, V., Masciarelli, O., Kim, S.-H., & Doty, S. L. (2016). Growth enhancement and drought tolerance of hybrid poplar upon inoculation with endophyte consortia. *Current Plant Biology*, *6*, 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2016.08.001>
- Khanna, K., Jamwal, V. L., Sharma, A., Gandhi, S. G., Ohri, P., Bhardwaj, R., Al-Huqail, A. A., Siddiqui, M. H., Ali, H. M., & Ahmad, P. (2019). Supplementation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) alleviates cadmium toxicity in *Solanum lycopersicum* by modulating the expression of secondary metabolites. *Chemosphere*, *230*, 628-639. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.072>
- Kim, Y.-C., Glick, B. R., Bashan, Y., & Ryu, C.-M. (2012). Enhancement of plant drought tolerance by microbes. En R. Aroca (ed.), *Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features* (pp. 383-413). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0_15
- Kole, C., Michler, C., Abbott, A. G., & Hall, T. C. (2010). *Transgenic crop plants. Volume 2: Utilization and biosafety*. Springer.
- Kong, Z., & Glick, B. R. (2017). Chapter Two - The role of plant growth-promoting bacteria in metal phytoremediation. En R. K. Poole (ed.), *Advances in microbial physiology* (vol. 71, pp. 97-132). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.04.001>
- Konkolewska, A., Piechalak, A., Ciszewska, L., Antos-Krzemińska, N., Skrzypczak, T., Hanć, A., Sitko, K., Małkowski, E., Baratkiewicz, D., & Matecka, A. (2020). Combined use of companion planting and PGPR for the assisted phytoextraction of trace metals (Zn, Pb, Cd). *Environmental Science and Pollution Research*, *27*, 13.809-13.825. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07885-3>
- Lazar, T. (2003). *Plant physiology*. 3rd edn [reseña]. *Annals of Botany*, *91*(6), 750-751. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg079>
- Liu, J. L., Xie, B. M., Shi, X. H., Ma, J. M., & Guo, C. H. (2015). Effects of two plant growth-promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase on oat growth in petroleum-contaminated soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *12*(12), 3.887-3.894. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0798-x>
- Loupassaki, M. H., Chartzoulakis, K. S., Digalaki, N. B., & Androulakis, I. I. (2002). Effects of salt stress on concentration of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, and sodium in leaves, shoots, and roots of six olive cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, *25*(11), 2.457-2.482. <https://doi.org/10.1081/PLN-120014707>
- Ma, Y., Oliveira, R. S., Wu, L., Luo, Y., Rajkumar, M., Rocha, I., & Freitas, H. (2015). Inoculation with metal-mobilizing plant-growth-promoting rhizobacterium *Bacillus* sp. SC2b and its role in rhizoremediation. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *78*(13-14), 931-944. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1051205>
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *444*(2), 139-158. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.018>
- Mehler, A. H. (1951). Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *34*(2), 339-351. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(51\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(51)90012-4)
- Miransari, M. (ed.). (2014). *Use of microbes for the alleviation of soil stresses. Volume 1*. Springer.
- Moreno-Galván, A., Romero-Perdomo, F. A., Estrada-Bonilla, G., Meneses, C. H. S. G., & Bonilla, R. R. (2020). Dry-Caribbean *Bacillus* spp. strains ameliorate drought stress in maize by a strain-specific antioxidant response modulation. *Microorganisms*, *8*(6), artículo 823. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060823>
- Moreno-Galván, A. E., Cortés-Patiño, S., Romero-Perdomo, F., Uribe-Vélez, D., Bashan, Y., & Bonilla, R. R. (2020). Proline accumulation and glutathione reductase activity induced by drought-tolerant rhizobacteria as potential mechanisms to alleviate drought stress in Guinea grass. *Applied Soil Ecology*, *147*, artículo 103367. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103367>
- Moutia, J.-F. Y., Saumtally, S., Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2010). Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. *Plant and Soil*, *337*(1), 233-242. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0519-7>
- Müller, M., & Munné-Bosch, S. (2015). Ethylene response factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiology*, *169*(1), 32-41. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00677>
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, *25*(2), 239-250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, *59*(1), 651-681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Nadeem, S. M., Zahir, Z. A., Naveed, M., & Arshad, M. (2007). Preliminary investigations on inducing salt tolerance in maize

- through inoculation with rhizobacteria containing Acc deaminase activity. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(10), 1.141-1.149. <https://doi.org/10.1139/W07-081>
- Naseem, H., & Bano, A. (2014). Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 689-701. <https://doi.org/10.1080/17429145.2014.902125>
- Naveed, M., Mitter, B., Reichenauer, T. G., Wiecek, K., & Sessitsch, A. (2014). Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. *Environmental and Experimental Botany*, 97, 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.014>
- Negrão, S., Schmöckel, S. M., & Tester, M. (2016). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany*, 119(1), 1-11. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw191>
- Ngumbi, E., & Klopper, J. (2016). Bacterial-mediated drought tolerance: Current and future prospects. *Applied Soil Ecology*, 105, 109-125. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.009>
- Noctor, G., Mhamdi, A., & Foyer, C. H. (2014). The roles of reactive oxygen metabolism in drought: Not so cut and dried. *Plant Physiology*, 164(4), 1.636-1.648. <https://doi.org/10.1104/pp.113.233478>
- Noctor, G., Mhamdi, A., & Foyer, C. H. (2016). Oxidative stress and antioxidative systems: Recipes for successful data collection and interpretation. *Plant, Cell & Environment*, 39(5), 1.140-1.160. <https://doi.org/10.1111/pce.12726>
- Noctor, G., Reichheld, J.-P., & Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 80, 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2017.07.013>
- Numan, M., Bashir, S., Khan, Y., Mumtaz, R., Shinwari, Z. K., Khan, A. L., Khan, A., & Al-Harrasi, A. (2018). Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. *Microbiological Research*, 209, 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.003>
- Orozco-Mosqueda, M. del C., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2020). Acc deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. *Microbiological Research*, 235, artículo 126439. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126439>
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L.-S. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5, artículo 86. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00086>
- Pardo, J. M., & Rubio, F. (2011). Na⁺ and K⁺ transporters in plant signaling. En M. Geisler, & K. Venema (eds.), *Transporters and pumps in plant signaling* (pp. 65-98). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14369-4_3
- Qin, Y., Druzhinina, I. S., Pan, X., & Yuan, Z. (2016). Microbially mediated plant salt tolerance and microbiome-based solutions for saline agriculture. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1.245-1.259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.005>
- Rangel de Souza, A. L. S., De Souza, S. A., De Oliveira, M. V. V., Ferraz, T. M., Figueiredo, F. A. M. M. A., Da Silva, N. D., Rangel, P. L., Panisset, C. R. S., Olivares, F. L., Campostrini, E., & De Souza Filho, G. A. (2016). Endophytic colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion, plant physiology, and activation of plant defense. *Plant and Soil*, 399(1), 257-270. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2672-5>
- Riemann, M., Dhakarey, R., Hazman, M., Miro, B., Kohli, A., & Nick, P. (2015). Exploring jasmonates in the hormonal network of drought and salinity responses. *Frontiers in Plant Science*, 6, artículo 1077. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01077>
- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61, 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.01.006>
- Rolli, E., Marasco, R., Vigani, G., Ettoumi, B., Mapelli, F., Deangelis, M. L., Gandolfi, C., Casati, E., Previtali, F., Gerbino, R., Pierotti, Cei, F., Borin, S., Sorlini, C., Zocchi, G., & Daffonchio, D. (2015). Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environmental Microbiology*, 17(2), 316-331. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12439>
- Safdar, H., Amin, A., Shafiq, Y., Ali, A., Yasin, R., Shoukat, A., Hussan, M. U., & Sarwar, M. I. (2019). A review: Impact of salinity on plant growth. *Nature and Science*, 17(1), 34-40. https://www.researchgate.net/publication/330689445_Abbas_Shoukat_Maqsood_UL_Hussan_Muhammad_Ishtiaq_Sarwar_A_review_Impact_of_salinity_on_plant_growth#:~:text=Salinity%20stress%20limits%20crop%20yield,restricting%20the%20use%20of%20land.&text=Plants%20are%20affected%20by%20salt,cellular%20metabolism%2C%20and%20plant%20nutrition.
- Saikia, J., Sarma, R. K., Dhandia, R., Yadav, A., Bharali, R., Gupta, V. K., & Saikia, R. (2018). Alleviation of drought stress in pulse crops with Acc deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. *Scientific Reports*, 8(1), artículo 3560. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21921-w>
- Sandhya, V., Ali, S. Z., Grover, M., Reddy, G., & Venkateswarlu, B. (2010). Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regulation*, 62(1), 21-30. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9479-4>
- Sangiorgio, D., Cellini, A., Donati, I., Pastore, C., Onofrietti, C., & Spinelli, F. (2020). Facing climate change: Application of microbial biostimulants to mitigate stress in horticultural crops. *Agronomy*, 10(6), artículo 794. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060794>
- Sarkar, J., Chakraborty, B., & Chakraborty, U. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria protect wheat plants against temperature stress through antioxidant signalling and reducing chloroplast and membrane injury. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(4), 1.396-1.412. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9789-8>
- Sarma, R. K., & Saikia, R. (2014). Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21. *Plant and Soil*, 377(1-2), 111-126. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1981-9>

- Shabala, S. (2017). *Plant stress physiology*. Cabi.
- Shabala, S., & Cuin, T. A. (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 133(4), 651-669. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01008.x>
- Shabala, S., & Shabala, L. (2011). Ion transport and osmotic adjustment in plants and bacteria. *Biomolecular Concepts*, 2(5), 407-419. <https://doi.org/10.1515/BMC.2011.032>
- Shaharoon, B., Arshad, M., & Zahir, Z. A. (2006). Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Letters in Applied Microbiology*, 42(2), 155-159. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01827.x>
- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., & Pinelli, E. (2014). Heavy-metal-induced reactive oxygen species: Phytotoxicity and physicochemical changes in plants. En D. M. Whitacre (ed.), *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Volume 232 (pp. 1-44). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06746-9_1
- Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S. K., Sidhu, G. P. S., Bali, A. S., Handa, N., Kapoor, D., Bhardwaj, R., & Zheng, B. (2019). Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules*, 9(7), artículo 285. <https://doi.org/10.3390/biom9070285>
- Sharma, P., & Dubey, R. S. (2007). Involvement of oxidative stress and role of antioxidative defense system in growing rice seedlings exposed to toxic concentrations of aluminum. *Plant Cell Reports*, 26(11), 2.027-2.038. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0416-6>
- Sharma, S. S., & Dietz, K.-J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 711-726. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj073>
- Shilev, S., Babrikova, I., & Babrikov, T. (2020). Consortium of plant growth-promoting bacteria improves spinach (*Spinacea oleracea* L.) growth under heavy metal stress conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95(4), 932-939. <https://doi.org/10.1002/jctb.6077>
- Shrivastava, P., & Kumar, R. (2015). Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.12.001>
- Shukla, P. S., Agarwal, P. K., & Jha, B. (2012). Improved salinity tolerance of *Arachis hypogaea* (L.) by the interaction of halotolerant plant-growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(2), 195-206. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9231-y>
- Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H., & Basalah, M. O. (2011). Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma*, 248(3), 447-455. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0206-9>
- Silva, R., Figueiras, L., Santos, B., Coelho, M., Silva, M., Estrada-Bonilla, G., Vidal, M., Baldani, J. I., & Meneses, C. (2020). *Gluconacetobacter diazotrophicus* changes the molecular mechanisms of root development in *Oryza sativa* L. growing under water stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), artículo 333. <https://doi.org/10.3390/ijms21010333>
- Singh, A., & Prasad, S. M. (2011). Reduction of heavy metal load in food chain: Technology assessment. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10(3), artículo 199. <https://doi.org/10.1007/s11157-011-9241-z>
- Singh, A., Sharma, R. K., Agrawal, M., & Marshall, F. M. (2010). Health risk assessment of heavy metals via dietary intake of foodstuffs from the wastewater irrigated site of a dry tropical area of India. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 611-619. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.041>
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6, artículo 1143. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>
- Stearns, J. C., Shah, S., Greenberg, B. M., Dixon, D. G., & Glick, B. R. (2005). Tolerance of transgenic canola expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase to growth inhibition by nickel. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(7), 701-708. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.05.010>
- Sultana, S., Paul, S. C., Parveen, S., Alam, S., Rahman, N., Jannat, B., Hoque, S., Rahman, M. T., & Karim, M. M. (2019). Isolation and identification of salt-tolerant plant-growth-promoting rhizobacteria and their application for rice cultivation under salt stress. *Canadian Journal of Microbiology*, 66(2), 144-160. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0323>
- Tanji, K. K., & Wallender, W. W. (2012). Nature and extent of agricultural salinity and sodicity. En W. W. Wallender, & K. K. Tanji (eds.), *Agricultural salinity assessment management* (pp. 1-25). American Society of Civil Engineers.
- Theocharis, A., Bordiec, S., Fernandez, O., Paquis, S., Dhondt-Cordelier, S., Baillieul, F., Clément, C., & Barka, E. A. (2011). *Burkholderia phytofirmans* PsJN primes *Vitis vinifera* L. and confers a better tolerance to low nonfreezing temperatures. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(2), 241-249. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-11-0124>
- Timmusk, S., Abd El-Daim, I. A., Copolovici, L., Tanilas, T., Kännaste, A., Behers, L., Nevo, E., Seisenbaeva, G., Stenström, E., & Niinemets, Ü. (2014). Drought-tolerance of wheat improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: Enhanced biomass production and reduced emissions of stress volatiles. *PLoS ONE*, 9(5), artículo e96086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096086>
- Timmusk, S., & Nevo, E. (2011). Plant root associated biofilms: Perspectives for natural product mining. En D. K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in agrobiolgy: Plant nutrient management* (pp. 285-300). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21061-7_12

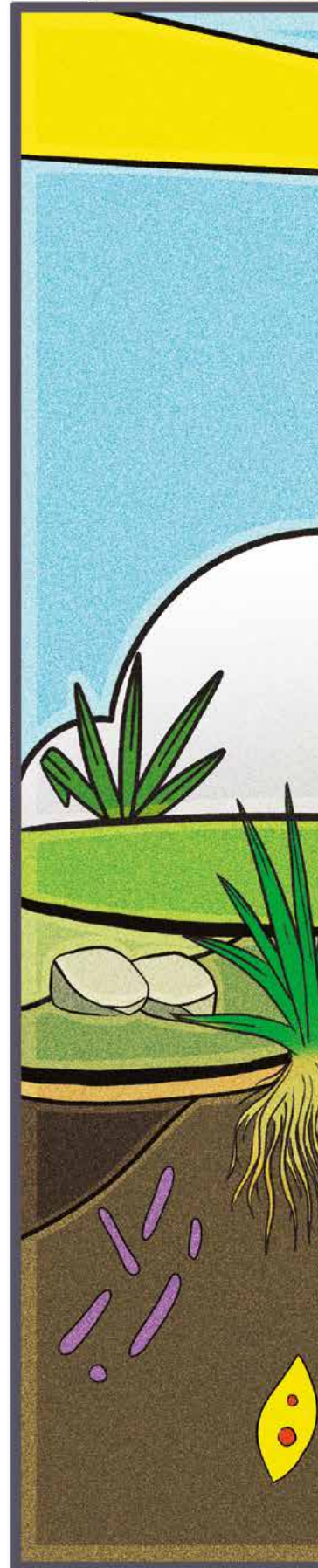
- Tiwari, G., Duraivadivel, P., Sharma, S., & P. H. (2018). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing beneficial rhizobacteria ameliorate the biomass characters of *Panicum maximum* Jacq. by mitigating drought and salt stress. *Scientific Reports*, 8(1), artículo 17513. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35565-3>
- Ullah, A., Nisar, M., Ali, H., Hazrat, A., Hayat, K., Keerio, A. A., Ihsan, M., Laiq, M., Ullah, S., Fahad, S., Khan, A., Khan, A. H., Akbar, A., & Yang, X. (2019). Drought tolerance improvement in plants: An endophytic bacterial approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7.385-7.397. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10045-4>
- Ullah, S., & Bano, A. (2015). Isolation of plant-growth-promoting rhizobacteria from rhizospheric soil of halophytes and their impact on maize (*Zea mays* L.) under induced soil salinity. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(4), 1-7. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0668>
- Upadhyay, S. K., Singh, J. S., & Singh, D. P. (2011). Exopolysaccharide-producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. *Pedosphere*, 21(2), 214-222. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(11\)60120-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(11)60120-3)
- Urban, M. C., Bocedi, G., Hendry, A. P., Mihoub, J. B., Pe'er, G., Singer, A., Bridle, J. R., Crozier, L. G., De Meester, L., Godsoe, W., Gonzalez, A., Hellmann, J. J., Holt, R. D., Huth, A., Johst, K., Krug, C. B., Leadley, P. W., Palmer, S. C. F., Pantel, J. H., ... Travis, J. M. (2016). Improving the forecast for biodiversity under climate change. *Science*, 353(6304). <https://doi.org/10.1126/science.aad8466>
- Vargas, L., Santa Brígida, A. B., Mota Filho, J. P., de Carvalho, T. G., Rojas, C. A., Vanechoutte, D., Van Bel, M., Farrinelli, L., Ferreira, P. C. G., Vandepoele, K., & Hemerly, A. S. (2014). Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: A transcriptomic view of hormone pathways. *PLoS ONE*, 9(12), artículo e114744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114744>
- Ventrella, A., Catucci, L., Pitetska, E., Piletsky, S., & Agostiano, A. (2009). Interactions between heavy metals and photosynthetic materials studied by optical techniques. *Bioelectrochemistry*, 77(1), 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.05.002>
- Viehweger, K. (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55(1), artículo 35. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-35>
- Vurukonda, S. S. K. P., Vardharajula, S., Shrivastava, M., & SkZ, A. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, 184, 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>
- Wang, F., Cui, X., Sun, Y., & Dong, C.-H. (2013). Ethylene signaling and regulation in plant growth and stress responses. *Plant Cell Reports*, 32(7), 1.099-1.109. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1421-6>
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>
- Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*, 4(3), 162-176. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.010>
- Waśkiewicz, A., Beszterda, M., & Goliński, P. (2014). Chapter 7 - Nonenzymatic antioxidants in plants. En P. Ahmad (ed.), *Oxidative damage to plants: Antioxidant networks and signaling* (pp. 201-234). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00007-1>
- Wilkinson, S., Kudoyarova, G. R., Veselov, D. S., Arkhipova, T. N., & Davies, W. J. (2012). Plant hormone interactions: Innovative targets for crop breeding and management. *Journal of Experimental Botany*, 63(9), 3.499-3.509. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers148>
- Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C.-M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14(1), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.004>
- Yegorenkova, I. V., Konnova, S. A., Sachuk, V. N., & Ignatov, V. V. (2001). *Azospirillum brasilense* colonisation of wheat roots and the role of lectin-carbohydrate interactions in bacterial adsorption and root-hair deformation. *Plant and Soil*, 231(2), 275-282. <https://doi.org/10.1023/A:1010340700694>
- Zhang, H., Kim, M.-S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M. A., Ryu, C.-M., Allen, R., Melo, I. S., & Paré, P. W. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*, 226(4), artículo 839. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0530-2>
- Żróbek-Sokolnik, A. (2012). Temperature stress and responses of plants. En P. Ahmad, & M. N. V. Prasad (eds.), *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change* (pp. 113-134). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4_5

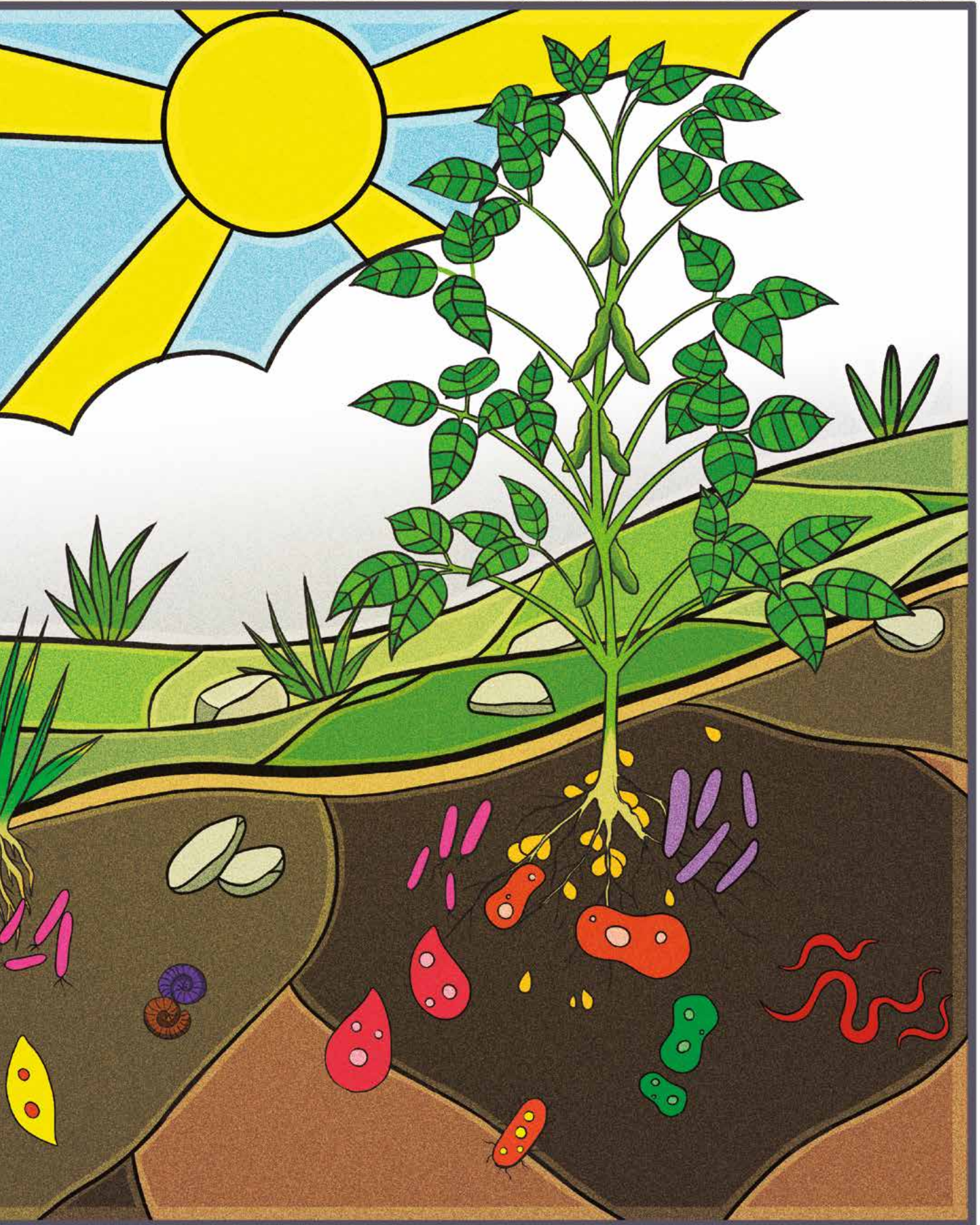
5

Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por rizobios simbióticos y asimbióticos

Blanca Estela Romero López¹
Getzabeth González Gutiérrez¹

1. Grupo de Microbiología Ambiental, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México.





Introducción

La necesidad de realizar prácticas agrícolas y forestales sustentables, así como de resolver problemas ambientales de degradación y contaminación de suelos, ha incentivado el interés por expandir el aprovechamiento de los rizobios, particularmente su versatilidad fisiológica y capacidad de establecer relaciones con las plantas.

Los rizobios son un grupo complejo de bacterias Gram-negativas que viven en el suelo como saprófitos, en asociación con plantas o en simbiosis (Benhizia et al., 2004; Rosenblueth et al., 2018). Estas bacterias son bien conocidas por establecer una relación simbiótica con plantas de la familia Fabaceae, conocidas como *leguminosas*, a las que proveen de compuestos nitrogenados mediante la fijación de nitrógeno atmosférico (N_2), a cambio de fuentes de carbono y otros nutrientes. Las primeras descripciones de los rizobios fueron realizadas por Beijerinck y Frank a finales del siglo XIX, cuando se descubrió que estas bacterias eran responsables de la formación de nódulos y de la fijación de nitrógeno, función previamente asignada a las leguminosas. Las bacterias simbióticas nodulantes fueron inicialmente clasificadas en el género *Rhizobium*, pero posteriormente se fueron agregando otros géneros, designados de acuerdo con su velocidad de crecimiento y especificidad con el hospedador (Das et al., 2017). La clasificación taxonómica de los rizobios es muy dinámica, ya que a los rasgos tradicionales de morfología celular, los rasgos bioquímicos y la especificidad de hospedadores se han ido sumando los atributos fisiológicos y genéticos (Latif et al., 2013). Actualmente, la mayoría de los rizobios pertenecen a la subclase Alfa-Proteobacteria, en la cual se estima una diversidad aproximada de 40 géneros, entre los cuales se destacan los siguientes: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Carvalho et al., 2010; Laguerre et al., 2001; Latif et al., 2013; Sessitsch et al., 2002), además de *Devosia* y *Methylobacterium* (Balachandar et al., 2007; Senthilkumar et al., 2009). En las últimas dos décadas se han reportado algunos representantes de la subclase Beta-Proteobacteria (por ejemplo, *Burkholderia*, *Cupriavidus* y *Herbaspirillum*) como bacterias atípicas que también inducen la formación de nódulos (Balachandar et al., 2007; Bontemps et al., 2010; Das et al., 2017), y también se han reportado miembros de la subclase Gama-Proteobacteria como ocupantes de nódulos, específicamente del género *Pantoea*, así como de los órdenes Enterobacteriales y Pseudomonadales (Benhizia et al., 2004; Peix et al., 2015).

Los rizobios presentan una variedad de estrategias y estilos de vida que les permiten asociarse a un amplio espectro de familias botánicas y, así, producir efectos diversos (Antoun et al., 1998; Mehboob et al., 2012; Van Loon, 2007). Además de la fijación simbiótica de nitrógeno, otros mecanismos que contribuyen al crecimiento vegetal están relacionados con la producción de metabolitos fitoefectivos, como fitohormonas, sideróforos, vitaminas y antibióticos, así como con la producción de otros metabolitos “fitoefectivos”, como lipoquitooligosacáridos (LCO) y exopolisacáridos (Mehboob et al., 2012), los cuales se describen brevemente en esta revisión. De acuerdo con su modo de acción, los rizobios se utilizan en diferentes aplicaciones biotecnológicas como fitoestimulantes, biofertilizantes, bioplaguicidas y rizorremediadores (Figueiredo et al., 2011).

Asociaciones simbióticas fabáceas-rizobios

Para que la simbiosis rizobio-leguminosa pueda establecerse exitosamente, se debe llevar a cabo un proceso de colonización intracelular mediado por una compleja vía de señalización molecular (Oldroyd et al., 2011). Esta señalización es tan precisa que les permite a las leguminosas seleccionar únicamente a ciertos rizobios dentro de la comunidad bacteriana (Figura 5.1a). El mecanismo de interacción bacteria-planta requiere de dos procesos esenciales que se encuentran finamente coordinados: formación del nódulo e infección (Figura 5.1b). Todo el proceso inicia cuando la planta comienza a secretar en sus exudados compuestos fenólicos que atraen a los rizobios hacia la raíz (Peters & Verma, 1990). Una vez que los rizobios se encuentran cerca de los pelos radicales, la planta libera flavonoides al medio, los cuales inducen la producción, por parte de los rizobios, de Lco llamados *factores de nodulación (NodD)* (Spaink, 2000). Los factores *NodD* son reconocidos por la planta mediante receptores (*LysM*) que se encuentran en la membrana plasmática de las células de la raíz (Zipfel & Oldroyd, 2017). Mediante proteínas de adherencia, los rizobios se unen a los pelos radicales, por lo cual estos se enroscan, y así ingresan al pelo radical (Gibson et al., 2008). Durante este proceso de invasión, además de la síntesis del factor *NodD*, las bacterias requieren de la producción de exopolisacáridos y de especies reactivas de oxígeno para inducir en la planta la formación del canal de infección, y una vez alcanzan la corteza del pelo radical, los factores *NodD* promueven la división celular (Figura 5.1a). En esta división celular se dispara un mecanismo de señalización en el cual participan las fitohormonas citoquininas y auxinas, para dar lugar a la organogénesis del nódulo (Zipfel & Oldroyd, 2017).

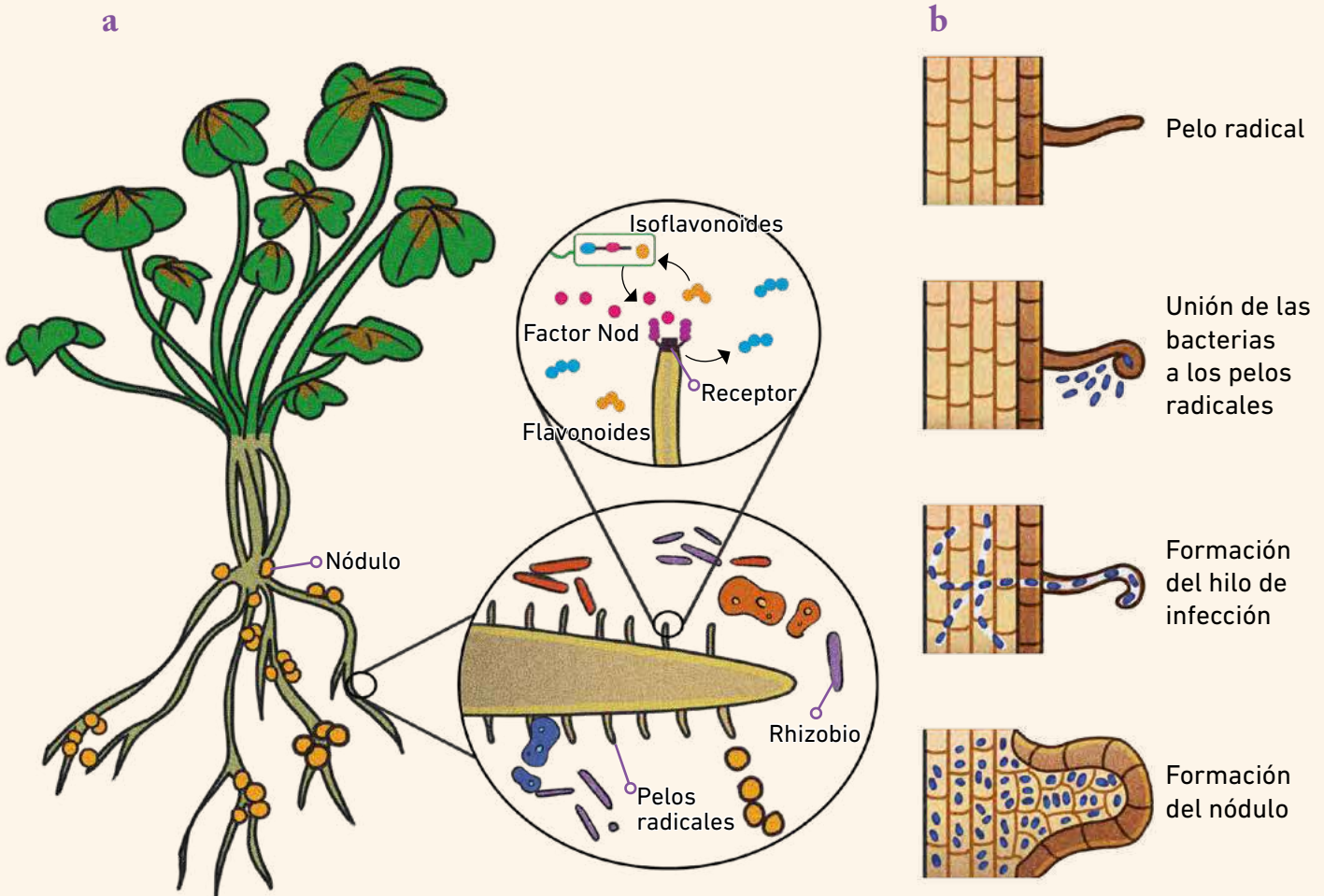
El mecanismo general de infección de rizobios se da a través de canales de infección. Una vez que estos canales comienzan a formarse, las bacterias son transportadas hacia el citoplasma de las células hospederas a través del canal de infección por un mecanismo de endocitosis (Bianco, 2014). Cada célula es envuelta por una membrana peribacteroidal (MPB), dando lugar a su forma simbiótica, llamada *bacteroide*, el cual, bajo condiciones microaerófilas dentro del nódulo, es capaz de realizar enzimáticamente la



transformación de N_2 en formas biológicamente activas de nitrógeno (Figura 5.1b). Esta transformación es llevada a cabo por la enzima nitrogenasa, que está conformada por dos unidades proteicas: una proteína homodimérica que contiene Fe y es codificada por *nifH*, y una proteína tetramérica que contiene Fe y Mo (y en algunos casos V), codificadas por los genes *nifD* y *nifK*, respectivamente (Raymond et al., 2004). Este complejo enzimático es la unidad central de fijación de nitrógeno en todas las bacterias diazotróficas conocidas a la fecha. En esta relación simbiótica, la planta provee a los bacteroides los nutrientes y la energía necesarios para llevar a cabo la fijación de nitrógeno. Compuestos como succinato, malato y fumarato son transportados a través de la membrana peribacteroidal hacia el interior de los bacteroides.

Estos compuestos son utilizados para la producción de ATP y posteriormente son convertidos en piruvato, que actúa como fuente de electrones para la reducción de N_2 a amonio, el cual puede ser directamente asimilado por las plantas (Poole et al., 2018).

- **Figura 5.1.** Procesos que dan lugar a la formación de nódulos por parte de rizobios en leguminosas. *a.* Sistema de señalización del proceso de colonización de rizobios en leguminosas; *b.* Proceso general de infección y formación del nódulo.
Fuente: Elaboración propia con base en Clúa et al. (2018)





Asociaciones no simbióticas

En las últimas dos décadas se han estudiado progresivamente las interacciones asociativas no específicas entre diversas plantas y rizobios. En plantas distintas a las leguminosas, los rizobios pueden colonizar exitosamente diferentes órganos y tejidos, como las partes aéreas de la filósfera (hojas, tallos, partes florales y frutos), los nichos rizosféricos (zona de influencia de la raíz o el rizoplaneo) y la endosfera, es decir, el interior de diversos tejidos vegetales (Chi et al., 2005; Schloter et al., 1997). De hecho, en especies no leguminosas, los rizobios colonizan de manera endofítica, es decir, en el interior de los tejidos, sin ocasionarles enfermedad a las plantas (Sessitsch et al., 2002), o como rizobacterias. Entre la amplia diversidad de especies vegetales que son colonizadas por estos microorganismos, se encuentran el arroz, la avena, el trigo, el maíz, el algodón, la cebada, la canola, la lechuga, la mostaza, el sorgo, el pasto Sudán, el mijo perla, el girasol, la oca, la papa, el tabaco, el nabo y el espárrago (Antoun et al., 1998; Biswas et al., 2009; Glick, 2012, 2014; Mehboob et al., 2012). Aunque los rizobios pueden colonizar de manera abundante especies vegetales no leguminosas, solo en casos excepcionales se forman estructuras semejantes a nódulos o tejidos hipertróficos, cuya tasa de fijación de nitrógeno es limitada (Senthilkumar et al., 2009; Trinick & Hadobas, 1995). Con respecto al efecto observado en las plantas, se distinguen tres tipos de interacciones entre rizobios y no leguminosas: 1) las positivas, que promueven el crecimiento y rendimiento de las plantas; 2) las débiles o negativas, que tienen un

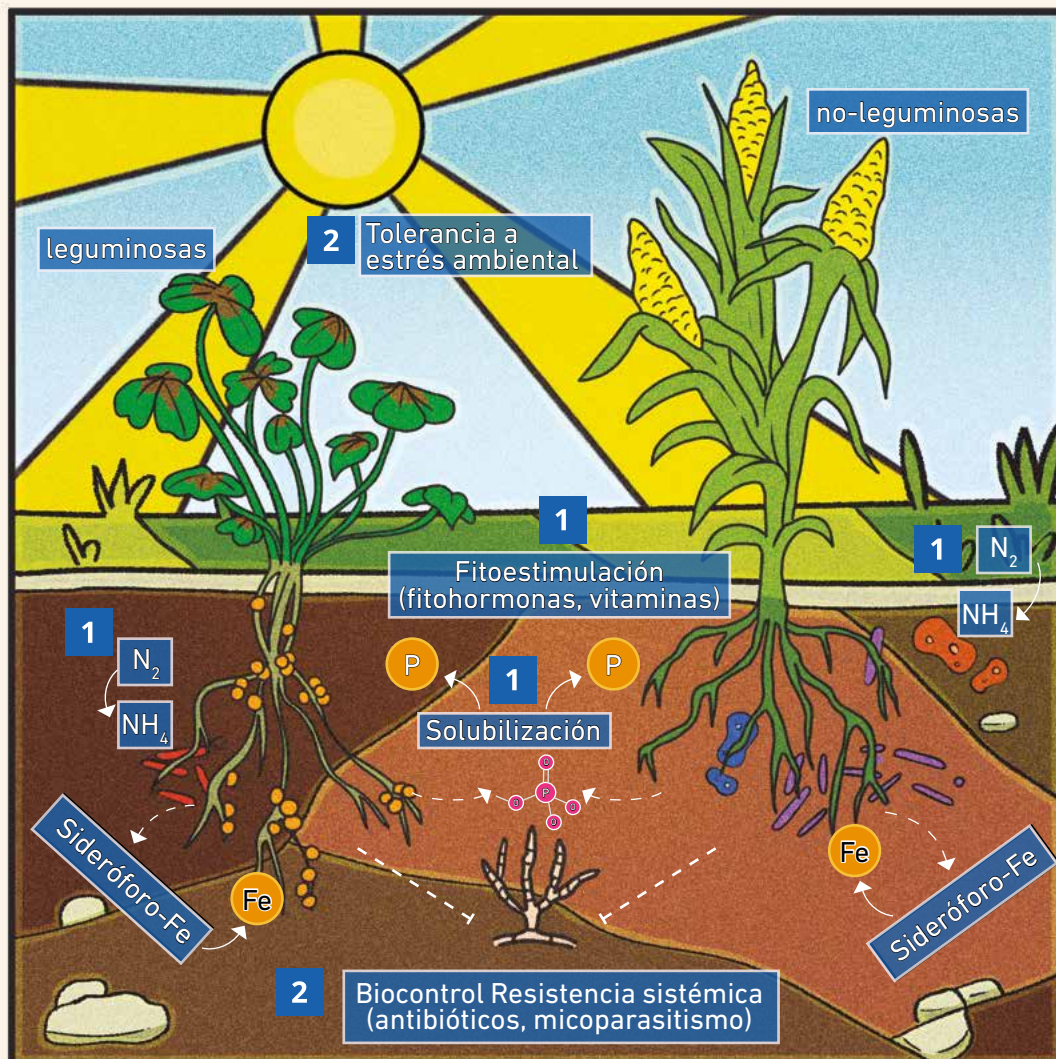
mínimo o nulo efecto en el crecimiento de las plantas, y 3) las neutras o sin efecto, que no producen ni incremento ni disminución en el crecimiento (Perrine-Walker et al., 2007). En las interacciones positivas se ha observado un incremento en la germinación, la tasa de elongación radicular, el vigor de las plántulas, el crecimiento del tallo, el área foliar, la absorción de nutrientes, la actividad fotosintética, el contenido de clorofila, la conductancia estomática, la tolerancia al estrés abiótico, el rendimiento y el contenido de proteína (Cassán et al., 2009; Chi et al., 2005; Hussain et al., 2016; McInroy & Kloepper, 1995; Shakhawat Hossain & Mårtensson, 2008). En ciertas condiciones de tiempo y lugar, algunas interacciones rizobios-no leguminosas producen efectos insignificantes en el crecimiento y rendimiento de las plantas inoculadas, y en otras, incluso se producen efectos negativos. La evidencia indica que ciertos efectos negativos están relacionados con la sobreproducción de compuestos de tipo fitohormonas (por ejemplo, ácido indolacético) y HCN (cianuro de hidrógeno) por parte de los inoculantes rizobiales, así como con la acumulación de ácido nítrico dentro de las raíces (Antoun et al., 1998; Mehboob et al., 2009; Perrine-Walker et al., 2007). Actualmente, se sabe que el tipo y la intensidad del efecto que tienen los rizobios en plantas distintas a las leguminosas dependen del tipo de cultivo, la bacteria inoculada, las condiciones de cultivo, la microbiota nativa y el suelo, entre otros factores ecológicos (Antoun et al., 1998; Hussain et al., 2016; Mehboob et al., 2011).

Mecanismos de promoción del crecimiento de los rizobios

Los rizobios, simbióticos o no simbióticos, al igual que otras rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, pueden mejorar el crecimiento o desempeño fisiológico de las plantas a través de modos de acción directos o indirectos. Los mecanismos de acción directos promueven el mejoramiento del mecanismo de nutrición (fijación de nitrógeno, solubilización

de fosfatos, quelación de hierro y producción de fitohormonas), mientras que los indirectos favorecen el desempeño de las plantas en cuanto a la tolerancia a factores bióticos o abióticos (supresión de organismos patógenos e inducción de resistencia tanto a patógenos como a estreses ambientales) (Figura 5.2) (Glick, 2012; Gopalakrishnan et al., 2015; Van Loon, 2007).

- **Figura 5.2.** Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por rizobios simbióticos (con leguminosas) y no simbióticos (con no leguminosas). 1. Mecanismos directos; 2. Mecanismos indirectos.
Fuente: Elaboración propia



Mecanismos directos

Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas, debido a que es indispensable en la síntesis de ácidos nucleicos, enzimas, proteínas y clorofila (Lazar, 2003). Aunque el 78% del aire atmosférico es N, no se encuentra en forma disponible para las plantas, de manera que estas lo obtienen a través de síntesis industrial, procesos biológicos y, en menor grado, deposiciones atmosféricas de compuestos nitrogenados oxidados o reducidos (Lassaletta et al., 2014). Se estima que la fijación biológica contribuye con un 54%-65% del N utilizado en la agricultura (Peoples et al., 2009). El proceso de fijación biológica en leguminosas requiere un alto gasto de energía, por parte de las plantas, para el mantenimiento de la relación simbiótica, y por parte de las bacterias, para ejecutar la serie de reacciones en cadena que reducen el nitrógeno N₂ a NH₃ (Gopalakrishnan et al., 2015; Laranjo et al., 2014). Tanto la nodulación como la efectividad de la fijación simbiótica pueden ser limitadas por diversos factores que en general limitan la supervivencia, competencia e infectividad de los rizobios, entre los cuales están la deficiencia hídrica en el suelo, el estrés osmótico, temperaturas extremas, la salinidad, la acidez o alcalinidad de los suelos, la deficiencia de nutrientes y la sobredosis de fertilizantes o plaguicidas (Gopalakrishnan et al., 2015; Zahran, 2001).

Como se ha explicado anteriormente, los esfuerzos por extrapolar de manera eficiente la fijación de nitrógeno por rizobios a plantas no leguminosas, especialmente cereales, han tenido una reducida aplicación práctica debido a efectos insignificantes o contrastantes en este intento (Hussain et al., 2016; Rosenblueth et al., 2018; Sessitsch et al., 2002). En muchos casos, no hay evidencia contundente de la fijación de nitrógeno como el principal mecanismo de promoción del crecimiento; sin embargo, diferentes estudios sobre inoculación con rizobios en cereales, principalmente maíz y arroz, reportan, además de una colonización efectiva, efectos benéficos que incluyen incremento en la absorción de nutrientes, mayor eficiencia fotosintética, así como mayor rendimiento y contenido de nitrógeno en grano (Chi et al., 2005;

Hussain et al., 2016). En la búsqueda de diazótrofos naturalmente asociados a cereales, se ha reportado la ocurrencia común de rizobios afiliados a los grupos Alfa- y Beta-Proteobacteria, como *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*, a partir de secuencias de *nifH* en ADN en la rizósfera y en diferentes tejidos de maíz (Roesch et al., 2008), en macerados de arroz (Engelhard et al., 2000) y en rizósfera de sorgo (Rodrigues Coelho et al., 2008). Análisis moleculares funcionales mediante aproximaciones de transcriptómica y proteómica han mostrado que ciertos grupos de diazótrofos de arroz, específicamente *Bradyrhizobium*, son activos a fijación de nitrógeno en asociación con la planta (Rosenblueth et al., 2018). De manera similar, en un estudio con plantas de caña de azúcar cultivadas en maceta, Thaweenut et al. (2011) sugieren que la proliferación de diazótrofas, entre ellas *Bradyrhizobium* sp. y *Azorhizobium caulinodans*, está relacionada con la expresión abundante de genes *nifH* y la tasa de fijación de nitrógeno analizada por dilución isotópica. Además de las bacterias asociadas que proveen naturalmente de nitrógeno a las plantas, las estrategias actuales involucran la modificación genética, especialmente de gramíneas, a través aproximaciones dirigidas a 1) transferir los genes de la nitrogenasa, 2) desarrollar la simbiosis por nodulación y, alternativamente, 3) desarrollar cereales que promuevan el crecimiento de diazótrofas (véase Rosenblueth et al., 2018).

Solubilización de fósforo

Después del nitrógeno, el fósforo es el segundo nutriente más importante para las plantas. En el suelo, el fósforo se encuentra en forma orgánica (ligada) o inorgánica (ligada, fijada o disponible), en concentraciones que dependen principalmente de la composición del material parental; sin embargo, su disponibilidad es influenciada por las características fisicoquímicas del suelo (especialmente el pH y la materia orgánica), de la exudación de las raíces y de la microbiota disponible (Gopalakrishnan et al., 2015). Los rizobios pueden liberar el fósforo ligado a formas orgánicas a través de la acción de fosfomonoesterasas y fitasas (mineralización), o por solubilización de formas inorgánicas mediante la liberación de ácidos como 2-ceto-glucónico, glutámico, sulfúrico, nítrico y carbónico (Afzal & Bano, 2008; Alikhani et al., 2007; Makoudi et al., 2018), y de esta manera incrementan

la absorción de P y promueven el crecimiento de las plantas. Diversos rizobios exhiben la capacidad de mineralizar o solubilizar el P en simbiosis con leguminosas o asociadas endofíticamente con otras especies; entre estos rizobios se encuentran *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti*, *Mesorhizobium mediterraneum*, *Bradyrhizobium* sp. y *Bradyrhizobium japonicum* (Afzal & Bano, 2008; Antoun et al., 1998; Makoudi et al., 2018; Tao et al., 2008; Vessey, 2003; Wang et al., 2006).

Formación de sideróforos: disponibilidad de hierro

El hierro es un micronutriente necesario para el óptimo desarrollo de las plantas. Específicamente en la relación simbiótica rizobios-leguminosas, el hierro es necesario para que la planta pueda sintetizar proteínas como la leghemoglobina (indispensable para mantener bajas las concentraciones de oxígeno dentro del nódulo), y en los bacteroides es necesario para la síntesis de nitrogenasas, citocromos, ferredoxinas e hidrogenasas (Brear et al., 2013; Guerinot, 1991). Aunque el hierro es un

micronutriente abundante en los suelos, normalmente se encuentra en estado insoluble, lo cual impide que pueda ser aprovechado por la mayoría de los organismos (Ahemad & Kibret, 2014). En este sentido, algunos microorganismos han desarrollado estrategias para la producción de compuestos de bajo peso molecular llamados *sideróforos*, que son capaces de unirse al hierro insoluble (quelante) y, así, facilitar su transporte al interior de la célula. Las plantas utilizan el hierro proveniente de los sideróforos de distintas maneras, ya sea incorporándolo directamente desde el sideróforo, utilizando quelantes para liberar el hierro soluble o bien mediante una reacción de intercambio de ligandos (Schmidt, 1999). Se ha observado que los sideróforos pueden actuar como fuente importante de hierro en plantas con deficiencias de este nutriente (Radzki et al., 2013), por lo que los rizobios pueden asistir a las plantas en su adquisición. Algunas especies reconocidas por la producción de sideróforos son *R. meliloti*, *Rhizobium tropici*, *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *Sinorhizobium meliloti* y *Bradyrhizobium* sp. (Antoun et al., 1998; Chabot et al., 1996; Gopalakrishnan et al., 2015).



Producción de fitohormonas

Las fitohormonas son mensajeros químicos producidos en una célula o tejido que modulan procesos celulares en otra parte de la planta, por lo que requieren concentraciones micromolares más bajas (Lazar, 2003). Los rizobios, como la mayoría de las bacterias rizosféricas, pueden inducir el crecimiento vegetal a través de la producción de fitohormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas y ácido abscísico, y la producción de la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa (ACC- desaminasa) (Mehboob et al., 2012). Los principales efectos de las hormonas producidas por rizobios inoculados en semillas o raíces de plantas no leguminosas son mejoras en el desempeño fisiológico de las plantas, como una mayor eficiencia fotosintética, un mejor uso del agua y un aumento en la absorción de nutrientes, los cuales resultan en un incremento de la productividad de los cultivos (Chi et al., 2005; Hussain et al., 2016; Mehboob et al., 2012), mientras que, en leguminosas, están mayormente relacionados con la nodulación.

Las auxinas fueron de las primeras hormonas descritas y, en conjunto con las citoquininas, difieren de otras fitohormonas en que son vitales para las plantas, ya que se utilizan de forma continua, mientras que otras fitohormonas tienen mecanismos de encendido y apagado. Las auxinas regulan procesos del desarrollo de las plantas como la elongación de tallos, la dominancia apical, la organogénesis, el desarrollo de frutos y meristemas y el crecimiento orientado, o tropismo. El ácido indolacético (AIA) es la auxina más abundante y fisiológicamente importante, ya que regula procesos de división celular y formación y diferenciación del haz vascular (Benková et al., 2003). Numerosos estudios reportan que la aplicación exógena de AIA estimula la formación de primordios de nódulos en ciertas leguminosas; sin embargo, se ha encontrado que los requerimientos de auxinas para la organogénesis de los nódulos varían entre tipos de nódulos, así como que la sensibilidad ocurre en ciertos intervalos de concentraciones (Ferguson & Mathesius, 2014; Turner et al., 2013). En la simbiosis leguminosa-rizobios, los controles locales (en el nódulo) y sistémicos (en el sistema radicular) de nodulación están regulados por el balance entre las diferentes fitohormonas. Esto se lleva a cabo a través de dos mecanismos a través de los cuales la señalización de las fitohormonas se altera durante la nodulación: 1) mediante la síntesis directa por rizobios y 2) mediante la manipulación indirecta del balance de fitohormonas en la planta desencadenado por los factores *NodD*, los cuales son un prerrequisito para la formación de nódulos (Ferguson & Mathesius, 2014). Entre los rizobios más sobresalientes por la producción de AIA se encuentran *A. caulinodans*, *B. japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium japonicum*, *R. leguminosarum*, *Rhizobium lupini*, *R. meliloti*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium trifolii* y *Sinorhizobium* spp. (Gopalakrishnan et al., 2015).

Por su parte, las citoquininas estimulan la división y el alargamiento celulares y, en algunos casos, el desarrollo de raíces y la formación de pelos radiculares (Mehboob et al., 2012).

A pesar de que se tiene reportada una gran diversidad de citoquininas de origen microbiano, hasta ahora solo se ha reconocido a los géneros Rhizobium y Methylobacterium como productores de estos compuestos (Senthilkumar et al., 2009).

Las giberelinas, representadas por el ácido giberélico, son responsables de la elongación de tallos y la expansión de hojas, pero no tienen efecto en las raíces. La aplicación de giberelinas estimula la germinación de semillas, induce la formación de frutos sin semillas e incrementa el número de botones, la expresión sexual en flores y la nodulación en leguminosas (Biswas et al., 2009). Se sabe de la producción de giberelinas por *Rhizobium* y *S. meliloti*, pero pocos estudios han mostrado evidencia del efecto específico de giberelinas producidas por rizobios inoculados en no leguminosas. En un estudio reciente, la inoculación de *Rhizobium* sp. 10268 en caña de azúcar produjo efectos positivos en la producción de brotes y el crecimiento de las plantas, probablemente a través de la producción de giberelinas (Ferreira et al., 2020).

Por su parte, el ácido abscísico (ABA) es sintetizado primordialmente en las hojas, y su producción se acentúa a bajas temperaturas y en estrés hídrico. El ABA regula la apertura y el cierre estomático y funciona como regulador del crecimiento vegetal al inhibir el crecimiento de tallos e inducir dormancia de semillas (Gopalakrishnan et al., 2015). Por algún tiempo se consideró que su efecto era inhibitorio de la formación de nódulos; sin embargo, se ha visto que su función es compleja, al ser requerido solo en algunos tejidos o en etapas fenológicas específicas, mientras que puede ser inhibitorio cuando sus concentraciones son elevadas, posiblemente ante condiciones de estrés (Ferguson & Mathesius, 2014; Turner et al., 2013).

La ACC-desaminasa, que se considera dentro de la familia de las enzimas triptófano sintasas, requiere de la vitamina B6 como cofactor para llevar a cabo

su actividad. El principal efecto del ACC es reducir los niveles de etileno producido por estrés ambiental (Glick, 2014). Las bacterias que producen AIA son capaces de producir también altos niveles de ACC, como *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *Rhizobium hedysari*, *R. japonicum*, *Rhizobium gallicum*, *B. japonicum*, *B. elkanii*, *M. loti* y *S. meliloti*. Algunos de estos rizobios se han inoculado en plantas sometidas a diferentes estreses (metales pesados, patógenos, sequía, alta radiación o salinidad), y se ha tenido como resultado una disminución en los niveles de etileno en la raíz, además de un aumento en la elongación de raíces, una mejor absorción de nutrientes, un incremento en la nodulación y un aumento en la longitud de los tallos (Glick, 2014; Gopalakrishnan et al., 2015).

Producción de otros compuestos fitoestimulantes

Otros compuestos con efecto estimulante del crecimiento vegetal en plantas no leguminosas están representados por moléculas señal producidas por rizobios como los LCO, riboflavina y lumicromo, el compuesto que deriva de la degradación de la riboflavina (Mehboob et al., 2012). Algunos géneros de rizobios con capacidad de producir estos compuestos son *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium* (Dakora et al., 2015; Yang et al., 2002). En general, estos compuestos, aplicados en concentraciones micromoleculares, como es el caso de los LCO, pueden incrementar la producción de fotosintatos y el rendimiento en granos. De manera similar, el lumicromo puede mitigar el estrés hídrico, mientras que la riboflavina tiene un efecto promotor del crecimiento vegetal vía un aumento de la respiración radicular (Dakora et al., 2015; Yang et al., 2002).



Mecanismos indirectos

Biocontrol e inducción de resistencia sistémica

Además del beneficio de la fijación de nitrógeno y otros mecanismos directos de promoción vegetal, los rizobios tienen propiedades para biocontrol e inducción de resistencia sistémica contra fitopatógenos y plagas de insectos. Estos mecanismos se basan en la producción de principios activos como los siguientes:



Antibióticos

Como el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), kanosamina, fenazina-1-ácido-carboxílico, pioluteorina, neomicina A, pirrolnitrina, piocianina y viscosinamida, entre los cuales el más sobresaliente es el DAPG por su amplio espectro antibacteriano y su actividad antifúngica y antihelmíntica.



Metabolitos de bajo peso molecular

Como el cianuro de hidrógeno (HCN), que inhibe metaloenzimas, en general, pero particularmente de cobre contenido en la citocromo C oxidasa.



Sideróforos

Para una mayor absorción de hierro, lo que priva, por competencia, a los hongos fitopatógenos.



Enzimas líticas

Como la quitinasa, β -1,3-glucanasa, proteasa y lipasa, que lisan paredes y membranas celulares de patógenos fúngicos y bacterianos.

Además de la producción de metabolitos, los rizobios pueden inhibir el crecimiento de fitopatógenos edáficos a través de 1) la exclusión competitiva por nutrientes o del sitio de colonización en la planta y 2) el micoparasitismo de las hifas o la inhibición de estructuras reproductivas como esclerotios o zoosporas (Das et al., 2017; Gopalakrishnan et al., 2015).

Por otro lado, en la inducción de resistencia sistémica se generan señales que se distribuyen sistémicamente y fortalecen los mecanismos de defensa de las plantas a través de la acción de metabolitos como los mencionados anteriormente o mediante la expresión de genes y la producción de enzimas líticas y antioxidantes,

como la peroxidasa, el polifenol oxidasa, el superóxido dismutasa, las catalasas, las lipoxigenasas y el ascorbato peroxidasa, además de fitoalexinas y flavonoides o incluso lipopolisacáridos que han mostrado efecto en la protección contra nematodos (Das et al., 2017; Gopalakrishnan et al., 2015). Algunas especies, como *B. japonicum*, *R. meliloti* y *R. leguminosarum*, son conocidas por su eficiencia en el control de fitopatógenos fúngicos del suelo como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* y *Macrophomina* (Das et al., 2017). La capacidad de biocontrol e inducción de resistencia sistémica de los rizobios se ha probado mediante el uso de extractos de nódulos o la inoculación en plantas, tanto leguminosas como de otras familias botánicas.

Mitigación de estreses abióticos: salinidad, acidez del suelo y metales pesados

De manera natural, los rizobios presentan algunos mecanismos clave para la tolerancia o resistencia a diferentes condiciones estresantes, como estrés ambiental, déficit hídrico, temperaturas extremas, salinidad, pH extremos, metales pesados y plaguicidas. La asociación artificial o la simbiosis de plantas con rizobios pueden mitigar el daño de estos factores estresantes, que limitan la productividad de los cultivos (Yang et al., 2002).

Es bien sabido que las altas temperaturas ambientales producen efectos negativos en las plantas, principalmente a causa de las pérdidas de agua por aumento de la transpiración. Asimismo, se limita la actividad enzimática para llevar a cabo procesos vitales para las plantas, como la fotosíntesis, mientras que, en leguminosas, se limitan considerablemente los procesos asociados a la nodulación. Aunque los rizobios son, en general, susceptibles a altas temperaturas, muchos de ellos exhiben adaptación natural al calor a través de procesos regulatorios complejos que involucran el uso de proteínas y lipopolisacáridos (LPS) (Gopalakrishnan et al., 2015; Zahran, 2001). Al someter a cepas de rizobios tolerantes a temperaturas por encima de los 30 °C, se ha observado un incremento en la producción de sustancias poliméricas extracelulares o exopolisacáridos (EPS), así como una mayor expresión de proteínas de *shock* térmico (Nandal et al., 2005). Aumentos considerables en la producción de EPS y la formación de *biofilms* (biopelículas) constituyen también mecanismos de tolerancia a la desecación y, por lo tanto, pueden asistir a las plantas para sobrellevar el déficit hídrico. Recientemente se ha propuesto que la producción de poliaminas por parte de rizobios puede mitigar el estrés hídrico a través de un mecanismo de comunicación cruzada de poliaminas con fitohormonas (Menéndez et al., 2019).

La salinidad en el suelo reduce la absorción de nutrientes por parte de las plantas debido a la

unión del sodio con cationes esenciales, como el P, o bien por la acumulación de iones de Na⁺, Cl⁻ y SO₄²⁻ en el interior de las células vegetales, lo cual inactiva enzimas que inhiben la síntesis de proteínas y la fotosíntesis (Zhu, 2001). La salinidad afecta el proceso de infección, colonización y formación de nódulos, impactando su eficiencia en el aprovisionamiento de nitrógeno a las plantas. Aunque los rizobios son sensibles a altas concentraciones de sales, hay especies tolerantes de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Gopalakrishnan et al., 2015; Zahran, 2001). En algunas de estas especies se han caracterizado metabolitos que, al igual que en las plantas, les permiten compensar los potenciales altamente negativos que produce la salinidad en el interior de las células, entre los cuales están los denominados solutos compatibles (trehalosa, N-acetilglutamilglutamina amida y glutamato) y los osmoprotectores (betaínas, glucanos, trehalosa, sucrosa, ectoína, 3-dimetilsulfoniopropionato, ácido piperídico y cationes como Ca⁺ y K⁺), cuya producción está modulada por familias de genes bien identificados (Sugawara et al., 2010).

Debido a su naturaleza no degradable, los metales pesados representan un grupo de contaminantes cuya abundancia en suelos causa daños tanto a plantas como a la microbiota. Los efectos de los metales pesados en el crecimiento, la abundancia, la morfología y la fisiología de los rizobios están bien documentados. En términos generales, se ha observado que la acumulación de metales como As, Mo, Hg, Cd y Cu reduce considerablemente la simbiosis leguminosa-rizobios debido a que su efecto tóxico disminuye las poblaciones de bacterias de vida libre, su viabilidad y consecuencia, las posibilidades de colonización y la formación de nódulos (Paudyal et al., 2007). A pesar de ello, cepas con buena eficiencia simbiótica, como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, muestran una tolerancia natural a algunos metales a través de la producción de EPS y biopolímeros, sideróforos, metalotioninas o fitoquelatinas que pueden acomplejar metales pesados, o bien a través de mecanismos genéticos que involucran una mayor diversidad de tipos de plásmidos (Fagorzi et al., 2018; Nonnoi et al., 2012).

Conclusiones

Los rizobios son un grupo ampliamente conocido por sus relaciones simbióticas con leguminosas; sin embargo, también establecen relaciones con plantas de otras familias botánicas, ocupando diferentes nichos, particularmente los endofíticos.

Los rizobios son un grupo taxonómicamente diverso que se enriquece con la exploración de nuevas especies vegetales de la extensa y ampliamente distribuida familia de las leguminosas, además de otras plantas que albergan géneros menos diversos de rizobios. En las relaciones simbióticas con rizobios, el mayor beneficio que tienen las plantas es la obtención de compuestos nitrogenados producto de la fijación del nitrógeno molecular atmosférico, mientras que, en relaciones asociativas con plantas no leguminosas, el beneficio se obtiene a través de otros mecanismos relacionados con la adquisición de nutrientes y la inducción del crecimiento por fitohormonas producidas por los rizobios, además de otros mecanismos indirectos, como la producción de metabolitos fitoefectivos (antibióticos, enzimas, sideróforos, moléculas señal, entre otros) para biocontrol, la inducción de resistencia sistémica y la mitigación del estrés ambiental, los cuales mejoran el desempeño fisiológico de las plantas y el rendimiento de los cultivos. Actualmente, las aproximaciones para extrapolar el beneficio de la fijación de nitrógeno a gramíneas de interés alimenticio se basan en manipulaciones genéticas, tanto de las plantas como de los rizobios. La literatura indica que los rizobios confieren a las leguminosas una vasta lista de efectos positivos, muchos de ellos relacionados con la nodulación y la eficiencia en la fijación de nitrógeno. Aunado a ello, se ha descrito su participación en la disponibilidad y absorción de fósforo, además de otros beneficios indirectos que cubren toda la gama de mecanismos aquí presentados. La evidencia colectada sobre los efectos de promoción del crecimiento en leguminosas proviene principalmente de estudios sobre inoculación con rizobios, mientras que en otras plantas los estudios abarcan experimentos con extractos de nódulos, extractos de cultivos e inoculación de raíces.

A pesar de la versatilidad que exhiben los rizobios para establecer relaciones simbióticas obligadas, cruzadas o asociativas, hay diversos factores que determinan una nodulación eficiente y, por lo tanto, pueden limitar los efectos deseados. Entre estos factores se distinguen el genotipo de la planta y el rizobio, los factores fisicoquímicos del suelo (pH, contenido de humedad, salinidad, etc.), los factores ambientales, la exudación radicular, así como la composición de la microbiota, ya sea esta residente del suelo o naturalmente asociada a las plantas. Debido a que los rizobios tienen capacidades sobresalientes para producir de manera natural un amplio espectro de metabolitos para sobrellevar diferentes tipos de estrés, se reconoce que estos microorganismos pueden utilizarse de manera eficiente no solo como biofertilizantes sino también como agentes para biocontrol e inducción de resistencia sistémica contra fitopatógenos, así como para favorecer el desempeño de las plantas en condiciones ambientales adversas o en suelos degradados o contaminados.

Referencias

- Afzal, A., & Bano, A. (2008). *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 10(1), 85-88. https://www.researchgate.net/publication/228684375_Rhizobium_and_Phosphate_Solubilizing_Bacteria_Improve_the_Yield_and_Phosphorus_Uptake_in_Wheat_Triticum_aestivum
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Alikhani, H. A., Saleh-Rastin, N., & Antoun, H. (2007). Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. En E. Velázquez, & C. Rodríguez-Barrueco (eds.), *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Developments in Plant and Soil Sciences* (vol. 102, pp. 35-41). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5765-6_4
- Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R., & Lalande, R. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). En G. Hardarson, & W. J. Broughton (eds.), *Molecular microbial ecology of the soil: Results from an FAO/IAEA co-ordinated research programme, 1992-1996* (pp. 57-67). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2321-3_5
- Balachandar, D., Raja, P., Kumar, K., & Sundaram, S. P. (2007). Non-rhizobial nodulation in legumes. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2(2), 49-57. <https://doi.org/10.5897/BMBR2007.0004>
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A., & Squartini, A. (2004). Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(4), 462-468. <https://doi.org/10.1078/0723202041438527>
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., & Friml, J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115(5), 591-602. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00924-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00924-3)
- Bianco, L. (2014). Rhizobial infection in *Adesmia bicolor* (Fabaceae) roots. *Archives of Microbiology*, 196(9), 675-679. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1004-0>
- Biswas, B., Chan, P. K., & Gresshoff, P. M. (2009). A novel ABA insensitive mutant of *Lotus japonicus* with a wilted phenotype displays unaltered nodulation regulation. *Molecular Plant*, 2(3), 487-499. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp009>
- Bontemps, C., Elliott, G. N., Simon, M. F., Dos Reis Júnior, F. B., Gross, E., Lawton, R. C., Neto, N. E., De Fátima Loureiro, M., De Faria, S. M., Sprent, J. I., James, E. K., & Young, J. P. W. (2010). *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Molecular Ecology*, 19(1), 44-52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04458.x>
- Brear, E. M., Day, D. A., & Smith, P. M. C. (2013). Iron: An essential micronutrient for the legume-rhizobium symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 4, artículo 359. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00359>
- Carvalho, F. M., Souza, R. C., Barcellos, F. G., Hungria, M., & Vasconcelos, A. T. R. (2010). Genomic and evolutionary comparisons of diazotrophic and pathogenic bacteria of the order Rhizobiales. *BMC Microbiology*, 10(1), artículo 37. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-37>
- Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., & Luna, V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.005>
- Chabot, R., Antoun, H., & Cescas, M. P. (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. *Plant and Soil*, 184(2), 311-321. <https://doi.org/10.1007/BF00010460>
- Chi, F., Shen, S.-H., Cheng, H.-P., Jing, Y.-X., Yanni, Y. G., & Dazzo, F. B. (2005). Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7.271-7.278. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7271-7278.2005>
- Clúa, J., Roda, C., Zanetti, M. E., & Blanco, F. A. (2018). Compatibility between legumes and Rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. *Genes*, 9(3), artículo 125. <https://doi.org/10.3390/genes9030125>
- Dakora, F. D., Matiru, V. N., & Kanu, A. S. (2015). Rhizosphere ecology of lumichrome and riboflavin, two bacterial signal molecules eliciting developmental changes in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, artículo 700. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00700>
- Das, K., Prasanna, R., & Saxena, A. K. (2017). Rhizobia: A potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia Microbiologica*, 62(5), 425-435. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0513-z>
- Engelhard, M., Hurek, T., & Reinhold-Hurek, B. (2000). Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environmental Microbiology*, 2(2), 131-141. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00078.x>
- Fagorzi, C., Checcucci, A., diCenzo, G. C., Debiec-Andrzejewska, K., Dziewit, L., Pini, F., & Mengoni, A. (2018). Harnessing rhizobia to improve heavy-metal phytoremediation by legumes. *Genes*, 9(11), artículo 542. <https://doi.org/10.3390/genes9110542>
- Ferguson, B. J., & Mathesius, U. (2014). Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 40(7), 770-790. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0472-7>

- Ferreira, N. S., Matos, G. F., Meneses, C. H. S. G., Reis, V. M., Rouws, J. R. C., Schwab, S., Baldani, J. I., & Rouws, L. F. M. (2020). Interaction of phytohormone-producing rhizobia with sugarcane mini-setts and their effect on plant development. *Plant and Soil*, 451(1), 221-238. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04388-0>
- Figueiredo, M. do V. B., Seldin, L., de Araujo, F. F., & Mariano, R. de L. R. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: Fundamentals and applications. En D. K. Maheshwari (ed.), *Plant growth and health promoting bacteria* (pp. 21-43). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2_2
- Gibson, K. E., Kobayashi, H., & Walker, G. C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics*, 42, 413-441. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091427>
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, artículo 963401. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with acc deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L. L., & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: Challenges and opportunities. *3 Biotech*, 5(4), 355-377. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0241-x>
- Guerinot, M. L. (1991). Iron uptake and metabolism in the rhizobia/legume symbioses. En Y. Chen, & Y. Hadar (eds.), *Iron nutrition and interactions in plants: "Proceedings of the Fifth International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants", 11-17 June 1989, Jerusalem, Israel, 1989* (pp. 239-249). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3294-7_29
- Hussain, M. B., Zahir, Z. A., Asghar, H. N., Mubarak, R., & Naveed, M. (2016). Efficacy of *Rhizobia* for improving photosynthesis, productivity, and mineral nutrition of maize. *Clean: Soil, Air, Water*, 44(11), 1.564-1.571. <https://doi.org/10.1002/clen.201500912>
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P., & Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, 147(4), 981-993. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-981>
- Laranjo, M., Alexandre, A., & Oliveira, S. (2014). Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological Research*, 169(1), 2-17. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.012>
- Lassaletta, L., Billen, G., Grizzetti, B., Anglade, J., & Garnier, J. (2014). 50 year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: The relationship between yield and nitrogen input to cropland. *Environmental Research Letters*, 9(10), artículo 105011. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/10/105011>
- Latif, S., Khan, S., Naveed, M., Mustafa, G., Bashir, T., & Mumtaz, A. S. (2013). The diversity of Rhizobia, *Sinorhizobia* and novel non-Rhizobial *Paenibacillus* nodulating wild herbaceous legumes. *Archives of Microbiology*, 195(9), 647-653. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0914-6>
- Lazar, T. (2003). *Plant physiology*. 3rd edn [reseña]. *Annals of Botany*, 91(6), 750-751. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg079>
- Makoudi, B., Kabbadj, A., Mouradi, M., Amenc, L., Domergue, O., Blair, M., Drevon, J.-J., & Ghoulam, C. (2018). Phosphorus deficiency increases nodule phytase activity of faba bean-rhizobia symbiosis. *Acta Physiologica Plantarum*, 40(3), artículo 63. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2619-6>
- McInroy, J. A., & Kloepper, J. W. (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, 173(2), 337-342. <https://doi.org/10.1007/BF00011472>
- Mehboob, I., Naveed, M., & Zahir, Z. A. (2009). Rhizobial association with non-legumes: Mechanisms and applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28(6), 432-456. <https://doi.org/10.1080/07352680903187753>
- Mehboob, I., Naveed, M., Zahir, Z. A., & Ashraf, M. (2012). Potential of rhizobia for sustainable production of non-legumes. En M. Ashraf, M. Öztürk, M. S. A. Ahmad, & A. Aksoy (eds.), *Crop production for agricultural improvement* (pp. 659-704). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4116-4_26
- Mehboob, I., Zahir, Z. A., Arshad, M., Tanveer, A., & Azam, F. (2011). Growth promoting activities of different *Rhizobium* spp., in wheat. *Pakistan Journal of Botany*, 43(3), 1.643-1.650. https://www.researchgate.net/publication/265979200_Growth_promoting_activities_of_different_rhizobium_spp_in_wheat
- Menéndez, A. B., Calzadilla, P. I., Sansberro, P. A., Espasandín, F. D., Gazquez, A., Bordenave, C. D., Maiale, S. J., Rodríguez, A. A., Maguire, V. G., Campestre, M. P., Garriz, A., Rossi, F. R., Romero, F. M., Solmi, L., Salloum, M. S., Monteoliva, M. I., Debat, J. H., & Ruiz, O. A. (2019). Polyamines and legumes: Joint stories of stress, nitrogen fixation and environment. *Frontiers in Plant Science*, 10, artículo 1415. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01415>
- Nandal, K., Sehrawat, A. R., Yadav, A. S., Vashishat, R. K., & Boora, K. S. (2005). High temperature-induced changes in exopolysaccharides, lipopolysaccharides and protein profile of heat-resistant mutants of *Rhizobium* sp. (*Cajanus*). *Microbiological Research*, 160(4), 367-373. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.02.011>
- Nonnoi, F., Chinnaswamy, A., García de la Torre, V. S., Caba de la Peña, T., Lucas, M. M., & Pueyo, J. J. (2012). Metal tolerance of rhizobial strains isolated from nodules of herbaceous legumes (*Medicago*

- spp. and *Trifolium* spp.) growing in mercury-contaminated soils. *Applied Soil Ecology*, 61, 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.06.004>
- Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45, 119-144. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
- Paudyal, S. P., Aryal, R. R., Chauhan, S. V. S., & Maheshwari, D. K. (2007). Effect of heavy metals on growth of *Rhizobium* strains and symbiotic efficiency of two species of tropical legumes. *Scientific World*, 5(5), 27-32. <https://doi.org/10.3126/sw.v5i5.2652>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2015). Bacterial associations with legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 17-42. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899>
- Peoples, M. B., Brockwell, J., Herridge, D. F., Rochester, I. J., Alves, B. J. R., Urquiaga, S., Boddey, R. M., Dakora, F. D., Bhattarai, S., Maskey, S. L., Sampet, C., Rerkasem, B., Khan, D. F., Hauggaard-Nielsen, H., & Jensen, E. S. (2009). The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*, 48(1), 1-17. <https://doi.org/10.1007/BF03179980>
- Perrine-Walker, F. M., Gartner, E., Hocart, C. H., Becker, A., & Rolfe, B. G. (2007). *Rhizobium*-initiated rice growth inhibition caused by nitric oxide accumulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(3), 283-292. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-3-0283>
- Peters, K. N., & Verma, D. P. (1990). Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe relations. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 3(1), 4-8. <https://doi.org/10.1094/mpmi-3-004>
- Poole, P., Ramachandran, V., & Terpolilli, J. (2018). Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 291-303. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.171>
- Radzki, W., Gutierrez Mañero, F. J., Algar, E., Lucas García, J. A., García-Villaraco, A., & Ramos Solano, B. (2013). Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(3), 321-330. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9954-9>
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., & Blankenship, R. E. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology Evolution*, 21(3), 541-554. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh047>
- Rodrigues Coelho, M. R., De Vos, M., Carneiro, N. P., Marriel, I. E., Paiva, E., & Seldin, L. (2008). Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer. *FEMS Microbiology Letters*, 279(1), 15-22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00975.x>
- Roesch, L. F. W., Camargo, F. A. O., Bento, F. M., & Triplett, E. W. (2008). Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. *Plant and Soil*, 302(1), 91-104. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9458-3>
- Rosenblueth, M., Ormeño-Orrillo, E., López-López, A., Rogel, M. A., Reyes-Hernández, B. J., Martínez-Romero, J. C., Reddy, P. M., & Martínez-Romero, E. (2018). Nitrogen fixation in cereals. *Frontiers in Microbiology*, 9, artículo 1794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01794>
- Schlöter, M., Wiehe, W., Assmus, B., Steindl, H., Becke, H., Höflich, G., & Hartmann, A. (1997). Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5), 2.038-2.046. <http://aem.asm.org/content/63/5/2038.abstract>
- Schmidt, W. (1999). Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist*, 141(1), 1-26. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00331.x>
- Senthilkumar, M., Madhaiyan, M., Sundaram, S. P., & Kannaiyan, S. (2009). Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. Cv CO-43). *Microbiological Research*, 164(1), 92-104. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.10.007>
- Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U., & Wilhelm, E. (2002). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomyces*-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 39(1), 23-32. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00903.x>
- Shakhawat Hossain, M., & Mårtensson, A. (2008). Potential use of *Rhizobium* spp. to improve fitness of non-nitrogen-fixing plants. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 58(4), 352-358. <https://doi.org/10.1080/09064710701788810>
- Spaink, H. P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Review Microbiology*, 54, 257-288. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.257>
- Sugawara, M., Cytryn, E. J., & Sadowsky, M. J. (2010). Functional role of *Bradyrhizobium japonicum* trehalose biosynthesis and metabolism genes during physiological stress and nodulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4), 1.071-1.081. <https://doi.org/10.1128/AEM.02483-09>
- Tao, G.-C., Tian, S.-J., Cai, M.-Y., & Xie, G.-H. (2008). Phosphate-solubilizing and -mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*, 18(4), 515-523. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(08\)60042-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(08)60042-9)
- Thaweenut, N., Hachisuka, Y., Ando, S., Yanagisawa, S., & Yoneyama, T. (2011). Two seasons' study on *nifH* gene expression and

- nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): Expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia. *Plant and Soil*, 338(1), 435-449. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0557-1>
- Trinick, M. J., & Hadobas, P. A. (1995). Formation of nodular structures on the non-legumes *Brassica napus*, *B. campestris*, *B. juncea* and *Arabidopsis thaliana* with *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* isolated from *Parasponia* spp. or legumes grown in tropical soils. *Plant and Soil*, 172(2), 207-219. <https://doi.org/10.1007/BF00011323>
- Turner, M., Nizampatnam, N. R., Baron, M., Coppin, S., Damodaran, S., Adhikari, S., Arunachalam, S. P., Yu, O., & Subramanian, S. (2013). Ectopic expression of miR160 results in auxin hypersensitivity, cytokinin hyposensitivity, and inhibition of symbiotic nodule development in soybean. *Plant Physiology*, 162(4), 2.042-2.055. <https://doi.org/10.1104/pp.113.220699>
- Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. En P. A. H. M. Bakker, J. M. Raaijmakers, G. Bloemberg, M. Höfte, P. Lemanceau, & B. M. Cooke (eds.), *New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research* (pp. 243-254). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6776-1_2
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Wang, E. T., Tan, Z. Y., Guo, X. W., Rodríguez-Duran, R., Boll, G., & Martínez-Romero, E. (2006). Diverse endophytic bacteria isolated from a leguminous tree *Conzattia multiflora* grown in Mexico. *Archives of Microbiology*, 186(4), 251-259. <https://doi.org/10.1007/s00203-006-0141-5>
- Yang, G., Bhuvaneswari, T. V., Joseph, C. M., King, M. D., & Phillips, D. A. (2002). Roles for riboflavin in the *Sinorhizobium*-alfalfa association. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(5), 456-462. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2002.15.5.456>
- Zahran, H. H. (2001). Rhizobia from wild legumes: Diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 91(2), 143-153. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00342-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00342-X)
- Zhu, J.-K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6(2), 66-71. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01838-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01838-0)
- Zipfel, C., & Oldroyd, G. E. D. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*, 543(7.645), 328-336. <https://doi.org/10.1038/nature22009>

6

Producción de biofertilizantes

Andrés Díaz García¹
Martha Isabel Gómez Álvarez¹
Ginna Milena Quiroga Cubides¹
Erika Paola Grijalba Bernal¹
Mauricio Camelo Rusinque²
Ruth Rebeca Bonilla Buitrago²

-
1. Bioproductos y Bioprocesos Agropecuarios. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA. Sede Central. Cundinamarca. Colombia.
 2. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.





Biofertilizante®



Introducción

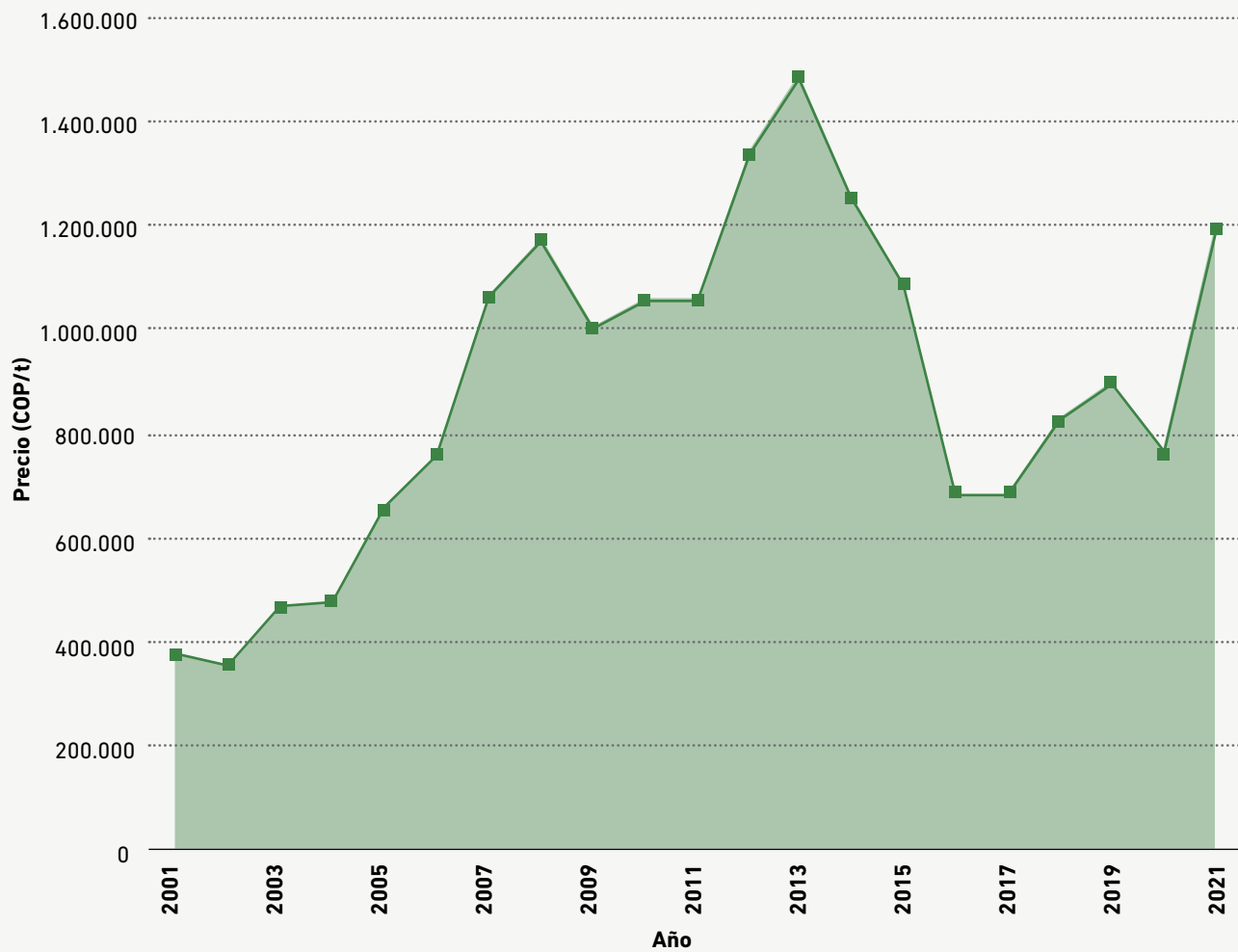
Es ampliamente conocida la importancia del nitrógeno en el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales, pues lo necesitan en cantidades relativamente grandes (75-150 kg de N ha⁻¹); sin embargo, su disponibilidad en el suelo es baja debido a las condiciones de este y al clima, por lo cual, en la mayoría de los casos, se requiere adicionar fertilizantes nitrogenados para obtener una alta productividad en los sistemas de producción agropecuarios. Adicionalmente, el alto precio de los fertilizantes de síntesis química y sus efectos sobre el ambiente han hecho que se planteen alternativas más sostenibles para suministrar el nitrógeno que requieren los cultivos. En la Figura 6.1, por ejemplo, se presenta un promedio histórico del precio de la urea en los últimos 20 años, y se puede observar que, en los últimos 10 años, el precio se ha incrementado en un 50%. Según la base de datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, desde 2016 el precio ha venido aumentando año a año en un promedio del 25%, y en Colombia este precio es superior en un 30 o 40% (Jensen et al., 2012).

El nitrógeno se encuentra principalmente en la atmósfera en forma de N₂, y es necesario emplear el proceso Haber-Bosch para romper el triple enlace que une a las dos moléculas de nitrógeno, lo cual requiere de altas temperaturas y presiones y conlleva un alto impacto ambiental negativo por el uso de combustibles fósiles. Una alternativa para suplir las necesidades de este importante nutriente es su fijación biológica, fenómeno que permite la transformación del nitrógeno elemental del aire (N₂) en formas asimilables por las plantas. El proceso de fijación biológica de nitrógeno es llevado a cabo por una gama relativamente amplia de microorganismos procarióticos, entre los cuales se encuentran géneros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Herbaspirillum* (Laranjo et al., 2014; Thilakarathna & Raizada, 2017).

Debido al alto costo de los fertilizantes nitrogenados en Colombia y a la marcada dependencia que tienen los cultivos de este nutriente, se hace necesario masificar la utilización de los biofertilizantes. Desde hace varias décadas, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) han trabajado en los procesos de evaluación, selección, producción masiva, formulación y escalamiento de cepas fijadoras de nitrógeno para diferentes cultivos como sustituto de los fertilizantes nitrogenados.

■ **Figura 6.1.** Precio de la urea, 2001-2021.

Fuente: www.indexmundi.com





Desarrollo de medios de cultivo, formulaciones y control de calidad de biofertilizantes

En el desarrollo tecnológico de un biofertilizante se deben surtir varias etapas relacionadas principalmente con la estandarización de la producción masiva del microorganismo, mediante procesos de fermentación, para asegurar cantidades adecuadas de biomasa microbiana para los procesos de formulación y control

de calidad del bioproducto terminado. La idoneidad y experticia del equipo involucrado en todas las etapas del desarrollo tecnológico permitirá asegurar la obtención de un biofertilizante eficiente, seguro, estable en almacenamiento y con resultados reproducibles en el tiempo cuando se aplica en campo.

Procesos de fermentación

En general, el tipo de fermentación más usado para la producción masiva de biomasa de microorganismos biofertilizantes es la fermentación líquida, ya que este sistema es altamente homogéneo y facilita un control riguroso de las variables críticas del proceso, como la agitación, la concentración de oxígeno disuelto y la temperatura. El fermentador tipo reactor de tanque agitado convencional (STR, por sus siglas en inglés), con turbinas Rushton, es la elección más utilizada, ya que genera unos patrones de flujo y de mezcla radiales bien definidos, que favorecen la obtención de altos valores del coeficiente volumétrico de transferencia de masa ($k_L a$). Además, la mayoría de los microorganismos biofertilizantes toleran los esfuerzos cortantes generados dentro de esta clase de sistemas, sin que se afecte su viabilidad o velocidad específica de crecimiento.

Desarrollo de medios de cultivo y estandarización a escala de laboratorio

A nivel de laboratorio, para el crecimiento de los microorganismos que sirven como principio activo de los biofertilizantes, es usual trabajar con medios de cultivo bien definidos (*yeast extract mannitol*, Ashby, Okon, Pikovskaya, etc.), que brindan rendimientos de biomasa adecuados para llevar a cabo bioensayos *in vitro* y otros experimentos pequeños que no requieren más de un litro de caldo de fermentación. Sin embargo, cuando el objetivo es escalar los procesos a nivel piloto o industrial, el diseño y estandarización de un medio de cultivo específico para cada microorganismo toma relevancia, ya que criterios como la economía,

la eficiencia en la producción del ingrediente activo, la disponibilidad en cantidades significativas (kilogramos o toneladas) durante todo el año, la compatibilidad con el ingrediente activo y la pureza, entre otros, deben tenerse en cuenta para la selección de las materias primas de los medios de cultivo.

En esta etapa se aplican diseños estadísticos de tipo exploratorio (como Plackett-Burman, factoriales fraccionados, entre otros) con el fin de seleccionar, a escala de laboratorio, los componentes del medio que tienen un efecto significativo sobre la variable de respuesta, así como para definir los rangos de concentración promisorios, que deben ser optimizados en etapas posteriores.

Optimización del medio de cultivo

En la fase de optimización, el investigador debe manejar y gestionar *software* especializado en diseño de experimentos u otras herramientas estadísticas de análisis que le permitan llevar a cabo la implementación experimental a escala de laboratorio con un uso eficiente de los recursos (tiempo, equipos, personal). El desarrollo exitoso de este tipo de estrategias experimentales asegura la obtención de un medio de cultivo óptimo en función de las variables de respuestas de interés, tanto cualitativas como cuantitativas, asociadas al microorganismo biofertilizante en cuestión. Por ejemplo, para la optimización del medio de cultivo de un biofertilizante a base de *Azotobacter chroococcum*, se aplicó un diseño Box-Behnken en el que se evaluaron tres factores nutricionales en tres niveles y se generó un modelo polinomial de segundo orden para maximizar la producción de biomasa viable; este modelo explicó el 90,06 % de la variabilidad presentada durante la experimentación, y con los valores óptimos de los tres factores nutricionales se predijo un valor óptimo de $6,1 \times 10^9$ uFc mL⁻¹ de *A. chroococcum* (Moreno et al., 2011).

Cambio de escala del medio de cultivo

Antes de que la aplicación de un biofertilizante sea factible en áreas de cultivo amplias, debe surtir un proceso de cambio de escala —“escalamiento hacia arriba”— que asegure que el comportamiento del microorganismo dentro del sistema de fermentación es similar independientemente de la escala aplicada, con el fin de asegurar que los rendimientos obtenidos en el laboratorio se puedan reproducir en escalas superiores (piloto o industrial), y obtener así las cantidades necesarias para este tipo de aplicaciones.

Generalmente, en función de la facilidad y economía del proceso, se genera una estrategia de cambio de escala a nivel de laboratorio (~10 litros), cuya reproducibilidad se valida posteriormente a escala piloto (100–200 litros) o directamente a escala industrial (> 500 litros). La estrategia de cambio de escala debe tener en consideración dos grandes componentes: aspectos técnicos y aspectos de ingeniería del proceso de fermentación, los cuales deben ser tenidos en cuenta de manera simultánea durante todo el trabajo experimental.

Aspectos técnicos del proceso de fermentación: En esta categoría se debe analizar el efecto de componentes y procesos que pueden tener un efecto significativo sobre la variable de respuesta a escala industrial, tales como grado de pureza y manejo de materias primas, desarrollo de inóculos, esterilización de materiales y equipos, implementación de sistemas CIP (*cleaning in place*), entre otros (Ali et al., 2018; Crater & Lievense, 2018).

Aspectos de ingeniería: En esta categoría se analiza el efecto de las variables críticas que se han identificado, para conocer si afectan significativamente el proceso de fermentación, así como de las variables de respuesta definidas. Estas variables críticas se denominan *criterios de escalamiento* y se analizan en profundidad mediante experimentos cuidadosamente planificados para generar modelos predictivos o correlaciones empíricas de cambio de escala que permitan hacer un análisis detallado del fenómeno en escala de laboratorio y su posterior validación a escala piloto.

Las herramientas más usadas para generar estrategias de escalado son:



Diseño de experimentos clásico mediante la aplicación de técnicas de optimización.



Uso de números adimensionales.



Correlaciones empíricas.

Para la aplicación de la estrategia seleccionada, es esencial usar, en primera instancia, un criterio de similitud geométrica entre los fermentadores usados en las dos escalas y aplicar uno o más criterios adicionales que se relacionan con la transferencia de masa y de calor, la hidrodinámica o la fisicoquímica de los procesos aerobios; entre estos criterios se encuentran los siguientes (Crater & Lievense, 2018):



Potencia por unidad de volumen (P/V).



Tiempo de mezcla (t_m).



Coefficiente volumétrico de transferencia de masa gas-líquido ($k_L a$).



Velocidad de punta del impulsor (nD).



Retención de gas (ϵ).



Presión hidrostática en el líquido (P_l).

En la tabla 6.1 se presentan algunos ejemplos de escalado hacia arriba aplicados para la producción de microorganismos biofertilizantes.



■ **Tabla 6.1.** Ejemplos de microorganismos con capacidad biofertilizante escalados

1 **Microorganismo evaluado:** *Azospirillum sp., cepa 8-Inica*

Criterios de escalamiento aplicados*: Número de aireación

($N_a = Q/n \cdot D_i^3$); número de Reynolds ($Re = n \cdot D_i^2 \cdot \rho / \mu$), y número de potencia

($N_p = P_g / r \cdot n^3 \cdot D_i^5$)

Volumen final: 5.000 L

Referencia: San Juan et al. (2013)

2 **Microorganismo evaluado:** *Rhizobium sp. AC1 y Agrobacterium pusense AC10*

Criterios de escalamiento aplicados*: Número de Reynolds

($Re = n \cdot D_i^2 \cdot \rho / \mu$)

Volumen final: 100 L

Referencia: Quiroga-Cubides et al. (2017)

* Además del criterio de similitud geométrica entre los biorreactores de las dos escalas.

Nota: Q: flujo volumétrico de aire (L min⁻¹); n: velocidad del impulsor (rpm); D_i: diámetro del impulsor (m); ρ: densidad del líquido (kg m³); μ: viscosidad del líquido (kg m·s⁻¹); P_g: potencia gaseada (kg m·s⁻¹).

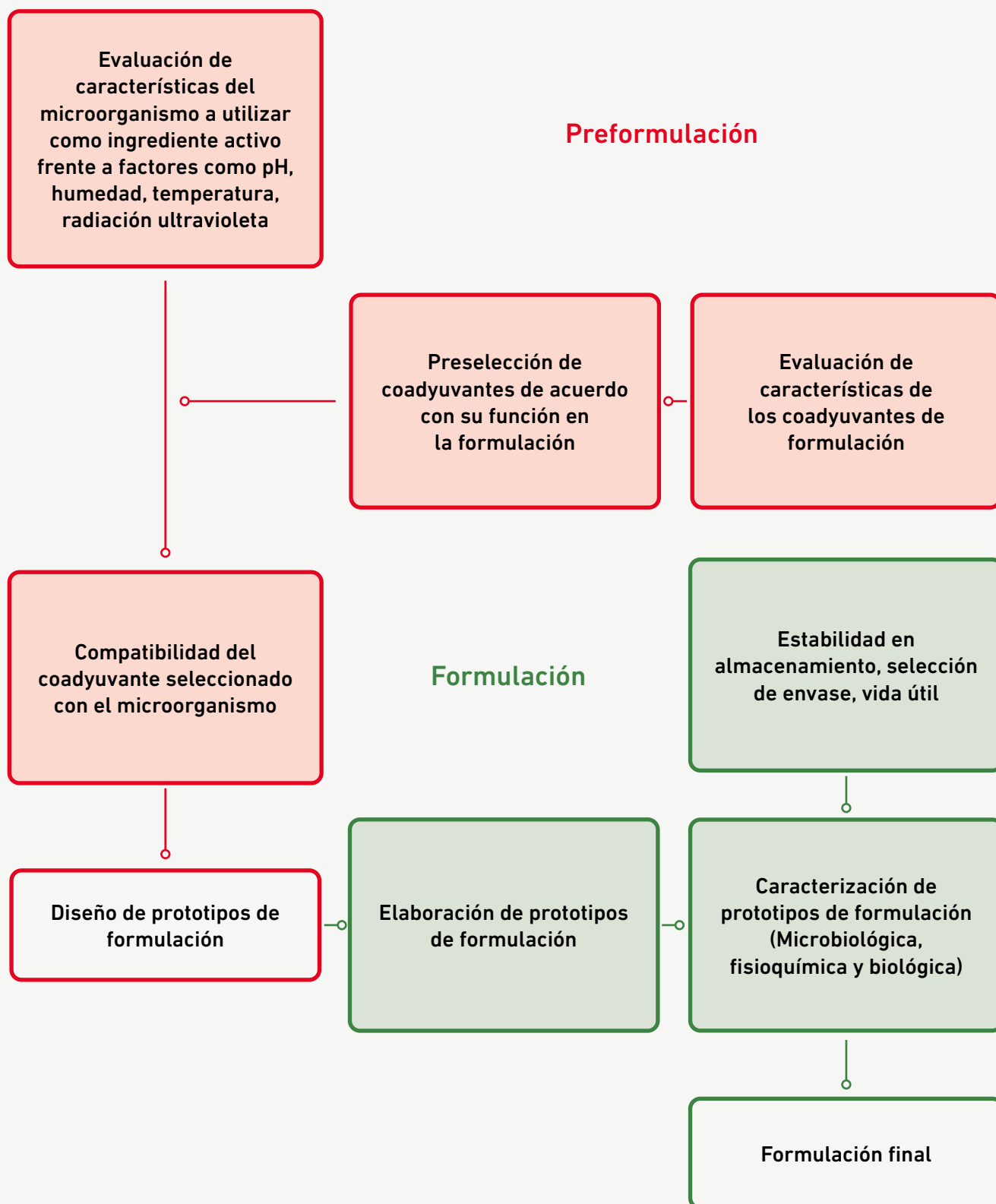


Formulación de los biofertilizantes

Los biofertilizantes se definen como inóculos fúngicos o bacterianos que, al ser aplicados a las plantas, permiten incrementar la disponibilidad de los nutrientes y su utilización por parte de estas.

Los biofertilizantes pueden también definirse como bioestimulantes microbianos que mejoran la eficiencia en la nutrición de las plantas (Du Jardin, 2015). En la formulación, el ingrediente activo ejerce la actividad biológica, que es, en este caso, hacer disponibles elementos nutricionalmente importantes para las plantas que no se encuentran disponibles para su asimilación, a través de procesos biológicos (Vessey, 2003). En general, la formulación ideal debe cumplir con los siguientes criterios: 1) estabilizar al microorganismo y extender su vida útil; 2) proteger al ingrediente activo de factores ambientales externos en el sitio blanco de acción, y 3) facilitar la aplicación del biofertilizante en condiciones de campo (Burges, 2012; Hermann et al., 2015). Sin embargo, en muchos países, los biofertilizantes desarrollados y comercializados no cumplen con parámetros de calidad, lo que causa inconsistencia en los resultados de su actividad biológica en campo, y esto produce una baja adopción a nivel comercial (Herrmann & Lesueur, 2013; Yadav & Chandra, 2014). Esta situación resalta la importancia de seguir un proceso de desarrollo riguroso tanto en la etapa de producción del microorganismo como en la etapa de diseño y desarrollo de la formulación, controlando todas las operaciones realizadas y llevando a cabo los controles de calidad pertinentes en cada una de ellas. En la Figura 6.2 se resumen algunas de las actividades que forman parte de la etapa de diseño y desarrollo de una formulación.

- **Figura 6.2.** Etapas requeridas en el proceso de diseño y desarrollo de una formulación para un biofertilizante.
Fuente: Elaboración propia



Diversas formulaciones de biofertilizantes han sido desarrolladas a nivel mundial (Tabassum et al., 2017), y en la actualidad el reto es que estos productos mantengan una alta viabilidad durante el almacenamiento (uno o dos años a temperatura ambiente) y en el sitio de aplicación (Lobo et al., 2019). En general, las formulaciones a base de microorganismos con potencial biofertilizante son líquidas o sólidas (Oliveira et al., 2017), con una concentración entre 1×10^7 y 1×10^9 UFC mL⁻¹ o g⁻¹ (Malusá & Vassilev, 2014). Otro enfoque considera el número de células viables por semilla después de la aplicación, el cual se encuentra en el orden de entre 1×10^3 y 1×10^5 , de acuerdo con el tamaño de la semilla (Bashan et al., 2014; Bharti et al., 2017). Las formulaciones líquidas corresponden al medio de fermentación completo o a la suspensión del microorganismo mezclado con agua, aceite o sustancias poliméricas y surfactantes, para incrementar su adherencia, estabilidad y capacidad de dispersión (Lee et al., 2016), mientras que en las formulaciones sólidas se emplean soportes inorgánicos u orgánicos, para obtener granulados o polvos (Adholeya & Das, 2012; Malusá et al., 2012). Comúnmente, en el mercado, la mayoría de los biofertilizantes se encuentran formulados como líquidos, ya que su proceso de elaboración es más sencillo y tienen un menor costo en comparación con las formulaciones sólidas (Kumaresan & Reetha, 2011).

En Colombia, a diciembre de 2018, de acuerdo con el ICA (2018), se encontraban registradas como inoculantes biológicos aproximadamente 75 formulaciones, a base de microorganismos solos o en mezcla, de los géneros *Bacillus*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter*, *Geotrichum*, *Azospirillum*, *Lactobacillus*, *Trichoderma*, *Rhodopseudomonas*, *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Penicillium* y *Scutellospora*. De estos inoculantes, el 61,33% correspondió a formulaciones líquidas (concentrados solubles, suspensiones concentradas y suspensiones líquidas), y el 38,66%, a formulaciones sólidas (sustratos sólidos, polvos y granulados dispersables). Aunque la mayoría de los biofertilizantes registrados a nivel mundial corresponden a formulaciones líquidas o sólidas (povos y granulados), se evidencia que hay nuevas tendencias en la investigación y el desarrollo de este tipo de productos que buscan sustituirlas en un futuro por medio de la obtención de formulaciones innovadoras, como, por ejemplo, matrices de liberación controlada o hidrogeles a base de polímeros o materiales poliméricos (Da Silva et al., 2012). En estas nuevas formulaciones, los microorganismos son inmovilizados en matrices, por lo que presentan mayor



viabilidad en condiciones de almacenamiento, en el suelo o en el sitio blanco de acción sobre la planta (Marcelino et al., 2016; Schoebitz et al., 2013). En 2016, Marcelino y colaboradores desarrollaron una espuma biodegradable a base de *Azospirillum brasilense* con el objetivo de que se formara una biopelícula en el momento de su aplicación. Uno de los prototipos que ellos desarrollaron fue estable durante cuatro meses de almacenamiento a temperatura ambiente y aun diez días después de su aplicación en el suelo, lo que sugiere que este tipo de formulación protegió y aportó nutricionalmente al microorganismo, permitiéndole mantenerse activo, en comparación con biofertilizantes líquidos a base de *A. brasilense*. Asimismo, Perez et al. (2018) desarrollaron macrocápsulas de almidón y quitosán a base de *A. brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*; esta matriz polimérica fue estable durante doce meses de almacenamiento a temperatura ambiente, conservando la viabilidad de las bacterias en 1×10^9 UFC g⁻¹ y 1×10^8 UFC g⁻¹, respectivamente.

Control de calidad de los biofertilizantes

El aseguramiento de la calidad es uno de los principales factores en el proceso de producción y comercialización de biofertilizantes, pues permite asegurar la eficacia del producto a los consumidores finales (Benintende, 2010; Herrmann & Lesueur, 2013; Lupwayi et al., 2000; Vessey, 2003; Young, 2007).

Asegurar los estándares de calidad exigidos para el producto y mantener controlados los puntos críticos de la producción deben ser los principales objetivos a la hora de elaborar un bioproducto (Herrmann & Lesueur, 2013; Lupwayi et al., 2000; Sun et al., 2006). Para asegurar la calidad del producto y detectar a tiempo inconsistencias durante la producción, se le deben realizar controles de calidad al banco de trabajo o la cepa madre durante su almacenamiento, en el proceso de selección de coadyuvantes de formulación y durante la elaboración del producto final (Deaker et al., 2011; Lupwayi et al., 2000; Sethi & Adhikary, 2012).

El control de calidad que se realiza al banco de trabajo o la cepa madre consiste en la determinación de su viabilidad celular y su pureza (Herrmann & Lesueur, 2013; Lupwayi et al., 2000; Sun et al., 2006). En general, se espera que la cepa (o cepas) seleccionada como principio activo del bioproducto tenga la habilidad de ser cultivable y que sea genéticamente estable (Herridge et al., 2002). Durante la producción del principio activo (caldo de cultivo), se efectúa el conteo de células totales y se determina la viabilidad celular, la pureza y algunas características físicas y químicas vinculadas con la producción de metabolitos de interés (pH, concentración de biopolímeros, enzimas, etc.) o la presencia de contaminantes. Finalmente, al producto terminado, independientemente de la matriz en la que se encuentre, se le determina el número de células viables, la pureza y las propiedades fisicoquímicas que aseguran la estabilidad de la formulación, y también se realizan pruebas biológicas o bioquímicas para verificar la actividad biofertilizante del producto (Herrmann & Lesueur, 2013; Lupwayi et al., 2000; Sun et al., 2006).

Entre las técnicas más empleadas para la cuantificación celular directa, se encuentra el conteo en cámaras Thoma, Petroff-Hausser o Neubauer; en el conteo indirecto se emplea la densidad óptica y la turbidez (Lupwayi et al., 2000; Sun et al., 2006; Thompson, 1984). Asimismo, se utilizan técnicas inmunológicas y de cuantificación por *real time-PCR* (*real time-polymerase chain reaction*) (Deaker et al., 2011; Hermann et al., 2015; Herrmann & Lesueur, 2013; Lupwayi et al., 2000; Thompson, 1984). En el caso de la viabilidad celular, se ha desarrollado una amplia gama de métodos, siendo los más empleados 1) el recuento en placa de Petri con medios selectivos, utilizando las técnicas de siembra por extensión, microgota (Miles et al., 1938) o vertido en placa, y 2) la fermentación en múltiples tubos, como el método del número más probable (Deaker et al., 2011; Hermann et al., 2015; Lupwayi et al., 2000). Actualmente, se ha aumentado el uso de técnicas inmunológicas asociadas a cultivos en medios selectivos (Deaker et al., 2011; Hermann et al., 2015; Lupwayi et al., 2000).

La pureza del principio activo, del caldo de cultivo o del producto terminado es un parámetro de control de calidad importante debido a que los microorganismos contaminantes compiten por espacio y nutrientes y pueden llegar a producir compuestos tóxicos como mecanismo de defensa (Herrmann & Lesueur, 2013). Los procedimientos más empleados para la determinación de contaminantes son la tinción de Gram (pared celular) (Deaker et al., 2011; Sun et al., 2006; Thompson, 1984) y el recuento en placa con medios como agar nutritivo (AN) y agar glucosa peptona, para el conteo de cepas bacterianas; PDA (*potato dextrose agar*) y agar Rosa de Bengala, para cepas fúngicas, y YM (*yeast mold*), para levaduriformes (Lupwayi et al., 2000; Thompson, 1984).

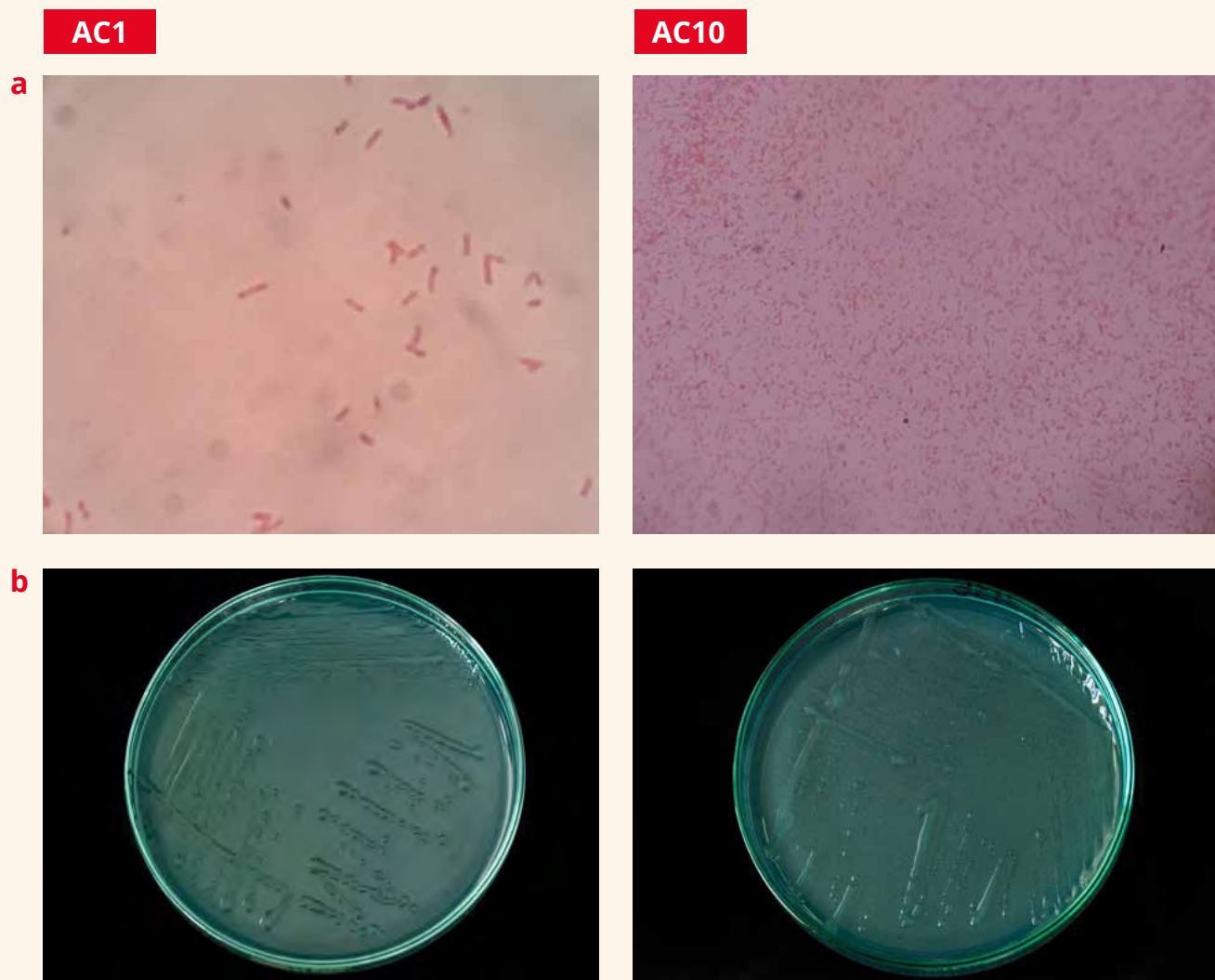
Durante la producción del principio activo y en el producto terminado, es frecuente que se evalúen variables fisicoquímicas como pH, viscosidad, contenido de humedad y tamaño de partícula. En algunos casos, el pH suele ser un indicador de presencia de contaminantes y, por lo tanto, se emplea como parámetro crítico en los procesos de fermentación (Herrmann & Lesueur, 2013; Sun et al., 2006; Thompson, 1984). El contenido de humedad, por su parte, es un parámetro que permite controlar la actividad de agua del producto terminado, y de este modo se previene la aparición de contaminantes (Sun et al., 2006).

La evaluación de la actividad biológica corresponde a uno de los parámetros de calidad más importantes dentro de la producción de inoculantes microbianos, ya que gracias a esta se definen la eficacia del bioinsumo y la estabilidad de la actividad biológica del principio activo (Herridge et al., 2002; Herrmann & Lesueur, 2013; Ohyama & Pham, 2006). En general, la evaluación de este parámetro se puede realizar por medio de ensayos en campo, estimando el rendimiento de la producción del cultivo vegetal, la medición del crecimiento vegetal y la absorción de nutrientes en los cultivos (Kennedy, 2008; Ohyama & Pham, 2006). Por otro lado, en el caso de los bioproductos que actúan como fijadores de nitrógeno, se han venido empleando métodos analíticos, entre los que se encuentran la actividad de reducción de acetileno (Eckert et al., 2001; Valero, 2003), la actividad fijadora de $^{15}\text{N}_2$ (Ohyama & Pham, 2006; Vose et

al., 1982), la prueba de producción de H_2 (Witty & Minchin, 1998) y el método de concentración relativa de nitrógeno ureico (Herridge & Peoples, 1990; Kushizaki et al., 1964). Asimismo, la estimación de la actividad de solubilización de fosfato se ha medido por métodos cualitativos con siembra en medios selectivos, encontrando degradación de fosfatos insolubles por cambios de pH (Becerra et al., 2011; Ohyama & Pham, 2006). La cuantificación de esta actividad se ha determinado por medio de la liberación de ácidos orgánicos producidos durante la solubilización del fósforo (Rodríguez & Fraga, 1999; Sharma et al., 2013), la formación de cromóforos (Icontec, 2018; Ohyama & Pham, 2006), o mediante el análisis de la actividad fosfatasa a partir de la reacción con *p*-nitrofenil fosfato (Otalora et al., 2003). Para los microorganismos promotores de crecimiento, se realiza la cuantificación de indoles totales y ácido indolacético (Icontec, 2018; Ohyama & Pham, 2006). En el caso de los productos a base de *Rhizobium*, su actividad biológica es medida como su capacidad de formación de nódulos en el tallo de la planta hospedera, método indirecto que permite la cuantificación de los microorganismos capaces de crecer en la planta (Ohyama & Pham, 2006; Yadav & Chandra, 2014).

Como ejemplo de lo anterior, en AGROSAVIA, para mantener la calidad del biofertilizante comercial Monibac líquido, los controles de calidad se efectúan en la colección del banco de trabajo, en el proceso de producción del principio activo y sobre el producto terminado. Las pruebas efectuadas en el banco de trabajo consisten en identificar micro y macroscópicamente las cepas de *Rhizobium* sp. AC1 y *Agrobacterium pusense* AC10. La primera caracterización se realiza por medio de la tinción de Gram, y la morfología de estas bacterias corresponde a cocobacilos Gram-negativos, de aproximadamente 2 μm (Figura 6.3a). Para la identificación macroscópica, se emplea el medio LG (*N-free sucrose medium*) (Turner & Gibson, 1980), selectivo para bacterias diazótroficas. Sus colonias son redondas, brillantes, convexas, lisas y ligeramente viscosas (Figura 6.3b). Además, se utiliza el recuento en placa para la cuantificación de contaminantes, empleando el medio AN, para el conteo de bacterias, y agar Rosa de Bengala, para cuantificar contaminantes fúngicos y levaduriformes.

- **Figura 6.3.** Control de calidad de *Rhizobium* sp. AC1 y *Agrobacterium pusense* AC10. *a.* Identificación microscópica; *b.* Recuento en placa (microgota) en medio LG.
Fuente: Laboratorio de Microbiología de Suelos de AGROSAVIA

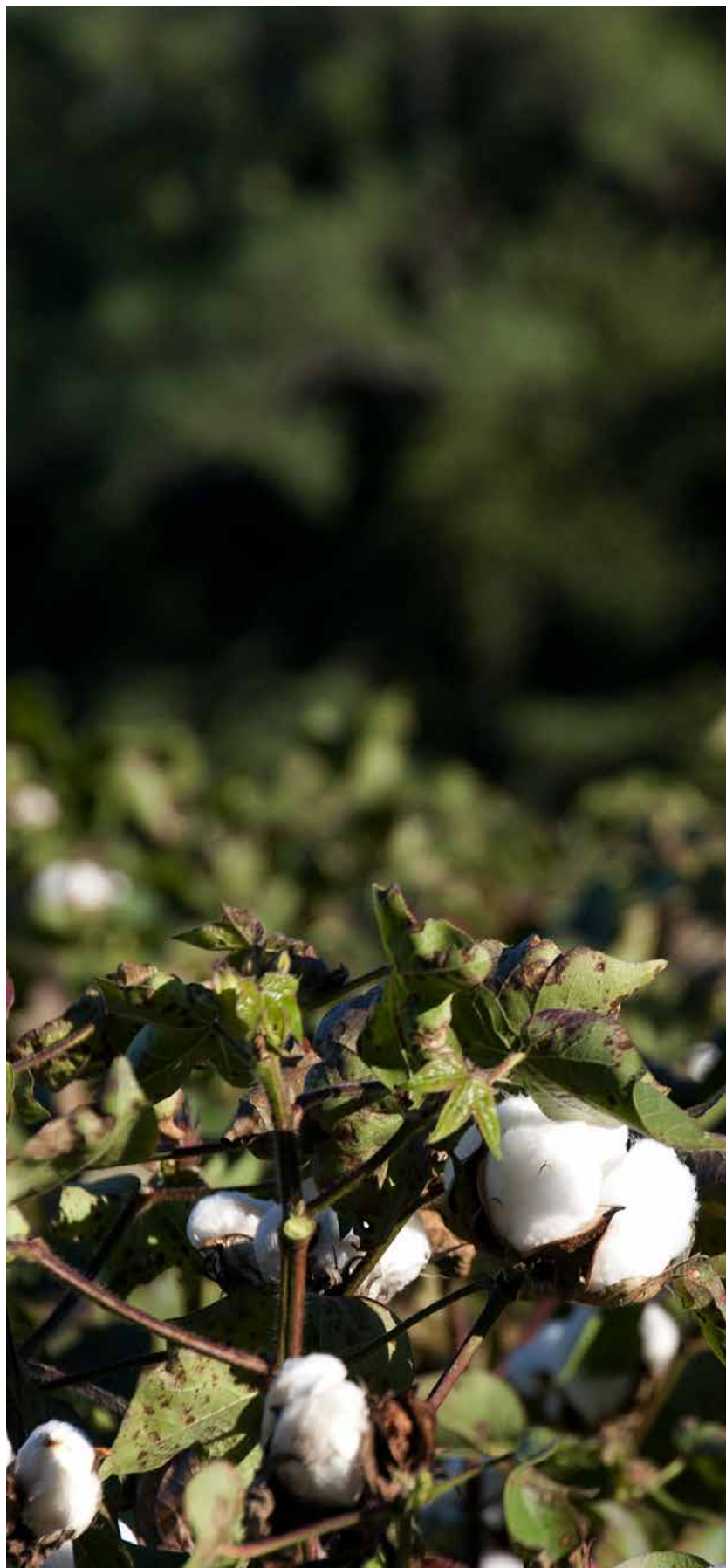


Durante el proceso de fermentación de las cepas de *A. chroococcum*, se verifica la pureza del caldo de cultivo mediante tinción de Gram, y por medio de un potenciómetro se hace un monitoreo del pH, ya que, durante una adecuada fermentación de las cepas, este tiende a aumentar, así que un cambio en este comportamiento puede ser debido a la presencia de contaminantes en el medio de cultivo. Al finalizar la fermentación y antes de pasar a la etapa de formulación, se realiza una cuantificación de las células viables presentes, utilizando la metodología de recuento en placa por microgota (Figura 6.3b) (Doyle et al., 2001),

y se determina el contenido de contaminantes como se explicó anteriormente. Finalmente, al producto terminado se le realiza un proceso de control de calidad que consiste en cuantificar células viables y contaminantes y determinar el pH y la viscosidad, empleando métodos potenciométricos y de viscosímetro rotacional de disco, respectivamente. Con respecto a la actividad biológica, esta se determina mediante el método de actividad reductora de acetileno, procedimiento estandarizado en el Laboratorio de Química de Suelos de AGROSAVIA (Obando Castellanos et al., 2010).

La implementación de estándares de calidad permite verificar que los parámetros evaluados en el control de calidad sean adecuados a las necesidades de los consumidores finales y aseguren la eficacia del biofertilizante (Deaker et al., 2011). Por otra parte, la regulación permite disminuir la competencia con productos de baja calidad y mejorar la aceptación y el posicionamiento del producto en el mercado (Herridge et al., 2002). Hasta el momento no existen estándares de calidad definidos globalmente, por lo que tienden a variar de país en país (Benintende, 2010; Deaker et al., 2011; Lupwayi et al., 2000; Stephens & Rask, 2000; Sun et al., 2006). Sin embargo, los valores mínimos actuales permitidos para biofertilizantes corresponden a concentraciones entre 10^6 y 10^9 UFC g^{-1} o mL^{-1} para productos recién elaborados (Benintende, 2010; Lupwayi et al., 2000; Sethi & Adhikary, 2012). En algunos países se exige la ausencia total de contaminantes, mientras que en otros está permitido un máximo del 0,001 % de contaminantes con respecto a la concentración del principio activo o una concentración máxima de 10^5 UFC g^{-1} o mL^{-1} (Benintende, 2010; Lupwayi et al., 2000; Sethi & Adhikary, 2012).

En Colombia, el registro y la vigilancia de estos bioproductos está a cargo del ICA, que tiene en cuenta los estándares de calidad sugeridos en la Norma Técnica Colombiana (NTC) 5842, "Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes biológicos. Requisitos" (Icontec, 2018). En ella se establece que los biofertilizantes deben presentar una concentración mínima, antes de su vencimiento, de 10^4 UFC mL^{-1} o g^{-1} , y en el caso de biofertilizantes a base de micorrizas, entre 5 y 10 esporas mL^{-1} o UFC g^{-1} por cada cepa presente en el cultivo. En cuanto a la pureza, esta debe ser mayor o igual al 95 %, con respecto a la concentración del principio activo, y poseer una actividad biológica superior o igual al 90 %, o estadísticamente significativa con respecto al control. Las propiedades fisicoquímicas como pH, contenido de humedad y densidad son especificadas por cada productor.



Referencias

- Adholeya, A., & Das, M. (2012). Biofertilizers: Potential for crop improvement under stressed conditions. En N. Tuteja, S. Singh Gill, & R. Tuteja (eds.), *Improving crop productivity in sustainable agriculture* (pp. 183-200). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9783527665334.ch9>
- Ali, S., Ali, M. F., Sameer, M., & Rafique, Z. (2018). A review scale up fermentation procedure. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*, 4, 1.301-1.307. https://www.academia.edu/37123900/A_Review_Scale_Up_Fermentation_Procedure
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J.-P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, 378(1), 1-33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Becerra, J. M., Quintero, D., Martínez, M., & Matiz, A. (2011). Caracterización de microorganismos solubilizadores de fosfato aislados de suelos destinados al cultivo de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 5(2), 195-208. https://revistas.upc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/1265
- Benintende, S. M. (2010). Calidad de inoculantes comerciales para el cultivo de soja en la Argentina: concentración de rizobios viables y presencia de contaminantes. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(2), 129-132. https://www.researchgate.net/publication/262652456_Calidad_de_inoculantes_comerciales_para_el_cultivo_de_soja_en_la_Argentina_concentracion_de_rizobios_viables_y_presencia_de_contaminantes
- Bharti, N., Sharma, S. K., Saini, S., Verma, A., Nimonkar, Y., & Prakash, O. (2017). Microbial plant probiotics: Problems in application and formulation. En V. Kumar, M. Kumar, S. Sharma, & R. Prasad (eds.), *Probiotics and plant health* (pp. 317-335). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3473-2_13
- Burges, H. D. (2012). *Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. Springer.
- Crater, J. S., & Lievense, J. C. (2018). Scale-up of industrial microbial processes. *FEMS Microbiology Letters*, 365(13). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny138>
- Da Silva, M. F., de Souza Antônio, C., de Oliveira, P. J., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., de Barros Soares, L. H., & Reis, V. M. (2012). Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. *Plant and Soil*, 356(1), 231-243. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1242-3>
- Deaker, R., Kecskés, M. L., Rose, M. T., Amprayn, K., Krishnen, G., Cuc, T. T. K., Nga, V. T., Cong, P. T., Hien, N. T., & Kennedy, I. R. (2011). *Practical methods for the quality control of inoculant biofertilisers*. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R., & Montville, T. J. (coords.). (2001). *Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras*. Acribia.

- Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Eckert, B., Weber, O. B., Kirchof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., & Hartmann, A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 17-26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-17>
- Herrmann, L., Atieno, M., Brau, L., & Lesueur, D. (2015). Microbial quality of commercial inoculants to increase BNF and nutrient use efficiency. En F. J. de Bruijn (ed.), *Biological nitrogen fixation* (pp. 1.031-1.040). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch101>
- Herridge, D., Gemell, G., & Hartley, E. (2002). Legume inoculants and quality control. *Australian Centre for International Agricultural Research Proceedings*, 109c, 105-115. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.465.1854&rep=rep1&type=pdf>
- Herridge, D. F., & Peoples, M. B. (1990). Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by 15n methods. *Plant Physiology*, 93(2), 495. <https://doi.org/10.1104/pp.93.2.495>
- Herrmann, L., & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 8.859-8.873. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5228-8>
- Icontec. (2018). NTC 5842:2018. Bioinsumos para uso agrícola. Inoculantes biológicos. Requisitos.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2018). *Productos registrados bioinsumos - diciembre 30 de 2018*. <https://es.scribd.com/document/440425803/Productos-Registrados-Bioinsumos-Dic-30-2018>
- Jensen, E. S., Peoples, M. B., Boddey, R. M., Gresshoff, P. M., Hauggaard-Nielsen, H., Alves, B. J. R., & Morrison, M. J. (2012). Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(2), 329-364. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0056-7>
- Kennedy, I. R. (2008). *Efficient nutrient use in rice production in Vietnam achieved using inoculant biofertilisers*. Australian Centre for International Agricultural Research.
- Kumaresan, G., & Reetha, D. (2011). Survival of *Azospirillum brasilense* in liquid formulation amended with different chemical additives. *Journal of Phytology*, 3(10), 48-51. <http://updatepublishing.com/journal/index.php/jp/article/download/2725/2704>
- Kushizaki, M., Ishizuka, J., & Akamatsu, F. (1964). Physiological studies on the nutrition of soybean plants. 2 Effect of nodulation on the nitrogen constituent. *Journal of the Science of Soil and Manure*, 35, 323-327.
- Laranjo, M., Alexandre, A., & Oliveira, S. (2014). Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological Research*, 169(1), 2-17. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.012>
- Lee, S.-K., Lur, H.-S., Lo, K.-J., Cheng, K.-C., Chuang, C.-C., Tang, S.-J., Yang, Z.-W., & Liu, C.-T. (2016). Evaluation of the effects of different liquid inoculant formulations on the survival and plant-growth-promoting efficiency of *Rhodopseudomonas palustris* strain PS3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), 7.977-7.987. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7582-9>
- Lobo, C. B., Juárez Tomás, M. S., Viruel, E., Ferrero, M. A., & Lucca, M. E. (2019). Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research*, 219, 12-25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>
- Lupwayi, N. Z., Olsen, P. E., Sande, E. S., Keyser, H. H., Collins, M. M., Singleton, P. W., & Rice, W. A. (2000). Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Research*, 65(2-3), 259-270. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00091-X)
- Malusá, E., Sas-Paszt, L., & Ciesielska, J. (2012). Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 2012, artículo 491206. <https://doi.org/10.1100/2012/491206>
- Malusá, E., & Vassilev, N. (2014). A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6.599-6.607. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>
- Marcelino, P. R. F., Milani, K. M. L., Mali, S., dos Santos, O. J. A. P., & de Oliveira, A. L. M. (2016). Formulations of polymeric biodegradable low-cost foam by melt extrusion to deliver plant growth-promoting bacteria in agricultural systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(16), 7.323-7.338. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7566-9>
- Miles, A. A., Misra, S. S., & Irwin, J. O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*, 38(6), 732-749. <https://doi.org/10.1017/S002217240001158X>
- Moreno, A. E., Rojas, D. F., & Bonilla, R. R. (2011). Aplicación de diseños estadísticos secuenciales en la identificación de fuentes nutricionales para *Azotobacter chroococcum* AC1. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 151-158. https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:226
- Obando Castellanos, D. M., Burgos Zabala, L. B., Rivera Botía, D. M., Rubiano Garrido, M. F., Bonilla Buitrago, R. R., & Divan Baldani, V. L. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, 15(3), 107-120. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/13529>
- Ohyama, T., & Pham, V. (2006). General methods to evaluate microbial activity. En Japan Atomic Industrial Forum (JAIF, ed.), *Biofertilizer manual* (pp. 3-17). https://www.fnca.mext.go.jp/bf/bfm/pdf/Biofertilizer_Manual.pdf
- Oliveira, A. L. M., Santos, O. J. A. P., Marcelino, P. R. F., Milani, K. M. L., Zuluaga, M. Y. A., Zucareli, C., & Gonçalves, L. S. A. (2017). Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate results in high productivity under low N fertilizer input. *Frontiers in Microbiology*, 8, artículo 1873. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01873>

- Otalora, J., Patiño, M., Martínez, M., & Pedroza, A. (2003). *Estandarización de prueba para la detección de fosfatasa producida por bacterias solubilizadoras de fosfatos* [tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana].
- Perez, J. J., Francois, N. J., Maroniche, G. A., Borrajo, M. P., Pereyra, M. A., & Creus, C. M. (2018). A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria. *Carbohydrate Polymers*, *202*, 409-417. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.084>
- Quiroga-Cubides, G., Díaz, A., & Gómez, M. (2017). Adjustment and scale-up strategy of pilot liquid fermentation process of *Azotobacter* sp. *International Journal of Bioengineering Life Sciences*, *11*(4), 322-330. <https://publications.waset.org/10007055/adjustment-and-scale-up-strategy-of-pilot-liquid-fermentation-process-of-azotobacter-sp>
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, *17*(4-5), 319-339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(99\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00014-2)
- San Juan, A. N., Pérez, J. A., Borges, D., Gómez, E., Pérez, M., Guevara, Y., Serrano, J., Pérez, J., Oliva, L., Casa, M., Martínez, J., Saura, G., Pérez, J. A., & Lorenzo, M. (2013). Escalado de la producción del biofertilizante Nitrofix en la planta de Bioproductos Cuba 10. En Icidca (ed.), *Memorias diversificación 2013*.
- Schoebitz, M., López, M. D., & Roldán, A. (2013). Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *33*(4), 751-765. <https://doi.org/10.1007/s13593-013-0142-0>
- Sethi, S. K., & Adhikary, S. P. (2012). Cost effective pilot scale production of biofertilizer using *Rhizobium* and *Azotobacter*. *African Journal of Biotechnology*, *11*(70), 13.490-13.493. <https://doi.org/10.5897/AJBx11.012>
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, *2*(1), artículo 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Stephens, J. H. G., & Rask, H. M. (2000). Inoculant production and formulation. *Field Crops Research*, *65*(2-3), 249-258. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00090-8)
- Sun, J. S., Jiarong, P., Toan, P. V., Patiyuth, S., Anarna, J. A., & Rahim, K. B. A. (2006). *Quality control of biofertilizers*. En Japan Atomic Industrial Forum (JAIF, ed.), *Biofertilizer manual* (pp. 112-124). https://www.fnca.mext.go.jp/bf/bfm/pdf/Biofertilizer_Manual.pdf
- Tabassum, B., Khan, A., Tariq, M., Ramzan, M., Iqbal Khan, M. S., Shahid, N., & Aaliya, K. (2017). Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Applied Soil Ecology*, *121*, 102-117. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.030>
- Thilakarathna, M. S., & Raizada, M. N. (2017). A meta-analysis of the effectiveness of diverse rhizobia inoculants on soybean traits under field conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, *105*, 177-196. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.022>
- Thompson, A. (1984). *Production and quality control of carrier-based legume inoculants* International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.
- Turner, G., & Gibson, A. (1980). Measurement of nitrogen fixation by indirect means. En F. J. Bergersen (ed.), *Methods for evaluating nitrogen fixation* (pp. 111-138). John Siley and Sons.
- Valero, N. (2003). *Potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fosfatos asociados a cultivos de arroz (Oryza sativa L.)* [tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia].
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, *255*, 571-586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Vose, P. B., Ruschel, A. P., Victoria, R. L., Saito, S. M. T., & Matsui, E. (1982). ¹⁵N as a tool in biological nitrogen fixation research. En P. H. Graham, & S. C. Harris (eds.), *Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture* (pp. 575-592). CIAT.
- Witty, J. F., & Minchin, F. R. (1998). Methods for the continuous measurement of O₂ consumption and H₂ production by nodulated legume root systems. *Journal of Experimental Botany*, *49*(323), 1.041-1.047. <https://doi.org/10.1093/jxb/49.323.1041>
- Yadav, A. K., & Chandra, K. (2014). Mass production and quality control of microbial inoculants. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, *80*(2), 483-489. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2014/v80i2/5>
- Young, C.-C. (2007). Development and application of biofertilizers in the Republic of China. En Asian Productivity Organization (ed.), *Business potential for agricultural biotechnology* (pp. 51-57). https://www.apo-tokyo.org/publications/wp-content/uploads/sites/5/agr-19-bp_abp.pdf

7

Métodos de aplicación de biofertilizantes bacterianos

Luz Estela González de Bashan¹

Manuel Moreno Legorreta¹

Juan Pablo Hernández²

Prabu S.R.³

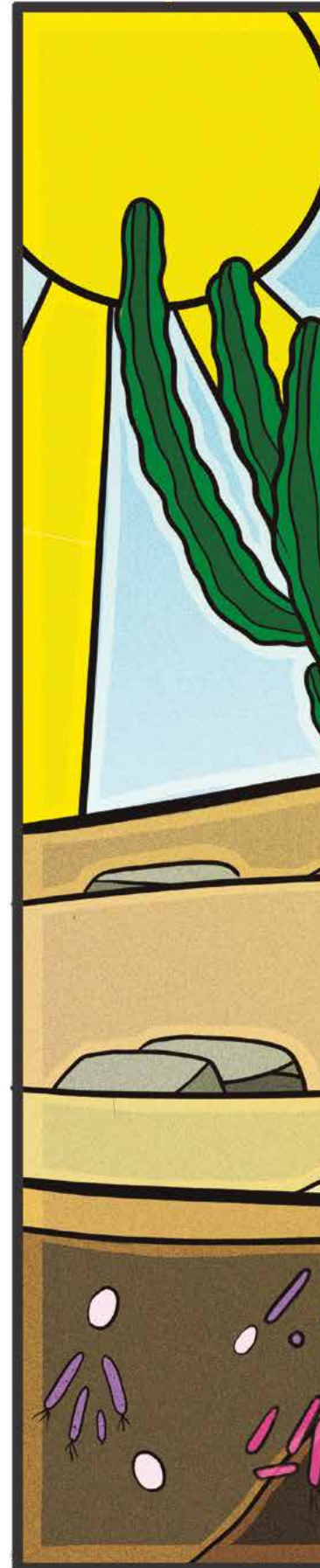
Jonathan Alberto Mendoza Labrador⁴

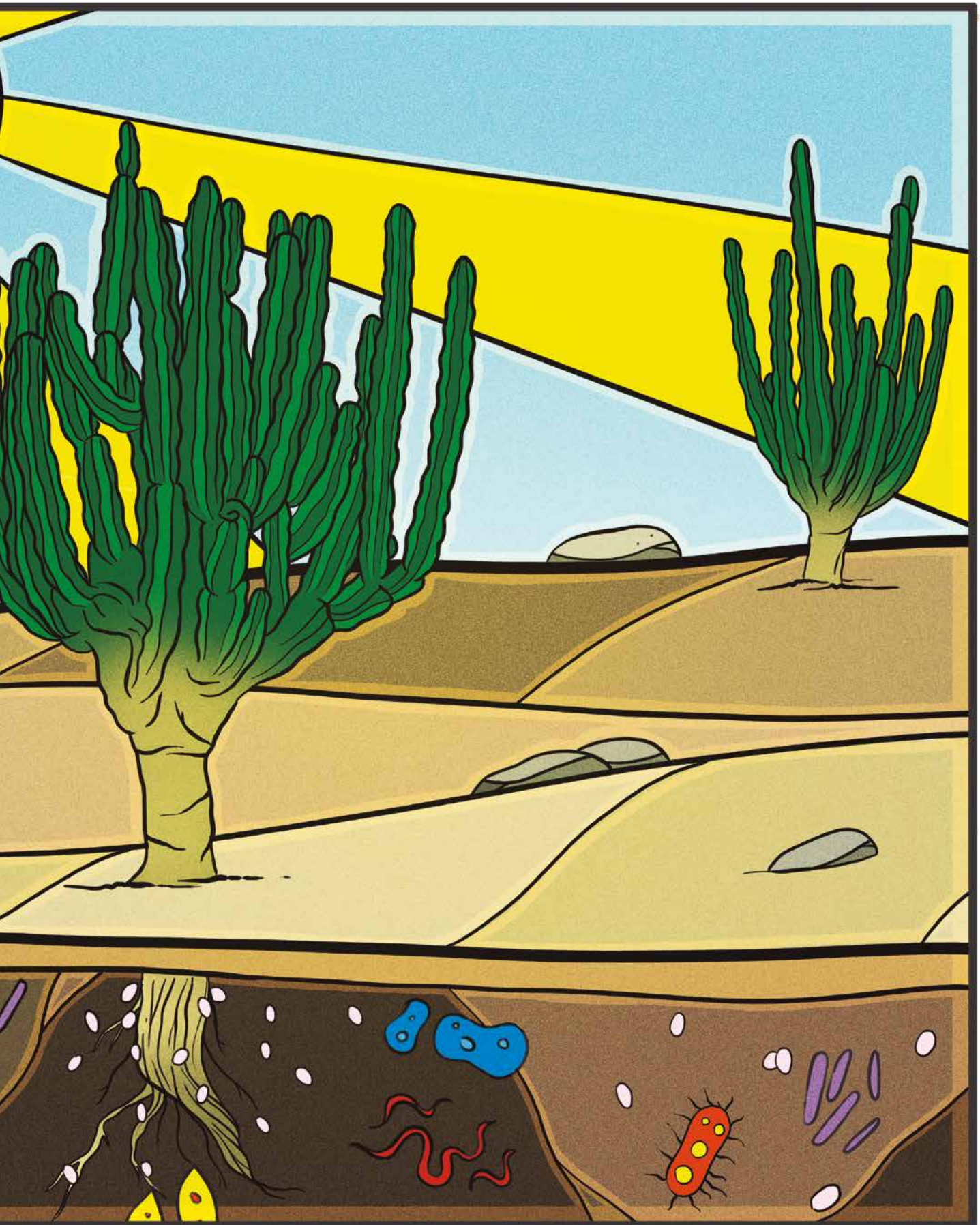
1. Grupo de Microbiología Ambiental, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México.

2. Laboratorio de Investigaciones de Biología INBIBO. Universidad del Bosque. Bogotá. Colombia.

3. Servicio de Investigación Agrícola del Consejo Indio de Investigación Agrícola ICAR. India.

4. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.





Introducción*

La inoculación de plantas con bacterias promotoras del crecimiento (PGPB, por sus siglas en inglés: plant growth promoting bacteria, o PGPR, plant growth promoting rhizobacteria), con el fin de mejorar el rendimiento de cultivos agrícolas, no es una práctica reciente.

El éxito de la inoculación depende tanto de la efectividad de las bacterias utilizadas como de la tecnología empleada para su aplicación. La razón del uso de inoculantes formulados es simple: con la inoculación de bacterias en suspensión aplicada directamente en el suelo, sin una formulación adecuada, la población de bacterias se ve rápidamente diezmada. Este resultado, combinado con una pobre producción de biomasa bacteriana, la dificultad para mantener la actividad bacteriana en la rizósfera y el estado fisiológico de las bacterias en el momento de la aplicación, puede afectar la concentración de PGPB en la rizósfera. Para obtener una respuesta positiva de la planta, es esencial contar con un número mínimo de células viables, el cual difiere según la especie.

La heterogeneidad característica de los suelos es el obstáculo más importante en la inoculación. En algunas ocasiones, las bacterias introducidas pueden encontrar todos los nichos de la rizósfera colonizados por otros microorganismos, por lo que las bacterias introducidas sin protección deben competir con la microflora nativa (a menudo mejor adaptada) y enfrentar la depredación por parte de la microfauna del suelo. Como respuesta, una función importante de cualquier formulación es proporcionar un microambiente más adecuado, así como protección física durante un tiempo prolongado. Las formulaciones empleadas en campo deben diseñarse para proporcionar una fuente confiable de bacterias que puedan sobrevivir en la rizósfera y estar disponibles para los cultivos cuando sea necesario (Bashan et al., 2014; Calvo et al., 2014; Herrmann & Lesueur, 2013).

Debido al uso poco claro en la literatura de los términos *inoculantes*, *biofertilizantes*, *bioplaguicidas*, *portadores* y *formulaciones*, en este capítulo los “aislados bacterianos” se refieren a una cepa bacteriana específica de PGPB/PGPR que puede promover el crecimiento de las plantas después de la inoculación; “portador” se refiere al sustrato abiótico (sólido, líquido o en gel) que se emplea en el proceso de formulación; “formulación” se refiere al proceso de laboratorio o industrial de unificar el portador con la cepa bacteriana, e “inoculante” se refiere al producto final de la formulación que contiene un portador y un agente bacteriano o consorcio de microorganismos.

* Este capítulo está dedicado a la memoria del Prof. Yoav Bashan, quien fue líder en el tema de inoculantes bacterianos, creador del Grupo de Microbiología Ambiental y fundador del Bashan Institute of Science.

Formulaciones de inoculantes

El rendimiento de un inoculante suele ser el talón de Aquiles para su comercialización. Una cepa bacteriana puede funcionar de manera óptima bajo condiciones de laboratorio controladas; sin embargo, la formulación de este microorganismo en un producto asequible para ser utilizado por los agricultores, del cual se esperan resultados similares en condiciones reales de campo, es una tarea difícil, y el fracaso es común (Bashan et al., 2014; Stephens & Rask, 2000). La literatura describe muchos inoculantes probados (Bashan, 1998; Bashan et al., 2014; Calvo et al., 2014), pero los inoculantes comerciales aparecen en muy pocas variaciones. Las siguientes son las formulaciones que se han desarrollado hasta el momento.

Medios de cultivo sin formulación adicional

El antiguo método de inoculación de semillas y plantas con cultivos bacterianos en suspensión aún prevalece. Es una práctica común entre los investigadores porque es el método menos laborioso y más descrito en la literatura.

Inoculantes líquidos

Los inoculantes líquidos son una mejora de los inoculantes "sin formulación", ya que intentan solucionar algunas de las limitaciones enumeradas anteriormente. Básicamente, son simples cultivos o suspensiones bacterianas modificadas con sustancias que pueden mejorar la adherencia, la estabilidad y la capacidad de dispersión (Bashan et al., 2014; Singleton et al., 2002). La principal ventaja de los inoculantes líquidos es que su fabricación se puede realizar fácil y rápidamente en fermentadores, bajo condiciones controladas de laboratorio y con bajos costos de producción en comparación con otros tipos de formulaciones (granulares y poliméricas) (Kumaresan & Reetha, 2011). Por lo tanto, los inoculantes líquidos constituyen un porcentaje significativo de los inoculantes disponibles en el mercado (Lee et al., 2016).



Inoculantes con portadores orgánicos

Sin lugar a duda, la turba es el principal portador de rizobios en América del Norte y del Sur, Europa y Australia, además del principal ingrediente de los inoculantes que se venden en grandes volúmenes. También es adecuada para la mayoría de las otras PGPB o PGPR. Sin embargo, la materia prima es costosa en la mayor parte de Asia y África. Los detalles técnicos del inoculante a base de turba, como el tamaño del grano, el pH, la humedad óptima, la calidad de los inoculantes, los estándares de control de calidad y la salud y seguridad ocupacional, son de dominio público, por lo cual es ampliamente utilizado (Catroux et al., 2001; Deaker et al., 2004; Stephens & Rask, 2000; Xavier et al., 2004).

Las alternativas a la turba como base de los inoculantes han sido el lignito, el carbón, el polvo de bonote, compost de diversos orígenes y composiciones, residuos de caña de azúcar, bagazo, suelos mezclados con varias enmiendas orgánicas y vermiculita. Sin embargo, la mayoría de estos se consideran portadores inferiores a la turba (Bashan, 1998; Singleton et al., 2002). Algunos inoculantes orgánicos hechos de materiales de desecho se han probado con éxito en los últimos años, principalmente en países en desarrollo (Ben Rebah et al., 2007); ejemplos de estas formulaciones se describen en Bashan et al. (2014). Aunque algunos desechos orgánicos pueden tener el mismo o un mejor rendimiento que la turba, la principal limitación es la disponibilidad de suficiente materia prima para su uso industrial. El compost hecho de corcho, bagazo, aserrín, residuos de la cervecería u hojas de plátano puede sostener una pequeña industria de inoculantes local, donde los materiales están disponibles, pero no puede sostener producciones a nivel industrial, especialmente cuando la materia prima de cada lote es variable.

Inoculantes inorgánicos y parcialmente orgánicos

Los inoculantes inorgánicos pueden fabricarse a partir de materiales inorgánicos naturales, polímeros naturales o materiales sintéticos. Aparte de los poliméricos, los inoculantes inorgánicos son la versión más antigua de los inoculantes (véase Bashan, 1998), y algunos otros, como la arcilla y el biochar (carbón quemado a 300 °C),

se han usado experimentalmente para reforestación en zonas semiáridas como portadores potenciales de PGPB/PGPR (Hale et al., 2014; Schoebitz et al., 2014; Stelting et al., 2014). Si bien la mayoría de estos inoculantes se utilizan a pequeña escala para la producción de cultivos, todos los inoculantes poliméricos, hasta donde se sabe, son experimentales; sin embargo, debido a que abren un nuevo enfoque en la formulación, con infinitas variaciones industriales, se describen y discuten en detalle en este capítulo.

Inoculantes poliméricos

Las formulaciones sintéticas basadas en una gran variedad de polímeros se han probado de manera continua durante décadas porque ofrecen ventajas sustanciales sobre la turba y mejores opciones para la producción industrial. Estas ventajas incluyen una vida útil mucho más larga, una supervivencia adecuada en el campo, suficiente densidad celular, facilidad de fabricación y un mejor rendimiento de las plantas en general (Bashan, 1998; Bashan et al., 2014; John et al., 2011). Estos polímeros incluyen alginato, agar, kappa carragenina, pectina, quitosano, goma y varios polímeros patentados.

Todos estos polímeros comparten varios requisitos básicos: 1) son de naturaleza no tóxica y están libres de conservantes dañinos que puedan afectar tanto a las bacterias como a las plantas inoculadas; 2) pueden degradarse lentamente por microorganismos del suelo, con lo cual liberan gradualmente las bacterias en las cantidades necesarias, generalmente en el momento de la germinación de las semillas y la emergencia de las plántulas, sin crear contaminación secundaria; 3) proporcionan una protección física significativa para las bacterias contra competidores del suelo y estreses ambientales (Covarrubias et al., 2012; Cruz et al., 2013; Zohar-Perez et al., 2003); 4) retienen la humedad suficiente para la supervivencia de las bacterias, y 5) se pueden dispersar en agua para permitir el movimiento de las bacterias desde el polímero hasta las plantas, cuando sea necesario.

Otras características positivas de estos inoculantes poliméricos son: 1) brindan la posibilidad de que, una vez secos, puedan ser almacenados en condiciones ambientales favorables durante un tiempo prolongado y sin necesidad de refrigeración; 2) ofrecen la calidad de lote consistente para la fabricación y al mismo tiempo un



mejor ambiente para las bacterias; 3) dan la posibilidad de manipularlos industrialmente para satisfacer las necesidades específicas de las PGPB/PGPR, y 4) brindan la posibilidad de mejorarlos adicionando nutrientes para aumentar la supervivencia a corto plazo de las bacterias tras la inoculación, lo que incrementa el éxito del proceso. Esta última característica es esencial para las PGPB asociativas, que compiten en la rizósfera con microbios nativos.

El principal inconveniente de los inoculantes poliméricos es que las materias primas son relativamente costosas en comparación con la turba, el suelo y los inoculantes orgánicos, y requieren de un manejo industrial con costos similares a los de la industria de la fermentación, por lo que, hasta la fecha, no hay inoculantes poliméricos comerciales disponibles. Sin embargo, estos inoculantes pueden representar la tecnología del futuro. Un aspecto positivo de los inoculantes poliméricos es que siguen siendo del dominio de los laboratorios de investigación y no tienen protección patentada de empresas privadas, por lo cual hay más información disponible en la literatura científica.

Formulaciones encapsuladas

La encapsulación de microorganismos en polímeros (también conocida como *inmovilización*, cuando se usa un microorganismo, o *coimovilización*, cuando se usa más de un organismo) es actualmente experimental en los campos de la tecnología de inoculación de bacterias agrícolas y ambientales. Su uso industrial actual tiene como finalidad atrapar microorganismos vivos en una matriz polimérica mientras se mantiene su viabilidad y funciones biológicas. Posteriormente, el producto final encapsulado (bacteria-polímero) se fermenta en un medio de crecimiento bacteriano, con el fin de obtener productos industriales tales como ácidos orgánicos, aminoácidos, enzimas y vitaminas. Los productos bacterianos deseados se extraen mientras continúa la fermentación. Las células microbianas inmovilizadas son fáciles de producir, almacenar y manipular durante la producción industrial. El objetivo principal de las inmovilizaciones industriales es mantener las células inmovilizadas en

una forma activa, en altas concentraciones, durante el mayor tiempo posible. Las formulaciones de PGPB/PGPR inmovilizadas para aplicaciones agrícolas tienen al menos dos propósitos muy distintos de los de la industria de la fermentación: 1) deben proporcionar protección física temporal para las PGPB/PGPR inmovilizadas en el suelo contra condiciones ambientales estresantes y contra competidores microbianos y depredadores, todos hostiles ante cualquier cambio en la composición biológica del suelo, y, 2) para una colonización de raíces exitosa, deben liberar la cepa PGPB/PGPR gradualmente. La liberación de las bacterias inmovilizadas se produce cuando el polímero se degrada lentamente por los microorganismos nativos del suelo.

Macroesferas de alginato

El uso de macroesferas de alginato (1-4 mm de diámetro) para inmovilizar diversas PGPB/PGPR y hongos micorrízicos es una tecnología ampliamente utilizada. Por ejemplo, *Streptomyces* sp. fue inmovilizado en esferas de alginato-caolina (aluminosilicato), inicialmente mezclando la bacteria con caolina y agregando esta mezcla, después, al alginato, para así formar las esferas; finalmente, las esferas fueron secadas y congeladas. Esta formulación se presentó como un polvo fácil de hidratar al adicionar almidón, talco y más caolina, con el fin de alargar la vida útil del inoculante por más de 14 semanas. Esta formulación permitió producir diversas variaciones en la eficiencia para el control biológico del hongo patógeno del tomate *Rhizoctonia solani* (Sabaratnam & Traquair, 2002).

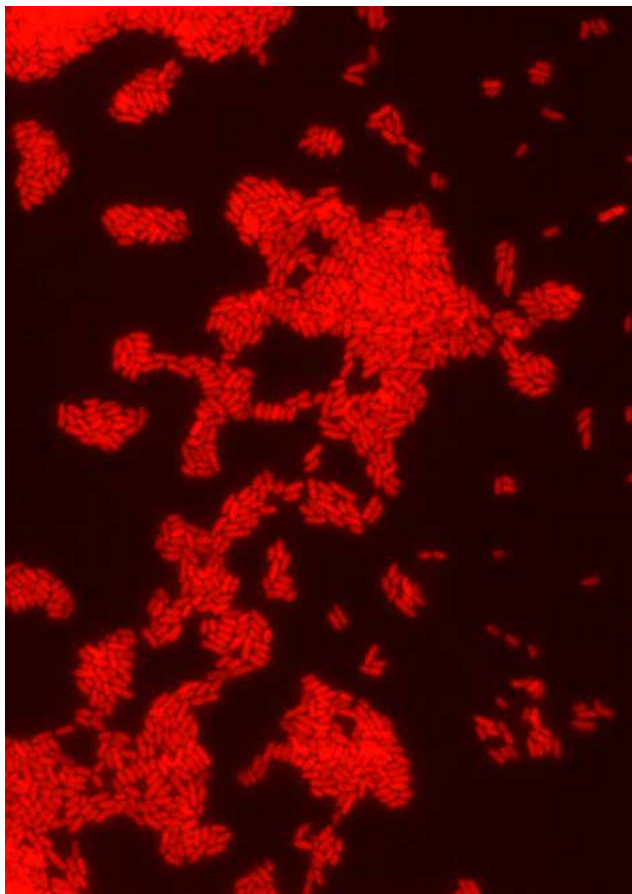
La encapsulación de la PGPB/PGPR *Bacillus subtilis* en esferas de alginato suplementadas con ácidos húmicos permitió aumentar la viabilidad de las bacterias inmovilizadas, con una excelente supervivencia cinco meses después de su almacenamiento. Por otro lado, se presentó una liberación lenta de las bacterias, en medios con diferentes pH, durante un mes, y se comprobó la promoción del crecimiento de lechuga con el uso de estos encapsulados bacterianos (Young et al., 2006). El éxito de esta técnica particular de inmovilización se debe al efecto positivo que tienen los ácidos húmicos sobre microorganismos y plantas, así como a sus propiedades químicas, entre las que se encuentra la facilidad de ser mezclados con el alginato sin que este modifique la formación de las esferas. Uno

de los beneficios que presentan los ácidos húmicos, mezclados con las esferas de alginato, es que sirven como una fuente de carbono para *Pseudomonas putida* y *B. subtilis*, con lo que se promueve la sobrevivencia de los microorganismos durante el tiempo de almacenamiento (Rekha et al., 2007). La bacteria solubilizadora de fosfato *Serratia* sp. inmovilizada demostró ser mucho más eficiente que la misma bacteria sin inmovilizar, pues aumentó el crecimiento de plantas de trigo (Schoebitz et al., 2013). La eficiencia de la PGPR *Raoultella planticola*, inmovilizada y en suspensión, para promover el crecimiento de plantas de algodón bajo estrés salino, mostró que el encapsulado de esta bacteria tiene potencialmente un mayor efecto positivo en comparación con el inoculante en suspensión (Wu et al., 2014).

La inmovilización en esferas de alginato puede extender el tiempo de vida efectiva de las bacterias. Esto se comprobó cuando las PGPB *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*, inmovilizadas en dos tipos de inoculantes de perlas de alginato, lograron ser recuperadas después de que los inoculantes fueron secados y almacenados a temperatura ambiente durante 14 años. Aunque las poblaciones en las perlas habían disminuido, aún sobrevivieron números significativos (10^5 - 10^6 UFC g⁻¹ perlas). Después de inocular plantas de trigo en una cámara de crecimiento, ambas especies colonizaron y aumentaron el crecimiento en igual medida que las que no se habían almacenado (Bashan & Gonzalez, 1999). Vassilev et al. (2001) demostraron que la inoculación de plantas de tomate con el hongo micorrízico arbuscular *Glomus deserticola* y la levadura solubilizadora de fosfato *Yarrowia lipolytica*, coinmovilizados en esferas de alginato, es una técnica muy útil para el establecimiento de plantas en suelos con deficiencia de nutrientes. El cultivo de hongos blancos (*Agaricus bisporus*) mejoró con el inoculante de alginato en suspensión aplicado como soporte, lo que proporcionó un periodo de adaptación (*lag*) más corto y una mayor tasa de crecimiento en compost pasteurizado, en comparación con los soportes líquidos y los soportes convencionales de grano comerciales. La superioridad de este sistema de entrega se atribuye a la alta capacidad de carga de biomasa de las esferas, la protección de los micelios en el microambiente e incluso la distribución espacial de las esferas en el compost (Friel & McLoughlin, 1999).

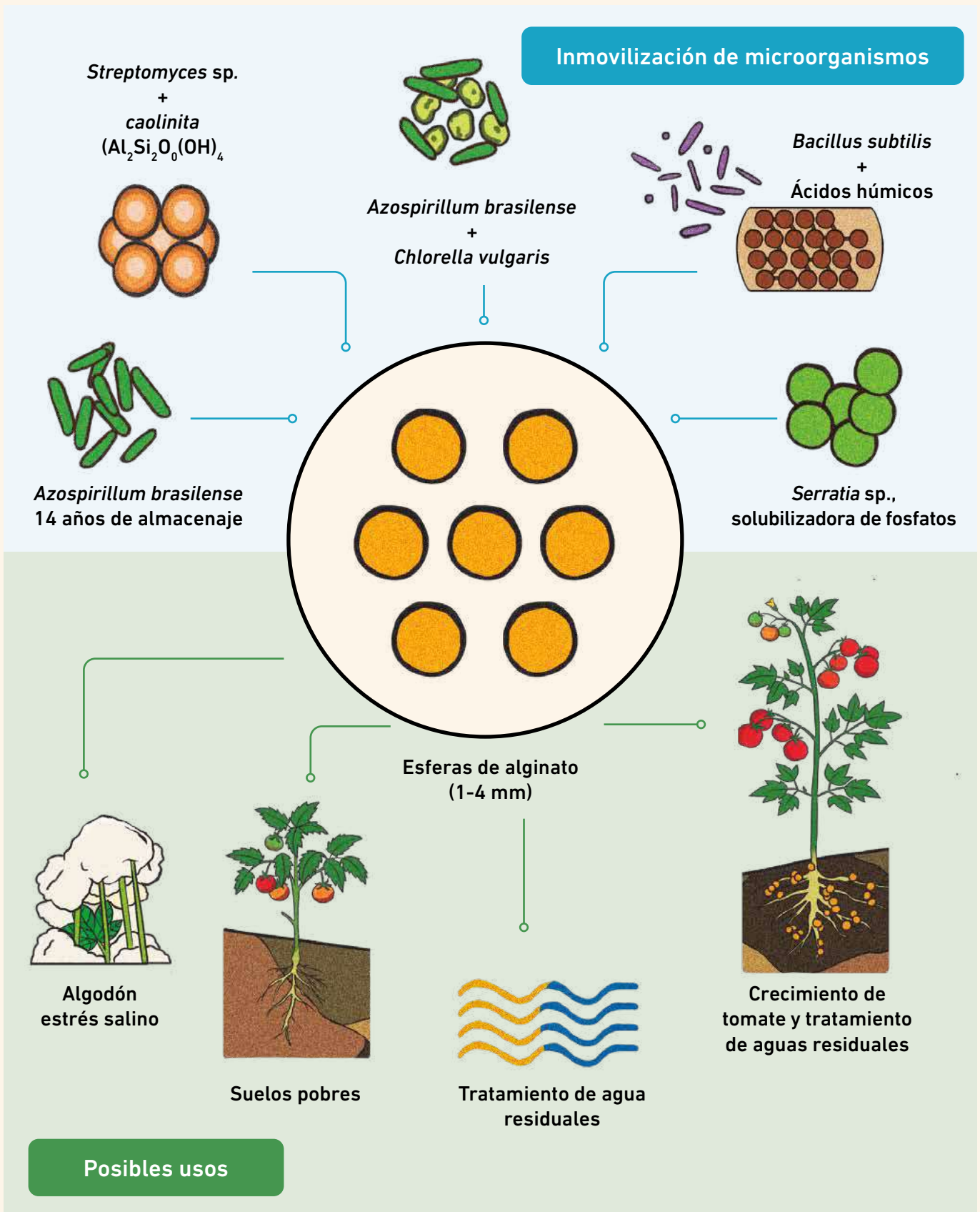
Las esferas de alginato también pueden proporcionar protección contra las altas temperaturas. La formulación de alginato permitió mantener altas poblaciones y supervivencia de las bacterias solubilizadoras de fosfato *Pseudomonas striata* y *Bacillus polymyxa* en temperaturas de almacenamiento de 40 °C (Viveganandan & Jauhri, 2000). Asimismo, varias formulaciones de macroesferas de alginato de *B. subtilis* y *Pseudomonas corrugata* mostraron ser más eficientes que los inoculantes líquidos o los inoculantes a base de carbón para mejorar el crecimiento del maíz cultivado a bajas temperaturas en el Himalaya, en India (Trivedi et al., 2005). Igualmente, la supervivencia de las rizobacterias *Raoultella terrigena* y *A. brasilense* durante la encapsulación se mejoró incorporando almidón en el momento de realizar la preparación de las esferas de alginato, así como adicionando trehalosa, un disacárido, en el medio de cultivo (Schoebitz et al., 2012).

Otra aplicación de los inoculantes de macroesferas de alginato es en el tratamiento de aguas residuales terciarias usando microalgas (de-Bashan & Bashan, 2010; de-Bashan et al., 2015). Para este fin, se puede usar una combinación de microalgas (*Chlorella vulgaris* o *Chlorella sorokiniana*) y una PGPB como *A. brasilense*, las cuales pueden ser coinmovilizadas. Este sistema único elimina los nutrientes, como el fósforo y el nitrógeno, de las aguas residuales municipales. La coinmovilización de la microalga y la bacteria ha mostrado consistentemente valores más altos de remoción de nutrientes en comparación con la inmovilización de la microalga sola (Covarrubias et al., 2012; Cruz et al., 2013; de-Bashan et al., 2002; de-Bashan et al., 2004; Hernandez et al., 2006). Asimismo, la coinmovilización de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* con la bacteria *A. brasilense* resultó en una mayor eliminación de fósforo de las aguas residuales de acuicultura en comparación con la cianobacteria que se encontraba inmovilizada sola (Ruiz-Güereca & Sánchez-Saavedra, 2016). Después de tratar las aguas residuales, las esferas con *C. sorokiniana* y *A. brasilense* se secaron y almacenaron por un año, y posteriormente fueron usadas para incrementar el crecimiento del sorgo y mejorar la fertilidad del suelo desértico erosionado (Lopez et al., 2013; Trejo et al., 2012). De manera similar, Escalante et al. (2015) observaron que la coinmovilización de *A. brasilense* y *C. vulgaris* mejoró el crecimiento de plantas de tomate en condiciones salinas.



Si bien la formulación de alginato puede haber resuelto las dificultades asociadas con los inoculantes de turba comunes (Bashan, 1998), la aplicación de macroesferas de alginato como inoculantes presenta dos desventajas principales: 1) se necesita un tratamiento adicional durante la siembra, incluso si el inoculante es adicionado a una máquina sembradora; 2) las bacterias liberadas del inoculante deben migrar a través del suelo hacia las plantas. Bajo las prácticas agrícolas típicas, cuando las esferas se mezclan con las semillas y se siembran juntas, aquellas pueden caer alejadas de las semillas unos pocos centímetros, y las bacterias que se liberan de las esferas deben moverse a través del suelo y enfrentar, allí, la competencia y la depredación con la microflora nativa, que a menudo es más agresiva y está mejor adaptada al suelo que la PGPB/PGPR agregada. A veces, la ausencia de una película continua de agua, esencial para tal movimiento, es un factor limitante. Estas distancias, que son grandes a escala microbiana, pueden resultar difíciles para muchas PGPB/PGPR agregadas, incluso para *Azospirillum*, que se ha comprobado que presenta una alta movilidad en el suelo (figura 7.1) (Bashan & Holguin, 1994; Bashan & Levany, 1987).

■ **Figura 7.1.** Inmovilización de dos microorganismos en el suelo.
 Fuente: Elaboración propia





Las microesferas de alginato (50-200 μm de diámetro, aproximadamente) fueron desarrolladas para superar las dos dificultades fundamentales de las macroesferas.

Microesferas de alginato

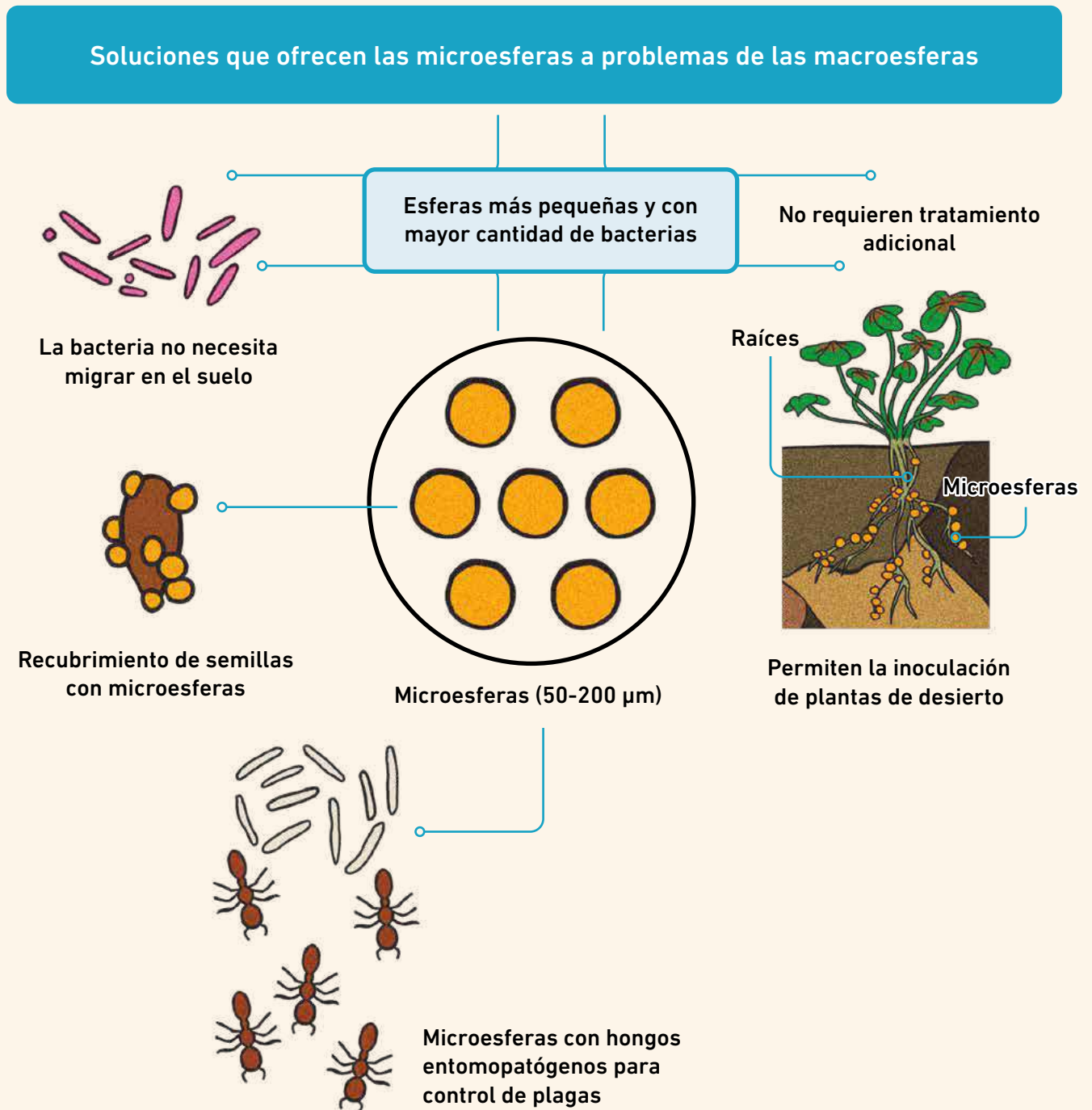
El mecanismo considera que, si las esferas son lo suficientemente pequeñas, pero capaces de encapsular un número suficiente de bacterias, es posible producir una formulación “en polvo” muy parecida a los inoculantes de turba. Las semillas se pueden recubrir con el polvo de esferas en la planta de manejo de semillas y ser vendidas a los agricultores como “semillas mejoradas”. Las semillas recubiertas con fertilizantes, fungicidas u hormonas son comunes y aceptadas por la mayoría de los agricultores. En países desarrollados, con prácticas agrícolas a gran escala, las semillas prerrecubiertas eliminan un tratamiento de campo adicional y brindan comodidad a los agricultores. A pesar de este beneficio significativo, el prerrecubrimiento de semillas con PGPB/PGPR no es una tarea fácil a nivel industrial, si consideramos los problemas antes mencionados. Algunos de los compuestos usados para realizar el recubrimiento pueden ser tóxicos o no son compatibles con las PGPB/PGPR, por lo que hasta ahora solo se han realizado experimentos a pequeña escala. Sin embargo, una idea de formulación similar, pero con un inoculante de turba, se ha aplicado comercialmente durante mucho tiempo como una preinoculación de leguminosas forrajeras, como la alfalfa. La turba que contiene la PGPB/PGPR se aplica a las semillas como suspensión, y después se agrega un adhesivo para que las semillas inoculadas se cubran con carbonato de calcio finamente molido (Brockwell, 1977).

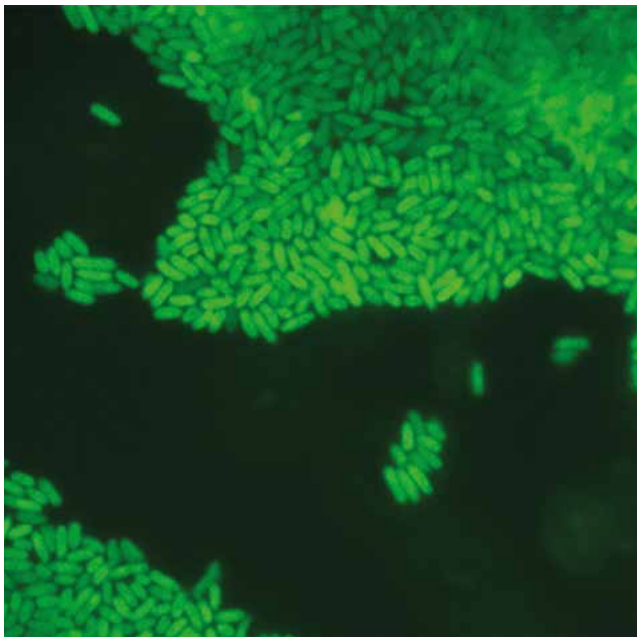
La producción de microesferas de alginato es relativamente simple e implica la pulverización a baja presión a través de una boquilla con orificios muy pequeños, lo que da como resultado gotas con un diámetro en micras de una solución de alginato, en la cual se encuentra mezclado un cultivo bacteriano

suspendido y un medio líquido enriquecido. Estas gotas se solidifican inmediatamente, formando las microesferas, mientras que se van pulverizando en una solución de CaCl_2 ; este sistema crea esferas con diámetros que oscilan entre 100 y 200 μm y en las que se pueden llegar a inmovilizar entre 10^8 y 10^{10} UFC g^{-1} de bacterias (Bashan et al., 2002), cifra similar a los niveles de población inmovilizados en las macroesferas de alginato (Campos et al., 2014).

Existen equipos especializados para la producción de estas microesferas de alginato (Bashan et al., 2002), pero una alternativa simple, que permite su producción sin la necesidad de estos equipos, es moler láminas sólidas y secas de alginato, para producir el polvo que contenga las PGPB/PGPR, y posteriormente usar algún tipo de adhesivo agrícola que permita el recubrimiento de las semillas (figura 7.2).

- **Figura 7.2.** Soluciones que ofrecen las microesferas a problemas de las macroesferas.
Fuente: Elaboración propia





Futuras mejoras de las microesferas de alginato

Actualmente, la inmovilización de microorganismos se ha empleado en campos de investigación más amplios, como la alimentación, la farmacología, la nanotecnología y los cosméticos. En consecuencia, en el sector agrícola se han propuesto varias mejoras técnicas derivadas de estos campos, con el objetivo de hacer que el polímero sea más adecuado para la inmovilización de materiales biológicos. Aunque estas técnicas no están relacionadas con los inoculantes agrícolas, ofrecen perspectivas para desarrollos futuros (John et al., 2011; Schoebitz et al., 2013). Algunos ejemplos que tienen potencial para la producción de inoculantes son: 1) crear un complejo *avidin*-biotina. La biotina, acoplada covalentemente con el alginato en una reacción de fase acuosa, combina las ventajas del gelificante de alginato para proporcionar un ambiente suave, hidratado y altamente poroso (Polyak et al., 2004). 2) Reforzar la superficie de los hidrogeles de alginato con varios polímeros secundarios, para mejorar la resistencia mecánica y la estabilidad, con el fin de retrasar su degradación en el suelo (Nussinovitch, 2010); algunos ejemplos de aditivos que refuerzan los geles son la polietilimina (Kong & Mooney, 2003), el ácido poliacrílico (Gaumann et al., 2000) y el quitosano (Wang et al., 2001). 3) Formar esferas con una estructura de poro interconectada en alginato, para mejorar el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos, mediante la incorporación de bolsas de gas dentro de las esferas (Eiselt et al., 2000).

En resumen, según experimentos de las últimas tres décadas, el alginato es el polímero más prometedor. Sin embargo, dada la escasa bibliografía disponible sobre microesferas de alginato ligadas a proyectos agrícolas, es prematuro predecir si el alginato desplazará a la turba como el principal inoculante agrícola, si permanecerá en el área de la microbiología industrial y ambiental o, incluso, si el material es económico en comparación con otros polímeros.

Inoculantes poliméricos con otros materiales

Irónicamente, aunque los preparados comerciales de alginato aún no están disponibles para PGPB/PGPR, varios otros polímeros que se utilizan en microbiología industrial y ambiental pueden considerarse como sustitutos cuando los microorganismos fallan al adaptarse a preparaciones de alginato. A pesar de que todos los materiales son todavía experimentales, vale la pena mencionarlos para fomentar más investigación sobre estos portadores potenciales. Los casos anteriores se enumeran en Bashan (1998) y Bashan et al. (2014).

La formulación con quitosano como portador para varias PGPR se mezcló con un medio de crecimiento mineral como un control biológico exitoso contra el virus del mosaico del pepino en el tomate (Murphy et al., 2003). Se prepararon cinco PGPB en varias formulaciones de polímeros compuestos de almidón carboximetilcelulosa, y estas mantuvieron las cepas bacterianas en grandes cantidades durante 60-120 días de almacenamiento, además de que fueron eficaces para promover el crecimiento de cortes de caña de azúcar (Da Silva et al., 2012). La PGPB *P. fluorescens* fue formulada con tres polímeros: copolímero de ácido metacrílico (película comercial), etilcelulosa y un almidón modificado. La mejor formulación fue el polímero comercial, pues las bacterias sobrevivieron por un año, efecto que se relacionó con la humedad residual de las microesferas (la mayor supervivencia de las bacterias se produjo cuando la humedad residual fue del ~25 %); sin embargo, este inoculante no se probó en plantas (Amiet-Charpentier et al., 1998). Aun con estos resultados, con información tan limitada sobre estos portadores, es imposible predecir su futuro como inoculantes bacterianos.



Portadores poliméricos secos

El objetivo principal de inmovilizar PGPB/PGPR para usos agrícolas es aumentar la vida útil, en lugar de mantener un alto conteo bacteriano, ya que el número de microorganismos disminuye durante el almacenamiento. Desde el punto de vista comercial y agrícola, una mayor supervivencia de las bacterias en estas preparaciones poliméricas hace que las formulaciones secas sean extremadamente atractivas.

Varios estudios han probado inoculantes de alginato seco. Una formulación de microesferas con *A. brasilense* seco se adhirió fácilmente a la superficie de las semillas al añadir lecitina o un adhesivo sintético. Los inoculantes secos mejoraron el desarrollo de plántulas de trigo y tomate (peso seco y altura de las plantas) cultivadas en suelo infértil y fueron biodegradados en 15 días en suelo húmedo (Bashan et al., 2002). Igualmente, una formulación de microesferas similar fue utilizada para la reforestación de un desierto con árboles leguminosos (Bashan, Salazar, & Puente, 2009; Bashan, Salazar, Puente, et al., 2009; Bashan et al.,

2012). La eficacia de las esferas de alginato liofilizado se probó con una cepa agrícola de *Pantoea agglomerans*. Las esferas secas fueron complementadas con glicerol y quitina, con el fin de mejorar la supervivencia bacteriana durante el proceso de liofilización. Estas perlas fueron capaces de proteger mejor la PGPB/PGPR aplicada al suelo que la suspensión bacteriana (Zohar-Perez et al., 2002). El recubrimiento de semillas secas con varias formulaciones de alginato, ya sea solo o con aditivos de salvado y de quitina, pero sin PGPB, no afectó la viabilidad o el porcentaje de germinación de las semillas de trigo, albahaca, col y rábano (Sarrocchio et al., 2004); sin embargo, el alginato de sodio, suministrado como aditivo a la formulación líquida sin polimerización, aumentó significativamente la vida útil de *Sinorhizobium meliloti* (Tarek et al., 2014). Además, esferas secas hechas con una mezcla de alginato y bentonita fueron muy eficientes en la liberación lenta de la PGPR *Raoultella planticola*, pero esta formulación no fue probada en las plantas. Otra combinación de alginato con proteína de guisante demostró proteger a la bacteria *B. subtilis* en el suelo (Gagné-Bourque et al., 2015).

Vida útil de los inoculantes

Mantener la vida útil de los inoculantes durante un determinado tiempo, conservando sus características biológicas intactas, es un desafío importante para cualquier tipo de formulación.

Por ahora, las soluciones más comunes a este problema han sido 1) reducir la humedad en la formulación, para que permanezca seca (secándola en un lecho fluidizado, secando al aire o liofilizando), o 2) almacenarla bajo refrigeración. En formulaciones completamente secas, las bacterias permanecen en forma latente, y su metabolismo es muy lento o, incluso, está detenido; de esta forma, son resistentes al estrés ambiental, son más compatibles con las aplicaciones de fertilizantes en campo y se reduce la posibilidad de contaminación.

La principal dificultad con las formulaciones poliméricas secas es mantener la viabilidad celular o la vida útil de los microorganismos, debido a tres factores que deben soportar: estrés por la inmovilización, estrés por la desecación y estrés por la rehidratación antes de la aplicación a las raíces de las plantas. Además, durante el estrés y el tiempo de almacenamiento, la tasa de mortalidad alcanza más del 90 % de la población microbiana incorporada en el punto de inicio, como resultado del proceso de fermentación. Asimismo, la fase más crítica y estresante para los microorganismos durante el proceso de formulación es, quizás, la deshidratación. Este proceso es particularmente difícil para las bacterias Gram-negativas que no forman esporas, que son la mayoría de las especies de PGPB/PGPR. Inclusive, un estrés adicional por hidratación en las células se produce cuando las bacterias se reactivan en el momento de la inoculación. Igualmente, la vida útil de los inoculantes formulados se puede afectar por diversos factores, como el medio de cultivo utilizado para la producción de biomasa de PGPB/PGPR, el estado fisiológico de las bacterias cuando se extraen del medio, el proceso de inmovilización celular, el uso de materiales de protección, el tipo de procedimiento de secado y la velocidad de deshidratación. El secado durante la formulación es un paso crucial. La mayor tasa de mortalidad se produce poco después de la fabricación, durante el almacenamiento o inmediatamente después de la aplicación a las semillas o al suelo (Date, 2001). Sin embargo, si se deshidrata correctamente, la vida útil de la formulación seca es mucho más larga que la de cualquier inoculante húmedo.

Una comparación entre varias formulaciones orgánicas, inorgánicas y poliméricas con dos PGPB demostró que *B. subtilis* sobrevivió a una temperatura ambiente de 22 °C durante 45 días, pero *Pseudomonas putida* requirió refrigeración a 0 °C, dependiendo del tipo de soporte utilizado (Amer & Utkhede, 2000). Rizobios almacenados a 25 °C, utilizando como soportes el compost de corcho irradiado con rayos gama (γ) y perlita estéril, permanecieron estables durante un periodo de 90 a 120 días. Igualmente, los inoculantes compuestos de dos arcillas preservaron una alta población bacteriana durante más de 5 meses (Albareda et al., 2008), lo que también es típico de los inoculantes poliméricos, que son esencialmente estériles.

La literatura comercial que se encuentra en internet muestra que la vida útil deseable en condiciones de almacenamiento para inoculantes de turba es de uno a dos años, aunque en la práctica esto no es cierto para muchos de los inoculantes de PGPB/PGPR contemporáneos. Al respecto, la vida útil es más larga para inoculantes poliméricos y sintéticos. Trejo et al. (2012) reportaron que el inoculante de esferas secas de alginato que contienen *A. brasilense* fue almacenado a temperatura ambiente durante un año y mantuvo el efecto de promoción del crecimiento vegetal de *A. brasilense* inmovilizado cuando fue inoculado en plantas de sorgo, con diferencias significativas; posteriormente, las poblaciones de *A. brasilense* dentro de las perlas secas disminuyeron con el tiempo. Del mismo modo, se encontraron datos idénticos en un inoculante de alginato-almidón: el 76% de las células viables de *A. brasilense* sobrevivieron a más de un año de almacenamiento (Schoebitz et al., 2012). Asimismo, se mostró un tiempo de supervivencia de tres años, sin perder la viabilidad, de las bacterias *B. subtilis* y *Pseudomonas corrugata* inmovilizadas en esferas húmedas de alginato a una temperatura de 4 °C (Trivedi

& Pandey, 2008). Por último, el tiempo de supervivencia más largo, sin perder eficacia, fue de 14 años, para las cepas *A. brasilense* y *P. fluorescens* inmovilizadas en esferas de alginato secas (Bashan & Gonzalez, 1999).

En resumen, el éxito de una formulación en inoculantes se refleja en poder garantizar una viabilidad celular durante un periodo de tiempo aceptable, para poder asegurar una inoculación exitosa en las raíces de las plantas y en las semillas. Actualmente, para mantener una buena estabilidad celular en inoculantes, se están utilizando aditivos que pueden mantener el crecimiento de las bacterias y, de esta manera, ayudar a prolongar la vida útil del inoculante en almacenamiento. Entre los aditivos más utilizados, se encuentran 1) polímeros naturales, como carragenina, goma arábica, goma xantana, gelatina, alginato, entre otros, y 2) polímeros sintéticos, como alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona (PVP), aceite hortícola, glicerol y monodisacáridos (como la glucosa y la lactosa) (Lobo et al., 2019). Sin embargo, Bashan et al. (2014) reportaron mejores resultados de prolongación de la vida útil de los inoculantes cuando se emplearon formulaciones poliméricas secas.



Productos emergentes innovadores: productos microbianos sin células

Las limitaciones inherentes de los inoculantes basados en células vivas siguen siendo un fuerte cuello de botella en la aplicación generalizada de bioproductos y continúan retrasando la comercialización y el uso de PGPB/PGPR en una escala mayor. Evidentemente, existe un creciente interés en producir y comercializar bioproductos que no se vean afectados por las condiciones del suelo y el clima y que sean capaces de lograr un rendimiento constante. Actualmente están surgiendo “inoculantes” hechos de fragmentos activos y metabolitos de PGPB/PGPR en ausencia de células vivas. Además, en la última década se han documentado la utilización de inductores para activar el mecanismo de defensa de las plantas y la producción de metabolitos secundarios producidos a partir de PGPB/PGPR. Estos productos microbianos se producen comercialmente y tienen potencial como “inoculantes” para reducir el uso de agroquímicos (Compant et al., 2013). Asimismo, existe una tendencia creciente en el número de productos microbianos comerciales sin células, basados únicamente en metabolitos secundarios, que pueden integrarse con las prácticas culturales de los agricultores y generalmente no se ven afectados por las condiciones del suelo o del clima.

Veselova et al. (2019) mostraron que *Bacillus subtilis* Cohn (cepa 26 D) y *Bacillus thuringiensis* Berliner (cepas V-6066 y V-5689) son capaces de suprimir la actividad viral del pulgón (*Schizaphis graminum* Rond.) en plantas de trigo, posiblemente debido a metabolitos secundarios producidos que activan rutas metabólicas (aún no muy claras) que ayudan a la inducción de resistencia sistémica en las plantas frente a un patógeno. Además, se conoce que los rizobios secretan lipoquitooligosacáridos (LCO), los cuales son factores de nodulación que inducen la formación de nódulos en raíces de leguminosas (Truchet et al., 1991). Aunque, los LCO son moléculas de señalización importantes en la interacción planta-simbionte, estos pueden afectar directamente el crecimiento y desarrollo de las plantas no leguminosas (Prithiviraj et al., 2003; Tanaka et al., 2015). Productos comerciales a base de LCO para aplicaciones foliares y en semillas de leguminosas y no leguminosas se encuentran disponibles en Norteamérica. Del mismo modo, hormonas producidas, exopolisacáridos (EPS) y LCO producidos a partir de rizobios tienen una vida útil de 24 meses. Este producto mejoró los rendimientos de soya y maíz, y está registrado para su uso en Brasil (Marks et al., 2013). Además, se sabe que los LCO mejoran la simbiosis de las plantas con hongos micorrízicos arbusculares (Xie et al., 1995).

Por todo esto, se esperan usos más prácticos de este metabolito secundario en los próximos años.

Perspectivas hacia el futuro

Aunque la opinión predominante en muchas compañías que producen PGPB/PGPR es que la formulación es una cuestión secundaria y rápida de desarrollar una vez que se selecciona la PGPB/PGPR correctamente, el desarrollo de nuevas formulaciones para la inoculación de estas bacterias y rizobios es un proceso muy lento y consume recursos. La creación de nuevas formulaciones es un desafío en la microbiología práctica, y los atajos generalmente conducen al fracaso del inoculante en el campo. Así, las mejoras en las formulaciones son clave para el desarrollo de inoculantes mejorados de alta calidad.

Los siguientes temas deben ser las principales prioridades de la investigación sobre sistemas de administración nuevos o mejorados para PGPB/PGPR y rizobios, excluyendo las formulaciones de turba, que ya han alcanzado su punto máximo:

- Evaluación más precisa de portadores conocidos. Periódicamente, una nueva formulación, que involucra un portador conocido, como alginato o inoculante líquido, que contiene un suplemento, se presenta como una solución para todas las enfermedades de los portadores anteriores.
 - Mejora de las formulaciones que mostraron resultados positivos en campo, lo que requiere un ajuste fino de los ingredientes clave (cantidades, condiciones y proporción de mezclas) o mejoras en el proceso de producción. Aunque se supone que la evaluación es realizada por la industria, no se dispone de información específica.
 - Mejora de la supervivencia de la PGPB/PGPR en el inoculante. La reducción del declive de la población de la PGPB/PGPR durante la formulación y la aplicación debe ser un objetivo importante de la investigación. Si la mortalidad celular se reduce significativamente, puede ser posible aumentar el número de células aplicadas por semilla en dos o tres órdenes de magnitud. Esto incluye la edad fisiológica de las células (fase de crecimiento) y la
- humedad relativa durante el almacenamiento, que depende de la especie. El proceso de deshidratación y la optimización de la tasa de rehidratación deben ser, igualmente, un objetivo de investigación.
- Vida útil de la formulación. Esta es una preocupación comercial esencial porque el tiempo de aplicación en campo es corto, mientras que el tiempo de producción de grandes cantidades en la fábrica es largo, y por lo general este proceso no se puede hacer poco antes de la aplicación. Mantener la eficacia de la formulación durante dos años sería óptimo.
 - Inoculantes de múltiples cepas y combinación de inoculantes que contienen rizobios y una PGPB/PGPR. Numerosos estudios han demostrado las ventajas de estas combinaciones, generalmente demostradas solo en laboratorio, sin ninguna formulación. Si bien la formulación de varios microorganismos no agrega dificultades técnicas significativas en comparación con la formulación de un microorganismo, la interacción de los componentes dentro de estas formulaciones es en gran parte desconocida. El desarrollo de estos consorcios de inoculantes requiere exploraciones con respecto a 1) compatibilidad entre poblaciones microbianas, 2) simbiosis o interacción con las plantas, 3) eficiencia de los aspectos que promueven el crecimiento de las plantas, 4) tasa de crecimiento de estas cuando están juntas, 5) potencial de formación de biopelículas y 6) dificultades técnicas en el cultivo de microorganismos en un fermentador, donde cada uno tiene diferentes requerimientos nutricionales u otras condiciones de cultivo *in vitro*.
 - Aditivos para muchas formulaciones. Si bien estos ya son un hecho, los estudios de aditivos utilizados en las formulaciones se han realizado de forma *ad hoc* y son en gran medida empíricos. Además, rara vez se entiende su modo de acción. Esta parte del proceso de formulación es un campo virgen y merece más atención.
 - Inoculantes poliméricos. Aunque muchos estudios han señalado que este es el futuro de los inoculantes, ninguna de estas formulaciones para PGPB/PGPR o rizobios ha superado el umbral de aprobación industrial. La inmovilización de microorganismos

es un gran campo emergente en farmacéutica, nanotecnología, medicina, acuicultura y cosmética, para lo cual se han desarrollado muchas técnicas de inmovilización diferentes y eficientes (Bioencapsulation, 2020; Schoebitz et al., 2013).

- Esfuerzo necesario para el agricultor. Es difícil que las prácticas agrícolas comerciales cambien significativamente, incluso para adaptarse a una tecnología que ofrezca un inoculante de alta calidad. En consecuencia, el objetivo debe ser crear formulaciones que sean más amigables con el agricultor, como lo son algunos de los inoculantes contemporáneos. El mejor enfoque será el de aquellas formulaciones que no impliquen un esfuerzo adicional por parte del agricultor.
- Cepas locales. Las cepas locales deben usarse para mejorar el rendimiento, porque ninguna cepa de *PGPB/PGPR* puede rendir mejor en todas las condiciones de cultivo. Dado que la efectividad de la inoculación depende de múltiples factores, incluidas las especies de plantas objetivo y las condiciones climáticas y del suelo, los inoculantes, en teoría, también deben diferenciarse y combinarse de manera adecuada para las condiciones de cultivo, siempre cambiantes.
- Lipopéptidos. Varias *PGPR* producen lipopéptidos con actividad biosurfactante (Raaijmakers et al.,

2010) que inhiben directamente los patógenos y proporcionan resistencia sistémica inducida en los cultivos (Ongena et al., 2007; Ongena & Jacques, 2008). Hay posibilidades de desarrollar productos de lipopéptidos libres de células y biofungicidas en los que parte de la eficiencia del producto se deba a los lipopéptidos suministrados junto con las células vivas, aunque se requiere más exploración de los metabolitos microbianos para obtener más beneficios de estas *PGPB/PGPR*.

- Microbiomas. Los estudios de microbiomas solo han producido hasta el momento conocimientos fundamentales sobre la complejidad de las comunidades microbianas. Se han aislado cepas microbianas beneficiosas capaces de cambiar de manera beneficiosa la estructura de la comunidad microbiana del suelo (Kang et al., 2013; Lopez et al., 2013), pero esta información fundamental aún debe servir como base para la próxima generación de inoculantes (Berg et al., 2013; Berg et al., 2014; Massart et al., 2015).

En resumen, la formulación y aplicación de los inoculantes en campo es una plataforma tecnológica pura que se basa en los principios fundamentales de la microbiología y las ciencias de los materiales. La unión de estos campos permite la creación de productos útiles que continuarán siendo un insumo importante en la agricultura sostenible y en soluciones ambientales correctivas.



Referencias

- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Camacho, M., & Temprano, F. J. (2008). Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2.771-2.779. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.021>
- Amer, G. A., & Utkhede, R. S. (2000). Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(9), 809-816. <https://doi.org/10.1139/w00-063>
- Amiet-Charpentier, C., Gadille, P., Digat, B., & Benoit, J. P. (1998). Microencapsulation of rhizobacteria by spray-drying: Formulation and survival studies. *Journal of Microencapsulation*, 15(5), 639-659. <https://doi.org/10.3109/02652049809008247>
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4), 729-770. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(98\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(98)00003-2)
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J.-P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, 378(1), 1-33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Bashan, Y., & Gonzalez, L. E. (1999). Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(2), 262-266. <https://doi.org/10.1007/s002530051391>
- Bashan, Y., Hernandez, J.-P., Leyva, L. A., & Bacilio, M. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 35(5), 359-368. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0481-5>
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1994). Root-to-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 2.120-2.131. <http://aem.asm.org/content/60/6/2120.abstract>
- Bashan, Y., & Levanony, H. (1987). Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. *Journal of General Microbiology*, 133(12), 3.473-3.480. <https://doi.org/10.1099/00221287-133-12-3473>
- Bashan, Y., Salazar, B., & Puente, M. E. (2009). Responses of native legume desert trees used for reforestation in the Sonoran Desert to plant growth-promoting microorganisms in screen house. *Biology and Fertility of Soils*, 45(6), 655-662. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0368-9>
- Bashan, Y., Salazar, B., Puente, M. E., Bacilio, M., & Linderman, R. (2009). Enhanced establishment and growth of giant cardon cactus in an eroded field in the Sonoran Desert using native legume trees as nurse plants aided by plant growth-promoting microorganisms and compost. *Biology and Fertility of Soils*, 45(6), 585-594. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0367-x>
- Bashan, Y., Salazar, B. G., Moreno, M., Lopez, B. R., & Linderman, R. G. (2012). Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *Journal of Environmental Management*, 102, 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.12.032>
- Ben Rebah, F., Prévost, D., Yezza, A., & Tyagi, R. D. (2007). Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology*, 98(18), 3.535-3.546. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.066>
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: Looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5, artículo 148. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00148>
- Berg, G., Zachow, C., Müller, H., Philipps, J., & Tilcher, R. (2013). Next-generation bio-products sowing the seeds of success for sustainable agriculture. *Agronomy*, 3(4), 648-656. <https://doi.org/10.3390/agronomy3040648>
- Brockwell, J. (1977). Application of legume seed inoculants. En R. W. Hardy, & W. Silver (eds.), *A treatise on dinitrogen fixation. Section III, Biology* (pp. 277-309). Wiley and Sons.
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383(1-2), 3-41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Campos, D. C., Acevedo, F., Morales, E., Aravena, J., Amiard, V., Jorquera, M. A., Inostroza, N. G., & Rubilar, M. (2014). Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(9), 2.371-2.378. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1662-8>
- Catroux, G., Hartmann, A., & Revellin, C. (2001). Trends in rhizobial inoculant production and use. *Plant and Soil*, 230(1), 21-30. <https://doi.org/10.1023/A:1004777115628>
- Compant, S., Brader, G., Muzammil, S., Sessitsch, A., Lebrhi, A., & Mathieu, F. (2013). Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *BioControl*, 58(4), 435-455. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9479-6>
- Covarrubias, S. A., de-Bashan, L. E., Moreno, M., & Bashan, Y. (2012). Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), 2.669-2.680. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3585-8>
- Cruz, I., Bashan, Y., Hernández-Carmona, G., & de-Bashan, L. E. (2013). Biological deterioration of alginate beads containing immobilized microalgae and bacteria during tertiary wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(22), 9.847-9.858. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4703-6>

- Da Silva, M. F., de Souza Antônio, C., de Oliveira, P. J., Xavier, G. R., Rumjanek, N. G., de Barros Soares, L. H., & Reis, V. M. (2012). Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. *Plant and Soil*, 356(1), 231-243. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1242-3>
- Date, R. A. (2001). Advances in inoculant technology: A brief review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41(3), 321-325. <https://doi.org/10.1071/EA00006>
- Deaker, R., Roughley, R. J., & Kennedy, I. R. (2004). Legume seed inoculation technology—A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1.275-1.288. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.009>
- De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(6), 1.611-1.627. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>
- De-Bashan, L. E., Hernandez, J. P., & Bashan, Y. (2015). Interaction of *Azospirillum* spp. with microalgae: A basic eukaryotic-prokaryotic model and its biotechnological applications. En F. D. Cassán, Y. Okon, & C. M. Creus (eds.), *Handbook for Azospirillum: Technical issues and protocols* (pp. 367-388). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06542-7_20
- De-Bashan, L. E., Hernandez, J.-P., Morey, T., & Bashan, Y. (2004). Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: A novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Research*, 38(2), 466-474. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.09.022>
- De-Bashan, L. E., Moreno, M., Hernandez, J.-P., & Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*, 36(12), 2.941-2.948. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00522-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00522-X)
- Eiselt, P., Yeh, J., Latvala, R. K., Shea, L. D., & Mooney, D. J. (2000). Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. *Biomaterials*, 21(19), 1.921-1.927. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00033-8)
- Escalante, F. M. E., Cortés-Jiménez, D., Tapia-Reyes, G., & Suárez, R. (2015). Immobilized microalgae and bacteria improve salt tolerance of tomato seedlings grown hydroponically. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 1.923-1.933. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0651-0>
- Friel, M. T., & McLoughlin, A. J. (1999). Immobilisation as a strategy to increase the ecological competence of liquid cultures of *Agaricus bisporus* in pasteurised compost. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(1), 39-46. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00633.x>
- Gagné-Bourque, F., Xu, M., Dumont, M.-J., & Jabaji, S. (2015). Pea protein alginate encapsulated *Bacillus subtilis* B26, a plant biostimulant, provides controlled release and increased storage survival. *Journal of Fertilizers & Pesticides*, 6(2). <https://doi.org/10.4172/jbfbp.1000157>
- Gaumann, A., Laudes, M., Jacob, B., Pommersheim, R., Laue, C., Vogt, W., & Schrezenmeier, J. (2000). Effect of media composition on long-term *in vitro* stability of barium alginate and polyacrylic acid multilayer microcapsules. *Biomaterials*, 21(18), 1.911-1.917. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00071-5)
- Hale, L., Luth, M., Kenney, R., & Crowley, D. (2014). Evaluation of pinewood biochar as a carrier of bacterial strain *Enterobacter cloacae* UW5 for soil inoculation. *Applied Soil Ecology*, 84, 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.08.001>
- Hernandez, J.-P., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2006). Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 190-198. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.005>
- Herrmann, L., & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 8.859-8.873. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5228-8>
- John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y., & Prévost, D. (2011). Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 211-226. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.513327>
- Kang, Y., Shen, M., Wang, H., & Zhao, Q. (2013). A possible mechanism of action of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus pumilus* WP8 via regulation of soil bacterial community structure. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59(4), 267-277. <https://doi.org/10.2323/jgam.59.267>
- Kong, H. J., & Mooney, D. J. (2003). The effects of poly(ethyleneimine) (PEI) molecular weight on reinforcement of alginate hydrogels. *Cell Transplantation*, 12(7), 779-785. <https://doi.org/10.3727/000000003108747253>
- Kumaresan, G., & Reetha, D. (2011). Survival of *Azospirillum brasilense* in liquid formulation amended with different chemical additives. *Journal of Phytology*, 3(10), 48-51. <http://updatepublishing.com/journal/index.php/jp/article/download/2725/2704>
- Lee, S.-K., Lur, H.-S., Lo, K.-J., Cheng, K.-C., Chuang, C.-C., Tang, S.-J., Yang, Z.-W., & Liu, C.-T. (2016). Evaluation of the effects of different liquid inoculant formulations on the survival and plant-growth-promoting efficiency of *Rhodospseudomonas palustris* strain PS3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), 7.977-7.987. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7582-9>
- Lobo, C. B., Juárez Tomás, M. S., Viruel, E., Ferrero, M. A., & Lucca, M. E. (2019). Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research*, 219, 12-25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>
- Lopez, B. R., Bashan, Y., Trejo, A., & de-Bashan, L. E. (2013). Amendment of degraded desert soil with wastewater debris containing immobilized *Chlorella sorokiniana* and *Azospirillum brasilense* significantly modifies soil bacterial community

- structure, diversity, and richness. *Biology and Fertility of Soils*, 49(8), 1.053-1.063. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0799-1>
- Marks, B. B., Megías, M., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2013). Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. *AMB Express*, 3(1), artículo 21. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-21>
- Massart, S., Martínez-Medina, M., & Jijakli, M. H. (2015). Biological control in the microbiome era: Challenges and opportunities. *Biological Control*, 89, 98-108. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.06.003>
- Murphy, J. F., Reddy, M. S., Ryu, C.-M., Kloepper, J. W., & Li, R. (2003). Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against cucumber mosaic virus. *Phytopathology*, 93(10), 1.301-1.307. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.10.1301>
- Nussinovitch, A. (2010). *Polymer macro- and micro-gel beads: Fundamentals and applications*. Springer.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L., & Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1.084-1.090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Polyak, B., Geresh, S., & Marks, R. S. (2004). Synthesis and characterization of a biotin-alginate conjugate and its application in a biosensor construction. *Biomacromolecules*, 5(2), 389-396. <https://doi.org/10.1021/bm034454a>
- Prithiviraj, B., Zhou, X., Souleimanov, A., Kahn, W., & Smith, D. (2003). A host-specific bacteria-to-plant signal molecule (Nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants. *Planta*, 216(3), 437-445. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0928-9>
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1.037-1.062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>
- Rekha, P. D., Lai, W.-A., Arun, A. B., & Young, C.-C. (2007). Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresource Technology*, 98(2), 447-451. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.009>
- Ruiz-Güereca, D. A., & Sánchez-Saavedra, M. del P. (2016). Growth and phosphorus removal by *Synechococcus elongatus* co-immobilized in alginate beads with *Azospirillum brasilense*. *Journal of Applied Phycology*, 28(3), 1.501-1.507. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0728-9>
- Sabaratnam, S., & Traquair, J. A. (2002). Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biological Control*, 23(3), 245-253. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.1014>
- Sarrocco, S., Raeta, R., & Vannacci, G. (2004). Seeds encapsulation in calcium alginate pellets. *Seed Science and Technology*, 32(3), 649-661. <https://doi.org/10.15258/sst.2004.32.3.01>
- Schoebitz, M., Mengual, C., & Roldán, A. (2014). Combined effects of clay immobilized *Azospirillum brasilense* and *Pantoea dispersa* and organic olive residue on plant performance and soil properties in the revegetation of a semiarid area. *Science of The Total Environment*, 466-467, 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.012>
- Schoebitz, M., Osman, J., & Ciampi, L. (2013). Effect of immobilized *Serratia* sp. by spray-drying technology on plant growth and phosphate uptake. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 29(2), 111-119. https://www.researchgate.net/publication/263235206_Effect_of_immobilized_Serratia_sp_By_spray-drying_technology_on_plant_growth_and_phosphate_uptake/link/53d2735c0cf228d363e94265/download
- Schoebitz, M., Simonin, H., & Poncelet, D. (2012). Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads. *Journal of Microencapsulation*, 29(6), 532-538. <https://doi.org/10.3109/02652048.2012.665090>
- Singleton, P., Keyser, H., & Sande, E. (2002). Development and evaluation of liquid inoculants. En D. Herridge (ed.), *Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam* (pp. 52-66). ACIAR Proceedings.
- Stelling, S. A., Burns, R. G., Sunna, A., & Bunt, C. R. (2014). Survival in sterile soil and atrazine degradation of *Pseudomonas* sp. strain ADP immobilized on zeolite. *Bioremediation Journal*, 18(4), 309-316. <https://doi.org/10.1080/10889868.2014.938723>
- Stephens, J. H. G., & Rask, H. M. (2000). Inoculant production and formulation. *Field Crops Research*, 65(2-3), 249-258. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00090-8)
- Tanaka, K., Cho, S.-H., Lee, H., Pham, A. Q., Batek, J. M., Cui, S., Qiu, J., Khan, S. M., Joshi, T., Zhang, Z. J., Xu, D., & Stacey, G. (2015). Effect of lipo-chitooligosaccharide on early growth of C₄ grass seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 66(19), 5.727-5.738. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv260>
- Tarek, R., Dayal, T. R., Kaur, B. S., & Danielle, P. (2014). Development of efficient suspension formulation of starch industry wastewater grown *Sinorhizobium meliloti* for agricultural use. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 3(4), 1.083-1.093. https://www.researchgate.net/publication/274961111_Development_of_Efficient_Suspension_Formulation_of_Starch_Industry_Wastewater_Grown_Sinorhizobium_Meliloti_for_Agricultural_Use/link/552d98760cf21acb0921786b/download

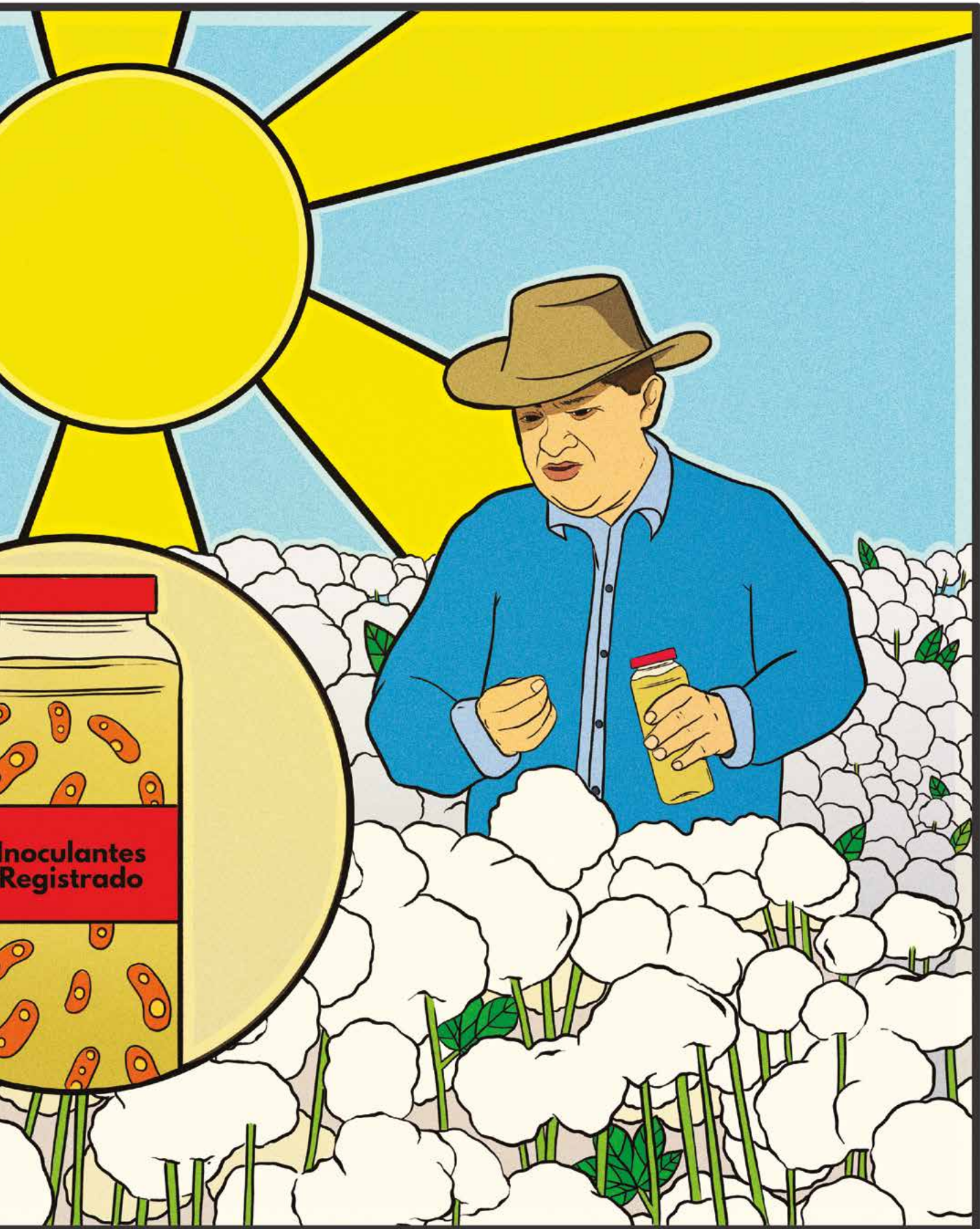
- Trejo, A., de-Bashan, L. E., Hartmann, A., Hernandez, J.-P., Rothballer, M., Schmid, M., & Bashan, Y. (2012). Recycling waste debris of immobilized microalgae and plant growth-promoting bacteria from wastewater treatment as a resource to improve fertility of eroded desert soil. *Environmental and Experimental Botany*, *75*, 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.08.007>
- Trivedi, P., & Pandey, A. (2008). Recovery of plant growth-promoting rhizobacteria from sodium alginate beads after 3 years following storage at 4 °C. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *35*(3), 205-209. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0284-7>
- Trivedi, P., Pandey, A., & Palni, L. M. S. (2005). Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *21*(6), 941-945. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-6820-y>
- Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Promé, J.-C., & Dénarié, J. (1991). Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature*, *351*(6.328), 670-673. <https://doi.org/10.1038/351670a0>
- Vassilev, N., Vassileva, M., Azcon, R., & Medina, A. (2001). Application of free and Ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil-plant system. *Journal of Biotechnology*, *91*(2-3), 237-242. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00341-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00341-8)
- Veselova, S. V., Burkhanova, G. F., Rumyantsev, S. D., Blagova, D. K., & Maksimov, I. V. (2019). Strains of *Bacillus* spp. regulate wheat resistance to greenbug aphid *Schizaphis graminum* Rond. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *55*(1), 41-47. <https://doi.org/10.1134/S0003683819010186>
- Viveganandan, G., & Jauhri, K. S. (2000). Growth and survival of phosphate-solubilizing bacteria in calcium alginate. *Microbiological Research*, *155*(3), 205-207. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(00\)80033-6](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(00)80033-6)
- Wang, L., Khor, E., & Lim, L.-Y. (2001). Chitosan-alginate-CaCl₂ system for membrane coat application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *90*(8), 1.134-1.142. <https://doi.org/10.1002/jps.1067>
- Wu, Z., Guo, L., Zhao, Y., & Li, C. (2014). Effect of free and encapsulated *Raoultella planticola* Rs-2 on cotton growth promotion under salt stress. *Journal of Plant Nutrition*, *37*(8), 1.187-1.201. <https://doi.org/10.1080/01904167.2014.881865>
- Xavier, I. J., Holloway, G., & Leggett, M. (2004). Development of rhizobial inoculant formulations. *Crop Management*, *3*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1094/CM-2004-0301-06-RV>
- Xie, Z. P., Staehelin, C., Vierheilig, H., Wiemken, A., Jabbouri, S., Broughton, W. J., Vogeli-Lange, R., & Boller, T. (1995). Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. *Plant Physiology*, *108*(4), 1.519-1.525. <https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1519>
- Young, C.-C., Rekha, P. D., Lai, W.-A., & Arun, A. B. (2006). Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. *Biotechnology and Bioengineering*, *95*(1), 76-83. <https://doi.org/10.1002/bit.20957>
- Zohar-Perez, C., Chernin, L., Chet, I., & Nussinovitch, A. (2003). Structure of dried cellular alginate matrix containing fillers provides extra protection for microorganisms against uvc radiation. *Radiation Research*, *160*(2), 198-204. <https://doi.org/10.1667/rr3027>
- Zohar-Perez, C., Ritte, E., Chernin, L., Chet, I., & Nussinovitch, A. (2002). Preservation of chitinolytic *Pantoea agglomerans* in a viable form by cellular dried alginate-based carriers. *Biotechnology Progress*, *18*(6), 1.133-1.140. <https://doi.org/10.1021/bp025532t>

Normativa Colombiana y Brasileña aplicada a la producción y registro de Inoculantes Biológicos para uso agrícola

Diana Corina Zambrano Moreno¹
Gregorio Salomón Zambrano Moreno²
Fabiola Moreno Martínez³

-
1. Asociación Colombiana de Porcicultores. Porkcolombia. Bogotá. Colombia.
 2. Estudios Socioeconomicos - Corpoica. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA. Sede Central. Cundinamarca. Colombia.
 3. Dirección Técnica de Inocuidad e Insumos Agrícolas del Instituto Colombiano Agropecuario -ICA. Bogotá. Colombia.





Inoculantes Registrado

Introducción

Los seres humanos se han beneficiado del uso de los microorganismos de formas diversas, desde la lucha contra infecciones hasta la mejora de la producción de alimentos, lo que ha suscitado el interés de los científicos, biólogos, expertos en patentes y funcionarios públicos durante las últimas tres décadas (Martínez Barrabés, 2014, capítulo 3). Este uso y aplicación de organismos vivos o sus partes para la obtención de productos, procesos o servicios útiles a la humanidad se conoce como *biotecnología*.

La creciente importancia económica de la biotecnología ha impulsado el fortalecimiento de la protección de la propiedad intelectual a nivel internacional, al punto que este tema ha sido incluido en la agenda de diversas negociaciones de libre comercio. Esto ha puesto en primera línea la discusión sobre las patentes en biotecnología en el ámbito científico y empresarial. En el ámbito científico, las patentes son consideradas un incentivo para la innovación, al facilitar la socialización segura del conocimiento. En el ámbito empresarial, pueden convertirse en una posibilidad de limitar la propiedad de la innovación y manejar el mercado (Cova et al., 2012). Sin embargo, la posición de los científicos y la de los empresarios coincide en que la protección en forma de derechos exclusivos debe generar lucro para el inventor, a través de la concesión de monopolios temporales que fomenten la innovación.

Los países en vía de desarrollo, en términos generales, entienden la patentabilidad de los microorganismos solo para aquellos que han sido modificados genéticamente por la acción del ser humano. Los microorganismos nativos, es decir, aquellos que ya existen naturalmente en el ambiente, no pueden ser patentados por su posible descubridor debido a que, al ser seres vivos, se constituye un descubrimiento, no una invención que pueda ser patentada, ya que las características del microorganismo no han sido adquiridas por la intervención del ser humano.

Muchas investigaciones de biotecnología no se han realizado o se desarrollan fuera del marco legal, en parte, debido a que la normativa para el acceso a los recursos genéticos no es clara para los investigadores

por la dispersión y superposición de normas nacionales (Kamau et al., 2010; Ribadeneira Sarmiento, 2014). Esto es un desestímulo a la labor investigativa, ya que, al obstaculizar los procesos de patente y de movilización de material genético a nivel internacional, se dificulta tanto la obtención de beneficios económicos por su descubrimiento como el desarrollo de análisis en laboratorios internacionales.

Respecto de las patentes, en los países de la Comunidad Andina de Naciones (CAN), como Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú, en desarrollo del principio de soberanía, se encuentra vigente el régimen de acceso a los recursos genéticos, mediante la Decisión 391 de 1996 (CAN, 1996). Según Nemogá Soto (2013), la definición de *acceso* en este régimen implica cualquier actividad que se realice sobre material genético, así como la obtención y utilización de los recursos genéticos conservados en condiciones *in situ* o *ex situ*, de sus productos derivados o de sus componentes intangibles, ya sea con fines de investigación o de bioprospección. Lo anterior implica que la legislación no distingue entre las diferentes etapas de la bioprospección, distintas entre sí y secuenciales, de tal forma que un proyecto de investigación que busque la caracterización de la biodiversidad sin ánimo de desarrollo de productos comerciales debe realizar los mismos trámites que un proyecto con fines de aprovechamiento comercial.

Brasil es uno de los países de América Latina que aprovecha las ventajas de la biotecnología (Valbuena, 2014), al facilitar nuevas opciones para el desarrollo rural y regional con las industrias biotecnológicas para el agro. Esta industria se desarrolló con base en los esfuerzos para introducir el cultivo de la soya y en la necesidad de inocular leguminosas forrajeras para la alimentación animal. Se estima que en el cultivo de soya se han logrado fijaciones biológicas de entre 0 y 450 kg de N ha⁻¹, supliendo hasta un 90% de los requerimientos de nitrógeno de los cultivos (Grageda-Cabrera et al., 2012). En términos económicos, se estima que, en el caso de la soya, los resultados con la fijación de N₂ representan un ahorro estimado de USD 3.000 millones anuales. Para 2007, se encontró que el 99% de los inoculantes en el mercado interno brasileño estaban diseñados para el



cultivo de soya (Hungria & Campo, 2007), aunque se han identificado cepas de rizobios altamente eficientes para casi un centenar de otras leguminosas.

En relación con la biotecnología, en Colombia, de manera particular, se tiene como política del Gobierno nacional “la locomotora de la biotecnología”, de acuerdo con el Documento Conpes 3697 (Departamento Nacional de Planeación [DNP], 2011), que tiene como objetivo atraer recursos públicos y privados para el desarrollo de empresas y productos comerciales como mecanismo de aprovechamiento industrial de la biodiversidad, sobre criterios de competitividad y rentabilidad económica. Sin embargo, esta política debe estar acompañada de una protección efectiva de los derechos de las patentes, ya que, de otra forma, a pesar de su riqueza en recursos biodiversos y de su localización privilegiada en la franja ecuatorial, Colombia será incapaz de revertir su creciente dependencia tecnológica, incluso en áreas básicas y productos agroindustriales (Nemogá Soto, 2013).

Ahora bien, las empresas fabricantes de los bioinsumos de uso agrícola, siendo estos productos biotecnológicos, no solo enfrentan el tema de las patentes y el acceso al recurso biológico para su producción, sino que también deben garantizar la calidad del producto, una vez sea formulado, para que sea competitivo comercialmente. Las garantías de calidad se refieren a que el producto formulado no aporte microorganismos no deseados ni posibles contaminantes, además de que las cantidades del microorganismo por aplicar deben ser las correctas, para garantizar su eficiencia (García de Salamone, 2011). Los microorganismos inoculados deben sobrevivir en la formulación, producir la actividad deseada posterior a su inoculación en campo y ser compatibles con los fertilizantes y productos químicos de protección de cultivos utilizados de forma estándar en las semillas o el follaje del cultivo objetivo (Calvo et al., 2014). El cumplimiento de estos requisitos contribuye a que los usuarios finales puedan acceder a productos estables y con estándares de calidad mínimos para su uso.

Comparación normativa entre Colombia y Brasil

El análisis de los mecanismos legales de Colombia y Brasil a través del estudio comparativo —en un nivel de abstracción bajo (Landman, 2011)— de las regulaciones de acceso, patentes y registro vigentes al 31 de diciembre de 2019 y aplicadas al desarrollo de inoculantes microbianos a nivel industrial permite identificar las principales diferencias a nivel normativo, siendo este uno de los componentes más relevantes en el desarrollo de la industria de bioinsumos de uso agrícola en los dos países.

Implementación del régimen de acceso a recursos genéticos

Colombia y Brasil presentan avances en sus regímenes de acceso a recursos genéticos, en cumplimiento del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), al cual pertenecen estos dos países. El CDB tiene tres objetivos fundamentales: 1) conservar la diversidad biológica, 2) utilizar sosteniblemente sus componentes y 3) participar justa y equitativamente en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos. Por lo tanto, como base para la comparación, se tuvieron en cuenta estos tres puntos (Naciones Unidas, 1992).

Régimen de acceso a recursos genéticos en Colombia

La CAN declaró en 1996 un estatuto comunitario, la Decisión 391, mediante la cual se estableció el Régimen Común sobre Acceso a los Recursos Genéticos (CAN, 1996), pero estudios realizados en Colombia dan testimonio de su escasa utilización; según Gómez y Nemogá Soto (2007), se especula que el estatuto no solo no ha conducido a cumplir su propósito central de evitar el uso inadecuado de la biodiversidad andina, sino que además pudo haber provocado un efecto negativo, una parálisis parcial de la investigación biotecnológica en la CAN, causando la fuga de talentos hacia escenarios menos restrictivos y la profundización de prácticas de biopiratería, ante los dispendiosos requisitos para acceder al recurso genético. Según Del Río Duque (2009), los científicos que deciden emigrar lo hacen buscando elevar su productividad, ya sea a través de infraestructura, recursos tecnológicos o capital de inversión disponible. En Colombia, las restricciones para obtener permisos de colecta, investigación y acceso a recursos genéticos han impedido la celebración de contratos de bioprospección entre el país y





empresas extranjeras, así como el desarrollo de actividades de colecta sistemática, incluso por investigadores colombianos (Melgarejo, 2012), lo que impide que estos puedan incrementar su productividad.

El Estado colombiano estableció la legislación específica para el control al acceso a recursos genéticos a través del Decreto 730 de 1996, con el que se nombró al Ministerio del Medio Ambiente (actual Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible [MADS]) como la autoridad nacional competente, y la Resolución 620 de 1997, con la que se le delegaron funciones específicas sobre el trámite y solicitud de acceso a los recursos genéticos a ese ministerio (Ministerio del Medio Ambiente, 1997). En el ámbito de vigilancia y control, se emitió la Ley 1333 de 2009 (Congreso de Colombia, 2009), con la cual se estableció el procedimiento sancionatorio ambiental, en el cual se presume la culpa o el dolo del infractor, el cual puede ser una persona natural o jurídica que realiza una acción u omisión que constituya un daño ambiental. Las competencias legales son atribuidas al actual MADS, a las corporaciones autónomas ambientales, a las corporaciones de desarrollo sostenible, a las unidades ambientales regionales, a los establecimientos públicos ambientales y a la Unidad Administrativa Especial del Sistema de Parques Nacionales Naturales (UAESPNN).

El procedimiento que se debe llevar a cabo para presentar la solicitud consiste en que la persona natural —nacional o extranjera y mayor de edad— o jurídica debe dirigirse al MADS y presentar los formularios específicos diligenciados y los documentos necesarios. La persona natural o jurídica debe cumplir con unas especificaciones, como ser investigador, estudiante o persona jurídica vinculada a un proyecto de investigación científica y acreditar un apoyo institucional, condiciones que difieren si se es nacional o extranjero. Después de la radicación en el MADS, los documentos son revisados, y se notifica y publica el auto de inicio del trámite, momento a partir del cual se inicia, en el MADS, la evaluación para conceder o no el acceso. Posterior a la evaluación, se informa al solicitante la aceptación o negación de la solicitud; una vez concedida, se puede iniciar el proceso de negociación del contrato de acceso a los recursos genéticos.

En el Decreto 1376 de 2013 (MADS, 2013), Colombia reglamentó la obtención del permiso de recolección de especímenes silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica, más no comerciales, antes contenido en el permiso de estudio con fines de investigación científica, regulado por el Decreto 309 de 2000 (Ministerio del Medio Ambiente, 2000); sin embargo, las disposiciones del Decreto 1376 no aplican a la recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines industriales, comerciales o de prospección biológica. De esta manera, la sistemática molecular, la ecología molecular, la evolución y la biogeografía, entre otras ramas de las ciencias básicas, no requieren contrato de acceso a recursos genéticos mientras tengan fines exclusivos de investigación.



Régimen de acceso a recursos genéticos en Brasil

El inicio del proceso formal para regular el acceso a los recursos genéticos se da con la aprobación de la Medida Provisional 2186-16, del 23 de agosto de 2001 (Presidência da República, 2001), llamada Ley de Acceso al Patrimonio Genético, que incluye organismos nativos de tipo vegetal, fúngico, microbiano o animal, en forma de moléculas, metabolitos y extractos obtenidos a partir de organismos vivos o muertos, encontrados *in situ* o mantenidos *ex situ*, en el territorio nacional, la plataforma continental o la zona económica exclusiva. A través de la medida provisional, se reglamentó el régimen de acceso y se conformó el Consejo de Gestión de Patrimonio Genético (CGEN), un órgano colegiado integrado por ocho ministerios, además del Ministério do Meio Ambiente (MMA), y otras diez agencias federales con funciones legislativas y deliberativas. El consejo tiene como funciones centrales implementar las políticas nacionales en materia de acceso a recursos genéticos y conocimientos tradicionales y actuar como instancia técnica en la materia, autorizando o denegando el acceso al patrimonio genético nacional.

En 2016, la Universidad Nacional de Colombia logró un avance importante al suscribir con el MADS un contrato de acceso a los recursos genéticos marco, que cubre las actividades de investigación que no tengan fines comerciales en sus resultados previstos. Con este contrato marco de acceso, los investigadores enfocados en el estudio y manejo de la biodiversidad colombiana o sus microorganismos, así como en la manipulación de material genético, podrán acceder a los recursos sin tener que hacer un contrato por cada proyecto de investigación, lo que agilizará el proceso de acceso a estos recursos en Colombia. Este modelo de negociación del acceso a los recursos genéticos permitirá en el mediano plazo que las universidades con trayectoria en investigación puedan realizar acuerdos de este tipo. Así, en lo posible, debe analizarse la posibilidad de extender este beneficio a otras universidades, tanto públicas como privadas, teniendo en cuenta que son instituciones sin ánimo de lucro.

En Colombia se realiza el registro de la información a través del Sistema de Información sobre Biodiversidad (SIB), que tiene como propósito brindar acceso libre a información sobre la diversidad biológica del país, aunque, para el caso de los microorganismos, la información es escasa.

Después de casi 15 años desde la publicación de la primera edición de la Medida Provisional, Brasil tiene una nueva legislación sobre el acceso a los recursos genéticos y los conocimientos tradicionales; se trata de la Ley 13.123 de 2015 (Presidência da República, 2015), que entró en vigor el 20 de noviembre y derogó la Medida Provisional 2186-16. Esta ley, según De Vasconcelos (2015), promueve un cambio significativo en el marco normativo brasileño, ya que desburocratiza y facilita los procedimientos para el acceso a los recursos genéticos. El uso de muestras de patrimonio genético o de conocimientos tradicionales asociados para la investigación o el desarrollo tecnológico se redujo a cumplir con el registro o la autorización del CGEN.

La actividad de recolección es regida por la Instrucción Normativa n.º 3, del 1.º de septiembre de 2014, del Instituto Chico Mendes para la Conservación de la Biodiversidad (ICMBio). Esta instrucción establece normas para el uso del Sistema de Autorización e Información en Biodiversidad (Sisbio), el cual aloja la información que los investigadores deben reportar sobre la recolección autorizada y regula la disponibilidad, el acceso y el uso de los datos y la información reportados (MMA, 2010).



La ley utiliza el término producto para referirse, de manera general, a todos los bienes y servicios desarrollados a partir del acceso.

En este contexto, en Brasil, el aprovechamiento económico del producto o material desarrollado a partir del acceso al recurso genético o a los conocimientos tradicionales asociados está sujeto a la presentación previa ante el CGEN, con la notificación de la existencia del producto terminado o el material reproductivo desarrollado. En caso de que el acceso no haya sido tramitado adecuadamente, el interesado debe presentar un acuerdo de distribución de beneficios ante el CGEN antes de que se cumplan 365 días a partir de la notificación de la existencia del producto. Este procedimiento le brinda al investigador la posibilidad de enmendar el error de procedimiento.

Para lograr el aprovechamiento económico del producto a partir de microorganismos, el interesado debe solicitar la aprobación del CGEN, en tanto estos están sujetos al alcance de la Ley 13.123 de 2015 (Presidência da República, 2015), que dispone sobre bienes, derechos y obligaciones relativos al “acceso al patrimonio genético del país, bien de uso común del pueblo encontrado en condiciones *in situ*, incluidas las especies domesticadas y poblaciones espontáneas, o mantenido en condiciones *ex situ*, siempre que se encuentre en condiciones *in situ* en el territorio nacional, en la plataforma continental, en el mar territorial y en la zona económica exclusiva” (traducción propia). En el trámite se debe incluir la distribución de beneficios en los siguientes casos:



Licencias, transferencia o permiso para el uso de cualquier forma de derecho de propiedad intelectual en el producto terminado, proceso o material reproductivo derivado de animales, plantas y microorganismos modificados genéticamente.



Explotación económica de productos desarrollados a partir de recursos genéticos de especies introducidas que no forman poblaciones espontáneas y que no han adquirido rasgos distintivos en el país.



Explotación económica de subproductos y procesos.



Explotación económica de los materiales de reproducción en el eslabón de la cadena de producción.

La distribución de los beneficios puede ser monetaria o no monetaria. Es obligatoria la repartición de los beneficios para las microempresas, los agricultores tradicionales y sus cooperativas, los fabricantes del producto intermediario o sus desarrolladores y los productores de material reproductivo con fines comerciales. Cuando el origen del material genético no es identificable, todos los pueblos indígenas, las comunidades locales y los agricultores tradicionales del país podrán ser considerados posibles beneficiarios de la asignación de beneficios. Cuando el producto comercializable se ha desarrollado a partir de acceso a los conocimientos tradicionales de una fuente identificable, el beneficiario de la distribución de los beneficios será la población indígena, la comunidad local o el agricultor tradicional que ha proporcionado ese conocimiento.

De acuerdo con la Ley 13.123 de 2015 (Presidência da República, 2015, arts. 20 y 21), la distribución monetaria de los beneficios corresponde al valor anual del 1 % de los ingresos netos de la explotación económica del producto, con excepción de los acuerdos con el sector productivo o con el Estado, que logran reducir el valor de la asignación de beneficios monetarios hasta el 0,1 % (un décimo por ciento) de los ingresos netos anuales obtenidos de la explotación económica del producto, según lo dispuesto por la ley. La reducción del porcentaje económico permite mayor flexibilidad durante la negociación en caso de que el producto desarrollado tenga beneficios sustanciales para un sector productivo específico, caso en el cual puede solicitar su participación el órgano oficial de defensa de los derechos de los pueblos indígenas y las comunidades tradicionales.

La distribución no monetaria, por su parte, puede incluir diferentes estrategias: desde proyectos para la conservación y uso sostenible de la biodiversidad o para la protección y mantenimiento de conocimientos, innovación, transferencia tecnológica, licencias gratuitas del producto desarrollado a partir del acceso, formación de recursos humanos en temas relacionados con la conservación y el uso sostenible de los recursos genéticos o conocimientos tradicionales asociados, hasta la distribución gratuita del producto terminado o el material reproductivo desarrollado.

La Ley 13.123 de 2015 (Presidência da República, 2015, art. 22), que regula el acceso al patrimonio genético, otorga al usuario el derecho a elegir, a su discreción, una de las

formas no monetarias de la distribución de beneficios. Para esta modalidad de reparto, se indica que la distribución de los beneficios debe ser equivalente al 75% de lo previsto para este mismo proyecto, si la modalidad fuese monetaria, de acuerdo con los criterios que establezca el CGEN. Así, los interesados en obtener acceso a recursos genéticos en Brasil deben esperar, por el momento, a que las instituciones se pronuncien sobre los criterios para la aplicación de estos procedimientos, y se requerirá el aporte de sus beneficiarios para realizar los ajustes a los que hubiese lugar.

Comparación de los regímenes de acceso a recursos genéticos

El régimen de acceso a recursos genéticos ha tenido diferencias en su implementación en Colombia y en Brasil. Una diferencia observada fue que en Brasil el acceso no debe ser solicitado con fines de investigación, pues solo es requerido un registro, a través de un proceso simplificado, para cualquier fin. Por el contrario, en Colombia se debe solicitar acceso con fines de investigación, prospección biológica, conservación, aplicación industrial o aprovechamiento comercial, cada fin con un trámite diferente. Esto incluye un amplio espectro de actividades en biotecnología, en las que podrían incluirse técnicas de clasificación y caracterización a través de biología molecular, con lo que se desviaría el objetivo principal de proteger la utilización sostenible y la distribución justa y equitativa de los posibles beneficios de un desarrollo tecnológico.

Una diferencia en el procedimiento de acceso a recursos genéticos entre los dos países se da en cuanto a la distribución de los beneficios. La legislación brasileña menciona específicamente el concepto de *producto* y establece un porcentaje máximo de las ganancias netas de los productos o procesos comercializables que debe ser entregado a los beneficiarios en el caso de la retribución monetaria. En Colombia, por el contrario, el porcentaje es negociado, y en la mayoría de los casos se llega a una negociación no monetaria, lo que puede retrasar el proceso de negociación. El procedimiento de darles un valor de uso a los recursos naturales e insertarlos en la economía de mercado no es una tarea sencilla (Rojas Blanco, 2013), por lo que establecer un porcentaje máximo sobre las ganancias netas es una manera práctica que permite tasar un precio máximo inicial, lo que facilita la negociación sin que ninguna de las dos partes sienta que se encuentra en desventaja.

Requisitos de patentabilidad de microorganismos

Los procedimientos para determinar qué tipo de uso y cómo el uso de los microorganismos puede dar lugar a una patente deben suscitar una gran investigación, por parte de las entidades competentes, soportada en información técnica, administrativa y legal.

El desarrollo de procesos de base biotecnológica está siendo apalancado por los gobiernos nacionales, desde la promoción de la innovación y la investigación científica, y por los sectores particulares, con el desarrollo de nuevos productos competitivos, novedosos y que generan una retribución económica significativa. Para que estos proyectos se enmarquen tanto en la inversión gubernamental como en la privada, se requiere la obtención de una patente que le asegure una prerrogativa en explotación del recurso novedoso al inventor, lo que asegura la retribución económica de la invención. Ahora bien, los procedimientos para determinar qué tipo de uso y cómo el uso de los microorganismos puede dar lugar a una patente deben suscitar una gran investigación, por parte de las entidades competentes, soportada en información técnica, administrativa y legal, trámites que pueden aumentar los tiempos y costos de una investigación e inversión.

Legislación de patentamiento de microorganismos en Colombia

La legislación vigente en materia de patentes se encuentra en la Decisión 486 de 2000 de la CAN (2000), la cual estableció un régimen común de propiedad intelectual que prohíbe, expresamente, patentar plantas, animales o procedimientos que sean biológicos o microbiológicos. En 2008 fue emitida la Decisión 689 (CAN, 2008), que modifica la Decisión 486 y exige que en la solicitud de las patentes se allegue el contrato de acceso o la licencia de uso, según sea el caso. Para dar cumplimiento a la Decisión 486, la Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia expidió en 2015 la Circular Única, cuyo título X contiene el conjunto de reglamentaciones e instrucciones generales que guían a los usuarios sobre la manera como se deben adelantar los trámites de propiedad industrial. En Colombia, para iniciar el trámite de patente de invención, debe presentarse de manera obligatoria el contrato de acceso al recurso genético.

En el caso de los microorganismos, debe también anexarse el certificado de depósito ante una autoridad internacional reconocida. Este depósito deberá efectuarse por el solicitante de la patente a más tardar en la fecha de presentación de la solicitud. Serán válidos los certificados de depósito de microorganismos o material biológico efectuados ante las autoridades internacionales reconocidas conforme al Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes de 1977, que se encuentran incluidas en la lista que publica la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) en su calidad de organización encargada de la administración del tratado en mención.

Legislación de patentamiento de microorganismos en Brasil

En Brasil, la protección de la propiedad intelectual está regulada por la Ley de Propiedad Industrial (LPI), promulgada bajo el número 9.279 el 14 de mayo 1996 y cuyo objeto es regular los derechos y obligaciones relativos a la propiedad industrial, incluyendo las patentes (Presidência da República, 1996). La LPI menciona, en su artículo 10, sección IX, que la totalidad o parte de los seres vivos naturales y materiales biológicos encontrados o aislados en la naturaleza no pueden ser protegidos por patentes; solamente los microorganismos modificados genéticamente pueden serlo, pues han sido producto de la intervención del investigador.

El Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes, adoptado por los Estados parte desde 1977, orienta el procedimiento internacional para el patentamiento de microorganismos, incluyendo el depósito de estos ante una autoridad internacional de depósito, con independencia de dónde se encuentre dicha autoridad. En el caso de Brasil, este no es signatario del Tratado de Budapest y no tiene ningún centro o institución

depositaria reconocida o autorizada por el Instituto Nacional de Propiedad Industrial (INPI) para el depósito de material biológico con fines de patentes. Para cumplir con el requisito legal, el Acto Normativo INPI 127 de 1997, en su artículo 16.1.1.2, autoriza el depósito en cualquier autoridad depositaria internacional reconocida por el Tratado de Budapest. De esta forma, el manejo de los microorganismos reduce gastos porque, en lugar de depositar el microorganismo en cada uno de los Estados contratantes en los que se ha presentado una solicitud de patente relacionada con ese microorganismo, bastará con que se deposite una vez y ante una sola autoridad de depósito. Además, esto aumenta la seguridad depositante, pues se establece un sistema uniforme de depósito, reconocimiento y suministro de muestras de microorganismos.

La divulgación del origen del microorganismo en las solicitudes de patentes es un mecanismo que se ha usado en Brasil desde finales de 2006. La Resolución 43 de 2015 del CGEN y la Resolución 207 de 2009 del INPI hacen referencia a los procedimientos que deben seguir los solicitantes de patentes. De este modo, se evita que se otorgue una patente sin cumplir los trámites de acceso al recurso genético, lo que puede incluso justificar la cancelación de la patente.



En el sector agrícola, los conocimientos y avances sobre la diversidad de los microorganismos directamente relacionados con la fertilización biológica del suelo están en una etapa avanzada gracias a los esfuerzos de la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (Embrapa, acrónimo formado por su nombre en portugués), que tiene una valiosa colección de microorganismos con capacidad de fijación biológica de nitrógeno y sus aplicaciones. Desde la introducción del cultivo de soya en Brasil se han desarrollado programas de selección de cepas de *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium japonicum* y *Bradyrhizobium elkanii* para proporcionar el nitrógeno necesario a las plantas a través de la fijación biológica. Como resultado de estos programas, Brasil tiene cepas disponibles en la actualidad que permiten que la producción de inoculantes en el país pueda sustituir un alto porcentaje del nitrógeno requerido por el cultivo. Así, la eliminación de la fertilización de nitrógeno se ha visto reflejada en un ahorro estimado de USD 6,6 millones al año (Ferreira et al., 2011).



Comparación de las legislaciones de patentamiento de microorganismos

La protección de la propiedad industrial en Colombia y Brasil es similar, puesto que los dos países hacen parte del Convenio de París para la Protección de la Propiedad Industrial, de manera que sus preceptos deben guardar los principios mínimos allí consignados. Las diferencias son los requisitos formales para la solicitud y la duración de la vigencia de la protección. En el caso de Brasil, la concesión para las patentes biotecnológicas se otorga en un tiempo medio, desde la fecha de solicitud, de 9-11 años, mientras que en Colombia se concede por un máximo de 20 años, sin hacer diferenciación del tipo de tecnología. Con la concesión de una patente se confieren los derechos patrimoniales de carácter exclusivo que otorga el Estado por un tiempo determinado. Al respecto, el periodo de tiempo en Brasil, al ser más corto, podría permitir que otro investigador retome la invención y le realice mejoras, lo que promueve que se le añada calidad al producto en un periodo de tiempo más corto que en Colombia; esto permite que Brasil pueda avanzar más rápido en el desarrollo y la innovación de productos.

Tanto en Colombia como en Brasil, los microorganismos transgénicos son los únicos que satisfacen los tres requisitos de patentabilidad, a saber, novedad,

actividad inventiva y aplicación industrial, y que no son contemplados como descubrimientos. Los microorganismos modificados genéticamente pueden expresar, mediante intervención humana directa en su composición genética, algunas características que han sido manipuladas por métodos de ADN recombinante con el objetivo de que se expresen en ese organismo y le confieran un rasgo dado. Los microorganismos en su estado natural no son objeto de patentabilidad porque las características que les confieren capacidades han sido otorgadas por la naturaleza, sin implicar el intelecto del investigador.

Asimismo, en los dos países se solicita, para iniciar el proceso de patentamiento, el certificado de depósito del material biológico, expedido por una institución de depósito internacional de microorganismos o por otro organismo reconocido por la oficina de la autoridad nacional. Cuando la invención se refiera a un producto o procedimiento relativo a un material biológico y no pueda describirse de manera que pueda ser comprendida y ejecutada por una persona capacitada en la materia técnica, la descripción deberá completarse con un depósito de dicho material. En estos casos, la descripción debe indicar el nombre y la dirección de la institución de depósito, y la fecha y el número de depósito atribuido por tal institución. Los depósitos se deben efectuar ante una autoridad internacional reconocida por el Tratado de Budapest.

Requisitos de calidad para los inoculantes

Los inoculantes microbianos, bioinsumos utilizados en la producción agrícola, se clasifican en agentes biocontroladores y biofertilizantes. Fuentes-Ramirez y Caballero-Mellado (2006) definieron los biofertilizantes como “un producto que contiene microorganismos vivos, que ejercen efectos benéficos directos o indirectos en el crecimiento de las plantas y el rendimiento de los cultivos a través de diferentes mecanismos” (p. 144; traducción propia). Los microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas mediante el control de organismos perjudiciales, tales como biofungicidas, bionematicidas, bioinsecticidas o cualesquiera otros productos con actividad similar que favorezca la sanidad vegetal, generalmente se definen como *bioplaguicidas*, no como *biofertilizantes* (Vessey, 2003).

La palabra *biofertilizante* no debe ser utilizada para referirse a la materia orgánica o los fertilizantes minerales —como el compost y los extractos de plantas—, ni a los productos que contengan células microbianas muertas, extractos de cultivos microbianos, extractos de células microbianas, etc. (Malusá & Vassilev, 2014). La necesidad de una definición legal de *biofertilizantes* se deriva de las descripciones que podrían dar lugar a erróneas clasificaciones para evadir la normatividad. Por ejemplo, en algún momento se indicaron los hongos micorrízicos como “una parte natural de las plantas” (Gianinazzi & Vosátka, 2004) y no como microorganismos, evitando los procedimientos de registro, que son complicados y caros. Por lo tanto, en los marcos normativos, es importante que las instituciones regulatorias actualicen la definición en concordancia con las tendencias mundiales.

Normatividad para la producción y comercialización de inoculantes en Colombia

En Colombia, la normatividad relacionada con los bioinsumos ha evolucionado a partir de las normas para el registro y control de los agroquímicos de síntesis química. Inicialmente, estas normas fueron concebidas con el objetivo esencial de garantizar la calidad y eficacia de los insumos químicos, la principal

herramienta tecnológica promovida en ese entonces para asegurar la productividad de los cultivos y atender la creciente demanda de alimentos, y fueron desarrolladas también para prevenir o reducir los impactos negativos asociados a la utilización de sustancias peligrosas e ingredientes activos que implican altos riesgos para la salud humana y el medio ambiente, según la Resolución ICA 1277 de 2004 (Instituto Colombiano Agropecuario [ICA], 2004b).

En Colombia, el ICA es la autoridad competente designada como responsable de adoptar las medidas necesarias para el efectivo control de la sanidad animal y vegetal y de ejercer el control técnico de los insumos agrícolas. La primera norma ICA que menciona estos productos es la Resolución 3418 del 1.º de octubre de 1991, que definió el término *inoculante para leguminosas* para el género *Rhizobium* e incluyó el control de calidad de estos microorganismos (ICA, 1991a).

En 1995 se publicó la Resolución 3079, en la cual se dictan disposiciones sobre la industria, el comercio y la aplicación de bioinsumos y productos afines, abonos o fertilizantes, enmiendas, acondicionadores del suelo y productos afines, plaguicidas químicos, reguladores fisiológicos y coadyuvantes de uso agrícola y productos afines, los cuales estuvieron registrados previamente en la Resolución 4313 de 1991 (ICA, 1991b). Con esta resolución se inició el control de los bioinsumos en el país, si bien les dio el mismo tratamiento y se exigieron los mismos requisitos que a los productos químicos, situación que fue ajustada a las características propias de los bioinsumos en febrero de 2004, cuando se emitió la Resolución 375 (ICA, 2004a), en la cual solo se consideraron los bioinsumos y extractos vegetales. En esta resolución se agruparon los bioplaguicidas y los inoculantes biológicos, y se definió a los bioinsumos como “producto de origen biológico utilizado con fines de nutrición vegetal, manejo integrado de plagas o mejoramiento de las características biológicas del suelo”. Siete años después, la Resolución 375 fue derogada por la Resolución 698 de 2011 (ICA, 2011).

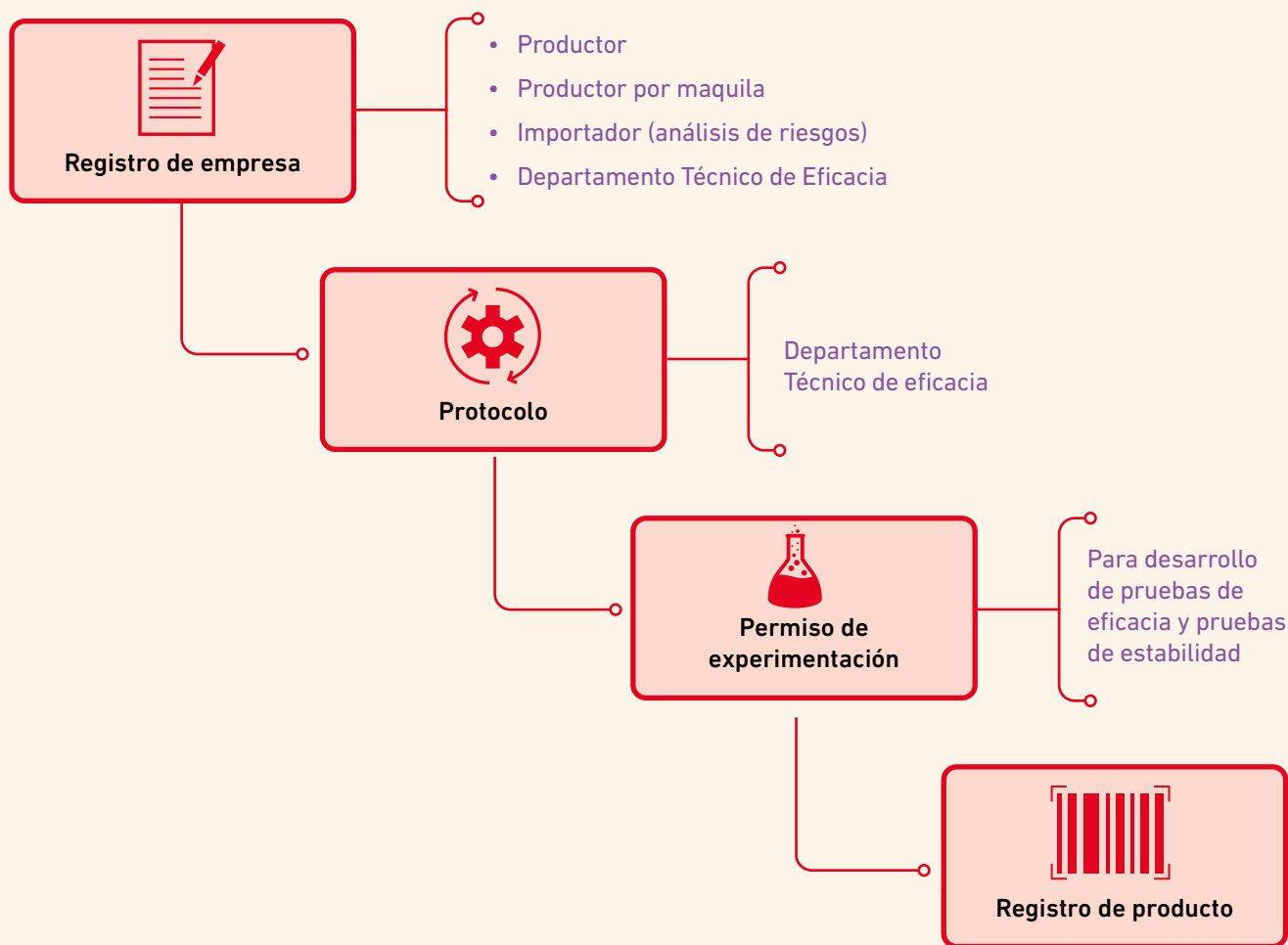
La Resolución 698 de 2011, vigente al año 2019, especifica la normatividad para productores de bioinsumos, donde se agrupan los productos biocontroladores y los inoculantes biológicos, e incluye nuevas regulaciones para el registro

de un producto que no sea producido por el interesado, es decir, que importe o maquile el producto. Se indica también que, para el registro del productor, se realizará una visita técnica de verificación a la planta de producción, lo que permite confirmar las condiciones técnicas de las solicitudes de registro. En relación con el producto, ya sea producido

nacionalmente o importado, se deben realizar pruebas de eficacia agronómica a partir de un protocolo aprobado por el ICA que será supervisado desde el montaje hasta la evaluación final, con el fin de confirmar que el producto cumpla con la actividad agronómica para la cual fue elaborado. El proceso de registro se muestra en la Figura 8.1.

■ **Figura 8.1.** Proceso de registro de inoculantes en Colombia.

Fuente: Elaboración propia con base en ICA (2011)



La resolución vigente les permite a los productores de bioinsumos solicitar cambios en la infraestructura de las plantas de producción, así como la ampliación de la estabilidad, siempre y cuando no alteren la composición del producto, lo cual le permite al productor realizarle cambios al producto sin perder su registro. La flexibilidad en el trámite permite que el productor de bioinsumos pueda trabajar en la mejora continua del producto, y esto hace que pueda ofrecerles un mejor insumo a los productores agropecuarios y, así, ser más competitivo. También es posible la importación de productos para

experimentación, ya sea para realizar pruebas de laboratorio o de eficacia agronómica de estos, lo que sirve para validar su actividad biológica en las condiciones de suelo y ambientales de Colombia, así como en las condiciones particulares de los cultivos colombianos.

Por último, la resolución solicita realizar pruebas de estabilidad biológica en lo que refiere a composición garantizada, pureza microbiológica, actividad biológica y características fisicoquímicas para dos lotes de producción, para los tiempos inicial y final de la vida útil del producto formulado.

Normatividad para la producción y comercialización de inoculantes en Brasil

El 16 de diciembre de 1980, el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAPA) promulgó la Ley 6.894, "sobre la inspección y el control de la producción y el comercio de fertilizantes, correctivos, inoculantes, estimulantes o biofertilizantes para la agricultura" (Presidência da República, 1980). Los inoculantes más frecuentemente comercializados en Brasil contienen rizobios. La Ley 6.894 define como *inoculante* el "material que contiene microorganismos fijadores de nitrógeno y que actúa favorablemente en el desarrollo de la planta", y define *estimulantes* o *biofertilizantes* como "producto que contiene un principio activo capaz de mejorar, directa o indirectamente, el desarrollo de las plantas".

La ley define la inscripción obligatoria de los productos al MAPA, así como las normas para la inspección y fiscalización de los productos. A esta ley se le hicieron algunos cambios el año siguiente, por medio de la Ley 6.934 del 13 de julio de 1981, cuya principal modificación se refería a la definición de *inoculante*, que pasó a ser "la sustancia que contenga microorganismos con desempeño favorable para el desarrollo vegetal" (Presidência da República, 1981). Con la creación del Mercado Común del Sur (Mercosur) en 1998, y con la ley común entre los países que lo componen, la definición de *inoculante* se confirmó como "todo producto que contenga microorganismos con acción estimulante para el crecimiento vegetal" (Mercosur, 1998).

El 14 de enero de 2004, con la publicación del Decreto 4.954 (Presidência da República, 2004), se aprobó la reglamentación de la Ley 6.894 de 1980 y se revocaron los decretos 86.955 y 99.427. Este decreto modificó, nuevamente, la definición de *inoculante*, que ahora sería un "producto que contiene microorganismos con rendimiento favorable para el crecimiento de las plantas", y de *biofertilizantes*, que pasaron a ser "los productos que contienen un ingrediente activo o agente orgánico, libre de sustancias agrotóxicas, y que son capaces de actuar directamente en la totalidad o parte de las plantas cultivadas, elevando su productividad".

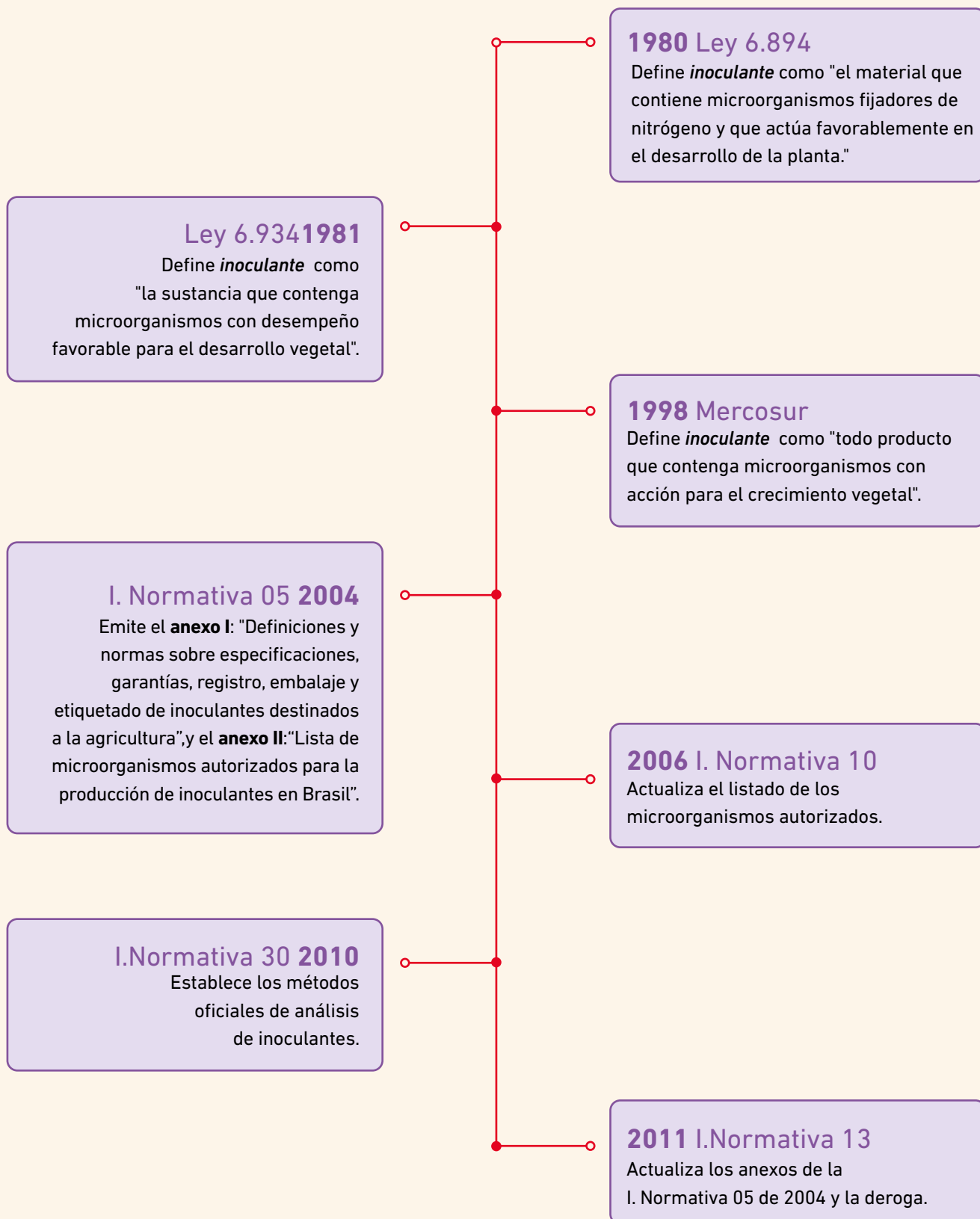
La siguiente modificación, publicada en la Instrucción Normativa 05 del 6 de agosto de 2004, propuso dos anexos: anexo I: "Definiciones y normas sobre especificaciones, garantías, registro, embalaje y etiquetado de inoculantes destinados a la agricultura", y anexo II: "Lista de microorganismos autorizados para la producción de inoculantes en Brasil". Posteriormente, se publicó la Instrucción Normativa 10 del 21 de marzo de 2006, en la cual se realizó la actualización del listado de los microorganismos autorizados para la producción de inoculantes en Brasil.

Más adelante, a través de la Instrucción Normativa 30 del 12 de noviembre de 2010, se establecieron los métodos oficiales de análisis de inoculantes, su calificación, identificación y análisis de pureza. La última modificación realizada se dio con la Instrucción Normativa 13 del 24 de marzo de 2011, por medio de la cual se aprobaron las normas sobre especificaciones, garantías, registro, embalaje y etiquetado de inoculantes para la agricultura, así como las relaciones de microorganismos autorizados y recomendados para la producción de inoculantes en Brasil; esto se presentó por medio de tres anexos: anexo I: "Normas sobre especificaciones, garantía, registro, envasado y etiquetado de inoculantes destinados a uso agrícola"; anexo II: "Lista de microorganismos autorizados para la producción de inoculantes en Brasil", y anexo III: "Lista de microorganismos recomendados para la producción de inoculantes en Brasil". Además, esta última normativa derogó la Instrucción Normativa 05 de 2004.

En resumen, la normatividad en Brasil para el control de calidad de los inoculantes establece los métodos oficiales de análisis, calificación, identificación y análisis de pureza. Los estándares establecidos para la verificación son descritos de tal forma que, para cada microorganismo del listado de los microorganismos aprobados, se establece el medio de cultivo en el cual se realizará el recuento en placa, el periodo de incubación, el medio de cultivo para el número más probable (NMP), el periodo de incubación para la interpretación del NMP y la temperatura de incubación. Esto le permite al productor de inoculantes conocer en qué condiciones será evaluado el producto, y así puede anticipar el estricto cumplimiento de los estándares evaluados (Figura 8.2).

■ **Figura 8.2.** Evolución normativa sobre los inoculantes en Brasil.

Fuente: Elaboración propia





Comparación de las normatividades para la producción y comercialización de inoculantes

La normatividad analizada para el registro y control de inoculantes de uso agrícola en Colombia y Brasil tiene como objetivo esencial garantizar la calidad y eficacia de los insumos químicos, para asegurar la productividad y la protección de los cultivos, y prevenir y reducir los impactos negativos que puedan causar.

Una de las diferencias encontradas es que, mientras en Brasil es el MAPA quien hace pruebas de germinación y en invernadero a los inoculantes, en Colombia se establecen los parámetros para las pruebas de eficacia, para que sean realizadas por un tercero.

En relación con las garantías de calidad, la tabla 8.1 presenta la comparación de las regulaciones de los dos países, teniendo en cuenta que los inoculantes microbianos comprenden dos elementos constitutivos de la misma importancia: el o los microorganismos y un material de soporte (Mazid & Khan, 2015).

■ Tabla 8.1. Comparación de los requisitos de calidad exigidos para los inoculantes biológicos en Colombia y Brasil

Fuente: Elaboración propia

1 Control de calidad del producto

Colombia:

- El productor establece la concentración del producto a través del desarrollo de investigaciones aplicadas.
- Evaluación de al menos dos lotes del producto, cada uno en el tiempo cero, es decir, inmediatamente después de formulado, y al final del periodo de vigencia, incluyendo 1) bioensayo de la actividad biológica, 2) características microbiológicas relacionadas con la composición, 3) pureza y 4) características fisicoquímicas.
- Se permiten soportes no estériles, pero deben realizarse pruebas para la determinación de Salmonella, coliformes totales y metales pesados en el tiempo cero de producción.

Brasil:

- Productos que contienen bacterias fijadoras de nitrógeno deben tener una concentración mínima de 1×10^9 ufc g⁻¹ o mL⁻¹ de producto hasta la fecha de vencimiento.
- La concentración de los microorganismos es establecida por la agencia brasileña para la investigación científica oficial o acreditada por el mapa de acuerdo con las pruebas realizadas durante el registro. La concentración se informa durante el proceso de registro del producto, y el productor debe velar por cumplirla en cada lote.
- Medio de soporte estéril, y cuando el producto es sólido, debe estar libre de microorganismos en factor de dilución 1×10^{-2} .

2 Soporte

Colombia:

- No se hace mención sobre las condiciones de supervivencia de los microorganismos.
- El producto debe tener una pureza del 95% y no debe contener microorganismos contaminantes ni patógenos a humanos, plantas o animales.

Brasil:

- El producto debe proporcionar condiciones de supervivencia de los microorganismos.
- El producto debe estar libre de microorganismos no especificados en un factor de dilución 1×10^{-5} .

3 Pureza

Colombia:

- Es establecida en las pruebas de estabilidad de producto.

Brasil:

- Debe ser de al menos seis meses a partir de la fecha de fabricación.

4 Vida útil

Colombia:

- No hay restricciones sobre la vida útil.

Brasil:

- El producto debe estar preparado solamente con microorganismos autorizados.

5 Tipo de microorganismo

Colombia:

- No hay restricciones sobre el tipo de microorganismo.

Brasil:

- Los productos hechos con microorganismos recomendados deben incluir aspectos técnico-científicos concluyentes, emitidos por la agencia brasileña de investigación oficial o acreditada, que demuestren la viabilidad y eficiencia de su uso agrícola.

El primer ítem analizado en los criterios de calidad solicitados fue la concentración, y se encontró que en Brasil se establece una concentración mínima de microorganismos viables en el caso de que el inoculante esté compuesto por bacterias fijadoras de nitrógeno. Los estándares de calidad de los inoculantes rizobianos varían de acuerdo con el país, pero en la mayoría de estos se establecen valores mínimos de recuento de células viables de rizobios, que van desde 5×10^7 hasta 1×10^9 UFC g^{-1} o mL^{-1} de inoculante, debido a que la cantidad de inóculo que sobrevive sobre la semilla es pequeña (aproximadamente del 5% al 10%) (Benintende, 2010). En el caso de microorganismos asociativos y promotores del crecimiento vegetal, la norma es similar en Brasil y en Colombia, donde, de acuerdo con cada caso y las condiciones, se establece, a través del desarrollo de investigaciones aplicadas, la concentración del producto para asegurar la supervivencia de los microorganismos en el suelo. Este umbral de las células difiere entre especies, pero es esencial para obtener una respuesta positiva en las plantas; por ejemplo, para *Azospirillum brasilense*, se debe asegurar una concentración de 10^6 - 10^7 células planta⁻¹ (Bashan et al., 2014). No en vano ambos países le dan relevancia a la concentración de células viables que debe tener el microorganismo en el momento de la inoculación, para poder garantizarle al productor la obtención de los mismos resultados presentados en las pruebas de eficacia del producto, debido a que es necesario que el microorganismo se encuentre en una concentración alta, que permita su supervivencia en las condiciones del suelo concretas, como cambios de pH, competencia con los microorganismos nativos, oxigenación y humedad.

El siguiente ítem analizado fue el soporte. En el caso de Colombia, se permite el uso de portadores no estériles, pero se hace la salvedad de que se deben hacer algunos análisis para conservar la inocuidad; así, el producto no puede contener microorganismos contaminantes ni patógenos a humanos, plantas o animales. Por el contrario, en Brasil, el soporte debe ser estéril, debido a que la supervivencia de los rizobios en el inoculante está fuertemente vinculada a la competencia que les hagan otros microorganismos presentes. En muchos países la legislación establece la necesidad de ausencia de contaminantes detectables para que el producto pueda ser comercializado (Benintende, 2010). El estándar solicitado por Brasil, con el requerimiento de un soporte estéril, tiene ventajas significativas para

alcanzar la concentración precisa del microorganismo, evitando la posibilidad de que los microorganismos nativos del soporte disminuyan la concentración del microorganismo de interés o de que estos sean patógenos; sin embargo, el proceso de esterilización hace al inoculante menos rentable, sobre todo en países en desarrollo (Bashan et al., 2014). Al respecto, aunque el costo de producción de los inoculantes puede verse incrementado, el proceso de esterilización del soporte contribuye de manera favorable al mejoramiento de la calidad del producto, pues ayuda a evitar la presencia de microorganismos no deseados durante el proceso de almacenamiento y de microorganismos patógenos que puedan llegar al cultivo. En Colombia, como se dijo, el ICA no exige este proceso de esterilización del soporte, pero podría ser una práctica adoptada por los productores de inoculantes que quieran mejorar su producto.

La vida útil del producto se encuentra en la normatividad de los dos países; sin embargo, en el caso colombiano, el productor debe determinar el tiempo máximo que su producto puede ser almacenado sin perder su actividad biológica, a partir de los datos obtenidos en las pruebas de estabilidad del producto, mientras que en Brasil se exige una vida útil de mínimo seis meses. Este es un tema comercial esencial, debido a que, si bien el tiempo de aplicación en campo es corto, el tiempo de producción de grandes cantidades en la fábrica es largo, por lo que no se puede hacer la aplicación de manera inmediata. Con la tecnología actual, se puede considerar un tiempo de conservación del producto de dos años, aunque es relativamente corto para que los productores puedan almacenarlo y aplicarlo sin perder sus beneficios. Una formulación práctica debe mantenerse, durante periodos de tiempo mayores a dos años, con suficientes bacterias viables para asegurar la inoculación exitosa de las semillas (Bashan et al., 2014). La extensión de la vida útil se puede obtener aumentando el número de microorganismos en el inoculante, dado que se considera que, a pesar de la disminución de la población con el tiempo, suficientes células permanecen vivas en el momento de la siembra. También se puede utilizar un aditivo en la formulación o mantener el almacenamiento en frío, para detener el crecimiento de los microorganismos (Xavier et al., 2004).

La principal diferencia identificada entre la normatividad de Brasil y la de Colombia está relacionada con los listados de microorganismos autorizados y recomendados,

establecidos por el MAPA brasileño en los anexos II y III, respectivamente, de la Instrucción Normativa 13 de 2011. El anexo II incluye los siguientes microorganismos fijadores de nitrógeno simbióticos: *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Mesorhizobium ciceri*, *Mesorhizobium amorphae*, *Methylobacterium* sp., *Sinorhizobium meliloti*, *Azorhizobium doebereineriae*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* y *Rhizobium etli*. El anexo III incluye los siguientes microorganismos recomendados para la producción de inoculantes: *Bacillus subtilis* y *Frateuria aurantia* para eucalipto, y *Azospirillum brasilense* para trigo, maíz y arroz. La inclusión de microorganismos nuevos a los listados se puede realizar a través de informes concluyentes de trabajos de investigación, de acuerdo con los requisitos para evaluar la viabilidad y la eficiencia agronómicas. Los nuevos microorganismos deben ser depositados por la institución responsable de la recomendación en una base indicada por el MAPA, y después reciben una designación específica.

La especificidad de los tipos de microorganismos y sus hospederos propuesta en los anexos II y III del MAPA puede considerarse una fortaleza para la producción de inoculantes en Brasil, donde desde el principio se ha tenido claridad, gracias a estudios científicos, sobre el tipo de cultivo al cual van dirigidos y los microorganismos con mejor actividad biológica reportada. Los procesos de selección de bacterias, así como el mejoramiento genético vegetal, han permitido el desarrollo de variedades de soya con alta respuesta al proceso simbiótico de fijación de nitrógeno (De Souza Moreira, 2008). El alto grado de especificidad que caracteriza estas relaciones simbióticas juega un papel esencial en el éxito de la fijación de nitrógeno, lo que contribuye a la obtención de respuestas positivas en la productividad de los cultivos. El direccionamiento de la relación planta-microorganismo desde la regulación, con fundamentos científicos, puede ser uno de los factores de éxito en la adopción de esta biotecnología en Brasil.



En el caso colombiano, por su parte, no existen los listados de microorganismos aprobados ni recomendados; la normatividad solamente menciona que los inoculantes no deben contener microorganismos patógenos a humanos, plantas o animales, y se rige por una clasificación general en bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno, hongos micorrizógenos, microorganismos solubilizadores de fosfatos, microorganismos productores de promotores del crecimiento vegetal, microorganismos transformadores de materia orgánica para la producción de abonos y microorganismos con actividad biocida. Bashan et al. (2014) mencionan que, para lograr el diseño de un inoculante adecuado, primero deben considerarse las necesidades y prácticas de los productores, así como la importancia del cultivo de interés. La amplitud y generalidad del listado de microorganismos que pueden ser utilizados en Colombia deja la decisión sobre la solución tecnológica y la especificidad planta-microorganismos en manos de los productores de inoculantes, que en su gran mayoría son pequeñas y medianas empresas.

La innovación y competitividad de los inoculantes, cuando la producción está direccionada por el tipo de microorganismo y de cultivo, como en el caso de Brasil, está dada por la formulación. Según Bashan et al. (2014), la formulación es el "arte secreto" industrial que convierte al microorganismo en un activo importante de la empresa, debido a que exige que la cepa sea seleccionada cuidadosamente por especialistas y que los experimentos que conduzcan a un proceso

comercial se hagan tanto en condiciones controladas como en condiciones de campo no controladas, debido a que los productores serán quienes tomen la decisión con base en los resultados positivos repetidos, el fácil manejo y el precio razonable del producto. Al existir un listado oficial de microorganismos y plantas blanco, la competitividad del inoculante se logra a través de la innovación en el proceso de desarrollo, con la optimización del soporte, los medios de cultivo y los métodos de conservación, así como con la garantía de que el productor obtendrá beneficios reales en condiciones de campo.

Un requisito que no hace parte directamente del producto, pero que es indispensable para que la información transmitida al usuario sea la indicada, es la etiqueta (tabla 8.2). La normatividad en Brasil y en Colombia solicita que la información esté escrita en el idioma oficial respectivo, con el fin de que los productores puedan comprenderla. Entre las dos normatividades, una de las diferencias en cuanto a la información solicitada en la etiqueta es el énfasis que se presenta en Colombia en las condiciones de manejo del envase en el momento de ser desechado, pues se hacen recomendaciones como el doble lavado, la no reutilización y la aclaración de los datos toxicológicos de su contenido. La etiqueta es el primer contacto que tiene el agricultor con el producto, por lo que es de suma importancia. Esta debe ser lo más clara posible para que el agricultor logre comprender, en lo posible, el tipo de tecnología que está utilizando y para que no se presenten inconvenientes por una mala interpretación.



■ **Tabla 8.2.** Comparación de los requisitos exigidos para las etiquetas de los inoculantes biológicos en Colombia y Brasil

Fuente: Elaboración propia

| | | | | | | | |
|---|--|---|-----------------------------|----|---|--|----------------------|
| 1 | Idioma de la etiqueta | Colombia: Español | Brasil: Portugués | 6 | Modo de aplicación | Colombia: Sí | Brasil: Sí |
| 2 | Identificación del productor o importador | Colombia: Sí | Brasil: Sí | 7 | Dosificación | Colombia: Sí | Brasil: Sí |
| 3 | Denominación del producto | Colombia: Marca del producto y la denominación “Bioinsumo de uso agrícola” en negrilla, seguida del tipo de bioinsumo; por ejemplo: “Bioinsumo de uso agrícola – Inoculante biológico formulado – Tipo concentrado soluble” | | 8 | Fecha de fabricación o fecha de caducidad | Colombia: Sí | Brasil: Sí |
| 4 | Tipo de microorganismo contenido | Colombia: No existe una codificación de colección oficial | | 9 | Número de lote | Colombia: Sí | Brasil: Sí |
| 5 | Instrucciones para el almacenamiento | Colombia: Sí | | 10 | Clasificación toxicológica | Colombia: No para biofertilizantes | |
| 4 | Tipo de microorganismo contenido | Brasil: Denominación del producto, seguida de la presentación física, el cultivo de aplicación y el tipo de soporte utilizado; por ejemplo: “Inoculante de turba sólida para soya” | | 10 | Condiciones de manejo y disposición del envase | Colombia: Sí | Brasil: No |
| 5 | Instrucciones para el almacenamiento | Brasil: Número de identificación del microorganismo en la colección oficial | | 11 | Registro del producto | Colombia: Sí | Brasil: No |

Otra diferencia relevante observada fue la obligatoriedad, en Brasil, de realizar el depósito del microorganismo en una colección oficial a cargo del MAPA responsable de la conservación y mantenimiento de las cepas. Adicionalmente, cada año los productores e importadores deben adquirir los microorganismos que desean producir de una institución responsable de mantener el banco de germoplasma. Los bancos de germoplasma son un componente fundamental del proceso, dado que permiten preservar los microorganismos y mantienen su consistencia genética para la elaboración de productos biológicos, lo cual permite garantizar la actividad biológica y la viabilidad de las cepas (Rojas-Tapias et al., 2013).

En Colombia, las empresas productoras de bioinsumos, entre ellos los inoculantes, se encargan directamente del mantenimiento de las cepas de los microorganismos. El ICA requiere, específicamente, que la empresa acredite la elaboración de un contrato con un biólogo, químico, agrónomo, microbiólogo, ingeniero biotecnológico o bacteriólogo para que ejerza las funciones de director técnico responsable de la calidad del producto, con el fin de asegurar que la empresa cuente con personal capacitado para realizar un adecuado mantenimiento de las cepas. Sin embargo, hasta la fecha, la liofilización y la ultracongelación se consideran los métodos más eficientes para preservar los microorganismos (Sorokulova et al., 2012), aunque requieren el uso de equipo especializado y costoso para preservar estables las bacterias. La imposibilidad de implementar estas tecnologías por parte de las empresas puede llevar a que usen métodos obsoletos que causen la muerte del microorganismo o la pérdida de la actividad biológica de interés.

Una última diferencia normativa entre los dos países es que la norma colombiana es única y específica para los bioinsumos de uso agrícola, sean biofertilizantes o bioplaguicidas, y su registro es para la comercialización a nivel nacional. En tanto, la normativa brasileña tiene una regulación para el registro de bioplaguicidas, que están incluidos en la legislación de agrotóxicos, y otra para los biofertilizantes, y la comercialización, por su parte, debe ser aprobada por cada estado.



Conclusiones

Los derechos de propiedad intelectual que permiten la protección de innovaciones biotecnológicas en Colombia y Brasil están vinculados a los acuerdos y legislaciones nacionales e internacionales relacionados con el desarrollo sostenible y la conservación, así como al uso sostenible y la distribución justa y equitativa de los beneficios derivados de la utilización de los recursos genéticos.

Además, cuentan con normatividad específica para garantizar a los agricultores un producto de calidad, que les permita beneficiarse de las ventajas que les pueden generar este tipo de biotecnologías. Este análisis logró evidenciar diferencias en la legislación de los dos países, especialmente en el aseguramiento de la calidad de los inoculantes, en el que Brasil presentó un mayor grado de formalidad en las exigencias, lo que evidencia un interés de fondo por promover el uso de la biotecnología a través de su adopción exitosa por parte de los productores.

La Oficina Europea de Patentes incluye en el término *microorganismo* a las bacterias y levaduras, los hongos, las algas, las células, los protozoarios, los plásmidos y los virus; sin embargo, los países pueden 1) decidir proteger solamente microorganismos modificados, tal como lo hacen Colombia y Brasil; 2) interpretar de forma restringida el concepto, excluyendo genes y secuencias genéticas, o 3) limitar el ámbito de la patente a un uso específico del producto, lo cual sería compatible con los Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual Relacionados con el Comercio (Adpic). Sin embargo, la decisión de no proteger a los microorganismos no modificados genéticamente podría ser perjudicial, debido a que, según Overmann (2015), no utilizar depósitos oficiales de microorganismos ha llevado a una continua duplicación de esfuerzos de investigación y desarrollo tecnológico que ha impedido el desarrollo de la obtención de productos a partir de microorganismos, sobre todo en aquellos países donde el sector de la bioindustria no está muy avanzado, debido a que las investigaciones nuevas podrían iniciar a partir de los resultados de las investigaciones previas.

El tiempo y los recursos invertidos para el desarrollo de productos biotecnológicos, tales como los bioinsumos, podrían reducirse si los investigadores iniciaran sus procesos a partir de microorganismos que han sido almacenados en un depósito internacional para mejorar los productos. Asimismo, podría controlarse adecuadamente que dos microorganismos aislados por investigadores o empresas competidores en diferentes países, del mismo género y con actividades benéficas para la agricultura similares, puedan ser utilizados para producir, válidamente, dos productos nuevos. Sin cooperaciones internacionales activas y el intercambio de cepas, es difícil construir las capacidades humanas y tecnológicas para aislar, caracterizar y preservar los microorganismos y, por lo tanto, para generar valor agregado a partir de ellos.

Uno de los problemas de procedimiento evidenciados en Colombia y Brasil es que ninguno de los dos cuenta con un depósito de microorganismos reconocido por los tratados internacionales, lo que podría causar posibles demoras en los procesos de depósito o de accesibilidad posteriores. Las instituciones de investigación públicas, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) y la Embrapa podrían, a través de sus bancos de germoplasma, realizar los trámites y ajustes necesarios para que las cepas

obtenidas a partir de la biodiversidad nativa pudieran ser depositadas en el mismo país de procedencia. Esto les permitiría asegurar que las cepas se mantengan genéticamente estables y mantener la soberanía sobre el recurso genético, debido a que podrían hacer seguimiento a su uso, para asegurar la distribución de los beneficios.

Finalmente, los listados de microorganismos autorizados y recomendados que rigen en Brasil para la producción de inoculantes son una herramienta práctica que podría ser analizada, de forma más detallada, para su implementación en Colombia. La trayectoria que presenta Brasil en el control y la verificación de la calidad de los productos que son entregados al agricultor lo ha llevado al desarrollo del listado de microorganismos autorizados, el cual ha sido construido con años de experiencia y con un enfoque hacia la biotecnología de fijación de nitrógeno. Este listado le permite a la autoridad brasileña disminuir al máximo el riesgo de que sus productos contengan microorganismos patógenos que causen efectos desagradables en los cultivos y la población por errores en el proceso de desarrollo del producto. Esto ha llevado a que los productores depositen su confianza en el uso de inoculantes, debido a sus resultados constantes en el tiempo. Así pues, el desarrollo de listados de microorganismos autorizados y recomendados en Colombia sería de gran utilidad para generar procesos de transferencia tecnológica exitosos.

Las diferencias identificadas entre los dos países son sustantivas: Brasil presenta un marco jurídico y normativo que podría servir de ejemplo para avanzar

en el aprovechamiento de la biodiversidad en Colombia. Ejemplo de esto es el proceso de negociación de los beneficios derivados en caso de que se desarrolle un producto comercializable, pues desde un principio los porcentajes que se deben aplicar para la distribución de los beneficios deben ser claros para las partes y permitir que las empresas puedan hacer análisis económicos de la inversión antes de desarrollar el producto. En el caso de la obtención de patentes, no se encontraron diferencias, debido a que los dos países se han guiado por la legislación internacional. Por último, en cuanto a la normatividad para el uso agrícola, Brasil tiene protocolos claros para el registro y control de calidad de productos a base de bacterias fijadoras de nitrógeno, con listados de microorganismos aprobados y recomendados para los cultivos relevantes en la agricultura. Como se dijo más atrás, la adopción en Colombia de mecanismos similares a los brasileños en cuanto a estos listados podría facilitar la transferencia de tecnología a los productores.

A partir de este análisis comparativo entre la normatividad de Colombia y la de Brasil, se pueden identificar algunas posibilidades de mejora para la colombiana. Por ejemplo, podría facilitarse el proceso de bioprospección de bioinsumos a través de la simplificación del proceso de acceso a recursos genéticos con fines de investigación, por medio de un contrato general entre el Estado y las instituciones que han tenido tradición en la investigación, quienes se pueden encargar de hacer un mejor seguimiento al proyecto que el MADS, con reportes frecuentes de los avances. Igualmente, las autoridades colombianas podrían evaluar el establecimiento de un listado de microorganismos-planta que oriente el desarrollo de los inoculantes y los bioinsumos, así como al productor, de acuerdo con las necesidades del país.



Referencias

- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J.-P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, 378(1), 1-33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Benintende, S. M. (2010). Calidad de inoculantes comerciales para el cultivo de soja en la Argentina: concentración de rizobios viables y presencia de contaminantes. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(2), 129-132. https://www.researchgate.net/publication/262652456_Calidad_de_inoculantes_comerciales_para_el_cultivo_de_soja_en_la_Argentina_concentracion_de_rizobios_viables_y_presencia_de_contaminantes
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383(1-2), 3-41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Comunidad Andina de Naciones (CAN). (1996, 2 de julio). Decisión 391. Régimen Común sobre Acceso a los Recursos Genéticos. https://www.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadyServiciosEcosistemicos/pdf/Recursos_Gen%C3%A9ticos_/Decisi%C3%B3n_391_de_1996.pdf
- Comunidad Andina de Naciones (CAN). (2000, 14 de septiembre). Decisión 486. Régimen Común sobre Propiedad Industrial. <http://www.wipo.int/edocs/lexdocs/laws/es/can/can012es.pdf>
- Comunidad Andina de Naciones (CAN). (2008, 13 de agosto). Decisión 689. Adecuación de determinados artículos de la Decisión 486 – Régimen Común sobre Propiedad Industrial, para permitir el desarrollo y profundización de derechos de propiedad industrial a través de la normativa interna de los países miembros. <http://www.wipo.int/edocs/lexdocs/laws/es/can/can017es.pdf>
- Congreso de Colombia. (2009, 21 de julio). Ley 1333 de 2009. Por la cual se establece el procedimiento sancionatorio ambiental y se dictan otras disposiciones. <https://www.funcionpublica.gov.co/eva/gestornormativo/norma.php?i=36879>
- Cova, S., Mancía, I., & Góes, A. (2012). Education, companies and patents in biotechnology in Brazil. *Revista Geintec*, 2(2), 138-153.
- De Souza Moreira, F. M. (2008). *Avaliação da eficiência de inoculantes microbianos de leguminosas em regiões inexploradas e de métodos para seu controle de qualidade e inspeção visando à expansão de seu uso na agricultura brasileira*. Centro Educacional de Lavras; UniLavras. <http://www.inoleg.dcs.ufra.br/phocadownload/projeto.pdf>
- De Vasconcelos, R. M. (2015). Conhecendo a nova lei de acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado. *Agência Intelecto*. <http://www.propp.ufu.br/acontece/2018/09/conhecendo-nova-lei-de-acesso-ao-patrimonio-genetico-e-ao-conhecimento-tradicional>
- Del Río Duque, M. L. (2009). Un análisis de la fuga de cerebros desde la teoría de redes sociales. *Sociedad y Economía*, (17), 89-113. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=99612495005>



- Departamento Nacional de Planeación (DNP). (2011, 14 de junio). Documento Conpes 3697. "Política para el desarrollo comercial de la biotecnología a partir del uso sostenible de la biodiversidad". <https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/Conpes/Econ%C3%B3micos/3697.pdf>
- Ferreira, E., Nogueira, M. A., Fukami, J., Conceição, R. B., & Hungria, M. (2011, agosto). *Nova legislação, recomendação de doses de inoculantes e pré-inoculação: riscos ao sucesso da contribuição da fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja* [presentación en reunión]. XXXII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil, San Pablo, Brasil.
- Fuentes-Ramirez, L. E., & Caballero-Mellado, J. (2006). Bacterial biofertilizers. En Z. A. Siddiqui (ed.), *PGPR: Biocontrol and biofertilization* (pp. 143-172). Springer. https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7_5
- García de Salamone, I. E. (2011). Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agroecosistemas [sic]. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(1), 1-3. <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213019226001.pdf>
- Gianinazzi, S., & Vosátka, M. (2004). Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: Science meets business. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1.264-1.271. <https://doi.org/10.1139/b04-072>
- Gómez, D., & Nemojá Soto, G. (2007). Ilegalidad de la investigación genética en Colombia. *Pensamiento Jurídico. Estudios sobre Bioderecho*, (18), 265-284. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/peju/article/view/38610>
- Grageda-Cabrera, O. A., Díaz-Franco, A., Peña-Cabriales, J. J., & Vera-Nuñez, J. A. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6), 1.261-1.274. <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/agricolas/article/view/1376>
- Hungria, M., & Campo, R. J. (2007). Inoculantes microbianos: situação no Brasil. En M. L. Izaguirre-Mayoral, C. Labandera, & J. Sanjuán (eds.), *Biofertilizantes en Iberoamérica: visión técnica, científica y empresarial* (pp. 22-31). Editorial Universitaria.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (1991a). Resolución ICA 3418. Por la cual se dictan disposiciones sobre el régimen de la industria y comercio de los inoculantes para leguminosas y se modifica parcialmente la Resolución No. 420 de 1988.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (1991b). Resolución ICA 4313. Sobre la cual se dictan disposiciones sobre producción, comercialización y manejo de los insecticidas microbiales y nematodos entomopatógenos.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2004a, 27 de febrero). Resolución ICA 375. Por la cual se dictan las disposiciones sobre registro y control de los bioinsumos y extractos vegetales de uso agrícola en Colombia. <https://www.mincit.gov.co/getattachment/0b26d8aa-9460-41d8-b176-b2c976986d72/Resolucion-375-del-27-de-febrero-de-2004-For-la-cu.aspx>
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2004b, 15 de junio). Resolución ICA 1277. Por la cual se reglamentan los análisis de riesgos de plagas de los vegetales y enfermedades de los animales para la importación y exportación de productos agropecuarios. https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/resolucion_ica_1277_2004.htm
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2011, 4 de febrero). Resolución ICA 698. Por medio de la cual se establecen los requisitos para el registro de departamentos técnicos de ensayos de eficacia, productores e importadores de bioinsumos de uso agrícola y se dictan otras disposiciones. https://www.redjurista.com/Documents/resolucion_698_de_2011_ica_-_instituto_colombiano_agropecuario.aspx#/
- Kamau, E., Fedder, B., & Winter, G. (2010). The Nagoya Protocol on access to genetic resources and benefit sharing: What is new and what are the implications for provider and user countries and the scientific community? *Law, Environment and Development Journal*, 6(3), 248-263. https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=2178975
- Landman, T. (2011). *Política comparada: una introducción a su objeto y métodos de investigación*. Alianza.
- Malusá, E., & Vassilev, N. (2014). A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6.599-6.607. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>
- Martínez Barrabés, M. (2014). *La patente biotecnológica y la OMC*. Marcial Pons.
- Mazid, M., & Khan, T. A. (2015). Future of bio-fertilizers in Indian agriculture: An overview. *International Journal of Agricultural & Food Research*, 3(3). <https://www.sciencetarget.com/Journal/index.php/IJAFR/article/view/132>
- Melgarejo, L. M. (2012). Introducción. En A. M. Cotes Prado, L. E. Barrero Meneses, F. Rodríguez Villamizar, M. V. Zuluaga Mogollón, & H. Arévalo Martínez (eds.), *Bioprospección para el desarrollo del sector agropecuario de Colombia* (pp. 9-18). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).
- Mercado Común del Sur (Mercosur). (1998, 22 de julio). MERCOSUR/GMC/RES N° 28/98. Disposiciones para el Comercio de Inoculantes. <http://www.sice.oas.org/Trade/MRCSRS/Resolutions/Res2898s.asp>
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADS). (2013, 27 de junio). Decreto 1376. Por el cual se reglamenta el permiso de recolección de especímenes silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial. <http://wsp.presidencia.gov.co/Normativa/Decretos/2013/Documents/JUNIO/27/DECRETO%201376%20DEL%2027%20DE%20JUNIO%20DE%202013.pdf>
- Ministerio del Medio Ambiente. (1997, 7 de julio). Resolución 620 de 1997. Por la cual se delegan algunas funciones contenidas en la Decisión 391 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena

- y se establece el procedimiento interno para tramitar las solicitudes de acceso a los recursos genéticos y sus productos derivados. https://www.minambiente.gov.co/images/BosquesBiodiversidadyServiciosEcosistemicos/Recursos_Gen%C3%A9ticos/Normativa/Resoluci%C3%B3n_620_de_1997.pdf
- Ministerio del Medio Ambiente. (2000, 1.º de marzo). Decreto 309 de 2000. Por el cual se reglamenta la investigación científica sobre diversidad biológica. <http://corponarino.gov.co/expedientes/juridica/2000decreto309.pdf>
- Ministério do Meio Ambiente (MMA). (2010). Instrução normativa No. 3. Fixa normas para a utilização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBio, na forma das diretrizes e condições previstas nesta Instrução Normativa, e regulamenta a disponibilização, o acesso e o uso de dados e informações recebidos pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade por meio do SISBio. https://www.icmbio.gov.br/flonatapajos/images/stories/INSTRU%C3%87%C3%83O_NORMATIVA_ICMBio_N%C2%BA_3_DE_2014_com_retifica%C3%A7%C3%A3o_do_DOU18062015.pdf
- Naciones Unidas. (1992). *Convenio sobre la diversidad biológica*. <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>
- Nemogá Soto, G. R. (2013). *Investigación genética y política sobre biodiversidad: Escenarios para el reconocimiento de la diversidad étnica y cultural* (vol. 4). Ibañez.
- Overmann, J. (2015). Significance and future role of microbial resource centers. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.02.008>
- Presidência da República [Brasil]. (1980, 16 de diciembre). Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980. Dispõe sobre a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas, destinados à agricultura, e dá outras providências. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1980-1988/L6894.htm
- Presidência da República [Brasil]. (1981, 13 de julio). Lei 6.934, de 13 de julho de 1981. Altera a Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes, ou biofertilizantes, destinados à agricultura, e dá outras providências. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/1980-1988/L6934.htm
- Presidência da República [Brasil]. (1996, 14 de mayo). Ley 9.279, de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9279.htm
- Presidência da República [Brasil]. (2001, 23 de agosto). Medida Provisória nº 2186-16, de 2001. Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição, os arts. 1º, 8º, alínea "j", 10, alínea "c", 15 e 16, alíneas 3 e 4 da Convenção sobre Diversidade Biológica, dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para sua conservação e utilização, e dá outras providências. <https://www.congressonacional.leg.br/materias/medidas-provisorias/-/mpv/48024/pdf>
- Presidência da República [Brasil]. (2004, 14 de enero). Decreto Nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas destinados à agricultura. <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2004/decreto-4954-14-janeiro-2004-497758-norma-actualizada-pe.html>
- Presidência da República [Brasil]. (2015, 20 de mayo). Lei Nº 13.123, de 20 de maio de 2015. Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição Federal, o Artigo 1, a alínea j do Artigo 8, a alínea c do Artigo 10, o Artigo 15 e os §§ 3º e 4º do Artigo 16 da Convenção sobre Diversidade Biológica, promulgada pelo Decreto nº 2.519, de 16 de março de 1998; dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade; revoga a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001; e dá outras providências. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2015/Lei/L13123.htm
- Ribadeneira Sarmiento, M. (2014). Protocolo de Nagoya sobre acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de su utilización: cuatro retos para su implementación nacional en países de América Latina y el Caribe. *Opera*, (15), 127-146. <https://ssrn.com/abstract=2539201>
- Rojas Blanco, D. L. (2013). Vicisitudes del Protocolo de Nagoya en Colombia. *Gestión y Ambiente*, 16(3), 17-23. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/gestion/article/view/36946>
- Rojas-Tapias, D., Ortiz-Vera, M., Rivera, D., Kloepper, J., & Bonilla, R. (2013). Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. *Universitas Scientiarum*, 18(2), 129-139. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832013000200001&nrm=iso
- Sorokulova, I., Watt, J., Olsen, E., Globa, L., Moore, T., Barbaree, J., & Vodyanoy, V. (2012). Natural biopolymer for preservation of microorganisms during sampling and storage. *Journal of Microbiological Methods*, 88(1), 140-146. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.11.002>
- Valbuena, G. (2014). Social, economic and environmental impacts of bioeconomy in Latin America and the Caribbean. En E. Hodson de Jaramillo (ed.), *Towards a Latin America and Caribbean knowledge based bio-economy in partnership with Europe (79-87)*. Editorial Pontificia Universidad Javeriana.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Xavier, I. J., Holloway, G., & Leggett, M. (2004). Development of rhizobial inoculant formulations. *Crop Management*, 3(1), 1-6. <https://doi.org/10.1094/CM-2004-0301-06-RV>

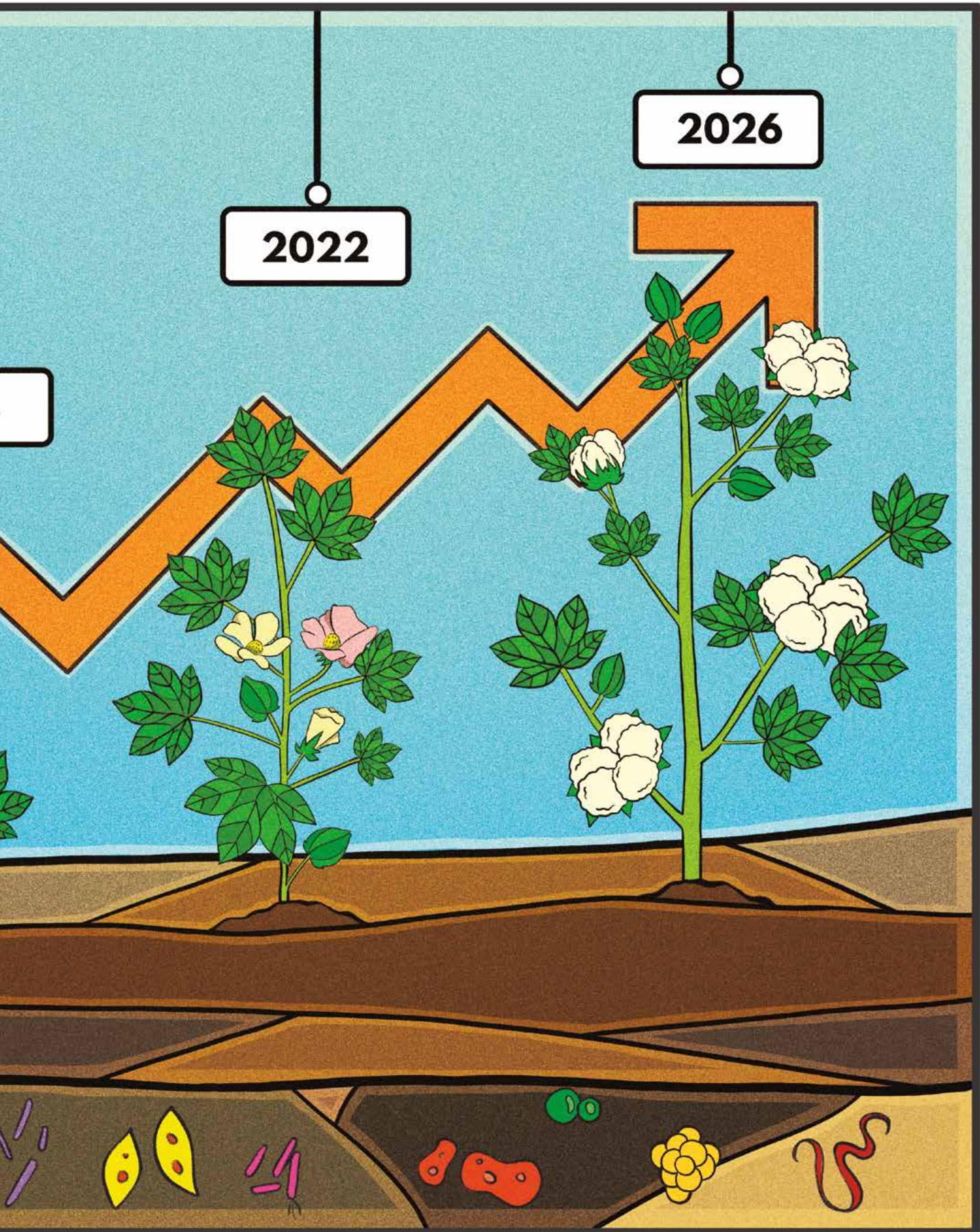
9

El mercado de los biofertilizantes

Diana Marcela León Moreno¹
Erika Andrea Alarcón Torres¹
Martha Isabel Gómez Álvarez¹

1. Bioproductos y Bioprocesos Agropecuarios. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA. Sede Central. Cundinamarca. Colombia.





2022

2026

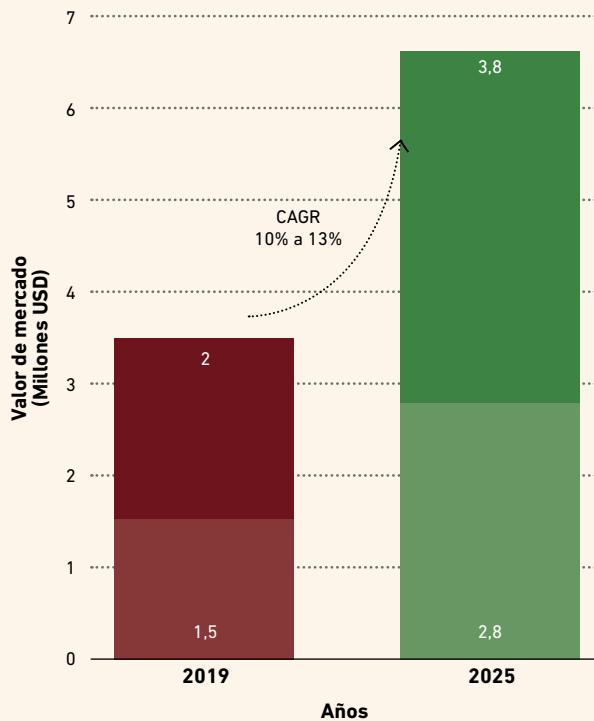
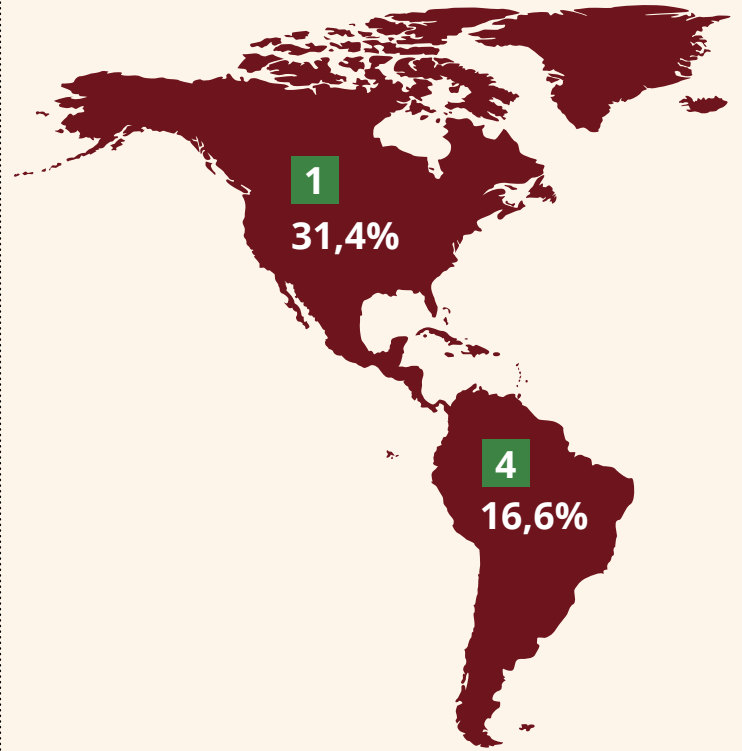
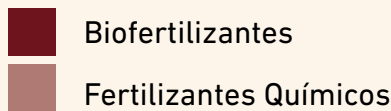
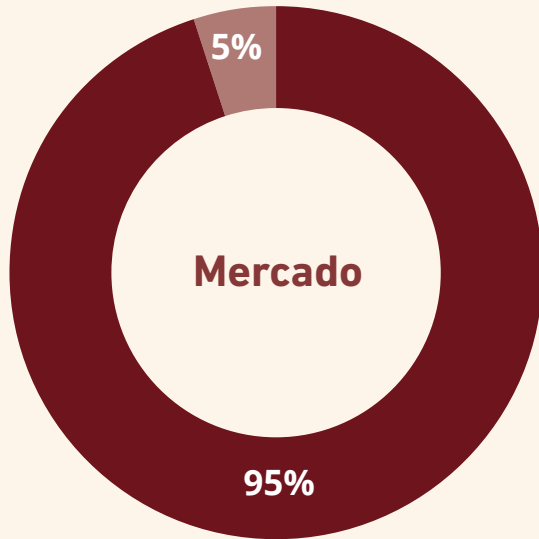
Introducción

Entre los principales mecanismos que utilizan los microorganismos para ejercer su efecto biofertilizante se encuentran la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fósforo y potasio, la producción de sideróforos, la producción de reguladores del crecimiento, la inducción del crecimiento, el cambio en la morfología de las raíces y la estimulación de simbiosis beneficiosas para las plantas (Grageda-Cabrera et al., 2012; Vessey, 2003). Los biofertilizantes cumplen un papel clave en la productividad y sostenibilidad del suelo, pero también en la protección del medioambiente, como insumos ecológicos y rentables para los agricultores, con lo que contribuyen, así, a la sostenibilidad (Mohammadi & Sohrabi, 2012).

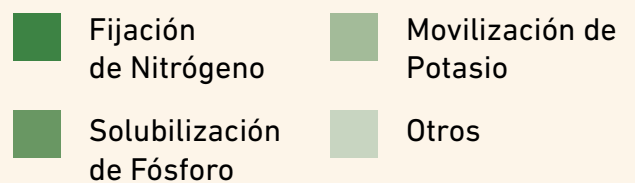


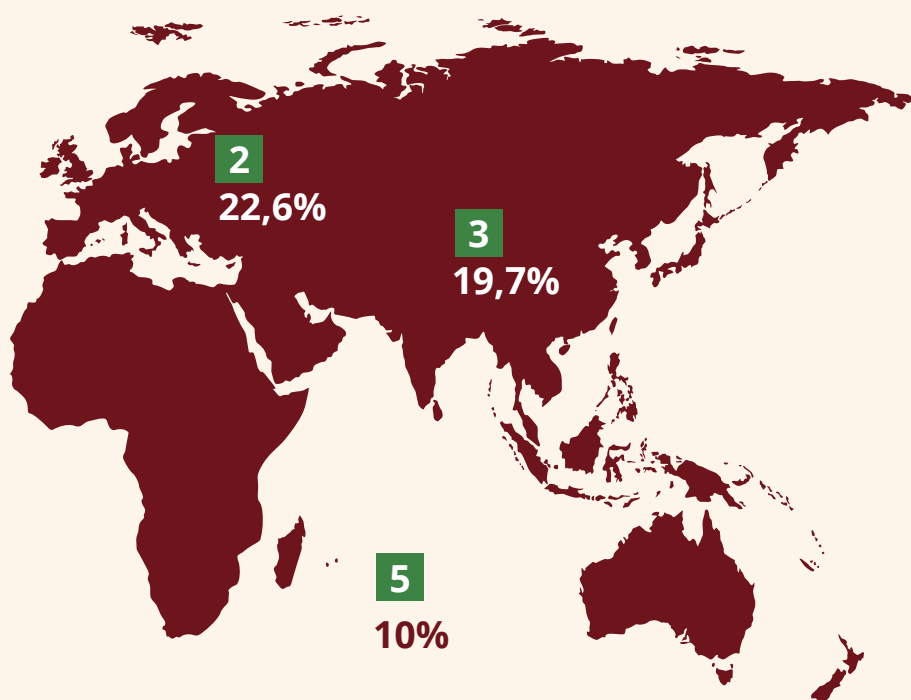


Mercado de biofertilizantes



Segmentación 2014





Mercado de biofertilizantes 2016

- 1 América del Norte
- 2 Europa
- 3 Asia Pacífico
- 4 Latinoamérica
- 5 Resto del mundo

Por principios activos



Bacterias



Cianobacterias



Microrrizas

Tipo de formulación

Líquidas

Sólidas

Tipos de cultivos

Cereales, granos, leguminosas, oleaginosas, frutas y verduras



Segmentación del mercado de los biofertilizantes

Los biofertilizantes son una alternativa importante al uso de fertilizantes de síntesis química, aunque solo representan un 5% del mercado mundial de fertilizantes (Timmusk et al., 2017).

Los biofertilizantes son una alternativa importante al uso de fertilizantes de síntesis química, aunque solo representan un 5% del mercado mundial de fertilizantes (Timmusk et al., 2017). En 2019 se estimaba que la industria de los biofertilizantes estaba valorada en USD 1,5-2 billones, y se espera que crezca un 10-13% anual, lo que representaría un mercado de USD 2,8-3,8 billones en 2025 (Fortune Business Insights, 2020; Markets and Markets, 2020; Mordor Intelligence, 2020d; Ravensberg, 2017).

Segmentación del mercado por actividad biológica

En el mercado global, los biofertilizantes se pueden clasificar teniendo en cuenta la acción que ejercen los productos para que los nutrientes estén disponibles para las plantas. Los principales productos que se encuentran en el mercado son aquellos que permiten la fijación biológica de nitrógeno, los que facilitan la solubilización de fosfatos y los que permiten la movilización de potasio. El principal segmento de los biofertilizantes son los productos para fijación de nitrógeno, con una participación aproximada del 75% del mercado en 2014, es decir, aproximadamente USD 629 millones, los cuales son usados ampliamente en cultivos de trigo, arroz y oleaginosas, entre otros. Después están los productos para solubilización de fosfatos, con un mercado de entre el 15 y el 18% para 2014, es decir, aproximadamente USD 141 millones, los cuales se utilizan principalmente para convertir ácidos orgánicos de bajo peso molecular en formas de productos nutricionales solubles (Bio-FIT Project, 2019b). Por último, están los movilizadores de potasio, con un mercado de entre el 5 y el 6% para 2014. El resto del mercado se repartía en productos que facilitan la adquisición de otros elementos, como zinc, boro y azufre (Fortune Business Insights, 2020).

Segmentación del mercado por principios activos

Los microorganismos usados en los biofertilizantes dependen también de la función que se requiera por parte de estos: para fijación biológica de nitrógeno, se pueden utilizar microorganismos capaces de llevar a cabo la fijación de nitrógeno de vida libre, como bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium* y *Klebsiella*; cianobacterias de los géneros *Anabaena*

y *Nostoc*; bacterias simbióticas de *Rhizobium* y *Frankia*; cianobacterias como *Anabaena azollae*, y aquellas bacterias que permiten asociaciones, como *Azospirillum*. Para solubilización de fósforo, se usan bacterias como *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans* y *Pseudomonas striata*, y hongos como *Penicillium* sp. y *Aspergillus awamori*. Para movilización de potasio, por su parte, se usan micorrizas arbusculares, ectomicorrizas y micorrizas ericoides, entre otras. Y, por último, para movilización de otros micronutrientes, como silicato y zinc, se destaca el género bacteriano *Bacillus* sp. (European Biomass Industry Association, 2019).

Las cianobacterias son uno de los segmentos de mayor importancia por su capacidad de sintetizar y fijar el nitrógeno atmosférico (N_2); se han usado principalmente en el cultivo de arroz, pero también han tenido buenos resultados en cultivos de cebada, avena, tomate, rábano, algodón, caña de azúcar, maíz, chile y lechuga (Chakdar et al., 2012). Las principales cianobacterias usadas son *Anabaena*, *Nostoc* y *Gloeoitrichia* ("Alternativas biológicas a los fertilizantes nitrogenados", s.f.).

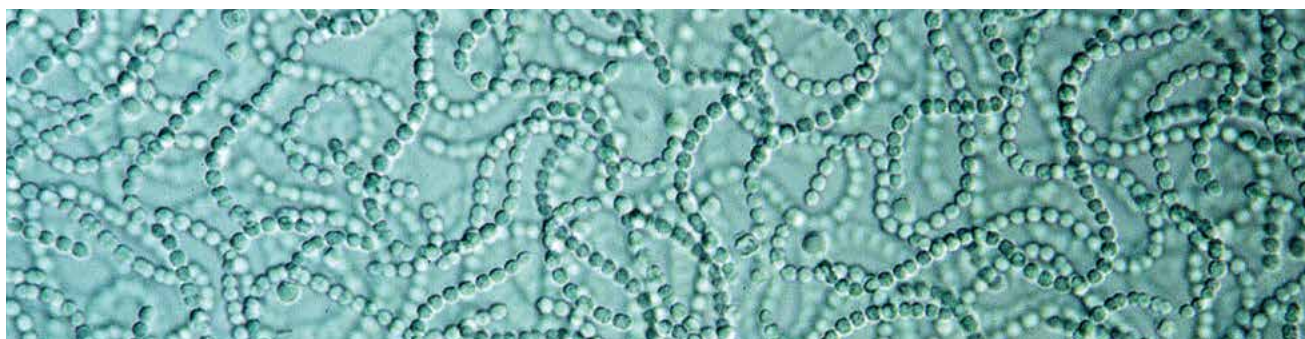
Los inoculantes a base de rizobios son muy usados en el mundo por su capacidad de fijación simbiótica de nitrógeno; los géneros más usados son *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium*. Para 2017, se estimó que en 64 millones de hectáreas en el mundo se usaron biofertilizantes a base de estos microorganismos (Mordor Intelligence, 2020e), y los géneros más usados fueron los ya mencionados. En Estados Unidos, por ejemplo, para el mismo año, el consumo de biofertilizantes a base de estos microorganismos fue de 87.000 toneladas métricas (Research and Markets, 2018).

Azotobacter es otro microorganismo de gran importancia dentro del mercado de biofertilizantes, pues es capaz

de convertir nitrógeno atmosférico en nitrato de amonio en el suelo y también ayuda a retener la humedad del suelo. De las diversas especies de este género, la más usada es *A. chroococcum*, por ser el habitante más dominante en los suelos cultivables, seguida de *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. armeniacus* y *A. paspali*. *Azotobacter* se utiliza como biofertilizante para diferentes cultivos, como trigo, avena, mostaza, cebada, arroz, semillas de lino, girasol, ricino, maíz, sorgo, algodón, yute, remolacha azucarera, tabaco, té, café, caucho y coco (Mordor Intelligence, 2020b).

Otro segmento importante en el mercado son las micorrizas, con las que se generan actividades industriales económicamente importantes en varias partes del mundo. Existen aproximadamente 12 productores de micorrizas ampliamente conocidos en la Unión Europea: en Reino Unido, República Checa, Alemania, Suiza, España y Francia. También se reportan más de 20 grandes productores en otros lugares del mundo, como China, Japón, Canadá y Estados Unidos (Ramírez Rojas et al., 2010). La micorrizas se clasifican en ectomicorrizas, las cuales se aplican principalmente en los cultivos forestales y en producción agrícola y ornamental; y las micorrizas ericoides, que se usan en la familia de ericáceas, rododendros y arándanos (Tapia, 2013).

Por último, está un grupo de microorganismos solubilizadores de fosfato; los principales son *Pseudomonas* sp., *Azospirillum* sp., *Bacillus* sp., *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. Los microorganismos solubilizadores de fosfato (PSM, por sus siglas en inglés) son capaces de hidrolizar compuestos de fósforo insolubles orgánicos e inorgánicos en forma de fósforo soluble, que las plantas pueden asimilar fácilmente (Kalayu, 2019).





Segmentación del mercado por tipo de aplicación, formulación y cultivo

Por tipo de aplicación, el mercado más importante es el de tratamiento de semillas, con un 65% del mercado para 2014, el cual fue valorado aproximadamente en USD 556 millones. Las semillas tratadas con biofertilizantes permiten aprovechar el nitrógeno atmosférico y la disponibilidad de fósforo soluble en el suelo (Bio-FIT Project, 2019b; Fortune Business Insights, 2020), obtener un mejor rendimiento de las plantas y generar en estas una mejor resistencia frente a ataques de virus y bacterias (Markets and Markets, 2020). Respecto a la aplicación en el suelo, este segmento representó casi un 30% del mercado en 2014, el cual fue valorado aproximadamente en USD 256 millones y fue impulsado principalmente por el aumento de la agricultura orgánica. Se esperaba, por ejemplo, que en India, entre los años 2014 y 2020, aumentara en casi USD 1.000 millones (Bio-FIT Project, 2019b; Fortune Business Insights, 2020; Markets and Markets, 2020).

Los biofertilizantes se encuentran tanto en presentaciones sólidas como líquidas; sin embargo, estas últimas tienen una mayor acogida en el mercado de los países en desarrollo, debido a su vida útil, que es mayor a dos años. Además, los fertilizantes líquidos tienen mejores límites de tolerancia a condiciones adversas, y su forma de aplicación es más fácil (Markets and Markets, 2020). Se esperaba que este segmento creciera un 3% en 2020 (Bio-FIT Project, 2019b). El uso de biofertilizantes líquidos también ha promovido el crecimiento del mercado de los aspersores líquidos, y se esperaba que este creciera a una tasa anual compuesta de más del 6% para 2020 (Bio-FIT Project, 2019b).

Los principales segmentos de aplicación de los biofertilizantes por tipo de cultivo son: cereales, granos, leguminosas, oleaginosas, frutas y verduras. Se estimó que el 39% (USD 489 millones) de las ventas en 2016 fueron para uso en cultivos de cereales y granos (Ravensberg, 2017), y se pronostica un mayor crecimiento en los cultivos de frutas y verduras, teniendo en cuenta el nuevo estilo de vida de muchos consumidores, que prefieren los cultivos orgánicos (Markets and Markets, 2020).

Se pronostica un mayor crecimiento en los cultivos de frutas y verduras, teniendo en cuenta el nuevo estilo de vida de muchos consumidores, que prefieren los cultivos orgánicos (Markets and Markets, 2020).

Segmentación del mercado por región

Para 2016, América del Norte fue el mercado más grande, con el 31,4% de los ingresos mundiales por biofertilizantes, seguido por Europa, con el 22,6%; Asia-Pacífico, con el 19,7%; Latinoamérica, con el 16,6%, y el resto del mundo, con el 10% (Research Nester, 2019a, 2019b).

El mercado de América del Norte, para el mismo año, fue valorado en USD 300-350 millones, y se espera que crezca a una tasa compuesta anual del 12% hasta 2023/2024 (Market Data Forecast, 2020d; Micro Market Monitor, 2015; Mordor Intelligence, 2019a). El principal mercado es Estados Unidos, con una participación de más de la mitad del total de Norteamérica, donde el aumento de las prácticas agrícolas orgánicas y ecológicas impulsa la demanda de este tipo de productos (Mordor Intelligence, 2019a).

El mercado Europeo, para 2016, fue valorado en USD 220-270 millones, y se espera que crezca a una tasa compuesta anual del 12,81% hasta 2023/2024 (Market Data Forecast, 2020b; Mordor Intelligence, 2020c; Research Nester, 2019a), principalmente por la imposición de regulaciones estrictas sobre el uso de fertilizantes químicos y por el aumento de la agricultura ecológica en los principales países de la región. En 2017, los países con más cultivos orgánicos fueron España (16,6%), Italia (15,2%), Francia (13,9%) y Alemania (9,1%). El mercado español de biofertilizantes es uno de los más importantes en el mundo, con un valor estimado, para 2018, de USD 91,4 millones (Mordor Intelligence, 2020c).

El mercado de la región de Asia-Pacífico, para 2016, fue valorado en 200-250 millones, y se espera que crezca a una tasa compuesta anual del 13% hasta 2023/2024 (Market Data Forecast, 2020a; Mordor Intelligence, 2020a; Research Nester, 2019b), principalmente por el aumento de áreas orgánicas. Allí, China es el mercado más importante, con un 43% del mercado y una producción de medio millón de toneladas métricas por año. Después está el mercado de India, potenciado por acciones del Gobierno, como el Proyecto Nacional sobre el Desarrollo y el Uso de Esquemas de Biofertilizantes (NPDB), que busca capacitar trabajadores agrícolas en el uso de biofertilizantes. Otros mercados importantes en la región son Australia y Japón (Mordor Intelligence, 2020a; Reuters Plus, 2019).

El mercado de biofertilizantes en Latinoamérica, para 2016, fue valorado en USD 160-220 millones, y se espera que crezca a una tasa compuesta anual del 13,54% hasta 2023 (Market Data Forecast, 2020c; Mordor Intelligence, 2019b; Research Nester, 2019b). Allí, los principales mercados son Brasil y Argentina (Mordor Intelligence, 2019b), y los cultivos donde más se aplican son las leguminosas, tanto para Brasil y Argentina como para Uruguay y Paraguay (Grageda-Cabrera et al., 2012). Las empresas internacionales más importantes en la región son Novozymes, Rizobacter y Antibiotice.

Brasil tiene el mayor mercado de productos orgánicos en América del Sur, mercado que representó el 56,6% de los ingresos por biofertilizantes en esta región (Mordor Intelligence, 2019b), donde el uso de biofertilizantes se ha incrementado, anualmente, cerca de 60.000-70.000 toneladas. Las principales empresas locales productoras de biofertilizantes en Brasil son Embrafós, el Instituto de Fosfato Biológico (IFB), Biofosfatos do Brasil y Liderfós. Los cultivos en los que más se usan biofertilizantes en este país son frijol, maíz, arroz, caña de azúcar, soya, eucalipto, cítricos, tomate, algodón, cultivos forrajeros y zanahoria (Prochnow & Casarin, 2011).

Argentina es el segundo país más importante en el mercado de biofertilizantes en Latinoamérica, y el cultivo donde más se usan es la soya (Grageda-Cabrera et al., 2012). Uno de los factores clave que impulsan este mercado en el país es el aumento de la agricultura orgánica; de hecho, a nivel mundial, para 2016, Argentina estaba ubicada como el segundo país con mayor cantidad de hectáreas orgánicas, con 3.000 mil millones de hectáreas ("La Argentina", 2017).

Cuba, por su parte, es uno de los países que iniciaron el desarrollo de los bioinoculantes con productos biofertilizantes a base de microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo y hongos formadores de micorriza. Estos biofertilizantes se han aplicado principalmente en caña de azúcar, cultivos tropicales y hortalizas ("Las nuevas bio herramientas", 2017).

En México, el mercado de biofertilizantes se desarrolló en los años 70 y 80, cuando se emplearon productos para fijación biológica de nitrógeno en soya y garbanzo; así, el uso de *Rhizobium* se convirtió en una práctica generalizada (“Las nuevas bio herramientas”, 2017).

En Chile, el desarrollo de los biofertilizantes, en los años 80 y 90, estuvo marcado por la fijación biológica de nitrógeno, principalmente a través del uso de *Rhizobium* para leguminosas y cianobacterias para arroz (“Las nuevas bio herramientas”, 2017).

Colombia tuvo un fuerte desarrollo en el mercado de los biofertilizantes desde los años 90 en empresas privadas y centros de investigación, con biofertilizantes fijadores de nitrógeno —tanto simbióticos (*Rhizobium*) como de vida libre (*Azotobacter chroococcum*)—, bacterias solubilizadoras de fosfato y hongos formadores de micorriza (*Glomus* sp. y *Entrophospora colombiana*), así como con diferentes PGPR como bioestimulantes (“Las nuevas bio herramientas”, 2017). En el sector arrocero se tuvo un incremento especial (Arévalo, 2009) asociado a la producción de alta calidad; al trabajo de producción de Biocultivos, que cuenta actualmente con 10 registros de productos ante el ICA bajo la categoría de “inoculantes biológicos” (ICA, 2019), y a una *spin-off* creada entre la Universidad Nacional de Colombia, el sector privado y el gremio arrocero (Sanjuán Pinilla & Moreno Sarmiento, 2010). Sobre el valor actual del mercado de los bioplaguicidas en Colombia, no se tiene información específica; sin embargo, de acuerdo con información del ICA, en 2016 se vendieron aproximadamente 1.279 toneladas de productos (entre sólidos y líquidos). Tomando esta información junto con el precio de un biofertilizante en el mercado, que está entre COP 20.000 y 66.000, se estima que el mercado pudo haber tenido un valor de COP 26.000-88.000 millones para 2016 (aproximadamente entre USD 8 y 25 millones).¹

Para conocer el panorama del sector de los biofertilizantes en Colombia, se revisó el número de registros de empresas de bioinsumos y el número de registros de venta de productos ante el ICA. En el listado de bioinsumos del ICA se encontraron 44 empresas que producen inoculantes biológicos, para un total de 86 productos

registrados en esta categoría, de los cuales el 58,1% corresponde a formulaciones líquidas, y el 41,9%, a formulaciones sólidas. En cuanto a la actividad biológica de estos bioinsumos registrados, se encuentran las subcategorías de “solubilizador de fósforo”, “fijador biológico de nitrógeno”, “acondicionador y activador del suelo”, “estimulador de crecimiento”, “desarrollo de raíces” y “promotor de crecimiento vegetal”. Al revisar los principios activos, 23 productos son hechos a base de bacterias (principalmente *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp.), 8 a base de hongos de diferentes especies y 4 a base de micorrizas (tabla 9.1). Respecto a los cultivos de aplicación, los inoculantes biológicos están autorizados para 35 cultivos, entre los cuales están arroz, tomate, soya y flores. Entre las empresas que cuentan con el mayor número de registros, se encuentran Biocultivos S.A., AGROSAVIA, Fundases, Bioquirama S.A.S., Sobiotec, Biotech Orius S.A.S., Semilas del Valle S.A y Dibicol TDA (ICA, 2019).



¹ Valor del dólar a septiembre de 2019: COP 3.482,7.

■ **Tabla 9.1.** Principios activos de los biofertilizantes registrados en Colombia

Fuente: Elaboración propia con base en ica (2019)



Bacterias

| | |
|--|-----------------------------------|
| <i>Azotobacter vinelandii</i> | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> |
| <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> | <i>Lactobacillus acidophilus</i> |
| <i>Azospirillum brasilense</i> | <i>Lactobacillus brevis</i> |
| <i>Azotobacter chroococcum</i> | <i>Lactobacillus casei</i> |
| <i>Bacillus laterosporus</i> | <i>Pseudomonas aureofaciens</i> |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| <i>Bacillus megaterium</i> | <i>Pseudomonas montinelli</i> |
| <i>Bacillus mycoides</i> | <i>Rhizobium japonicum</i> |
| <i>Bacillus pumilus</i> | <i>Rhizobium leguminosarum</i> |
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Rhizobium phaseoli</i> |
| <i>Bacillus thuringiensis var. kurstaki</i> | <i>Rhodopseudomonas palustris</i> |
| <i>Bacillus thuringiensis var. tenebrionis</i> | |



Hongos y levaduras

| | |
|--------------------------------|---------------------------------|
| <i>Akanthomyces johnsonii</i> | <i>Penicillium janthinellum</i> |
| <i>Geotrichum penicillatum</i> | <i>Pochonia chlamydo sporia</i> |
| <i>Hirsutella thompsonii</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| <i>Penicillium bilaiae</i> | <i>Trichoderma harzianum</i> |



Micorrizas

| | |
|---------------------------|--------------------------|
| <i>Acaulospora spp.</i> | <i>Glomus spp.</i> |
| <i>Entrophospora spp.</i> | <i>Scutellospora sp.</i> |
| <i>Gigaspora spp.</i> | |

Empresas líderes en el mercado de los biofertilizantes

Veinte son las principales empresas del mercado de biofertilizantes a nivel mundial, de las cuales 12 están en la región Asia-Pacífico —principalmente en India—, 4 en Norteamérica, 3 en Europa y una en Latinoamérica (tabla 9.2) (Fortune Business Insights, 2020; Markets and Markets, 2020; Mordor Intelligence, 2020d).

- **Tabla 9.2.** Principales empresas del mercado de biofertilizantes en el mundo
Fuente: Elaboración propia con base en Fortune Business Insights (2020), Markets and Markets (2020) y Mordor Intelligence (2020d)



Argentina
Rizobacter Argentina



Australia
Mapleton Agri
Biotec Private



Canadá
Lallemand



China
CBF China Bio-Fertilizer
Kiwa Bio-Tech Products
Group Corporation



Dinamarca
Novozymes



España
Symborg



Estados Unidos
Agrinos
Monsanto
Nutramax Laboratories



India
AgriLife
Biomax Naturals
Camson Bio Technologies
Gujarat State Fertilizers &
Chemicals
International Panaacea Limited
Madras Fertilizers Limited
National Fertilizers Limited
Rashtriya Chemicals & Fertilizers
T Stanes and Company Limited



Rumania
Antibiotice

Al tomar como referencia diferentes estudios del mercado, se encontraron cinco empresas líderes con diferentes portafolios de productos, algunas de ellas muy especializadas en ciertos microorganismos; por ejemplo, Rizobacter cuenta con productos a base de *Bradyrhizobium* para fijación de nitrógeno; Lallemand, con productos a base de levaduras, y Symborg, con productos a base de micorrizas, mientras que otras compañías, como AgriLife y National Fertilizers Limited, cuentan con un portafolio más diverso, a base de diferentes microorganismos con aplicaciones para obtención de diferentes nutrientes (tabla 9.3).



■ **Tabla 9.3.** Empresas referentes del mercado de biofertilizantes y su portafolio

Fuente: Elaboración propia con base en las páginas web de las empresas: www.agrilife.in/biofertilizer.htm; www.lallemand.com; www.symborg.com; www.nationalfertilizers.com; <https://rizobacter.com.ar>

1 AgriLife

País: India

Productos: Agri Life Agri vam (micorrizas), Agri Life Nitrofix (cinco productos a base de bacterias como *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Rhizobium*), Fe-Sol B (*Acidithiobacillus* sp.), K-Sol B (*Frateuria*), Mn Sol B, P Sol B (tres productos a base de *Bacillus* sp.), S-Sol B (*Thiobacillus thiooxidans*), Si - Sol B (*Bacillus* sp.) y Zn-Sol B (*Thiobacillus thiooxidans*).

2 Lallemand

País: Canadá

Productos: Bioreveil: levadura, para mineralización de la materia orgánica y estimulación del crecimiento. Cilus: a base de bacterias como *Bacillus* sp. Natural Defences Enhancer: levadura, para mejora de las defensas naturales de las plantas. GlioMix: inoculantes de raíces. Greenstim/Bluestim: a base de una glicina-betaína natural, actúa como osmoprotector. Rhizocell GC y Rhizocell C: levaduras y rizobacterias para solubilización de fósforo. Folwin: bioestimulante que mejora el rendimiento y la resistencia al estrés. myc: endomicorrizas arbusculares.

3 Symborg

País: España

Productos: MycoUp y MycoUp Activ (micorrizas), VitaSoil (complejo microbiano rizosférico fitofortificante), Resid mg (micorrizas) y Trichosym Bio (*Trichoderma harzianum*, estimula el desarrollo vegetativo).

4 National Fertilizers Limited

País: India

Productos: *Rhizobium* (Symbiotic), *Acetobacter* (Non-Symbiotic) y P. S. B. Phosphate Solubilising Bacteria

5 Rizobacter Argentina

País: Argentina

Productos: Signum, *Rhizobium*, Rizoliq Dakar, Rizoliq Ili, Rizoliq top, Rizoliq Surco, Rizoliq, Rilotus, Ribol, Rialfa, Rizoliq top Garbanzo, Signum Arveja, Rizoliq top Poroto, Rizoliq top Poroto Mung, Signum Garbanzo, Rizoliq Surco Maní, Rilegum top y Premax R. Productos a base de *Bradyrhizobium* sp. con diferentes tipos de aplicación (semilla y suelo) para diferentes cultivos.

Dinámica del mercado de los biofertilizantes

El mercado de biofertilizantes tiene un potencial de crecimiento como alternativa a los productos de síntesis química.

A continuación se describen las fortalezas, los jalonadores y las tendencias del mercado que favorecen este aumento, así como las debilidades y barreras que aún deben superarse para que los biofertilizantes puedan representar un porcentaje más alto en el total del mercado mundial, pues actualmente solo representan un 5% (Timmusk et al., 2017).

Fortalezas y debilidades de los biofertilizantes

Existe una lista de factores que determinan el éxito o fracaso de un biofertilizante (Biofábrica Siglo XXI, 2011; Carvajal Muñoz & Mera Benavides, 2010; Farnen, 2019; García Cañedo, 2017; Gómez Avendaño, 2010; Teng, 2008). A continuación se presentan las principales fortalezas y debilidades de estos productos:



Fortalezas

- Pueden llegar a ser complementarios al uso de fertilizantes químicos, debido a que permiten un mayor aprovechamiento de los nutrientes.
- Son compatibles con otros microorganismos, lo que permite, incluso, realizar acciones complementarias; un ejemplo de esto es la aplicación de micorrizas en conjunto con las bacterias *Azospirillum* o *Rhizobium*, combinación que facilita la disponibilidad de nutrientes como el fósforo.
- Ayudan a la regeneración de los suelos, al mejorar su estructura, la vida microbiana y el crecimiento de raíces.
- En general, representan menores riesgos para el medio ambiente.
- Permiten un mejor desarrollo de la planta y pueden reducir los efectos de organismos nocivos en el suelo, como hongos y nematodos, además de que favorecen la resistencia de las plantas a factores ambientales.

Debilidades

- Teniendo en cuenta que los biofertilizantes están hechos a base de microorganismos vivos, se requieren formulaciones específicas que resistan las condiciones ambientales, por lo cual su investigación puede ser costosa.
- Algunas formulaciones tienen una vida útil menor a un año.
- Algunos biofertilizantes son específicos de un cultivo y muchas veces de una ubicación, por lo que su eficacia puede verse afectada por las condiciones ambientales y los factores edáficos del suelo.
- Factores como características inadecuadas del suelo, las altas temperaturas, la presencia de altos niveles de agroquímicos o bajos niveles de micronutrientes pueden afectar negativamente la eficacia de los biofertilizantes.
- Los cambios en los patrones de cultivo por parte de los agricultores pueden afectar su uso.
- No hay conciencia, entre los agricultores, sobre los beneficios de los biofertilizantes.
- Su acción es lenta y los resultados favorables son percibibles a más largo plazo en comparación con los fertilizantes químicos, por lo cual los agricultores pueden no estar convencidos de los beneficios de los biofertilizantes.
- Algunos procesos de producción pueden ser difíciles; ejemplo de esto son las micorrizas, que requieren del suelo y de la planta para su reproducción.





Tendencias en el mercado de alimentos que pueden favorecer el uso y la venta de los biofertilizantes

Existen diferentes tendencias mundiales asociadas a la agricultura y la alimentación que pueden permitir el desarrollo y la aplicación de nuevas tecnologías para la producción agropecuaria (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2017):

- Crecimiento demográfico: para 2050 la población mundial será de 9.700 millones de personas.
- Teniendo en cuenta el aumento de la población para 2050, también habrá un incremento previsto en la demanda de alimentos del 50 %, por lo que la producción agrícola necesita crecer de la mano de un mayor rendimiento.
- El aumento de la competencia por los recursos, entre los cuales están las áreas protegidas y el agua, tanto para producción agrícola como pecuaria, requiere que se den cambios que permitan una mayor productividad sin afectar o disminuyendo la afectación de los recursos naturales.
- El cambio climático afecta directamente la producción de alimentos y, por lo tanto, compromete la seguridad alimentaria y la nutrición.
- Las nuevas enfermedades y plagas, que además son transfronterizas, afectan la producción agrícola y pecuaria.
- La malnutrición se ha convertido en una emergencia de salud mundial, tanto en casos de desnutrición por carencia de nutrientes como en casos de sobrepeso y obesidad, lo que obliga a un cambio en la dieta de la población con alimentos más saludables.
- El cambio en la producción de alimentos y los canales de distribución impacta los diferentes eslabones de la cadena de valor.
- Nuevas tecnologías son necesarias para evitar la pérdida y el desperdicio de alimentos en los diferentes procesos de producción, cosecha, distribución y consumo.

Jalonadores del mercado

Entre los principales jalonadores del mercado de biofertilizantes se identifican los siguientes:

- **Políticas de gobierno favorables:** algunas políticas de gobierno favorecen el uso de biofertilizantes; por ejemplo, la Política Agrícola Común de la Unión Europea promueve el uso de este tipo de productos y proporciona hasta el 30% del presupuesto a los agricultores que cumplan con prácticas agrícolas sostenibles. Asimismo, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos tiene un plan para promover la agricultura orgánica en el que el uso de este tipo de productos es beneficiado (Fortune Business Insights, 2020). Igualmente, en India, el Gobierno tiene diferentes esquemas para promover el uso de los biofertilizantes en el país, como el Proyecto Nacional sobre el Desarrollo y el Uso de Esquemas de Biofertilizantes (NPDB) (Ghosh, s.f.).
- **Precio de los fertilizantes y su beneficio:** uno de los insumos más costosos para la producción agrícola son los fertilizantes, pues actualmente pueden representar entre el 30 y el 35% de los costos totales, a la vez que son uno de los insumos menos aprovechados, ya que tan solo el 40% de estos puede ser aprovechado para el cultivo, lo que contrasta con el mayor aprovechamiento que se puede obtener de un producto biológico (Biofábrica Siglo XXI, 2011).
- **Incremento en el área orgánica:** la empresa de investigación de mercado Ecovia Intelligence estima que el mercado mundial de alimentos orgánicos alcanzó los USD 97.000 millones en 2017. Estados Unidos es el principal mercado, seguido de Alemania, Francia y China. En 2017 se reportaron 2,9 millones de productores orgánicos y un total de 69,8 millones de hectáreas gestionadas orgánicamente, lo que representa un crecimiento del 20% anual en los últimos 18 años. Muchas políticas de gobierno están dirigidas a la promoción de este tipo de producción, que requiere el uso de productos más limpios (Willer & Lernoud, 2019).

Barreras del mercado

Las principales barreras del mercado que pueden afectar la adopción de los biofertilizantes se listan a continuación:

- **Costo de los productos de base biológica:** algunas de las materias primas necesarias para los fertilizantes sintéticos están directamente disponibles en la naturaleza y requieren menos innovación, mientras que los biofertilizantes necesitan innovación avanzada que puede requerir una gran inversión, lo que afecta el precio final al usuario (Mordor Intelligence, 2019b).
- **Efecto de los factores abióticos sobre la eficacia de los biofertilizantes:** muchos factores, como el tipo de suelo, las prácticas de manejo y el clima, afectan la eficacia de los biofertilizantes (Bio-FIT Project, 2019a).
- **Rendimiento de las pruebas de campo:** todavía es difícil replicar el efecto de los inoculantes obtenido en laboratorio en campo (Bio-FIT Project, 2019a; Stamenković et al., 2018).
- **Control de calidad:** el control de calidad de los biofertilizantes debe garantizar el efecto de los microorganismos en campo, y a veces no se cumplen todos los parámetros exigidos para su registro, como, por ejemplo, el número de células viables o el porcentaje de pureza, lo que conduce a una falta de confianza en este tipo de productos (Bio-FIT Project, 2019a; Stamenković et al., 2018).



Estrategias de negocio en la industria de los biofertilizantes

Existen diferentes estrategias de crecimiento empresarial en los negocios, como penetración del mercado, expansión o desarrollo del mercado, expansión del producto, diversificación y adquisición de otras empresas (Suttle, 2019). A continuación se explican brevemente y se dan ejemplos en el mercado de biofertilizantes.

- Penetración del mercado: esta estrategia se usa cuando una compañía decide comercializar productos existentes dentro del mismo mercado que ha estado utilizando (Suttle, 2019).
 - ◇ En 2014, Labiofam inició la construcción de una planta de producción y desarrollo de bioplaguicidas y biofertilizantes en Santa Clara, Cuba, con una capacidad de producción anual de 6 millones de litros de bioproductos líquidos y de 1.000 toneladas de bioproductos sólidos de origen biológico (Pérez Cabrera, 2014).
 - ◇ En 2015, National Fertilizers Limited, Engineers India Limited (EIL) y Fertilizer Corporation of India Limited firmaron un acuerdo de *joint venture* para formar la empresa Ramagundam Fertilizers and Chemicals Limited para la producción de fertilizantes.
 - ◇ En 2016, Rizobacter invirtió USD 33 millones en la construcción de Synertech Industrias, una planta con capacidad para producir 50.000 toneladas del fertilizante microgranulado Microstar, desde la cual puede abastecer, desde Argentina, a todo el Cono Sur (Rizobacter, 2019).
- Expansión o desarrollo del mercado: esta estrategia implica la venta de productos actuales en un nuevo mercado (Suttle, 2019).
 - ◇ En 2018, Rizobacter abrió una oficina en Francia para poder llegar mejor con sus tecnologías al mercado europeo (Rizobacter, s.f.).
 - ◇ En 2019, Novozymes (Dinamarca) anunció planes para continuar su asociación de investigación y distribución con Bayer (Alemania), asociación con la que Novozymes podría formar una asociación múltiple con UPL (India) y Univar Solutions (EE.UU.) para distribuir sus productos biológicos (Markets and Markets, 2020).
 - ◇ En 2019, Symborg realizó la apertura de una nueva filial en Francia con el objetivo de prestar el máximo apoyo a su distribuidor en este país y para consolidar su estrategia de expansión internacional afianzando nuevos mercados (Symborg, 2019).
- Expansión del producto: esta estrategia contempla expandir una línea de productos o agregar nuevas características (Suttle, 2019).
 - ◇ En 2018, Rizobacter Argentina registró en ese país un inoculante para garbanzo, y se espera que lo lleve a Europa e India, donde Rizobacter tiene presencia (Rizobacter, 2018).
- Crecimiento a través de la diversificación: esta estrategia incluye la venta de nuevos productos a nuevos mercados (Suttle, 2019).
 - ◇ En 2014, Lallemand (Canadá) adquirió el portafolio de la línea de productos biológicos de BrettYoung y a partir de 2017 asumió todos los aspectos de venta, comercialización, distribución y servicio posventa en todo el mundo (BrettYoung, 2017).
- Adquisición de otras empresas: en esta estrategia, una compañía compra a otra para expandir sus operaciones (Suttle, 2019).
 - ◇ En 2013, Novozymes adquirió la compañía TJ Technologies Inc. (América del Norte), la cual era pionera en soluciones biológicas para mejorar el crecimiento de las plantas, aumentar la

tolerancia al estrés y mejorar los rendimientos. Esta adquisición marcó otro paso importante en la construcción del negocio de Novozymes para brindar soluciones sostenibles en bioagricultura (Novozymes, 2013).

- ◇ En 2014, Camson Bio Technologies compró la compañía Deccan & Srushti Agro Exports, con sede en Maharashtra, India, lo que le permitió tener la cadena completa de productos agrícolas en ese país (“Camson Biotech acquires Deccan & Srushti Agro”, 2014).
- ◇ En 2016, Lallemand adquirió Lage y Cia (Uruguay), una importante empresa de inoculantes de semillas de América del Sur. Esta adquisición ayudaría a Lallemand en el desarrollo de productos de levadura, hongos y bacterias como agentes bioestimulantes, biocontroladores y biofertilizantes de la industria agrícola (Markets and Markets, 2020).



Ejemplo de experiencia en el mercado de los biofertilizantes en Latinoamérica: Rizobacter Argentina

Rizobacter es una compañía líder en microbiología agrícola, con más de 30 años en el mercado, 9 subsidiarias, presencia en 30 países y ventas de 250 millones de dosis de inoculantes en 2018. Uno de sus productos principales es el fertilizante microgranulado Microstar, para el cual se tiene una capacidad de producción de 50.000 toneladas y que surgió de una alianza entre Rizobacter y De Sangosse. Cuenta con una presencia significativa en las categorías de productos como adyuvantes, tratamientos de semillas y cebos para el control de plagas (moluscos e isópodos), con una participación en el mercado local del 26, 23 y 50%, respectivamente.

La compañía cuenta con diferentes alianzas con empresas de todo el mundo. Desde 1998 tiene una alianza con Syngenta que ha permitido consolidar un portafolio enriquecido para las dos compañías en distintos países. Además, en 2009 inició una relación con la empresa francesa De Sangosse, con el objetivo de crear productos tangibles, patentes y

licencias o para el desarrollo de soluciones naturales para la protección y la nutrición de los cultivos agrícolas. Igualmente, en 2016 construyó en Argentina una planta de fertilizantes microgranulados, Synertech Industrias, que, por su capacidad de producción de 50.000 toneladas y su infraestructura, es una de las más modernas de América Latina. También en 2009 inició una relación con la empresa estadounidense Momentive para comercializar en Argentina algunos de sus productos, entre los cuales se encuentra la marca Silwet L Ag, que distribuye exclusivamente también en Paraguay, Uruguay, Bolivia y Brasil. En 2012 desarrolló, en forma conjunta con la misma empresa, el adyuvante agrícola Rizospray Extremo de última generación, con desempeño antievaporante, tensoactivo y penetrante. En 2016, Bioceres, una empresa Argentina proveedora de soluciones para la agricultura (semillas, germoplasma, tratamientos de semillas, entre otras), terminó de adquirir el 80% de las acciones de Rizobacter (Rizobacter, s.f.).

Perspectivas de la industria de los biofertilizantes

El mercado de los biofertilizantes está estrechamente ligado al mercado de los fertilizantes químicos, por lo que se evidencia una oportunidad en el mercado de biológicos. De acuerdo con la International Fertilizer Industry Association, se espera que la demanda mundial de fertilizantes crezca un 1,3% anual en el periodo 2015-2023, llegando a 199 millones de toneladas de nutrientes entre 2022 y 2023. En cuanto a nutrientes, se espera que la demanda de fertilizantes nitrogenados crezca un 1%; la de productos de fósforo, un 1,4%, y la de productos de potasio, un 1,8%. Las regiones donde se espera un mayor aumento en la demanda de fertilizantes en los próximos años son, por orden de importancia, África, Europa y Asia (Asociación Nacional de Fabricantes de Fertilizantes [Anffe], 2018). En cuanto al mercado de los biofertilizantes, se espera que este tenga un mayor crecimiento, de entre el 10 y el 13%, en el mismo periodo de tiempo (Fortune Business Insights, 2020; Markets and Markets, 2020; Mordor Intelligence, 2020d; Ravensberg, 2017).

Un hecho importante para potenciar el desarrollo del mercado sería un aumento en la investigación sobre inoculantes con propiedades multifuncionales y biofertilizantes, que contienen más de un microorganismo, los cuales tienen efectos en la mejora del crecimiento y el rendimiento de las plantas en cultivo, así como en la mejora y el mantenimiento de la fertilidad del suelo (Bio-FIT Project, 2019a).

Otro objetivo esencial para tener en cuenta para garantizar la comercialización de estos productos es lograr la calidad y la estabilidad deseadas. Se requiere hacer investigación en la fisiología de los microorganismos y de las plantas, pero también en otros desafíos tecnológicos, como el proceso de fermentación, los tipos de formulaciones, la población

de microorganismos y su sistema de liberación. Respecto a las formulaciones, estas deben permitir que el producto resista al ambiente y pueda ser biodegradable, económico y fácilmente disponible, además de que deben aumentar la estabilidad del producto y alargar su vida útil y su efectividad en campo (Stamenković et al., 2018).

Otro factor importante que dificulta la adopción de los biofertilizantes es que no hay consistencia en los resultados en campo, y una causa importante de esto es el hábitat de crecimiento diverso y la estructura comunitaria de las raíces de las plantas; por lo tanto, se requieren enfoques innovadores que seleccionen las mejores tecnologías genómicas y moleculares, que permitan una mejor comprensión del sistema biológico. Asimismo, se pueden generar mapas de riesgo en términos de probabilidad de colonización, destino y eficiencia de los aislamientos que se quiera introducir, mapas que permitan adelantarse en aquellos factores de estrés que afecten el funcionamiento del microorganismo (Timmusk et al., 2017).

También se requiere un mayor conocimiento de este tipo de productos por parte de los agricultores, por lo cual es indispensable desarrollar programas de extensión para educar a los agricultores y trabajadores sobre el beneficio a largo plazo del uso de biofertilizantes. En Taiwán, por ejemplo, el Consejo de Agricultura desarrolla seminarios y talleres sobre la aplicación de biofertilizantes en los cuales se incluye el seguimiento de los cultivos inoculados con hongos micorrízicos arbusculares, rizobios o bacterias solubilizadoras de fosfato, los cuales permiten ver resultados exitosos con el uso de este tipo de bioinsumos; estas actividades han permitido aumentar las hectáreas que utilizan biofertilizantes en 12.000 hectáreas anuales y reducir un 30-50% el uso de fertilizantes químicos (ChunLi et al., 2010).



Conclusiones

El mercado de biofertilizantes ha tenido una tasa de crecimiento constante de entre el 10 y el 13% en los últimos diez años, y aunque actualmente es un mercado pequeño, representa una alternativa importante frente al uso de fertilizantes químicos.

Un factor muy importante que impulsa el crecimiento del mercado de biofertilizantes es el aumento de la demanda de productos orgánicos, que está asociado al mayor número de consumidores conscientes. Adicionalmente, la necesidad de mejorar las prácticas agrícolas para optimizar la fertilidad del suelo induce aún más la demanda de este tipo de bioinsumos, pues permiten mantener el equilibrio ecológico. Los cultivos de frutas y verduras orgánicas tienen una tendencia de crecimiento más rápida, debido a las nuevas preferencias de los consumidores por el cambio en su estilo de vida y al aumento del ingreso per cápita, por lo cual se espera que el uso de los biofertilizantes en estos cultivos tenga un mayor crecimiento.

La disponibilidad de los nutrientes en el suelo seguirá siendo un reto en el desarrollo de los biofertilizantes para mejorar la actividad biológica de los microorganismos, principalmente en actividades como la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo y la movilización de potasio.

El tipo de microorganismo usado como biofertilizante está asociado a su función: géneros como *Rhizobium* sp., *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp. y las cianobacterias fijan nitrógeno; géneros como *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. solubilizan fósforo, y las micorrizas se usan principalmente para movilizar potasio.

Respecto a las formulaciones, prevalecen las líquidas, con una vida útil mayor, con mejor tolerancia a condiciones adversas y con protocolos de control de calidad más fáciles y rápidos en comparación con otros tipos de formulaciones.

Referencias

- Alternativas biológicas a los fertilizantes nitrogenados. (s.f.). <http://www.ugr.es/~cjl/fertilizantes%20nitrogenados.pdf>
- Arévalo, E. (2009). Más arroz a menos costo con la aplicación de biofertilizantes y materia orgánica. *Revista Arroz*, 57(476), 26-28.
- Asociación Nacional de Fabricantes de Fertilizantes (Anffe). (2018, 20 de julio). Perspectivas de IFA sobre la demanda mundial de fertilizantes 2018-2022. <http://www.anffe.com/destacados/Todos/2018-07-20%20Perspectivas%20de%20IFA%20sobre%20la%20demanda%20mundial%20de%20fertilizantes%202018-2022/index.html>
- Biofábrica Siglo XXI. (2011, 1.º de junio). Biofábrica Siglo XXI presente en el XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. <https://www.biofabrica.com.mx/blog/en-el-mundo/biofabrica-siglo-xxi-presente-en-el-xiv-congreso-nacional-de-biotecnologia-y-bioingenieria/>
- Bio-FIT Project. (2019a). Production managers in agriculture and forestry. LO10: Biofertilizers technology – awareness, marketing and future perspectives for sustainable development - 3. Future perspective of biofertilizers. <https://www.bio-fit.eu/q9/lo10-bio-fertilizers-technology-%E2%80%93-awareness,-marketing-and-future?start=3>
- Bio-FIT Project. (2019b). VET specialists in environmental protection. LO12: Bio-fertilizers Market Size - 3. Biofertilizers market. <https://www.bio-fit.eu/q5/lo12-bio-fertilizers-market-size?start=2>
- Brett Young. (2017, 19 de junio). Lallemand Plant Care and Brett Young conclude their collaboration. <https://www.brettyoung.ca/news/lallemand-plant-care-and-brettyoung-conclude-their-collaboration>
- Camson Biotech acquires Deccan & Srushti Agro. (2014, 6 de junio). *The Economic Times*. <https://economictimes.indiatimes.com/industry/cons-products/food/camson-biotech-acquires-deccan-srushti-agro/articleshow/36160395.cms?from=mdr>
- Carvajal Muñoz, J. S., & Mera Benavides, A. C. (2010). Biological fertilization: State of the art techniques for a sustainable agricultural development. *Producción + Limpia*, 5(2), 77-96. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1909-04552010000200007
- Chakdar, H., Jadhav, S. D., Dhar, D. W., & Pabbi, S. (2012). Potential applications of blue green algae. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 71(1), 13-20. https://www.researchgate.net/publication/216611050_Potential_applications_of_blue_green_algae
- ChunLi, W., Shiuanyuh, C., & ChiuChung, Y. (2010). Present situation and future perspectives of biofertilizer for environmentally-friendly agriculture. *Extension Bulletin - Food & Fertilizer Technology Center*, (634). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123097358>
- European Biomass Industry Association. (2019). Biofertilizers. <https://www.eubia.org/cms/wiki-biomass/biofertilizers/>
- Farnen, K. (2019). Advantages and disadvantages of biofertilizers. *Hunker*. <https://www.hunker.com/13404698/advantages-and-disadvantages-of-biofertilizers>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2017). *El futuro de la alimentación y la agricultura: tendencias y desafíos*. <http://www.fao.org/3/i6881s/i6881s.pdf>
- Fortune Business Insights. (2020). *Biofertilizers market size, share & COVID-19 impact analysis, by type (nitrogen fixing, phosphate solubilizers, and others), microorganism (Rhizobium, Azotobacter, Azospirillum, Pseudomonas, Bacillus, VAM, and others), application (seed treatment, soil treatment, and others), crop type, and regional forecast, 2020 - 2017*. <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/biofertilizers-market-100413>
- García Cañedo, J. C. (2017, 27 de junio). Biofertilizantes, ventajas y desventajas. *Blasting News*. <https://mx.blastingnews.com/tecnologia/2017/06/biofertilizantes-ventajas-y-desventajas-001806021.html>
- Ghosh, N. (s.f.). Promoting bio-fertilizers in Indian agriculture. https://www.researchgate.net/profile/Prem_Baboo/post/Please_suggest_me_a_good_bio-fertilizer_for_detailed_study/attachment/59d62d9079197b807798bd59/AS%3A350788372189184%401460645873588/download/12+South+Asia.Ghosh.Promoting+Bio-fertilizers+in+India+Agri.pdf
- Gómez Avendaño, N. (2010, 6 de octubre). Biofertilizantes vs fertilización comercial en la agricultura. *El Economista*. <https://www.eleconomista.com.mx/opinion/Biofertilizantes-vs-fertilizacion-comercial-en-la-agricultura-20101006-0005.html>
- Grageda-Cabrera, O. A., Díaz-Franco, A., Peña-Cabrales, J. J., & Vera-Núñez, J. A. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6), 1.261-1.274. <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/agricolas/article/view/1376>
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2019). *Productos registrados bioinsumos*. <https://www.ica.gov.co/getdoc/2ad9e987-8f69-4358-b8a9-e6ee6dcc8132/productos-bioinsumos-mayo-13-de-2008.aspx>, consultado en octubre de 2019.
- Kalayu, G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 2019, artículo 4917256. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>
- La Argentina, segunda en el mundo en producción orgánica certificada. (2017, 28 de octubre). *Télam*. <https://www.telam.com.ar/notas/201710/217092-argentina-produccion-organica-ranking.html>
- Las nuevas bio herramientas. (2017, 24 de febrero). *Mundoagro*. <https://www.mundoagro.cl/las-nuevas-bio-herramientas>
- Market Data Forecast. (2020a). *Asia-Pacific biofertilizers market by type (nitrogen fixing, phosphate solubilizing and potash mobilizing), by crop type (cereals & grains, pulses & oilseeds and fruits & vegetables), by microorganism (Azotobacter, Azospirillum, Rhizobium, phosphate solubilizing bacteria and Cyanobacteria), by mode of application (seed treatment and*

- soil treatment), by form (pure & mixed liquid fermentations, dispersible granules and pellets) and by region - Industry analysis, size, share, growth, trends, and forecasts (2020-2025). <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/asia-pacific-biofertilizers-market>
- Market Data Forecast. (2020b). *Europe biofertilizers market by type (nitrogen fixing, phosphate solubilizing and potash mobilizing) by crop type (cereals & grains, pulses & oilseeds and fruits & vegetables), by microorganism (Azotobacter, Azospirillum, Rhizobium, phosphate solubilizing bacteria and Cyanobacteria), by mode of application (seed treatment and soil treatment), by form (pure & mixed liquid fermentations, dispersible granules and pellets) and by region - Industry analysis, size, share, growth, trends, and forecasts (2020-2025)*. <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/europe-biofertilizers-market>
- Market Data Forecast. (2020c). *Latin America biofertilizers market by type (nitrogen fixing, phosphate solubilizing and potash mobilizing) by crop type (cereals & grains, pulses & oilseeds and fruits & vegetables), by microorganism (Azotobacter, Azospirillum, Rhizobium, phosphate solubilizing bacteria and Cyanobacteria), by mode of application (seed treatment and soil treatment), by form (pure & mixed liquid fermentations, dispersible granules and pellets) and by region - Industry analysis, size, share, growth, trends, and forecasts (2020-2025)*. <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/latin-america-biofertilizers-market>
- Market Data Forecast. (2020d). *North America biofertilizers market by type (nitrogen fixing, phosphate solubilizing and potash mobilizing) by crop type (cereals & grains, pulses & oilseeds and fruits & vegetables), by microorganism (Azotobacter, Azospirillum, Rhizobium, phosphate solubilizing bacteria and Cyanobacteria), by mode of application (seed treatment and soil treatment), by form (pure & mixed liquid fermentations, dispersible granules and pellets) and by region - Industry analysis, size, share, growth, trends, and forecasts (2020-2025)*. <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/north-america-biofertilizers-market>
- Markets and Markets. (2020). *Biofertilizers market by form (liquid, carrier-based), mode of application (soil treatment, seed treatment), crop type, type (nitrogen-fixing, phosphate solubilizing & mobilizing, potash solubilizing & mobilizing), region - Global forecast to 2025*. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/compound-biofertilizers-customized-fertilizers-market-856.html>
- Micro Market Monitor. (2015). *North America biofertilizer market by application (cereals & grains, fruits & vegetables, pulses & oilseeds), by type (nitrogen fixing biofertilizers, phosphate solubilizing biofertilizers, potash mobilizing biofertilizers), by source, by geography - Analysis and forecast to 2019*. <http://www.micromarketmonitor.com/pressreleases/north-america-bio-fertilizer.html>
- Mohammadi, K., & Sohrabi, Y. (2012). Bacterial biofertilizers for sustainable crop production: A review. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 7(5), 307-316.
- Mordor Intelligence. (2019a). *North America biofertilizers market - Growth, trends, COVID-19 impact, and forecasts (2021-2026)*. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/north-america-biofertilizers-market>
- Mordor Intelligence. (2019b). *South America biofertilizers market - Growth, trends, COVID-19 impact, and forecasts (2021-2026)*. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/south-america-biofertilizers-market>
- Mordor Intelligence. (2020a). *Asia-Pacific biofertilizers market - Growth, trends, COVID-19 impact, and forecasts (2021-2026)*. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/asia-pacific-biofertilizers-market>
- Mordor Intelligence. (2020b). *Azotobacter based biofertilizer market - Growth, trends, COVID-19 impact, and forecasts (2021-2026)*. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/azotobacter-based-biofertilizer-market>
- Mordor Intelligence. (2020c). *Europe biofertilizers market - Growth, trends, COVID-19 impact, and forecasts (2021-2026)*. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/europe-biofertilizers-market>
- Mordor Intelligence. (2020d). *Global biofertilizers market - Growth, trends, COVID-19 impact, and forecasts (2021-2026)*. https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biofertilizers-market-industry?gclid=EAlaIqobChMIkYSC1dyH4glVEonlCh2-rPwEAAyAiAAEgJmnpD_BwE
- Mordor Intelligence. (2020e). *Rhizobium-based biofertilizer market - Growth, trends, COVID-19 impact, and forecasts (2021-2026)*. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/rhizobium-based-biofertilizer-market>
- Novozymes. (2013, 25 de junio). Novozymes acquires TJ Technologies Inc., further strengthens position in bioagriculture. <https://www.novozymes.com/es/news/news-archive/2013/06/novozymes-acquires-tj-technologies-inc-further-strengthens-position-in-bioagriculture>
- Pérez Cabrera, Á. F. (2014). Construyen en Santa Clara moderna fábrica productora de bioplaguicidas y biofertilizantes. *Granma*. <http://www.granma.cu/cuba/2014-08-13/construyen-en-santa-clara-moderna-fabrica-productora-de-bioplaguicidas-y-biofertilizantes>
- Prochnow, L. I., & Casarin, V. (2011). Biofertilizers in Brazil. [http://www.ipni.net/ipniweb/porta1.nsf/0/94cfd5a0ed0843028525781c0065437e/\\$FILE/05%20Brazil.Prochnow%20and%20Casarin.Biofertilizers%20in%20Brazil.pdf](http://www.ipni.net/ipniweb/porta1.nsf/0/94cfd5a0ed0843028525781c0065437e/$FILE/05%20Brazil.Prochnow%20and%20Casarin.Biofertilizers%20in%20Brazil.pdf)
- Ramírez Rojas, J. L., Trejo Aguilar, D., & Lara Capistran, L. (2010). La mercadotecnia en la producción de biofertilizante de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana. *Ciencia Administrativa*, 2, 48-56. <https://www.uv.mx/iiesca/files/2012/12/biofertilizante2010-2.pdf>
- Ravensberg, W. (2017, 4-7 de diciembre). *The future of microbial products and regulatory issues* [presentación en conferencia]. International Symposium Microbe-Assisted Crop Production – Opportunities, Challenges & Needs (miCROPe 2017), Viena, Austria.
- Research and Markets. (2018, 26 de septiembre). United States biofertilizer market 2018-2023 - Increasing government support to promote organic farming driving market growth - ResearchAndMarkets.com. *Business Wire*. <https://www.businesswire.com/news/home/20180926005421/en/United-States-Biofertilizer-Market-2018-2023---Increasing>

- Research Nester. (2019a). *BioFertilizers market by product type (nitrogen-fixing, phosphate-solubilizing, potash-mobilizing & others); by microorganisms (Azospirillum, Cyanobacteria, phosphate-solubilizing bacteria, Azobacter & others); by crop (cereals & grains, pulses & oil seeds, fruits & vegetables & others); by form (pure & mixed liquid fermentations, dispersible granule and pellet); by application (seed treatment, soil treatment and root dipping) – Industry demand analysis & opportunity assessment 2016-2024*. <https://www.researchnester.com/reports/biofertilizers-market/1197>
- Research Nester. (2019b). *Biofertilizers market : Global demand analysis & opportunity outlook 2024*. <https://www.researchnester.com/reports/bio-fertilizers-market-global-demand-analysis-opportunity-outlook-2024/193>
- Reuters Plus. (2019). *Global biofertilizers market to expand in the coming years, active government participation to favor growth*. <https://www.reuters.com/brandfeatures/venture-capital/article?id=143013>, consultado en 2019
- Rizobacter. (s.f.). Hitos. Un camino innovador. <https://rizobacter.com/es/hitos>
- Rizobacter. (2018, 17 de julio). Rizobacter logró el registro del primer inoculante larga vida para el garbanzo. <https://rizobacter.com/es/noticia/mar-17072018-0920>
- Rizobacter. (2019, 14 de junio). Con foco en la expansión a nivel global, Rizobacter logra la aprobación de una segunda Aduana en Planta. <https://rizobacter.com/es/noticia/vie-14062019-1616>
- Sanjuán Pinilla, J., & Moreno Sarmiento, N. (2010). Aplicación de insumos biológicos: una oportunidad para la agricultura sostenible y amigable con el medioambiente. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 4-7. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752010000100001
- Stamenković, S., Bešković, V., Karabegović, I., Lazić, M., & Nikolić, N. (2018). Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(1). <https://doi.org/10.5424/sjar/2018161-12117>
- Suttle, R. (2019, 12 de febrero). Growth strategies in business. *Chron*. <https://smallbusiness.chron.com/growth-strategies-business-4510.html>
- Symborg. (2019, 3 de mayo). Symborg abre nueva filial en Francia. <https://www.symborg.com/symborg-abre-nueva-filial-en-francia/>
- Tapia, A. (2013, 13 de noviembre). Micorrizas, las aliadas de la producción agrícola. *El Mercurio*. <https://www.elmercurio.com/campo/noticias/noticias/2013/11/13/micorrizas-las-aliadas-de-la-produccion-agricola.aspx>
- Teng, P. S. (2008). *Bioscience entrepreneurship in Asia: Creating value with biology*. World Scientific.
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., & Aronsson, A.-C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8, artículo 49. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049>
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255, 571-586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Willer, H., & Lernoud, J. (eds.). (2019). *The world of organic agriculture. Statistics & emerging trends 2019*. Ifoam. https://ciaorganico.net/documypublic/486_2020-organic-world-2019.pdf





10

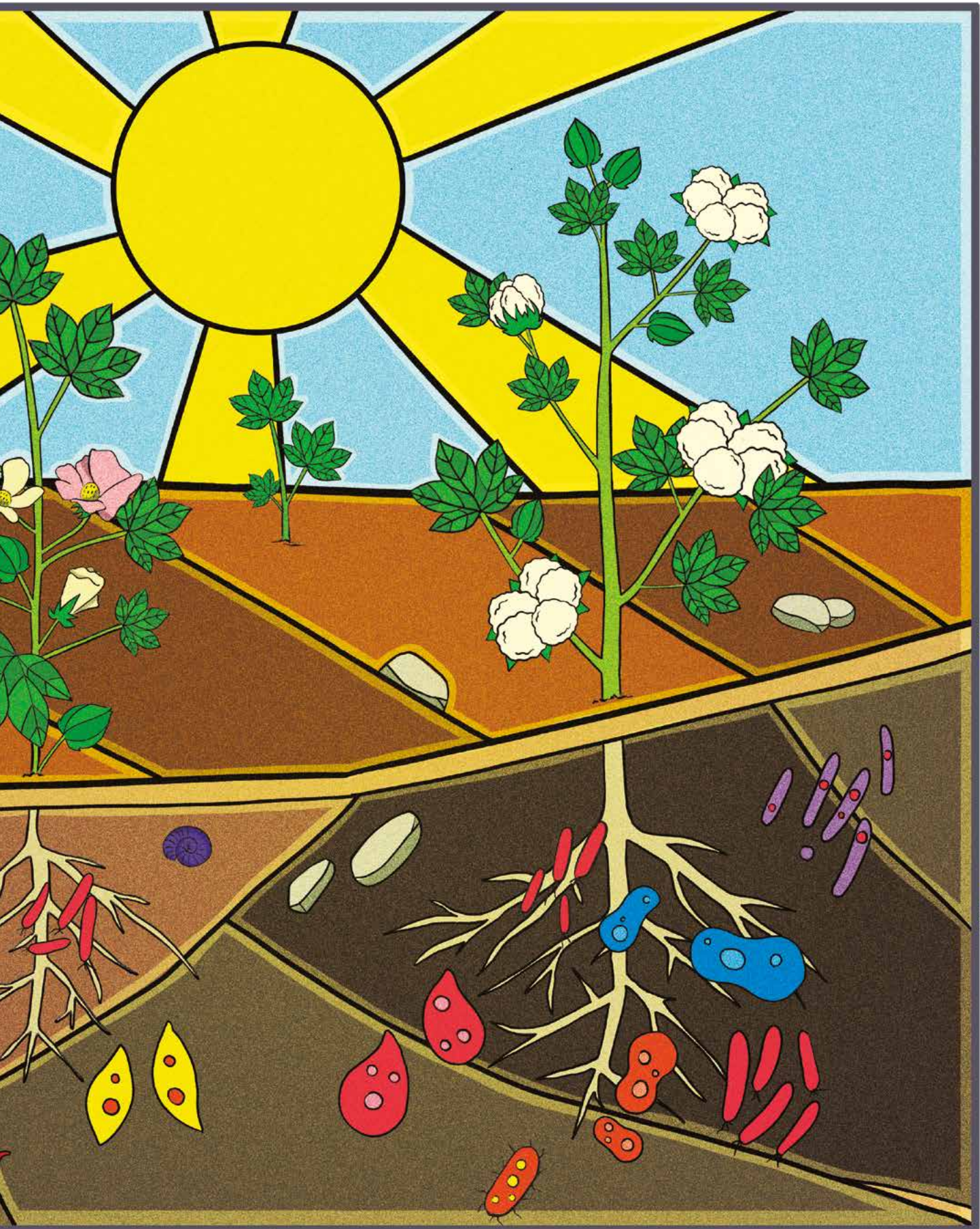
Experiencia AGROSAVIA en Algodón (*Gossypium hirsutum*)

Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el cultivo bajo condiciones de invernadero

Felipe Andrés Romero Perdomo¹
Ever Mauricio Barón Guaquetá¹
Ruth Rebeca Bonilla Buitrago¹

1. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.







Introducción

El algodón es el producto agrícola no alimentario más importante del mundo. Es producido en un gran número de países —alrededor de 100—, pero los principales productores en el periodo 2019-2020 fueron India (23,1 % del mercado), China (22,1%), Estados Unidos (17,5%), Brasil (9,5%) y Paquistán (6,4%). Se cultiva principalmente por su fibra, que se utiliza universalmente como materia prima de productos textiles, la cual genera divisas del orden de USD 20-30 billones por su comercialización (Gallegos-Cedillo, 2019). Adicionalmente, sus semillas contienen un 24 % de proteína y un 15 % de aceite, que se emplea para fabricar margarinas, aceites comestibles, jabones, pinturas, entre otros productos, y su cáscara se emplea como fertilizante. Por otro lado, la pelusa que resta en las semillas después del desmote, las motas (semillas no desarrolladas) y los residuos fibrosos se emplean en la producción de fieltros, colchones

y tapicerías, o como materia prima en las industrias papeleras o para materiales explosivos (Westcott, 2010).

En América Latina y el Caribe, un 80 % de la producción de algodón la realizan agricultores familiares. Este cultivo se ha transformado en el sustento de millones de agricultores y sus familias, al generarles empleo e ingresos, además de que contribuye en gran medida a la seguridad alimentaria, especialmente en países en desarrollo. Respecto a Colombia, el cultivo del algodón siempre se ha destacado en los departamentos de Córdoba, Cesar y Tolima, y ha ocupado el segundo lugar en exportación después del café. En la última década, se han presentado disminuciones en las áreas cosechadas y en los rendimientos, con una producción total de fibra de algodón mayor a 23.000 toneladas a nivel nacional (Campuzano-Duque & Buenaventura-Baron, 2020).

Desarrollo de la investigación

En el Centro de Investigación (ci) Motilonia, que pertenecía al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), se centró la investigación en el algodón, cuando Agustín Codazzi (Cesar) era la ciudad blanca de Colombia. Alrededor de este cultivo estaban especialistas a nivel de doctorado y maestría, en todas las áreas del conocimiento. Fue hacia 2002 cuando la Confederación Colombiana del Algodón (Conalgodón) manifestó que uno de los problemas sentidos por los productores algodoneiros era el costo del rubro de fertilización, el cual hacía insostenible el cultivo, por lo que los investigadores iniciaron estudios junto con el doctor René Novo, investigador cubano experto en microbiología de suelos, específicamente en bacterias fijadoras de nitrógeno, a partir de aislamientos de bacterias promotoras del crecimiento vegetal que pudieran complementar parcialmente la fuente de nitrógeno de las plantas sin afectar su rendimiento.

Microorganismos y condiciones de medio de cultivo

Un total de 25 bacterias fijadoras de nitrógeno fueron aisladas de la rizósfera de suelos algodoneiros del departamento del Cesar, Colombia. Con base en los resultados obtenidos de experimentos realizados en invernadero en varias de estas especies vegetales, se seleccionaron las cepas *Rhizobium* sp. AC1 y *Agrobacterium pusense* AC10 para ser estudiadas como candidatas a ser el principio activo de un posible biofertilizante. Se iniciaron estudios en el medio de cultivo Ashby, pero su costo y su producción convencional no eran factibles para un futuro escalamiento, por lo que se hizo necesario buscar alternativas para estandarizar un medio de cultivo y un proceso de fermentación específicos. Luego de varios estudios, se seleccionaron las condiciones que optimizaban el crecimiento de las cepas a nivel nutricional, con el medio de cultivo (Moreno et al., 2011), así como las condiciones fisicoquímicas para la producción en un biorreactor (Camelo-Rusique et al., 2017). Adicionalmente, se realizaron varias investigaciones para optimizar la conservación de la viabilidad celular: $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 50 % (v/v) de glicerol (Rojas-Tapias et al., 2013).

Caracterización *in vitro* de actividades metabólicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal de las cepas en estudio

Se llevó a cabo una caracterización bajo condiciones *in vitro* de los mecanismos metabólicos relacionados con la promoción del crecimiento vegetal de las cepas AC1 y AC10. Las actividades evaluadas fueron: fijación de nitrógeno (Eckert et al., 2001), solubilización de nutrientes como fósforo (De Bolle et al., 2013), producción de la enzima ACC-desaminasa (Honma & Shimomura, 1978), síntesis de compuestos indólicos (AIA) (Bradford, 1976; Glickmann & Dessaux, 1995), producción de sideróforos (Schwyn & Neilands, 1987) y síntesis de enzimas como proteasas, quitinasas pectinasas, celulasas, amilasas y ureasas (Cappuccino & Sherman, 2005). Cada ensayo se realizó por triplicado y fue repetido dos veces.

Los resultados revelaron que cada cepa exhibe más de un mecanismo de promoción del crecimiento vegetal. Se

observó que AC1 y AC10 son capaces de fijar nitrógeno mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA), la cual registró valores entre 1.033 y 1.408 nmol de etileno $\text{mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ (tabla 10.1). Con respecto a la solubilización de nutrientes, se evidenció que los microorganismos tienen la habilidad de solubilizar fósforo a partir de fosfato tricálcico a pH de 7,5 y fosfato de hierro a pH de 5,0. Este resultado mostró que las cepas AC1 y AC10 son más eficientes en la solubilización de fosfato tricálcico (Ca-P) que de fosfato de hierro (Fe-P). La solubilización de fosfato está asociada al aumento en la disponibilidad de fósforo en el suelo, posiblemente dado por la secreción bacteriana de ácidos orgánicos o agentes quelantes en el medio de crecimiento (Panhwar et al., 2014). Sin embargo, se observaron resultados negativos en la solubilización de potasio de moscovita y biotita.

■ Tabla 10.1. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de AC1 y AC10

Fuente: Elaboración propia

| 1 | AC1 | 2 | AC10 |
|---|---|---|---|
| | Actividad nitrogenasa: | | Actividad nitrogenasa: |
| | • Ensayo de reducción de acetileno (ara) (nmol de etileno $\text{mL}^{-1} \text{h}^{-1}$): 68,01 | | • Ensayo de reducción de acetileno (ara) (nmol de etileno $\text{mL}^{-1} \text{h}^{-1}$): 45,32 |
| | Solubilización: P (mg de $\text{PO}_4^{3-} \text{mL}^{-1}$) | | Solubilización: P (mg de $\text{PO}_4^{3-} \text{mL}^{-1}$) |
| | • Fosfato tricálcico (Ca-P): $1.408 \pm 95,57$ | | • Fosfato tricálcico (Ca-P): $1.033,83 \pm 47,75$ |
| | • Fosfato de hierro (Fe-P): $76,33 \pm 12,14$ | | • Fosfato de hierro (Fe-P): $75,50 \pm 15,71$ |
| | Fitoestimulación: | | Fitoestimulación: |
| | • Compuestos indólicos (mg de indol mg proteína^{-1}): $0,16 \pm 0,01$ | | • Compuestos indólicos (mg de indol mg proteína^{-1}): $0,18 \pm 0,01$ |
| | Producción: | | Producción: |
| | • Sideróforos (+/-): - | | • Sideróforos (+/-): - |

Nota: Los datos se presentan como error estándar de la media. Las medias y los errores estándar son el resultado de al menos tres repeticiones por análisis bioquímico, y los resultados son representativos de dos experimentos independientes. (+/-) indica presencia/ausencia de la actividad.



Los resultados también demostraron que ninguna de las cepas fue capaz de producir complejos sideróforos de hierro en agar CAS. Los microorganismos fueron capaces de producir compuestos indólicos (AIA) en presencia de L-triptófano. El AIA es la auxina fisiológicamente más activa en plantas involucradas en el agrandamiento y división celular, la diferenciación de tejidos y las respuestas a la luz y la gravedad (Sukumar et al., 2013). Por último, se observó producción de enzimas hidrolíticas, como proteasas, ureasas y pectinasas (tabla 10.2). Estas características bacterianas confieren capacidad de inhibir fitopatógenos o competir contra el suelo y poblaciones microbianas, ya que sus paredes celulares se degradarán por enzimas extracelulares, y también contribuyen en el proceso de mineralización de nutrientes (Pereira & Castro, 2014).

■ **Tabla 10.2.** Síntesis de enzimas hidrolíticas
Fuente: Elaboración propia

| | | | |
|----------|-------------|----------------------------|-------------------------------|
| 1 | AC1 | Proteasas (+/-): + | Alfa-amilasas (+/-): - |
| | | Celulasas (+/-): - | Quitinasas (+/-): - |
| | | Pectinasas (+/-): - | Ureasas (+/-): + |
| 2 | AC10 | Proteasas (+/-): + | Alfa-amilasas (+/-): + |
| | | Celulasas (+/-): - | Quitinasas (+/-): - |
| | | Pectinasas (+/-): + | Ureasas (+/-): + |

Nota: (+/-) indica presencia/ausencia de la actividad.

Al saber las principales capacidades metabólicas de AC1 y AC10 que están relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal, se llevaron a cabo experimentos en Agustín Codazzi (Cesar), Aguachica (Cesar) y El Espinal (Tolima), durante varios años, para consolidar las condiciones de aplicación y el efecto de estas dos cepas (producto Monibac) sobre el desarrollo del algodón.

Antes de establecer los experimentos, se realizaron las pruebas de compatibilidad con los agroquímicos que usualmente se utilizan en este cultivo (tabla 10.3).

A continuación, se describe a manera de información uno de los últimos experimentos realizados a nivel de invernadero y de campo.

■ **Tabla 10.3.** Compatibilidad de Monibac con los agroquímicos utilizados en el cultivo del algodón

| | |
|---|---|
| <p>1 Fungicida Producto: Vitavax Ingredientes activos: Carboxina y tiram Dosis de aplicación: 200 g 100 kg de semilla⁻¹ L de agua⁻¹ Compatibilidad con Monibac*: +</p> | <p>Producto: Carbovax Ingredientes activos: Carboxina y tiram Dosis de aplicación: 100 mL 100 kg de semilla⁻¹ L de agua⁻¹ Compatibilidad con Monibac*: +</p> |
| <p>2 Insecticida Producto: Gaucho Ingredientes activos: Imidacloprid Dosis de aplicación: 0,2 L 100 kg de semilla⁻¹ L de agua⁻¹ Compatibilidad con Monibac*: +</p> | <p>Producto: Cipermetrina Ingredientes activos: Cipermetrina Dosis de aplicación: 0,5 L 100 kg de semilla⁻¹ L de agua⁻¹ Compatibilidad con Monibac*: -</p> |
| <p>3 Herbicida Producto: Dual Ingredientes activos: Metolaclopro Dosis de aplicación: 1,5 L ha⁻¹ 200 L de agua⁻¹ Compatibilidad con Monibac*: + Producto: Cottonex Ingredientes activos: Fluometuron Dosis de aplicación: 2 L ha⁻¹ 200 L de agua⁻¹</p> | <p>Compatibilidad con Monibac*: + Producto: Roundup Ingredientes activos: Glifosato Dosis de aplicación: 4 L ha⁻¹ 400 L de agua⁻¹ Compatibilidad con Monibac*: +</p> |

* Compatibilidad obtenida hasta las 24 horas de secado, a 30 °C, con una viabilidad celular mayor a 1×10^8 UFC mL⁻¹. Para los demás plaguicidas, no disminuyó la viabilidad celular en el periodo evaluado (48 horas), a excepción de la cipermetrina.

Fuente: Elaboración propia

Influencia bacteriana sobre el desarrollo del algodón

Se estableció un experimento en invernadero en el CI Motilonia de AGROSAVIA (Agustín Codazzi) para determinar si la inoculación con AC1 y AC10 podría permitir reducir la fertilización mineral en algodón.

El experimento fue llevado a cabo en un diseño completamente al azar con seis tratamientos. Cada experimento se realizó tres veces, con seis réplicas. Las dosis de los fertilizantes fueron del 100, 75 y 50 % (p/v) de urea (producto Ecofértil, Colombia) con respecto a la aplicación recomendada, cada una acompañada con un porcentaje de fosfato diamónico (DAP) (producto Nutrimon, Colombia) y con el 100 % de KCl (producto Diabonos, Colombia), como fuentes de N, P y K, respectivamente. El 100 % del fertilizante correspondió a 75 kg ha⁻¹ (~2,34 g por maceta) para urea, 50 kg ha⁻¹ (~1,56 g por maceta) para DAP y 50 kg ha⁻¹ (~1,56 g por maceta) para KCl. Los tratamientos biológicos fueron AC1, AC10 y AC1+AC10 (1:1), y sin inoculación bacteriana (caldo MBR estéril). En todos los casos, los tratamientos biológicos se aplicaron junto con un 50 % de urea, DAP y KCl. El suelo utilizado fue recolectado de cultivos de algodón del CI Motilonia. Las propiedades químicas y físicas del suelo fueron las siguientes: pH: 7,15; materia orgánica: 3,02 %; coeficiente de intercambio catiónico efectivo: 15,23 cmol kg⁻¹; P: 215,93 ppm; S: 15,08 ppm; Ca: 13,37 cmol kg⁻¹; Mg: 1,8 cmol kg⁻¹; K: 0,63 cmol kg⁻¹; Na: 0,05 cmol kg⁻¹; Fe: 38,5 ppm; Mn: 2,2 ppm; Cu: 1,7 ppm. Las semillas del algodón fueron inoculadas (~4 × 10⁸ UFC mL⁻¹ semilla⁻¹) mediante remojo con 10 mL de inóculo o MBR estéril, dependiendo del tratamiento, durante 30 minutos, y sembradas en materas con capacidad de 600 g de suelo. 5 mL de cada inóculo bacteriano se volvieron a aplicar en la rizósfera, por tratamiento, después de 20 y 40 días de establecimiento, acorde con el periodo de tiempo en que se realizaron las aplicaciones de urea. Las condiciones del invernadero fueron 25-35 °C, un régimen 16/8 día-noche y aplicación diaria de agua. Después de 90 días, en la etapa de floración, se midió la longitud de la raíz y de la parte aérea de las plantas. Las muestras se secaron a 50 °C durante 72 días, y posteriormente se midieron la biomasa seca de las cápsulas, la parte aérea y la raíz. Además, el contenido de nitrógeno se estimó sobre el tejido vegetal en el Laboratorio Integral de Servicios para el Sector Agroalimentario (Lissalab), de AGROSAVIA. El análisis estadístico se realizó con Anova ($\alpha=0,05$) y la prueba de Tukey. Las asociaciones entre variables fueron examinadas con un análisis de correlación simple. Estos análisis y los gráficos se realizaron con el *software* GraphPad Prism 7.

Los resultados mostraron que la inoculación con bacterias causó un aumento significativo ($p < 0,05$) en el crecimiento de las plantas en comparación con los controles (Figura 10.1). Por ejemplo, cuando la concentración del fertilizante químico fue del 50 % de la dosis recomendada, se observó que la inoculación con AC1, AC10 y AC1 + AC10 aumentó significativamente ($p < 0,05$) la longitud de la parte aérea de las plantas en 9, 7 y 38 %, y la longitud de la raíz en 6, 16 y 32 %, respectivamente. En cuanto a biomasa seca, la raíz, la parte aérea y la cápsula mejoraron significativamente ($p < 0,05$), al ~13, 20 y 25 %, respectivamente.

Respecto al contenido de N, la aplicación microbiana condujo a un ligero aumento en su contenido, y las mejoras significativas en el contenido de este elemento por las bacterias solo se exhibieron con la inoculación mixta, lo que indica que la inoculación bacteriana tiene una mayor influencia en la biomasa vegetal con respecto al contenido de N. Los hallazgos actuales sugieren que la interacción entre plantas y bacterias podría mejorar la eficiencia en el uso de los nutrientes del fertilizante o que la inoculación

bacteriana podría beneficiar directamente el crecimiento de las plantas. Es importante tener en cuenta que el efecto de AC1 fue mayor en la parte aérea que en las raíces, mientras que con AC10 la respuesta fue mejor en estas. Además, se observó una correlación positiva ($R = 0,65$) entre la longitud de la raíz y el contenido de N en el tejido de toda la planta, únicamente cuando estaba presente AC10. Esto nos permite deducir que un aumento en la longitud de la raíz podría contribuir a una mayor tasa de N en la planta.

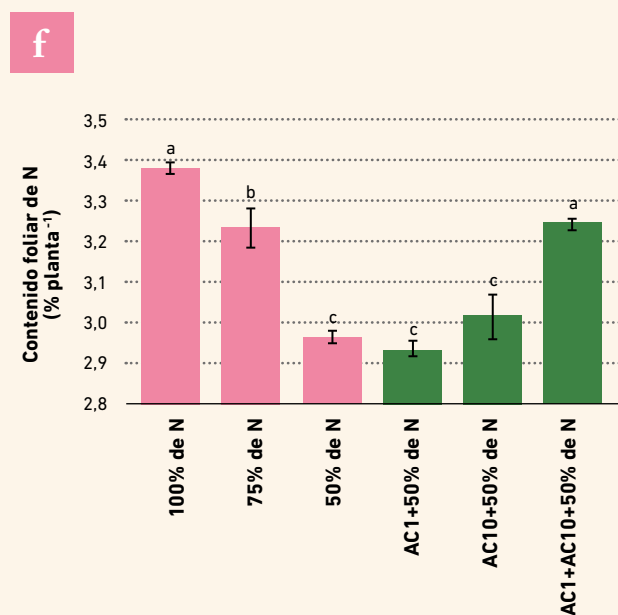
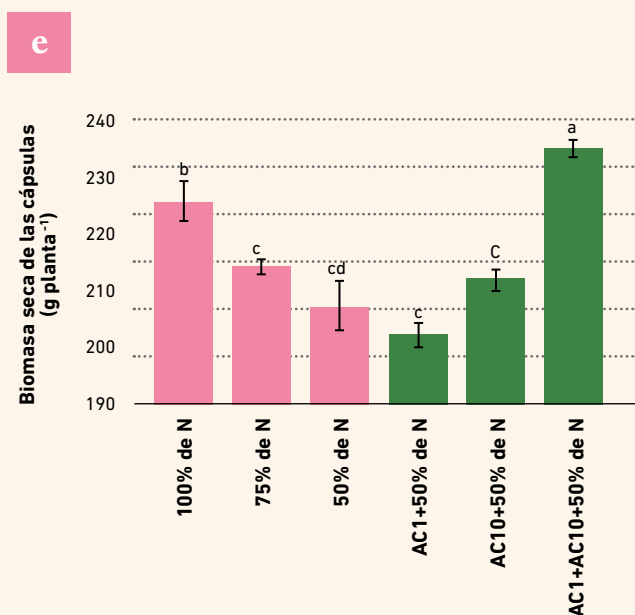
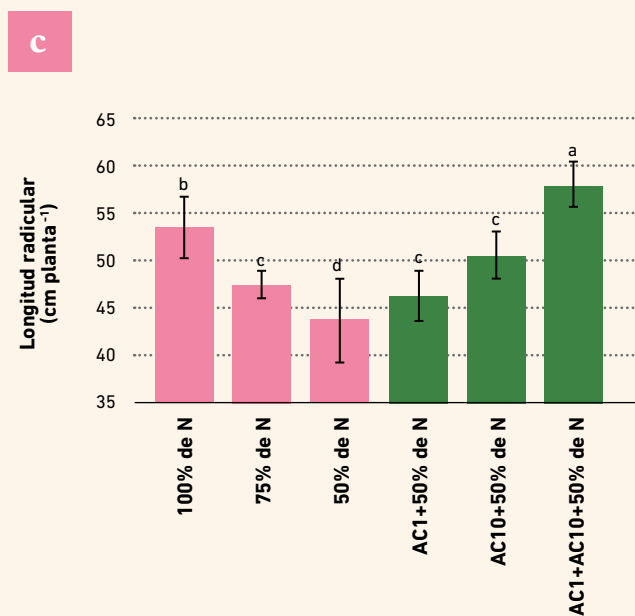
■ **Figura 10.1.** Influencia de la inoculación y la coinoculación de AC1 y AC10 con diferentes dosis de urea en el crecimiento del cultivo de algodón.

Fuente: Elaboración propia



En este experimento también se observó que la inoculación mixta con AC1 y AC10 aumentó el crecimiento de la planta con respecto a las inoculaciones simples (Figura 10.2). De hecho, se evidenció un aumento que oscila entre el 8 y el 53% en todos los parámetros de crecimiento de las plantas, lo que sugiere que la coinoculación microbiana tiene un mayor potencial para promover el crecimiento en estas (Figura 10.1). Este resultado podría explicarse por una contribución positiva y aditiva de cada microorganismo en comparación con las inoculaciones individuales. Cabe destacar que otros

investigadores han observado resultados similares cuando se utilizan coinoculaciones bacterianas para promover el crecimiento de las plantas. Sin embargo, Rojas-Tapias et al. (2014) informaron que la coinoculación no condujo a ningún efecto adicional en comparación con las inoculaciones individuales de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, al estudiar el crecimiento del maíz, aunque esta observación contrastante podría estar asociada a la relación intrínseca entre las diferentes especies de plantas y bacterias y las propiedades químicas y físicas del suelo.



Capítulo 10. Experiencia AGROSAVIA en Algodón (*Gossypium hirsutum*)

Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el cultivo bajo condiciones de invernadero

■ **Figura 10.2.** Experimento en invernadero.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Por último, se evidenció que la coinoculación más un 50 % de urea causó un efecto significativo en el crecimiento del algodón en comparación con el 75 y el 50 % de la fertilización mineral, respectivamente. Además, se observó que el 100 % de la fertilización y el 50 % de la fertilización + la coinoculación bacteriana produjeron resultados similares, sin estadísticas diferentes, en presencia de la coinoculación más la mitad de las dosis de urea; la promoción de la longitud, la biomasa seca de la parte aérea y la biomasa seca de la cápsula fue del 10, el 9 y el 5 % con respecto a la fertilización completa, respectivamente. Por el contrario, la longitud de la raíz y el contenido de N fueron mayores con tasas de urea completas, en un 0,6 y un 4 %, respectivamente. Esta observación sugiere que la coinoculación con AC1 y AC10 reemplaza parcialmente las dosis normales de fertilización nitrogenada, lo que significa que es posible una reducción de $1,17 \text{ g materia de urea}^{-1}$ o de $37,5 \text{ kg ha de urea}^{-1}$, debido a la fertilización biológica. Pereg y McMillan (2015) informaron hallazgos similares y describieron que los géneros bacterianos más utilizados para aumentar la eficiencia de los fertilizantes químicos son *Azospirillum* sp., *Methylobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y la combinación de *Azotobacter*

chroococcum con hongos micorrízicos arbusculares, con resultados comparables en el crecimiento, el rendimiento y la calidad de la fibra con respecto al programa completo de fertilización.

Como conclusión, la coinoculación de las cepas AC1 y AC10 permite reducir las dosis de fertilización nitrogenada hasta en un 50 % en el cultivo de algodón en condiciones de invernadero. Los análisis bioquímicos mostraron que ambas cepas poseen múltiples actividades metabólicas de promoción del crecimiento vegetal que indirectamente podrían explicar los resultados observados. Aunque nuestro trabajo no establece si los mecanismos bacterianos fueron responsables del efecto positivo de la coinoculación, sí proporciona un punto de partida para futuras investigaciones, en las cuales las herramientas moleculares en diferentes vías metabólicas permitirán discernir los mecanismos asociados a los resultados reportados aquí. Consideramos que una reducción en la cantidad de agroquímicos utilizados en el cultivo de algodón es primordial para reducir su impacto negativo en los aspectos ambiental, social y económico, por lo que es una verdadera contribución para mitigar el cambio climático



Caso de estudio de AGROSAVIA bajo condiciones de campo: inoculante microbiano para reducir la fertilización mineral nitrogenada en la producción de algodón

Los resultados evidenciados con la coinoculación de las cepas AC1 y AC10 sobre el crecimiento del algodón en invernadero mostraron un potencial biofertilizante de reducir hasta en un 50 % la fertilización nitrogenada, lo que permitió continuar con estudios en campo para corroborar dichos efectos positivos hasta la producción del cultivo.

Microorganismos y condiciones de cultivo

Las cepas AC1 y AC10 fueron suministradas por el Banco de Germoplasma de AGROSAVIA. Los microorganismos fueron reactivados en medio sólido LG (composición en g L⁻¹: 20 de sacarosa, 0,05 de fosfato dibásico de potasio, 0,15 de fosfato monobásico de potasio, 0,02 de cloruro de calcio, 0,2 de sulfato de magnesio heptahidratado, 0,002 de molibdato de sodio, 0,01 de cloruro férrico, 1 de carbonato de calcio, 5 mL de azul de bromotimol y a un pH de 7) y llevados a incubación a 30 ± 2 °C durante 48 horas. Posteriormente, se generó un preinóculo en medio MBR (Moreno et al., 2011) como cultivo *overnight* a 30 ± 2 °C y a 200 rpm por 24 horas. Los microorganismos fueron multiplicados mediante fermentaciones discontinuas por separado en medio MBR en un biorreactor de 5L, estableciendo condiciones de 500 rpm, 1 vvm y 30 ± 2 °C

durante 24 horas. Finalmente, el consorcio bacteriano se preparó mezclando volúmenes de ambas cepas ajustadas a una concentración aproximada de 10⁸ UFC mL⁻¹ en relación 1:1.

Ubicación y diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en el departamento de Valle del Cauca (Colombia), en el CI Palmira de AGROSAVIA, en el municipio de Palmira, a una altura de 1.200 m s. n. m., a una temperatura media anual de 23 °C, una humedad relativa del 75 % y una precipitación de 2.000-2.100 mm totales anuales. Su objetivo fue evaluar la eficacia de una formulación líquida optimizada del inoculante a base de las cepas AC1 y AC10.

Los tratamientos se implementaron, y la información se tomó hasta la finalización del cultivo (140 días). Se empleó un arreglo factorial ampliado de 2 × 2, donde el primer factor fue la dosis de la fertilización en forma de urea (75 y 50 %), y el segundo factor fue la aplicación biológica en dos presentaciones: control comercial Monibac en turba y AC1+AC10 en consorcio líquido. Un tratamiento con fertilización completa (100 %) fue

el control positivo empleado, lo que dio en total cinco tratamientos evaluados. En todos los tratamientos fue aplicada la fertilización mineral base de los demás elementos recomendados por el análisis de suelos.

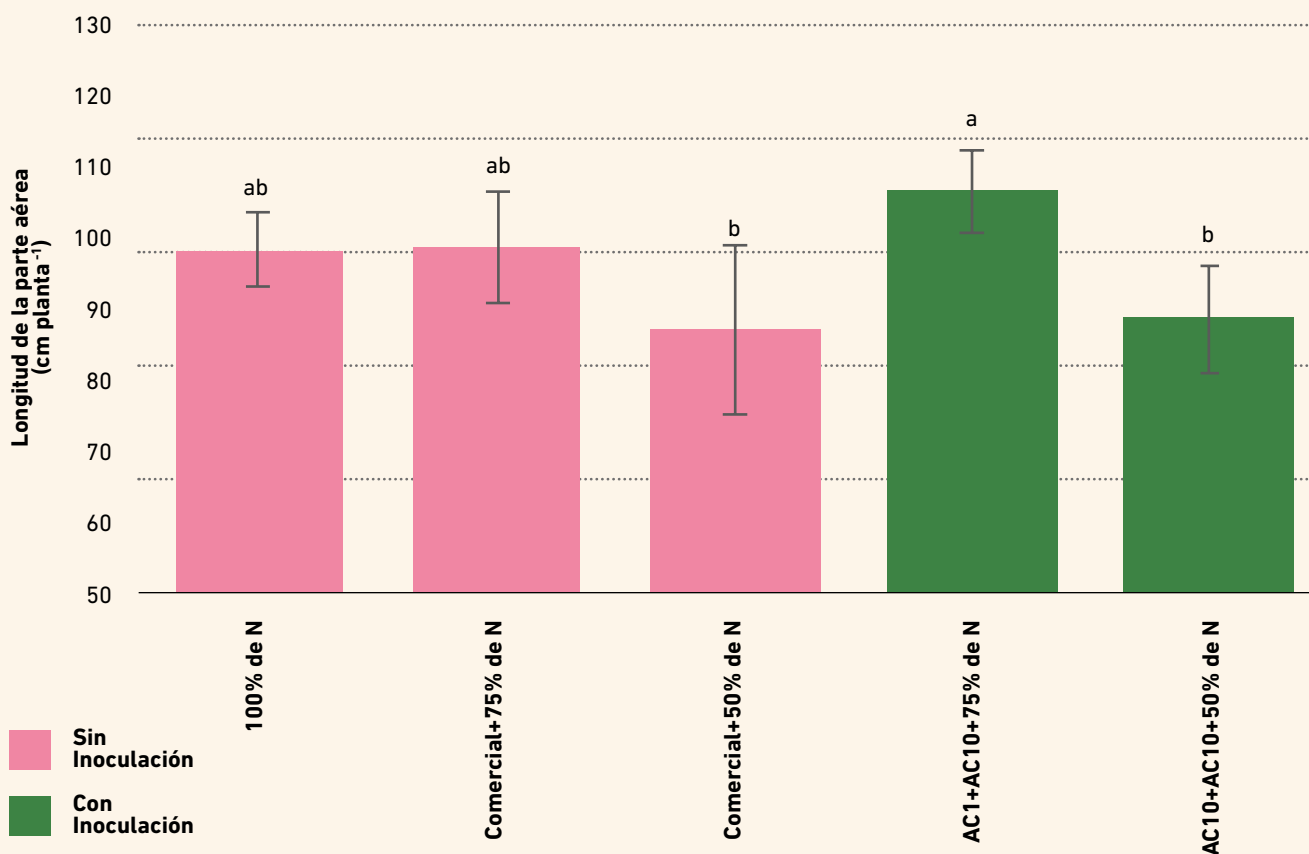
Las semillas de *Gossypium hirsutum* var. Sinuana M-137 fueron peletizadas con Monibac en turba, empleando CaCO_3 como adherente, de acuerdo con lo estipulado en la ficha técnica. El tratamiento de los inoculantes líquidos se basó en la aplicación a la semilla de 500 mL por cada 10 kg de semilla. Las reinoculaciones se realizaron a los 20 y 40 días de emergencia, junto con la fertilización nitrogenada en forma de urea, aplicando 1 L ha^{-1} . El experimento fue establecido en parcelas de 54 m^2 , divididas en seis surcos de 10 m de largo, con una separación de 0,9 m entre ellos y una distancia de 12,5 cm entre plantas, lo que dio como resultado una densidad de siembra de 8 plantas/ m^2 . Las parcelas fueron distribuidas en forma de bloques completamente al azar con tres repeticiones por bloque, donde los cuatro surcos centrales de cada repetición fueron cosechados para efectuar los análisis respectivos con base en una muestra de 50 motas tomadas al azar

por parcela. A partir de esta muestra, se realizó el cálculo correspondiente de los índices de cosecha: altura de la planta (cm), biomasa seca de la mota (g), biomasa seca de la fibra (g), biomasa seca de la semilla (g), número de cápsulas por metro lineal y rendimiento (kg ha^{-1}). El análisis certificado de la calidad de la fibra fue realizado por el Laboratorio de Fibras Diagonal, determinando las variables de micronaire, madurez, longitud, uniformidad, índice de fibras cortas (SFI, por sus siglas en inglés), humedad y resistencia. El análisis de los datos se realizó con Anova, donde se estableció un grado de significancia de 0,05 mediante el paquete estadístico SPSS Statistics de IBM (versión 22.0.0).

Los resultados mostraron diferencias significativas entre tratamientos en la altura vegetal, donde el consorcio bacteriano (AC1+AC10) más el 75% de N produjo la mayor influencia promotora del crecimiento sobre el algodónero (Figura 10.3), con un incremento del 4% frente a la fertilización completa (100% de N). Adicionalmente, el consorcio bacteriano promovió más la longitud vegetal en comparación con el control comercial (Monibac en turba).

■ **Figura 10.3.** Altura de la parte aérea de las plantas de algodón.

Fuente: Elaboración propia



En cuanto a biomasa seca de mota, semilla y fibra (Figura 10.4), no se encontraron diferencias significativas, pero se evidenció una tendencia de incremento asociada a la aplicación del consorcio bacteriano (AC1 + AC10) tanto con el 50 % como con el 75 % de N.

■ **Figura 10.4.** Biomasa seca de la mota, la semilla y la fibra del cultivo de algodón (correspondiente a 50 motas).
Fuente: Elaboración propia

■ Sin Inoculación
■ Con Inoculación

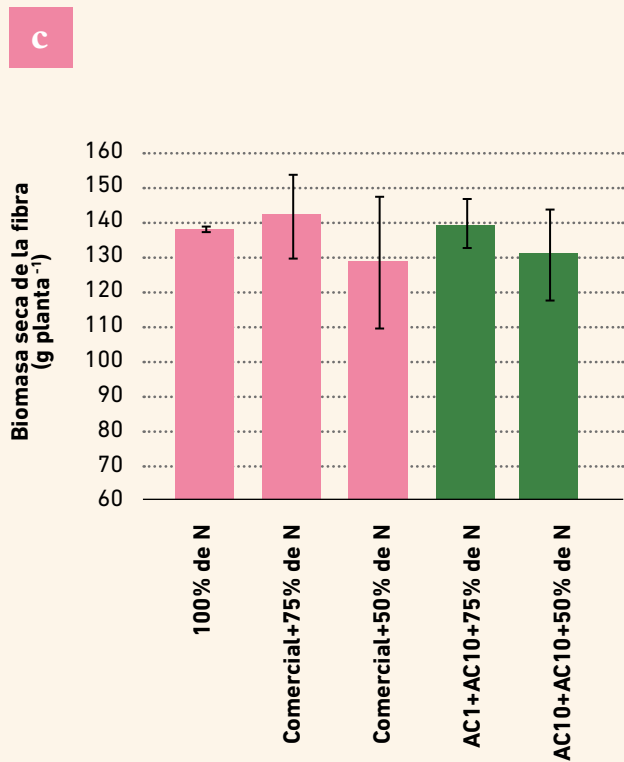
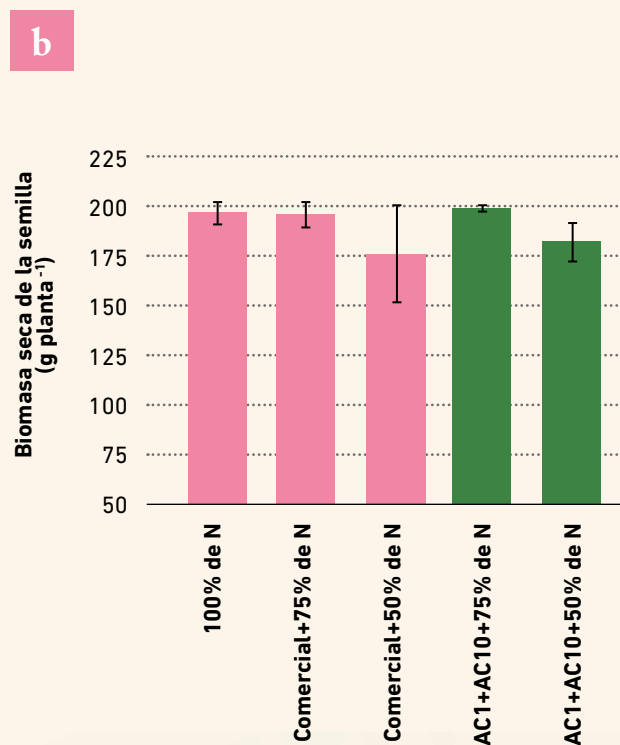
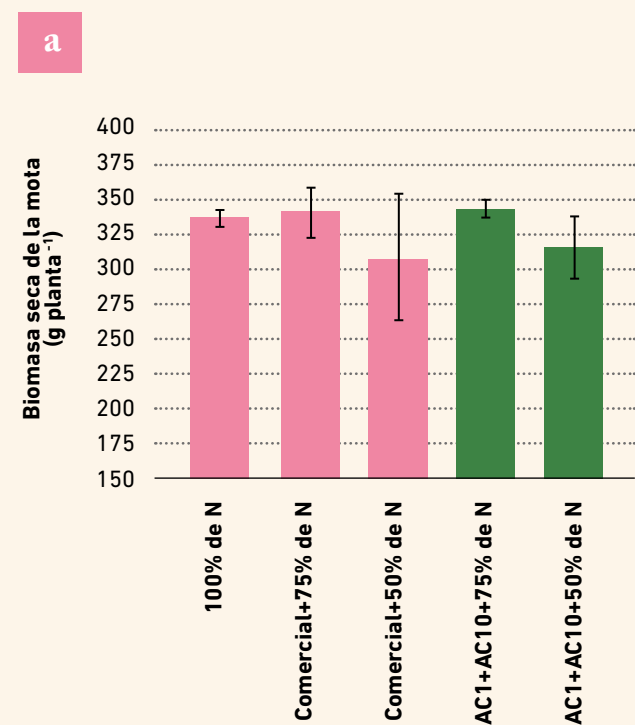


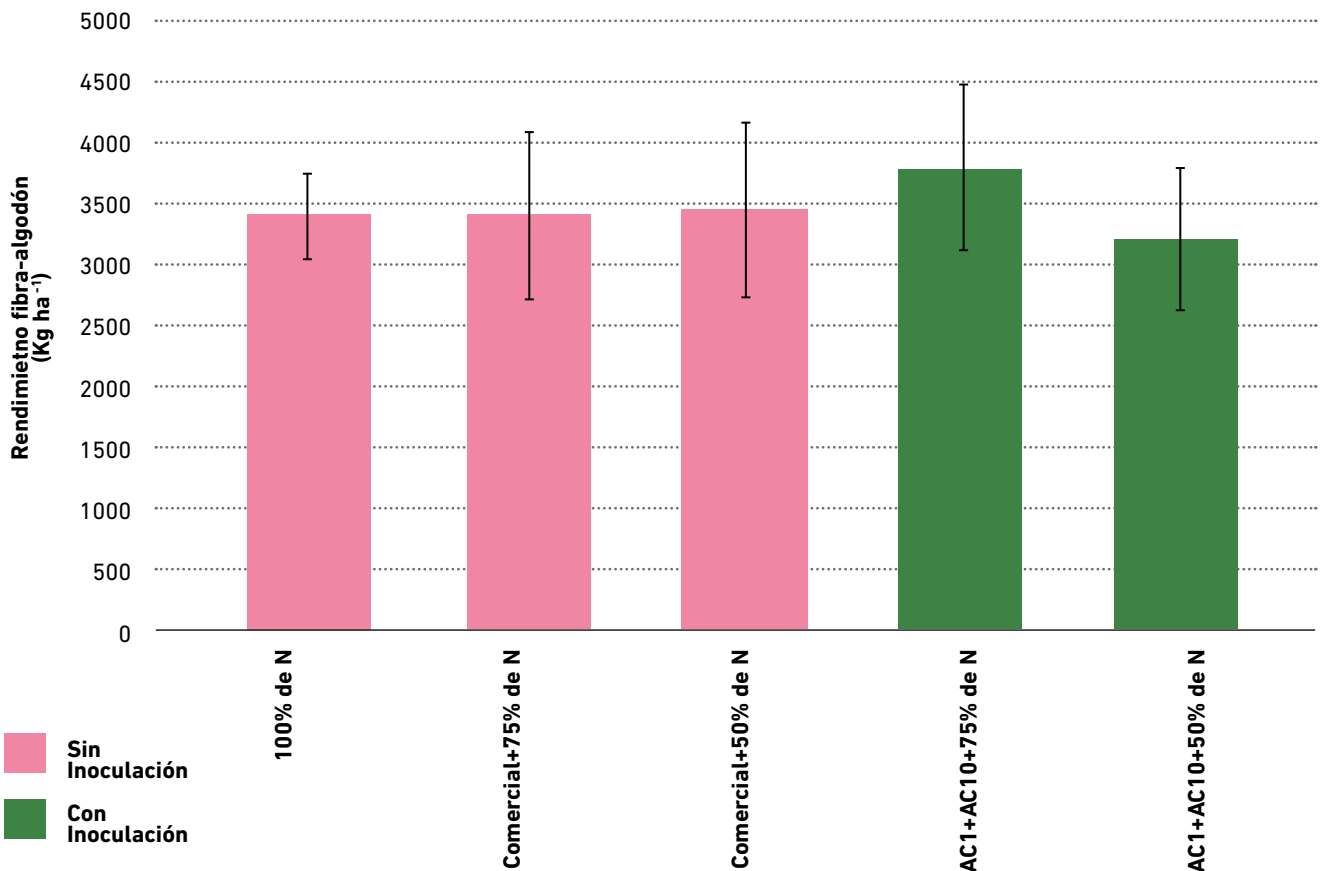


Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

Respecto al rendimiento (Figura 10.5), no se encontraron diferencias significativas, pero se evidenció una tendencia similar de los tratamientos a los resultados de biomasa seca de mota, semilla y fibra. Específicamente, se observó un incremento mayor al 10% del rendimiento cuando se aplicó el consorcio bacteriano (AC1 + AC10) más el 75% de N, y una disminución de aproximadamente el 5% cuando se usó el consorcio bacteriano (AC1 + AC10) más el 50% de N, con respecto a la fertilización mineral completa. Esto nos permite deducir que el efecto estimulador del crecimiento del consorcio con AC1 y AC10 podría reemplazar hasta un 50% la aplicación de urea. Estos resultados corroboran lo obtenido bajo condiciones de invernadero, donde se evidenció que el consorcio de AC1 y AC10 permite reducir las dosis de fertilización nitrogenada hasta un 50% para el crecimiento (longitud, biomasa y contenido foliar de N) del algodón en su etapa de floración en condiciones de invernadero. Esta obtención de un rendimiento similar del cultivo de algodón bajo condiciones reducidas de fertilización suplementadas con la aplicación de un consorcio de bacterias promotoras del crecimiento se ha podido observar también en otros cultivos, como el ajonjolí (*Sesamum indicum*), donde la aplicación de *A. chroococcum* TRA2 redujo la fertilización, en general, en un 50% (Maheshwari et al., 2012).

■ **Figura 10.5.** Rendimiento del cultivo de algodón (kg ha^{-1}).

Fuente: Elaboración propia



Respecto al algodón, se han reportado reducciones de 25 kg ha⁻¹ en la fertilización nitrogenada mediante la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal de géneros como *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* y *Bacillus* (Amjad et al., 2015; Wu et al., 2012).

En cuanto a la calidad de fibra, se observó que no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (tabla 10.4 y Figura 10.6), lo que demuestra que la biofertilización, que reduce las dosis de fertilización nitrogenada, no afecta la calidad de la fibra obtenida en comparación con la fertilización convencional nitrogenada (100% de urea) del cultivo.



Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

■ **Tabla 10.4.** Resultados de calidad de fibra en el cultivo de algodón

Fuente: Elaboración propia

| | |
|----------|---|
| 1 | <p>Consorcio 50 % de N Micronaire: 3,77 ± 0,32 Madurez (porcentaje): 87 ± 0,1 Longitud (mm): 1,21 ± 0,02 Uniformidad (porcentaje): 84,95 ± 0,64 Índice de fibras cortas (IFC): 6,33 ± 0,32 Resistencia (g tex-1): 32,43 ± 0,52</p> |
| 2 | <p>Consorcio 75 % de N Micronaire: 3,81 ± 0,28 Madurez (porcentaje): 87 ± 0,1 Longitud (mm): 1,23 ± 0,03 Uniformidad (porcentaje): 84,63 ± 1,53 Índice de fibras cortas (IFC): 6,38 ± 0,59 Resistencia (g tex-1): 31,90 ± 1,21</p> |
| 3 | <p>Monibac 50 % de N Micronaire: 3,95 ± 0,17 Madurez (porcentaje): 87 ± 0,1 Longitud (mm): 1,24 ± 0,02 Uniformidad (porcentaje): 85,13 ± 0,92 Índice de fibras cortas (IFC): 6,23 ± 0,28 Resistencia (g tex-1): 31,93 ± 0,71</p> |
| 4 | <p>Monibac 75 % de N Micronaire: 4,04 ± 0,15 Madurez (porcentaje): 87 ± 0,1 Longitud (mm): 1,22 ± 0,01 Uniformidad (porcentaje): 84,93 ± 1,58 Índice de fibras cortas (IFC): 6,33 ± 0,35 Resistencia (g tex-1): 31,15 ± 1,24</p> |
| 5 | <p>100 % de N Micronaire: 3,86 ± 0,23 Madurez (porcentaje): 86 ± 0,1 Longitud (mm): 1,21 ± 0,02 Uniformidad (porcentaje): 85,00 ± 1,41 Índice de fibras cortas (IFC): 6,28 ± 0,10 Resistencia (g tex-1): 31,10 ± 1,02</p> |

■ **Figura 10.6.** Experimento establecido en campo.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Una comparación de los valores considerados por la Corporación Distribuidora de Algodón Nacional (Diagonal) en la clasificación HVI de la fibra de algodón con los resultados de la investigación mostró que la fibra obtenida presentó las siguientes características promedio: micronaire de $3,89 \pm 0,23$, madurez del $87\% \pm 0,1\%$ (madura), longitud de la fibra media de $1,22 \pm 0,02$ mm, uniformidad del $84,93\% \pm 1,14\%$, IFC de

$6,31 \pm 0,33$ (bajo), resistencia de $31,70 \pm 1,02$ g tex⁻¹ (alta) y humedad del 7,04 % (intermedia).

Así, se puede concluir que el uso de las cepas AC1 y AC10 en presentación líquida permite reducir hasta un 50 % la dosis de urea en todo el proceso de producción del cultivo de algodón, sin afectar la calidad de mota.

Caso de estudio de AGROSAVIA bajo condiciones de invernadero: evaluación del potencial biofertilizante de bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el algodón *Gossypium hirsutum*

Después de haber obtenido resultados prometedores en la reducción de la fertilización nitrogenada para el cultivo del algodón mediante el uso de biofertilizantes, se decidió realizar investigaciones en relación con la fertilización fosfatada, para aumentar el impacto positivo en el sector (Romero-Perdomo et al., 2021).

Cepas bacterianas y preparación de inóculos

Las cepas SP20, N8, N9, G56, G58 y B02 fueron proporcionadas por el Banco de Germoplasma de AGROSAVIA. Estos microorganismos fueron seleccionados para este estudio porque en investigaciones previas demostraron tener la capacidad de promover el alargamiento de la raíz de las plántulas de algodón bajo condiciones nutricionales limitadas en P (datos no mostrados). Para la preparación del inóculo, las cepas fueron crecidas en agar YMA (Vincent, 1970) en condiciones estándar: a 30 °C durante 24 horas de incubación. El inóculo bacteriano se produjo aeróbicamente, haciendo crecer cada cepa en condiciones estándar en un agitador rotativo (150 rpm) en medio líquido YM.

Material vegetal

Se utilizaron semillas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) de la variedad M-123. Estas semillas se esterilizaron en superficie (10 minutos de inmersión con hipoclorito de sodio al 5 %, y un minuto de inmersión en etanol al 70 %), se enjuagaron cinco veces en agua destilada esterilizada y se secaron al aire en una campana de flujo laminar.

Influencia de las cepas en el algodón en un suelo deficiente en fósforo

Para seleccionar dos de los seis microorganismos mencionados anteriormente, se realizaron ensayos en invernadero basados en su potencial de promoción del crecimiento de las plantas en el ci Nataima de AGROSAVIA, en El Espinal (Tolima). Para ello se utilizó un diseño experimental

completamente al azar con 8 tratamientos, 3 réplicas y 2 repeticiones. Los tratamientos fueron: (T1) fertilización completa sin inoculación bacteriana (urea, DAP y KCl); (T2) fertilización con urea, KCl y, en reemplazo del DAP, roca de fosfato del Huila (producto Olafos-S: 9 % de P_2O_5), sin inoculación bacteriana, y (T3-T8) fertilización con urea, roca fosfórica (RF) y KCl, con inoculación de cada cepa.

Después, materas de 1 kg de capacidad fueron llenadas con suelo no estéril con las siguientes características: pH: 6,12; materia orgánica: 1,69 %; P: 12,28 mg kg⁻¹; coeficiente de intercambio catiónico efectivo: 6,9 cmol kg⁻¹; Ca: 4,79 cmol kg⁻¹; Mg: 1,74 cmol kg⁻¹; K: 0,23 cmol kg⁻¹; Na: <0,14 cmol kg⁻¹. El suelo se secó al aire a 37 °C durante tres días y luego se tamizó con una malla de 2 mm (Romero-Perdomo et al., 2019). La inoculación y la fertilización se realizaron según los tratamientos después de 4 días de la siembra. Se usaron fertilizantes minerales solubles, en dosis convencionales en campo, como urea (75 kg ha⁻¹, producto Ecofétil, Colombia), DAP (50 kg ha⁻¹) y KCl (50 kg ha⁻¹). Se aplicó cada fertilizante (5 mL maceta⁻¹) en las siguientes concentraciones por litro de agua destilada estéril: 6,3 g de urea, 16 g de DAP y 5 g de KCl, y la cantidad de roca fosfórica aplicada fue de 0,152 g maceta⁻¹. Para inocular, se aplicaron manualmente 5 mL de cada inóculo o caldo YEM estéril a la rizósfera. Después de 30 días a 18-38 °C, a una humedad del ~55 % y con un régimen 16/8 día-noche, se realizó la medición del contenido relativo de clorofila (CRC) con el medidor de clorofila SPAD-502 (Konica Minolta, Japón) en el estadio principal 15 (quinta hoja desplegada) (Munger et al., 1998). Asimismo, se analizaron las mediciones de intercambio de gases: fotosíntesis neta (Pn) y tasa de transpiración (E), entre las 9 a.m. y las 11 a.m., con el analizador de gases infrarrojo LI-6400 XT (Licor, EE. UU.). Los parámetros de evaluación se establecieron en 400 μmol s⁻¹ para la velocidad de flujo, con una concentración de 400 μmol de CO₂ y una densidad de flujo fotónico de 1.200 μmol de fotones de luz por m⁻² s⁻¹. Los datos se tomaron una vez se alcanzó el estado estable de la Pn (Chastain et al., 2016). Luego de 30 días, se midió la longitud de la raíz y la parte aérea. El material vegetal se secó al horno por separado, a 60 °C, durante 48 horas, para medir su peso seco. Además, se estimó el contenido de fósforo en la parte aérea en el Lissalab de AGROSAVIA con el método Bray II.

Para los análisis estadísticos, se usó el *software* SPSS Statistics de IBM (versión 22.0.0), y los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (Anova). Las significaciones estadísticas de las comparaciones por pares se obtuvieron con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0,05$), y las asociaciones entre variables se examinaron mediante un análisis de correlación simple.

Los resultados mostraron que la inoculación de B02 y SP20 mejoró significativamente ($p < 0,05$) el crecimiento del algodón (Figura 10.7). Igualmente, se observaron incrementos del 36,21 y el 19% en biomasa seca de la parte aérea con DAP, B02 + RF y SP20 + RF respecto al control (no

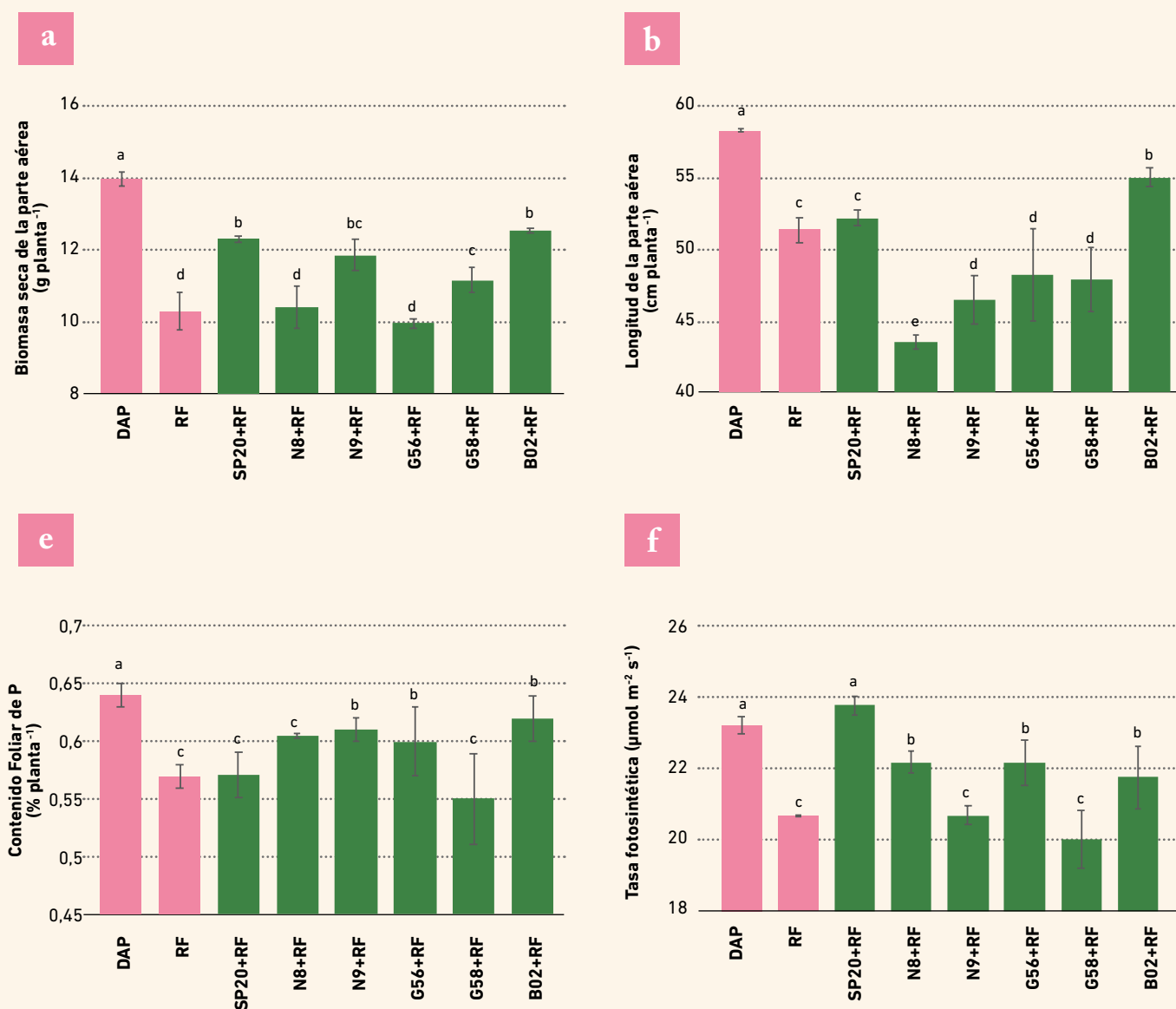




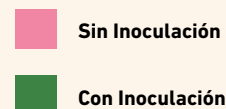
inoculado con aplicación de roca fosfórica). En cuanto a la longitud de la parte aérea, aumentos del 13 y el 7% fueron medidos cuando se aplicó DAP y B02+RF en comparación con el control. Por otro lado, las plantas del tratamiento control exhibieron una biomasa radicular de 1,86 g planta⁻¹. En contraste, el DAP, B02+RF y SP20+RF produjeron una biomasa radicular de 3,36, 3,25 y 3,14 g planta⁻¹, lo que representa incrementos del 81, el 75 y el 69%, respectivamente; además, interesantemente,

se encontró mayor influencia positiva bacteriana en la longitud radicular. La aplicación de B02+RF y SP20+RF promovió la longitud radicular en un 34 y un 26%, con valores de 24,73 y 23,31 cm planta⁻¹, respectivamente, mientras que la aplicación del DAP la promovió en un 24% (23,02 cm planta⁻¹) en relación con el control (18,44 cm planta⁻¹). Los otros tratamientos biológicos no difirieron significativamente del control no inoculado con roca fosfórica.

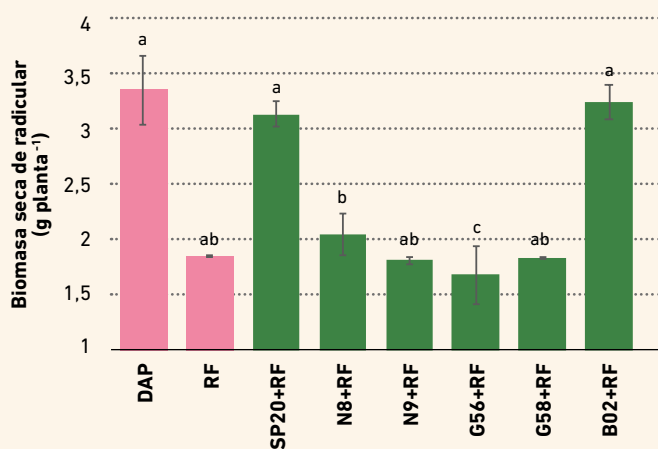
■ **Figura 10.7.** Influencia de la inoculación de las cepas SP20, N8, N9, G56, G58 y B02 con roca fosfórica en el crecimiento del algodón.



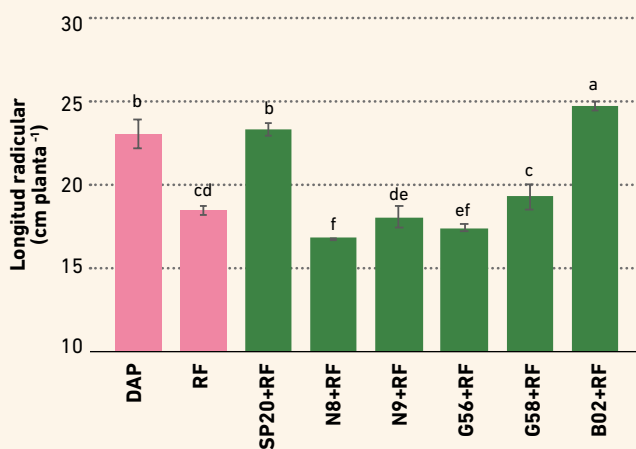
Nota: Las medias y los errores estándar son el resultado de tres réplicas por tratamiento, y los resultados son representativos de dos experimentos independientes. Las diferentes letras indican diferencias significativas basadas en la prueba de Duncan.



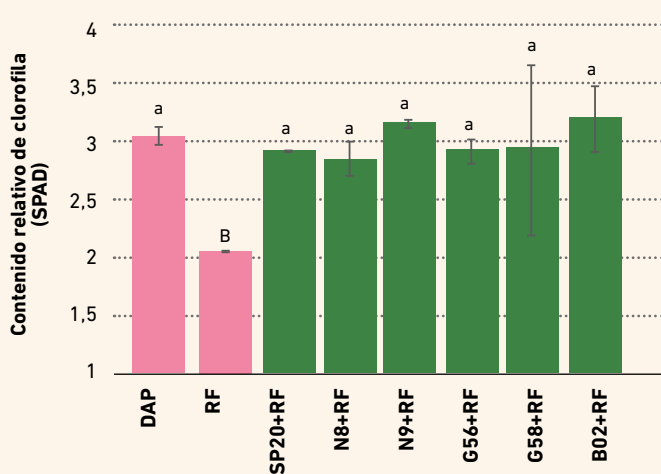
c



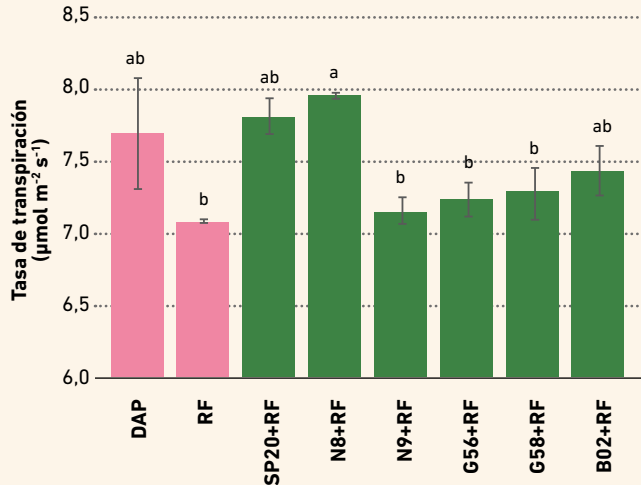
d



e



h



Capítulo 10. Experiencia AGROSAVIA en Algodón (*Gossypium hirsutum*)

Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el cultivo bajo condiciones de invernadero

Respecto a las variables relacionadas con la nutrición del P, se observó un efecto benéfico cuando se aplicaron los inoculantes a base de las cepas B02, SP20 y N8 (Figura 10.8). Por ejemplo, respecto al control, el contenido de P aumentó en un 12 y un 7% con DAP y B02+RF. Asimismo, la tasa fotosintética incrementó en un 14 y un 12% en los tratamientos de SP20+RF y DAP. En cuanto a la clorofila, se observó en promedio un aumento del 8% con B02+RF, DAP

y SP20+RF. Por último, N8+RF, DAP y SP20+RF mejoraron la transpiración en un 12,8 y un 6%. Un análisis correlacional de todo el experimento mostró una relación positiva entre los parámetros de crecimiento ($0,76 \leq r \leq 0,93$) y también entre la tasa fotosintética y la tasa de transpiración ($r = 0,74$). Por lo tanto, nuestros datos indican que las cepas SP20 y B02 influyeron positivamente en el algodón, por lo que fueron seleccionadas para los siguientes ensayos.

■ **Figura 10.8.** Evaluación de bacterias solubilizadoras de fósforo en invernadero.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Son frecuentes los reportes con informes microbiológicos sobre la inoculación de *Rhizobium* sp. como una estrategia exitosa para mejorar el crecimiento de legumbres como los frijoles comunes, las lentejas, los guisantes, los garbanzos y la soya (Wang, 2019); sin embargo, el número de publicaciones sobre la inoculación de *Rhizobium* sp. en algodón disminuye considerablemente. Por ejemplo, Hafez et al. (2004) evidenciaron que la inoculación rizobiana mejora la emergencia de las plántulas, la absorción de nutrientes (K^+ y Ca^{+2}) y el crecimiento del algodón, pero, hasta donde nosotros sabemos, no hay

investigaciones que reporten si únicamente el uso de *Rhizobium* sp. influye benéficamente sobre el crecimiento de las plantas, el contenido de P y los parámetros fisiológicos en algodón en suelos deficientes en P.

Al respecto, una condición determinante en nuestro trabajo fueron las condiciones del suelo, pues el suelo usado tenía un bajo contenido de P ($12,28 \text{ mg kg}^{-1}$). Según Ramírez y Kloepper (2010), esta condición es necesaria para observar que las plantas respondan al incremento de P soluble generado por la acción

microbiana. Otro parámetro del suelo que muchas veces es olvidado en los estudios de bacterias solubilizadoras de fosfato es el índice de sorción de P, el cual representa la capacidad de retención de P en los suelos. Es importante resaltar que en la investigación el suelo no fue esterilizado y procedía de suelos donde se cultiva algodón (Tolima, Colombia). El objetivo de utilizar estas condiciones fue observar el efecto de promoción del crecimiento de las plantas en condiciones idénticas a las aplicadas comercialmente, por lo que no podemos excluir la posibilidad de que las poblaciones microbianas del suelo nativo puedan influir en el efecto promotor del crecimiento vegetal.

Identificación molecular de cepas

Las dos cepas seleccionadas fueron identificadas molecularmente. Para esto, se realizó un análisis de secuencia del gen 16S rARN, como se describió previamente en Rojas-Tapias et al. (2012). Las secuencias parciales obtenidas se analizaron mediante el algoritmo de la herramienta de búsqueda de alineación local básica (Blast) y se compararon con las secuencias registradas en la base de datos GenBank, del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y luego se depositaron en esta misma base de datos.

Los resultados arrojaron que las cepas bacterianas SP20 y B02 mostraron un 99% de similitud con el género *Rhizobium*. Los números de acceso del GenBank de SP20 y B02 fueron MH160395 y MH160394, respectivamente.

Evaluación *in vitro* de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal

De manera similar, las dos cepas seleccionadas se caracterizaron bioquímicamente en condiciones *in vitro*, para determinar si exhibían características promotoras del crecimiento de las plantas. La evaluación de la capacidad de solubilización/mineralización de fosfato se llevó a cabo en dos ensayos: 1) cuantificación de P soluble con fosfato tricálcico y roca de fosfato (0,5%), en medio NBRIP líquido (Nautiyal, 1999), medido 5 y 12 días después de la inoculación con azul de molibdato, método colorimétrico (Fiske & Subbarow, 1925), y 2) detección cualitativa de la producción de fitasa en el medio de selección de fitasa (PSM) descrito por Kerovuo et al. (1998). También se probaron otras características que promueven el crecimiento de las plantas. La producción de compuestos indólicos se evaluó con y sin adición de triptófano, según Glickmann y Dessaux (1995). Además, la producción de ACC-desaminasa se determinó observando la capacidad de crecimiento bacteriana durante dos días en un medio de sal mínimo con ACC (3 mM) como única fuente de N, según el método de Habib. Finalmente, se detectó la síntesis de sideróforos en medio agar cromo azulol S (Schwyn & Neilands, 1987). Cada ensayo se realizó con al menos dos repeticiones y tres réplicas.

Los resultados mostraron que las cepas SP20 y B02 realizan varias actividades promotoras del crecimiento vegetal (tabla 10.5). Estas cepas fueron activas en la solubilización de P como fosfato tricálcico y roca fosfórica del Huila (producto Olafos-S) de baja solubilidad (9% de P_2O_5). Con respecto a la mineralización de fósforo orgánico, ninguna cepa es capaz de producir fitasas. En AIA, ambas cepas exhiben esta actividad, y se observó que el triptófano mejora su producción. Finalmente, en relación con los sideróforos, las cepas SP20 y B02 mostraron resultados cualitativos positivos para su producción.

■ **Tabla 10.5.** Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de las cepas SP20 y B02
Fuente: Elaboración propia

1

SP20**Solubilización:**

- **Fosfato tricálcico (Ca-P) (mg de PO_4^{3-} mL⁻¹):**
0,58 ± 0,05

Mineralización:

- **Fitasas (+/-):** -

Fitoestimulación:

- **Compuestos indólicos (µg de indol mL por OD₆₃₀⁻¹)**
- » **Sin triptófano:** 56,45 ± 4,74
- » **Con triptófano:** 155,28 ± 4,59

Producción:

- **Sideróforos (+/-):** +

2

B02**Solubilización:**

- **Fosfato tricálcico (Ca-P) (mg de PO_4^{3-} mL⁻¹):**
0,41 ± 0,02

Mineralización:

- **Fitasas (+/-):** -

Fitoestimulación:

- **Compuestos indólicos (µg de indol mL por OD₆₃₀⁻¹)**
- » **Sin triptófano:** 37,51 ± 4,16
- » **Con triptófano:** 136,36 ± 10,47

Producción:

- **Sideróforos (+/-):** +

Nuestra hipótesis es que la influencia directa de las cepas SP20 y B02 estimula el alargamiento y el aumento en el área de la raíz del algodón, lo que le permite una mayor exploración del suelo y una mayor absorción de nutrientes cuando el P es limitado; así, su concentración aumenta mediante su solubilización y la producción de sideróforos. La sinergia de estas dos actividades pudo haber sido la causante del incremento aproximado del 8 y el 7% en el contenido de P y de la longitud de la raíz de las plantas que fueron inoculadas con estas dos cepas, con respecto al tratamiento con DAP. De este modo, las actividades exhibidas por cada cepa bacteriana podrían estar asociadas con el efecto de promoción del crecimiento vegetal sobre el algodón (Romero-Perdomo et al., 2017; Santos-Torres et al., 2021). Sin embargo, para probar la importancia biológica de estas actividades metabólicas, se requerirá la creación de mutantes (Pardo-Díaz et al., 2021). La presente descripción de las habilidades de promoción del crecimiento vegetal de las cepas SP20 y B02 corrobora la idea de García-Fraile et al. (2012) de que las especies del género *Rhizobium* son reconocidas como microorganismos solubilizadores de fosfato, sintetizadores de AIA y productores de sideróforos.

Aunque los rizobios, entre muchas otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal, son los organismos más estudiados debido en gran medida a su capacidad para formar una simbiosis efectiva con plantas leguminosas para transformar el nitrógeno atmosférico (N_2) en N (amoníaco) utilizable, los resultados presentados aquí muestran su potencial biotecnológico con otros mecanismos metabólicos centrados en cultivos no leguminosos.

Conclusiones

Las cepas *Rhizobium* sp. SP20 y *Rhizobium* sp. B02 mostraron la mayor eficiencia ($p < 0,05$) sobre la biomasa, la longitud, el contenido de P y la tasa fotosintética del algodón, así como un potencial para reemplazar dosis de aplicación del fertilizante mineral con DAP. Además, estas cepas fueron capaces de solubilizar fosfato tricálcico y roca fosfórica, de sintetizar compuestos indólicos en presencia y ausencia de triptófano y de producir sideróforos, actividades metabólicas que podrían estar asociadas al crecimiento del algodón en suelos con bajo contenido de P. Sin embargo, es necesario realizar pruebas de campo para obtener información sobre la respuesta de las plantas de algodón en términos de rendimiento y calidad de la fibra con estas cepas, buscando reducir el uso de fertilizantes con DAP.

Nota: Los datos se presentan como media ± error estándar. Las medias y los errores estándar son el resultado de tres repeticiones por análisis bioquímico, y los resultados son representativos de dos experimentos independientes. (+/-) indica presencia/ausencia de la actividad.

Referencias

- Amjad, M., Akhtar, J., & Rashid, M. S. (2015). Evaluating the effectiveness of biofertilizer on salt tolerance of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Archives of Agronomy and Soil Science*, 61(8), 1.165-1.177. <https://doi.org/10.1080/03650340.2014.990006>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Campuzano-Duque, L. F., & Buenaventura-Baron, M. (2020). Desempeño productivo de algodón en surco ultra-estrechos en suelos ácidos en Colombia. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(1), 203-211. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i1.2062>
- Camelo-Rusique, M., Moreno-Galván, A., Romero-Perdomo, F., & Bonilla-Buitrago, R. (2017). Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial como biofertilizante. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.06.005>
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2005). *Microbiology: A laboratory manual*. Benjamin Cummings.
- Chastain, D. R., Snider, J. L., Choinski, J. S., Collins, G. D., Perry, C. D., Whitaker, J., Grey, T. L., Sorensen, R. B., van Iersel, M., Byrd, S. A., & Porter, W. (2016). Leaf ontogeny strongly influences photosynthetic tolerance to drought and high temperature in *Gossypium hirsutum*. *Journal of Plant Physiology*, 199, 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.05.003>
- De Bolle, S., Gebremikael, M. T., Maervoet, V., & De Neve, S. (2013). Performance of phosphate-solubilizing bacteria in soil under high phosphorus conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 49(6), 705-714. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0759-1>
- Eckert, B., Weber, O. B., Kirchoff, G., Halbritter, A., Stoffels, M., & Hartmann, A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 17-26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-17>
- Fiske, C. H., & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66(2), 375-400. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84756-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84756-1)
- Gallegos-Cedillo, G. (2019, 26 de agosto). El mercado mundial y nacional del algodón. *El Economista*. <https://www.economista.com.mx/opinion/El-mercado-mundial-y-nacional-del-algodon-20190826-0063.html>
- García-Fraile, P., Carro, L., Robledo, M., Ramírez-Bahena, M.-H., Flores-Félix, J.-D., Fernández, M. T., Mateos, P. F., Rivas, R., Igual, J. M., Martínez-Molina, E., Peix, Á., & Velázquez, E. (2012). *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS ONE*, 7(5), artículo e38122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038122>
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 793-796. <http://aem.asm.org/content/61/2/793.abstract>
- Hafeez, F. Y., Safdar, M. E., Chaudhry, A. U., & Malik, K. A. (2004). Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44(6), 617-622. <https://doi.org/10.1071/EA03074>
- Honma, M., & Shimomura, T. (1978). Metabolism of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(10), 1.825-1.831. <https://doi.org/10.1080/00021369.1978.10863261>
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., & Apajalahti, J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2.079-2.085. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2079-2085.1998>
- Maheshwari, D. K., Dubey, R. C., Aeron, A., Kumar, B., Kumar, S., Tewari, S., & Arora, N. K. (2012). Integrated approach for disease management and growth enhancement of *Sesamum indicum* L. utilizing *Azotobacter chroococcum* TRA2 and chemical fertilizer. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(10), 3.015-3.024. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1112-4>
- Moreno, A. E., Rojas, D. F., & Bonilla, R. R. (2011). Aplicación de diseños estadísticos secuenciales en la identificación de fuentes nutricionales para *Azotobacter chroococcum* AC1. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 151-158. https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:226
- Munger, P., Bleiholder, H., Hack, H., Hess, M., Stauß, R., van den Boom, T., & Weber, E. (1998). Phenological growth stages of the cotton plant (*Gossypium hirsutum* L.): Codification and description according to the BBCH Scale1. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 180(3), 143-149. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.1998.tb00384.x>
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Panhwari, Q. A., Naher, U. A., Jusop, S., Othman, R., Latif, M. A., & Ismail, M. R. (2014). Biochemical and molecular characterization of potential phosphate-solubilizing bacteria in acid sulfate soils and their beneficial effects on rice growth. *PLoS ONE*, 9(10), artículo e97241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097241>
- Pardo-Díaz, S., Romero-Perdomo, F., Mendoza-Labrador, J., Delgadillo-Duran, D., Castro-Rincon, E., Silva, A. M., Rojas-Tapias, D., Cardoso, E. J. B. N., Estrada-Bonilla, G. A. (2021). Endophytic PGPB Improves Plant Growth and Quality, and Modulates the Bacterial Community of an Intercropping System. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5:715270. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.715270>

- Pereg, L., & McMillan, M. (2015). Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 80, 349-358. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.10.020>
- Pereira, S. I. A., & Castro, P. M. L. (2014). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. *Ecological Engineering*, 73, 526-535. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.060>
- Ramírez, C. A., & Kloepper, J. W. (2010). Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. *Biology and Fertility of Soils*, 46(8), 835-844. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0488-2>
- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61, 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.01.006>
- Rojas-Tapias, D. F., Bonilla, R., & Dussán, J. (2014). Effect of inoculation and co-inoculation of *Acinetobacter* sp. RG30 and *Pseudomonas putida* GN04 on growth, fitness, and copper accumulation of maize (*Zea mays*). *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(12), artículo 2232. <https://doi.org/10.1007/s11270-014-2232-2>
- Rojas-Tapias, D., Ortiz-Vera, M., Rivera, D., Kloepper, J., & Bonilla, R. (2013). Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. *Universitas Scientiarum*, 18(2), 129-139. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-2.etmp>
- Romero-Perdomo, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galván, A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., & Bonilla, R. (2017). *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006>
- Romero-Perdomo, F., Ocampo-Gallego, J., Camelo-Rusique, M., & Bonilla, R. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bioinoculants on *Pennisetum clandestinum* (Poaceae). *Revista de Biología Tropical*, 67(4). <https://doi.org/10.15517/RBT.V67I4.34029>
- Romero-Perdomo, F., Beltrán, I., Mendoza-Labrador, J., Estrada-Bonilla, G., & Bonilla, R. (2021). Phosphorus nutrition and growth of cotton plants inoculated with growth-promoting bacteria under low phosphate availability. *Frontier in Sustainable Food System*, 4:618425. doi: 10.3389/fsufs.2020.618425
- Santos-Torres, M., Romero-Perdomo, F., Mendoza-Labrador, J., Gutiérrez, A. Y., Vargas, C., Castro-Rincon, E., Caro-Quintero, A., Uribe-Velez, D., Estrada-Bonilla, G. A. (2021). Genomic and phenotypic analysis of rock phosphate-solubilizing rhizobacteria. *Rhizosphere*, 17, 100290. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100290>
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Sukumar, P., Legué, V., Vayssières, A., Martin, F., Tuskan, G. A., & Kalluri, U. C. (2013). Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant, Cell & Environment*, 36(5), 909-919. <https://doi.org/10.1111/pce.12036>
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria* (IBP Handbook no. 15). Blackwell Scientific.
- Wang, E. T. (2019). Symbiosis between rhizobia and legumes. En E. T. Wang, C. F. Tian, W. F. Chen, J. P. W. Young, & W. X. Chen (eds.), *Ecology and evolution of rhizobia: Principles and applications* (pp. 3-19). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9555-1_1
- Westcott, P. (2010). *USDA agricultural projections to 2019*. USDA.
- Wu, Z., Yue, H., Lu, J., & Li, C. (2012). Characterization of rhizobacterial strain Rs-2 with Acc deaminase activity and its performance in promoting cotton growth under salinity stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 2.383-2.393. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1047-9>



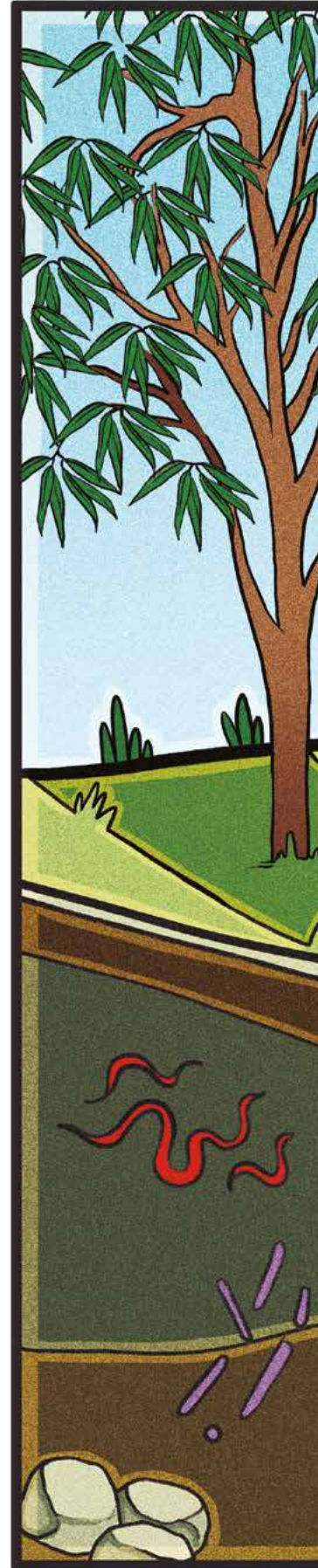


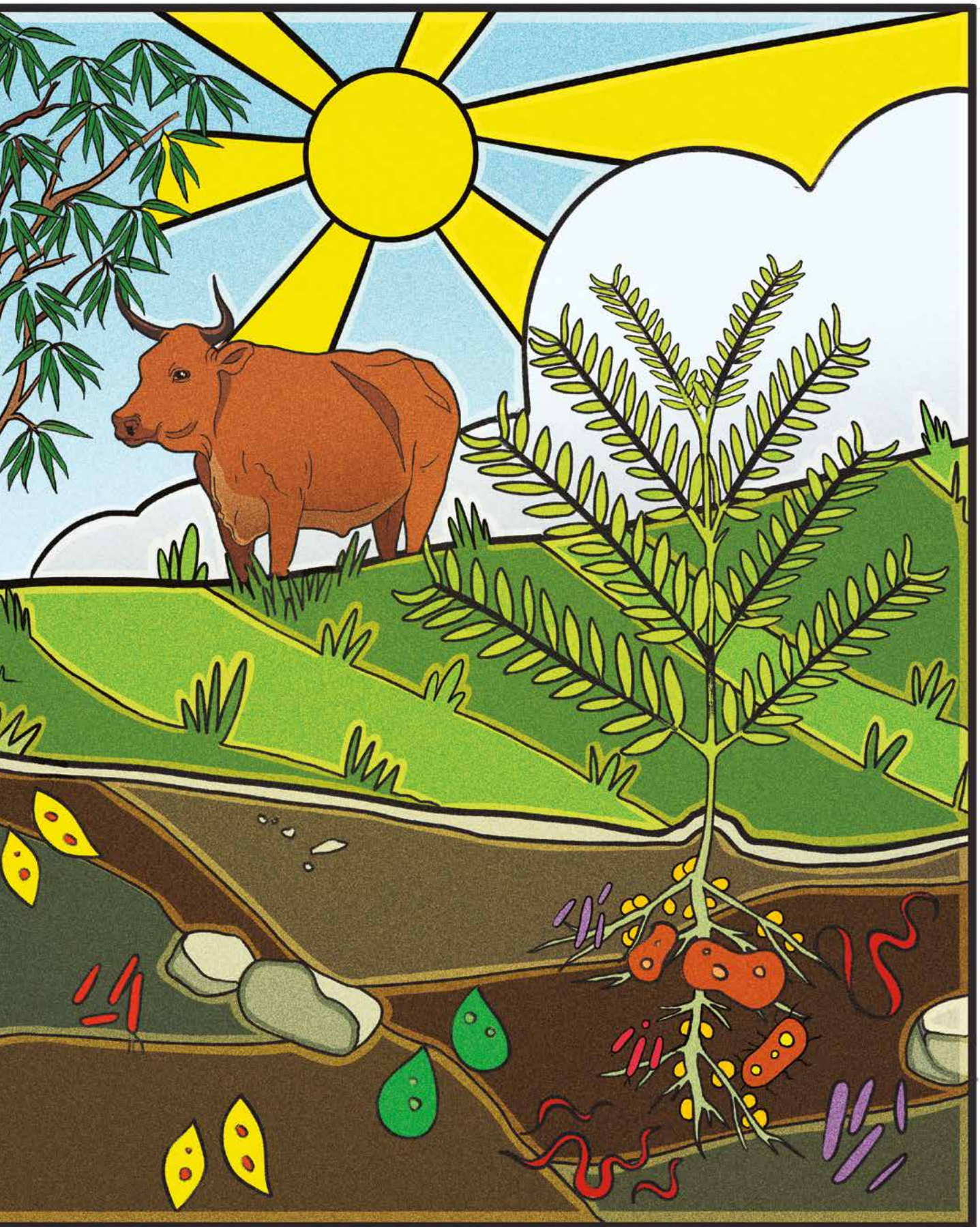
Experiencia AGROSAVIA en Sistemas Silvopastoriles Trópico Bajo

Uso de biofertilizantes
como promotores del
crecimiento vegetal de arreglos
silvopastoriles para Sistemas
Ganaderos en Colombia.

Belisario Antonio Roncallo Fandiño¹
Paola Jimena Criollo Campos²
Ruth Rebeca Bonilla Buitrago²

-
1. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Mutilonia. Codazzi. Colombia.
 2. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.





Introducción

El inventario bovino nacional dispone de una población de 22.689.420 cabezas, con una producción anual de 910.000 toneladas de carne y de 6.500 millones de litros de leche, con aportes de suma importancia para la seguridad alimentaria del país; además, ocupa el puesto 11.º en el mundo, 5.º en América y 3.º en Suramérica, y genera 810.000 empleos directos. El 35% del hato bovino se dedica a la actividad de doble propósito, el 39% a la cría, el 6% a la producción láctea y el 20% a la ceba, con diversos sistemas de producción en todo el territorio nacional. Los departamentos de Antioquia, Casanare, Córdoba, Meta, Santander y Cesar, en su orden, concentran más del 60% del inventario ganadero (Fedegán, 2018).

Sin embargo, el comportamiento del ganado bovino como subsector se caracteriza por la creciente pérdida de productividad, su alto impacto ambiental y sus conflictos por el uso del suelo (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2018), y los territorios ganaderos se caracterizan por el aumento de la degradación de los suelos por erosión o salinización (Ideam, 2019; Ideam & UDCA, 2015).

Las formas inadecuadas de explotación de los suelos han derivado en su deterioro físico, químico y biológico, con una reducción de su potencial productivo. También han sido afectados de manera negativa la biodiversidad y el recurso hídrico, factores clave en el desarrollo de la actividad agropecuaria; en la ganadería bovina, se ha comprobado una reducción gradual de la productividad de las pasturas, la cual ha sido más intensa en las áreas establecidas a lo largo del tiempo en monocultivos de gramíneas, modelo tecnológico implementado durante décadas en el país, con efectos negativos sobre la producción, la sostenibilidad y la competitividad rural (Chauveau et al., 2015; Zúñiga et al., 2015).

Por otra parte, se registra que la ganadería es responsable, en el mundo, del 14,5% de las emisiones de gases de efecto invernadero: el metano (CH_4) proviene de la fermentación entérica de los bovinos y el manejo deficiente del estiércol, y el CO_2 se deriva del uso de combustibles fósiles y del cambio en la actividad de la tierra (Villanueva et al., 2018). Esta situación hace pensar en la urgente necesidad de prestar la mayor atención posible al tema de la producción de gases de efecto invernadero y sus efectos nocivos con los cambios climáticos.

Se considera que la conversión de pasturas a sistemas silvopastoriles (SSP) puede reducir las pérdidas de carbono del suelo e incrementar su almacenamiento, debido a la cantidad que los árboles fijan de este elemento. También se ha determinado que los SSP disminuyen la tasa de descomposición, por lo que reducen el impacto causado por este compuesto a la atmósfera; además, el uso de asociaciones de leguminosas y gramíneas se ha corroborado como una alternativa importante en la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero por la actividad ganadera (Villanueva et al., 2018).

La conversión de pasturas a sistemas silvopastoriles (ssp) puede reducir las pérdidas de carbono del suelo e incrementar su almacenamiento, debido a la cantidad que los árboles fijan de este elemento. También se ha determinado que los SSP disminuyen la tasa de descomposición, por lo que reducen el impacto causado por este compuesto a la atmósfera.

Las interacciones y sinergias entre los componentes de los SSP (Figura 11.1) y los sistemas agrosilvopastoriles (ASSP) generan bienes y servicios ecosistémicos que tienen efectos diversos en los agroecosistemas ganaderos; así, es de gran importancia la identificación

y valoración de estos servicios asociados a los beneficios productivos, ambientales y sociales, obtenibles en sus interacciones, especialmente en lo que tiene que ver con el cambio climático (Jónsson & Davíðsdóttir, 2016).

■ **Figura 11.1.** Sistema silvopastoril establecido en Agustín Codazzi (Cesar).

Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Diversos trabajos de investigación en SSP en condiciones tropicales han demostrado importantes avances en la producción de los rumiantes, siendo relevantes los obtenidos en el incremento de peso vivo en novillos (entre 500 y 900 g día⁻¹), producción anual de carne (entre 800 y 1.200 kg ha⁻¹) y producción de leche (entre 7 y 10 litros vaca⁻¹ día⁻¹, sin uso de suplementos) (Iglesias et al., 2015; López-Vigo et al., 2017).

En este orden de ideas, las experiencias de investigaciones en condiciones tropicales expuestas demuestran cuánto han contribuido la ciencia y la tecnología en el incremento de la competitividad y sostenibilidad agropecuaria mediante la integración de las actividades agrícola, ganadera y forestal. Sin embargo, lo más importante es conocer cómo se favorece el potencial productivo de los suelos y, en consecuencia, la disponibilidad de forrajes en términos de cantidad y calidad, aspectos que repercuten en mayores producciones de carne y leche, sin desconocer que también se incrementa la diversidad de otros productos, maderables y agrícolas, con notables beneficios económicos, ambientales y sociales para los actores rurales.

Un elemento importante en el presente trabajo fue dilucidar el potencial del uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal como una alternativa para mejorar la producción y sostenibilidad de los sistemas ganaderos en el Caribe seco colombiano.

Desarrollo de la investigación: sistemas silvopastoriles en el Caribe seco colombiano

El desarrollo de un biofertilizante para la implementación y evaluación de un SSP en el trópico bajo contó con investigaciones en microbiología de suelos consistentes en el aislamiento, la selección y la multiplicación de bacterias efectivas para cada una de las especies vegetales que conformaron el sistema.



Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

Aislamiento y caracterización de cepas de *Azospirillum* sp. con potencial biofertilizante en pasto guinea (*Megathyrsus maximus* Jacq. cv. Tanzania) en el Valle del Cesar

Introducción

Gran parte de los suelos tropicales se caracterizan por sus bajos contenidos de nitrógeno, que afectan la adecuada producción agrícola, en la que se incluyen los bajos rendimientos de materia seca de los forrajes.

Es conocido que la fijación biológica de este elemento es posible mediante el uso de microorganismos fijadores de N_2 presentes en la rizósfera de los pastos tropicales y subtropicales. A pesar de ello, en Colombia no existían antecedentes de estos estudios: no se disponía de ningún registro de la evaluación de microorganismos diazótrofos asociados a las pasturas. El presente trabajo tuvo como objetivo iniciar el proceso de investigación sobre cepas nativas de *Azospirillum* asociadas con el pasto guinea (*Megathyrsus maximus* Jacq. cv. Tanzania) en el Valle del Cesar (Figura 11.2).

- **Figura 11.2.** Pastura de pasto guinea establecida en Agustín Codazzi (Cesar).
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Desarrollo de la investigación

Se obtuvieron 16 aislamientos de microorganismos correspondientes a *Azospirillum* sp., aislados a partir de suelo rizosférico, raíces y hojas de *M. maximus*, en dos épocas climáticas (lluvia y sequía), en el departamento del Cesar. En la evaluación de invernadero, las cepas seleccionadas fueron inoculadas en *M. maximus* solas y en coinoculación con *Enterobacter agglomerans* (UV1). Para tal efecto, las cepas de *Azospirillum* sp. fueron cultivadas en medio DYGS (Radwan et al., 2004) e incubadas durante 48 horas en agitación a 1.200 xg y a 32 °C. El aislamiento “*E. agglomerans* (UV1)” se multiplicó en medio de cultivo SRSM sin indicador. Los inoculantes fueron ajustados, en su concentración celular, a una densidad óptica DO_{600} 0,5, que corresponde a 4×10^7 UFC mL⁻¹. Después de 10 días de la siembra de la pastura, se registró el porcentaje de germinación y se raleó, con el fin de dejar 5 plantas por maceta. La fertilización química nitrogenada fue aplicada acorde con el análisis de suelo. Los tratamientos se basaron en las cepas seleccionadas complementadas con la mitad de la fertilización de nitrógeno, y el tratamiento de control fue manejado con la fertilización de síntesis completa. El experimento tuvo una duración de 45 días, y las variables medidas fueron: porcentaje de germinación, peso seco de hojas, porcentaje de proteína bruta y fósforo total en el tejido foliar.

Resultados relevantes

Los resultados indican que el mayor recuento poblacional de microorganismos (con el método de número más probable) se presentó en la época lluviosa, referente a las poblaciones de *Azospirillum* en los diferentes estratos de la planta. El mayor valor se observó en las hojas para el medio de cultivo NFb, y para el medio LGI (*A. amazonense*) no hubo diferencias significativas en los diferentes estratos evaluados. Marques et al. (2017) encontraron diferencias estadísticas significativas en la colonización de raíces de pastos C4 (*Axonopus affinis*, *Paspalum notatum*, *Andropogon lateralis* y *Aristida laevis*), por parte de *Azospirillum* spp., en un 61 % en relación con el tratamiento de control.

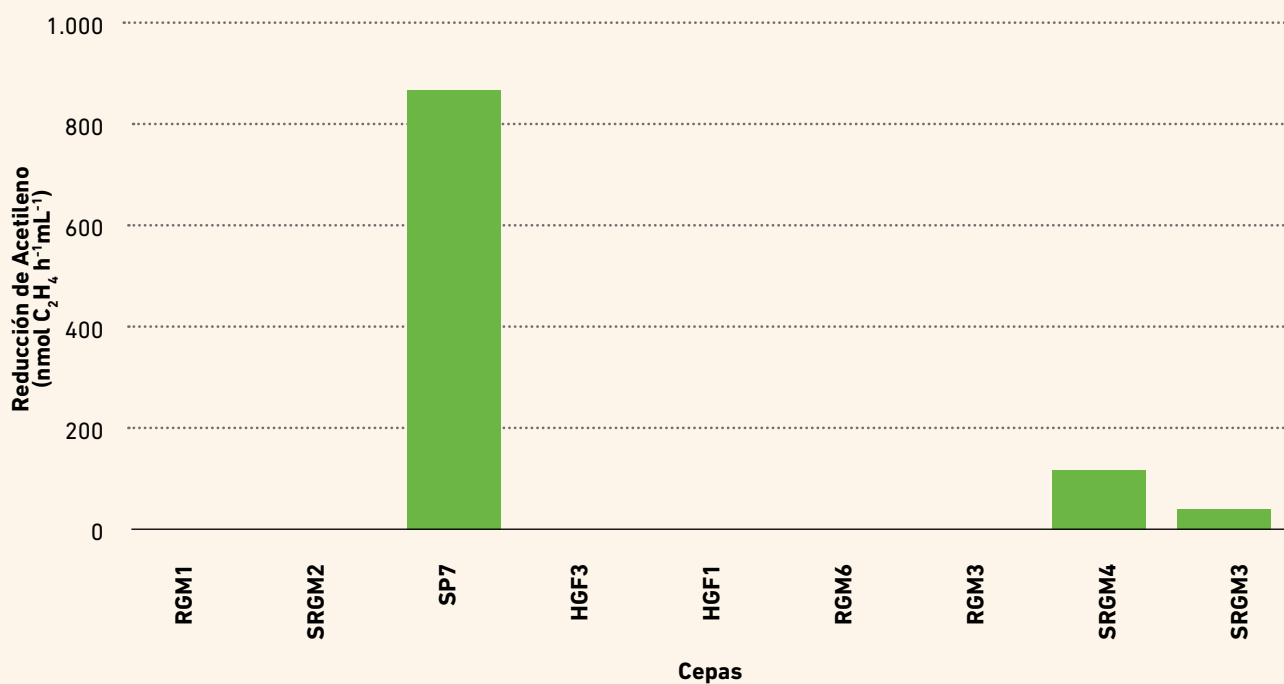
A partir de las caracterizaciones *in vitro* realizadas a las cepas, el método de la reducción de acetileno como indicador



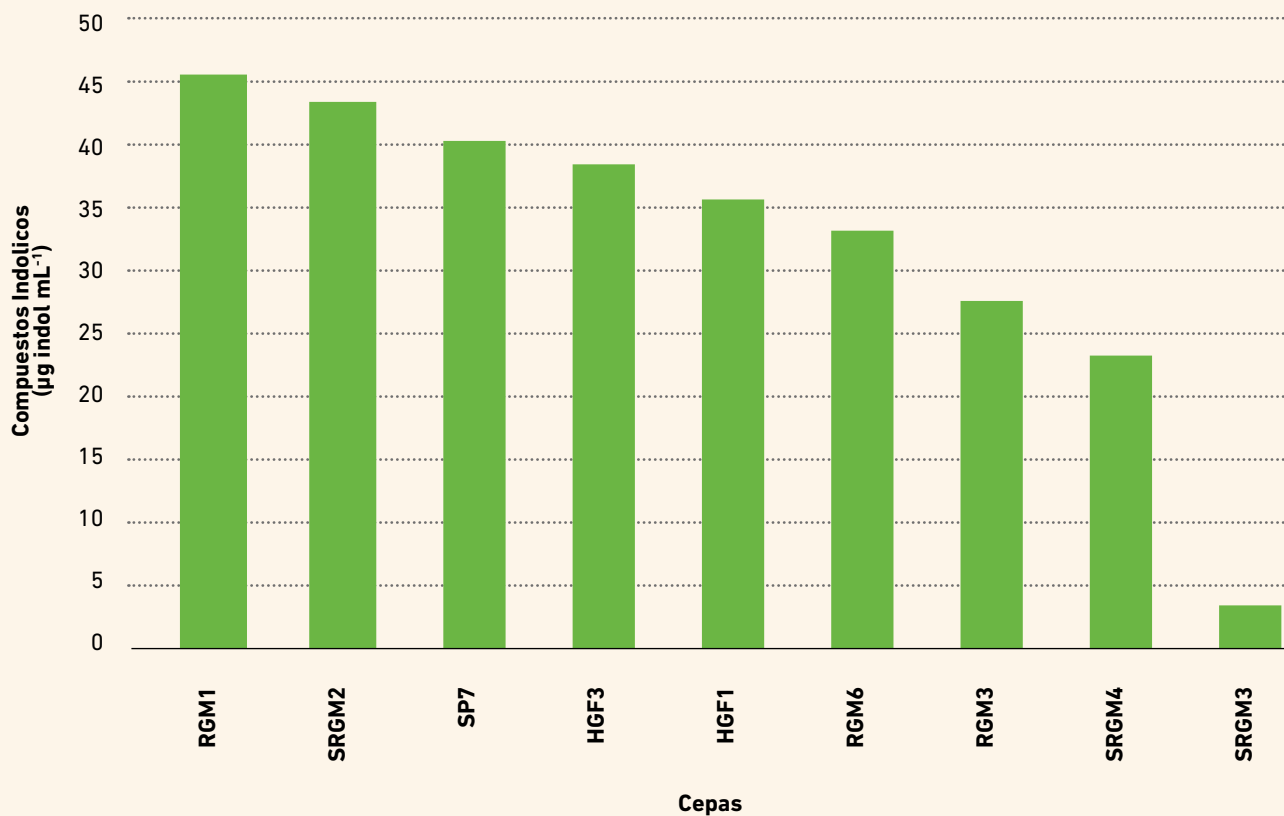
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) y la producción de compuestos indólicos (AIA), se seleccionaron 3 aislamientos identificados como *Azospirillum lipoferum* y 2 como *Azospirillum brasilense*. La cepa SRGM4 presentó la mayor actividad nitrogenasa, con 123,70 nmol de C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹ (Figura 11.3), en relación con la producción de compuestos indólicos. *A. brasilense*, cepa SRGM2, presentó uno de los valores más altos, con 43,27 µg de AIA mL⁻¹ (Cárdenas et al., 2010) (Figura 11.4). López-Reyes et al. (2017) reportaron la actividad de FBN de diferentes cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de *Zea mays*, que arrojaron entre 10 y 30 nmol de C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, valores que fueron muy inferiores a los reportados en esta investigación, y una producción de AIA de entre 4 y 35 µg mL⁻¹, valores que se encuentran próximos a los encontrados en este estudio. En un estudio llevado a cabo en *Oryza sativa*, Bharathiraja (2019) reportó valores que se encuentran entre 220,10 y 376,31 nmol de C₂H₄ mg de proteína⁻¹ h⁻¹ en 20 diferentes aislamientos de *Azospirillum* spp., estudio que se encuentra relacionado con la misma familia y presenta valores superiores a los obtenidos en este estudio. Adicionalmente, Cortés-Patiño et al. (2016) aislaron cepas de *Azospirillum brasilense* y *Herbaspirillum seropedicae* de raíces de *Cenchrus clandestinus* y reportaron 166 y 44 µmol de C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹, respectivamente, y valores de 67 y 37 µg mL de AIA⁻¹. Por su parte, la producción de AIA por la cepa SRGM4 fue de 23,15 µg mL de AIA⁻¹, valor similar al reportado por Reis Junior et al. (2004): entre 6,13 y 19,27 µg mL de AIA⁻¹ por cepas de *A. amazonense* aisladas de raíces de *Brachiaria* spp. en Brasil; Radwan et al. (2004), por su parte, reportaron que la principal hormona producida por *Azospirillum* es el ácido indol-3-acético.

■ **Figura 11.3.** Actividad de reducción de acetileno de las cepas aisladas de *Megathyrus maximus*.
Fuente: Elaboración propia



■ **Figura 11.4.** Producción de indoles de las cepas aisladas de *M. maximus*.
Fuente: Elaboración propia



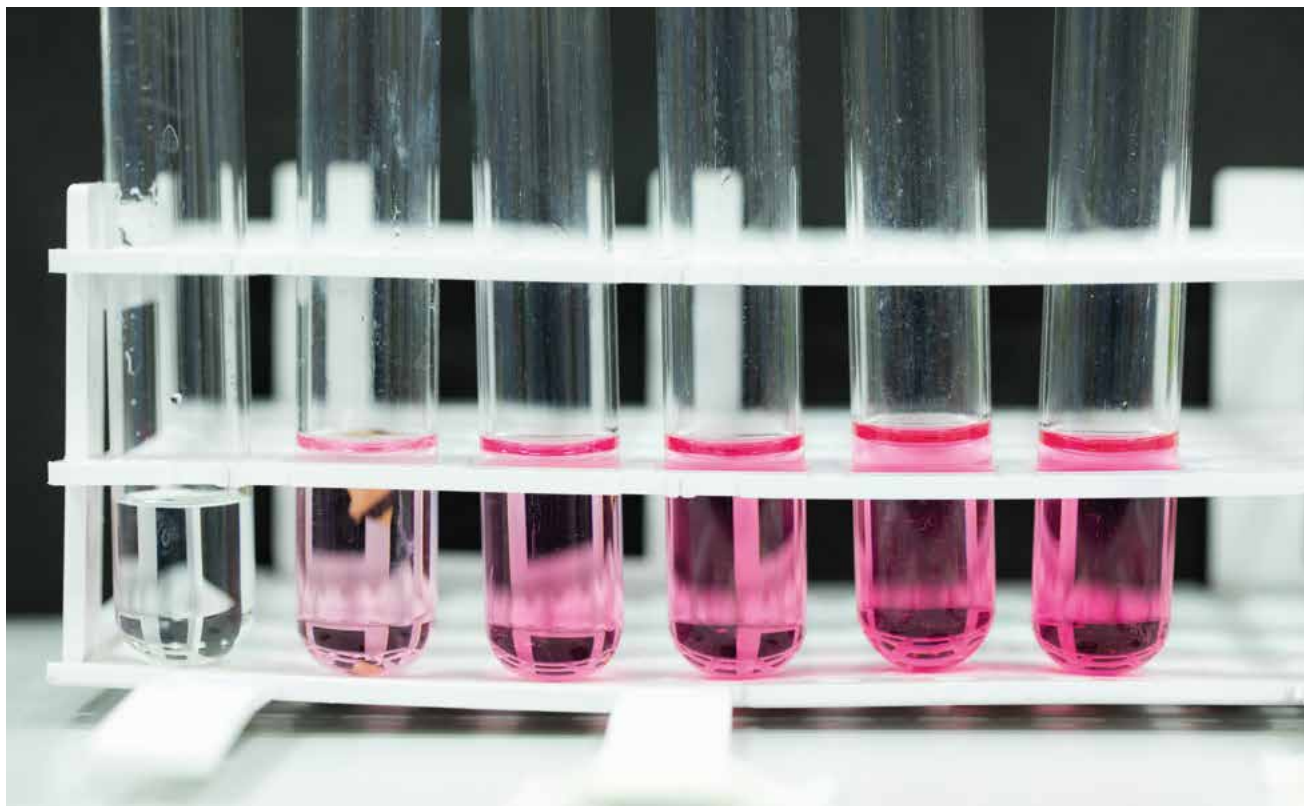


Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

Montaje en invernadero

Los resultados demuestran que la inoculación de las semillas de pasto guinea con las cepas seleccionadas incrementa los porcentajes de germinación. En la cepa SRGM3 (C16), el porcentaje reportado fue del 64,44 %, y la cepa SRGM2 (C14), en coinoculación con UV1, logró el mayor peso seco y el mayor porcentaje de proteína cruda, con valores de 1,62 g planta⁻¹ y 23,24 %, respectivamente, lo cual corrobora que las coinoculaciones son más eficientes (Cárdenas Caro et al., 2014).

Domingues Duarte et al. (2020) mencionan que uno de los principales mecanismos de acción por parte del género *Azospirillum* es la producción de reguladores del crecimiento, los cuales modifican la morfología de las raíces y maximizan el uso de los recursos del suelo, lo que a su vez aumenta la FBN y la reducción del nitrato disponible. Adicionalmente, Hungria et al. (2016) mencionan que las bacterias diazotróficas son las causantes principales de la FBN, proceso que implica la conversión de N₂ en otras sustancias nitrogenadas que luego son asimiladas por las plantas. En consonancia con estos reportes, Leite et al. (2019) reportaron un aumento

del 36 % en la producción de forraje en *M. maximus* con la inoculación con *Azospirillum brasilense*, y Hungria et al. (2016) reportaron un aumento del 22 % en la producción de *Brachiaria* sp. con la inoculación de *A. brasilense* y la adición de 40 kg de N ha⁻¹.

El-Komy (2005), al evaluar cepas de *Azospirillum lipoferum* solas o coinoculadas con una cepa fosfato-solubilizadora de *Bacillus megaterium*, obtuvo diferencias significativas en los tratamientos coinoculados con respecto a las plantas no inoculadas en las variables altura (cm), peso seco foliar (g materia⁻¹), fósforo foliar (mg g⁻¹) y rendimiento de nitrógeno total (mg materia⁻¹), al igual que valores superiores de hasta el 38,72 % en aumento de proteína cruda en el tratamiento coinoculado con *A. lipoferum* + *B. megaterium*, con respecto al tratamiento químico.

Los resultados obtenidos muestran que, en condiciones de invernadero, la inoculación de cepas nativas de *Azospirillum* (SRGM2) más una cepa fosfato-solubilizadora (UV1) mejora la producción de pasto guinea en términos de calidad y cantidad de proteína cruda y materia seca en comparación con las plantas del tratamiento con fertilización química.

Aislamiento y caracterización de bacterias fijadoras de nitrógeno asimbióticas asociadas a *Eucalyptus* sp. en el municipio de Agustín Codazzi (Cesar)

Introducción

El eucalipto (*Eucalyptus* sp.) es una especie arbórea que alcanza alturas de hasta 60 metros y está adaptada a diferentes tipos de climas, con una gran resistencia a la sequía. Su rápido crecimiento y su capacidad de regeneración hacen que sea muy valiosa para la industria maderera, y también se emplea en las industrias farmacéutica y de limpieza por el aceite que producen algunas de sus especies (Bioenciclopedia, s. f.).

Santos et al. (2016) reportan que distancias de siembra de 22 m en *Eucalyptus* sp. son ideales para no afectar la productividad de las pasturas en un SSP en el área del Cerrado brasileño, lo que hace que esta especie sea propicia para estos SSP. Con base en esta información, se aislaron y caracterizaron bacterias fijadoras de nitrógeno asimbióticas asociadas a suelo rizosférico, raíces y hojas de eucalipto (Figura 11.5), con el propósito de seleccionar cepas diazotróficas promisorias que contribuyeran con el crecimiento, desarrollo y establecimiento de esta especie forestal en condiciones de vivero.

■ **Figura 11.5.** Eucalipto establecido en el SSP en Agustín Codazzi (Cesar).

Foto: Grupo de investigación Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Desarrollo de la investigación y resultados

De un total de 116 bacterias aisladas de suelo, raíz y hojas de eucalipto en dos épocas climáticas (lluvia y sequía), fueron seleccionadas 44 cepas por presentar características morfológicas propias de los géneros *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum* sp., *Burkholderia* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Beijerinckia* sp. y *Derxia* sp.; estas cepas que fueron seleccionadas con la colaboración de la Dra. Vera Lucia Baldani, de la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), de Brasil.

Resultados relevantes

El análisis estadístico realizado no mostró diferencias significativas en la variable de población microbiana, evaluada en los diferentes estratos de la planta mediante la metodología del número más probable, a excepción de los géneros *Herbaspirillum* sp., que presentó una mayor población en la muestra de raíces, y *Azospirillum* sp., que presentó una mayor población en las muestras de raíces y suelo rizosférico. Sin embargo, Miguel et al. (2016) encontraron que la diversidad microbiana

cambia dependiendo del estado de desarrollo de las hojas muestreadas, y reportaron por primera vez las especies *Novosphingobium barchaimii*, *Rhizobium grahamii*, *Stenotrophomonas panacihumi*, *Paenibacillus terrigena*, *Paenibacillus darwinianus* y *Terrabacter lapilli* como endófitas, mientras que Da Silva et al. (2014) reportaron en su estudio que la estación climática influenció las comunidades microbianas del suelo en plantaciones de *Eucalyptus* sp. en Brasil y que los géneros más predominantes fueron *Bradyrhizobium* y *Burkholderia*.

En relación con la actividad de reducción de acetileno, la cepa 27 (*Flavobacterium anhuiense*) presentó el valor promedio más alto (85 nmol de C_2H_4 h^{-1} mL^{-1}), seguida por las cepas: 45 (cepa no identificada, 76 nmol de C_2H_4 h^{-1} mL^{-1}) y 25 (*Azotobacter* sp., 74 nmol de C_2H_4 h^{-1} mL^{-1}) (Figura 11.6). Padda et al. (2018) reportaron diferentes cepas diazotróficas aisladas de pino en Canadá con valores de FBN que varían entre 0,2 y 2,8 nmol de C_2H_4 h^{-1} mL^{-1} , entre las cuales se encuentra una cepa de *Flavobacterium aquidurensense*, siendo valores muy inferiores a los reportados en este trabajo. Asimismo, Romero-Perdomo et al. (2017) reportaron valores que varían entre 45,32 y 68,01 nmol de C_2H_4 h^{-1} mL^{-1} en cepas del género *Azotobacter*, valores cercanos a los reportados en el presente estudio.

■ **Figura 11.6.** Actividad de reducción de acetileno a etileno en diferentes aislamientos bacterianos de *Eucalyptus* sp.

Fuente: Elaboración propia

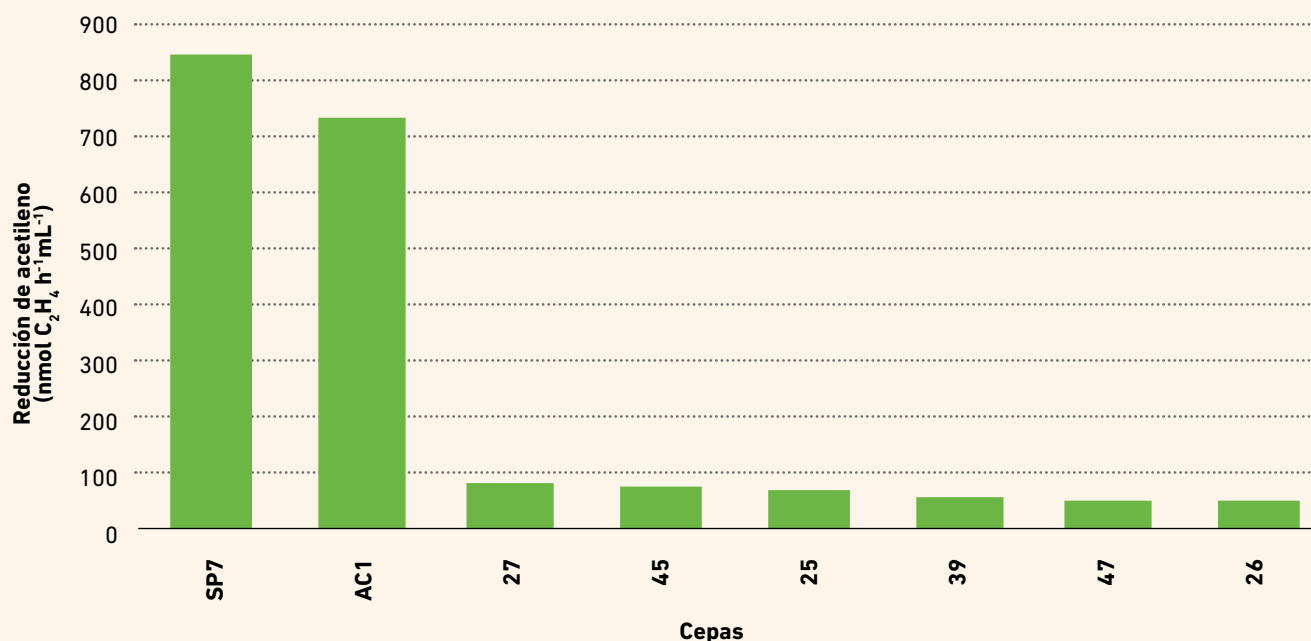




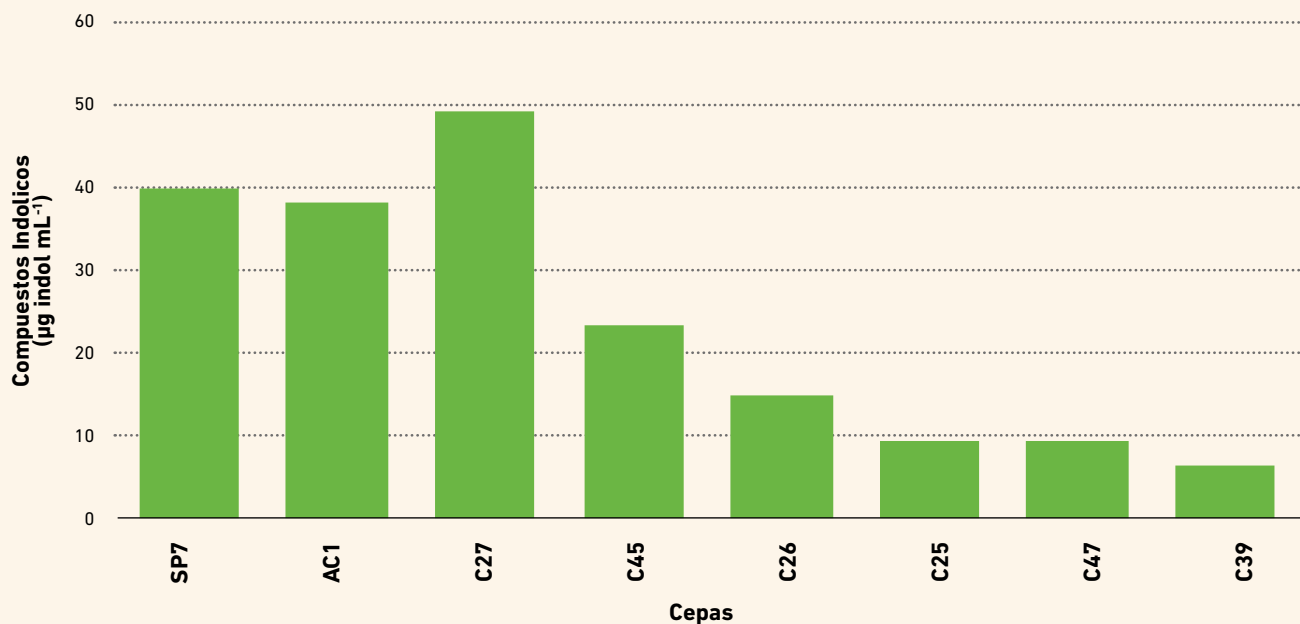
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

La característica de producir hormonas se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de diferentes géneros de bacterias, como *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum* y *Rhizobium*, entre otros, los cuales producen diversas fitohormonas como el AIA, giberelinas y citoquininas en medios libres de nitrógeno. En la prueba de producción de compuestos indólicos

(AIA) (Figura 11.7), la cepa C27 produjo $49,57 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguida por las cepas 45 y 26, con valores de $23,25$ y $14,93 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Reportes realizados por Đorđević et al. (2017) muestran que el aislamiento de *A. chroococcum* produjo $7,55 \mu\text{g mL}^{-1}$, y Romero-Perdomo et al. (2019) reportaron valores de $53,89 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA⁻¹ producido por *Beijerinckia* sp.

■ **Figura 11.7.** Producción de compuestos indólicos en diferentes bacterias aisladas del cultivo de *Eucalyptus* sp.

Fuente: Elaboración propia



Los resultados anteriormente citados evidencian que las cepas 27, 45 y 25 son candidatas para ser empleadas como

principios activos en la producción de biofertilizantes por su eficiencia en las pruebas *in vitro* realizadas.

Selección de cepas nativas de bacterias diazotróficas simbióticas asociadas a *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit en el Valle del Cesar y La Guajira

Introducción

Leucaena leucocephala, especie de la familia Fabaceae, subfamilia *Caesalpinioideae*, es una planta caducifolia que alcanza de 3 a 6 metros de altura y es empleada para una variedad de propósitos, como fuente de madera, alimento en forma de forraje para el ganado, abono orgánico y leña (Figura 11.8). Adicionalmente, es una

especie que forma asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico del género *Rhizobium*, con una tasa de fijación anual de N_2 de 249,31 kg ha⁻¹ en condiciones de campo (Bueno López & Camargo Garcia, 2015). Según Mahecha (2002), esta especie es ampliamente estudiada en Colombia por su alto valor nutritivo y sus servicios multipropósito en SSP.

- **Figura 11.8.** Establecimiento de *Leucaena leucocephala* en el SSP en Agustín Codazzi (Cesar).
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles





Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

Desarrollo de la investigación y resultados

En total, 52 aislamientos bacterianos fueron obtenidos a partir de nódulos presentes en las raíces de *L. leucocephala*, de los cuales se seleccionaron 12 por sus características fenotípicas correspondientes a los rizobios: 5 del Valle del Cesar (RC01, RC02, RC03, RC04 y RC05) y 7 de La Guajira (RG01, RG02, RG03, RG04, RG05, RG06 y RG07).

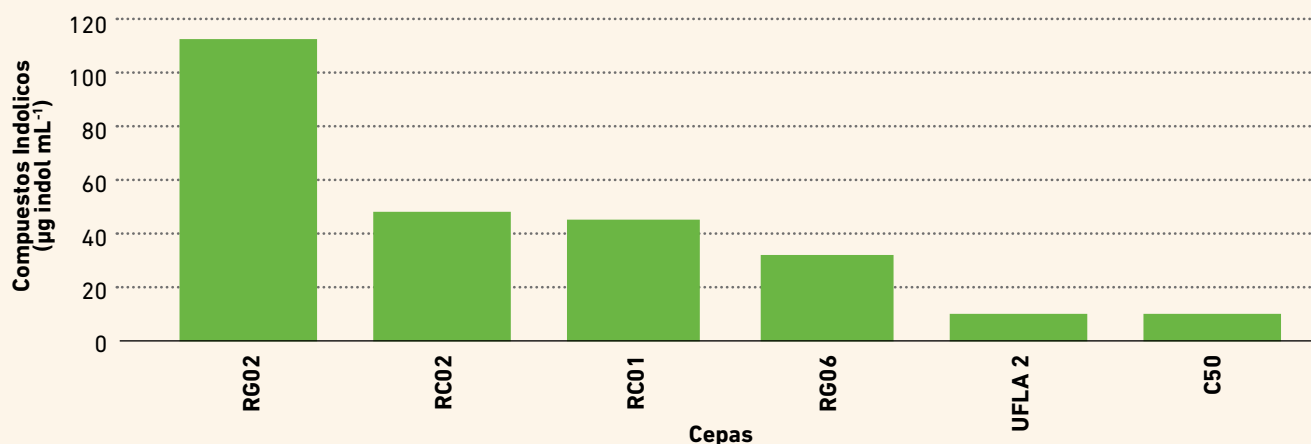
Resultados relevantes

Los aislamientos seleccionados fueron microscópicamente bacilos cortos, delgados y Gram-negativos, y macroscópicamente fueron de crecimiento rápido, con un diámetro de colonia que osciló entre 0,6 y 6,0 mm, descripción que concuerda con los datos reportados por Bécquer (2004). Las pruebas bioquímicas arrojaron resultados interesantes de asimilación de un amplio rango de mono y disacáridos (D-glucosa, D-manosa, D-manitol, L-arabinosa, D-maltosa y N-acetilglucosamina) por parte de los aislamientos RC04, RG01, RG02, RG03, RG04, RG05 y RG06, y también se evidenció que las cepas RC04, RG02 y RG06 emplearon el nitrato como fuente de nitrógeno.

Las evaluaciones de producción de compuestos indólicos mostraron que varios de los aislamientos tuvieron esta capacidad, en especial las cepas RG02 y RC02, que produjeron 112,59 y 47,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 11.9), valores mayores a los reportados por Tzec-Gamboa et al. (2020), quienes encontraron valores entre 14 y 27 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en cepas de *Sinorhizobium* aisladas de *L. leucocephala* y que son similares a los reportados por Küçük y Cevheri (2016), quienes encontraron una producción de AIA de entre 15 y 165 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por cepas de *Rhizobium* sp. aisladas de *Pisum sativum*.

■ **Figura 11.9.** Producción de compuestos indólicos en las cepas aisladas de *L. leucocephala* en los departamentos del Cesar y La Guajira.

Fuente: Elaboración propia

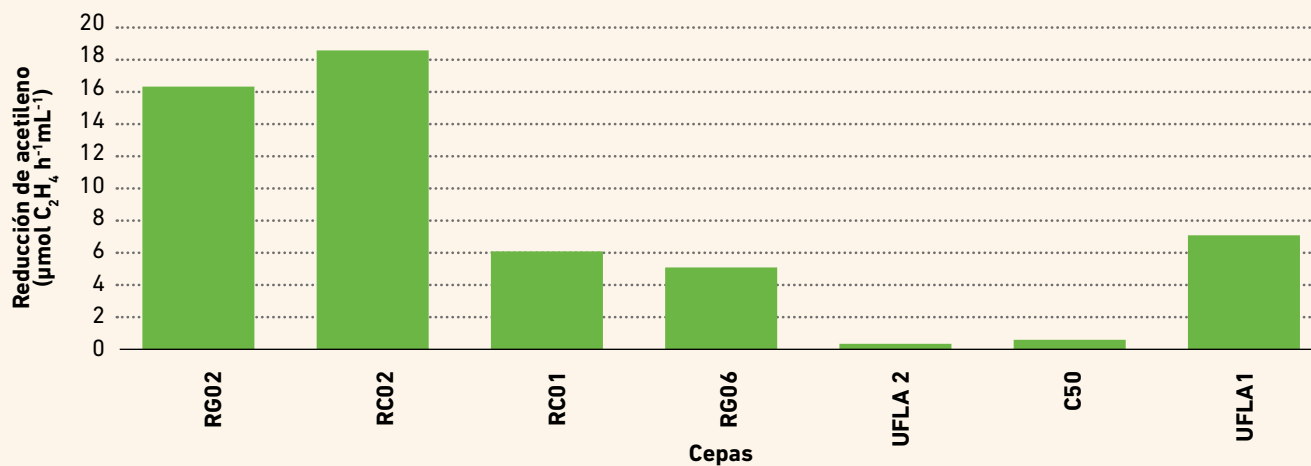


Adicionalmente, se realizaron pruebas de nodulación en plantas de *Leucaena* para determinar su capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, a través de la metodología de reducción de acetileno. Las cepas que sobresalieron en esta actividad fueron, nuevamente, RC02 y RG02, con valores de 18,56 y 16,25 µmol de C₂H₄ nódulo⁻¹ h⁻¹ mL⁻¹ (Figura 11.10), valores superiores a

los reportados por Kaushal y Kaushal (2015), quienes reportaron valores entre 402,91 y 437,26 nmol de C₂H₄ nódulo⁻¹ h⁻¹ mL⁻¹ en cepas aisladas de *Brassica oleracea*, y a los de Ayala (2005), quien reportó valores de 12,83 y 13,84 µmol de C₂H₄ nódulo⁻¹ h⁻¹ mL⁻¹ en cepas aisladas de *Arachis hipogea* y *Centrosema pubescens*, respectivamente.

■ **Figura 11.10.** Actividad de reducción de acetileno en las cepas aisladas de *L. leucocephala* en los departamentos del Cesar y La Guajira.

Fuente: Elaboración propia



Los aislamientos promisorios RC02 y RG02 fueron identificados molecularmente como *Rhizobium* sp. y *Burkholderia* sp. mediante secuenciación del gen 16S rADN, y el aislamiento RG02 se convirtió en el primer reporte para Colombia de *Burkholderia* sp. como fijador de nitrógeno atmosférico.

Los resultados muestran que *L. leucocephala* es una planta que puede ser nodulada por diferentes tipos de simbioses, que consiguen ser excelentes promotores del crecimiento vegetal, como los aislados en el presente estudio (*Rhizobium* sp. y *Burkholderia* sp.), además de que cuentan con diferentes características bioquímicas que ayudan a su supervivencia y desarrollo.

Uso de biofertilizantes como facilitadores biológicos en sistemas silvopastoriles en el Caribe seco colombiano

Los resultados anteriores muestran el potencial de las cepas aisladas de los diferentes componentes del sistema silvopastoril en el trópico bajo, por lo que se decidió probar los diferentes aislamientos en la implementación de un sistema silvopastoril en Agustín Codazzi.

Introducción

El proyecto titulado “Producción de un fertilizante biológico mixto con base en bacterias fijadoras de nitrógeno para ssp de la región Caribe colombiana” tuvo como objetivo la implementación y evaluación de un arreglo silvopastoril (Figura 11.11) como alternativa al uso convencional del monocultivo para la alimentación del ganado, además de la evaluación de la aplicación de un inoculante microbiano como facilitador biológico. Un elemento importante en el trabajo fue dilucidar el potencial del uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal como una alternativa para mejorar la producción y sostenibilidad de esta opción productiva.

- **Figura 11.11.** Arreglo silvopastoril. *a.* Plantas de pasto guinea asociadas a *L. leucocephala*; *b.* Plantas de pasto guinea asociadas a *Eucalyptus tereticornis*.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Metodología

La implementación del ssp se realizó en el Centro de Investigación Motilonia de AGROSAVIA, ubicado en el municipio de Agustín Codazzi, Cesar, Colombia. El sistema estuvo conformado por tres especies vegetales: una especie arbórea (*E. tereticornis*), una especie leguminosa (*L. leucocephala*) y una gramínea (*M. maximus* [Jacq.] B. K. Simon & S. W. L. Jacobs). Cuatro tratamientos fueron implementados: 1) testigo absoluto, constituido por un monocultivo de kikuyina (*Bothriochloa pertusa* [L.] A. Camus), el cual es el sistema modal de la región; 2) testigo de pasto guinea (*M. maximus*), consistente en monocultivo de guinea, que fue implementado para determinar las diferencias debido a



Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

la introducción de las especies arbórea y leguminosa; 3) ssp no inoculado, conformado por las tres especies vegetales y sin la adición de los inoculantes biológicos, y 4) SSP inoculado, conformado por las tres especies vegetales inoculadas. Las plantas de *Leucaena* fueron inoculadas con bacterias del género *Rhizobium*; el pasto guinea, con *Azospirillum brasilense* y *Azotobacter chroococcum*, y el eucalipto, con *A. chroococcum*.

La especie forestal fue establecida en doble fila a una distancia de 4 m × 4 m; a 8 m de la doble fila de eucalipto se sembró *Leucaena* en tres filas a una distancia de 1 m × 1 m, y en los espacios libres entre las dobles filas de eucalipto y las de *Leucaena* se estableció pasto guinea. La densidad de siembra empleada fue de 6 kg de semilla ha⁻¹. Las variables evaluadas fueron medidas tres veces con intervalos de un mes y medio.

Resultados relevantes

La producción de forraje disminuyó a través del tiempo. Sin importar el tipo de sistema de producción evaluado, la disminución en la oferta de forraje fue significativa a través de los ciclos de evaluación ($p < 0,05$). Tomando como parámetro la producción de materia seca (MS), se observó que en el SSP inoculado, en el SSP no inoculado y en los monocultivos de *B. pertusa* y *M. maximus* hubo disminución en la producción durante el segundo y tercer ciclo, respectivamente. Los resultados demuestran que, a medida que la época de sequía se amplía, la producción de forraje disminuye (tabla 11.1).

Portela Pérez y Brito Martínez (2018) registraron reducción en los rendimientos de MS con *B. pertusa* entre septiembre (1.230,0 kg de MS ha⁻¹) y febrero (428,4 kg de MS ha⁻¹), con una caída, en el periodo poco lluvioso, de entre el 30 % y el 50 % en su producción de forraje; entre tanto, en *M. maximus*, a diferencia de otras gramíneas cultivadas en la región Caribe de Colombia, se exhibió un crecimiento vegetativo intenso con incremento de su calidad nutricional en el periodo lluvioso, y provisto de una tolerancia moderada a la baja humedad en periodos poco lluviosos (Torregroza et al., 2015).

■ **Tabla 11.1.** Rendimiento de materia seca por hectárea en tres ciclos de evaluación

Nota: Las letras indican subgrupos homogéneos obtenidos con la prueba HSD de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

| | |
|---|---|
| <p>1 Monocultivo de <i>B. pertusa</i> Ciclo 1:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Promedio (kg de ms ha⁻¹): 1089,4 d <p>Ciclo 2:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Promedio (kg de ms ha⁻¹): 892,0 c <p>Ciclo 3:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Promedio (kg de ms ha⁻¹): 449,3 c | <p>3 SSP no inoculado Ciclo 1:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Promedio (kg de ms ha⁻¹): 2.319,8 b <p>Ciclo 2:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Promedio (kg de ms ha⁻¹): 1.801,5 a <p>Ciclo 3:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Promedio (kg de ms ha⁻¹): 1.327,5 a |
| <p>2 Monocultivo de <i>M. maximus</i> Ciclo 1:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Promedio (kg de ms ha⁻¹): 1.688,0 c <p>Ciclo 2:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Promedio (kg de ms ha⁻¹): 1.627,5 b <p>Ciclo 3:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Promedio (kg de ms ha⁻¹): 827,9 b | <p>4 SSP inoculado Ciclo 1:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Promedio (kg de ms ha⁻¹): 4.068,7 a <p>Ciclo 2:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Promedio (kg de ms ha⁻¹): 1.880,7 a <p>Ciclo 3:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Promedio (kg de ms ha⁻¹): 1.430,1 a |

Los SSP generaron una mayor oferta de forraje que los monocultivos. Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que el uso del SSP incrementa el rendimiento de MS en comparación con los monocultivos. Durante el primer ciclo se observaron aumentos del 37% y el 112% en la producción de MS, correspondientes al SSP no inoculado y al SSP inoculado, respectivamente. En el segundo ciclo, la producción de forraje de MS se incrementó en el SSP con respecto a los monocultivos de *M. maximus* y *B. pertusa*, y en el tercer ciclo se observó la misma tendencia (tabla 11.1).

Sanches Santos et al. (2019) consideran que, cuando las pasturas en los monocultivos están en proceso de degradación, proveen insuficientes nutrientes para alimentar a los animales; en estas circunstancias, se desmantelan nuevas áreas, lo que causa un aumento de la deforestación y daños ambientales. La introducción de los árboles en las pasturas y el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) surge como una estrategia viable que deriva en el incremento de la producción de forraje, en más calidad nutricional de la dieta, en una mayor carga animal por hectárea y en la obtención de ganancias superiores de peso en los bovinos respecto a los valores que se alcanzan en otros sistemas forrajeros tropicales (Rivera-Herrera et al., 2017).

Así, una de las alternativas para mejorar la capacidad de resiliencia en los sistemas ganaderos en épocas críticas es la implementación de SSP, que se consideran una de las soluciones más innovadoras para dar respuesta al reto ganadero de producción sustentable (Murgueitio et al., 2019).



Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

La inoculación con PGPB aumentó la producción del SSP: en el primer ciclo, la respuesta en términos de MS incrementó en comparación con el sistema no inoculado ($p < 0,05$), ya que su rendimiento aumentó en un 30%. En los siguientes ciclos, en los que no se realizó reinoculación, no se presentó un aumento significativo en la producción de forraje, lo que indicaría que los periodos de extrema sequía

tuvieron efecto sobre la abundancia o efectividad de las especies microbianas empleadas (tabla 11.2).

Estudios realizados por Pérez-Cordero et al. (2018) señalaron la presencia de bacterias endófitas asociadas al pasto colosoana, las cuales muestran un potencial importante para la nutrición vegetal, ya que promueven el crecimiento de las plantas.

■ **Tabla 11.2.** Producción de forraje de los componentes del sistema silvopastoril

Nota: Las letras indican subgrupos homogéneos obtenidos con la prueba hsd de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

1

L. leucocephala no inoculada

Ciclo 1:

- Promedio (kg de ms ha⁻¹): 711,3 b

Ciclo 2:

- Promedio (kg de ms ha⁻¹): 153,4 b

Ciclo 3:

- Promedio (kg de ms ha⁻¹): 140,1 b

3

M. maximus no inoculado

Ciclo 1:

- Promedio (kg de ms ha⁻¹): 1.598,7 b

Ciclo 2:

- Promedio (kg de ms ha⁻¹): 1.604,1 a

Ciclo 3:

- Promedio (kg de ms ha⁻¹): 1.177,5 a

2

L. leucocephala inoculada

Ciclo 1:

- Promedio (kg de ms ha⁻¹): 879,8 a

Ciclo 2:

- Promedio (kg de ms ha⁻¹): 329,9 a

Ciclo 3:

- Promedio (kg de ms ha⁻¹): 176,8 a

4

M. maximus inoculado

Ciclo 1:

- Promedio (kg de ms ha⁻¹): 2.884,5 a

Ciclo 2:

- Promedio (kg de ms ha⁻¹): 1.655,5 a

Ciclo 3:

- Promedio (kg de ms ha⁻¹): 1.201,8 a

La simbiosis rizobios-leguminosas es una fuente importante de fijación de nitrógeno (amonio) en la biósfera, por lo que el potencial de este proceso para aumentar el rendimiento agrícola ha generado interés en comprender y manipular de manera exitosa estos desarrollos (DiCenzo et al., 2018).

El efecto de los biofertilizantes fue constante a través del tiempo en *L. leucocephala*, pero no en *M. maximus*. Los fertilizantes biológicos a base de bacterias promotoras son destinados a promover el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos relacionados con el

aumento en la disponibilidad de nutrientes, la síntesis de moléculas bioactivas y la protección de la planta ante estreses de tipo biótico y abiótico. Estas bacterias suelen clasificarse de acuerdo con su grado de asociación con la planta. Las bacterias con las cuales se inocularon las plantas de *L. leucocephala* pertenecen al grupo de los rizobios, los cuales tienen la capacidad de formar una estructura especializada, denominada *nódulo*, con leguminosas (Figura 11.12), y por lo tanto son endófitos. Las bacterias diazotróficas empleadas sobre pasto guinea fueron endófitas no simbióticas, en el caso de *Azospirillum*, y de vida libre, en el caso de *Azotobacter*.

■ **Figura 11.12.** Nódulos en plantas de *L. leucocephala*.

Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Los datos de producción de forraje evidenciaron que el efecto de promoción de crecimiento se mantuvo sobre las plantas de *L. leucocephala* (tabla 11.2). Durante los tres ciclos de evaluación existieron diferencias significativas entre el tratamiento no inoculado y el inoculado ($p < 0,05$), lo que sugiere que las condiciones climáticas influyeron sobre la actividad de las bacterias simbióticas. En contraste, el efecto de los microorganismos sobre las plantas de *M. maximus* solo fue visible en la primera fase del cultivo, lo que sugiere que la actividad microbiana

se vio afectada por las condiciones edafoclimáticas asociadas al SSP. Después del segundo ciclo no existieron diferencias entre las plantas de guinea inoculadas y las no inoculadas ($p > 0,05$) (tabla 11.2), lo que indica que el aislamiento de bacterias xerófilas podría tener un efecto importante bajo las condiciones de sequía imperantes en esta región durante este periodo del año; de igual manera, este resultado abre la posibilidad de evaluar si el uso de la reinoculación podría generar un efecto positivo sobre el cultivo a través del tiempo sobre este tipo de plantas.

Terra et al. (2019) consideran que las leguminosas forrajeras han ganado importancia como alternativa sostenible para la alimentación animal por su capacidad de establecer relaciones simbióticas y asociativas con bacterias fijadoras de nitrógeno y promotoras del crecimiento vegetal, las cuales consiguen suplir total o parcialmente el nitrógeno utilizado por los cultivos. Así, se pueden aplicar microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre o asociados en simbiosis con las leguminosas, para que ejerzan un papel importante en el crecimiento de estas (Alcaraz, 2016).

La inoculación presentó un efecto positivo sobre el crecimiento de *E. tereticornis*. Los valores obtenidos en las variables de incremento en altura, diámetro basal y diámetro a la altura del pecho (DAP) (1,3 m) de *E. tereticornis* fueron mayores en el tratamiento inoculado que en el no inoculado, en los ocho meses evaluados, lo cual indica un efecto positivo del biofertilizante sobre el

crecimiento de los árboles (tabla 11.3). Los incrementos en altura de la planta, diámetro basal y DAP de *E. tereticornis* fueron, en su orden, del 41,2%, el 44,2% y el 46,7% en relación con el tratamiento no inoculado.

En investigaciones del efecto de los biofertilizantes sobre el crecimiento y la producción de *Eucalyptus grandis*, la mayor dosis aplicada demostró un significativo efecto sobre el más alto desarrollo de las plantas en vivero, una estimulación importante de las raíces y el mayor aumento en número de hojas; por lo tanto, esta se considera una alternativa sostenible para el manejo del suelo en el sector forestal (González-Díaz et al., 2019).

Además, según Laclau et al. (2018), se presentan ventajas competitivas de *Eucalyptus* sobre otras especies arbóreas en términos de productividad, tolerancia al estrés biótico y abiótico, calidad de la madera para una amplia variedad de usos y habilidad en el manejo de campo.

■ **Tabla 11.3.** Altura, diámetro basal y diámetro a la altura del pecho (DAP) de *Eucalyptus tereticornis* inoculado y no inoculado

Fuente: Elaboración propia

| 1 Altura (cm) | 2 Diámetro basal (cm) | 3 DAP (cm) |
|---|---|---|
| Respuesta: <ul style="list-style-type: none"> • Inoculado: 3,29 • No inoculado: 2,33 • Diferencia: +0,96 | Respuesta: <ul style="list-style-type: none"> • Inoculado: 6,20 • No inoculado: 4,30 • Diferencia: +1,90 | Respuesta: <ul style="list-style-type: none"> • Inoculado: 4,40 • No inoculado: 3,00 • Diferencia: +1,40 |

La aplicación del biofertilizante sobre el arreglo silvopastoril tuvo un efecto positivo sobre los diferentes componentes, expresado en el mayor incremento en la altura, el diámetro en la base del tallo y el DAP de los árboles de *E. tereticornis* en el arreglo silvopastoril inoculado, en comparación con el arreglo silvopastoril no inoculado. La producción de MS de *L. leucocephala* inoculada superó en los tres ciclos evaluados a la no inoculada entre un 26,1% y un 87,0%, y la producción de MS de la gramínea guinea fue mayor en el arreglo silvopastoril inoculado (96,2%) que en el no inoculado.

Los resultados revelaron que existe una amplia diversidad de microorganismos con potencial para promover el crecimiento de las plantas, los cuales están asociados a la rizósfera de las especies vegetales que componen el sistema: *Leucaena* (*L. leucocephala*), pasto guinea (*M. maximus*) y eucalipto (*E. tereticornis*). Se observó que el uso de SSP representa una alternativa eficiente frente a los monocultivos tradicionales, puesto que la oferta de forraje se incrementa en comparación, por ejemplo, con los monocultivos de kikuyina (*B. pertusa*) y pasto guinea (*M. maximus*).

Referencias

- Alcaraz, M. L. (2016). *Liberación/mineralización de nitrógeno y fósforo en hojarasca de Eucalyptus grandis y leguminosas herbáceas en distintos suelos: relación con la calidad física y química del residuo, y efecto sobre el crecimiento de plantas jóvenes de eucalipto* [tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata]. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/51559/Documento_completo_.pdf?sequence=5&isAllowed=y
- Andriulo, A. E., & Irizar, A. B. (2017). La materia orgánica como indicador base de calidad del suelo. En M. G. Wilson (ed.), *Manual de indicadores de calidad del suelo para las ecorregiones de Argentina* (1.ª ed., pp. 65-69). INTA. https://inta.gob.ar/sites/default/files/manual_ics_final.pdf
- Ayala, L. (2005). Estudio de algunos aspectos de la fijación biológica de nitrógeno por el maní (*Arachis hypogaea*): evaluación bioquímica de la fijación y factores relacionados en la asociación maní-*Rhizobium* sp. *Agronomía Tropical*, 27(4), 427-449.
- Bécquer, C. J. (2004). Descripción y clasificación de rizobios: enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. *Biología*, 18(1), 9-29.
- Bharathiraja, S. (2019). Selection of efficient *Azospirillum* isolates from rhizosphere and root samples of paddy using acetylene reduction assay (ARA). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(2s), 128-130.
- Bioenciclopedia. (s. f.). Eucalipto. <https://www.bioenciclopedia.com/eucalipto/>
- Bueno López, L., & Camargo Garcia, J. C. (2015). Nitrógeno edáfico y nodulación de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit en sistemas silvopastoriles. *Acta Agronómica*, 64(4), 349-354. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n4.45362>
- Cárdenas, D. M., Garrido, M. F., Bonilla, R. R., & Baldani, V. L. (2010). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes*, 33(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942010000300005
- Cárdenas Caro, D. M., Garrido Rubiano, M. F., Roncallo Fandiño, B. A., & Bonilla Buitrago, R. R. (2014). Inoculación con *Azospirillum* spp y *Enterobacter agglomerans* en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) en el departamento de Cesar (Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 67(2), 7.271-7.280. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v67n2.44168>
- Chauveau, M., Gastó, J., López, I., Clunes, J., & Dörner, J. (2015). Efecto del cambio de manejo de una pradera degradada sobre la resiliencia física de un suelo en la precordillera andina de la Araucanía. *Agro Sur*, 43(2), 19-28. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2015.v43n2-04>
- Comisión Económica para América Latina y el Caribe (Cepal), Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), & Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (2017). *Perspectivas de la agricultura y del desarrollo rural en las Américas: una mirada hacia América Latina y el Caribe 2017-2018*. https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/42281/1/PerspAgricultura2017-2018_es.pdf
- Cortés-Patiño, S., Avellaneda, L., Moreno-Galvan, A., & Bonilla, R. (2016). Bacterias diazotróficas con potencial para promover el crecimiento de las pasturas en condiciones de salinidad [ponencia en congreso]. XVIII Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo, Villa de Leyva, Boyacá, Colombia.
- Da Silva, M. de C. S., Paula, T. de A., Moreira, B. C., Carolino, M., Cruz, C., Bazzolli, D. M. S., Silva, C. C., & Kasuya, M. C. M. (2014). Nitrogen-fixing bacteria in *Eucalyptus globulus* plantations. *PLoS ONE*, 9(10), artículo e111313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111313>
- DiCenzo, G. C., Zamani, M., Checcucci, A., Fondi, M., Griffiths, J. S., Finan, T. M., & Mengoni, A. (2018). Multidisciplinary approaches for studying rhizobium-legume symbioses. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 1-33. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0377>
- Domingues Duarte, C. F., Cecato, U., Biserra, T. T., Mamédio, D., & Galbeiro, S. (2020). *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarías*, 11(1), 223-240. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>
- Dorđević, S., Stanojević, D., Vidović, M., Mandić, V., & Trajković, I. (2017). The use of bacterial indol-3-acetic acid (IAA) for reduce of chemical fertilizers doses. *Hemijska Industrija*, 71(3), 195-200. <https://doi.org/10.2298/hemind160317029d>
- El-Komy, H. M. A. (2005). Coimmobilization of *Azospirillum lipoferum* and *Bacillus megaterium* for successful phosphorus and nitrogen nutrition of wheat plants. *Food Technology and Biotechnology*, 43(1), 19-27. [https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak_jezik=162597](https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=162597)
- Fedegán. (2018). Fichas de caracterización departamental. <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/documentos-de-estadistica>
- González-Díaz, A., Ojeda-Morales, M. E., Hernández-Rivera, M. A., Córdova-Bautista, Y., Díaz-Flores, L. L., López-Lázaro, J. de los S., & Álvarez-Ramírez, J. G. (2019). Effect of biofertilizers application on the growth of *Eucalyptus grandis* seedlings under greenhouse conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 42(19), 2.560-2.576. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1655040>
- Hungria, M., Nogueira, M. A., & Araujo, R. S. (2016). Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 221, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>
- Ideam. (2019). *Estudio nacional de la degradación de suelos por salinización en Colombia*.

- Ideam, & UDCA. (2015). *Síntesis. Estudio nacional de la degradación de suelos por erosión en Colombia*. <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/023646/Sintesis.pdf>
- Iglesias, J. M., García, L., & Toral, O. C. (2015). Comportamiento productivo de diferentes genotipos bovinos en una finca comercial. Ceba final. *Pastos y Forrajes*, 38(2), 185-193. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942015000200006
- Jónsson, J. Ö. G., & Davíðsdóttir, B. (2016). Classification and valuation of soil ecosystem services. *Agricultural Systems*, 145, 24-38. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2016.02.010>
- Kaushal, M., & Kaushal, R. (2015). Acetylene reductase activity and molecular characterization of plant growth promoting rhizobacteria to know efficacy in integrated nutrient management system. *Indian Journal of Biotechnology*, 14, 221-227. http://oar.icrisat.org/9122/1/1JB_14_221-227_2015.pdf
- Küçük, C., & Cevheri, C. (2016). Indole acetic acid production by *Rhizobium* sp. isolated from pea (*Pisum sativum* L. ssp. *arvense*). *Turkish Journal of Life Sciences*, 1.
- Laclau, J. P., Mignard, E. J., Bouvet, J. M., & Mareschal, L. (eds.). (2018). *Eucalyptus 2018: Managing Eucalyptus plantation under global changes. Abstracts book*. Cirad.
- Leite, R. da C., dos Santos, A. C., dos Santos, J. G. D., Leite, R. da C., de Oliveira, L. B. T., & Hungria, M. (2019). Mitigation of Mombasa grass (*Megathyrus maximus*) dependence on nitrogen fertilization as a function of inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 43, artículo e0180234. <https://doi.org/10.1590/18069657rbcS20180234>
- López-Reyes, L., Carcaño-Montiel, M. G., Tapia-López, L., Medina-de la Rosa, G., & Tapia-Hernández, R. A. (2017). Antifungal and growth-promoting activity of *Azospirillum brasilense* in *Zea mays* L. ssp. *mexicana*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 50(13-14), 727-743. <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1372247>
- López-Vigoa, O., Sánchez-Santana, T., Iglesias-Gómez, J. M., Lamela-López, L., Soca-Pérez, M., Arece-García, J., & Milera-Rodríguez, M. de la C. (2017). Los sistemas silvopastoriles como alternativa para la producción animal sostenible en el contexto actual de la ganadería tropical. *Pastos y Forrajes*, 40(2), 83-95. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942017000200001
- Mahecha, L. (2002). El silvopastoreo: una alternativa de producción que disminuye el impacto ambiental de la ganadería bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 15(2), 226-231. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/rccp/article/view/323817>
- Marques, A. C. R., de Oliveira, L. B., Nicoloso, F. T., Jacques, R. J. S., Giacomini, S. J., & de Quadros, F. L. F. (2017). Biological nitrogen fixation in C₄ grasses of different growth strategies of South America natural grasslands. *Applied Soil Ecology*, 113, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.01.011>
- Martín, G. M., Rivera-Espinosa, R., Fundora, L. R., Cabrera, A., Martín, N., & Alonso, C. (2018). Evolución de algunas propiedades químicas de un suelo después de 20 años de explotación agrícola. *Cultivos Tropicales*, 39(4), 21-26. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362018000400003&lng=es&nrm=iso
- Miguel, P. S. B., de Oliveira, M. N. V., Delvaux, J. C., de Jesus, G. L., Borges, A. C., Tótola, M. R., Neves, J. C. L., & Costa, M. D. (2016). Diversity and distribution of the endophytic bacterial community at different stages of *Eucalyptus* growth. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109(6), 755-771. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0676-7>
- Murgueitio, E., Chará, J., Barahona, R., & Rivera, J. E. (2019). Development of sustainable cattle rearing in silvopastoral systems in Latin America. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 53(1), 65-71. https://www.researchgate.net/publication/331332787_Development_of_sustainable_cattle_rearing_in_silvopastoral_systems_in_Latin_America
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2018). *Cambio climático y seguridad alimentaria y nutricional América Latina y el Caribe (gestión del riesgo de desastres en el sector agrícola)*. <http://www.fao.org/3/I8014ES/i8014es.pdf>
- Padda, K. P., Puri, A., & Chanway, C. P. (2018). Isolation and identification of endophytic diazotrophs from lodgepole pine trees growing at unreclaimed gravel mining pits in central interior British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Forest Research*, 48(12), 1.601-1.606. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2018-0347>
- Pérez-Cordero, A., Chamorro-Anaya, L., & Doncel-Mestra, A. (2018). Bacterias endófitas promotoras de crecimiento aisladas de pasto colosoana, departamento de Sucre, Colombia. *Revista mvz Córdoba*, 23(2), 6.696-6.709. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1347>
- Portela Pérez, V. D., & Brito Martínez, A. (2018). *Respuesta agronómica, productiva y calidad nutricional del pasto colosuana (Bothriochloa pertusa) bajo diferentes fuentes de fertilización* [tesis de pregrado, Universidad del Tolima]. <http://repository.ut.edu.co/bitstream/001/2412/1/T%200101%20916%20CD5926%20APROBADO%20VIVIAN%20DAYANNA%20PORTELA%20PEREZ.pdf>
- Radwan, T. E.-S. E.-D., Mohamed, Z. K., & Reis, V. M. (2004). Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(10), 987-994. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2004001000006>
- Reis Junior, F. B., Silva, M. F., Teixeira, K. R. S., Urquiaga, S., & Reis, V. M. (2004). Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28(1), 103-113. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832004000100011>
- Rivera-Herrera, J. E., Molina-Botero, I., Chará-Orozco, J., Murgueitio-Restrepo, E., & Barahona-Rosales, R. (2017). Sistemas silvopastoriles intensivos con *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit: alternativa productiva en el trópico ante el cambio climático. *Pastos y Forrajes*, 40(3), 171-183. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942017000300001
- Romero-Perdomo, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galván, A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., & Bonilla, R. (2017). *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium*

hirsutum): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006>

Romero-Perdomo, F., Ocampo-Gallego, J., Camelo-Rusinque, M., & Bonila, R. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bioinoculants on *Pennisetum clandestinum* (Poaceae). *Revista de Biología Tropical*, 67(4). <https://doi.org/10.15517/RBT.V67I4.34029>

Sanches Santos, M., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: Reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9(1), artículo 205. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>

Santos, D. de C., Guimarães Júnior, R., Vilela, L., Pulrolnik, K., Bufon, V. B., & França, A. F. de S. (2016). Forage dry mass accumulation and structural characteristics of Piatã grass in silvopastoral systems in the Brazilian savannah. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 233, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.08.026>

Terra, A. B. C., Florentino, L. A., de Rezende, A. V., & Silva, N. C. D. (2019). Leguminosas forrageiras na recuperação de pastagens no Brasil. *Revista de Ciências Agrárias*, 42(2), 11-20. <https://doi.org/10.19084/rca.16016>

Torregroza, L., Reza, S., Suárez, E., Espinosa, M., Cuadrado, H., Pastrana, I., Mejía, S., Jiménez, N., & Abuabara, Y. (2015). Producción de carne en pasturas irrigadas y fertilizadas de *Brachiaria híbrido* cv. Mulato II en el valle del Sinú. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 16(1), 131-138. https://doi.org/10.21930/rcta.vol16_num1_art:391

Tzec-Gamboa, M., Solorio-Sánchez, F., Fiebrig, I., Torres-Calzada, C., Peña-Cabriales, J. J., & Ortiz-Vázquez, E. (2020). Biochemical and molecular characterization of native rhizobia nodulating *Leucaena leucocephala* with potential use as bioinoculants in Yucatan, Mexico. *Chiang Mai Journal of Science*, 47(1), 1-15. <https://www.thaiscience.info/Journals/Article/CMJS/10990738.pdf>

Videla, C., & Picone, L. (2017). Indicadores biológicos de calidad de suelo. En M. G. Wilson (ed.), *Manual de indicadores de calidad del suelo para las ecorregiones de Argentina* (1.ª ed., pp. 83-87). INTA. https://inta.gob.ar/sites/default/files/manual_ics_final.pdf

Villanueva, C., Casasola, F., & Detlefsen, G. (2018). *Potencial de los sistemas silvopastoriles en la mitigación al cambio climático y en la generación de múltiples beneficios en fincas ganaderas de Costa Rica* [serie técnica, boletín técnico n.º 87]. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (Catie). http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/8729/Potencial_de_los_sistemas_silvopastoriles.pdf?sequence=7&isAllowed=y

Zúñiga, F., Ivelic-Sáez, J., López, I., Huygens, D., & Dörner, F. J. (2015). Temporal dynamics of the physical quality of an Andisol under a grazing system subjected to different pasture improvement strategies. *Soil and Tillage Research*, 145, 233-241. <https://doi.org/10.1016/j.still.2014.09.014>



Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

12

Experiencia AGROSAVIA en Sistemas Silvopastoriles Trópico Alto

Sistema de producción ganadera en el Altiplano Cundiboyacense

Paola Jimena Criollo Campos¹
Lady Rocío Molano Chávez¹
Ruth Rebeca Bonilla Buitrago¹

1. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.



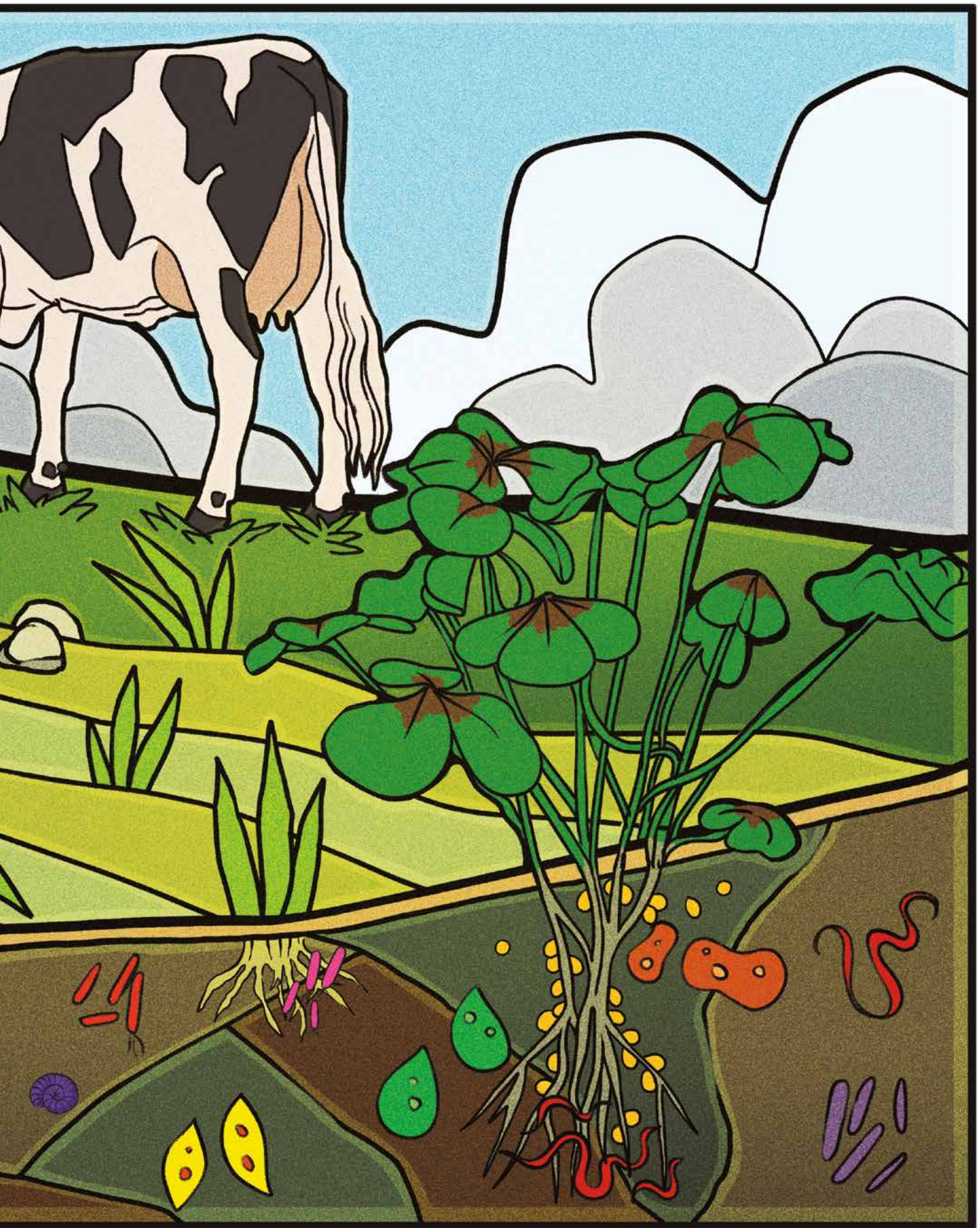




Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

*Los tres estudios que a continuación se exponen involucran el aislamiento y la caracterización de microorganismos presentes en especies vegetales empleadas en sistemas silvopastoriles del trópico alto colombiano, como la acacia amarilla (*Acacia decurrens*), el kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) y el trébol rojo (*Trifolium pratense*).*

Aislamiento, selección y caracterización fenotípica de rizobios nativos asociados a *Acacia decurrens* en cuatro municipios de Cundinamarca (Colombia)

Introducción

La acacia amarilla (*Acacia decurrens*) (Figura 12.1) es una especie arbórea que se encuentra distribuida en el Altiplano Cundiboyacense (Uribe et al., 2011). Es utilizada como suplemento alimenticio para el ganado, por lo cual se tuvo la iniciativa de aislar rizobios nativos como herramienta biotecnológica para mejorar la calidad del forraje. Teniendo en cuenta experiencias con otras leguminosas que

son utilizadas para dinamizar el ciclo del nitrógeno, se desarrollaron estas investigaciones en el Centro de Investigación Tibaitatá de AGROSAVIA. El objetivo principal del presente estudio fue aislar, seleccionar y caracterizar, mediante metodologías convencionales, cepas nativas de rizobios asociadas a *A. decurrens* en los municipios de Mosquera, Susa, Cucunubá y Ubaté (Cundinamarca).

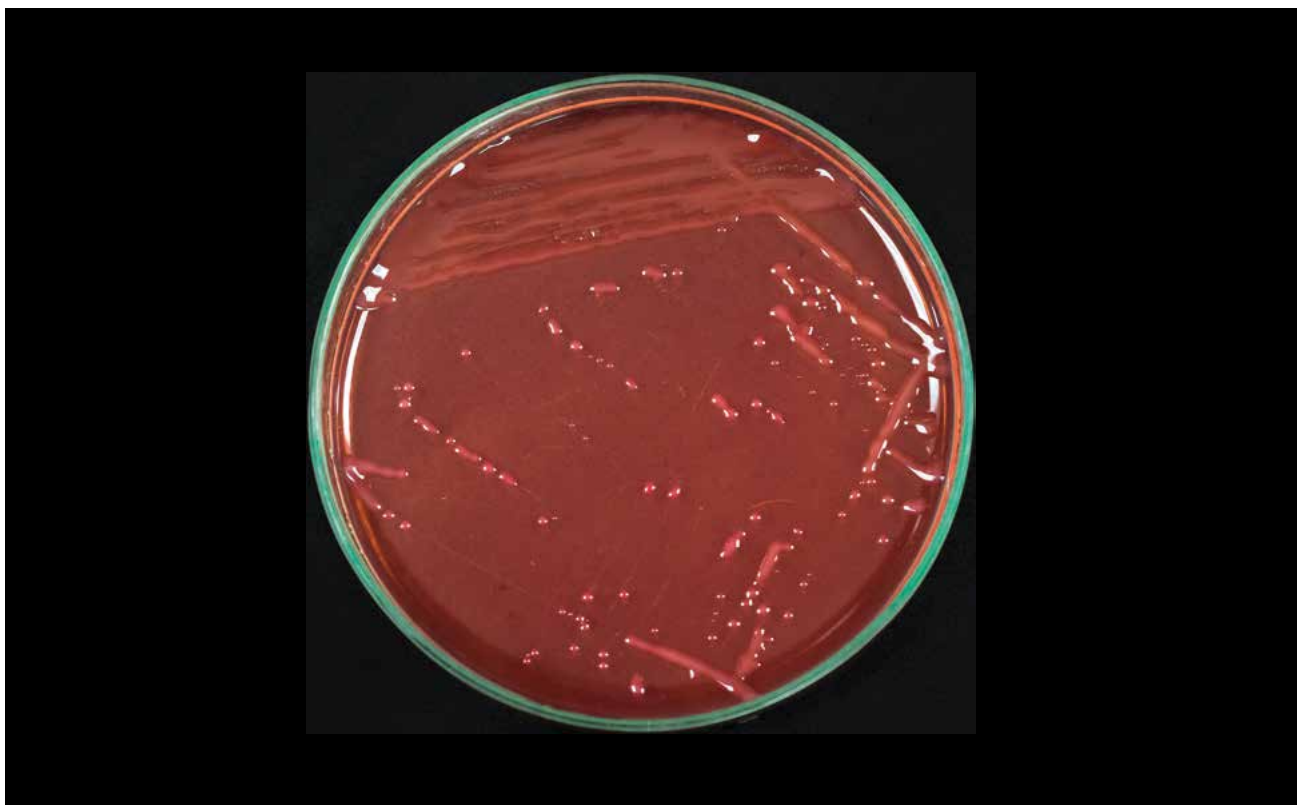
- **Figura 12.1.** *Acacia decurrens* en un sistema silvopastoril del trópico alto colombiano.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Desarrollo de la investigación y resultados

Se seleccionaron 16 cepas de un total de 28 aislamientos, los cuales presentaron características propias de los rizobios: colonias redondas, opacas, con poca o nula absorción del colorante rojo Congo, presencia de mucosidad y bordes lisos (Figura 12.2); además, microscópicamente, son bacilos Gram-negativos.

- **Figura 12.2.** Cepa RS04 en medio de cultivo yma suplementado con rojo Congo.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



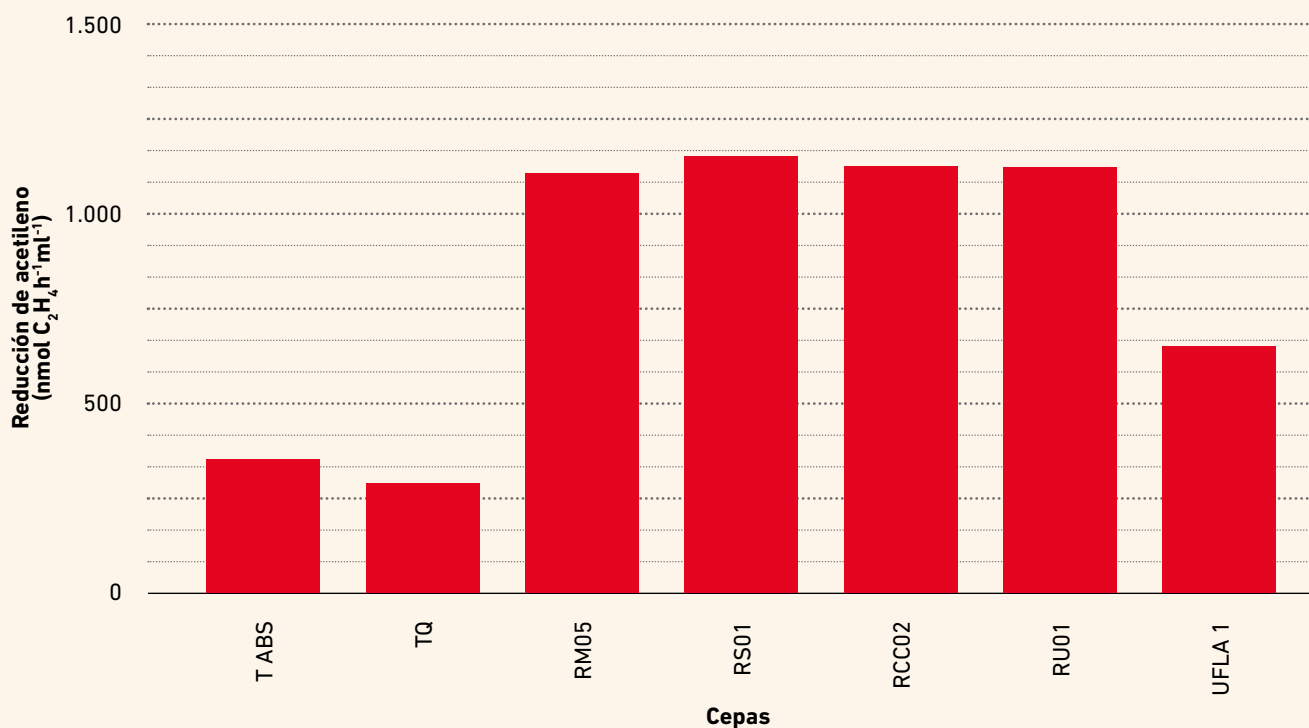
Resultados relevantes

Las cepas aisladas fueron caracterizadas por su tipo de crecimiento en medio de cultivo YMA, con adición de azul de bromotimol, y se determinó su capacidad de fijación biológica de nitrógeno (FBN) y su producción de indoles totales. El medio de cultivo YMA con azul de bromotimol fue alcalinizado por las cepas RM01, RM04, RM05, RCC01, RCC02, RCC03, RCC05 y RU01. A su vez, fue observada acidificación en el mismo medio por las cepas RM02, RM03, RM06, RS01, RS02, RS03, RS04 y RCC04. Los 16 aislamientos fueron capaces de producir nódulos en la planta huésped; sin embargo, solo 5 fueron

eficientes en ensayo de reducción de acetileno (ARA); la cepa RS01 presentó el mayor valor, 1.154,40 nmol de C_2H_4 h^{-1} mL^{-1} , seguida por la cepa RCC02, con un valor de 1.127 nmol de C_2H_4 h^{-1} mL^{-1} (Figura 12.3). Vincent et al. (2019) estudiaron la nodulación en plantas de *Acacia spirorbis* (perteneciente a la misma familia del presente estudio) y encontraron que las cepas de *Bradyrhizobium* sp. y *Paraburkholderia* sp. presentaron resultados de FBN de $130 \pm 0,07$ y $140 \pm 0,08$ nmol de C_2H_4 h^{-1} $planta^{-1}$, respectivamente, valores que son muy inferiores a los encontrados en este estudio.

■ **Figura 12.3.** Fijación biológica de nitrógeno de bacterias aisladas a partir de nódulos de *A. decurrens*.

Fuente: Elaboración propia



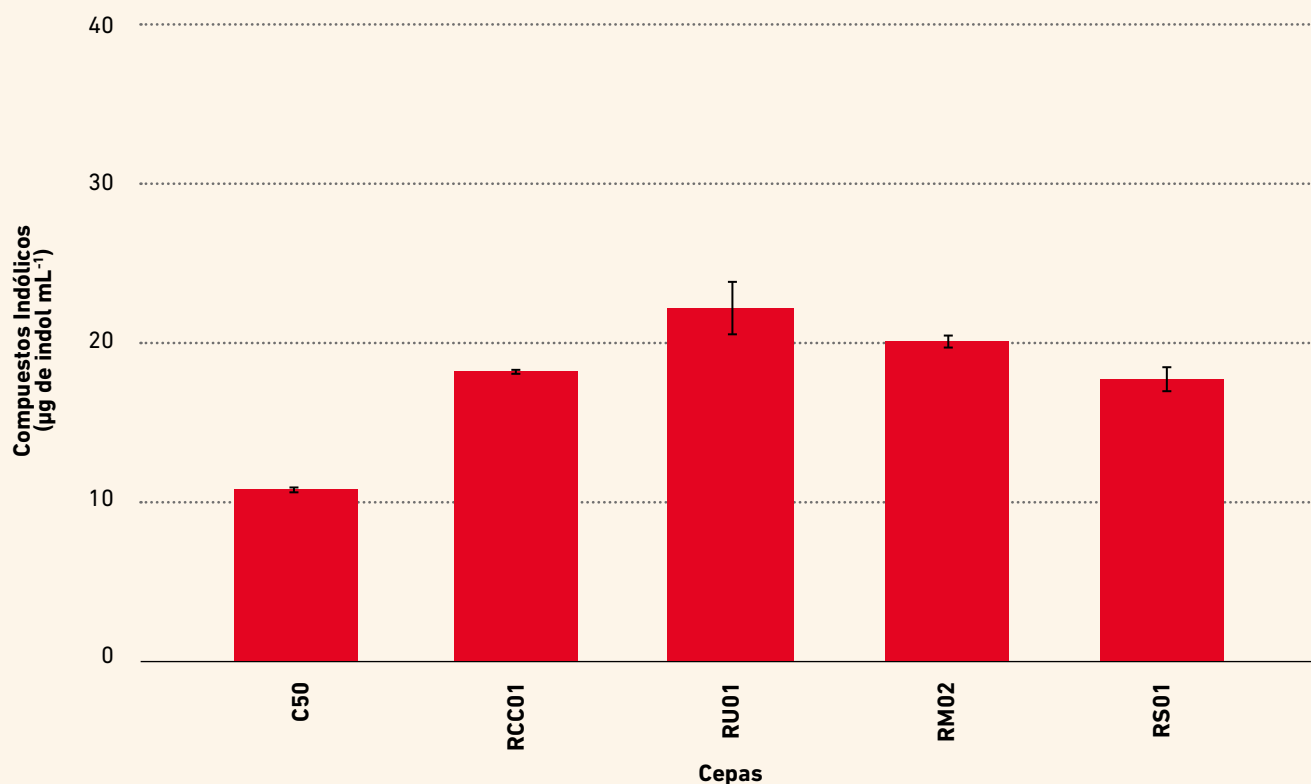
Las cepas seleccionadas RU01 y RS01 presentaron los valores más altos en las pruebas In Vitro

En cuanto a la producción de compuestos indólicos, se evaluaron 5 aislamientos seleccionados por su mayor producción de materia seca, mayor capacidad de nodulación y mayor desarrollo de la planta. Los aislamientos RU01 y RM02 presentaron los valores más altos (22,19 y 20,13 µg de ácido indolacético [AIA] mL⁻¹, respectivamente) con respecto al testigo, C50 (10,76 µg de AIA mL⁻¹) (Figura 12.4), valores inferiores a los reportados por Subudhi et al. (2020) para *Rhizobium alamii* (89,00 µg de AIA mL⁻¹) aislada de nódulos de *Acacia mangium*.



■ **Figura 12.4.** Producción de compuestos indólicos en bacterias aisladas a partir de nódulos de *A. decurrens*.

Fuente: Elaboración propia



De acuerdo con las pruebas de nodulación realizadas preliminarmente, no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$); sin embargo, hay que destacar que el aislamiento RM02 presentó la mejor respuesta en las variables de peso fresco de la parte aérea (1,79 g), peso seco de la parte aérea (0,649 g) y longitud de la parte aérea (17,87 cm). El aislamiento RCC01 presentó un incremento del 39,47% en materia seca y del 24,67% en longitud de la raíz, con respecto al testigo absoluto, a la aplicación de fertilizante químico y a las cepas de referencia C50 y UFLA1 (Bonilla et al., 2010).

Conclusión

Estos resultados nos permiten concluir que las cepas RS01 y RU01, aisladas de *A. decurrens*, pueden servir como principios activos de biofertilizantes nitrogenados, debido a su eficiencia en la actividad nitrogenasa y su producción de compuestos indólicos.



Efecto de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) asociadas a *Cenchrus clandestinum* en el Altiplano Cundiboyacense

Introducción

Cenchrus clandestinum Hochst. ex Chiov. (kikuyo) es una gramínea introducida en Colombia que se adapta bien entre los 1.000 y los 3.900 m.s.n.m. (Salazar Ulloa, 2016). Se la utiliza para la alimentación de ganado debido a su rápida tasa de crecimiento, a que es apetecible y altamente

digerible y a que cuenta con un alto valor proteico, bajo contenido de fibra y altas propiedades nutritivas (Naranjo, 2002). También se emplea en la recuperación de suelos degradados en ambientes fríos y para el control de la erosión, aplicada como cobertura del suelo (Figura 12.5).

- **Figura 12.5.** Pradera de pasto kikuyo en el trópico alto colombiano.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Desarrollo de la investigación y resultados

Las cepas B5 y 4K, aisladas a partir de suelo rizosférico de *Alnus acuminata* y *P. clandestinum* e identificadas como *Stenotrophomonas* sp. y *Pseudomonas* sp., — respectivamente— mediante secuenciación parcial del gen 16S rADN, fueron llevadas a pruebas de invernadero para determinar su eficiencia en la producción de biomasa del pasto kikuyo.

Resultados relevantes

Las cepas B5 y 4K fueron eficientes en FBN, que fue medida con ARA, en solubilización de fósforo y en producción de compuestos indólicos (tabla 12.1), cuyos resultados fueron inferiores a los reportados por Romero-Perdomo et al. (2017) en producción de AIA por parte de las accesiones de *Klebsiella* sp., *Beijerinckia* sp. y *Achromobacter* sp., evaluadas por ellos en la misma especie vegetal.

■ **Tabla 12.1.** Caracterización de la promoción del crecimiento *in vitro* de las cepas 4K y 5B.

Nota: Las letras indican subgrupos homogéneos obtenidos con la prueba hsd de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

| 1 | 2 | 3 |
|---|--|---|
| Solubilización de fósforo ($\mu\text{g de PO}_3 \text{ mL}^{-1}$) | Producción de compuestos indólicos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Fijación de nitrógeno ($\text{nmol de C}_2\text{H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$) |
| 4K: 68,10 \pm 0,22 b | 4K: 0,72 \pm 0,009 b | 4K: 184,47 \pm 3,29 a |
| B5: 96,01 \pm 0,03 a | B5: 1,15 \pm 0 a | B5: 183,42 \pm 6,15 a |

Los muestreos en planta fueron realizados 70, 100 y 130 días después de la siembra (dds), y se obtuvieron resultados positivos a los 70 dds en la variable de peso seco de la parte aérea y radical en los tratamientos de testigo químico y en el inoculado con la cepa 5B, además de que se presentó un incremento del 21 % en la longitud aérea. Los resultados a 100 y 130 dds presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el tratamiento inoculado con la cepa 4K y en el tratamiento inoculado con la cepa 5B, en todas las variables agronómicas evaluadas, con respecto al control no inoculado. Asimismo, a los 100 y 130 dds, los tratamientos inoculados superaron en más del 80 % al testigo absoluto en la variable de peso fresco aéreo, y en las variables de peso seco de la raíz y longitud aérea los valores aumentaron en más del 50 % y el 25 %, respectivamente, en comparación con los tratamientos testigos a los 100 dds (Criollo et al., 2012).

Conclusión

Las cepas 4K y 5B mostraron capacidades de promoción del crecimiento vegetal de *P. clandestinum* a los 100 y 130 días de muestreo, al incrementar el peso fresco y seco de la planta en relación con el control químico, bajo condiciones de invernadero.



Aislamiento, selección y caracterización fenotípica de bacterias simbióticas asociadas a trébol rojo (*Trifolium pratense*) en el trópico alto colombiano

Introducción

Trifolium pratense es una leguminosa que se encuentra distribuida en las praderas del trópico alto colombiano en asociación con *Cenchrus clandestinum*, y forma asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico tipo rizobios. Como resultado de la asociación, Wheeler et al. (1997) reportaron que es responsable de fijar 65 kg de N₂ ha⁻¹ año⁻¹. Por este motivo, el objetivo del presente estudio fue aislar y caracterizar rizobios con alta capacidad de FBN, producción de compuestos indólicos y solubilización de fosfatos en *T. pratense* (Figura 12.6).

- **Figura 12.6.** Plantas de *Trifolium pratense* inoculadas con cepas presuntivas de rizobios.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Desarrollo de la investigación y resultados

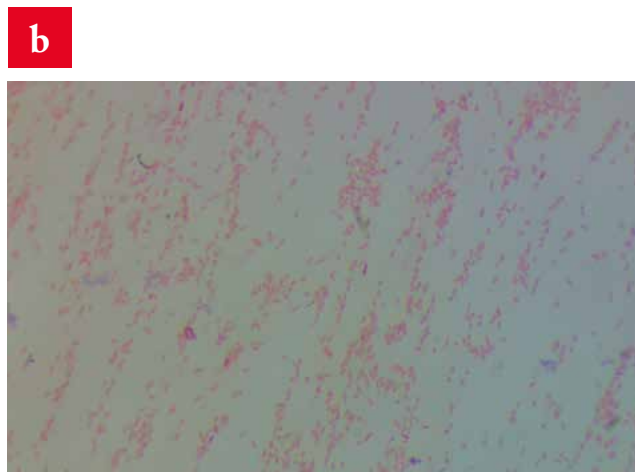
Se obtuvieron 20 cepas presuntivas de rizobios aisladas de nódulos colectados en Mosquera, 12 en Boyacá, 6 en Ubaté y 6 en Pasto.

Resultados relevantes

Las cepas aisladas de Mosquera y Boyacá presentaron crecimiento a las 24 horas de incubación y acidificación del medio de cultivo YMA suplementado con azul de bromotimol, mientras que las cepas aisladas de Ubaté y Pasto presentaron tiempos de crecimiento que variaron entre 48 y 72 horas. Todas las cepas aisladas presentaron colonias redondas, con poca o nula absorción del colorante rojo Congo, y fueron bacilos o cocobacilos Gram-negativos en la tinción diferencial de Gram (Figura 12.7).



- **Figura 12.7.** Cepa T88. *a.* En medio de cultivo YMA suplementado con azul de bromotimol; *b.* Vista microscópica en objetivo de 100x.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Los resultados de FBN mostraron resultados favorables para la accesión F2C3(2)U, aislamiento proveniente del Valle de Ubaté, con una producción de 1.173 nmol de C_2H_4 h^{-1} planta $^{-1}$, siendo estadísticamente diferente de las demás cepas ($p < 0,05$), seguido por la cepa F1C10PN, con una producción con

910 nmol de C_2H_4 h^{-1} planta $^{-1}$, mientras que las cepas aisladas de Mosquera y Boyacá presentaron valores inferiores (tabla 12.2). Estos resultados fueron superiores a los reportados por Matse et al. (2020) en cepas de *Rhizobium* sp., con valores de 22 y 28 nmol de C_2H_4 h^{-1} planta $^{-1}$.

■ **Tabla 12.2.** Resultados de fijación biológica de nitrógeno (FBN) en las cepas aisladas de *Trifolium pratense*

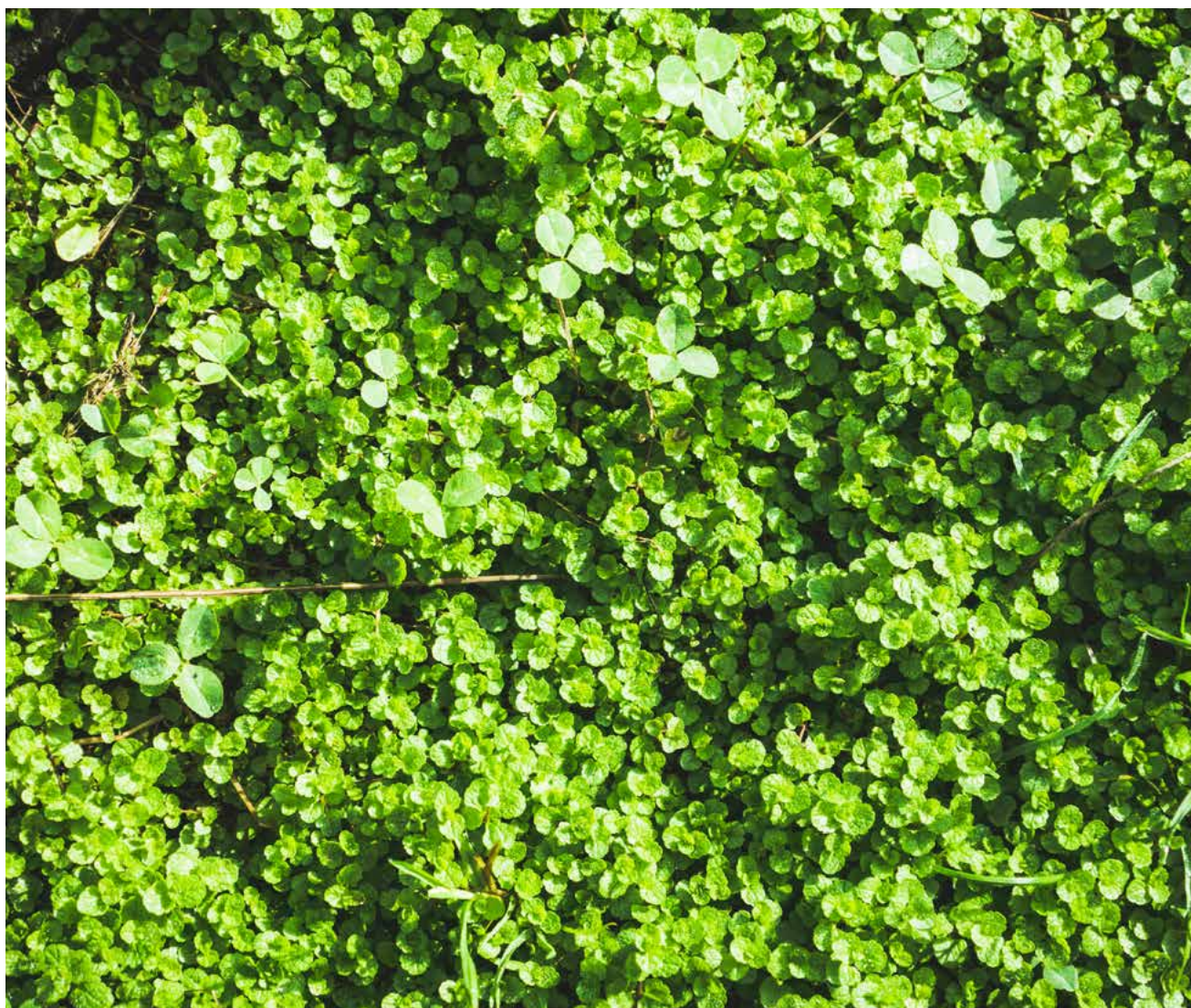
Nota: Las letras indican subgrupos homogéneos obtenidos con la prueba hsd de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

| | | | |
|----------|---|----------|--|
| 1 | F2C3(2)U FBN (nmol de C_2H_4 h^{-1} planta $^{-1}$): 1.173 a | 3 | TT3 FBN (nmol de C_2H_4 h^{-1} planta $^{-1}$): 390 c |
| 2 | F1C10PN FBN (nmol de C_2H_4 h^{-1} planta $^{-1}$): 910 ab | 4 | TT4 FBN (nmol de C_2H_4 h^{-1} planta $^{-1}$): 410 c |

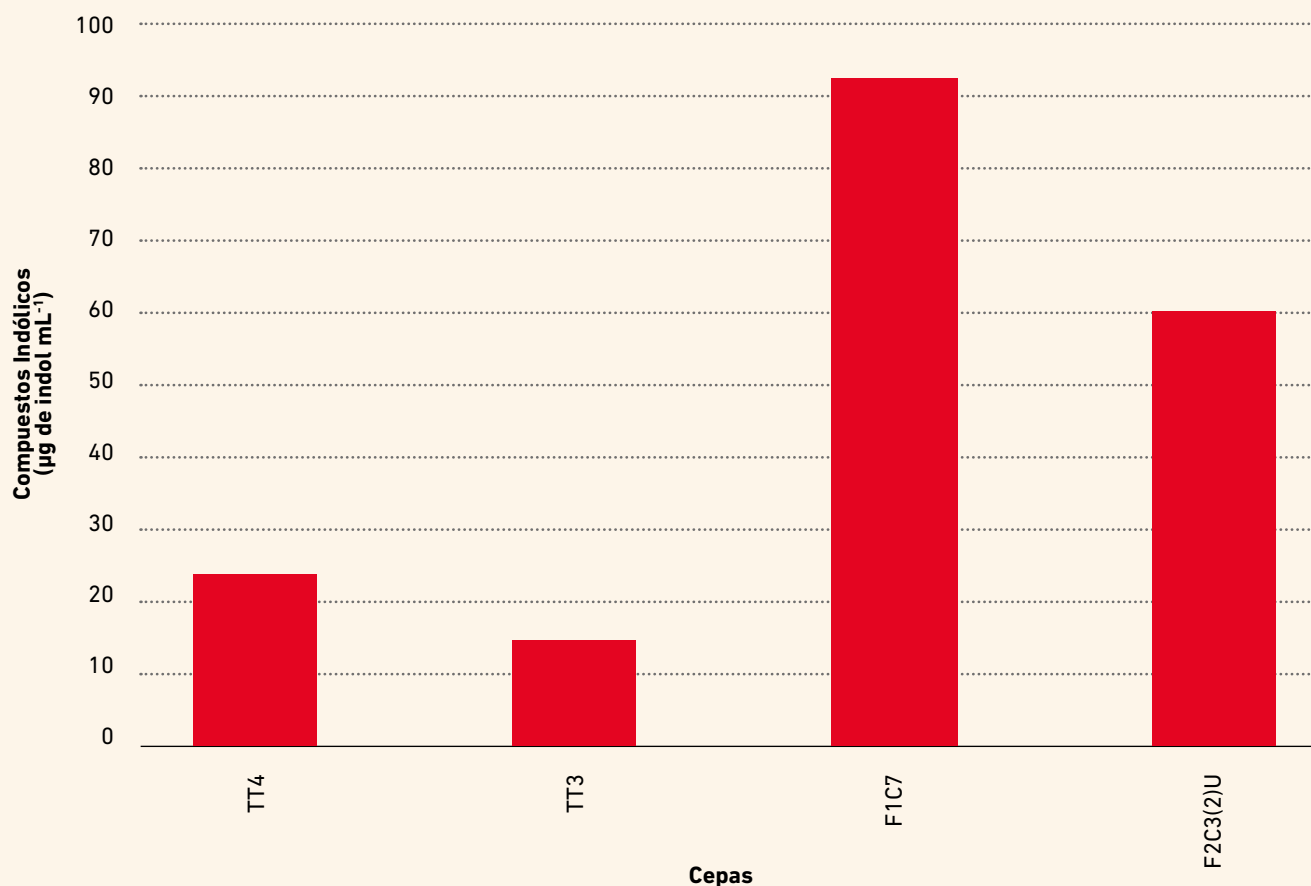
En cuanto a la producción de compuestos indólicos (Figura 12.8), los aislamientos de Mosquera y Boyacá presentaron los mejores resultados en los aislamientos TT3 y TT4, con valores de 0,24 y 8,15 μg mL $^{-1}$, respectivamente, mientras que, de los aislamientos de Ubaté y Pasto, la cepa F1C7 fue la que presentó mayor producción de indoles, con 93,281 μg mL $^{-1}$ ($p < 0,0001$),

seguida por la cepa F2C3(2)U, con un valor de 60,825 μg mL $^{-1}$ y la producción más baja de AIA se observó en la cepa TT3(1), con un valor de 14,860 μg mL $^{-1}$. Los resultados obtenidos por los aislamientos de Mosquera son similares a los reportados por Matse et al. (2020), quienes obtuvieron valores de 13,3 y 13,8 μg mL $^{-1}$ en cepas de *Rhizobium* sp. aisladas de *Trifolium repens*.



■ **Figura 12.8.** Producción de compuestos indólicos en las cepas aisladas de *T. pratense* en Cundinamarca y Nariño.

Fuente: Elaboración propia



La respuesta en planta no se vio influenciada por la inoculación de las cepas aisladas de Nariño y Ubaté, puesto que en las variables evaluadas (longitud de la parte aérea y de raíz, y peso fresco y seco de la parte aérea y de raíz) no se presentaron diferencias estadísticas significativas, mientras que los aislamientos de Mosquera y Boyacá sí presentaron un efecto promotor del crecimiento, expresado especialmente por la cepa TT7 en la variable de peso seco de la parte aérea (incremento del 96%), respecto al testigo absoluto, resultados que se pueden comparar con los obtenidos por Cruz-González et al. (2017), quienes reportaron un incremento de los pesos y las longitudes de *Trifolium rubens* al ser inoculado con tres cepas diferentes de *Rhizobium leguminosarum*.

Conclusión

Las cepas F2C3(2)U y F1C10PN, aisladas a partir de nódulos de *T. pratense*, correspondientes macroscópicamente a cepas tipo rizobios, fueron eficientes en la fijación de nitrógeno; la cepa F1C7 presentó los valores más altos en producción de compuestos indólicos, y la cepa TT7 aumentó la producción de biomasa de la planta indicadora. Estos constituyen resultados destacables, que hacen que estas especies sean candidatas como principios activos de biofertilizantes.



Referencias

- Bonilla, R., Criollo, P., & Garrido, M. F. (2010). Aislamiento, selección y caracterización fenotípica de rizobios asociados a *Acacia decurrens* en cuatro municipios de Cundinamarca (Colombia). *Revista Argentina de Microbiología*, 2(42).
- Criollo, P. J., Obando, M., Sánchez, L., & Bonilla, R. (2012). Efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) asociadas a *Pennisetum clandestinum* en el altiplano cundiboyacense. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 13(2), 189-195. https://doi.org/10.21930/rcta.vol13_num2_art:254
- Cruz-González, X., Laza-Pérez, N., Mateos, P. F., & Rivas, R. (2017). Analysis and effect of the use of biofertilizers on *Trifolium rubens* L., a preferential attention species in Castile and Leon, Spain, with the aim of increasing the plants conservation status. *AIMS Microbiology*, 3(4), 733-746. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.4.733>
- Matse, D. T., Huang, C.-H., Huang, Y.-M., & Yen, M.-Y. (2020). Effects of coinoculation of *Rhizobium* with plant growth promoting rhizobacteria on the nitrogen fixation and nutrient uptake of *Trifolium repens* in low phosphorus soil. *Journal of Plant Nutrition*, 43(5), 739-752. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1702205>
- Naranjo, H. (2002). Evaluación nutricional del pasto kikuyo a diferentes edades de corte. *Despertar Lechero*, 20, 150-167.
- Romero-Perdomo, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galván, A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., & Bonilla, R. (2017). *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006>
- Salazar Ulloa, A. N. (2016). *Determinación del cambio de la distribución altitudinal del Kikuyo (Pennisetum clandestinum L.), como posible indicador biológico del cambio climático* [tesis de pregrado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/11386>
- Subudhi, S., Sethi, D., & Pattanayak, S. K. (2020). Characterization of *Rhizobium* sp (SAR-5) isolated from root nodule of *Acacia mangium* L. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 57(3), 327-333.
- Uribe, F., Zuluaga, A. F., Murgueitio, E., Valencia, L. M., Zapata, Á., Solarte, L. H., Cuartas, C. A., Naranjo, J. F., Galindo, W. F., González, J. G., Sinisterra, J. A., Gómez, J. C., Molina, C. H., Molina, E. J., Galindo, A., & Soto, R. (2011). *Establecimiento y manejo de sistemas silvopastoriles. Manual 1. Proyecto Ganadería Colombiana Sostenible*. GEF; Banco Mundial; Fedegán; Cipav; Fondo Acción. <http://ganaderiacolombianasostenible.co/web/wp-content/uploads/2015/04/1.-Establecimiento-y-manejo-de-SSP.pdf>
- Vincent, B., Juillot, F., Fritsch, E., Klonowska, A., Gerbert, N., Acherar, S., Grangeteau, C., Hannibal, L., Galiana, A., Ducouso, M., & Jourand, P. (2019). A leguminous species exploiting alpha- and beta-rhizobia for adaptation to ultramafic and volcano-sedimentary soils: An endemic *Acacia spirorbis* model from New Caledonia. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(8). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz099>
- Wheeler, D. M., Edmeades, D. C., & Morton, J. D. (1997). Effect of lime on yield, N fixation, and plant N uptake from the soil by pasture on 3 contrasting trials in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 40(3), 397-408. <https://doi.org/10.1080/00288233.1997.9513261>

13

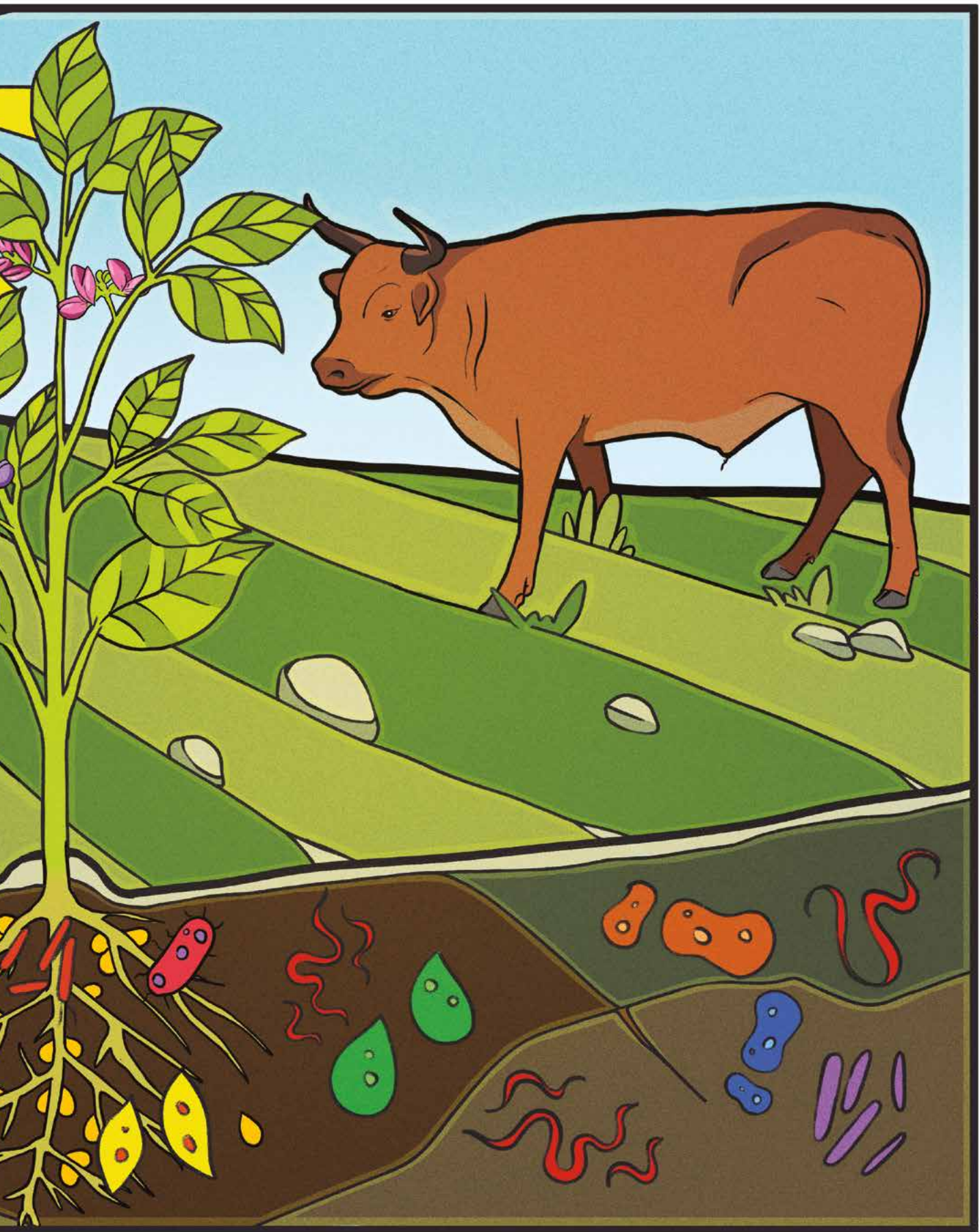
Experiencia AGROSAVIA en Fríjol (*Vigna unguiculata*) para ensilaje

Uso de rizobios nativos en
leguminosas forrajeras como
biofertilizantes en el mejoramiento
de la producción de ganado de
carne en el Valle del Cesar

Paola Jimena Criollo Campos¹
Felipe Andrés Romero Perdomo¹
Germán Orozco González²
Ruth Rebeca Bonilla Buitrago¹

1. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.
2. Unidad Municipal de Asistencia Técnica Agropecuaria Umata. Aguachica. Cesar. Colombia.





En la ganadería del trópico bajo colombiano han predominado los sistemas de producción extensivos, caracterizados por una baja eficiencia en el uso del suelo y una marcada estacionalidad de la zona (Lerner et al., 2017). Además, el deterioro ambiental, especialmente del suelo, atribuido a la deforestación, las quemas, la erosión y la pérdida de la biodiversidad, genera fuertes implicaciones sobre la producción, la calidad de los forrajes y la ganancia en peso de los animales (Enciso et al., 2019). Entre las problemáticas involucradas en el manejo inadecuado del suelo en los sistemas de producción ganadera se presenta el uso excesivo de determinados insumos químicos de síntesis que buscan suplir las necesidades de las especies forrajeras (Castro-Rincon et al., 2018); sin embargo, estos insumos generan efectos negativos sobre los ecosistemas y el medio ambiente, deteriorando las características físicas, químicas y biológicas propias de los suelos, lo cual conlleva, a su vez, al deterioro de diversos aspectos relacionados con la calidad de vida de los productores y consumidores (Massah & Azadegan, 2016).

Esta situación va en contravía de las políticas y los retos generados por la globalización, que exigen maximizar la eficiencia de los recursos y a la vez

propenden por el manejo sostenible de los sistemas de producción ganadera (Patrizi et al., 2018). Entre las posibles alternativas amigables con el medio ambiente se encuentra el uso de enmiendas orgánicas que complementen la fertilización de los suelos sin conllevar riesgos ambientales y a la salud de productores y consumidores (Soares Filho et al., 2018). Es por esto que el empleo de biofertilizantes formulados a partir de microorganismos que promueven el crecimiento vegetal y aumentan la disponibilidad de nutrientes necesarios para el desarrollo de la planta se perfila como una opción para optimizar la fertilización tradicional, teniendo como valor agregado que se producen a bajo costo y que son ecológicamente sostenibles (Bensidhoum & Nabti, 2020). Por esa razón, en el presente proyecto se buscó contribuir al mejoramiento de la producción de carne en el departamento del Cesar, mediante el incremento de la calidad y la cantidad del forraje de la especie *Vigna unguiculata*, con cepas nativas de rizobios, a partir de leguminosas forrajeras. Para llevar a cabo esta investigación, se contó con el desarrollo de diferentes trabajos en microbiología de suelos para aislar y caracterizar las cepas nativas, y, por último, se llevó a cabo la aplicación en campo de prototipos de biofertilizantes para la producción de heno y se evaluó la ganancia en peso del ganado vacuno.



Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

Aislamiento y caracterización de rizobios asociados a *Vigna unguiculata* en el Valle del Cesar y La Guajira

Introducción

En los sistemas ganaderos tropicales se propende por el uso de plantas leguminosas debido a que muchas de ellas se asocian en sus raíces con un grupo de microorganismos denominados *rizobios* para establecer una relación simbiótica en la que la bacteria provee a la planta de compuestos nitrogenados y la planta provee a la bacteria de compuestos carbonados (Ohyama & Pham, 2006). Esta simbiosis se lleva a cabo dentro de una estructura especializada denominada *nódulo*, que es el órgano capaz de llevar a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno (Poole et al., 2018). Varios estudios han reportado que el potencial de la interacción simbiótica de suplir nitrógeno disponible en cultivos como soya y otras leguminosas se encuentra entre el 70% y el 100% respecto a la fertilización química nitrogenada (Torabian et al., 2019).

Desarrollo de la investigación y resultados

Toma de muestras y recuento poblacional

Los muestreos se realizaron en cultivos de diferentes especies de leguminosas previamente establecidos en los departamentos del Cesar (municipio La Paz) y La Guajira (municipio Distracción), y se hicieron en dos épocas climáticas diferentes: sequía y lluvia. Una vez separados los nódulos de las raíces, estos se depositaron en tubos de ensayo con gel de sílice, para su conservación, y luego se llevaron al laboratorio, junto con las muestras de suelo, para su procesamiento. Las muestras de suelo fueron diluidas e inoculadas en

semillas pregerminadas de frijol caupí para realizar la cuantificación poblacional de rizobios de acuerdo con la técnica estadística del número más probable (Oblinger & Koburger, 1975). Así, se evaluó la formación de nódulos a los 60 días mediante un muestreo destructivo, verificando la presencia de nódulos, los cuales fueron conservados con la metodología descrita anteriormente. De esta manera, se determinó que la población se encontró en un promedio de $3,26 \times 10^4$ rizobios g de suelo⁻¹.



Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

Aislamiento de rizobios y descripción fenotípica

Los nódulos fueron sumergidos en etanol (95 %) durante un minuto y transferidos a una solución de hipoclorito de sodio (3 %) para su desinfección. Se realizaron cinco lavados con agua destilada estéril para retirar los residuos de las soluciones desinfectantes. Se colocaron los nódulos en un crisol estéril y se maceraron con el fin de liberar los bacteroides presentes. Para realizar el aislamiento de las cepas de rizobios, la solución obtenida se sembró en placas con medio de cultivo YMA con los colorantes rojo Congo y azul de bromotimol, las cuales se incubaron a 30 ± 2 °C entre 5 y 15 días.

A partir de nódulos colectados de las raíces de fríjol caupí, se obtuvieron 20 aislamientos presuntivos de rizobios, los cuales, de forma general, presentaron colonias redondas, blancas, de crecimiento rápido y elevación convexa, que acidificaron el medio de cultivo (YMA + azul de bromotimol). Además, presentaron formación y elasticidad de mucosidad variable de acuerdo con el aislamiento. Las diferencias en la caracterización permitieron establecer la presencia de diferentes morfotipos entre los aislamientos, los cuales presentaron en su totalidad la característica microscópica de bacilos Gram-negativos, propia del grupo de los rizobios.

Evaluación de la fijación biológica de nitrógeno y de la producción de compuestos indólicos

La prueba indirecta de reducción de acetileno (ARA, por sus siglas en inglés: *acetylene reduction assay*) fue empleada para evaluar la fijación biológica de nitrógeno. Mediante esta técnica se determina la actividad de la enzima nitrogenasa, la cual reconoce la presencia de enlaces triples como el que está presente en la estructura de la molécula de acetileno, reduciendo este compuesto a etileno, el cual es detectado mediante cromatografía de gases, lo que permite estimar la cantidad de nitrógeno molecular que el microorganismo sería capaz de reducir a amonio

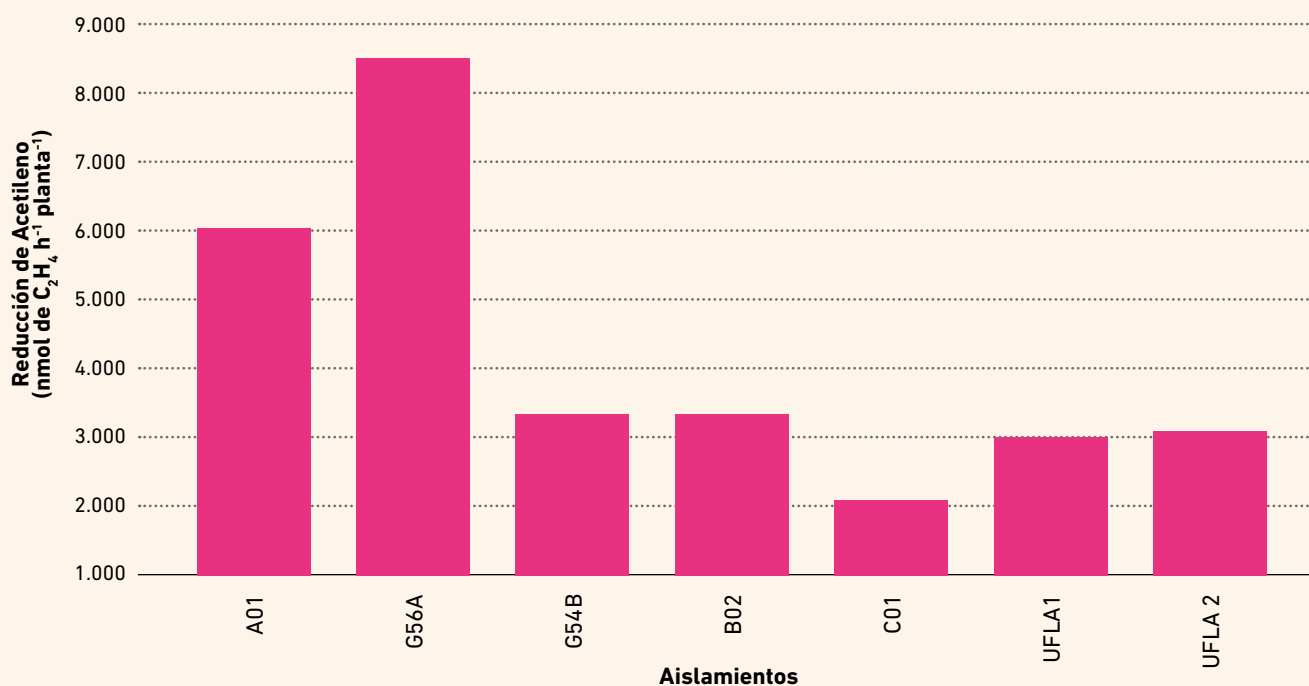
mediante la actividad de la misma enzima (Saiz et al., 2019). Con este fin, se emplearon las raíces noduladas con cada uno de los aislamientos seleccionados y las cepas de referencia (UFLA1 y UFLA2), las cuales, en presencia de una atmósfera con un 10 % de acetileno, fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente. La concentración de etileno producido fue determinada a partir de una muestra de la atmósfera en contacto con los nódulos (Grove & Malajczuk, 1987).

Los aislados de La Guajira que presentaron la mayor actividad nitrogenasa fueron G56A (8.558,97 nmol de C_2H_4 h^{-1} planta $^{-1}$) y G54B (3.216,23 nmol de C_2H_4 h^{-1} planta $^{-1}$), y los del Cesar fueron A01 (6.082,69 nmol de C_2H_4 h^{-1} planta $^{-1}$) y B02 (3.211,80 nmol de C_2H_4 h^{-1} planta $^{-1}$). Estos valores de los aislados nativos muestran una mayor eficiencia en la actividad nitrogenasa que los aislados de referencia provenientes de Brasil: UFLA1 (3.005,76 nmol de C_2H_4 h^{-1} planta $^{-1}$) y UFLA2 (3.125,38 nmol de C_2H_4 h^{-1} planta $^{-1}$) (Figura 13.1).



■ **Figura 13.1.** Actividad de reducción de acetileno como indicador de la fijación biológica de nitrógeno de los aislamientos del Cesar.

Fuente: Elaboración propia

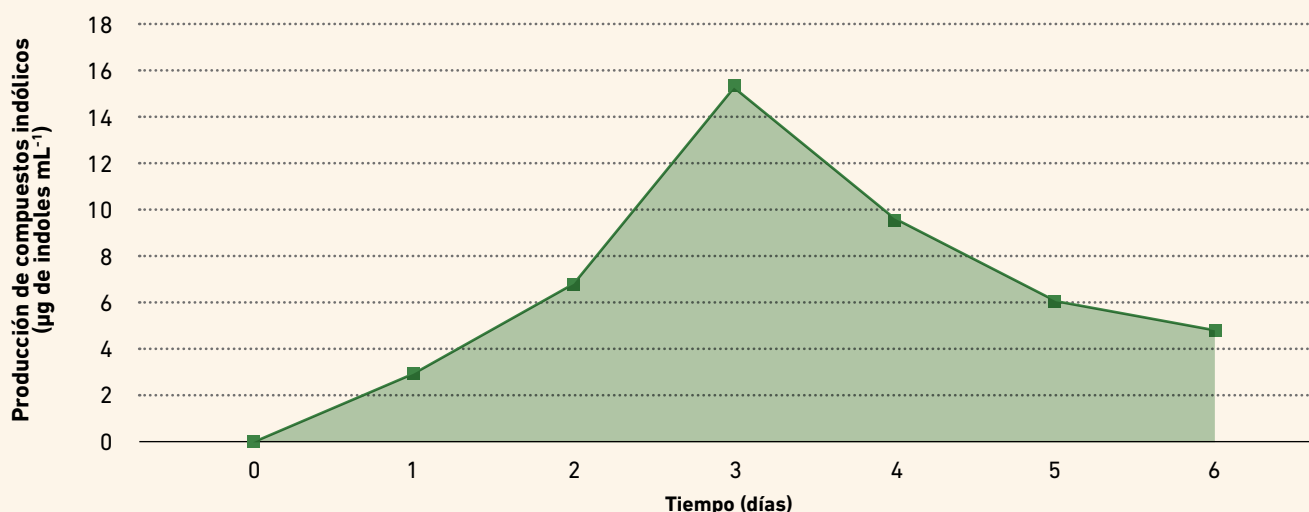


La prueba de detección de compuestos indólicos se basa en la capacidad microbiana para metabolizar precursores e intermediarios, como el aminoácido triptófano, convirtiéndolos en compuestos como el ácido indol-3-acético (AIA), el cual es capaz de regular el crecimiento de la planta al inducir su elongación (Egamberdieva et al., 2017). En ese sentido, a partir del cultivo de los aislamientos por evaluar en medio

con triptófano, se determinó la concentración de compuestos indólicos producidos mediante reacción colorimétrica (Glickmann & Dessaux, 1995). Los resultados mostraron que solo el aislamiento G58A, de La Guajira, fue capaz de sintetizar sustancias tipo indol. Este aislamiento, al tercer día de evaluación, presentó su pico de producción en 15,36 µg de indoles mL⁻¹ (Figura 13.2).

■ **Figura 13.2.** Producción de compuestos indólicos por el aislamiento G58A, de La Guajira.

Fuente: Elaboración propia



Determinación del efecto de la inoculación de los aislamientos seleccionados en pruebas de invernadero

Con el fin de determinar el efecto de la inoculación de los aislamientos que demostraron tener potencial en la promoción de crecimiento vegetal sobre el frijol caupí, se establecieron pruebas en invernadero bajo condiciones semicontroladas y fertilización con solución Hoagland libre de nitrógeno; se evaluaron 10 tratamientos a los 60 días después de la emergencia, y las variables agronómicas evaluadas fueron peso fresco y seco, longitud de la parte aérea y radical, y número y peso fresco de nódulos.

Los resultados mostraron que la aplicación de la solución de Hoagland libre de nitrógeno en el tratamiento químico mejoró significativamente las longitudes y la biomasa vegetal, tanto en la raíz como en la parte aérea, en comparación con el testigo absoluto (tabla 13.1). Además, en ninguno de estos

dos tratamientos se evidenció presencia de nódulos. Respecto a los tratamientos inoculados, se observó, en general, un efecto promotor de crecimiento sobre el frijol caupí frente al testigo químico. En la longitud de la parte aérea, la cepa G58A ejerció la mayor promoción de crecimiento, con un aumento del 14 %, seguida de la cepa B01, con el 6 %. En cuanto a la longitud radicular, las cepas G52A y G58A generaron un incremento del 98 % y el 50 %, respectivamente. Respecto a la biomasa vegetal, G58A fue la cepa que más aumentó significativamente las cuatro variables medidas, con aumentos superiores al 100 %. Asimismo, la inoculación de G58A generó el mayor número y peso de nódulos en el frijol caupí. De esta manera, los hallazgos sugieren que la cepa G58A generó el mayor efecto promotor del crecimiento vegetal (Figura 13.3).



■ **Tabla 13.1.** Resultados de la evaluación de las variables agronómicas en planta después de la nodulación con aislamientos obtenidos a partir de muestras de suelo y nódulos

Nota: Los valores de la misma columna con diferente letra presentan diferencias estadísticamente significativas a un 95 % de confianza de acuerdo con la prueba hsd de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

| | | |
|--|--|---|
| <p>1 Longitud de la parte aérea (cm planta⁻¹)</p> <p>Testigo absoluto: 10 h</p> <p>Testigo químico: 16,4 cd</p> <p>UFLA1: 16,5 bc</p> <p>UFLA2: 15,9 cde</p> <p>G52A: 15,5 fde</p> <p>G54B: 13,1 g</p> <p>G56A: 14,3 f</p> <p>G58A: 18,8 a</p> <p>A01: 15,4 e</p> <p>B01: 17,4 b</p> | <p>2 Longitud de la raíz (cm planta⁻¹)</p> <p>Testigo absoluto: 8,7 h</p> <p>Testigo químico: 12,3 g</p> <p>UFLA1: 17,7 cd</p> <p>UFLA2: 17 de</p> <p>G52A: 24,4 a</p> <p>G54B: 17,1 de</p> <p>G56A: 16,4 e</p> <p>G58A: 18,5 bc</p> <p>A01: 15,4 f</p> <p>B01: 19 b</p> | <p>3 Peso fresco de la parte aérea (g planta⁻¹)</p> <p>Testigo absoluto: 0,2 d</p> <p>Testigo químico: 0,7 bc</p> <p>UFLA1: 0,5 b</p> <p>UFLA2: 0,6 bc</p> <p>G52A: 0,7bc</p> <p>G54B: 0,7 bc</p> <p>G56A: 0,8 b</p> <p>G58A: 1,1 a</p> <p>A01: 0,7 bc</p> <p>B01: 0,7 bc</p> |
| <p>4 Peso fresco de la raíz (g planta⁻¹)</p> <p>Testigo absoluto: 0,2 f</p> <p>Testigo químico: 0,4 ef</p> <p>UFLA1: 0,9 bc</p> <p>UFLA2: 1b</p> <p>G52A: 0,4 ef</p> <p>G54B: 0,6 de</p> <p>G56A: 0,7 cd</p> <p>G58A: 2,2 a</p> <p>A01: 0,5 de</p> <p>B01: 1b</p> | <p>5 Peso seco de la parte aérea (g planta⁻¹)</p> <p>Testigo absoluto: 0,1 b</p> <p>Testigo químico: 0,2 b</p> <p>UFLA1: 0,1 b</p> <p>UFLA2: 0,2 b</p> <p>G52A: 0,1 b</p> <p>G54B: 0,1 b</p> <p>G56A: 0,2 b</p> <p>G58A: 0,5 a</p> <p>A01: 0,2 b</p> <p>B01: 0,2 b</p> | <p>6 Peso seco de la raíz (g planta⁻¹)</p> <p>Testigo absoluto: 0,1 a</p> <p>Testigo químico: 0,1 a</p> <p>UFLA1: 0,1 a</p> <p>UFLA2: 0,1 a</p> <p>G52A: 0,1 a</p> <p>G54B: 0,1 a</p> <p>G56A: 0,2 a</p> <p>G58A: 0,2 a</p> <p>A01: 0,1 a</p> <p>B01: 0,2 a</p> |
| <p>7 Nódulos planta⁻¹</p> <p>Testigo absoluto: 0 f</p> <p>Testigo químico: 0 f</p> <p>UFLA1: 4 e</p> <p>UFLA2: 10,3 c</p> <p>G52A: 6,7 d</p> <p>G54B: 11 c</p> <p>G56A: 7,3 d</p> <p>G58A: 19,3 a</p> <p>A01: 10,7 c</p> <p>B01: 15,3 b</p> | <p>8 Peso fresco de los nódulos (g planta⁻¹)</p> <p>Testigo absoluto: 0 b</p> <p>Testigo químico: 0 b</p> <p>UFLA1: 0,1 ab</p> <p>UFLA2: 0,1 ab</p> <p>G52A: 0,1 ab</p> <p>G54B: 0,1 ab</p> <p>G56A: 0,1 ab</p> <p>G58A: 0,2 ab</p> <p>A01 : 0,1 ab</p> <p>B01: 0,1 ab</p> | |

- **Figura 13.3.** Planta de frijol. *a.* Planta inoculada; *b.* Planta sin inocular a nivel de campo.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

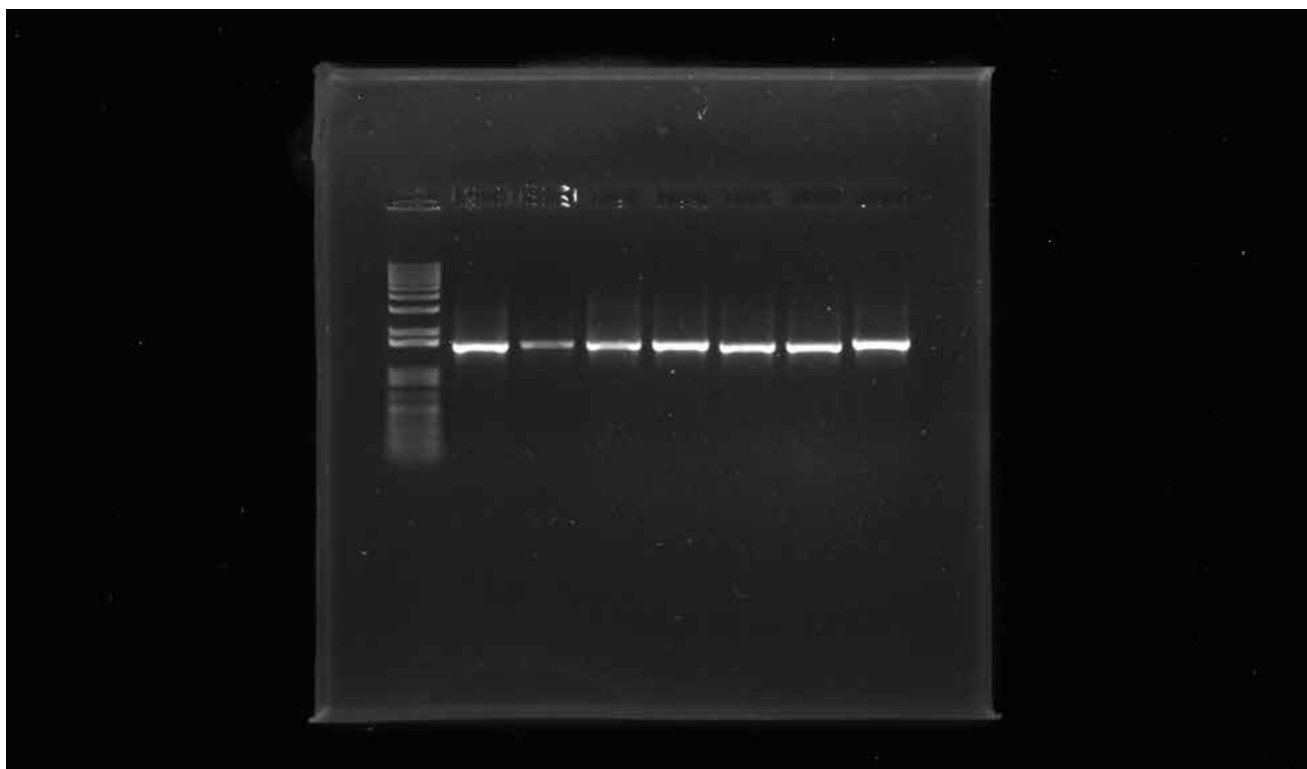


Identificación molecular de las cepas eficientes

Los resultados obtenidos bajo condiciones de invernadero arrojaron que la cepa más eficiente para la leguminosa frijol caupí (*Vigna unguiculata*) es la G58A, razón por la cual se realizó su identificación genética utilizando la secuencia 16S rARN ribosomal.

Los resultados de esta secuenciación determinaron que la cepa G58A, aislada de nódulos de frijol caupí, corresponde al género *Rhizobium* sp., con un porcentaje de similitud del 99% con respecto a la base de datos GenBank (Figura 13.4).

- **Figura 13.4.** Gel de electroforesis, en agarosa, para análisis del gen 16S rARN de la cepa G58A.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Conclusiones

El desarrollo de este estudio permitió observar que la densidad poblacional de rizobios en los suelos evaluados reporta un valor mayor a 1×10^3 UFC g de suelo⁻¹. Además, se observó un mayor número de nódulos en las muestras del departamento del Cesar, con un promedio de 574, en comparación con el departamento de La Guajira, con un promedio de 394.

Al evaluar la actividad biológica de las cepas aisladas, se logró comprobar que, en la prueba de reducción de acetileno, el aislamiento G56A presentó una mayor

actividad con respecto a los demás aislamientos de La Guajira y a los aislamientos obtenidos del Cesar. Asimismo, los aislamientos de La Guajira presentaron una mayor producción de indoles totales que los aislamientos del Cesar. Los mayores valores se presentaron en las cepas G52A y G58A. En el experimento bajo condiciones de invernadero, se encontró que las cepas aisladas promueven el crecimiento del frijol caupí, donde la cepa G58A mostró el mayor potencial biofertilizante y luego fue identificada como *Rhizobium* sp.

Inoculación de *Vigna unguiculata* con cepas nativas de rizobios para evaluar la ganancia en peso de terneros de levante

Los resultados evidenciados con la inoculación de la cepa *Rhizobium* sp. G58A sobre el crecimiento del frijol caupí en invernadero mostraron un potencial biofertilizante, lo que permitió continuar con estudios en campo. El objetivo fue corroborar los efectos positivos en la producción y calidad del forraje y en la ganancia en peso de terneros de levante.

Introducción

La alimentación de rumiantes en el Caribe seco colombiano está basada en el uso de forrajes, generalmente de baja oferta y calidad nutricional como consecuencia de procesos de degradación del suelo o falta de implementación de prácticas sostenibles en la producción (Capstaff & Miller, 2018). Asimismo, la estacionalidad climática afecta drásticamente la productividad de las pasturas en época seca (Grossi et al., 2018). Esta baja oferta y calidad nutricional de los forrajes utilizados para la alimentación de los bovinos de la región se manifiesta en bajas ganancias diarias de peso por animal (350 g día⁻¹), con capacidades de carga de 0,6 animales hectárea⁻¹ (Da Luz et al., 2019). Estos parámetros

productivos son susceptibles de incrementarse con el desarrollo de prácticas sostenibles de producción de forrajes, basadas en el uso de biofertilizantes, los cuales pueden mejorar la oferta y calidad nutricional de los forrajes en la región y propiciar, así, el aumento en la producción de carne por animal y unidad de área (Hungria et al., 2016; Zayed, 2018). Con base en lo anterior, se plantea la utilización de una cepa nativa de leguminosa forrajera desarrollada con la tecnología del uso de biofertilizantes para complementar la alimentación de bovinos de ceba en época seca con el propósito de mejorar los parámetros productivos.



Desarrollo de la investigación y resultados: evaluación en campo de *Vigna unguiculata*

El experimento se realizó en la Estación Experimental Motilonia de AGROSAVIA, localizada en la microrregión del Valle del Cesar, ubicada a una altitud de 160 ms.n.m., con una temperatura media anual de 29 °C, una precipitación promedio anual de 1.360 mm y enmarcada en la zona agroecológica Cj, correspondiente a trópico seco colombiano. Durante la época de lluvia, se estableció un lote de 0,7 ha de *Vigna unguiculata* inoculando la semilla con la cepa seleccionada, *Rhizobium* sp. G58A, la cual fue producida en medio de cultivo líquido YM (Vincent, 1970) a 30 °C, a 150 rpm, durante 24 horas. Se utilizaron 25 kg de semilla ha⁻¹ y distancias de 0,5 m entre surcos y de 15 cm entre plantas. Se realizó control de malezas con glifosato y basagran como control de ciperáceas y fertilización basal con DAP y KCL, según requerimientos y ajustes, por análisis de suelos (Figura 13.5). Adicionalmente, se evaluaron las características químicas del suelo al inicio y final del cultivo, utilizando los métodos descritos en el manual de suelos del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, 1989).

■ **Figura 13.5.** Fríjol establecido en campo.

Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Para la evaluación de la producción de heno al finalizar la época de lluvia se realizó la cosecha de fríjol caupí cuando el 70% de las vainas presentó llenado inicial del grano, el cual se llevó a exposición directa del sol para disminuir el porcentaje de humedad y obtener un porcentaje de materia seca cercano al 90%; esto, con el fin de elaborar, de forma manual, las pacas de heno. Así, se elaboraron pacas de 12 kg, aproximadamente, y se almacenaron para su posterior suministro a los animales.

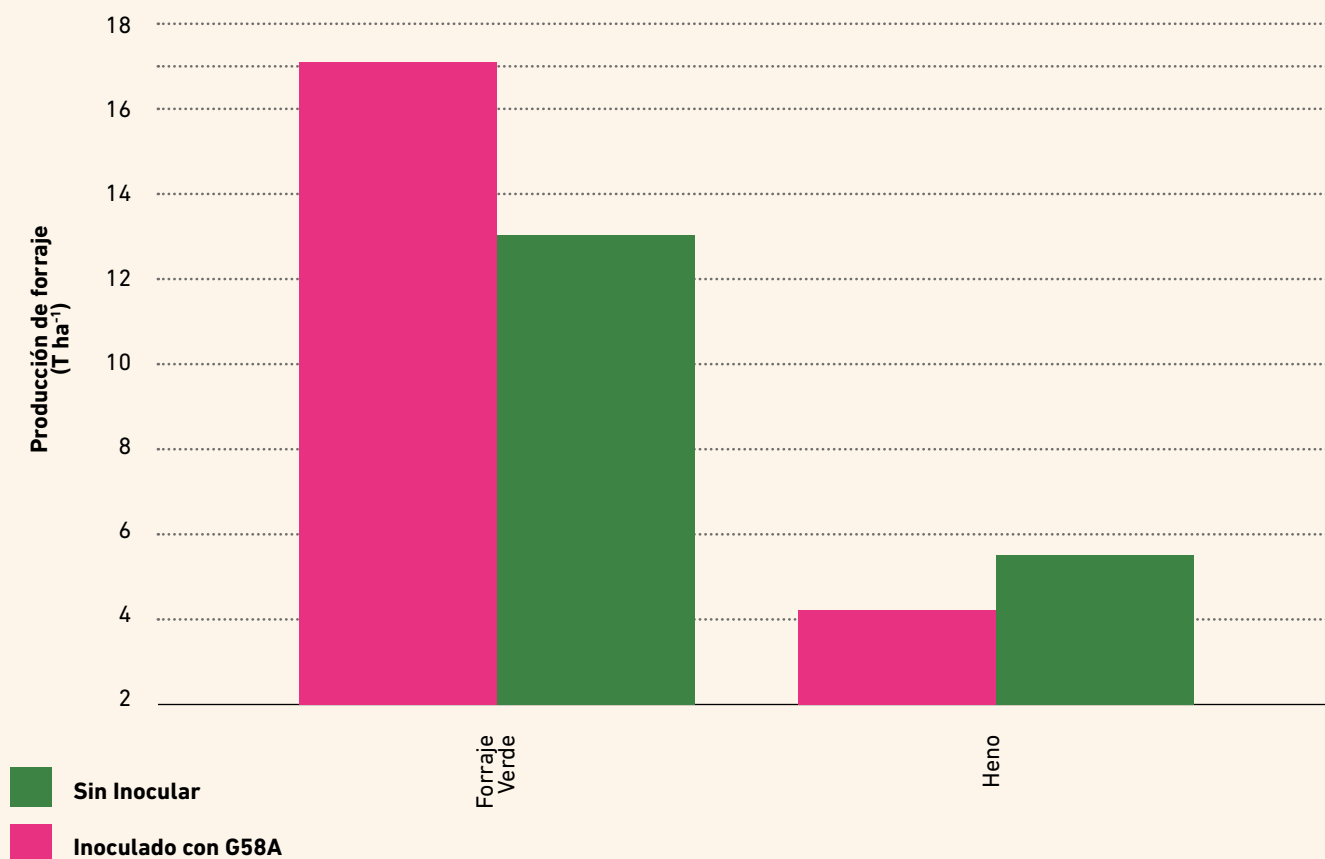
Con el fin de evaluar la calidad nutricional del forraje, los contenidos de carbohidratos y proteínas se determinaron por el sistema CNCPS, de la Cornell University (Fox et al., 2003); el fósforo y el calcio se determinaron, en su orden, por colorimetría y espectrofotometría; la digestibilidad, por el método de Tilley y Terry (1963), y FDN (fibra detergente neutra) y FDA (fibra detergente ácida), siguiendo los procedimientos de Van Soest et al. (1991).

Al realizar la inoculación de *Rhizobium* sp. G58A sobre *Vigna unguiculata*, los resultados mostraron un incremento del 30,8% en la producción de forraje verde y del 31,2% en la producción de heno, en comparación con el material sin inocular (Figura 13.6).



■ **Figura 13.6.** Producción de forraje verde y de heno de *Vigna unguiculata* con y sin inoculación con la cepa G58A.

Foto: Elaboración propia



Se observó un contenido más alto de proteína en el heno producido con semilla inoculada, lo cual se refleja en un producto de mayor calidad. Asimismo, se encontró un contenido de FDN y FDA menor en el heno inoculado, lo

cual es un indicador de mejora de la digestibilidad del ensilaje. En general, el heno se encuentra dentro de los parámetros normales de un heno bajo las condiciones de la zona (tabla 13.2).

■ **Tabla 13.2.** Calidad nutricional con fraccionamiento de proteínas para el heno, con y sin inoculación, en porcentaje.

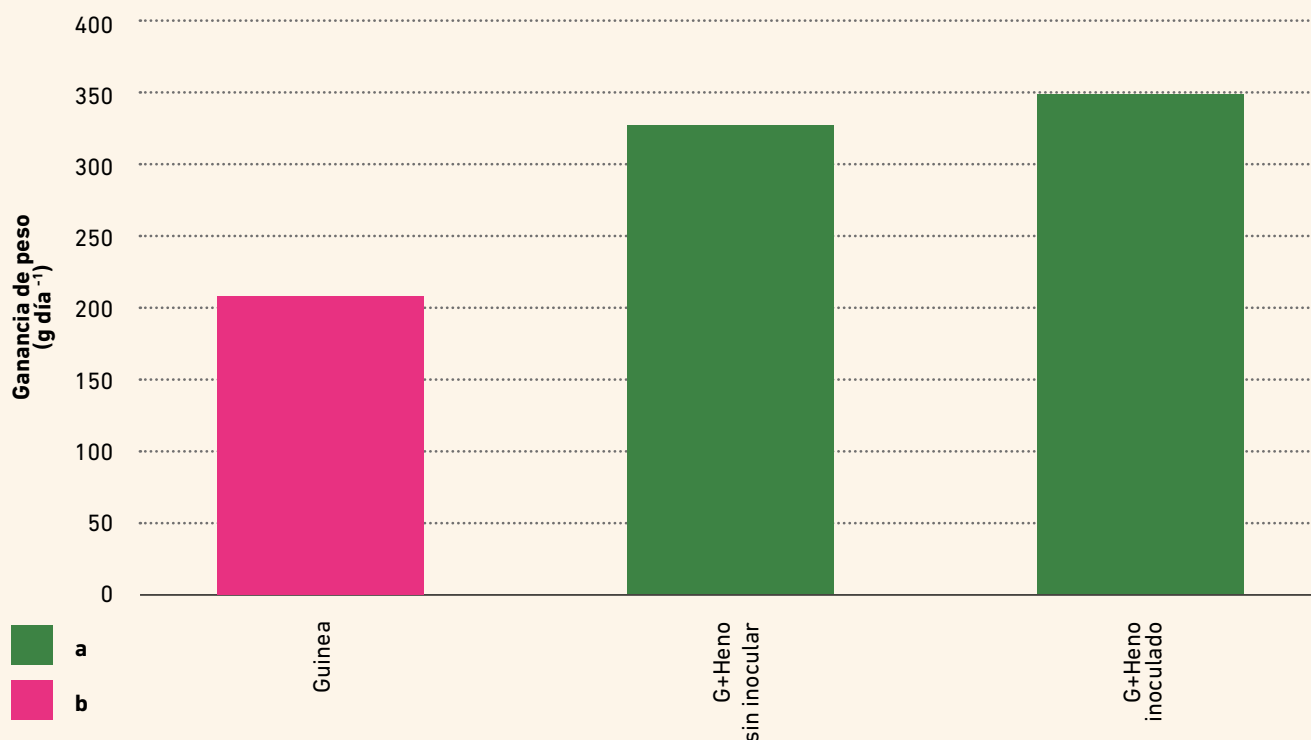
Fuente: Elaboración propia

| | | | | | |
|----------|--|----------|---|----------|--|
| 1 | Proteína Con inóculo: 17,15 Sin inóculo: 13,44 | 2 | FDN Con inóculo: 43,11 Sin inóculo: 52,11 | 3 | FDA Con inóculo: 29,66 Sin inóculo: 35,98 |
| 4 | Degradabilidad <i>in situ</i> Con inóculo: 69,95 Sin inóculo: 69,66 | 5 | Fracción A (NNP) Con inóculo: 6,29 Sin inóculo: 8,68 | 6 | Fracción B1 Con inóculo: 37,49 Sin inóculo: 44,81 |

Adicionalmente, se evaluó la respuesta animal calculando la ganancia de peso de los animales. Esta se evaluó mediante el pesaje individual de los terneros cada 28 días, con previo ayuno de 12 horas durante la fase experimental, y sometidos al manejo sanitario y general impartido en la explotación. Para el ensayo, se empleó un diseño completamente al azar, aplicando un

análisis de varianza con el procedimiento GLM (modelo lineal generalizado) de SAS (versión 9.0), y una comparación de medias por la prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95 %. La evaluación demostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la ganancia de peso en los tratamientos evaluados (Figura 13.7).

■ **Figura 13.7.** Ganancia diaria de peso en novillos alimentados con pasto guinea cv. Tanzania, pasto guinea cv. Tanzania más heno de *Vigna unguiculata* inoculado con *Rhizobium* sp. G58A y sin inocular.
Foto: Elaboración propia



La ganancia diaria de peso de los animales en los tratamientos en que se realizó la introducción de heno en el sistema de alimentación fue estadísticamente superior a la del tratamiento testigo. Sin embargo, pese a que no se presentó diferencia estadística en los tratamientos suplementados, la ganancia en peso de los animales fue mayor cuando se introdujo heno de frijol caupí inoculado en la dieta.

Conclusiones

La suplementación en terneros de levante con heno de *Vigna unguiculata* inoculada o sin inocular es superior en comparación con la ganancia de peso observada en el tratamiento de pasto guinea (*Panicum maximum* cv. Tanzania) como única fuente de alimentación. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre los tratamientos de suplementación con *Vigna unguiculata* inoculada y sin inocular. La suplementación con heno de *Vigna unguiculata* (inoculada y sin inocular) intensifica el sistema de producción al incrementar la carga animal en las praderas de pasto guinea, debido a la sustitución de una tercera parte de la oferta de pasto por el heno.



Referencias

- Bensidhoum, L., & Nabti, E.-H. (2020). Biofertilizers and biopesticides: Microbes for sustainable agriculture. En A. N. Yadav, A. A. Rastegari, N. Yadav, & D. Kour (eds.), *Advances in plant microbiome and sustainable agriculture: Diversity and biotechnological applications* (pp. 257-279). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3208-5_10
- Capstaff, N. M., & Miller, A. J. (2018). Improving the yield and nutritional quality of forage crops. *Frontiers in Plant Science*, 9, artículo 535. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00535>
- Castro-Rincon, E., Mojica-Rodríguez, J. E., Carulla-Fornaguera, J. E., & Lascano-Aguilar, C. E. (2018). Abonos verdes de leguminosas: integración en sistemas agrícolas y ganaderas del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 29(3), 711-729. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v29n3/1659-1321-am-29-03-00711.pdf>
- Da Luz, P. A. C., Andrighetto, C., Lupatini, G. C., Aranha, H. S., Trivelin, G. A., Mateus, G. P., Santos, C. T., Francisco, C. de L., Castilhos, A. M., & Jorge, A. M. (2019). Effect of integrated crop-livestock systems in carcass and meat quality of Nelore cattle. *Livestock Science*, 220, 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.11.018>
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd_Allah, E. F., & Hashem, A. (2017). Phytohormones and beneficial microbes: Essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*, 8, artículo 2104. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02104>
- Enciso, K., Sotelo, M., Peters, M., & Burkart, S. (2019). The inclusion of *Leucaena diversifolia* in a Colombian beef cattle production system: An economic perspective. *Tropical Grasslands*, 7(4), 359-369. [https://doi.org/10.17138/TGFT\(7\)359-369](https://doi.org/10.17138/TGFT(7)359-369)
- Fox, D., Tylutki, T., Tedeschi, L., Van Amburgh, M., Chase, L., Pell, A., Overton, T., & Russell, J. (2003). *Sistema de carbohidratos e proteínas "líquidos" para a avaliação da nutrição de rebanhos e excreção de nutrientes (CNCPS Versão 5.0): documentação do modelo CNCPS*. Embrapa Gado de Leite.
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 793-796. <http://aem.asm.org/content/61/2/793.abstract>
- Grossi, G., Goglio, P., Vitali, A., & Williams, A. G. (2018). Livestock and climate change: Impact of livestock on climate and mitigation strategies. *Animal Frontiers*, 9(1), 69-76. <https://doi.org/10.1093/af/vfy034>
- Grove, T. S., & Malajczuk, N. (1987). Nitrogen fixation (acetylene reduction) by forest legumes: Sensitivity to pre harvest and assay conditions. *New Phytologist*, 106(1), 115-127. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04795.x>



- Hungria, M., Nogueira, M. A., & Araujo, R. S. (2016). Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 221, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (1989). *Manual de análisis de suelos, plantas y aguas para riego* (Manual de Asistencia Técnica n.º 47).
- Lerner, A. M., Zuluaga, A. F., Chará, J., Etter, A., & Searchinger, T. (2017). Sustainable cattle ranching in practice: Moving from theory to planning in Colombia's livestock sector. *Environmental Management*, 60(2), 176-184. <https://doi.org/10.1007/s00267-017-0902-8>
- Massah, J., & Azadegan, B. (2016). Effect of chemical fertilizers on soil compaction and degradation. *Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America*, 47(1), 44-50.
- Oblinger, J. L., & Koburger, J. A. (1975). Understanding and teaching the most probable number technique. *Journal of Milk and Food Technology*, 38(9), 540-545. <https://doi.org/10.4315/0022-2747-38.9.540>
- Ohyama, T., & Pham, V. (2006). General methods to evaluate microbial activity. En Japan Atomic Industrial Forum (JAIF, ed.), *Biofertilizer manual* (pp. 3-17). https://www.fnca.mext.go.jp/bf/bfm/pdf/Biofertilizer_Manual.pdf
- Patrizi, N., Niccolucci, V., Castellini, C., Pulselli, F. M., & Bastianoni, S. (2018). Sustainability of agro-livestock integration: Implications and results of emergy evaluation. *Science of The Total Environment*, 622-623, 1.543-1.552. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.029>
- Poole, P., Ramachandran, V., & Terpolilli, J. (2018). Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 291-303. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.171>
- Saiz, E., Sgouridis, F., Drijfhout, F. P., & Ullah, S. (2019). Biological nitrogen fixation in peatlands: Comparison between acetylene reduction assay and $^{15}\text{N}_2$ assimilation methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 131, 157-165. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.01.011>
- Soares Filho, C. V., Cavazzana, J. F., Heinrichs, R., Vendramini, J. M. B., Lima, G. C., & Moreira, A. (2018). The impact of organic biofertilizer application in dairy cattle manure on the chemical properties of the soil and the growth and nutritional status of Urochroa grass. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 49(3), 358-370. <https://doi.org/10.1080/00103624.2018.1427261>
- Tilley, J. M. A., & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass and Forage Science*, 18(2), 104-111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
- Torabian, S., Farhangi-Abriz, S., & Denton, M. D. (2019). Do tillage systems influence nitrogen fixation in legumes? A review. *Soil and Tillage Research*, 185, 113-121. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.09.006>
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Symposium: Carbohydrate Methodology, Metabolism, and Nutritional Implications in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3.583-3.597. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria* (IBP Handbook no. 15). Blackwell Scientific.
- Zayed, M. S. (2018). Enhancement the feeding value of rice straw as animal fodder through microbial inoculants and physical treatments. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 7(2), 117-124. <https://doi.org/10.1007/s40093-018-0197-7>



Capítulo 13. Experiencia AGROSAVIA en Frijol (*Vigna unguiculata*) para ensilaje
 Uso de rizobios nativos en leguminosas forrajeras como biofertilizantes en el mejoramiento de la producción de ganado de carne en el Valledel Cesar

14

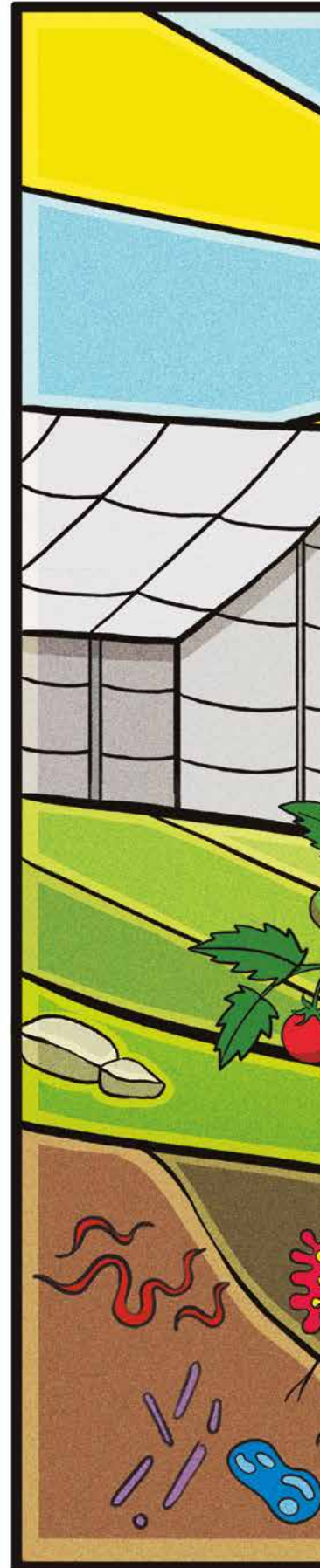
Experiencia

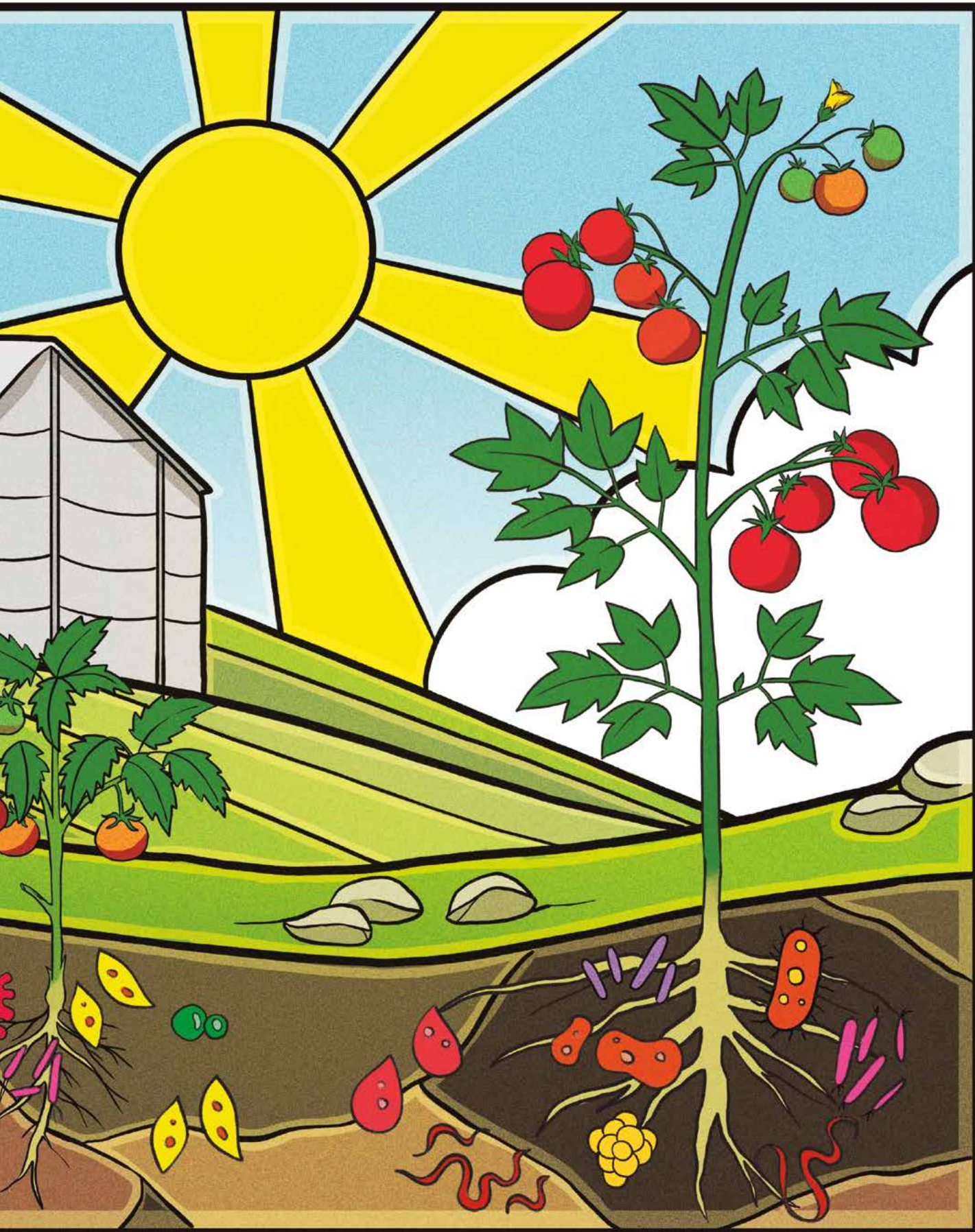
AGROSAVIA en Tomate (*Solanum lycopersicum*)

Evaluación del efecto de la
inoculación de bacterias fijadoras
de nitrógeno sobre la producción
de tomate (*Solanum lycopersicum*)
bajo condiciones de invernadero

Mauricio Camelo Rusinque¹
Andrea del Pilar Villarreal Navarrete²
Ingrid Marcela Preciado Monguí²
Marco Steve Suarez Estrada²
Sergio Pardo Díaz¹
Ruth Rebeca Bonilla Buitrago¹

-
1. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.
 2. Grupo de análisis espacio temporal y manejo de fenómenos fitosanitarios. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.





Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una hortaliza de gran importancia para el mundo, donde se producen 211.021.843 toneladas (Cámara de Comercio de Bogotá [ccb], 2015), así como para Colombia, donde hay 16.725 hectáreas sembradas, con una producción de 682.572 toneladas, principalmente en los departamentos de Boyacá, Antioquia, Norte de Santander y Cundinamarca, que concentran aproximadamente el 65 % de esta producción nacional (ccb, 2015).

El tomate es una de las hortalizas que ha presentado un mayor crecimiento en cuanto a producción y consumo finales; de hecho, se estima que este aumento es del 30 % en comparación con la década inmediatamente anterior, lo que se explica por el hecho de que el tomate es uno de los productos favoritos de la canasta familiar de muchos países por su versatilidad en las preparaciones.

A nivel nacional, según la base de evaluaciones agrarias del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Antioquia se ha posicionado como la región con mayor producción, al consolidar 156.421 toneladas, seguida por Norte de Santander, con 86.017; Boyacá, con 72.851; Cundinamarca, con 70.631, y Santander, con 65.948, para completar los primeros cinco departamentos de la lista (ccb, 2015).

Sin embargo, el cultivo de tomate es altamente dependiente de la fertilización de síntesis química para alcanzar estos elevados rendimientos de producción, pues necesita una alta disponibilidad de N, P, K, Ca, Mg, S y micronutrientes como Fe, Mn, Cu, B y Zn. El esquema de fertilización en este cultivo es muy importante, ya que debe ser equilibrado y estar acorde a su edad. Por ejemplo, se ha observado que cuando los agricultores sobrepasan la dosificación de N en el cultivo, se reducen considerablemente la formación de frutos y, por ende, los rendimientos de producción (García Muñoz et al., 2013).

AGROSAVIA, en cumplimiento de su misión de entregar soluciones tecnológicas a los pequeños y medianos productores agropecuarios colombianos, ha desarrollado bioproductos con muy buenos atributos y con potencial para ser usados en el cultivo de tomate, de tal manera que se pueda reducir el impacto negativo causado por las prácticas convencionales y se incrementen tanto la calidad del producto como la competitividad del sector. Uno de estos bioproductos con potencial es un biofertilizante a base de bacterias fijadoras de nitrógeno que ha sido capaz de reducir hasta en un 50 % la fertilización nitrogenada de síntesis química en cultivos como el algodón (Bonilla & Pedroza, 2003; Bonilla Buitrago et al., 2001; Bonilla Buitrago & Morales, 2005), el maíz y algunas pasturas.

Teniendo en cuenta lo anterior, se pretendió hacer más eficiente la nutrición de las plantas del cultivo de tomate, bajo condiciones de invernadero, por medio de la aplicación a las plantas del biofertilizante, para reducir la fertilización edáfica nitrogenada de síntesis química.

AGROSAVIA, en cumplimiento de su misión de entregar soluciones tecnológicas a los pequeños y medianos productores agropecuarios colombianos, ha desarrollado bioproductos con muy buenos atributos y con potencial para ser usados en el cultivo de tomate, de tal manera que se pueda reducir el impacto negativo causado por las prácticas convencionales y se incrementen tanto la calidad del producto como la competitividad del sector la fertilización edáfica nitrogenada de síntesis química.

Investigación desarrollada

Microorganismos y condiciones de cultivo

Las cepas AC1 y AC10 fueron suministradas por el Banco de Germoplasma de AGROSAVIA y fueron multiplicadas mediante fermentaciones discontinuas por separado, en medio de cultivo MBR (Moreno et al., 2011), en un biorreactor Minifors (INF-30174) de 5 L, en condiciones de 500 rpm, 1 vvm y 30 ± 2 °C, durante 24 horas. Finalmente, el consorcio bacteriano se preparó mezclando volúmenes iguales de ambas cepas.

Ubicación y diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en el Centro de Investigación Tibaitatá de AGROSAVIA, en el municipio de Mosquera, Cundinamarca, ubicado a 2.350 m s.n.m., con una temperatura media anual de 17 °C. Los tratamientos que se implementaron se encuentran descritos en la tabla 14.1.



Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

- **Tabla 14.1.** Tratamientos para la evaluación del biofertilizante Monibac en el cultivo de tomate bajo condiciones de invernadero
Fuente: Elaboración propia

| | | | |
|----------|---|----------|--|
| 1 | T1 Descripción: Testigo. Aplicación del 100% de todos los nutrientes | 5 | T5 Descripción: Aplicación del 80% de N |
| 2 | T2 Descripción: Aplicación del 80% de N + Monibac | 6 | T6 Descripción: Aplicación del 60% de N |
| 3 | T3 Descripción: Aplicación del 60% de N + Monibac | 7 | T7 Descripción: Aplicación del 40% de N |
| 4 | T4 Descripción: Aplicación del 40% de N + Monibac | | |



Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

Plántulas de tomate fueron inoculadas con Monibac (biofertilizante a base de las cepas AC1 y AC10), agregando 100 mL del biofertilizante en 10 L de agua limpia, con una previa imbibición de las raíces de las plantas antes de realizar el trasplante. Los tratamientos

fueron evaluados en un diseño de bloques completos al azar (DBCA), con tres repeticiones por tratamiento, para un total de 21 unidades experimentales (UE). Los parámetros medidos en el ensayo se encuentran descritos en la tabla 14.2.

■ **Tabla 14.2.** Variables asociadas a la respuesta de la planta
Fuente: Elaboración propia

1 Rendimiento y calidad de tomate

Descripción: Se tomaron datos de rendimiento total (peso de todos los frutos cosechados) de 10 plantas tomadas al azar con aparente crecimiento homogéneo, y se cosecharon todos los frutos viables. Se determinó la distribución de los frutos de tomate cosechados en las diferentes categorías comerciales (primera, segunda, tercera o cuarta); así, se clasificó el tomate de acuerdo con el peso: mayor a 120 g: primera categoría; 80-119 g: segunda; menos de 79 g: tercera; descarte: cuarta.

2 Vida poscosecha

Descripción: Se evaluó visualmente la madurez, sanidad y dureza de tres frutos escogidos de la misma categoría, en cada uno de los tratamientos evaluados. La evaluación se realizó en un estante metálico dentro de un cuarto aislado, donde se mantuvo la temperatura ambiente, en los tres eventos de muestreo.

Los tratamientos fueron establecidos de acuerdo con el análisis de suelo del sitio donde se estableció el ensayo. La fertilización edáfica base y la fertilización de mantenimiento (fertirriego) fueron establecidas según el análisis de suelo, la recomendación agronómica y el

ajuste para el cultivo. Tres meses después de la siembra, se inició la etapa de cosecha de los frutos de cada uno de los tratamientos, proceso que se llevó a cabo durante tres meses y medio, hasta la cosecha del décimo racimo en las plantas.

Resultados

Los resultados demostraron que el tratamiento 3 (Figura 14.1) (aplicación del 60% de N + Monibac) presentó una producción de 5,2 kg de tomate planta⁻¹, lo que representó un 0,5% más que el tratamiento 1, en el que se aplicó el 100% de la fertilización de síntesis. Sin embargo, no se pudieron evidenciar diferencias estadísticamente significativas en esta evaluación. Estos resultados demostraron que la aplicación del biofertilizante Monibac permite reducir la fertilización nitrogenada de síntesis química hasta en un 60% sin afectar los rendimientos de producción de tomate bajo condiciones de invernadero.

■ Figura 14.1. Producción de tomate durante un ciclo de cultivo.

Nota: Las barras representan la media de producción de 10 racimos durante 3 meses de evaluación. No se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia

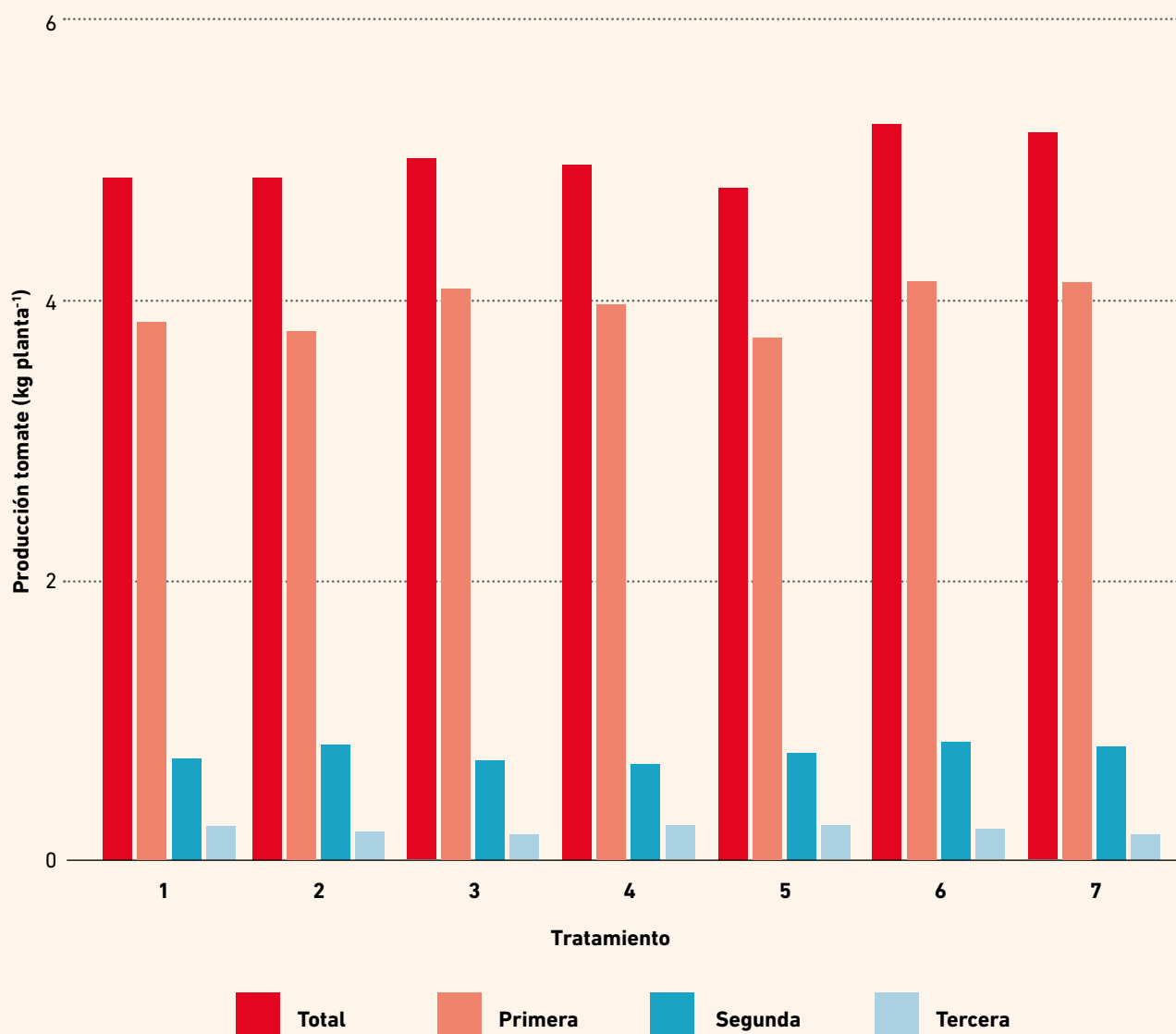




Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

El cultivo de tomate tiene altos requerimientos nutricionales; por ejemplo, necesita aplicaciones frecuentes de fertilizantes, y su aplicación, en dosis adecuadas y en el momento apropiado, de acuerdo con la etapa de crecimiento y la fenología de la planta, es la clave para obtener altos rendimientos en este cultivo. Las principales etapas de crecimiento del tomate son: fase vegetativa, floración, cuajado, crecimiento del fruto y cosecha. Asimismo, contar con resultados de la calidad del agua es de gran importancia, así como los análisis de suelos.

La aplicación de biofertilizantes como Monibac al sistema de cultivo beneficia a las plantas de diferentes formas, y esto se ve reflejado en el crecimiento y desarrollo del tomate bajo condiciones de invernadero. La producción de auxinas es uno de los principales mecanismos de promoción del crecimiento vegetal, ya que está fuertemente relacionada con los procesos de fructificación de las plantas (Dimkpa et al., 2009). Por esta razón, se puede inferir que la inoculación con este biofertilizante favoreció la producción de frutos, teniendo en cuenta que Monibac se caracteriza por producir sustancias tipo indol. Con relación a los resultados obtenidos en el presente estudio, se debe mencionar que otros autores (Ahemad & Kibret, 2014) han reportado la producción de indoles y sideróforos y la solubilización de fósforo como mecanismos que promueven el crecimiento de las plantas (Olanrewaju et al., 2017).

Otros autores han reportado el efecto de cepas de *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium leguminosarum* y *Pseudomonas putida* sobre la producción de tomate bajo condiciones de invernadero, al aumentar el número de frutos entre el 11 % y el 23,3 % (Escobar et al., 2011). Además, se ha reportado que *Pseudomonas fluorescens* incrementa esta producción hasta un 13,35 % (Kaur & Reddy, 2015); *Bacillus subtilis*, un 25 % (Almaghrabi et al., 2013), y *Gluconacetobacter diazotrophicus*, un 17,77 % (Ríos Rocafull et al., 2016), resultados que soportan lo encontrado en el presente estudio.

Adicionalmente, se debe señalar que el sustrato empleado en el ensayo fue suelo, posiblemente con importantes concentraciones de compuestos fosfatados orgánicos e inorgánicos no disponibles que gracias a la acción bacteriana fueron solubilizados y estuvieron disponibles para las plantas. En ese sentido, Hariprasad et al. (2009) evaluaron cepas de *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *P. putida*, *P. fluorescens* y *Enterobacter* sp., que no solo presentaron la capacidad de sintetizar ácido indol-3-acético (AIA), sino que además presentaron solubilización de fósforo bajo condiciones *in vitro*, por lo que se encontró un efecto positivo sobre el desarrollo de plantas de tomate en cuanto a su longitud radical, altura, producción de biomasa y adquisición de fósforo al inocular estas cepas (Atiyeh et al., 2000; De la Cruz-Lázaro et al., 2009).

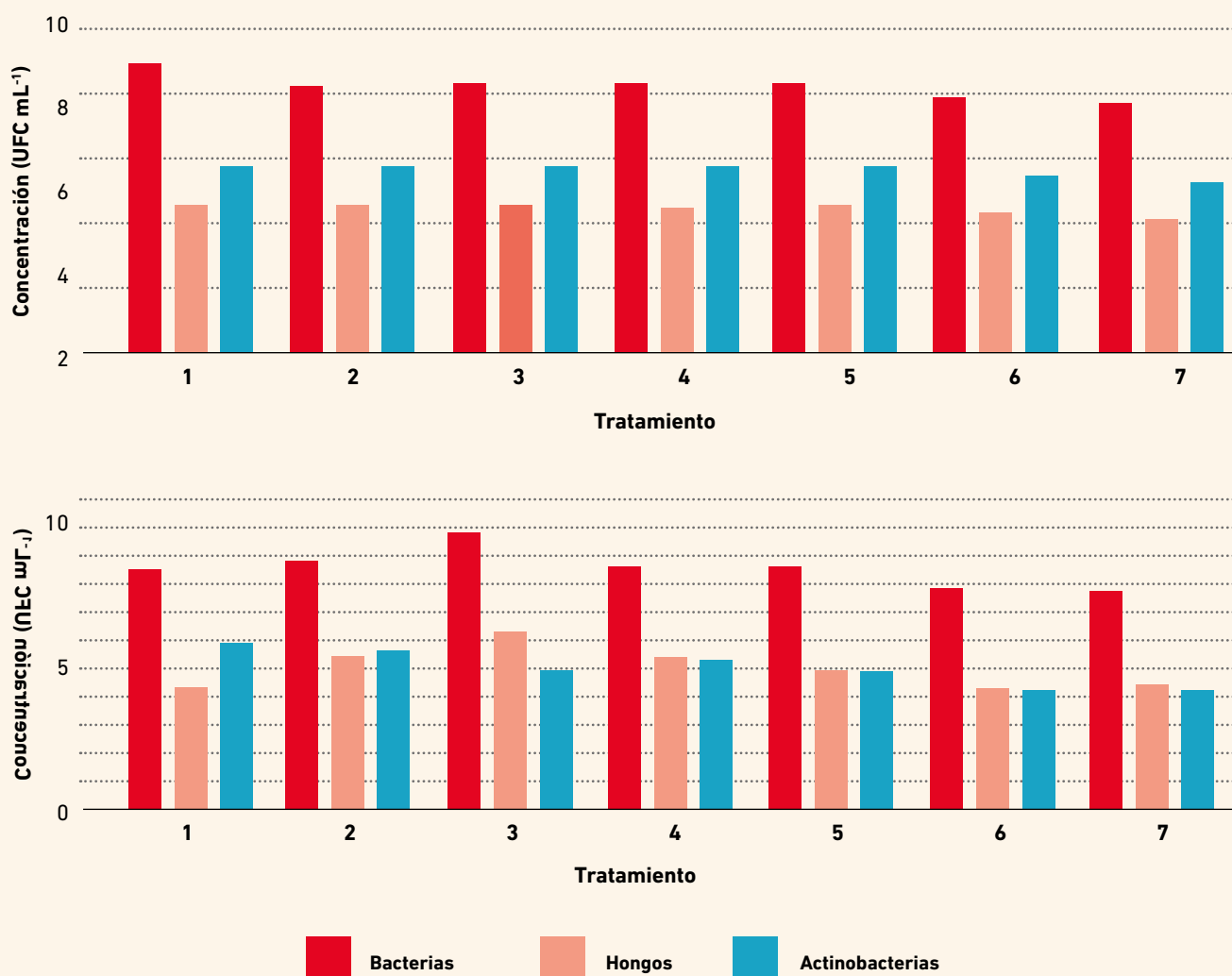
Con relación a lo anterior, se puede observar, en todas las variables agronómicas evaluadas, que los tratamientos inoculados que presentaron los mejores resultados siempre superaron o igualaron al testigo químico, lo cual demuestra la importancia de este tipo de inoculantes como complemento de la fertilización de síntesis, y esto permite reducir su dosis e impactar positivamente los cultivos, pues pueden posicionarse en mercados verdes (Rodríguez-Dimas et al., 2007; Romero-Perdomo et al., 2017).

Los resultados obtenidos por este estudio contrastaron con los publicados por Hashemimajd et al. (2004), quienes señalaron que el mejor desarrollo del cultivo de tomate

se dio con diferentes proporciones de sustrato orgánico (entre 25% y 50%). Las diferencias que se encontraron entre los tratamientos, a pesar de no ser estadísticamente significativas, se pueden deber a la densidad de los microorganismos, la tasa de mineralización y las características de cada uno de los sustratos (Santillana et al., 2005). Al observar los resultados descritos en la Figura 14.2, se puede encontrar la variación en la concentración de microorganismos (UFC g de suelo⁻¹) en todos los tratamientos antes de la aplicación del esquema de biofertilización (Figura 14.2a) y cuatro meses después de la siembra (Figura 14.2b). En el tratamiento 3 se observa un aumento en la cantidad de microorganismos respecto del tratamiento control (T1).

- **Figura 14.2.** Recuento de microorganismos totales (bacterias, hongos y actinobacterias). *a.* Antes de la aplicación de materia orgánica como enmienda de la fertilización edáfica; *b.* Cuatro meses después de la siembra.

Fuente: Elaboración propia



De acuerdo con Márquez-Quiroz et al. (2013), la cantidad de microorganismos totales es importante para definir la calidad de los suelos destinados al cultivo de tomate bajo condiciones de invernadero. Según la comparación de medias, se pueden estimar diferencias estadísticas entre los tratamientos propuestos, razón por la cual se hace evidente la importancia de la adición de microorganismos al suelo, ya que se establecen relaciones benéficas entre las bacterias y hongos y las raíces de las plantas, y de esta manera se puede aumentar la eficiencia en la toma de nutrientes por parte de las células vegetales.

En el ensayo poscosecha se pudo observar que los tomates recolectados y almacenados pertenecientes al tratamiento 1 presentaron signos de deterioro después del día 15 de evaluación (Figura 14.3a), mientras que los tomates recolectados de los tratamientos inoculados presentaron estos mismos síntomas a partir del día 21 de evaluación (Figura 14.3b), lo que representa un aumento de la vida en poscosecha del 40 % con respecto al testigo.

■ **Figura 14.3.** Evaluación de los tomates en poscosecha. *a.* Tratamiento testigo; *b.* Tratamiento 3.

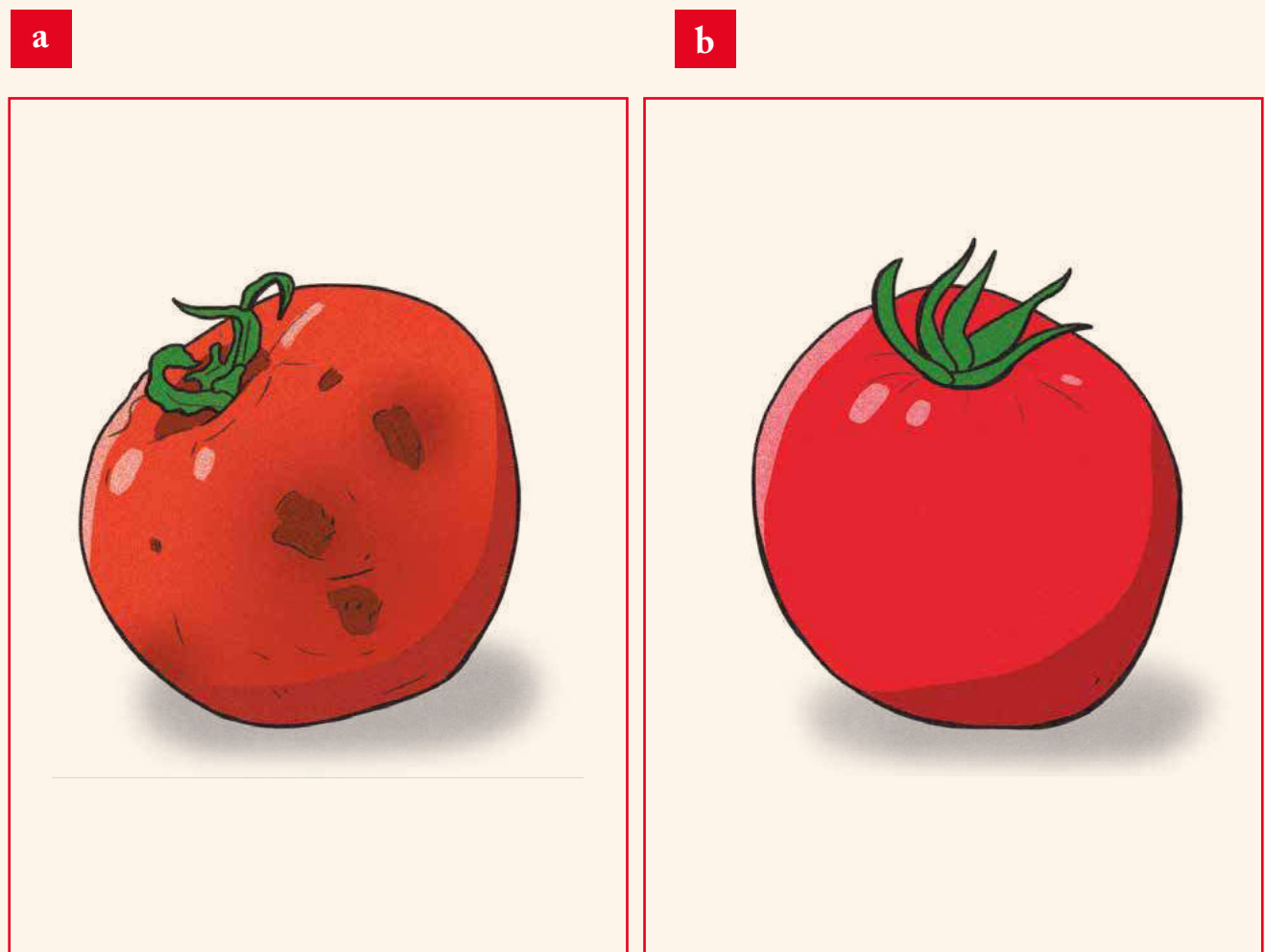




Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

Conclusiones

De forma preliminar, se puede establecer que la inoculación de las plantas de tomate con el biofertilizante Monibac exhibe un gran potencial para estimular el crecimiento y la producción de este cultivo. El uso de este tipo de bioproductos puede ser una alternativa prometedora para el cultivo de tomate y la producción en la agricultura sostenible, teniendo en cuenta que disminuiría el impacto sobre el medio ambiente al reducir el uso excesivo de fertilizantes de síntesis química. De igual forma, se podrán reducir los costos de producción

por el rubro de fertilización, al requerirse la mitad de la dosis del fertilizante químico, que, al ser suplementado con el biofertilizante, genera los mismos resultados. Por tanto, la inoculación con estos microorganismos promotores del crecimiento vegetal representa una alternativa limpia y segura para asegurar la fertilización de los cultivos sin incurrir en los costos ambientales y económicos de la fertilización química tradicional, lo que aporta, así, a mejorar la calidad de vida de los productores de tomate.

Referencias

- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Almaghrabi, O. A., Massoud, S. I., & Abdelmoneim, T. S. (2013). Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20(1), 57-61. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.10.004>
- Atiyeh, R. M., Domínguez, J., Subler, S., & Edwards, C. A. (2000). Changes in biochemical properties of cow manure during processing by earthworms (*Eisenia andrei*, Bouché) and the effects on seedling growth. *Pedobiologia*, 44(6), 709-724. [https://doi.org/10.1078/S0031-4056\(04\)70084-0](https://doi.org/10.1078/S0031-4056(04)70084-0)
- Bonilla, R., & Pedroza, A. M. (2003). Aislamiento, caracterización y producción semi-industrial de *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter vinelandii* [boletín técnico Corpoica: 7:16].
- Bonilla Buitrago, R., & Morales, J. G. (2005). Monibac: un biofertilizante con base en cepas nativas de *Azobacter* sp. para incrementar la productividad y sostenibilidad del algodón. *Revista Innovación y Cambio Tecnológico*, 4(3-4), 30-34. https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/15346/42804_46937.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Bonilla Buitrago, R. R., Novo Sordo, R., Venegas, N., Galvis, A. M., Martínez, M. M., Parra, D., & Vanegas, O. (2001). *Generación de tecnologías para la utilización de la fijación no simbiótica de nitrógeno como alternativa de fertilización*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/2159/42346_46114.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cámara de Comercio de Bogotá (ccb). (2015). *Manual tomate. Programa de Apoyo Agrícola y Agroindustrial. Vicepresidencia de Fortalecimiento Empresarial Cámara de Comercio de Bogotá*. <https://bibliotecadigital.ccb.org.co/bitstream/handle/11520/14307/Tomate.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- De la Cruz-Lázaro, E., Estrada-Botello, M. A., Robledo-Torres, V., Osorio-Osorio, R., Márquez-Hernández, C., & Sánchez-Hernández, R. (2009). Producción de tomate en invernadero con composta y vermicomposta como sustrato. *Universidad y Ciencia*, 25(1), 59-67. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792009000100004
- Dimkpa, C., Weinand, T., & Asch, F. (2009). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell & Environment*, 32(12), 1.682-1.694. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02028.x>
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., & Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2(1), 39-49. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2011.01.05>
- García Muñoz, M. C., Jaramillo Noreña, J. E., & Rodríguez, V. P. (2013). Poscosecha de tomate. En Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica, ed.), *Tecnología para el cultivo de tomate bajo condiciones protegidas* (pp. 427-466). <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/13320>
- Hariprasad, P., Navya, H. M., Chandra nayaka, S., & Niranjana, S. R. (2009). Advantage of using PSIRB over PSRB and IRB to improve plant health of tomato. *Biological Control*, 50(3), 307-316. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.04.002>
- Hashemimajd, K., Kalbasi, M., Golchin, A., & Shariatmadari, H. (2004). Comparison of vermicompost and composts as potting media for growth of tomatoes. *Journal of Plant Nutrition*, 27(6), 1.107-1.123. <https://doi.org/10.1081/PLN-120037538>
- Kaur, G., & Reddy, M. S. (2015). Effects of phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. *Pedosphere*, 25(3), 428-437. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)30010-2](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)30010-2)
- Márquez-Quiroz, C., López-Espinosa, S. T., Cano-Ríos, P., & Moreno-Reséndez, A. (2013). Fertilización orgánica: una alternativa para la producción de chile piquín bajo condiciones protegidas. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 19(3), 279-286. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.12.072>
- Moreno, A. E., Rojas, D. F., & Bonilla, R. R. (2011). Aplicación de diseños estadísticos secuenciales en la identificación de fuentes nutricionales para *Azotobacter chroococcum* AC1. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 151-158. https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:226
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), artículo 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Ríos Rocafull, Y., Dibut Álvarez, B., Rojas Badía, M., Ortega García, M., Arozarena Daza, N., & Rodríguez Sánchez, J. (2016). Interaction of the bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* and root vegetables. *Cultivos Tropicales*, 37, 28-32. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2799.0640>
- Rodríguez-Dimas, N., Cano-Ríos, P., Favela-Chávez, E., Figueroa-Viramontes, U., De Paul-Álvarez, V., Palomo-Gil, A., Márquez-Hernández, C., & Moreno-Reséndez, A. (2007). Vermicomposta como alternativa orgánica en la producción de tomate en invernadero. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 13(2), 185-192. <https://www.redalyc.org/pdf/609/60913280011.pdf>
- Romero-Perdomo, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galván, A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., & Bonilla, R. (2017). *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006>
- Santillana, N., Arellano, C., & Zúñiga, D. (2005). Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*, 4, 47-51. <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v4n1-2/a07v4n1-2.pdf>



Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

15

Desarrollo tecnológico de biofertilizantes en Colombia: experiencia en AGROSAVIA

Andrés Díaz García¹
Martha Isabel Gómez Álvarez¹
Ginna Milena Quiroga Cubides¹
Erika Paola Grijalba Bernal¹
María Margarita Ramírez Gómez²
Mauricio Camelo Rusinque³
Ruth Rebeca Bonilla Buitrago³

-
1. Bioproductos y Bioprocesos Agropecuarios. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA. Sede Central. Cundinamarca. Colombia.
 2. Raíces del Futuro. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA. Sede Central. Cundinamarca. Colombia.
 3. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.





Introducción

El desarrollo tecnológico de biofertilizantes requiere el trabajo en equipo de especialistas en diversas disciplinas que abarcan la biología, la ingeniería agrícola, la microbiología, la ingeniería química y la química farmacéutica, entre otras, con el fin de aplicar sus conocimientos y experiencia en las diferentes etapas de investigación en campo, laboratorio y planta piloto. Desde hace más de veinte años, en

AGROSAVIA se han realizado trabajos de investigación con microorganismos fijadores de nitrógeno que han resultado en el registro de bioproductos o inoculantes de alta calidad y elevada eficiencia en diferentes sistemas vegetales. A continuación se describen algunos casos de estudio asociados a las etapas de producción por fermentación y formulación de biofertilizantes en el contexto nacional.

Caso de estudio AGROSAVIA: diseño de una formulación sólida a base de *Bradyrhizobium japonicum* (J96) para su uso en soya

Existe una gran cantidad de soportes o portadores para inoculantes, entre los cuales se conocen el cuarzo, arenas, arcillas, materiales inertes, el bagazo y la turba (Ben Rebah et al., 2007; Brockwell et al., 1988; Daza et al., 2000; Roughley, 1970; Smith, 1992; Stephens & Rask, 2000). Las turbas son los materiales más comúnmente utilizados en el mundo para la producción de inoculantes (Hartley et al., 2005; Smith, 1995).

En Colombia, la consecución de turbas aptas para este propósito es limitada, de manera tal que son pocos los materiales que se tienen identificados como promisorios. Por esta razón, se evaluaron dos materiales turbosos denominados La Selva y La Laguna, debido a su alta capacidad de retención de humedad, ausencia de elementos tóxicos, facilidad de esterilización, adecuada aireación y fácil manejo en su producción y en su aplicación en campo, además de que permiten una fácil liberación de la bacteria en campo y son de bajo costo (Bashan, 1998; Ben Rebah et al., 2002; Burton, 1981; Denardin & Freire, 2000; Hartley et al., 2005; Munévar, 1989; Smith, 1995).

Se establecieron experimentos de evaluación del soporte o portador con la cepa *Bradyrhizobium japonicum* ICA J01 durante un periodo de 30 días,

tomando como testigo el portador convencional (turba La Selva). De igual manera, utilizando los dos portadores, se adelantaron pruebas de supervivencia de la cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ICA T13, por el método de infección de plantas, durante 230 días. Los portadores fueron esterilizados en autoclave antes de preparar los inoculantes, y con cada uno se hicieron tres bolsas de inoculantes (réplicas), para cada especie de rizobio, y la supervivencia del microorganismo se determinó por recuento en placa.

Las dos evaluaciones descritas demostraron que el portador La Laguna ofrece condiciones que permiten el mismo nivel de supervivencia de los rizobios que el portador La Selva (tabla 15.1). Para ambos portadores, los recuentos de células después de 6 meses de preparación del inoculante superaron los valores exigidos por las normas de calidad internacionales (de 100 a 1.000 millones de células por gramo). Lo anterior permitió concluir que la utilización de los dos portadores, La Selva o La Laguna, es adecuada para la producción de inoculantes. Estos resultados aportaron una solución tecnológica para superar un factor limitante en la producción de inoculantes, como lo es la selección de un portador eficiente.

■ **Tabla 15.1.** Tiempo de supervivencia de *Bradyrhizobium japonicum* ICA J01 y *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ICA T13 (log UFC g⁻¹) sobre dos tipos de turba
Fuente: Munévar (1989)

| Tiempo del inoculante (días) | <i>B. japonicum</i> | | <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> | |
|---------------------------------|---------------------|-----------|---|-----------|
| | La Selva | La Laguna | La Selva | La Laguna |
| 0 | 7,74 | 7,69 | >7,84 | >7,84 |
| 7 | 9,78 | 9,43 | 7,60 | 7,41 |
| 14 | 9,77 | 9,61 | ND | ND |
| 21 | ND | ND | 8,34 | 8,10 |
| 30 | 9,49 | 9,42 | 7,00 | 7,50 |
| 60 | 9,76 | 9,87 | 7,65 | 7,23 |
| 90 | 9,86 | 9,88 | >8,84 | >8,84 |
| 120 | 9,83 | 9,65 | ND | ND |
| 140 | ND | ND | 9,53 | 9,37 |
| 160 | 9,87 | 9,93 | ND | ND |
| 180 | 9,77 | 9,69 | ND | ND |
| 200 | ND | ND | 9,10 | 9,22 |
| 230 | ND | ND | 9,56 | 9,68 |
| 300 | 9,90 | 9,74 | ND | ND |

Nota: ND: No determinado.

A pesar del importante papel que juegan las leguminosas para la economía de Colombia, el uso de inoculantes no había tenido una amplia adopción, en gran medida debido a la falta de inoculantes de buena calidad en el mercado. Desde 1985 se identificó la necesidad de contar en el país con una

producción nacional de inoculantes para leguminosas que fuera satisfactoria para nuestras necesidades, para lo cual el Estado, a través del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), inició la producción de estos fertilizantes biológicos con una alta aceptación en los productores.

Caso de estudio AGROSAVIA: diseño de una formulación líquida a base de *B. japonicum* (J96) para su uso en soya

Aunque los inoculantes sólidos favorecen la supervivencia en el suelo de las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno del género *Bradyrhizobium* sp., el uso de turbas u otros soportes similares presenta limitaciones desde el punto de vista de la sostenibilidad a largo plazo, por ser recursos no renovables; además, cuando la siembra es mecanizada, es preferible tratar las semillas con

inoculantes líquidos de alta densidad celular (Menéndez et al., 2014), y este tipo de formulación facilita el manejo del bioproducto, tanto para peletización de semillas como para su aplicación en campo en numerosos sistemas vegetales. Por tanto, el desarrollo de formulaciones líquidas estables en el tiempo, bajo diferentes condiciones de almacenamiento, ha adquirido un renovado interés.

Desarrollo del medio de cultivo para *B. japonicum*, cepa J96

La fermentación de *B. japonicum* (J96) se llevó a cabo en erlenmeyers de 1 L con un volumen efectivo de trabajo (VET) de 750 mL. Como medio de fermentación, se utilizó el caldo extracto de levadura-manitol (YMA), que fue inoculado con una suspensión del microorganismo ajustada en 1×10^9 UFC mL⁻¹, en una relación del 12 % v/v del VET, y se dejó en incubación a una temperatura

de 28 ± 2 °C y a 150 rpm por 7 días. Después de este tiempo, se evaluó la viabilidad de *B. japonicum* mediante recuento en placa en agar YMA, así como el pH, mediante un potenciómetro Hanna Checker A. Para los diferentes lotes de producción obtenidos, la viabilidad se encontró en el rango de $1,5 \times 10^9$ a $1,7 \times 10^9$ UFC mL⁻¹, y el pH, entre 5,96 y 6,34.

Desarrollo de la formulación a base de *B. japonicum*, cepa J96

A partir de una revisión de la literatura, se seleccionaron los coadyuvantes por incluir en el diseño de una suspensión acuosa. Entre las sustancias utilizadas, se consideraron las siguientes: a) viscosantes o adherentes, que ayudan a que el microorganismo se adhiera a las semillas de soya, además de que pueden proteger a las bacterias de la desecación después de la aplicación y, de esta manera, contribuir a su eficacia; b) reductores de actividad de agua, que disminuyen la cantidad de agua metabólicamente disponible para ser utilizada por el microorganismo, sin causar la muerte de este, y que, al detener su crecimiento y reducir su metabolismo, pueden otorgarle mayor estabilidad durante el almacenamiento; c) los emulsificantes, que mejoran la homogeneidad de la suspensión, evitando la formación de agregados del principio activo y permitiendo que la concentración sea uniforme.

Posteriormente, se llevó a cabo una prueba de compatibilidad de los coadyuvantes seleccionados, realizando una mezcla binaria con *B. japonicum* (J96) (coadyuvante-microorganismo) a dos concentraciones diferentes, determinando el número de unidades formadoras de colonia (UFC mL⁻¹) después de 7 días de incubación a temperatura ambiente. Finalmente, para seleccionar los coadyuvantes por incluir en la formulación, se planteó una matriz de decisión en la que se tuvieron en cuenta tres criterios: la compatibilidad de las sustancias con *B. japonicum*, la carga microbiana del coadyuvante y el costo de las sustancias. Después de la selección de los coadyuvantes, se diseñaron 12 prototipos de formulación que fueron elaborados adicionando al caldo de fermentación de *B. japonicum* (J96) el reductor de actividad de agua, los

emulsificantes y el regulador de pH. Esta mezcla se realizó con un homogeneizador Bar-Spin Orto Alresa a 500 rpm, aproximadamente, durante 2 minutos, se adicionó el viscosante y se sometió nuevamente a agitación, hasta completar la homogeneización. Cada prototipo de formulación se caracterizó a nivel microbiológico y físico-químico. Para el primer caso, se evaluó la viabilidad del microorganismo mediante

recuento en placa en agar YMA, y, para el segundo, se determinó tanto el pH, mediante un potenciómetro Hanna Checker A, como la actividad de agua (A_w), con un *thermoconstanter* Novasina MS1- A_w . Los prototipos obtenidos se dejaron en almacenamiento a temperatura ambiente (18 ± 2 °C) durante un mes, tiempo después del cual se evaluó nuevamente la viabilidad, el pH y la A_w (tabla 15.2).

■ **Tabla 15.2.** Composición y características de los prototipos de formulación (suspensiones acuosas) a base de *B. japonicum* (J96)
Fuente: Elaboración propia

| Prototipo | Característica | | | |
|------------|----------------|-------|---------------------------------------|--|
| | pH | A_w | Concentración (UFC mL ⁻¹) | |
| | | | Tiempo 0 | Tiempo 1 (un mes de almacenamiento) |
| P1 | 6,42 | 0,92 | $1,60 \times 10^9$ | $1,30 \times 10^8$ |
| P2 | 6,62 | 0,90 | $1,70 \times 10^9$ | $1,07 \times 10^9$ |
| P3 | 6,35 | 0,93 | $2,10 \times 10^9$ | $2,50 \times 10^7$ |
| P4 | 6,66 | 0,91 | $1,50 \times 10^9$ | $3,30 \times 10^8$ |
| P5 | 6,40 | 0,92 | $1,80 \times 10^9$ | $2,60 \times 10^8$ |
| P6 | 6,30 | 0,91 | $1,13 \times 10^9$ | $9,50 \times 10^7$ |
| P7 | 6,47 | 0,94 | $1,90 \times 10^9$ | $1,20 \times 10^9$ |
| P8 | 6,47 | 0,92 | $1,40 \times 10^9$ | $< 1,00 \times 10^7$ |
| P9 | 6,58 | 0,94 | $1,75 \times 10^9$ | $1,30 \times 10^7$ |
| P10 | 6,67 | 0,94 | $1,92 \times 10^9$ | $2,50 \times 10^7$ |
| P11 | 6,75 | 0,94 | $2,30 \times 10^9$ | $2,00 \times 10^9$ |
| P12 | 6,24 | 0,91 | $1,30 \times 10^9$ | $1,20 \times 10^8$ |

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron tres prototipos, denominados P2, P7 y P11, ya que después de un mes de almacenamiento a temperatura ambiente mantuvieron estable la concentración de *B. japonicum* (J96).

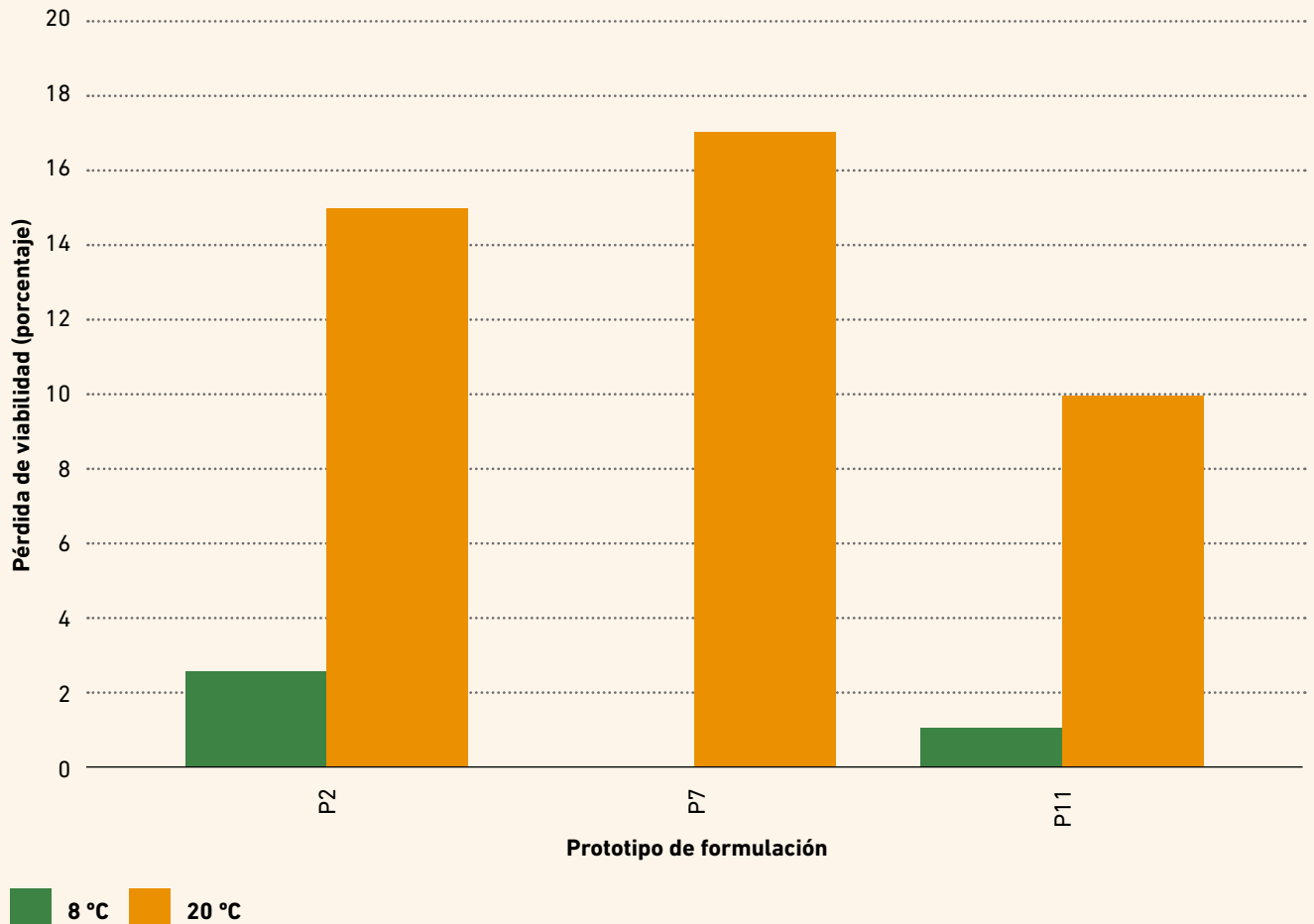
Estos prototipos fueron sometidos a un estudio de estabilidad durante 4 meses, almacenándolos a 8 ± 2 °C y 18 ± 2 °C. Cada mes se tomaron muestras de cada prototipo, a las que se les evaluó la viabilidad, mediante recuento en placa en LMA, y el pH. Asimismo, se evaluó la actividad biológica sobre la semilla de soya, para lo cual se determinó la biomasa, expresada como el peso seco radical y foliar; la longitud radical y foliar, y la cantidad de nódulos formados. Para esto, los prototipos fueron aplicados sobre 10 g de semilla de soya, variedad Superior 6 y línea 29, y estas se dejaron secar a temperatura ambiente, durante 6 horas,

antes de sembrarlas. La evaluación de las variables planteadas para determinar la actividad biológica se llevó a cabo 45 días después de la siembra.

Los resultados de viabilidad obtenidos se expresaron como pérdida de esta después de 4 meses de almacenamiento a las dos temperaturas evaluadas (Figura 15.1). En general, se observó el efecto de la temperatura sobre los prototipos evaluados, siendo menor la pérdida de viabilidad a 8 ± 2 °C en comparación con la temperatura a 18 ± 2 °C. A esta última temperatura, el prototipo P11 presentó una pérdida de viabilidad significativamente menor en comparación con P2 y P7 ($p < 0,005$). Con respecto al pH, el prototipo P7 fue el más estable a las dos temperaturas de almacenamiento, con una variación entre 5,92 y 5,61 a 8 ± 2 °C y entre 5,92 y 5,52 a 18 ± 2 °C. En contraste, los prototipos P2 y P11 redujeron su valor de pH en más de una unidad después del tiempo de 4 meses de almacenamiento a las dos temperaturas evaluadas.

■ **Figura 15.1.** Pérdida de viabilidad de tres prototipos de formulación (suspensiones acuosas) almacenados a 8 ± 2 °C y 18 ± 2 °C durante 4 meses.

Fuente: Elaboración propia



Finalmente, al evaluar en plantas de soya la actividad biológica con los tres prototipos —frescos (recién preparados) y después de 4 meses de almacenamiento—, se observó un mayor desarrollo de las plantas, expresado en longitud foliar y radical, al igual que una mayor formación de nódulos, en comparación con el testigo absoluto, en el que no se adicionó ningún tipo de fertilización. Estos resultados evidenciaron que con los tres prototipos se mantuvo la actividad biológica de *B. japonicum* (J96) y que su aplicación ejerce un efecto positivo sobre las plantas, tanto en su desarrollo como en la formación de las estructuras típicas de los rizobios (nódulos), que son las que les permiten establecerse en la raíz y realizar la fijación de nitrógeno. Este proceso es mediado por un complejo enzimático denominado *complejo nitrogenasa*, convirtiendo el nitrógeno gaseoso (N_2) en amoníaco (NH_3) o nitrato (NO_3^-) para hacerlo asimilable por la planta. Teniendo en cuenta los resultados del estudio de estabilidad, en los que no hay un efecto del almacenamiento sobre la actividad biológica del microorganismo en ninguno de los tres prototipos de formulación, y que el prototipo P11 mantuvo el valor de pH estable a las dos temperaturas de almacenamiento durante los 4 meses de evaluación, se decidió seleccionar este prototipo para continuar su evaluación en condiciones de campo.

Hoy en día, la práctica de inoculación con rizobios en soya está ampliamente difundida entre los productores. Desde 2017 AGROSAVIA ha medido el impacto del uso de bacterias fijadoras de nitrógeno en soya y ha encontrado ventajas ambientales, sociales y económicas en el uso de esta tecnología. Ambientalmente, la disminución del uso de urea mejora la calidad de los suelos y reduce el uso de maquinaria agrícola; económicamente, el costo de producción se reduce en un 9%, y el rendimiento por ciclo productivo en la altillanura colombiana es superior en un 20% con respecto a cultivos sin inoculación. Según el *Balance social 2017* de AGROSAVIA, ese año se presentó un beneficio económico para los productores de 16.000 millones de pesos, y para 2018 se estimó que el beneficio económico adicional para los productores de soya en la altillanura por el uso de rizobios fue superior a los 17.000 millones de pesos. En ambos años, el uso de la biotecnología presentó un impacto ambiental positivo, debido a la sustitución de fertilizantes nitrogenados de síntesis química por los biofertilizantes.



Caso de estudio AGROSAVIA: diseño de una formulación sólida de Monibac (*Rhizobium* sp. AC1 y *Agrobacterium pusense* AC10) para su uso en algodón

Las prácticas agrícolas inadecuadas, entre las que se encuentra el uso indiscriminado de fertilizantes químicos, han causado una reducción en la capacidad productiva de los suelos, debido principalmente a la degradación de sus características físicas, químicas y biológicas. Por esta razón, el uso de biofertilizantes ha tomado cada vez más relevancia como complemento a la fertilización química. La utilización de microorganismos benéficos nativos asociados a las plantas que se han estudiado —en el caso de AGROSAVIA— ha permitido la liberación de nutrientes inorgánicos, lo que se ve reflejado en una productividad sostenible al reducir la fertilización de síntesis nitrogenada y fosfórica (Camelo-Rusique et al., 2017).

Aislamiento del principio activo

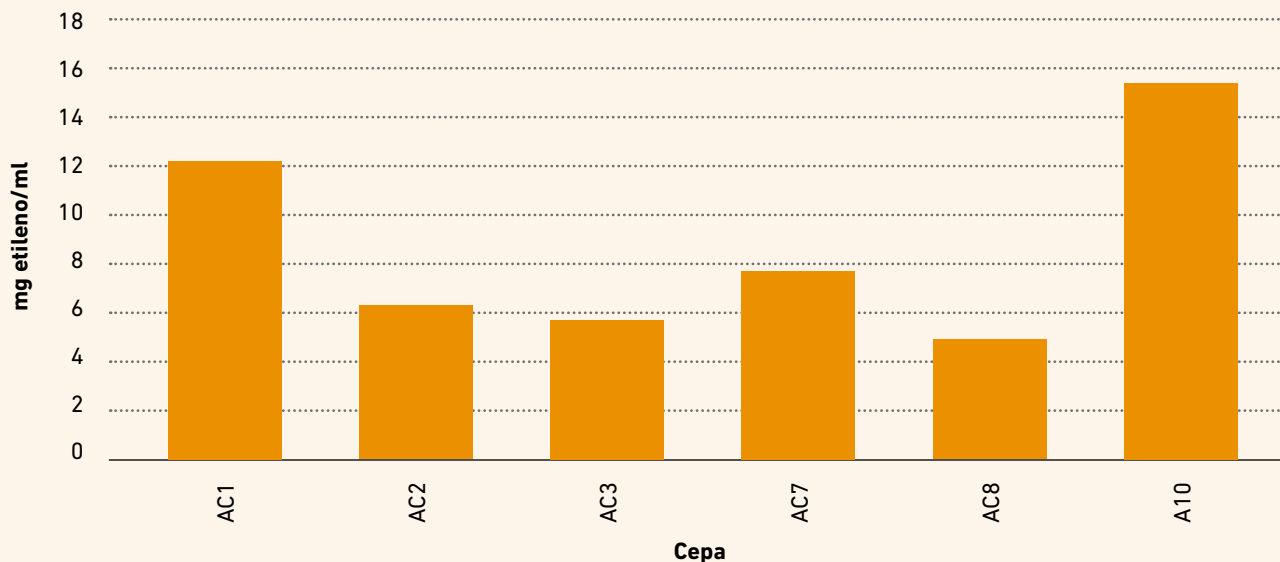
Teniendo en cuenta la anterior premisa, AGROSAVIA tomó la determinación de desarrollar un biofertilizante con la capacidad de fijar el nitrógeno presente en la atmósfera, para ser comercializado principalmente en el sector algodonero de nuestro país. La búsqueda de estas bacterias fue realizada a través de un proceso de bioprospección en suelos destinados al cultivo del algodón, en el Caribe seco colombiano (Rivera et al., 2010). La principal bacteria encontrada en esos suelos fue *Azotobacter* sp., que es un microorganismo habitante regular del suelo, fijador de nitrógeno y productor de sustancias promotoras del crecimiento vegetal. Este microorganismo se encuentra generalmente asociado a la rizósfera (zona de las raíces) y a las hojas (filósfera) de muchas plantas, y es capaz de generar estructuras de resistencia especiales, llamadas *quistes*. Varias investigaciones a nivel mundial han demostrado que el uso

de esta bacteria en el suelo ayuda a reducir la fertilización nitrogenada en un 40% y a incrementar los rendimientos de producción hasta un 25%, principalmente en cultivos de hortalizas, pero también se han demostrado efectos positivos en tomate, trigo, papa y girasol; asimismo, *Azotobacter* es capaz de fijar al menos 10 mg de N₂ por gramo de carbohidrato (Paredes, 2013).

Inicialmente fueron aisladas 20 bacterias presuntivas del género *Azotobacter* sp., con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, de las cuales se seleccionaron 6 por su rendimiento en el ensayo de reducción de acetileno (ARA), en la que las cepas AC1 y AC10 demostraron tener la mayor capacidad fijadora de nitrógeno bajo condiciones de laboratorio (Figura 15.2).



- **Figura 15.2.** Resultados del ensayo de reducción de acetileno (ARA) bajo condiciones de laboratorio.
Fuente: Elaboración propia



Medio de cultivo alternativo para la multiplicación de *Azotobacter chroococcum*

La multiplicación de las bacterias pertenecientes al género *Azotobacter* se ha realizado tradicionalmente en caldo Ashby (Escobar et al., 2011), el cual permite evidenciar las características morfológicas principales del género y ha demostrado un aceptable nivel de producción de biomasa, alcanzando hasta 1×10^8 UFC mL⁻¹, dependiendo de las condiciones de fermentación aplicadas. Sin embargo, la formulación de este medio de cultivo es costosa, razón por la cual fue necesario el desarrollo de un medio de cultivo alternativo para la multiplicación y desarrollo de la bacteria, con el objetivo de que pudiera llegar al productor a un precio razonable. Para lo anterior, se seleccionaron varias

fuentes nutricionales de bajo costo, como el azúcar cristalizada, la levadura y las sales de grado industrial o alimenticio. Como resultado, se obtuvo el medio de cultivo líquido Agrícola (Bonilla Buitrago & Morales, 2005), que demostró ser más eficiente que el caldo Ashby, ya que con aquel se obtuvieron niveles de producción de biomasa un 20% más altos. Además, el medio Agrícola permitió tener procesos de fermentación más rápidos, ya que el máximo de biomasa era obtenido en 48 horas de proceso, frente a las 72 que requería el medio convencional. En la tabla 15.3 se pueden observar las diferencias de producción de biomasa entre los dos medios de cultivo para las cepas AC1 y AC10.

- **Tabla 15.3.** Comparación de la producción de biomasa entre el medio de cultivo convencional y el medio Agrícola para *Rhizobium* sp. AC1 y *Agrobacterium pusense* AC10.
Fuente: Elaboración propia

1 Medio de cultivo: Ashby (72 horas)

AC1: $1,45 \times 10^7$ UFC mL⁻¹

AC10: $1,23 \times 10^7$ UFC mL⁻¹

2 Medio de cultivo: Agrícola (48 horas)

Con inóculo: $1,98 \times 10^9$ UFC mL⁻¹

Sin inóculo: $1,67 \times 10^9$ UFC mL⁻¹

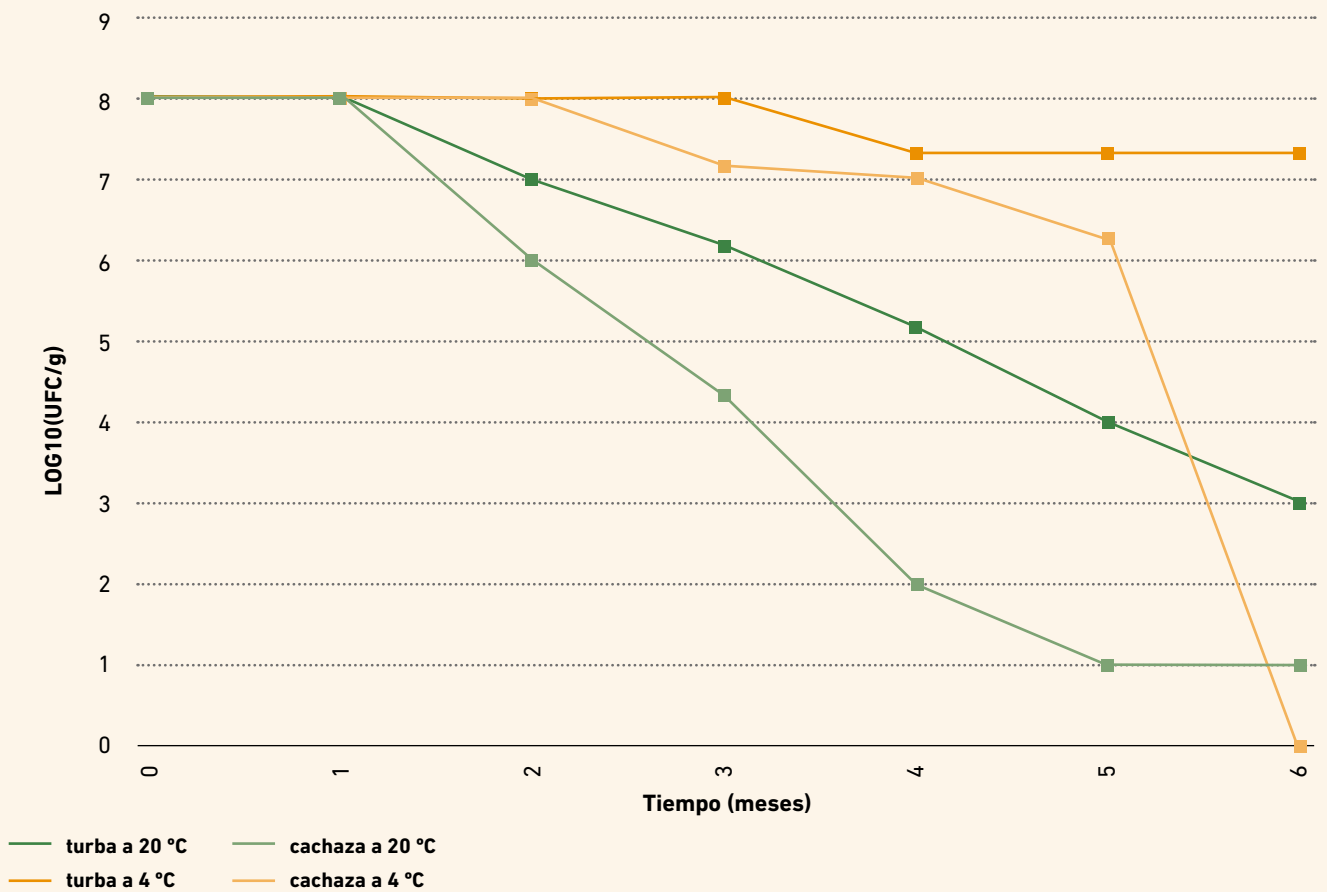
Selección del vehículo de inoculación

Como parte de la estrategia de desarrollo del biofertilizante, se realizó la evaluación de diferentes soportes sólidos, como la turba y la cachaza suplementada (melaza al 1%). Estos materiales demostraron ser ideales para el mantenimiento de las bacterias en el tiempo (6 meses) bajo almacenamiento en condiciones de refrigeración (4-8 °C). En la Figura 15.3 se observa el comportamiento de los dos soportes en una

prueba acelerada de estabilidad a temperatura ambiente y en refrigeración. Los resultados demostraron que la turba fue el mejor soporte para mantener la viabilidad y actividad biológica de la cepa AC1 durante 6 meses bajo condiciones controladas de refrigeración, por lo que es el soporte ideal para el desarrollo del biofertilizante (Bonilla Buitrago & Morales, 2005).

- **Figura 15.3.** Curvas de estabilidad acelerada de la cepa AC1 en dos soportes sólidos y a dos temperaturas diferentes.

Fuente: Elaboración propia



Caso de estudio AGROSAVIA: diseño de una formulación líquida de Monibac (*Rhizobium* sp. AC1 y *A. pusense* AC10) para su uso en algodón

Para el caso de bacterias no simbióticas fijadoras de nitrógeno del género *Azotobacter* sp., con el uso de formulaciones líquidas no solo se facilita el manejo del bioproducto para su aplicación en la peletización de semillas, sino que también se aprovecha la capacidad de producción de exopolisacáridos durante el proceso de fermentación por parte de *Azotobacter pusense* AC10, para generar formulaciones líquidas simples, que son altamente estables en el tiempo a bajas temperaturas.

Validación de la línea base del proceso de fermentación

En trabajos previos en el Laboratorio de Suelos de AGROSAVIA, se llevó a cabo el diseño y optimización de un medio de cultivo a escala de laboratorio denominado MBR (Moreno et al., 2011) para la producción de inóculos líquidos de las cepas AC1 y AC10. Para esto, se empleó un biorreactor de tanque agitado (STR, por sus siglas en inglés) marca Infors, modelo Minifors, y se aplicó una estrategia de fermentación discontinua (por lote o *batch*) independientemente para cada cepa. Las condiciones de trabajo establecidas fueron: temperatura: 30 °C; caudal de aire: 1 vvm; velocidad de agitación: 500 rpm; tiempo de fermentación: 24 horas sin control de pH y oxígeno disuelto (tabla 15.4) (Camelo-Rusínque et al., 2017); estas condiciones se usaron como línea base de los trabajos posteriores.

Inicialmente, se realizó la validación de la producción del principio activo bajo las condiciones de la línea base en la Planta Piloto de Biofertilizantes de AGROSAVIA (tabla 15.5), y se encontró que la cepa AC1 alcanzó una concentración celular máxima de $1,71 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ y una velocidad

específica de crecimiento máxima de 0,07 h⁻¹, y para la cepa AC10 se obtuvieron resultados similares: $2,79 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ y 0,10 h⁻¹, respectivamente. Adicionalmente, se determinó que la máxima concentración celular se obtenía a las 26 horas de fermentación bajo las condiciones de trabajo determinadas previamente.



■ **Tabla 15.4.** Condiciones de fermentación durante el desarrollo de la producción de *Rhizobium sp.* AC1 y *A. pusense* AC10
Fuente: Elaboración propia

| Variable operacional | Validación de línea base* | Etapa 1* | Etapa 2** | Etapa 3** | Cocultivo** | Relación N/C* |
|-------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Biorreactor | Infors-Minifors | Infors-Minifors | Biolab 50b | Biolab 50b | Biolab 50b | Infors-Minifors |
| Tipo de fermentación | <i>Batch</i> | <i>Fed-batch</i> | <i>Fed-batch</i> | <i>Fed-batch</i> | <i>Fed-batch</i> | <i>Fed-batch</i> |
| Velocidad de agitación | 500 rpm | 200 rpm | 200 rpm | 157 rpm | 157 rpm | 200 rpm |
| Aireación | 1 vvm | 1 vvm | 1 vvm | 1 vvm | 1 vvm | 1 vvm |
| Temperatura | 30 °C | 30 °C | 30 °C | 30 °C | 30 °C | 30 °C |
| Tiempo de fermentación | 30 horas | 28 horas | 26 horas | 26 horas | 26 horas | 26 horas |
| Volumen inicial | 3,50 L | 1,15 L | 28,50 L | 32,00 L | 32,00 L | 2,50 L |
| Volumen final | 3,50 L | 3,50 L | 45,00 L | 50,00 L | 50,00 L | 3,50 L |

* Escala de laboratorio; ** escala piloto.



■ **Tabla 15.5.** Parámetros de eficiencia y cinéticos durante el desarrollo de la producción de *Rhizobium sp.* AC1 y *A. pusense* AC10
Fuente: Elaboración propia

| Etapa | Cepa | Viabilidad celular (10^9 ufc mL ⁻¹) | Productividad máxima (log [ufc mL ⁻¹ h ⁻¹]) | Rendimiento biomasa-sustrato (g g ⁻¹) | Velocidad específica de crecimiento máxima (h ⁻¹) |
|--------------------------|-------------|---|---|---|---|
| Validación de línea base | AC1 | 1,71 ± 0,12 | 0,355 ± 0,001 | ND | 0,071 ± 0,001 |
| | AC10 | 2,79 ± 0,79 | 0,363 ± 0,005 | ND | 0,100 ± 0,005 |
| Escalamiento: Etapa 1 | AC1 | 4,25 ± 0,18 | 0,370 ± 0,001 | ND | 0,068 ± 0,012 |
| | AC10 | 4,21 ± 0,59 | 0,370 ± 0,002 | ND | 0,063 ± 0,012 |
| Escalamiento: Etapa 2 | AC1 | 3,71 ± 0,21 | 0,368 ± 0,001 | 0,54 ± 0,02 | 0,044 ± 0,002 |
| | AC10 | 3,46 ± 0,16 | 0,382 ± 0,001 | 0,60 ± 0,01 | 0,044 ± 0,046 |
| Escalamiento: Etapa 3 | AC1 | 4,21 ± 0,26 | 0,370 ± 0,001 | 0,48 ± 0,00 | 0,065 ± 0,003 |
| | AC10 | 4,04 ± 0,29 | 0,370 ± 0,001 | 0,55 ± 0,00 | 0,061 ± 0,002 |
| Ajuste: cultivo | AC1 AC10 | 16,6 ± 9,80 | 0,393 ± 0,001 | 0,47 ± 0,00 | 0,085 ± 0,001 |
| Ajuste: relación N/C | AC1 AC10 | 22,0 ± 1,18 | 0,399 ± 0,001 | 1,18 ± 0,02 | 0,131 ± 0,016 |

Nota: ND: No determinado.

Diseño de la estrategia de escalamiento

Para cumplir eficazmente con el objetivo de producir a escala de planta piloto la biomasa de las dos cepas mediante fermentación líquida, y con el fin de mejorar los parámetros de eficiencia del proceso, se planteó una estrategia de escalamiento convencional. Para ello, se aplicó un criterio basado en la similitud geométrica entre los equipos a escala de laboratorio y a escala de planta piloto, asociado con la relación geométrica entre la altura y el diámetro del tanque (H/D) (tabla 15.6 y Figura 15.4).

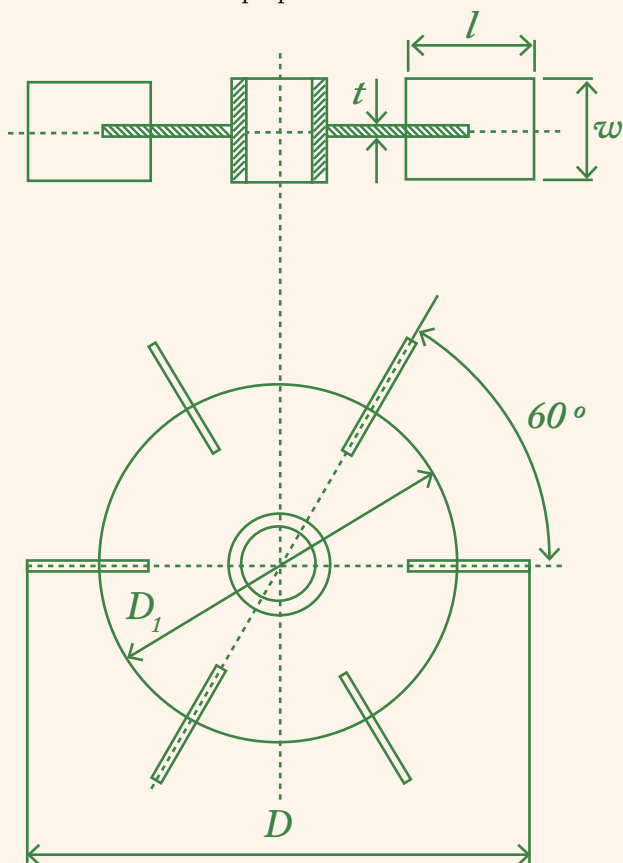


- **Tabla 15.6.** Caracterización geométrica de los biorreactores de tanque agitado (STR) empleados para la estrategia de escalamiento para la fermentación de *Rhizobium sp.* AC1 y *A. pusense* AC10
Fuente: Elaboración propia

| Característica | Biorreactor Infors-Minifors | Biorreactor Biolab 50b |
|----------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Diámetro del tanque (D) | 14,0 cm | 34,0 cm |
| Altura del tanque (H) | 34,0 cm | 83,0 cm |
| Volumen total | 5,0 L | 70,0 L |
| Volumen de trabajo | 3,5 L | 52,5 L |
| Tipo de impulsor | Rushton | Rushton |
| Número de impulsores | 2 | 2 |
| Diámetro del impulsor (Di) | 5,9 cm | 10,5 cm |
| Relación H/D | 2,43 | 2,44 |

■ **Figura 15.4.** Esquema de un impulsor tipo Rushton y sus relaciones geométricas características.

Fuente: Elaboración propia



Posteriormente, se hicieron ajustes en las condiciones de operación y se aplicó un criterio de similitud fluidodinámica. Esta estrategia se realizó en tres etapas:

Etapla 1. Ajuste preliminar a escala de laboratorio evaluando la disminución de la variable operacional de velocidad de agitación y la aplicación de una estrategia de alimentación *fed-batch*. Las condiciones de operación de la línea base (500 rpm, 1 vvm) implicaban un elevado consumo energético asociado a la potencia entregada al líquido gaseado por los impulsores y un posible exceso de oxígeno que no alcanza a ser utilizado por los microorganismos a escala de laboratorio, ineficiencias que llegarían a ser aún más restrictivas en el escalamiento a escala piloto. Por lo tanto, en esta etapa se evaluó el efecto de una disminución del 60% en la velocidad de agitación, manteniendo el mismo caudal de aire, a escala de laboratorio (tabla 15.5). También se aplicó una estrategia de alimentación *fed-batch* del sustrato limitante (fuente de carbono) de tres pulsos, para evitar inhibición del crecimiento por

sustrato y maximizar la producción de biomasa. Esto, a su vez, redujo el consumo energético en un 96,9% con respecto a la línea base por la disminución en el volumen inicial de trabajo. Con respecto al consumo de aire, este se redujo en un 22% para todo el proceso, con parámetros de eficiencia similares a los obtenidos con la línea base (tabla 15.5).

Etapla 2. Ajuste y validación de la estrategia de alimentación a escala piloto, previa verificación de la similitud geométrica de los biorreactores utilizados. Se identificó que los valores de la relación geométrica H/D de los biorreactores usados en las dos escalas fueran similares (tabla 15.6), lo que satisfaría la semejanza geométrica. El factor volumétrico de escala fue de 14, que correspondió a la relación entre los volúmenes de trabajo del biorreactor a escala de laboratorio y el de la escala piloto. Se procedió a desarrollar las fermentaciones a escala piloto manteniendo la velocidad de agitación determinada en la etapa 1 y se evaluó una estrategia de alimentación de sustrato de un solo pulso para simplificar la logística y disminuir la posibilidad de contaminación del cultivo. Así, se concluyó que la estrategia de alimentación *fed-batch* a escala piloto permitió mantener la concentración celular observada a nivel de laboratorio, ya que no se presentaron diferencias significativas entre las dos escalas (tabla 15.5). Esto asegura la repetibilidad y reproducibilidad en producciones comerciales, con respecto a los parámetros de eficiencia del proceso a escala industrial (Lim & Shin, 2013; Qu et al., 2013; Shay et al., 1987).

Etapla 3. Ajuste y validación de la estrategia de escalamiento aplicando dos criterios de escalamiento: un criterio de similitud geométrica verificado en la etapa anterior y un criterio de similitud relacionado con la dinámica del fluido asociado a un número adimensional (número de Reynolds $[Re]$). En esta etapa se correlacionaron los procesos de fermentación de las cepas seleccionadas con un criterio de similitud fluidodinámica denominado *número de Reynolds*, frecuentemente usado para describir procesos de mezcla (Reynolds, 1883). Dicho criterio representa los mecanismos de transferencia de la cantidad de movimiento como una función simple de las fuerzas de inercia (la velocidad característica del fluido) y de las fuerzas viscosas (la viscosidad μ del fluido). A partir

de esta premisa de semejanza dinámica, se determinó la velocidad de agitación que se debía mantener en el biorreactor a escala piloto con los datos obtenidos en la etapa 2 (tabla 15.5). En los resultados obtenidos se evidenció un aumento del 50 % en las velocidades de crecimiento de ambas cepas, en relación con los valores encontrados en la etapa anterior. A las 26 horas de fermentación se obtuvieron las concentraciones celulares máximas, semejantes a las obtenidas en las demás fermentaciones *fed-batch*, acercándose más a los valores encontrados a escala de laboratorio. En contraste, se presentaron diferencias significativas con respecto a las fermentaciones tipo *batch* para las producciones de la cepa AC1.

Etapa 4. Evaluación de una estrategia de cocultivo de las cepas AC1 y AC10. Con el objetivo de reducir los costos y tiempos de producción, simplificar el control de calidad del bioproducto y reducir el gasto energético de los equipos empleados para el proceso de fermentación líquida, se evaluó una estrategia de fermentación simultánea de las dos cepas, o tipo cocultivo (Bader et al., 2010). La producción del principio activo de *Monibac* líquido a escala piloto se realizó en un STR Biolab 50b bajo las condiciones estandarizadas en los procesos anteriores. La concentración final celular de este cocultivo fue de $1,66 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹ y fue significativamente diferente a los demás resultados obtenidos en el desarrollo del biofertilizante. También se observó un aumento de la velocidad de crecimiento del 30 %, mientras que la productividad máxima y el rendimiento presentaron valores similares a los obtenidos en las fermentaciones a escala piloto convencionales.

Etapa 5. Evaluación del efecto de la relación carbono-nitrógeno en el medio de cultivo. Con el fin de mejorar los parámetros cinéticos y de productividad del proceso de fermentación tipo *fed-batch* de las cepas AC1 y AC10, se estudiaron diferentes relaciones de fuente de nitrógeno y fuente de carbono a escala de laboratorio en un biorreactor STR Infors, modelo Minifors, y el modo de implementación o aplicación de esta variación en el medio de cultivo. Se encontró que, empleando una relación N/C inicial de 1,00/5,25, aplicada en el medio de cultivo usado al inicio de la estrategia de alimentación, se aumentó la concentración celular en un 37,5 % con respecto a la obtenida en las fermentaciones tipo cocultivo, mientras que el parámetro de productividad se mantuvo igual

(tabla 15.5). Adicionalmente, el consumo de fuente de C aumentó, lo que se reflejó en un incremento del 100 % en el rendimiento biomasa-sustrato y en un aumento del 35 % en la velocidad de crecimiento.

En resumen, los resultados anteriores demostraron la reproducibilidad de las variables de respuesta evaluadas en las fermentaciones a escala de planta piloto con respecto a las obtenidas en la escala de laboratorio, así como el éxito de la estrategia de escalamiento planteada al aumentar la eficiencia global del proceso (tabla 15.7).



- **Tabla 15.7.** Comparación de los resultados obtenidos en el proceso de ajuste y escalamiento de la producción de *Rhizobium* sp. AC1 y *A. pusense* AC10 con respecto a la línea base. Nota: ND: No determinado. La dirección de la flecha indica aumento o disminución en la magnitud. Fuente: Elaboración propia

1 Escala de laboratorio

Volumen: 3,5 L / Estrategia: *batch*

Viabilidad celular (10^9 UFC mL⁻¹)

AC1: 1,71 ± 0,12 / AC10: 2,79 ± 0,79

Productividad máxima (log₁₀ [UFC mL⁻¹ h⁻¹]):

AC1: 0,355 ± 0,001 / AC10: 0,363 ± 0,005

Rendimiento biomasa-sustrato (g g⁻¹): ND

Consumo de aire (L de aire L de cultivo⁻¹): 22.285,71

Consumo energético (kW h⁻¹ L de cultivo⁻¹): 0,69

2 Escala piloto

Volumen: 70 L / Estrategia: *cocultivo fed-batch*

Viabilidad celular (10^9 UFC mL⁻¹): 16,6 ± 9,80

Productividad máxima (log₁₀ [UFC mL⁻¹ h⁻¹]): 0,393 ± 0,001

Rendimiento biomasa-sustrato (g g⁻¹): 0,47 ± 0,00

Consumo de aire (L de aire L de cultivo⁻¹): 1.188,84

Consumo energético (kW h⁻¹ L de cultivo⁻¹): 0,0016

3 Diferencia (porcentaje)

Viabilidad celular (10^9 UFC mL⁻¹): 8,2-10,7 ↑

Productividad máxima (log₁₀ [UFC mL⁻¹ h⁻¹]): 8,2-10,7 ↑

Rendimiento biomasa-sustrato (g g⁻¹): ND

Consumo de aire (L de aire L de cultivo⁻¹): 94,8 ↓

Consumo energético (kW h⁻¹ L de cultivo⁻¹): 99,8 ↓

Diseño de la formulación

La formulación de un biofertilizante se debe diseñar de forma específica con cada uno de los ingredientes activos usados, ya que se debe demostrar la compatibilidad de los excipientes o coadyuvantes con los microorganismos fijadores de nitrógeno, para que no se afecte negativamente su actividad biológica. Además, la selección de adyuvantes debe tener en cuenta no solamente la protección física del microorganismo, sino otros factores como la forma y frecuencia de aplicación, la temperatura de almacenamiento, el cultivo objetivo, entre otros, de manera que se asegure una aplicación eficiente del bioproducto.





Compatibilidad del ingrediente activo con coadyuvantes

A partir del caldo de fermentación de las dos cepas bacterianas, se elaboraron mezclas con coadyuvantes, dentro de las cuales se encontraban agentes suspensores, estabilizantes, humectantes y solventes. Como tratamiento control, se empleó el caldo de fermentación sin adición de ningún coadyuvante, pero sometido a las mismas condiciones de mezcla que los demás tratamientos. En el tiempo cero y después de 15 días de almacenamiento a 4 y 25 °C, se evaluó la viabilidad celular en cada uno de los tratamientos realizados.

Los tratamientos almacenados durante 15 días a 4 °C presentaron una pérdida de viabilidad de entre el 4 % y el 16 %, en tanto que los tratamientos almacenados durante el mismo tiempo a 25 °C presentaron una pérdida de viabilidad de entre el 3 % y el 30 %. Estos resultados evidenciaron un efecto negativo de la temperatura sobre la viabilidad de las mezclas binarias microorganismo-coadyuvante. Además, ninguno de los tratamientos almacenados a las dos temperaturas presentó un efecto significativo con respecto al tratamiento control, lo que indica que ninguna de las sustancias evaluadas afecta la viabilidad de las dos cepas. Al analizar los resultados obtenidos, se seleccionaron los excipientes Ba03 y Ps05, que corresponden a un agente solvente y un humectante, en su orden. Los excipientes seleccionados actúan como reductores de actividad de agua y también forman parte de las sustancias conocidas como *solutos compatibles*, las cuales protegen la estructura y función celular de los microorganismos bajo condiciones de estrés (Brown, 1976).

Selección de prototipos

Con base en los resultados anteriores, se elaboraron cuatro prototipos de formulación (T2-T5), los cuales se evaluaron en contraste con un tratamiento control (T1: caldo de fermentación de las dos cepas bacterianas sin coadyuvantes) (tabla 15.8). Cada formulación y su control se almacenaron a 35 °C durante un mes, y se evaluó la viabilidad celular en el tiempo cero y después de finalizar el tiempo de almacenamiento.

- **Tabla 15.8.** Tratamientos evaluados en la selección de prototipos de las cepas *Rhizobium* sp. AC1 y *A. pusense* AC10 bajo condiciones de laboratorio.

Fuente: Elaboración propia

-
- | | | |
|----------|-----------|--|
| 1 | T1 | Composición: Caldo de fermentación |
| 2 | T2 | Composición: Caldo de fermentación + Sp09 (0,15%) |
| 3 | T3 | Composición: Caldo de fermentación + Sp09 (0,15%) + Ba03 (1%) |
| 4 | T4 | Composición: Caldo de fermentación + Ps05 (3%) + Ba03 (1%) |
| 5 | T5 | Composición: Caldo de fermentación + Sp09 (0,15%) + Ps05 (3%) |
-

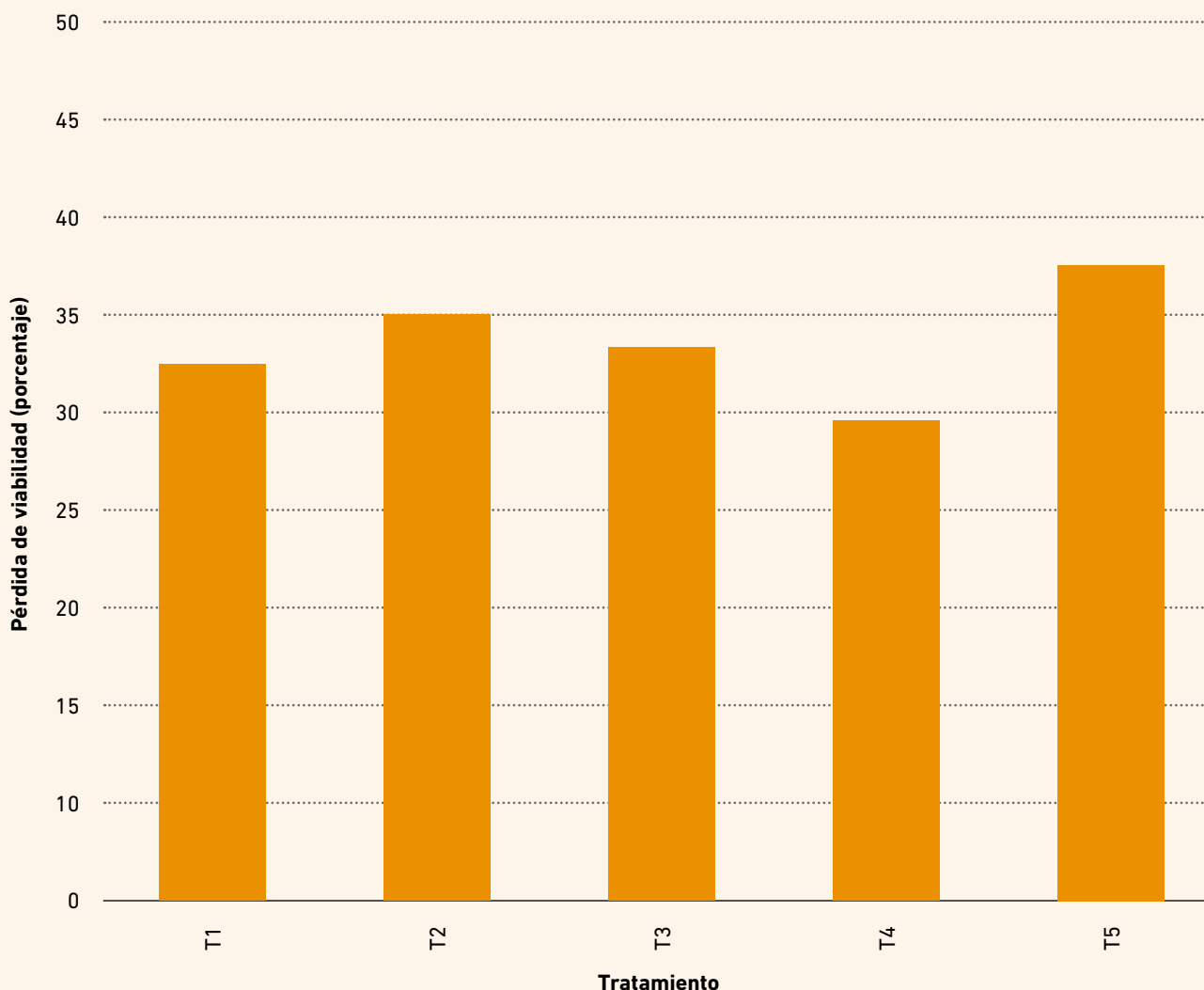
Después de 30 días de almacenamiento a una temperatura de 35 ± 2 °C, el tratamiento T5 presentó una pérdida de viabilidad significativamente mayor que el tratamiento T1, que correspondió al caldo de fermentación sin formular, lo que indica que los componentes del prototipo T5 afectaron la viabilidad de los microorganismos (Figura 15.5). Por su parte, no se presentaron diferencias significativas en la pérdida de viabilidad de los tratamientos T1, T2 y T3, lo que indica que la composición de los tratamientos T2 y T3 no tuvo un efecto negativo sobre la viabilidad de las bacterias. El tratamiento T4, a su vez, presentó el menor valor de pérdida de viabilidad, un 29,15%, resultado significativamente inferior al del tratamiento T2 (34,42%),

pero no presentó diferencias significativas con respecto a los tratamientos T1 y T3. Después de 30 días de almacenamiento a 35 °C, se observó que los tratamientos T2, T3 y T5 tomaron una coloración negra y un fuerte olor a azufre, pero no así los prototipos T1 y T4. Dado que el excipiente Sp09 era el factor común en los tratamientos T2, T3 y T5, posiblemente el cambio de color y olor del producto se debió a que este excipiente tiene como parte de su estructura ésteres de sulfato, los cuales pueden ser hidrolizados a altas temperaturas (Rowe et al., 2009). Así, a partir de los resultados de viabilidad obtenidos, se seleccionó el tratamiento T4 para continuar con el estudio de vida útil propuesto.

■ **Figura 15.5.** Estabilidad de los prototipos de formulación almacenados a 35 ± 2 °C.

Nota: Barras con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95%. La codificación de los tratamientos se presentó en la tabla 15.8.

Fuente: Elaboración propia



Estudio de vida útil

A partir de los resultados del ensayo anterior, se seleccionó el prototipo más estable durante el almacenamiento a 35 °C (T4). El tratamiento T4 fue nuevamente almacenado a tres temperaturas: 4 ± 2 °C, 20 ± 3 °C y 30 ± 3 °C, y se evaluó su viabilidad en el tiempo cero y después de 15, 30, 45 y 60 días de almacenamiento. Como tratamiento control, se almacenó el caldo sin formular. Además, se calculó la constante de degradación o pérdida de viabilidad mediante las ecuaciones 1a, 1b y 1c. Finalmente, mediante la ecuación de Arrhenius, se determinó la energía de activación y se predijo el tiempo de vida útil a las tres temperaturas evaluadas (ecuación 2).

Ecuación de orden cero:

$$N = -k \cdot t + N_0 \quad (1a).$$

Ecuación de orden uno:

$$\log \log N = \log \log N_0 - k \cdot t \quad (1b).$$

Ecuación de orden dos:

$$\frac{1}{N} = k \cdot t + \frac{1}{N_0} \quad (1c);$$

$$k = A \cdot \left(\frac{-E_a}{R \cdot T} \right) \quad (2),$$

donde N es la viabilidad en el tiempo t ; K es la constante de degradación; N_0 es la viabilidad celular inicial; A es el factor de frecuencia; E_a es la energía de activación (Kcal mol⁻¹); R es la constante de los gases ideales (1,987 Kcal Kmol⁻¹); y T es la temperatura en °C.

A partir de los resultados obtenidos, se observó que la mayoría de los tratamientos presentaron una mayor correlación y linealidad con los modelos cinéticos de orden uno, a excepción del tratamiento T4 almacenado a una temperatura de 4 °C y el tratamiento T1 (control) almacenado a una temperatura de 30 °C, los cuales presentaron un mayor valor de correlación R^2 con una reacción de orden 2. Sin embargo, teniendo en cuenta que los tratamientos evaluados poseen el mismo ingrediente activo, de acuerdo con Osorio et al. (2013), se seleccionó el modelo cinético al que se ajustó la mayoría de los

tratamientos bajo las tres condiciones de almacenamiento, siendo este el modelo de orden uno, al cual se ajusta la mayoría de los productos a base de microorganismos en medio acuoso (Madigan et al., 2003); por tanto, con este modelo cinético se determinó la constante de degradación o pérdida de viabilidad. En general, la constante de degradación fue mayor cuando los tratamientos se almacenaron a la temperatura de 30 °C, en comparación con la temperatura a 20 °C, y en esta, a su vez, en comparación con la de 4 °C, lo que indica que, a mayor temperatura, la viabilidad de las bacterias disminuye.

Empleando los tratamientos T1 y T4, se determinó la energía de activación de cada uno (18,75 Kcal mL⁻¹ y 20,066 Kcal mol⁻¹, respectivamente), lo que demostró una mayor estabilidad del tratamiento T4 con respecto al control. Posteriormente, se predijo el tiempo en que cada tratamiento a una temperatura dada alcanzaría una concentración teórica de 1×10^8 UFC mL⁻¹, ya que esta es la concentración mínima efectiva estandarizada para el bioproducto (tabla 15.9).



- **Tabla 15.9.** Tiempo de almacenamiento teórico de los prototipos de formulación para alcanzar una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹ a diferentes temperaturas.

Nota: La codificación de los tratamientos se presentó en la tabla 15.8.

Fuente: Elaboración propia

1 T1

4 °C

- **Tiempo de almacenamiento (días):** 320,08

20 °C

- **Tiempo de almacenamiento (días):** 35,01

30 °C

- **Tiempo de almacenamiento (días):** 9,95

2 T4

4 °C

- **Tiempo de almacenamiento (días):** 340,70

20 °C

- **Tiempo de almacenamiento (días):** 44,18

30 °C

- **Tiempo de almacenamiento (días):** 9,71

Los resultados obtenidos permitieron observar que para cada temperatura evaluada el tiempo de vida útil es similar, alcanzando sus valores máximos equivalentes a los 11 meses, aproximadamente, a una temperatura de almacenamiento de 4 °C. El efecto deletéreo del almacenamiento fue más drástico a medida que aumentó la temperatura, comportamiento que probablemente se

debe a que el metabolismo del microorganismo se puede encontrar más activo a temperaturas elevadas (Marino et al., 2004). Por el contrario, a menores temperaturas de refrigeración, el metabolismo celular disminuye, se previene la formación de metabolitos tóxicos y se evita el agotamiento de nutrientes, lo que extiende la vida del microorganismo en almacenamiento (Sabaratnam & Traquair, 2002).





Referencias

- Bader, J., Mast-Gerlach, E., Popović, M. K., Bajpai, R., & Stahl, U. (2010). Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(2), 371-387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04659.x>
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, *16*(4), 729-770. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(98\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(98)00003-2)
- Ben Rebah, F., Prévost, D., Yezza, A., & Tyagi, R. D. (2007). Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: A review. *Bioresource Technology*, *98*(18), 3.535-3.546. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.066>
- Ben Rebah, F., Tyagi, R. D., & Prévost, D. (2002). Wastewater sludge as a substrate for growth and carrier for rhizobia: The effect of storage conditions on survival of *Sinorhizobium meliloti*. *Bioresource Technology*, *83*(2), 145-151. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00202-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00202-4)
- Bonilla Buitrago, R., & Morales, J. G. (2005). Monibac: un biofertilizante con base en cepas nativas de *Azobacter* sp. para incrementar la productividad y sostenibilidad del algodón. *Revista Innovación y Cambio Tecnológico*, *4*(3-4), 30-34. https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/15346/42804_46937.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Brockwell, J., Gault, R. R., Herridge, D. F., Morthorpe, L. J., & Roughley, R. J. (1988). Studies on alternative means of legume inoculation: Microbiological and agronomic appraisals of commercial procedures for inoculating soybeans with *Bradyrhizobium japonicum*. *Australian Journal of Agricultural Research*, *39*(6), 965-972. <https://doi.org/10.1071/AR9880965>
- Brown, A. D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*, *40*(4), 803-846. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1008746>
- Burton, J. C. (1981). *Rhizobium* inoculants for developing countries. *Tropical Agriculture*, *58*(4), 291-295. https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/pnaak123.pdf
- Camelo-Rusínque, M., Moreno-Galván, A., Romero-Perdomo, F., & Bonilla-Buitrago, R. (2017). Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial como biofertilizante. *Revista Argentina de Microbiología*, *49*(3), 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.06.005>
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA). (2017). *Balance social 2017*. https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/12011/110038_67755.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Daza, A., Santamaría, C., Rodríguez-Navarro, D. N., Camacho, M., Orive, R., & Temprano, F. (2000). Perlite as a carrier for bacterial inoculants. *Soil Biology and Biochemistry*, *32*(4), 567-572. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00185-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00185-6)

- Denardin, N. D., & Freire, J. R. J. (2000). Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 215-217. <https://doi.org/10.1023/A:1008914223467>
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C., & Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 2(1), 39-49. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2011.01.05>
- Hartley, E. J., Gemell, L. G., Slattery, J. F., Howieson, J. G., & Herridge, D. F. (2005). Age of peat-based lupin and chickpea inoculants in relation to quality and efficacy. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45(3), 183-188. <https://doi.org/10.1071/ea03158>
- Lim, H. C., & Shin, H. S. (2013). *Fed-batch cultures: Principles and applications of semi-batch bioreactors*. Cambridge University Press.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock. Biología de los microorganismos* (10.ª ed.). Prentice Hall.
- Marino, P., Villamizar, L., Espinel, C., & Cotes, A. (2004). Caracterización de prototipos de bioplaguicidas granulados a base de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Ancognatha scarabaeoides* (Coleóptera: Melolonthidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 30(1), 43-49.
- Menéndez, C., Trujillo, L. E., Ramírez, R., González-Peña, D., Espinosa, D., Enriquez, G. A., & Hernández, L. (2014). Producción de un inoculante líquido de *Bradyrhizobium japonicum* con alto impacto en la siembra mecanizada de la soya en Cuba. *Bioteología Aplicada*, 31(2), 111-115. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=51730>
- Moreno, A. E., Rojas, D. F., & Bonilla, R. R. (2011). Aplicación de diseños estadísticos secuenciales en la identificación de fuentes nutricionales para *Azotobacter chroococcum* AC1. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 151-158. https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:226
- Munévar, F. (1989). Aumento en la rentabilidad del cultivo de la soya y otras leguminosas mediante el uso de inoculantes [ICA, documento interno 102].
- Osorio, O., Villareal, Y., Mejía, D. F., & Cerón, A. F. (2013). Efecto de pasteurización sobre características sensoriales y contenido de vitamina C en jugos de frutas. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2), 66-75. <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/bioteologia/article/view/302>
- Paredes, M. C. (2013). *Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas* [tesis de grado, Pontificia Universidad Católica Argentina]. <https://repositorio.uca.edu.ar/handle/123456789/393>
- Qu, L., Ren, L.-J., Sun, G.-N., Ji, X.-J., Nie, Z.-K., & Huang, H. (2013). Batch, fed-batch and repeated fed-batch fermentation processes of the marine thraustochytrid *Schizochytrium* sp. for producing docosahexaenoic acid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(12), 1.905-1.912. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0966-7>
- Reynolds, O. (1883). xxix. An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 174. <https://doi.org/10.1098/rstl.1883.0029>
- Rivera, D., Camelo, M., Estrada, G., Obando, M., & Bonilla, R. (2010). Efecto de diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 94-102. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/bioteologia/article/view/15566/16323>
- Roughley, R. J. (1970). The preparation and use of legume seed inoculants. *Plant and Soil*, 32, 675-701. <https://doi.org/10.1007/BF01372900>
- Rowe, R. C., Sheskey, P. L., & Quinn, M. E. (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients* (6.ª ed.). Pharmaceutical Press. https://jums.ac.ir/dorsapax/Data/sub_7/file/Handbook%20of%20pharmaceutical%20excipients.pdf
- Sabaratham, S., & Traquair, J. A. (2002). Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biological Control*, 23(3), 245-253. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.1014>
- Shay, L. K., Hunt, H. R., & Wegner, G. H. (1987). High-productivity fermentation process for cultivating industrial microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology*, 2(2), 79-85. <https://doi.org/10.1007/BF01569506>
- Smith, R. S. (1992). Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 485-492. <https://doi.org/10.1139/m92-080>
- Smith, R. S. (1995). Inoculant formulations and applications to meet changing needs. En I. A. Tikhonovich, N. A. Provorov, V. I. Romanov, & W. E. Newton (eds.), *Nitrogen fixation: Fundamentals and applications* (pp. 653-657). Springer.
- Stephens, J. H. G., & Rask, H. M. (2000). Inoculant production and formulation. *Field Crops Research*, 65(2-3), 249-258. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00090-8)



