

Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación

Raúl Vivanco-Calixto¹, Dalia Molina-Romero¹, Yolanda Elizabeth Morales-García¹, Verónica Quintero-Hernández¹, Antonio Munive-Hernández¹, Antonino Baez-Rogelio¹, & Jesús Muñoz Rojas^{1*}

¹Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. *joymerre@yahoo.com.mx

Las bacterias capaces de promover el crecimiento de plantas (PGPR por sus siglas en inglés) han sido aisladas a partir de diversas fuentes y ambientes naturales (Para ejemplos ver la tabla 1). Los ambientes más frecuentemente explorados han sido los nódulos de leguminosas, la rizósfera de plantas, la región endófito de raíces o región aérea, el rizoplasma y la región epífita de las plantas (Molina-Romero *et al.*, 2016). Sin embargo, también podrían rescatarse a partir de suelos (Onofre-Lemus *et al.*, 2009). Luego de su aislamiento se procede a su caracterización, lo cual se realiza mediante estudios bioquímicos y moleculares, generalmente abarcando su capacidad de uso de diversas fuentes de carbono y nitrógeno, su capacidad de resistir a la acción de los antibióticos y estudios de amplificación de genes como aquellos que codifican para el 16S rRNA, así como otros genes altamente conservados como el *rpoB*, *gyrA*, *mdh*, *infB* (Morales-García *et al.*, 2011; Caballero-Mellado *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2004; Rosenblueth *et al.*, 2004).

No todas las bacterias que se aíslan a partir de plantas o del suelo son promotoras del crecimiento vegetal, así que primero deben realizarse estudios de estas bacterias tanto de interacción como de la capacidad para realizar la fitoestimulación. Para ello, primero tiene que explorarse su habilidad de adhesión y colonización en plantas, ya que es un aspecto crítico para que una bacteria benéfica tenga éxito (Albareda *et al.*, 2006; Muñoz-Rojas & Caballero-Mellado, 2003). A la par de estos estudios o de forma desfasada se tienen que demostrar que estas bacterias son capaces de

estimular el crecimiento de plantas tras su inoculación, generalmente en ensayos a nivel de cámara de plantas y de invernadero y cuyo crecimiento debe superar el crecimiento de las plantas control (Morales-García *et al.*, 2011; Muñoz-Rojas & Caballero-Mellado, 2003). Una vez que se seleccionan bacterias con capacidad de promover el crecimiento de planta se pueden explorar los mecanismos moleculares que podrían estar involucrados (Lugtemberg & Kamilova, 2009), por ejemplo buscar mediante amplificación a los genes clave que están implicados en la promoción de crecimiento (Rosenblueth *et al.*, 2004) o bien explorando las características fisiológicas para realizar la promoción de crecimiento como la capacidad de fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos o producir hormonas, entre otras (Onofre-Lemus *et al.*, 2009; Tenorio-Salgado *et al.*, 2013; Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993). Se ha reportado que las bacterias promotoras del crecimiento de plantas poseen diversos mecanismos para potenciar el crecimiento de las plantas, los cuales se clasifican en mecanismos directos y mecanismos indirectos. La prueba contundente para elucidar el mecanismo o mecanismos involucrados en la promoción de crecimiento de plantas debe estar respaldado por estudios donde se obtienen mutantes incapaces de realizar la función explorada. La capacidad fijadora de nitrógeno ha sido explorada para varias bacterias, por ejemplo *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutante en el gen *nifH* ya no es capaz de fijar nitrógeno tanto a nivel *in vitro* como asociada a plantas de caña de azúcar, lo que demuestra que este mecanismo está implicado en la promoción de

crecimiento de esta bacteria (Sevilla *et al.*, 2001).

Mecanismos directos de promoción de crecimiento

1) Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

La FBN se refiere a la capacidad de algunas bacterias para captar el nitrógeno atmosférico (N_2) y transformarlo a nitrógeno combinado, generalmente en la forma de amonio (NH_4^+) (Annan *et al.*, 2012; Dixon and Kahn, 2004;

PGPR aislada	Mecanismo propuesto	Planta	Sitio de aislamiento	Referencia
<i>A. brasilense</i> UAP-154	AIA, Producción de sideróforos	Rizósfera de maíz	Tlaxcala-México	Dobbelaere <i>et al.</i> , 2001;
<i>Enterobacter</i> sp. EP2a JN653461	Solubilización de fosfatos, FBN	Región epifita de <i>Houttuynia cordata</i>	India	Tapia-Hernández <i>et al.</i> , 1990
<i>B. tropica</i> MTO 293	VOC, FBN, Solubilización de fosfatos y Producción de sideróforos	Tallo de maíz (endófito)	Oaxaca-México	War Nongklaw & Joshi, 2014
<i>Enterobacter</i> sp. UAPSO3001	Desconocido	Rizósfera de maíz	Tlaxcala-México	Tenorio <i>et al.</i> , 2013
<i>B. unamae</i> MTH-641	FBN, AAC desaminasa	Rizósfera de maíz	Morelos-México	Morales-García <i>et al.</i> , 2011
<i>B. tropica</i> MCU-931	FBN	Rizoplano de maíz	Morelos-México	Caballero-Mellado <i>et al.</i> , 2004
<i>G. diazotrophicus</i> UAP-C105	FBN, AIA	Rizósfera de café	Puebla-México	Reis <i>et al.</i> , 2004
<i>Azotobacter</i> sp. NAT 13	FBN	Rizósfera de algodón	Tolima-Colombia	Jiménez-Salgado <i>et al.</i> , 1997
<i>P. fluorescens</i> ABE66285	ACC desaminasa y Solubilización de fosfatos	Rizósfera de <i>Larrea tridentata</i>	Chile	Guzmán <i>et al.</i> , 2012
<i>B. tuberum</i> STM678 ¹	ACC desaminasa	Nódulo de leguminosa	Francia	Jorquera <i>et al.</i> , 2012
				Vandamme <i>et al.</i> , 2002; Onofre-Lemus <i>et al.</i> , 2009

Santi *et al.*, 2013). El nitrógeno fijado podría ser donado hacia las plantas y éstas a cambio proporcionan fuente de carbono a las bacterias implicadas. Uno de los modelos más ampliamente estudiados es la interacción de diferentes especies de *Rhizobium* con leguminosas (Liu *et al.*, 2010). Esta interacción es altamente específica y ambas poblaciones de la interacción son altamente favorecidas, razón por la que se considera de tipo mutualista y se refiere frecuentemente como simbiosis mutualista (Simms & Taylor, 2002). Aunque la FBN es altamente efectiva en leguminosas por la interacción con las rizobias, este fenómeno no ha resultado tan significativo en plantas no leguminosas como ha sido el caso de gramíneas con bacterias de vida libre (Sevilla *et al.*, 2001; Muñoz-Rojas & Caballero-Mellado, 2003). Sin embargo, en algunas gramíneas se han observado altos niveles de nitrógeno obtenido mediante el proceso de la FBN (Herridge *et al.*, 2008), pero aún no se conoce cuáles son las bacterias que más contribuyen con este proceso. Por lo que será un reto encontrar bacterias que consigan hacer más eficiente el proceso de FBN asociado

a no leguminosas o realizar ingeniería genética de las platas de tipo no leguminosa para introducir los genes relacionados a la fijación de nitrógeno (Saika & Jain, 2007). Entre las bacterias de vida libre con potencial para realizar el proceso de FBN se encuentran *Pseudomonas fluorescens*, *Beijerinckia* sp., *Azoarcus* sp. *Azotobacter* sp. (Guzmán *et al.*, 2012), *Burkholderia unamae* (Caballero-Mellado *et al.*, 2004), *G. diazotrophicus* (Sevilla *et al.*, 2001), *Herbaspirillum* sp. y *Azospirillum* sp. (Fibach-Paldi *et al.*, 2012).

2) Producción de hormonas de crecimiento vegetal

Este es un mecanismo ampliamente distribuido entre las bacterias que se asocian a plantas (Costacurta & Vanderleyden, 1995). Se han descrito diversos tipos de fitohormonas producidas por bacterias que estimulan el crecimiento vegetal, entre las que podemos mencionar a las giberelinas, al ácido indol acético y a las citocininas (Bottini *et al.*, 2004; Costacurta & Vanderleyden, 1995; Kang *et al.*, 2013). La fitohormona más estudiada es el ácido indol acético (IAA por sus siglas en inglés) y los esfuerzos para conocer su biosíntesis en bacterias se ha descrito en cepas del género *Azospirillum* (Aguilar-Piedras *et al.*, 2008). El IAA induce el alargamiento y la división celular de las plantas, permitiendo un mayor crecimiento de las raíces y por lo tanto mayor superficie de absorción de nutrientes (Patten & Glick, 2002). Así que el IAA es responsable de un mejor aprovechamiento de los nutrientes del suelo y mayor crecimiento de las plantas. Entre las bacterias capaces de producir IAA podemos mencionar a *G. diazotrophicus* (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993), *Azospirillum brasilense* (Aguilar-Piedras *et al.*, 2008), *Pseudomonas* sp. (Malik & Sindhu, 2011), *Bacillus amyloliquefaciens* (Idris *et al.*, 2007).

3) Solubilización de fosfatos

Un elemento que es fundamental para el metabolismo de las plantas es el fósforo. Aunque este componente es muy abundante

en el suelo, solo es soluble en la forma monobásica o dibásica; que son las formas biodisponibles para las plantas y que desafortunadamente se encuentran en bajas concentraciones (Castagno *et al.*, 2011). Algunas bacterias de tipo PGPR solubilizan fosfatos a partir de compuestos inorgánicos u orgánicos; involucrando el uso de fosfatasa no específicas, C-P liasas, fosfatasa y fitasas (Lugtemberg & Kamilova, 2009; Molina-Romero *et al.*, 2016). Por otro lado, mediante la liberación de ácidos orgánicos, las bacterias podrían ser capaces de quelar fósforo, haciéndolo biodisponible para las plantas (Vyas & Gulati, 2009). Algunas PGPR con capacidad de solubilizar fosfatos son: *Pseudomonas putida*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Enterobacter agglomerans* y *Rhizobium leguminosarum* (Molina-Romero *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2006).

4) Producción de ACC desaminasa

En el ambiente natural, las plantas están sujetas a cambios bióticos como abióticos que pueden afectar su crecimiento (Morgan *et al.*, 1997). Por ejemplo, cambios en las condiciones de crecimiento como el clima, la cantidad de agua disponible, la radiación solar, el ataque por patógenos, plagas y animales. Estos cambios significan un estrés intenso sobre las plantas que a su vez desencadenan efectos de respuesta de defensa mediados por etileno que producen gastos excesivos de energía lo que podría afectar el crecimiento de las plantas. Algunas bacterias PGPR producen una enzima denominada 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC desaminasa) que facilita el crecimiento de las plantas por la disminución de los niveles de etileno (Bal *et al.*, 2012; Glick *et al.*, 2007; Saleem *et al.*, 2007). La ACC desaminasa rompe el precursor del etileno evitando su síntesis y además liberando amonio que posteriormente puede ser usado por las plantas como fuente de nitrógeno. Hay varias bacterias con el potencial de producir ACC desaminasa, entre las que podemos

destacar a *B. unamae* MTI-641 (Onofre-Lemus *et al.*, 2009), *Azospirillum lipoferum*, *Pseudomonas fluorescens* y *Enterobacter cloacae* (Esquivel-Cote *et al.*, 2013). El mecanismo ACC desaminasa se puede considerar como parte de los mecanismos indirectos ya que está bloqueando una respuesta de defensa extrema y evita el gasto energético innecesario por parte de las plantas.

Mecanismos de promoción de crecimiento indirectos

1) Antagonismo contra patógenos

Los microorganismos fitopatógenos causan efectos adversos en la salud de las plantas y podrían ser causantes de la disminución de la productividad de los cultivos agrícolas. Las bacterias PGPR capaces de eliminar a los patógenos son de alta importancia para regular al crecimiento de éstos últimos (Beneduzi *et al.*, 2012; Blomberg & Lugtemberg, 2001). Hay diversos mecanismos de antagonismo mediante los cuales se frena el desarrollo de los patógenos y los más reportados son los sideróforos, las bacteriocinas, antibióticos de amplio espectro, enzimas líticas, metabolitos antifúngicos entre otros (Molina-Romero *et al.*, 2016; Morales-García *et al.*, 2007; Tapia-Hernández *et al.*, 1990). Hay varias bacterias con la capacidad de producir sustancias antagonistas entre las que se resaltan a *Streptomyces venezuelae* (Morales-García *et al.*, 2007), *G. diazotrophicus* (Muñoz-Rojas, 2004), *Burkholderia* sp. (Tenorio-Salgado *et al.*, 2013), *B. altitudinis* (Sunar *et al.*, 2013), *Azospirillum brasilense* (Tapia-Hernández *et al.*, 1990).

2) Inducción de la respuesta sistémica inducida o adquirida en plantas

Una forma alternativa para eliminar los patógenos es la respuesta sistémica de las plantas que es desencadenada por diversas bacterias. Si la respuesta es activada por un patógeno, se induce la respuesta sistémica

adquirida (SAR) y si esta es activada por un microorganismo benéfico entonces se activa la respuesta sistémica inducida por rizobacterias (ISR) (Lucas *et al.*, 2013; Van Loon, 2007). La respuesta SAR está mediada por ácido salicílico y es bastante agresiva para las plantas incluso desencadena necrosis (Ramamoorthy *et al.*, 2001), en cambio la respuesta ISR está mediada por etileno y jasmonato; esta respuesta impide el establecimiento de los patógenos (Van Loon, 2007). Así se pueden seleccionar bacterias tipo PGPR que sean capaces de estimular la respuesta de defensa de las plantas vía ISR con el propósito de obtener mejores rendimientos de los cultivos agrícolas.

Algunos componentes bacterianos también inducen la respuesta ISR, por ejemplo los lipopolisacáridos (LPS), flagelos, ácido salicílico, sideróforos, lipopéptidos cíclicos, entre otros (Ramamoorthy *et al.*, 2001). A diferencia de otros mecanismos de biocontrol, para desencadenar el mecanismo ISR no es requerido que la cepa colonice a las raíces de las plantas de forma extensiva (Poupin *et al.*, 2013). Ejemplos de rizobacterias capaces de promover el ISR en plantas son: *Bacillus altitudinis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pasteurii*, *B. pumila*, *B. mycoide*, *B. sphaericus*, *Burkholderia phytofirmans*, *Rhizobium leguminosarum*; *P. putida* 89B-27 y *Serratia marcescens* (Poupin *et al.*, 2013; Bhattacharyya 2012).

3) Producción de VOCs (Compuestos orgánicos volátiles)

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) se han identificado como moléculas eficientes de señalización, que desempeñan funciones de quimio-atrayentes, quimio-repelentes y señales de peligro (Ortíz-Castro *et al.*, 2009). Estas moléculas se caracterizan por ser: volátiles, algunos compuestos identificados en este grupo son: aldehídos, alcoholes, cetonas, hidrocarburos, índoles, derivados de ácidos

grasos, terpenos y jasmonatos (Van Loon, 2007).

En la interacción microorganismos-planta algunos VOCs actúan de forma directa como fitohormonas, sin embargo la mayoría estimula de forma indirecta al crecimiento vegetal. Se ha propuesto que la biosíntesis activa de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) es un fenómeno cepa-específico (Park *et al.*, 2013). Cuando estas moléculas son producidas en suficiente concentración aumentan la respuesta inmunitaria, estimulando específicamente la resistencia sistémica inducida (ISR); regulan el crecimiento, morfogénesis de la planta, antibiosis y biocontrol de fitopatógenos (Frag *et al.*, 2013).

B. subtilis GB03 produce VOCs que pueden activar las vías de producción de fitohormonas como auxinas, giberelinas, citocininas, ácido salicílico y brasinoesteroides, por lo que promueve el desarrollo de *Arabidopsis* sp. (Zhang *et al.*, 2007).

La actividad de los VOCs producidos por rizobacterias, inhiben el crecimiento del micelio y promueven la reducción de la esporulación de hongos (Ortíz-Castro *et al.*, 2009). *B. subtilis* GB03 y *B. amyloliquefaciens* IN937a, producen acetoina y 2,3-butanediol, esta última PGPR estimula la resistencia sistémica inducida en contra del patógeno *Erwinia carotovora* mediante señalización independiente de etileno; a diferencia de *B. subtilis* que estimula el ISR vía señalización dependiente de etileno en *Arabidopsis* sp. (Ryu *et al.*, 2004). La capacidad de *P. polymyxa* E681 de producir hexadecano (VOCs de cadena larga) que estimula fuertemente la ISR de *Arabidopsis* sp. en contra de *P. syringae* (Park *et al.*, 2013). La producción de VOCs por *B. subtilis* GB03 mejora la asimilación de hierro y la fotosíntesis de *Arabidopsis* sp.; estimulando la síntesis del factor transcripcional inducido por deficiencia de Fe (ftl-2), incrementando la producción de la enzima reductasa férrica y del

transportador de Fe IRT1; además de acidificar el medio, lo que incrementa la disponibilidad de este macronutriente (Zhang *et al.*, 2009). Una función recientemente propuesta para los VOCs producidos por las PGPR, es aumentar la resistencia al estrés abiótico de las plantas bajo condiciones de salinidad, sequía y metales pesados (Farag *et al.*, 2013).

4) Eliminación de compuestos tóxicos para plantas

En la agricultura moderna se han estado adicionando compuestos tóxicos como plaguicidas y herbicidas a las plantas. El uso indiscriminado de estos compuestos podrían tener efectos nocivos para el desarrollo de algunas plantas, animales e incluso el humano (Igbedioh, 1991). Especialmente si las plantas son sensibles como el caso de la chíá negra con el benomilo (Barranco-Cuellar, 2015). Estos compuestos incluso modifican a la diversidad microbiana (Johnsen *et al.*, 2001); que es fundamental para el buen desarrollo de las plantas (Do Carmo *et al.*, 2011). Por esta razón será necesario eliminar a esos compuestos tóxicos del suelo para permitir un buen crecimiento de las plantas de interés agrícola. Hay varias bacterias con la capacidad de eliminar compuestos tóxicos y que a su vez interactúan bien con las plantas (Ahemad & Khan, 2012), entre ellas se destacan a *P. putida* (Caballero *et al.*, 2005), *Sphingomonas* sp. (Bölkner *et al.*, 2008), *Burkholderia unamae* (Caballero-Mellado *et al.*, 2004; Caballero-Mellado *et al.*, 2007), *B. tropica* (Reis *et al.*, 2004). Sin embargo, aún se tiene que hacer trabajo referente a la capacidad de bacterias para eliminar plaguicidas presentes en suelos agrícolas.

Desarrollo de inoculantes bacterianos

Las bacterias con capacidad promotora de crecimiento, cuyo mecanismo de fitoestimulación esté respaldado por estudios moleculares y que no sean patógenas son candidatas para ser usadas para formular inoculantes bacterianos. La inoculación de

bacterias en plantas de interés agrícola se ha realizado en baja proporción en referencia a la totalidad de cultivos agrícolas existentes. Una de las bacterias más explorada en cultivos agrícolas es *Azospirillum brasilense* que se ha utilizado en diversos cultivos en el mundo con resultados exitosos en más del 70% de los casos (Dobbelaere *et al.*, 2001). En general, en la agricultura comercial se han desarrollado monoinoculantes y ya se están comercializando en diversos países, principalmente en México y Argentina (Molina-Romero *et al.*, 2016).

Entre las empresas dedicadas a producir y comercializar biofertilizantes en México, se encuentra Biofábrica Siglo XXI que ha desarrollado productos como Azofer, inoculante formulado a base de *A. brasilense*; Rhizofer, formulado con *Rhizobium etli*, la producción de los inoculantes a nivel industrial surgió a partir de un licenciamiento tecnológico celebrado con el Centro de Ciencias Genómicas UNAM (<http://www.biofabrica.com.mx/about.html>).

Otra empresa mexicana es Biosustenta, dedicada al desarrollo y producción de insumos biológicos como el inoculante Ferbiliq, formulado a base de *A. brasilense* y *Glomus intrarradices*; Endomaz, biofertilizante hecho a base de *A. brasilense* (<http://cosustenta.com/catalogo.html>).

Fertilizantes Mexicanos comercializa biofertilizantes formulados con bacterias fijadoras de nitrógeno (Azoton AA Plus); "Biomatrix + polvo" es formulado con bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfatos, otros de sus productos son Bioespiril L y Raizinn Biol (<http://biofertilizantes.mx/index.html>).

También Bio Orgánica Mexicana comercializa biofertilizantes como: Ultralite AZO (<http://www.bio-organica.com.mx>). Algunos laboratorios de instituciones mexicanas como el Laboratorio de Microbiología del Suelo de la BUAP también

tienen formulaciones bacterianas destinadas para la agricultura mexicana, entre los productos que ofertan se encuentra Biofertiup un producto que contiene a *Azospirillum brasilense*. Todas las empresas antes mencionadas ofrecen al agricultor una alternativa ecológica para incrementar la producción de sus cultivos, además de un impacto favorable a su economía, por los costos menores de estos productos en comparación con los fertilizantes químicos. En Argentina también se ha desarrollado agrobiotecnología desde hace 50 años, empleando a las PGPR aisladas de este país para la formulación de inoculantes bacterianos (Molina-Romero *et al.*, 2016). Estas formulaciones se desarrollaron para mejorar el crecimiento y aumentar la productividad de plantas leguminosas y cereales de importancia agrícola de esta región. Dentro de las empresas con más trayectoria en esta área biotecnológica ubicamos a NITRASOIL ARGENTINA S. A. que ha desarrollado un inoculante que contiene bacterias del género *Azospirillum* sp. cepa AZ39, recomendada por el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) por ser considerada la mejor entre las disponibles hasta el momento (<http://www.nitrasoil.com.ar>). La Empresa Rizobacter Argentina S. A. Microbiología agrícola (<http://www.viarural.com.ar>) también cuenta con una variedad de productos cuya formulación está dirigida a soja, maíz y trigo. Las bacterias que emplean para el desarrollo de estos inoculantes son *Pseudomonas fluorescens*, *Bradyrhizobium* sp., *Mesorhizobium cicerii*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* biovar trifoli y *Bradyrhizobium japonicum*. La firma Nitrasoil S. A. se dedica a la formulación y comercialización de fertilizantes e inoculantes biológicos para el sector agrícola, también FPC Argentina S.A.

(<http://www.fpcinoculantes.com.ar>);

(<http://geadecolon.com.ar>) GEA: Graneros y

Elevadores Argentinos de Colon Soc. Coop. Ltda y bionet (<http://www.bionetsrl.com/inoculantes-bionet-soja-premium.php>).

Aunque el uso de estas formulaciones aun es moderado, cada vez son más aceptadas por los agricultores, debido a las ventajas que se observan en los cultivos inoculados por bacterias promotoras del crecimiento; entre las que más destacan son el aumento de la productividad (Lugtemberg and Kamilova, 2009), la disminución del uso de fertilizantes químicos (Dobbelaere *et al.*, 2001) y adicionalmente podría ocurrir la disminución del uso de compuestos tóxicos como pesticidas y herbicidas (Myresiotis *et al.*, 2012). Esto hace que estos microorganismos sean de elección en la agricultura orgánica ya que son altamente compatibles con esta tecnología.

Co-inoculación contra mono-inoculación

La co-inoculación de microorganismos promotores del crecimiento de plantas ha sido aparentemente más efectiva para estimular el crecimiento de plantas, quizás por el efecto sinérgico que ocurre cuando están co-interaccionando (Atieno *et al.*, 2012; Barea *et al.*, 2002, Zoppellari *et al.*, 2014). Por ejemplo la co-inoculación de lechuga con *Bacillus* sp. y *Glomus intraradices* hacen más eficiente el uso del agua bajo condiciones de estrés (Vivas *et al.*, 2003). La co-inoculación de chícharo con *Rhizobium* y *Bacillus megaterium* incrementa la biomasa de raíces y región aérea, el porcentaje de nitrógeno y la productividad (Elkoca *et al.*, 2008). No obstante, aún hay pocas formulaciones que contienen más de tres especies de microorganismos en consorcio. Por ejemplo se ha demostrado que la inoculación de caña de azúcar con una mezcla de 5 bacterias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. Amazonense*, *Burkholderia tropica*) potencia la producción de tallos en suelos con bajo a medio nivel de fertilización nitrogenada (Martinez de Oliveira *et al.*, 2009).

El diseño, formulación y optimización de una mezcla efectiva de bacterias para ser usadas como inoculantes, no es un trabajo sencillo y se requieren estudios de la forma de interacción, capacidad de adhesión a semillas y colonización en plantas (Sundamoorthy *et al.*, 2011; Sing *et al.*, 2014). Además se deben llevar a cabo estudios de las relaciones antagonistas entre las cepas implicadas en una mezcla de bacterias antes del diseño y aplicación de un inoculante multi-especies; ya que algunos efectos antagónicos podrían ocurrir entre las bacterias inoculadas cuando están asociadas a las plantas (Martínez de oliveira *et al.*, 2009).

Razón por la que un reto recientemente planteado es el diseño y formulación de inoculantes multi-especies con bacterias capaces de coexistir tanto en la formulación que se diseña como asociados a las plantas, además de verificar la capacidad promotora del crecimiento de plantas de estas cepas cuando están en conjunto. Recientemente en el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana se han desarrollado inoculantes multiespecies, que tienen la característica de contener cepas capaces de coexistir sin antagonizarse entre ellas pero que son capaces de eliminar a patógenos (Morales-García, 2013). Por las características y ventajas que tienen en relación a inoculantes convencionales se les ha designado el término de inoculantes de segunda generación y algunas formulaciones multi-especies se han sometido para su evaluación ante el IMPI para la obtención de las patentes (Alatorre-Cruz *et al.*, 2015; Morales-García *et al.*, 2013; Santiago-Saenz *et al.*, 2015). Algunas de estas formulaciones contienen bacterias tolerantes a la desecación para ser más eficientes en ambientes con baja disponibilidad de agua (Vielchez *et al.*, 2011) y hemos observado mejores efectos promotores del crecimiento de plantas inoculadas con las formulaciones multi-especies en relación con las plantas

mono-inoculadas o aquellas no inoculadas (Fig. 2) (Alatorre-Cruz *et al.*, 2015; Morales-García *et al.*, 2013). También los efectos positivos de los cultivos en campo son más constantes en referencia a las formulaciones mono-especie, por lo que consideramos que las bacterias de estas formulaciones podrían estar ejerciendo efectos sinérgicos sobre las plantas inoculadas. Por ejemplo la Asociación Nacional de Empresas Campesinas A. C. en convenio con el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana han estado explorando el uso de un inoculante multi-especies con resultados positivos en el rendimiento de maíz y arroz (Muñoz-Rojas; comunicación personal).

Conclusiones

Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas poseen diversos mecanismos para realizar la fitoestimulación. Aunque la inoculación de bacterias de tipo PGPR en plantas de interés agrícola se ha realizado en forma moderada, estas formulaciones, cada vez son más utilizadas por sus efectos benéficos como el aumento de la productividad, la disminución del uso de fertilizantes químicos y la disminución del uso de compuestos tóxicos como pesticidas y herbicidas. La co-inoculación de microorganismos promotores del crecimiento de plantas ha sido aparentemente más efectiva para estimular el crecimiento de plantas, quizás por el efecto sinérgico que ocurre cuando están co-interaccionando. No obstante, aún hay pocas formulaciones que contienen más de tres especies de microorganismos en consorcio. Razón que justifica como un nuevo reto, el diseñar y formular inoculantes multi-especies que potencien un mayor crecimiento de plantas en comparación con las no inoculadas o aquellas mono-inoculadas. En el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana se han diseñado inoculantes de este tipo y algunos de ellos se han patentado. Por las características y ventajas que tienen en relación a inoculantes convencionales se les ha

designado el término de inoculantes de segunda generación.

Agradecimientos

Agradecemos a DITCo2016-3, DITCo2016-4 por el apoyo otorgado para el desarrollo de inoculantes de segunda generación, así como estudios de estabilidad y escalamiento. Raúl Vivanco-Calixto y Dalia Molina-Romero son becarios CONACYT por lo que agradecemos el apoyo de esta institución. Los estudios de esta tecnología también generan preguntas de ciencia básica por lo que agradecemos a la VIEP (00450, 00513, 00476, 00510) por el apoyo para resolver preguntas relacionadas con estas investigaciones.

Referencias

- Aguilar-Piedras J, Xique-Vásquez M, García S, Baca BE. 2008. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 50:29-37.
- Ahemand M, Khan M. 2012. *Saudi J. Biol. Sci.* 19:451-59.
- Alatorre-Cruz JM, Bustillos-Cristales MR, Morales-García YE, Hernández-Tenorio AL, Baez-Rogelio A, Pérez-Santos JLM, Muñoz-Rojas J (Inventores). 2015. Solicitud patente MX/a/2015/014278, y PCT/1B2015/056548.
- Albareda M, Dardanelli MS, Sousa C, Megías M, Temprano F, Rodríguez-Navarro D. 2006. *FEMS Microbiol. Lett.* 259: 67-73.
- Annan H, Golding A, Zhao Y, Dong Z. 2012. *Ecol. Evol.* 2:2285-90.
- Atieno M, Herrmann L, Okalebo R, Lesueur D. 2012. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28:2541-50.
- Bal HB, Das S, Dangar TK, Adhya TK. 2012. *J. Basic. Microbiol.* 53:972-84.
- Barea JM, Toro M, Orozco MO, Campos E, Azcón R. 2002. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 63: 35-42.
- Barranco-Cuellar V. 2015. Tesis de licenciatura, Facultad de Ingeniería Química, Colegio de Ingeniería Ambiental, BUAP.
- Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LMP. 2012. *Genet. Mol. Biol.* 35: 1044-51.
- Bhattacharyya PN, Jha DK. 2012. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28:1327-50.
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJ. 2001. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:343-50.
- Böltner D, Godoy P, Muñoz-Rojas J, Duque E, Moreno-Morillas S, Sánchez L and Ramos JL. 2008. *Microb. Biotechnol.* 1(1):87-93.
- Bottini R, Cassán F, Piccoli P. 2004. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65(5):497-503.
- Caballero A, Lázaro JL, Ramos JL, Esteve-Núñez A. 2005. *Environ. Microbiol.* 7(8):1211-19.
- Caballero-Mellado J, Onofre Lemus J, Estrada-de los Santos P, Martínez Aguilar L. 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5308-19.
- Caballero-Mellado J, Martínez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Estrada-de los Santos P. 2004. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1165-72.
- Castagno LN, Estrella MJ, Sannazzaro AI, Grassano A, Ruiz OA. 2011. *J Appl. Microbiol.* 110:1151-65.
- Castro-Sowinski S, Herschkovitz Y, Okon Y, Jurkevitch E. 2007. *FEMS Microbiol. Lett.* 276:1-11.
- Costacurta A, Varderleyden J. 1995. *Critical Rev. Microbiol.* 21(1):1-18.
- Couillerot O, Ramírez-Trujillo A, Walker V, von Felten A, Jansa J, et al. 2013. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:4639-49.
- Dixon R, Kahn D. 2004. *Nature Rev. Microbiol.* 2:621-31.
- Do Carmo FL, dos Santos HF, Martins EF, Van Elsas JD, Rosado AS, Peixoto RS. 2011. *J. Microbiol.* 49:535-43.
- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera Gonzalez C, Caballero Mellado J, Aguirre JF, Kapulnik Y, Brener S, Burdman S, Kadouri D, Sarig S, Okon. Y. 2001. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:871-9.
- Elkoca E, Kantar F, Sahin F. 2008. *J. Plant Nutr.* 31:157-67.
- Esquivel-Cote R, Gavilanes-Ruiz M, Cruz-Ortega R. Huante P. 2013. *Rev. Fitotec. Mex.* 36(3):251-8.

- Farag MA, Zhang H, Ryu CM. 2013. *J. Chen. Ecol.* 39:1007-18.
- Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y. 2012. *FEMS Microbiol. Lett.* 326:99-108.
- Fuentes-Ramírez LE, Jiménez-Salgado T, Abarca-Ocampo IR, Caballero-Mellado J. 1993. *Plant Soil* 154:145-50.
- Glick B, Cheng Z, Czarny J, Duan J. 2007. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:329-39.
- Guzmán A, Obando M, Rivera D, Bonilla R. 2012. *Rev. Colomb. Biotechnol.* 14:182-90.
- Herridge D, Peoples MB, Boddey RM. 2008. *Plant Soil* 311:1-18.
- Idris EE, Iglesias DJ, Talon M, Borris R. 2007. *MPMI* 20(6):619-26.
- Igbedioh SO. 1991. *Arch. Environ. Health: An Int. J.* 46(4):218-24.
- Jiménez-Salgado T, Fuentes-Ramírez LE, Tapia-Hernández A, Mascarua-Esparza MA, Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J. 1997. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3676-83.
- Johnsen K, Jacobsen CS, Torsvik V, Sorensen J. 2001. *Biol. Fertil. Soils* 33:443-53.
- Jorquera MA, Shaharoon B, Nadeem SM, de la Luz Mora M, Crowley DE. 2012. *Microb. Ecol.* 64:1008-17.
- Kang SM, Khan AL, You YH, Kim JG, Kamran M, et al. 2013. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24:106-12.
- Liu Y, Wu L, Baddeley JA, Watson CA. 2010. *Agron. Sustain. Dev.* 31:155-72.
- Lucas JA, García-Villaraco A, García-Cristobal J, Algar E, Gutierrez-Mañero J. 2013. *J. Appl. Microbiol.* 115:218-35.
- Lugtenberg B, Kamilova F. 2009. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:541-56.
- Malik DK, Sindhu SS. 2011. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 17:25-32.
- Martínez de Oliveira AL, Stoffels M, Schmid M., Reis VM, Baldani JJ. 2009. *European J. Soil Biol.* 45:106-13.
- Molina-Romero D, Bustillos-Cristales MR, Rodríguez-Andrade O., Morales-García YE, Santiago-Saenz Y, Castañeda-Lucio M, Muñoz-Rojas J. 2016. *Biológicas* 17(2):24-34.
- Morales-García YE. 2013. Tesis de Doctorado, Posgrado en Ciencias (Microbiología). Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Morales-García YE, Herrera MC, Muñoz-Rojas J. 2007. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 38:58-69.
- Morales-García YE, Juárez-Hernández D, Aragón-Hernández C, Mascarua-Esparza MA, Bustillos-Cristales MR, et al. 2011. *Rev. Argent. Microbiol.* 43:287-93.
- Morales-García YE, Juárez-Hernández D, Fuentes-Ramírez LE, Munive-Hernández A, Muñoz Rojas J (Inventores). 2013. MX/a/2013/007978.
- Morgan PW, Drew MC. 1997. *Physiologia Plantarum* 100(3):620-30.
- Muñoz-Rojas J. 2004. En: Microbios en línea (2ª. Edición) E. Martínez-Romero y J. Martínez-Romero (Eds). UNAM.
- Muñoz-Rojas J, Caballero-Mellado J. 2003. *Microb. Ecol.* 46:454-64.
- Myresiotis CK, Vryzas Z, Papadopoulou-Mourkidou E. 2012. *Biodegradation* 23:297-310.
- Onofre-Lemus J, Hernández-Lucas I, Girard L, Caballero-Mellado J. 2009. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:6581-90.
- Ortíz-Castro R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, López-Bucio J. 2009. *Plant Signal Behav.* 4:701-12.
- Park HB, Lee B, Kloepper JW, Ryu CM. 2013. *Plant Signal Behav.* 8:e24619.
- Patten CL, Glick BR. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(8):3795-801.
- Poupin MJ, Timmermann T, Vega A, Zuñiga A, González B. 2013. *PLoS One* 8:69435.
- Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V, Samiyappan R. 2001. *Crop Protection* 20:1-11.
- Reis VM, Estrada-de los Santos P, Tenorio-Salgado S, Vogel J, Stoffels M, et al. 2004. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2155-62.
- Rodríguez H, Fraga R, González T, Bashan Y. 2006. *Plant Soil* 287:15-21.

- Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romero E. 2004. *System. Appl. Microbiol.* 27:27-35.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, et al. 2004. *Plant Physiol.* 134:1017-26.
- Saika SP, Jain V. 2007. *Current Sci.* 92(3):317-22.
- Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS. 2007. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34:635-48.
- Santi C, Bogusz D, Franche C. 2013. *Ann Bot.* 111: 743-67.
- Santiago-Saenz YO, Hernández-Tenorio AL, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Baez-Rogelio A, Pérez-Santos JLM, Muñoz-Rojas J (Inventores). 2015. Solicitud de patente MX/a/2015/014804.
- Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C. 2001. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 14:358-66.
- Simms EL, Taylor DL. 2002. *Integ. And Comp. Biol.* 42:369-380.
- Singh A, Jain A, Sarma B, Upadhyay R, Singh H. 2014. *Microbiol. Research* 169:353-60.
- Sunar K, Dey P, Chkraborty U, Chakreborty B. 2013. *J. Basic Microbiol.* 10:1002-14.
- Sundaramoorthy S, Raguchander T, Ragupathi N, Samiyappan R. 2012. *Biological Control* 60:59–67.
- Tapia-Hernández A, Mascarúa-Esparza MA, Caballero-Mellado J. 1990. *Microbios* 64(259):73-83.
- Tenorio-Salgado S, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R, Caballero-Mellado J, Pérez-Rueda E. 2013. *Bioengineered* 4:236-43.
- Van Loon LC. 2007. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:243-54.
- Vandamme P, Goris J, Chen WM, de Vos P, Willems A. 2002. *Syst. Appl. Microbiol.* 25:507-12.
- Vilchez S & Manzanera M. 2011. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91:1297-304.
- Vivas A, Marulanda A, Ruiz-Lozano JM, Barea JM, Azcón R. 2003. *Mycorrhiza* 13:249-56.
- Vyas P, Gulati A. 2009. *BMC Microbiol.* 9:174-89.
- War Nongkhilaw FM, Joshi SR. 2014. *Rev. Biol. Trop.* 62(4):1295-308.
- Zhang H, Kim MS, Krishnamachari V, Payton P, Sun Y, Grimson M, et al. 2007. *Plant* 226:839-51.
- Zhang H, Sun Y, Xie X, Kim MS, Dowd SE, et al. 2009. *Plant J.* 58:568-77.
- Zoppellari F, Malusà E, Chitarra W, Lovisolo C, Spanna F, Bardi L. 2014. *Italian J. Agrometeorology* 1(2014):1-18.