



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

TÍTULO DE LA TESIS

**Viabilidad de bacterias de un inoculante multi-especies y su efecto a corto plazo, en el crecimiento de *Solanum tuberosum* cv. Atlantic.**

Tesis que para obtener el título de

**BIOLOGA**

PRESENTA:

**Hernández Tenorio Ana Laura**

TUTOR (A):

**Dr. Jesús Muñoz-Rojas**

**Septiembre 2014**



*Esta tesis está dedicada a las dos personas que siempre confiaron en mí, los que siempre me apoyaron, los que me enseñaron que no existe problema alguno para lograr lo que se desea, a los que sacrificaron su vida para cumplir mis sueños y siempre pase lo que pase estarán conmigo, Mis padres:*

*Hernández Flores Emisiano y Tenorio Ruiz Laura.*

*La vida tendrá cosas buenas como malas no es perfecta, pero ¿Qué lo es? ... así que goza, ríe, diviértete sin pensar en un mañana.*

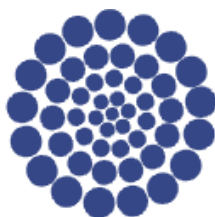
*Vive hoy como si fuera el último día de tu vida.*



El presente trabajo se realizó en el instituto de ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en el Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas.

Este trabajo fue realizado con financiamiento CONACYT (000000000156576),  
DITco 2014-09 y VIEP NAT14-1.

Gracias por la beca brindada durante la realización de esta tesis a CONACYT  
(000000000156576)



**CONACYT**

*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*

## **Agradecimientos:**

Agradezco a la Dra. Rocío Pérez y Terrón y a la M en C. Adriana Ramírez Vargas por la revisión y sus contribuciones al presente trabajo.

Al Doctor Jesús Muñoz Rojas por haberme aceptado en su grupo de investigación, por su apoyo en estos años de trabajo, así como por su amistad, a Elizabeth Morales García por su asesoría y consejos en el laboratorio, gracias a ambos y a su familia.

A los maestros que a lo largo de mi escolaridad me brindaron confianza y conocimiento, lo cual hoy es mi herramienta para seguir con mis planes futuros.

A todos mis amigos de la universidad por todos estos años que hemos compartido, gracias por todos sus cuidados en todo momento, especialmente a Ana Laura por cinco años que me soporto gracias por todo a Leo, Amy, Anali, Madai, Maribel, Maricela, Blanca por su amistad y por estar conmigo y mostrarme su apoyo a Gustavo, Héctor, Fonseca, Nestor, Misael López, Omar, Fidel, gracias por su amistad, a las familias de mis amigas gracias por las atenciones que tuvieron conmigo.

A Salvador el cual me ha enseñado a vivir y a disfrutar la vida de una manera diferente, gracias por el ánimo que recibo día a día, tu comprensión y tu apoyo en momentos difíciles, gracias a tu familia por las atenciones que me han brindado.

A mis amigos del laboratorio y agregados por todos sus consejos y su asesoría principalmente a Dalia Juárez por enseñarme lo que se, a Osvaldo por siempre saber todo, Jessi y Fernando por brindarme su amistad a Víctor, Simón, Arturo, Julia Alatorre, Verónica, Dalia Molina, Rojan, Alma, Uriel y a mis compañeros del mismo que sin ellos el laboratorio no sería el mismo.

A mis padres de los cuales estoy muy orgullosa, a mis hermanos que siempre me consintieron y me apoyaron, a mis sobrinos a los cuales quiero mucho: Luis Daniel, Joselyn, Brisa, Jesús, Mareli, Emanuel (Kalvin), Dulce Milagros y Uriel.

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
Rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas (PGPR) -	8
Inoculantes Microbianos .....	11
Características <i>Solanum tuberosum</i> cv. Atlantic. ....	14
<b>ANTECEDENTES</b> .....	15
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	19
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	19
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	20
Experimento I: Supervivencia de las bacterias que conforman al inoculante multi-especies EMMIM-1 .....	20
Experimento II: Evaluación de la capacidad del inoculante multi- especies EMMIM-1 para promover el crecimiento de <i>Solanum</i> <i>tuberosum</i> cv Atlantic. ....	22
Experimento III: Amplificación del gen 16sDNAr y su corte con enzimas de restricción .....	23
<b>Resultados</b> .....	24
Supervivencia bacteriana bajo distintas condiciones de almacenamiento. ....	24
Adhesión, colonización de las cepas que conforman al inoculante multi-especies en <i>Solanum tuberosum</i> CV Atlantic. ....	32
Estimulación de crecimiento de la papa por el inoculante multi- especies EMMIM-1 .....	34
Purificación de DNA, Amplificación del 16SDNAr y corte con enzimas de restricción .....	38
<b>Discusión</b> .....	40
Evaluación del inoculante multi-especies durante los seis meses de conservación. ....	40
Efecto del inoculante multi-especies en <i>Solanum tuberosum</i> cv. Atlantic .....	43
Diferenciación molecular de las cepas que conforman al inoculante multiespecies .....	46
<b>Conclusiones</b> .....	47
<b>Perspectivas</b> .....	47
<b>Bibliografía</b> .....	48

## RESUMEN.

Los inoculantes bacterianos se definen como una formulación que contiene una o más especies de bacterias contenidas en un acarreador; cuya función del acarreador es la de transportar a los microorganismos desde el sitio donde son producidos hasta el sitio donde serán inoculados. En función del beneficio que aporten las bacterias, los inoculantes pueden subclasificarse en los siguientes tipos: 1) biofertilizantes; cuando contienen bacterias que aportan nutrientes a la planta (ej. bacterias fijadoras de nitrógeno o solubilizadoras), 2) fitoestimulantes; cuando las bacterias contenidas producen sustancias de tipo hormonal que inducen el crecimiento de plantas, 3) biocontrolante; cuando las bacterias contenidas antagonizan el crecimiento de patógenos en asociación con las plantas, entre otros ejemplos. Para que un inoculante tenga una amplia aplicación es necesario que la inoculación sea práctica, económica y fácil de manejar para el agricultor, debe proveer inóculo suficiente para la planta, ser competitivo con las normas comerciales vigentes, así mismo tener una larga viabilidad en las condiciones de almacenamiento. Recientemente se describió un inoculante multi-especies compuesto por seis especies bacterianas compatibles y altamente competitivas; el cual se ha utilizado exitosamente en plantas de maíz en condiciones de laboratorio y en campos de los estados de Hidalgo y Tlaxcala. Por su impacto y para su comercialización es necesario evaluar la supervivencia de dichas bacterias cuando el inoculante es almacenado bajo distintas condiciones. En el presente trabajo las bacterias del inoculante multi-especies fueron sometidas de manera individual y en mezcla a cinco condiciones diferentes de resguardo, durante seis meses. Las condiciones evaluadas fueron fotoperiodo a temperatura ambiente y oscuridad a temperatura ambiente,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$ . Para la cuantificación bacteriana se realizó el método de goteo por sellado en placa masivo observándose donde se observó que en mezcla las bacterias tienen una mejor supervivencia que de manera individual así se dedujo que las condiciones óptimas de almacenamiento en mezcla son: en oscuridad temperatura ambiente (entre  $25-30^{\circ}\text{C}$ ) y  $4^{\circ}\text{C}$ . Además, se evaluó la capacidad del inoculante multi-especies para promover el crecimiento de plántulas de papa de la variedad Atlantic; observándose efectos positivos en la supervivencia de la planta.

## **INTRODUCCIÓN.**

En el planeta existe una gran diversidad de especies bacterianas las cuales se encuentran en los diferentes ecosistemas realizando diversas funciones e interacciones con otros organismos; las bacterias pueden tener propiedades benéficas desde una perspectiva biotecnológica, agrícola, ecológica, en bioremediación y biomedicina (Lucy *et al.*, 2004). Un ejemplo de interés agrícola es que hay bacterias que colonizan la rizósfera y el rizoplaneo. El término rizósfera se refiere al suelo circundante que se encuentra bajo la influencia de raíces de las plantas; las cuales son capaces de exudar una amplia gama de compuestos orgánicos, el rizoplaneo en cambio es la superficie de la raíz de las plantas donde también están fuertemente adheridas las partículas del suelo (Kennedy, 2005). En estos ambientes se llevan a cabo diferentes interacciones bacteria-planta como por ejemplo la producción de fitohormonas, la disponibilidad de nutrimentos, la reducción de poblaciones de patógenos de la raíz y la fijación de nitrógeno, lo que en conjunto contribuye en el efecto del crecimiento de la planta (Córdova-Bautista *et al.*, 2009)

Las bacterias que se encargan de colonizar la rizósfera como la raíz que a su vez tienen un efecto sobre el crecimiento de la planta se llaman rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR por sus siglas en Inglés); las cuales se encuentran ya sea en vida libre, como endófitas (viven sin causar daño en el interior de las células y los tejidos de plantas superiores durante una parte considerable de su ciclo de vida) y pueden habitar en espacios intracelulares o en el tejido vascular a estas se le llaman bacterias endófitas (Dibut *et al.*, 2009). La presencia de rizobacterias en la rizósfera puede tener un efecto neutro, perjudicial o beneficioso sobre el crecimiento de las plantas (Antoun & Prévost, 2005). Se ha reportado que las bacterias que producen un efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas lo realizan por dos mecanismos importantes:

### **1.- Mecanismos indirectos.**

En los mecanismos indirectos las bacterias benéficas producen metabolitos que pueden inducir respuesta de defensa en plantas contra los posibles patógenos presentes en el entorno o bien producir algunas sustancias

inhibitorias contra esos patógenos; lo cual conduce a plantas más sanas y con menos posibilidad a ser atacadas por un patógeno. El fenómeno más estudiado es la producción de metabolitos que pueden funcionar como antagónicos suprimiendo o inhibiendo los microorganismos perjudiciales para el desarrollo de la planta. Los metabolitos inhibitorios pueden ser de diversos tipos como por ejemplo los sideróforos, antibióticos, enzimas líticas (glucanasas, quitinasas), bacteriocinas, entre otros. Adicionalmente, la inducción de mecanismos de degradación de xenobióticos presentes en suelos contaminados podría significar un mecanismo de efecto benéfico indirecto, sobre todo si los contaminantes presentes afectan el crecimiento de las plantas; así las bacterias al degradar los tóxicos ayudarían a la planta a tener un mejor desarrollo (Jiménez Delgadillo *et al.*, 2001).

## **2.-Mecanismos directos.**

Cuando ocurre un mecanismo directo hay una mejora del estado de los nutrientes de la planta (Antoun y Prévost, 2005), ya sea por su valor nutrimental o su efecto hormonal. Los ejemplos incluyen la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos minerales, producción de sustancias o moléculas volátiles (tipo fitohormona) y fitohormonas en rizósfera; como ácido Indol acético (AIA), giberelinas, auxinas y citoquinas.

La conjunción de los mecanismos da como resultado la promoción evidente del crecimiento en la plantas, observando un incremento en la emergencia, el vigor y peso de las plántulas, un mayor desarrollo en sistemas radiculares y un incremento de hasta 30% en la producción de cultivos de interés comercial, tales como papa, rábanos, jitomate, trigo y soya (Canstante Pérez, 2012).

## **Rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas (PGPR).**

Las PGPR son importantes por poseer diversos mecanismos en la promoción del crecimiento de las plantas, ya que favorecen el crecimiento de las raíces y los pelos radiculares; lo cual mejora la absorción de agua y de nutrientes del suelo produciendo un mejor desarrollo e incremento del tamaño global de las plantas (Caballero-Mellado, 2004). Por esta razón, en las últimas décadas se ha realizado una búsqueda intensiva de bacterias que sean

benéficas para la agricultura, a continuación se describen algunos géneros bacterianos que actúan como PGPR:

El género ***Azospirillum*** (del francés *Azote*-nitrógeno y del grupo *Spirillum*-espiral) comprende bacterias Gram negativas, de vida libre, fijadoras de nitrógeno y asociadas a la rizósfera de la planta, se encuentran en zonas templadas, tropicales y subtropicales, son bacterias móviles con la capacidad de adaptar sus flagelos a diferentes ambientes (Parra *et al.*, 2001). La especie más estudiada de este género es ***Azospirillum brasilense***, debido a que es una bacteria con la capacidad de fijar de nitrógeno; lo cual es común en el género. Las colonias de *A. brasilense* son rojo escarlata crecidas en medio “Rojo Congo”, produce fitohormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas y la auxina más estudiada es el ácido 3-indol-acético (AIA). La bacteria tiene un flagelo polar cuando se encuentra en medio líquido y además tienen un cilio en la parte lateral cuando está en medio sólido, se encuentra en ambientes tropicales a temperaturas de 30°C-40°C (Cassán *et al.*, 2008).

***Pseudomonas putida*** es una bacteria saprófita del suelo, Gram negativa, aerobia, móvil, posee una dioxigenasa inicial, una toluenodioxigenasa, se caracteriza por poseer la capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos (de tipo xileno o etilbenceno) y otros xenobióticos; los cuales usa como fuente de carbono en condiciones aeróbicas evitando de esta manera la contaminación medioambiental producida por dichos compuestos (Ramos *et al.*, 2005), *P. putida* es capaz de producir auxinas, giberelinas, citoquininas y ácido 3-indol-acético (AIA); coloniza efectivamente la rizósfera de plantas y es antagonista de patógenos asociados a las raíces (Patente y López de Mesa, 2006)

***Gluconacetobacter diazotrophicus*** se aisló por primera vez por Cavalcante y Döbereiner en raíz y tallos de caña de azúcar en diversas regiones de Brasil (Cavalcante y Döbereiner, 1988), es una bacteria endófito y se encuentra en los tejidos vasculares como Xilema y en los espacios intracelulares. En condiciones de laboratorio tiene la capacidad de fijar nitrógeno en presencia de nitratos. El crecimiento óptimo de esta bacteria se presenta a 30°C de temperatura y resulta más abundante en medios de cultivo que contienen 10 % de sacarosa y pH de 5.5 (Muñoz- Rojas y Caballero-Mellado, 2001). La bacteria

también se ha descrito asociada a la rizósfera de plantas y promueve su crecimiento vía independiente a la fijación biológica de nitrógeno; quizás por la producción de AIA (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003).

***Burkholderia unamae*** es una bacteria Gram negativa que ha sido aislada de la rizósfera de maíz, caña de azúcar y café (Caballero-Mellado *et al.*, 2004). Estas bacterias crecen en medio BAc formando colonias de color amarillento redondas y contrasta con el medio ya que se tiñe de azul una vez crecida la cepa, tiene la capacidad de fijar nitrógeno con diferentes fuentes de carbono, solubilizan fosfatos insolubles, producen sideróforos; lo cual la hacen una bacteria con capacidad de antagonizar fitopatógenos protegiendo a la planta.

***Bradyrhizobium sp.*** Son bacterias Gram negativas, producen alcalinidad y son fijadoras de nitrógeno se caracterizan por hacer simbiosis con la familia de las leguminosas formando nódulos, en estudios recientes se ha demostrado que pueden colonizar otras plantas, estas bacterias presentan un crecimiento lento, son de vida libre, produce sideróforos, solubilizan fosfatos inorgánicos, es productor de ácido indolacético (AIA) y promueve el crecimiento de las plantas (Cuadrado *et al.*, 2009).

***Sphingomonas sp.*** Comprende bacterias Gram negativas, en forma de bacilo, aerobias y quimioheterótrofas (tanto la energía como el carbono pueden obtenerse del metabolismo de un mismo sustrato orgánico). Estas bacterias se encuentran distribuidas en varios ambientes tanto acuáticos como terrestres, se han aislado cepas de este género en aguas contaminadas, material médico y recientemente en la superficie de las plantas. Diversos organismos del género tiene la capacidad de degradar diferentes compuestos xenobióticos y algunos componentes de tipo herbicida y plaguicida utilizados en campo, también se sabe que el género es capaz de producir sustancias que antagonizan tanto a hongos como bacterias fitopatógenas por esto es considerada una bacteria de interés biotecnológico (Basta *et al.*, 2004; Böltner *et al.*, 2008).

## **Inoculantes Microbianos.**

Para potenciar el crecimiento de las plantas y obtener mejores rendimientos en la agricultura se han utilizado los microorganismos benéficos, en especial aquellos de tipo PGPR (Lucy *et al.*, 2004). Estos han tenido diversas denominaciones, tradicionalmente se usaban los términos de “inoculo” o “inocular” que es la introducción de gérmenes en un sustrato cualquiera, también de manera informal se han nombrado “fertilizantes bacterianos” y para la comercialización de estos inoculantes en el mercado se les llama biofertilizantes. Sin embargo, en términos más adecuados deben denominarse “inoculantes microbianos” que se definen como formulaciones que contienen uno o más microorganismos dentro de un soporte; cuya función es la de transportar de forma viable a los microorganismos desde donde son producidos hasta el campo donde son utilizados (Bashan, 1998). Estos pueden subclasificarse de forma general en función de la actividad que tienen las bacterias y algunos ejemplos se dan a continuación: 1) Biofertilizantes, cuando los microorganismos que contienen aportan algún nutriente esencial para la planta a partir del medio que lo rodea, por ejemplo las bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias solubilizadoras de fosfatos minerales, etc. 2) Bioestimulantes, cuando los microorganismos que contiene la formulación interaccionan con las plantas aportando alguna molécula de tipo hormonal que acelera el crecimiento celular de raíces y por consiguiente la mejor absorción de nutrientes. 3) Bioremediante, cuando los microorganismos tienen vías metabólicas de degradación de contaminantes o sustancias xenobióticos que son nocivas para el medio ambiente o las plantas. 4) Biocontrolante, cuando los microorganismos que contiene realizan antagonismo contra patógenos, lo que conduce a plantas más sanas y con menos posibilidad de ser atacadas por patógenos. No obstante, en la actualidad han comenzado a desarrollarse formulaciones complejas que contienen mezclas de bacterias con distintas capacidades y poseen más de una función, estas formulaciones han sido designadas con el nombre de inoculantes de “segunda generación” y se observan más efectivas que los monoinoculantes (Morales-García, 2013; Muñoz-Rojas, 2013)

Los inoculantes microbianos de una o más especies tienen la capacidad de estimular e incrementar la productividad vegetal, se aplican a la semilla,

suelo y/o planta con el fin de sustituir parcial o totalmente la fertilización sintética y así disminuir la contaminación generada por los agroquímicos; estos microorganismos generalmente están en soportes que tienen un formato fácil de usar y económico; pueden ser orgánicos, inorgánicos o sintéticos (Bashan., 1998; Armenta-Bojórquez *et al.*, 2010)

El método comúnmente empleado en la producción de inoculantes, consiste en aislar del suelo o de las raíces de las plantas determinados microorganismos nativos de tipo benéfico y luego de un proceso de selección, tomar cepas que puedan ser reproducidas para alcanzar elevadas poblaciones celulares, de forma tal que cuando sean formuladas e inoculadas al suelo cumplan el objetivo de influir en la planta de manera benéfica (Viñals *et al.*, 1999).

Para que un inoculante tenga una amplia aplicación es necesario que la inoculación sea práctica, económica y fácil de manejar para el agricultor, debe proveer un inóculo suficiente para la planta; debe ser competitivo con las normas comerciales vigentes, así mismo tener una larga viabilidad en las condiciones de almacenamiento (Bashan *et al.*, 1997). Las principales características para los inoculantes son las siguientes (Estrada-Bonilla, 2008 y Bashan., 1998)

- a) **Características químicas y físicas:** los soportes de los inoculantes deben esterilizarse fácilmente y en lo posible deben ser uniformes en cuanto a sus características físicas y químicas. También deben tener una calidad constante, una alta retención de agua (para los soportes húmedos) y ser adecuados para el mayor número de especies y cepas bacterianas como sea posible.
- b) **Cualidades de fabricación:** el inoculante debe ser fácilmente fabricado por la industria existente, permitiendo la adición de nutrientes, además de poderse calibrar su pH fácilmente. La materia de la cual está hecho debe tener precios razonables y una oferta adecuada.
- c) **Manejabilidad en el campo:** un buen inoculante tiene que ser fácilmente manejable, la cual es una de las principales preocupaciones

para el productor, también debe proporcionar una rápida y controlada liberación de bacterias al suelo, además de poder ser aplicado con maquinaria estándar.

- d) **Características ambientales:** El soporte del inoculante no debe ser tóxico, debe ser biodegradable, sin contaminantes, reduciendo el riesgo de contaminación al ambiente y la dispersión de células a la atmósfera o agua subterránea.
  
- e) **Calidad de almacenamiento:** Un inoculante debe tener suficiente periodo de vida de anaquel (uno o dos años a temperatura ambiente a menudo es necesario para el éxito de integración en el sistema de distribución agrícola en algunos países). No obstante, la mayoría de inoculantes que están en el mercado tienen un periodo de estabilidad de solo 4 meses.

La formulación de inoculantes bacterianos puede clasificarse de acuerdo a su aspecto: 1) Inoculantes con formulación en polvo, estos se utilizan en semillas antes de la siembra y mientras más pequeña sea la partícula del inoculante, mejor será su adherencia a la superficie de la semilla. 2) Otro tipo de inoculante son los microorganismos en polvo que están disueltos en un líquido (comúnmente agua) este se aplica en el surco o sumergiendo la semilla antes de ser sembrada y lleva por nombre inoculantes en base de lodo. 3) Los granulados son inoculantes que se aplican directamente en el surco junto con las semillas y 4) los inoculantes líquidos que comúnmente son hechos de formulaciones de caldo o líquidas, principalmente agua pero también se utilizan aceites minerales u orgánicos; en este caso la semilla se sumergen antes de la siembra. A pesar que son los más usados pueden tener una mayor contaminación en el transcurso de transporte o almacenamiento, la posibilidad de conservación es escasa, dada la rápida pérdida de viabilidad que sufren muchos microorganismos en estas condiciones (Bashan, 1998; Viñals *et al.*, 1999).

### **Características *Solanum tuberosum* cv. Atlantic.**

La papa o patata (*Solanum tuberosum*) pertenece al orden Solanales, en la familia Solanaceae en el género *Solanum* L., es una planta dicotiledónea perene (aunque son cultivadas como anuales) presenta un sistema aéreo y uno subterráneo; el primero está conformado por el tallo, hojas, flores y frutos, el segundo por raíces, estolones y tubérculos. Las plantas de papa miden entre 0.50-1.4 m de alto, presenta flores de color blanca, rosa, púrpura o azul dependiendo la variedad, su germinación se da entre temperaturas de 15° a 25°C, su reproducción es asexual, por medio de tubérculos que es lo más común para su propagación y su desarrollo, abarca de 3 a 7 meses dependiendo de la variedad (Sistema de Información de Organismos Vivos Modificado; Rico-Gallegos, 2009). Los registros indican que se domesticó en Bolivia pero se estima que el altiplano Peruano-Boliviano es el centro de origen de este importante producto el cual se cultiva en casi todo el mundo ocupando el cuarto lugar de importancia después del trigo, arroz y maíz (Casaca, 2005)

En México se consume una gran cantidad de papa por los nutrientes que contiene como almidón, vitamina C y el complejo B, una pequeña porción de proteína y varios minerales. La producción de papa en México se desarrolla en dos ciclos otoño-Invierno y primavera-verano tanto en condiciones de riego como temporal (Hernández *et al.*, 2000), su producción en el año 2011 fue de 1 433 239 toneladas (t) en 54, 551 hectáreas (ha) de las cuales 69 252 t fueron aportadas por el Estado de Puebla en 4 256 ha (el sector alimentario en México 2012). *Solanum tuberosum* L tiene diferentes variedades de interés agrícola como la papa blanca donde la alfa es la variedad dominante y en México se cultiva en las llanuras y valles del norte, en el bajío y en la parte centro del país, la variedad de color “rosita” se cultiva en las Sierras del centro del país, unas de las variedades de papa blanca de interés por su uso industrial agro-alimentario es *Solanum tuberosum*. L. cv. Atlantic (papa gigante), la cual tiene un ciclo de cultivo de 80 a 90 días, presenta tubérculos oblongos alcanza alturas de 40-50 cm, florea a los 50 o 60 días después de la siembra, el color de la flor es lila pálido, es recomendable un fotoperiodo de 14h/10h luz/obscuridad y una temperatura de 16°C-22°C, es susceptible a enfermedades como el tizón tardío. La producción de esta variedad ocupa el

3% de la producción total la cual es consumida por la industria (Biarñes *et al.*, 1995; Arroyave, 2005).

En este trabajo, además se seleccionaron colonias de bacterias de las diluciones más altas que crecieron en los medios selectivos. Tanto cepas de referencia como aquellas captadas por los medios de selección fueron sometidas a extracción de DNA genómico y a amplificación del gen 16S DNAr. Los genes amplificados en cada caso fueron cortados con diferentes enzimas de restricción (metodología ARDRA) y la digestión fue sometida a electroforesis para su visualización en transiluminador, con la finalidad de comprobar que las bacterias rescatadas en planta son las que fueron inoculadas en el inicio experimental.

#### **ANTECEDENTES.**

Del Castillo y Montes de Oca (1994) estudiaron el efecto del uso de bacterias solubilizadoras de fósforo (P) y fijadores de N<sub>2</sub> sobre el rendimiento de este cultivo en las variedades Atlantic y Desiree donde se analizaron diferentes dosis de fertilizantes minerales a 50 y 100% con aplicación de fosforina (Fb) y *Azotobacter* (AZ), solos y combinados en diferentes dosis y momentos de aplicación. Se encontró que la aplicación del 50% fue similar a la inoculación de AZ; donde se encontraron mejores rendimientos fue al combinar el 100% del fertilizante mineral con ambos biopreparados, con incrementos entre 4 y 5 t/ha.

Matos y Zuñiga (2003) evaluaron la supervivencia de las cepas PLL113 de *Bradyrhizobium* sp. y PLC213 de *Rhizobium* sp. en dos inoculantes: turba y mezcla de suelo-composta no estériles y fueron almacenados a 4°C durante seis meses, observando que las poblaciones de ambas cepas disminuyeron con el paso del tiempo. Sin embargo, se encontró que las cepas tuvieron mejor supervivencia en el soporte de turba que en el suelo-composta.

Santillana (2006) realizó diversos experimentos en la búsqueda de un biofertilizante utilizando tres cepas de *Pseudomonas* sp., con el uso de un medio específico donde las bacterias se pudieron desarrollar, determinó la supervivencia de las cepas y la dosis eficiente para el frijol, maíz, papa y tomate, en condiciones de invernadero; observando que el medio donde se

desarrollan podía ser sustituido por uno de menor costo. La viabilidad de las cepas en el inoculante fue de tres meses y con respecto las dosis del inoculante no se encontraron diferencias significativas, pero si en el peso seco del maíz y frijol inoculadas a diferencia de las no inoculadas.

Zago y colaboradores (2006) observaron los efectos en la inoculación de *Azospirillum brasilense* y co-inoculación con *Bradyrhizobium japonicum* en aplicaciones simples y dobles en cultivo de sorgo en campo, dando como resultado que la co-inoculación simple y doble dieron mejores resultados en rendimiento en comparación al control.

Rico Gallegos (2009) evaluó la capacidad de promover el crecimiento vegetal de bacterias del género *Azotobacter* y del grupo Actinomicetos aislados de la papa, bajo condiciones de invernadero, obteniendo un efecto positivo sobre la promoción del crecimiento de *S. tuberosum* mediante incremento del número de tubérculos y en la planta.

Zuno-Florianio y colaboradores (2009) inocularon papa (*Solanum tuberosum* L.) cv. Alpha con *Pseudomonas* sp., la cual fue propagada mediante cultivo de tejido y a los 38 días de edad se inocularon con 100 µL de la suspensión bacteriana con  $10^8$  UFC/mL observando una biopelícula alrededor de la raíz a los 7 días después de la inoculación mientras que en las no inoculadas esta biopelícula no se observó. Esto mostró que *Pseudomonas* sp. tiene una buena colonización ya que se observó una concentración de  $1.92 \times 10^5$  UFC/g en el tejido de la planta de papa después de cinco semanas.

Estrada-Bonilla (2008) evaluó la viabilidad de cuatro bacterias diazotróficas en turba: *Azospirillum brasilense* Sp245, *Azospirillum amazonense* Y2, *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 y *Rhizobium tropici* BR322 sometidas a tres temperaturas: temperatura ambiente (19°-26°C), nevera (4°-10°C) e incubadora (30°C) por 150 días; obteniendo como resultado que el principal factor que afecta a las poblaciones de un inoculante es la temperatura, de igual forma observó que la condición favorable para almacenar los inoculantes evaluados es a temperatura ambiente (19°-26°C) y se observó que el género *Azospirillum* sp. no es muy tolerante a las condiciones de almacenamiento.

Morales García y colaboradores (2008) llevaron a cabo estudios de antagonismo entre diferentes cepas bacterianas de los géneros *Pseudomonas*,

*Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Sphingomonas*, *Burkholderia* y *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Azotobacter* y *Klebsiella*, notando que individualmente producen sustancias inhibitorias y que algunas especies a pesar de esa producción son capaces de coexistir en conjunto. Con los datos anteriores se formuló un inoculante con seis especies bacterianas capaces de coexistir a pesar de producir sustancias inhibitorias (Morales-García, 2013). Las bacterias que conforman al inoculante multi-especies son: *G. diazotrophicus* PAI<sup>5</sup>, *Bradyrhizobium* sp. MS22, *B. unamae* MTI-641, *Sphingomonas* sp. OF178, *A. brasilense* Sp7 y *P. putida* KT2440; todas las cepas son parte de una formulación líquida denominada EMMIM-1 cuyo soporte es agua (Muñoz-Rojas *et al.*, 2013), y con el uso de medios selectivos para cada especie se realizaron estudios de inoculación de semillas de maíz con estas cepas individualmente como en mezcla; mostrando que pueden colonizar y coexistir en la rizósfera.

Morales García y colaboradores (2012) evaluaron la promoción de crecimiento del inoculante multi-especies y lo compararon con un inoculante comercial (*Azospirillum brasilense* y Micorriza) en plantas de maíz de diferentes variedades (criollas) en campos de temporal, observando que el porcentaje de germinación fue mayor para plantas inoculadas con el multi-inoculante en referencia a las plantas no inoculadas y plantas inoculadas con inoculante comercial. Con el multi-inoculante las plantas de maíz alcanzaron una mayor altura y grosor del tallo que las plantas (Morales-García, 2013).

## JUSTIFICACIÓN

La papa es una de las principales hortalizas producidas en México su uso es de interés alimenticio e industrial, la variedad Atlantic es la destinada a la industria agro-alimentaria. Sin embargo, para los pequeños productores no es rentable esta variedad, debido a su baja productividad ocasionada por los requerimientos nutricionales, las diferentes enfermedades y el clima afectando la productividad de sus sembradíos. Una manera para evitar estos riesgos de infección es la utilización de elevadas dosis de fertilización nitrogenada y diversos compuestos químicos contra microorganismos y plagas, pero su uso excesivo hace que se eleven los costos de la producción y afectan de forma adversa al medio ambiente, así como a las poblaciones bacterianas que habitan en la rizósfera (2000; Franco, 2008).

Una alternativa para incrementar el crecimiento de la papa, de la variedad Atlantic, es utilizar el inoculante multi-especies con el propósito de potenciar la absorción de fertilizantes y evitar o disminuir la utilización de los agroquímicos; reduciendo los efectos contaminantes producidos por lixiviación. Además de la capacidad de promover el crecimiento de las plantas, el inoculante multi-especies contiene bacterias que inhiben patógenos por lo que las plantas inoculadas podrían estar más sanas, es por ello que en este trabajo se exploró la capacidad de inoculante multi-especies EMMIM-1 para promover el crecimiento de papa y se determinaron las condiciones más adecuadas para mantener la formulación en condiciones de anaquel.

## **HIPÓTESIS.**

El inoculante multi-especies en condiciones de almacenamiento tendrá una buena viabilidad en mezcla con respecto a las cepas independientes y tendrá un efecto benéfico en la crecimiento de *Solanun tuberosum* cv. Atlantic con respecto al control.

## **OBJETIVO GENERAL.**

- ④ Evaluar la viabilidad de bacterias de un inoculante multi-especies en condiciones de almacenamiento y observar su efecto sobre el crecimiento de *Solanum tuberosum* cv. Atlantic.

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- ④ Determinar una condición ideal para el almacenamiento del inoculante EMMIM-1.
- ④ Evaluar la altura de plantas de *Solanun tuberosum* cv. Atlantic de los tratamientos inoculados con EMMIM-1 y no inoculados.
- ④ Evaluar la supervivencia de las plantas de *Solanun tuberosum* cv. Atlantic, en los dos tratamientos (inoculado y no inoculado).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Experimento I: Supervivencia de las bacterias que conforman al inoculante multi-especies EMMIM-1.

El primer experimento consistió en monitorear la supervivencia de las cepas que forman al inoculante de manera individual como en mezcla, sometiénolas a cinco condiciones diferentes de almacenamiento: fotoperiodo de 24 h luz, 24 h obscuridad con una temperatura de 22°C y humedad 58%, 30°C, -20°C, 4°C. Las formulaciones tanto individuales como en mezcla fueron obtenidas de forma líquidas, en acuerdo con Morales-García (2013) y los medios de selección usados, así como los tiempos requeridos para el crecimiento de las bacterias hasta fase estacionaria (tabla 1).

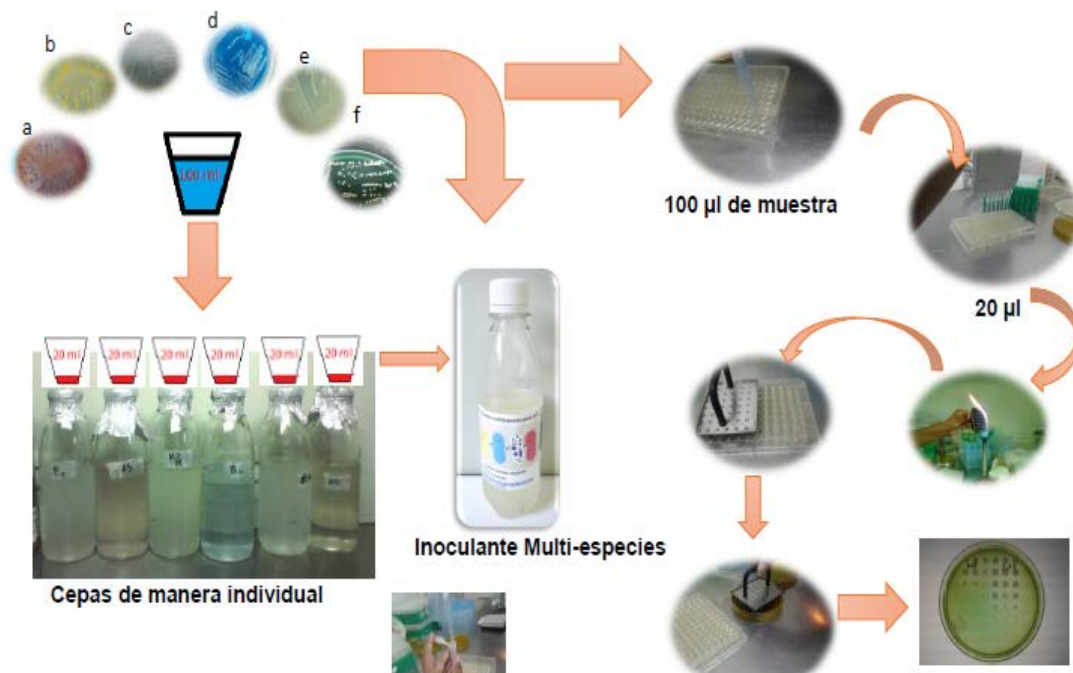
**Tabla 1.** Bacterias utilizadas para el inoculante y sus medios de selección así como el tiempo de incubación.

Espece bacteriana	Medio de selección	Horas de incubación
<i>P. putida</i> KT2440	LB +Cm <sup>50</sup>	24 h
<i>A. brasilense</i> Sp7	Rojo Congo	48 h
<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22	TESMA Ge <sup>10</sup> , AK <sup>30</sup> , TE <sup>30</sup>	24 h
<i>B. unamae</i> MTI-641 <sup>T</sup>	BAC-CRO <sup>30</sup>	24 h
<i>G. diazotrophicus</i> PAI 5 <sup>T</sup>	LGI	48 h
<i>Sphingomonas</i> sp. OF178	LB5%-Cm <sup>30</sup> , CTX <sup>30</sup>	24 h

Las células se crecen en los medios de selección sólidos en placas de 40 X 40 cm con aproximadamente 125 ml de medio de cultivo gelificado. La cosecha se llevó a cabo agregando 100 ml de agua destilada estéril a cada placa. Para desprender las cepas se utilizaron seis espátulas estériles, de cada 100 ml obtenidos se colocaron 20 ml en frascos estériles de 400 ml de capacidad y se aforaron a 300 ml obteniendo seis frascos con las seis bacterias independientes. Para realizar la mezcla se tomaron 20 ml de cada cepa en un frasco estéril de capacidad de 400 ml, haciendo un total de 120 ml que se aforaron a 300 ml (en total seis frascos con cepas individuales y un frasco con

el inoculante multi-especies). De cada frasco se tomaron alícuotas de 500 µl y se colocaron en 200 tubos Eppendorf., dividiéndolos en 40 tubos para colocarlos en las cinco condiciones antes mencionadas (Imagen 1).

Para la obtención de UFC/ml se utilizó el método de Goteo por Sellado en Placa Masivo (GSPM) (Corral Lugo *et al.*, 2010) el cual consiste en realizar diluciones seriadas en placas de ELISA con 96 pocillos con capacidad de 200 microlitros; en ellos se colocan 180 µl de agua estéril en los pozos de dilución. En este trabajo se usaron cinco muestras por tratamiento y 100 µl de muestra de suspensión original para su conteo; de esta se toman 20 µl y se realizan las diluciones en cada pozo, con un replicador previamente esterilizado a condiciones de autoclave. El replicador dispensa en la placa una gota de aproximadamente 1.6 µl y se incubaron a 30°C, posteriormente se contaron las colonias (Fig.1) y se obtuvo la relación de la supervivencia bacteriana (BSR) la cual es la relación del registro del número de células bacterianas presentes en una suspensión después de algún estrés en referencia con el número observado antes del estrés  $BSR = (\log A_e / \log B_e) \times 100$ , ( $A_e$  Antes de un estrés B después de un estrés) (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). Los datos obtenidos se evaluaron para saber si hay una diferencia significativa mediante un análisis de *t* de Student con el programa sigma plot de Handel Scientific Inc.



**Figura 1.** Preparación del inoculante multi-especies como de las cepas individuales donde a). *A.brasilense* Sp7, b). *G. diazotrophicus* PAI 5<sup>T</sup>, c). *Sphingomonas* sp. OF178, d). *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup>, e). *P. putida* KT2440 y f). *Bradyrhizobium* sp. MS22. Se muestra como se realizó el monitoreo de Goteo por Sellado en Placa Masivo (GSPM)

## **Experimento II: Evaluación de la capacidad del inoculante multi-especies EMMIM-1 para promover el crecimiento de *Solanum tuberosum* cv Atlantic.**

Se utilizaron treinta tubérculos en buenas condiciones (sin enfermedades fitopatogenas) y se colocaron en obscuridad a 25 °C y 65 % de humedad relativa, aproximadamente por veinte días; condiciones que permiten que el número de brotes por tubérculo sea mayor y de mejor calidad.

Una vez que se obtuvieron papas con los brotes, estos fueron cortados con un bisturí estéril en cuadrillos de un centímetro cuadrado aproximadamente, evitando daños al brote. Con ayuda de pinzas estériles, los brotes fueron colocados en frascos de 100 ml de capacidad que contenían 25 g de vermiculita estéril. Se inocularon 30 brotes con 15 ml de inoculante aforándolo a 40 ml con agua destilada estéril. Para el caso de los controles se les agregaron 40 ml de agua destilada estéril y se pusieron a condiciones de fotoperiodo 16 h de luz y 8 h de obscuridad, con una temperatura de 30°C y una humedad relativa de 60 %. Ambos tratamientos fueron regados con 4 ml de medio MS y cada semana con agua.

La adherencia de las bacterias a los brotes fue medida a las 24 horas en acuerdo con Morales-García (2013) y a los veinte días se cuantificó la colonización. En ambos casos se tomaron cinco muestras de los dos tratamientos y se utilizaron 10 ml de agua estéril para generar las suspensiones respectivas que fueron cuantificadas por el método GSPM, obteniendo las UFC/ml de las cepas que lograron adherirse a los brotes y colonizar las plantas. Los datos obtenidos fueron evaluados por análisis estadísticos usando la *t* de Student para conocer si hay una diferencia significativa en los tratamientos con el programa sigma plot de Handel Scientific. Los parámetros que se midieron fueron: número de plantas que sobrevive, altura de las plantas a 10 días después del inicio de crecimiento del brote a los 20 días y 30 días después de la primera inoculación.

## Amplificación del gen 16sDNAr y su corte con enzimas de restricción.

Las seis especies bacterianas que conforman al multi-inoculante se crecieron en un medio líquido de selección (Morales-García *et al.*, 2011) a 30 °C hasta fase estacionaria. A partir del crecimiento bacteriano se extrajo DNA genómico mediante el Kit de extracción de DNA de PROMEGA después se realizó una electroforesis para detectar el DNA y se tomaron fotografías. A partir de los DNAs purificados obtenidos se realizó la amplificación del gen 16S DNAr usando oligonucleótidos universales fd1 y rd1 con las condiciones de PCR siguientes: 95 °C 3 minutos, 30 X (95 °C 1 minuto, 57 °C 1 minuto, 72 °C 1 minuto), 72 °C 5 minutos, T final 4 °C. Los amplificados fueron purificados y cortados con las enzimas de restricción Roché HhaI y TaqI (tabla 2) bajo condiciones estipuladas por el fabricante. Se visualizaron y se tomaron fotografía de los bandeos obtenidos.

**Tabla 2.** Secuencia de oligonucleótidos universales fd1 y rd1 utilizados en PCR y los cortes específicos de las enzimas de restricción HhaI y TaqI

fd1 FORWARD	rd1 REVERSO	HhaI	TaqI
5'-GTTTTCCCAGTCACGTTGTA-3'	5'-TTGTGTGCGGATAACAATTTC-3'	GCG'C C'GCG	T'CGA AGC'T

## Resultados

### Supervivencia bacteriana bajo distintas condiciones de almacenamiento.

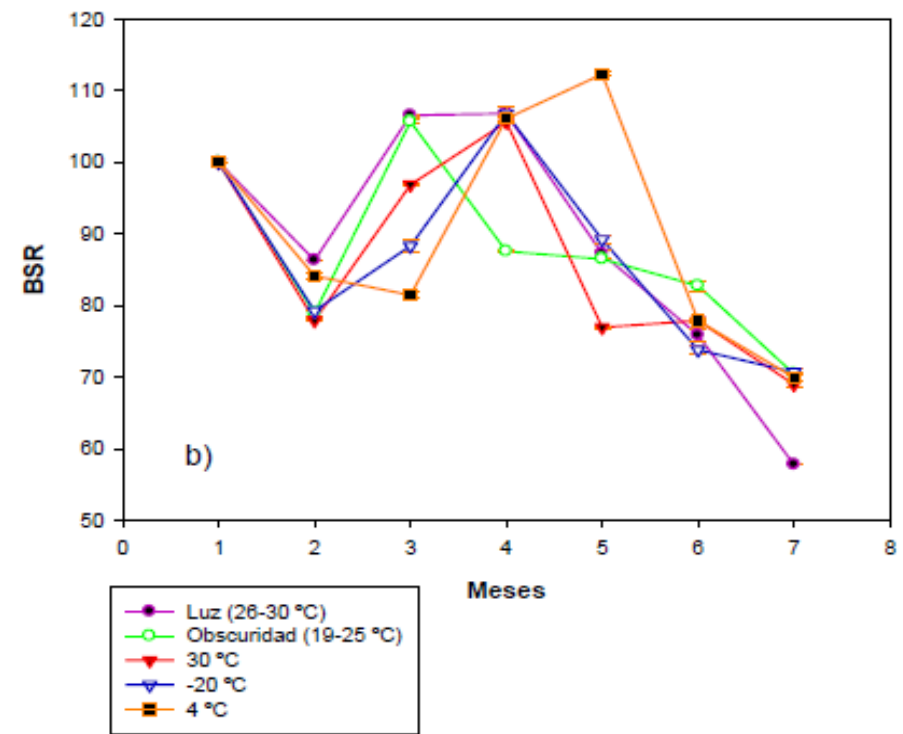
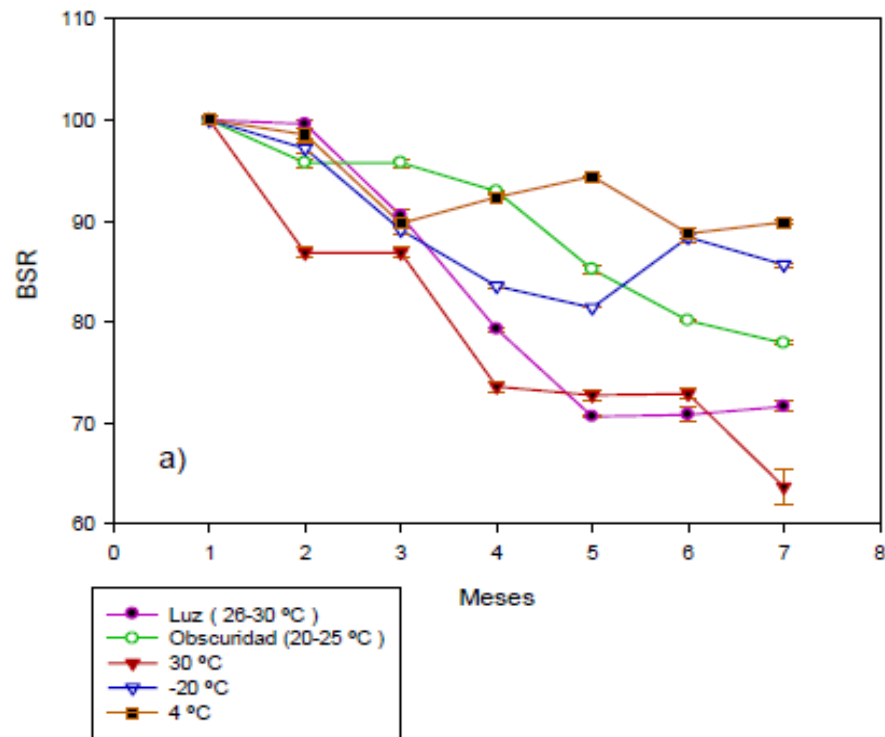
El número de bacterias contenidas en las suspensiones utilizadas para los experimentos de almacenamiento varía entre  $10^6$ - $10^8$  UFC/ml (tabla 3).

**Tabla 3.** Número de bacterias tanto individual como en mezcla, presentes en las suspensiones antes de someterlas a almacenamiento.

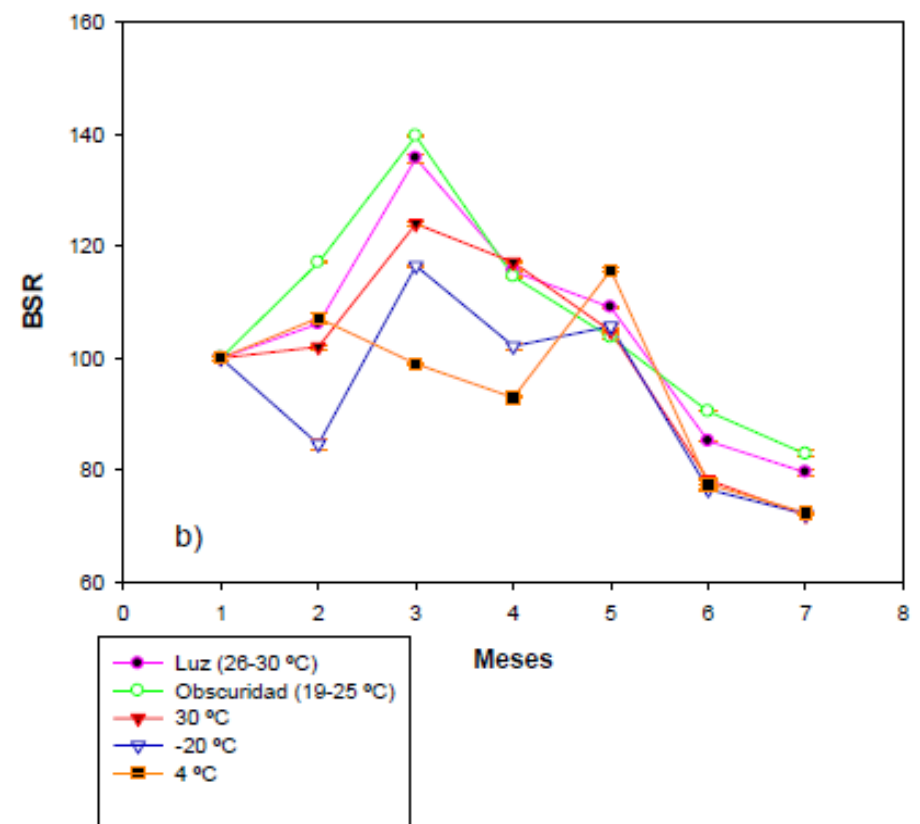
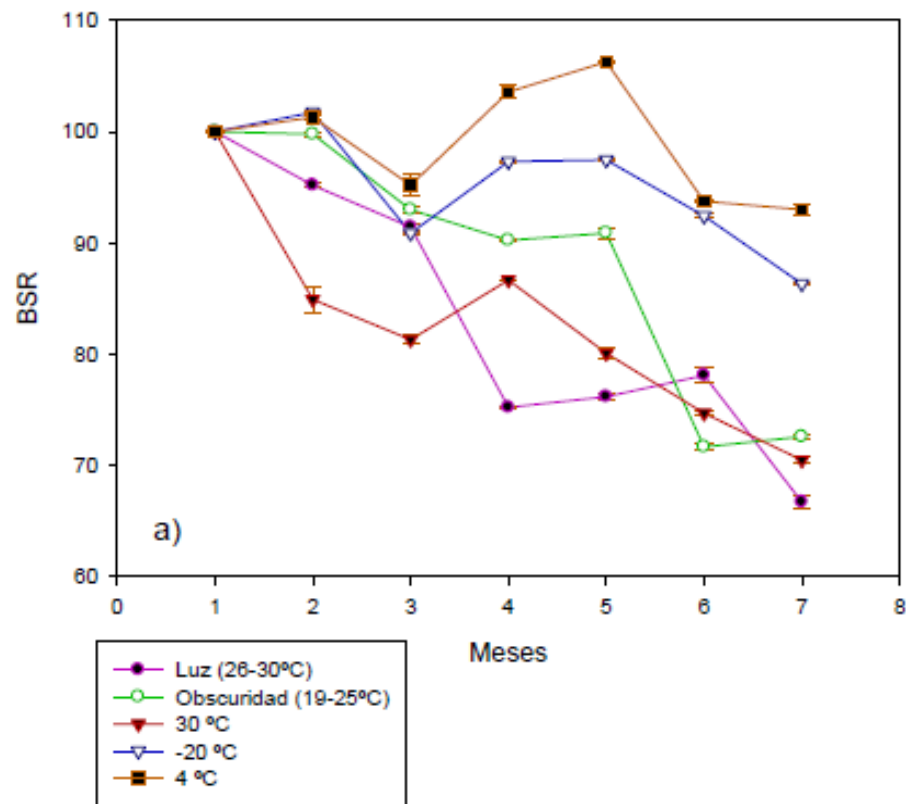
Especie bacteriana	Individual Log del UFC/ml	Mezcla Log del UFC/ml
<i>P. putida</i> KT2440	6,71E+08	1,10E+07
<i>A. brasilense</i> Sp <sup>7</sup>	2,16E+08	1,40E+07
<i>Bradyrhizobium</i> sp. MS 22	1,17E+07	5,30E+07
<i>B. unamae</i> MTI-641 <sup>T</sup>	3,70E+07	9,00E+06
<i>G. diazotrophicus</i> PAI 5 <sup>T</sup>	2,83E+06	9,00E+06
<i>Sphingomonas</i> sp. OF178	1,77E+07	2,00E+07

Después de someter a las bacterias de manera individual como en mezcla en cinco condiciones de almacenamiento por seis meses se puede observar que de manera individual la cepa *P. putida* KT 2440 (gráfica 4) no se ve afectada en su BSR la cual se mantiene en un rango de 60 a 70 en condiciones de Luz a temperatura ambiental ( $T_a$ ), resultados similares se obtuvieron en 30 °C, mientras que en -20 °C, obscuridad  $T_a$  y 4 °C se mantiene una BSR de 70 a 90 después de 6 meses (a). En la mezcla se puede notar que en la condición luz  $T_a$ , la bacteria *P. putida* tiene una BSR de 50 a comparación de las otras condiciones las cuales se mantienen en rango de 65-75 de BSR. *Sphingomonas* sp. OF178 (gráfica 5) en condición de Luz  $T_a$ , obscuridad  $T_a$  y en 30 °C tiene una BSR de 65 a75, pero se mantiene en una BSR de 85-95 en condiciones de congelación a -20 °C como en 4 °C. En la mezcla se nota que la cepa *Sphingomonas* sp. OF178 se mantiene con una BSR de 70-85 en las cinco condiciones evaluadas. En el caso se de la bacteria *Bradyrhizobium* sp. MS22 (gráfica 6) se puede observar que al estar sometida

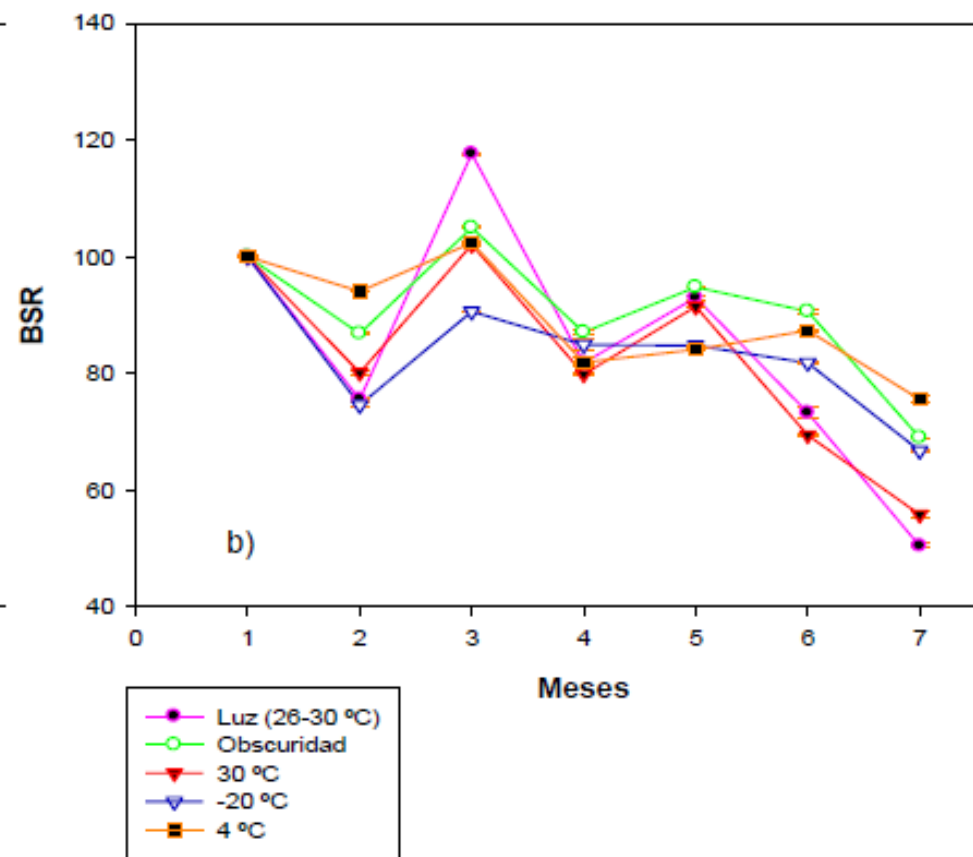
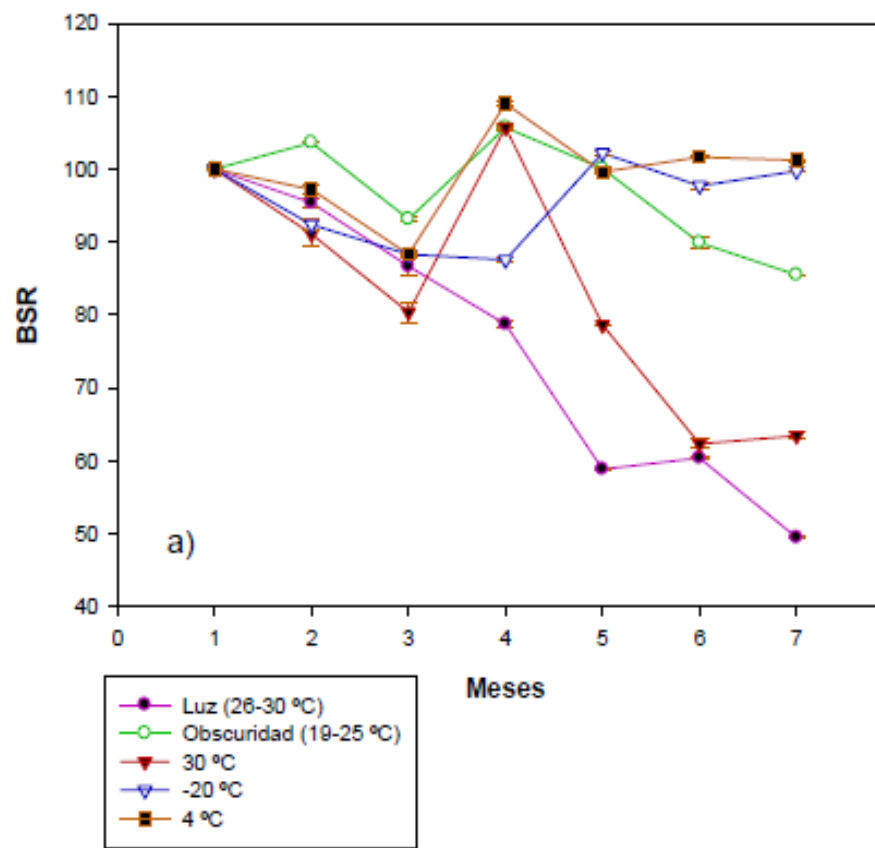
de manera individual la bacteria tiene una BSR de 85-105 en 20°C, oscuridad T<sub>a</sub> y 4°C mientras que en luz T<sub>a</sub> y 30 °C su BSR es de 40-65. En mezcla *Bradyrhizobium* sp. MS22 tiene un rango de BSR de 50 a 75 siendo la condición de 4 °C donde se observó la más alta supervivencia y luz T<sub>a</sub> la más baja. En general el comportamiento de la supervivencia bacteriana tanto en mezcla como individual, la condición de 4°C es favorable para una buena supervivencia de estas bacterias, sin embargo en la cepa *A. brasilense* Sp<sup>7</sup> (gráfica 7) de manera individual tuvo una población menor en la condición de 4°C (BSR 54) en referencia a la condición de -20 °C (BSR 61). Esta bacteria estuvo en un rango de BSR entre 70-75, bajo las condiciones de oscuridad a T<sub>a</sub>, 30 °C y Luz T<sub>a</sub>. En mezcla la BSR de *A. brasilense* sp<sup>7</sup> fue similar en las cinco condiciones ya que están en un rango de 57-65. *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup> cae a niveles no detectados a los seis meses de evaluación (BSR 0), en varias condiciones evaluadas: luz y oscuridad T<sub>a</sub>, 30 °C y -20 °C (tabla 8). No obstante en la condición de 4 °C, se observó una BSR de 29 a los 6 meses de evaluación para esta bacteria de forma individual. *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup> en mezcla se comportó de manera similar bajo las cinco condiciones de almacenamiento exploradas; ya que se obtienen BSRs en un rango de 40 a 50. Un comportamiento parecido se observó en la cepa *G. diazotrophicus* PAI5<sup>T</sup> (grafica 9), donde a los cinco meses se mostraron valores de BSR de 0 bajo las siguientes condiciones: 30 °C y -20 °C y a los 6 meses en las condiciones de 4°C, luz y oscuridad T<sub>a</sub>, también se observó una BSR de 0. En mezcla *G. diazotrophicus* sobrevive en un rango de BSR de 35 a 45, en las condiciones luz, oscuridad T<sub>a</sub>, -20 °C y 30 °C, mientras que en la condición de 4 °C tiene una BSR de 60 la cual fue muy superior.



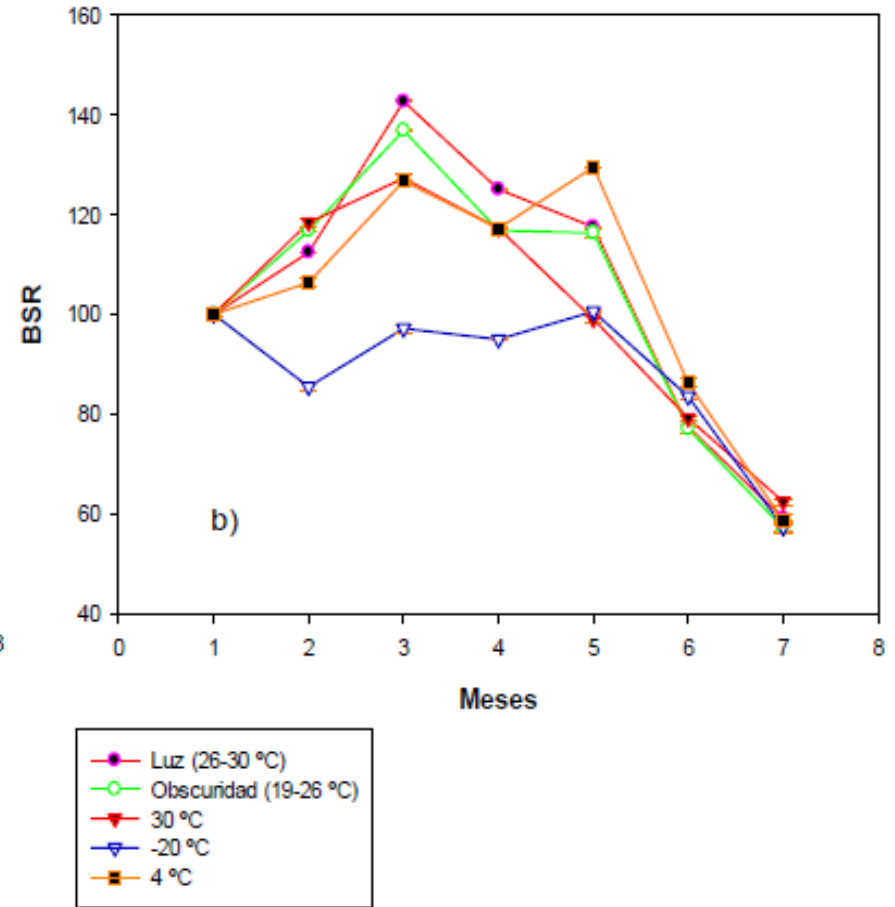
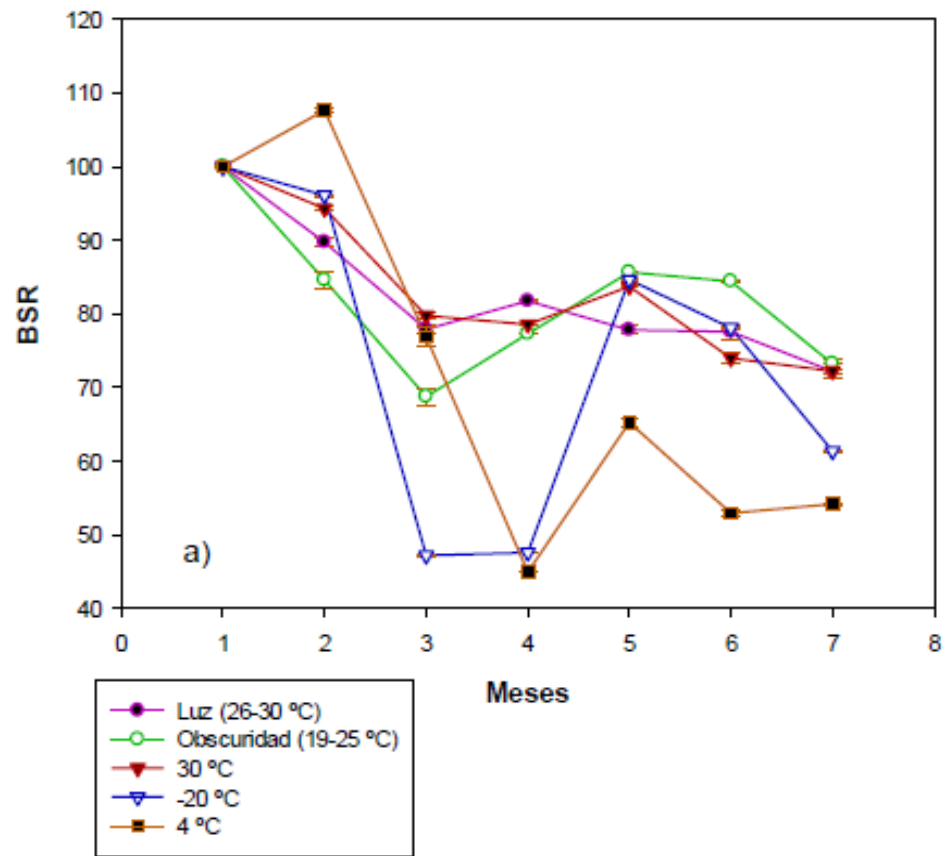
Gráfica 4. Supervivencia de *Pseudomonas putida* KT2440 en cinco condiciones diferentes, durante seis meses de almacenamiento, de manera individual (a) como en mezcla (b).



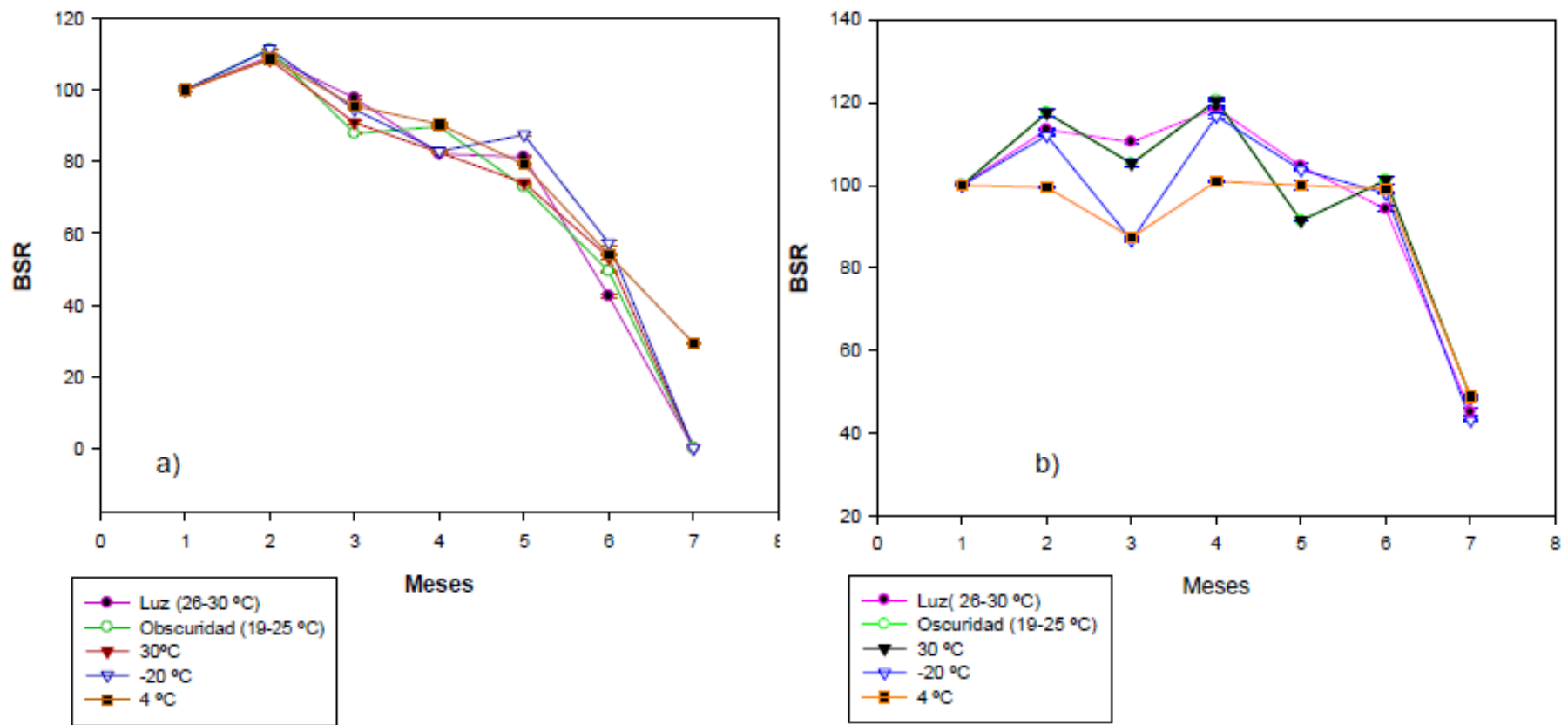
Gráfica 5. Supervivencia de *Spingomonas* sp. OF178 en cinco condiciones diferentes, durante seis meses de almacenamiento, de manera individual (a) como en mezcla (b).



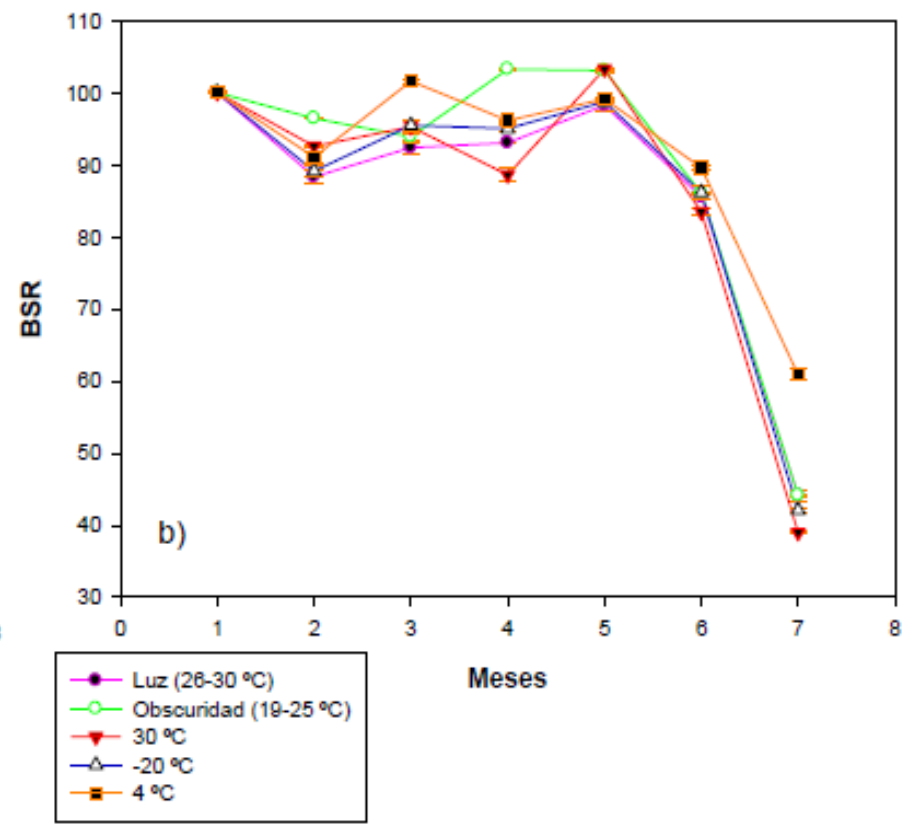
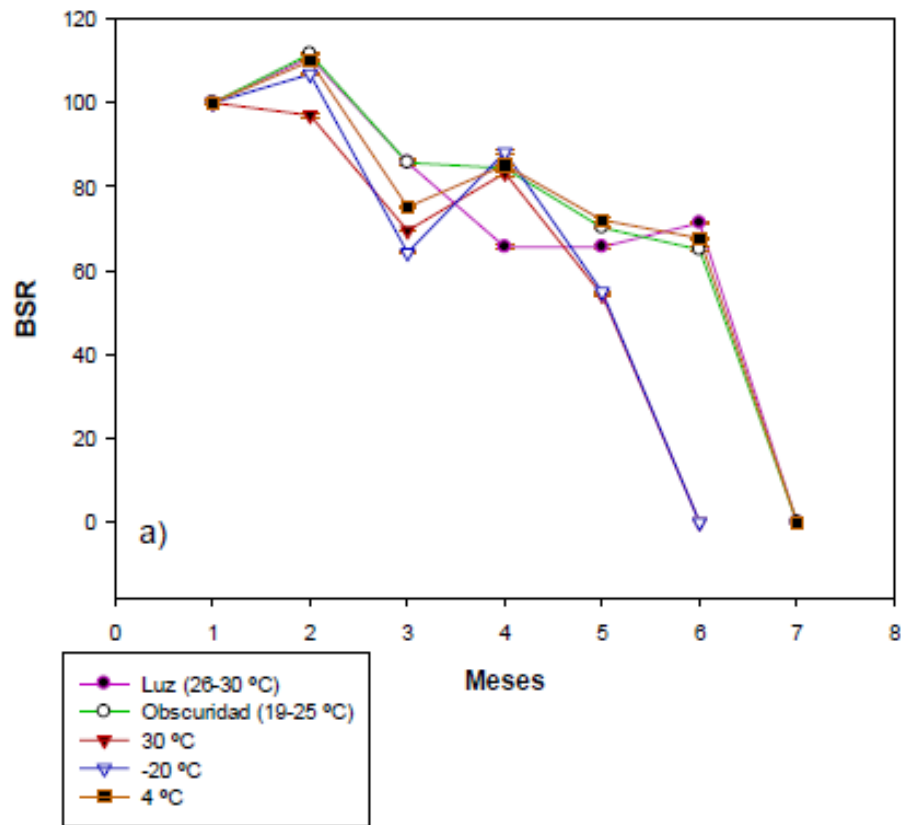
Gráfica 6. Supervivencia de *Bradhyrizzobium* sp. MS22 sometida a cinco condiciones diferentes, durante un periodo seis meses de almacenamiento, de manera individual (a) como en mezcla (b).



Gráfica 7. Supervivencia de *Azospirillum brasilense* Sp7 sometido a cinco condiciones diferentes de almacenamiento, durante un periodo de seis meses, de manera individual (a) como en mezcla (b).



Gráfica 8. Supervivencia de *Burkholderia unamae* MTI-641<sup>T</sup> en cinco condiciones diferentes de almacenamiento, durante un periodo de seis meses, de manera individual (a) como en mezcla (b).

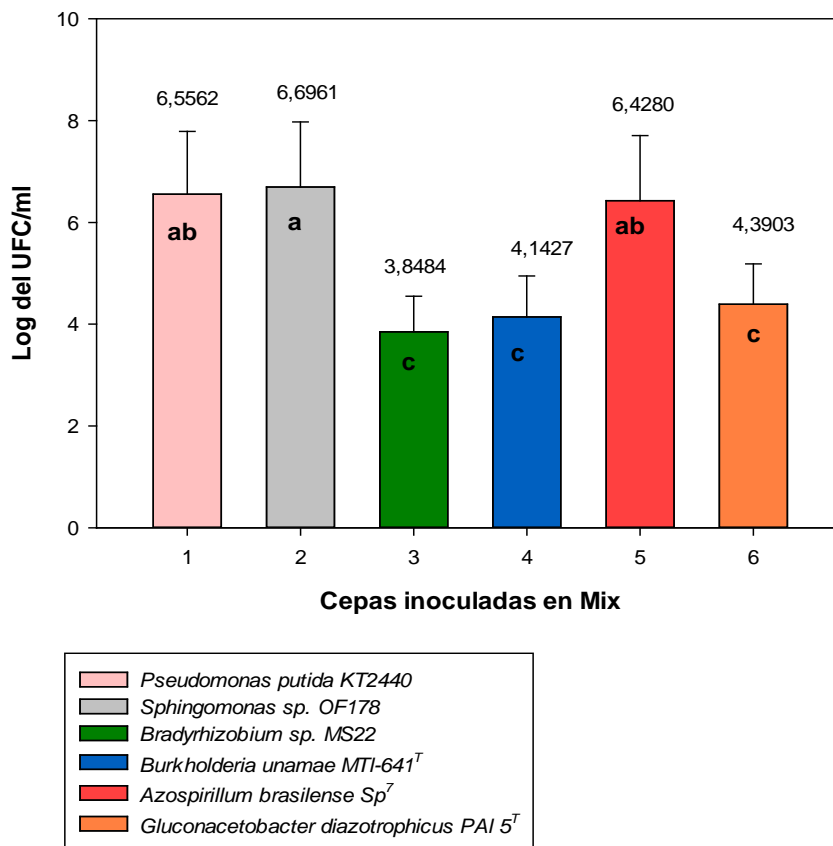


Gráfica 9. Supervivencia de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5<sup>T</sup> sometida a cinco condiciones diferentes de almacenamiento, durante seis meses, de manera individual (a) como en mezcla (b).

## Adhesión, colonización de las cepas que conforman al inoculante multi-especies en *Solanum tuberosum* CV Atlantic.

Se inocularon los brotes de papa con una suspensión bacteriana del inoculante multi-especies. La adhesión bacteriana se tomó entre 12 a 24 h después de la inoculación donde se observó que *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178 y *A. brasilense* Sp7 se adhieren en el orden de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/brote, en el caso de *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup>, *G. diazotrophicus* PAI 5<sup>T</sup> y *Bradyrhizobium* sp. MS22 se observó una adhesión de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/brote (ver gráfica 6).

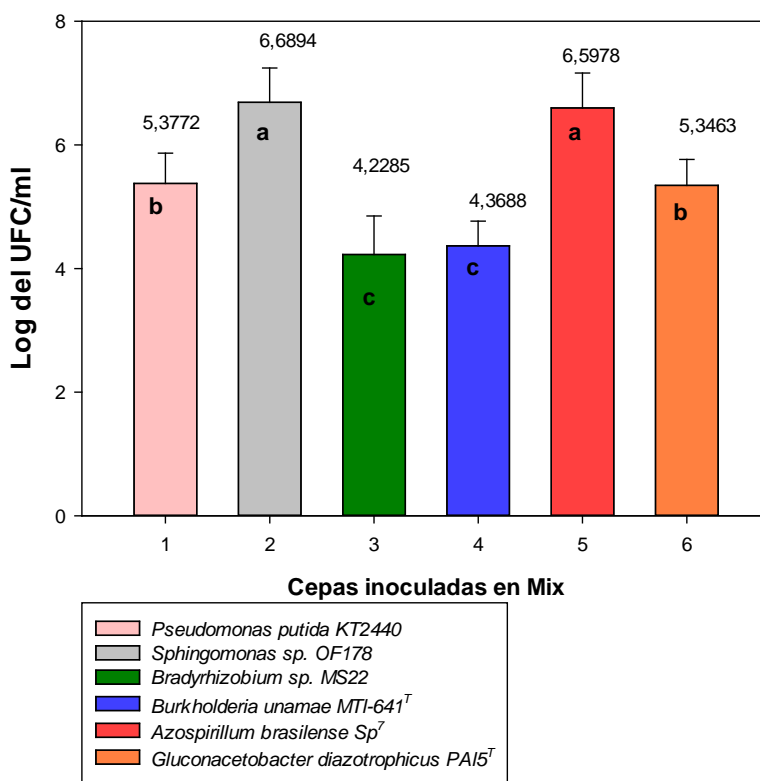
### Adhesión



**Grafica 6.** Adhesión de las bacterias del inoculante multi-especies después de 12-24 horas de ser inoculadas en el brote de papa las letras nos indican una denotan una diferencia estadística significativa (t-student  $P < 0.05$ ).

La colonización se realizó a los 20 días después de la inoculación del brote donde se observó que *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* Sp7 alcanzaron una colonización entre  $5 \times 10^6$  UFC/ml. Sin embargo, *Sphingomonas* sp. y *G. diazotrophicus* PAI 5<sup>T</sup> colonizaron en un orden alrededor de  $2 \times 10^5$  UFC/ml. Por su parte *Bradyrhizobium* sp. MS22, *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup> solo alcanzaron de  $2 \times 10^4$  UFC/ml, a los 20 días después de la inoculación.

### Colonización

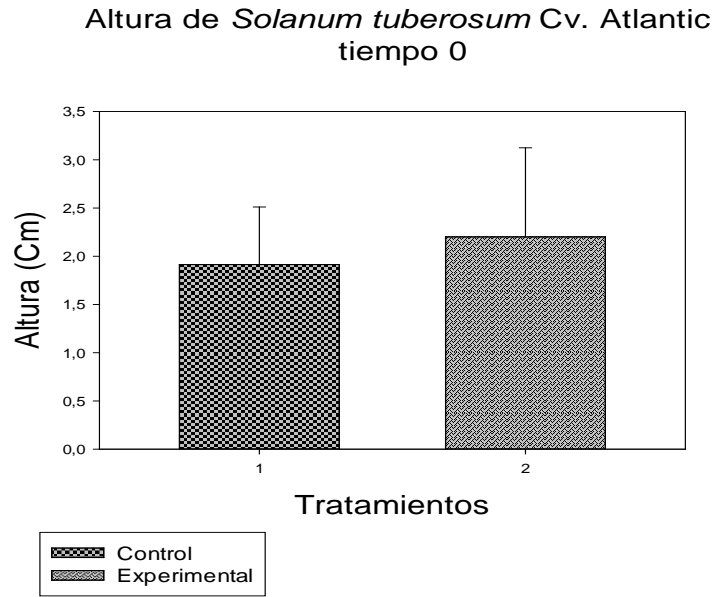


Grafica 7. Colonización del inoculante multi-especies a los 20 días después de la inoculación sobre el brote de papa. Las letras denotan una diferencia estadística significativa (t-student  $P < 0.05$ ).

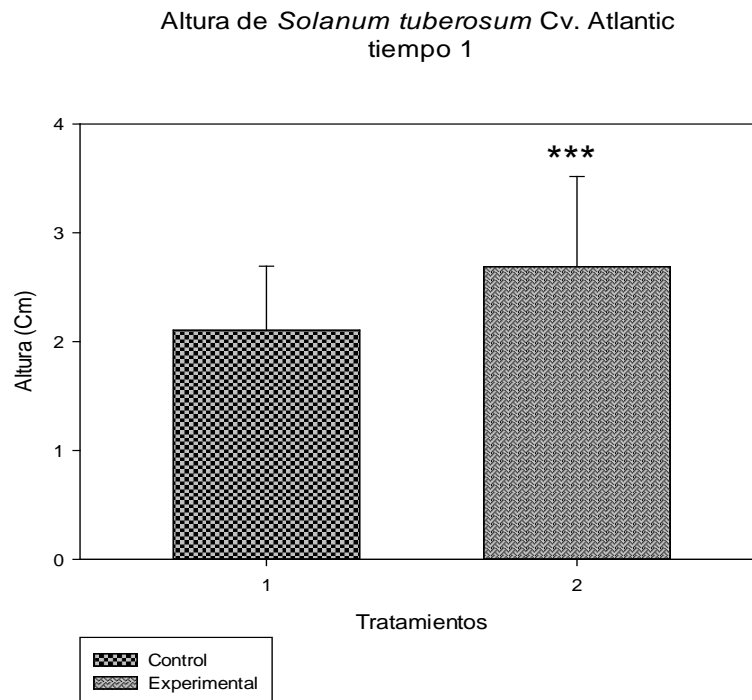
## **Estimulación de crecimiento de la papa por el inoculante multi-especies EMMIM-1.**

Se realizó la medición de longitud de los brotes de papa antes de ser inoculados y sembrados. Se tomaron medidas de longitud (cm), 10, 20 y 30 días después de que las plantas fueron inoculadas. En el tiempo cero no hubo diferencia significativa en el tamaño del brote entre los brotes destinados para los tratamientos inoculados y no inoculados (Gráfica 8). A los 10 días después de la inoculación se observó diferencia significativa entre el tamaño de los brotes que fueron inoculados con respecto a de los controles (Gráfica 9). En las siguientes dos mediciones no se notó diferencia significativa entre los plantas controles y las inoculadas (Gráfica 10 y Gráfica 11).

Aun cuando no se observó estimulación de crecimiento por parte de las bacterias en tiempos 10 y 20 días posteriores a la inoculación, la supervivencia brotes de papa inoculados con el inoculante multi-especies fue mayor (43.75%) al de brotes no inoculados (25%) (Gráfica 12); posiblemente debido a que estas últimas fueron más afectadas por hongos fitopatógenos, observados desde los primeros días de ser plantadas.

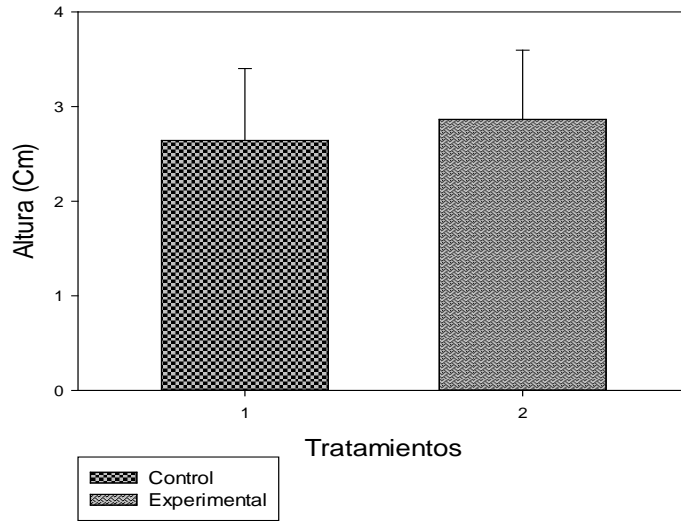


**Gráfica 8.** Altura de los brotes de *Solanum tuberosum* CV. Atlantic antes de ser plantadas e inoculadas.



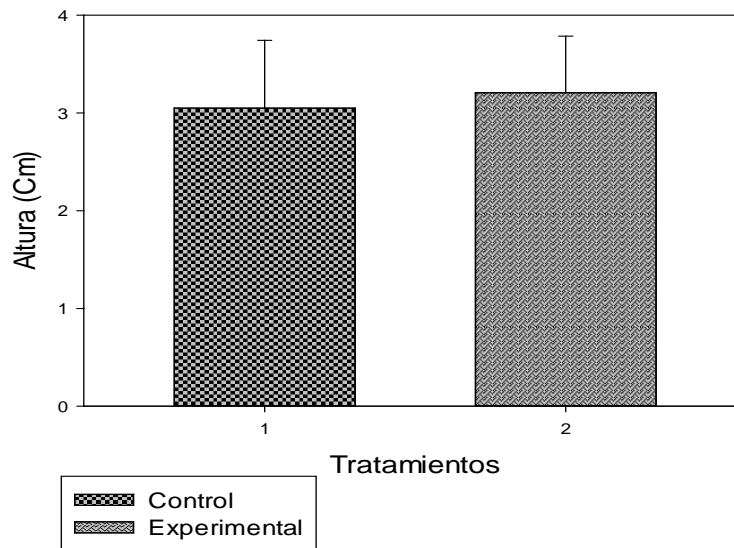
**Gráfica 9.** Altura de plántulas de *Solanum tuberosum* cv. Atlantic a los diez días posteriores a la inoculación. Cada barra representa el promedio de 32 plantas y los asteriscos denotan una diferencia estadística significativa (t-student  $P < 0.05$ ).

Altura de *Solanum tuberosum* Cv. Atlantic  
tiempo 2



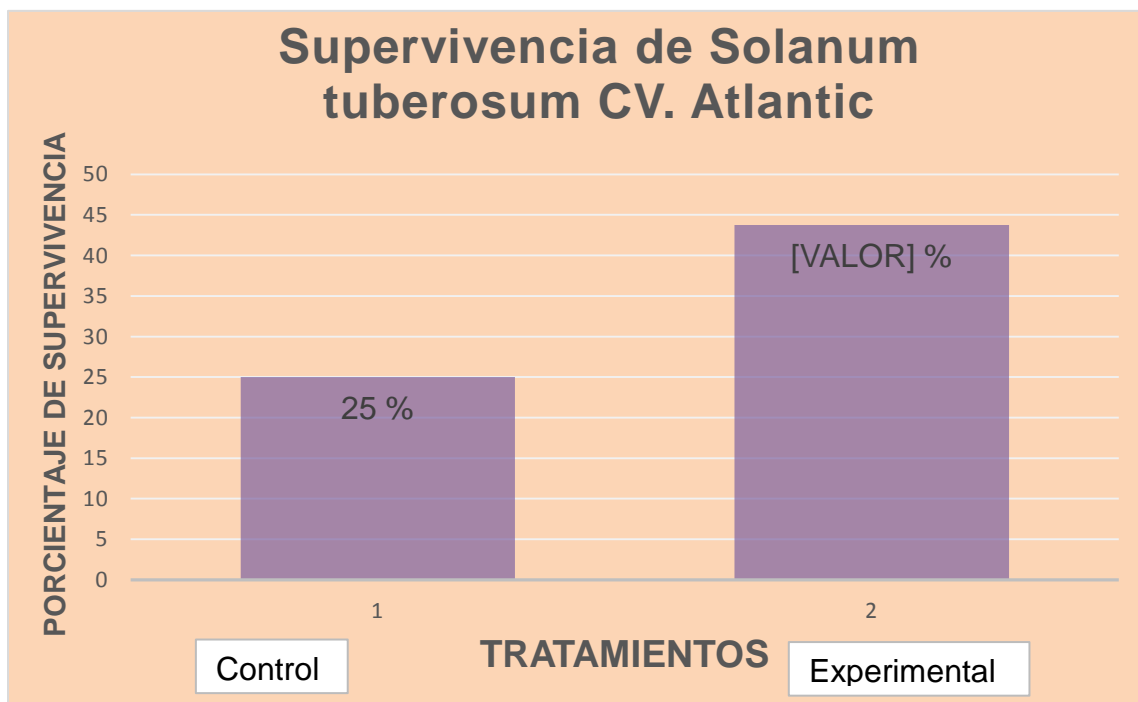
**Gráfica 10.** Altura de *Solanum tuberosum* cv. Atlantic a los veinte días posteriores a la inoculación. No hay diferencia significativa entre los tratamientos.

Altura de *Solanum tuberosum* Cv. Atlantic  
Tiempo 3



**Gráfica 11.** Crecimiento de *Solanum tuberosum* cv. Atlantic, a los 30 días posteriores a la inoculación. No hay diferencia significativa entre los tratamientos.

Debido a los resultados obtenidos en el crecimiento de las plantas de papa se realizó una evaluación de supervivencia del brote de papa con y sin inoculante multi-especie, notando que los brotes que fueron inoculados tuvieron un 43.75% de supervivencia que el grupo control que obtuvo un 25% de supervivencia (Grafica 12) debido a que estas se veían afectada por hongos fitopatógenos desde los primeros días de ser plantadas.

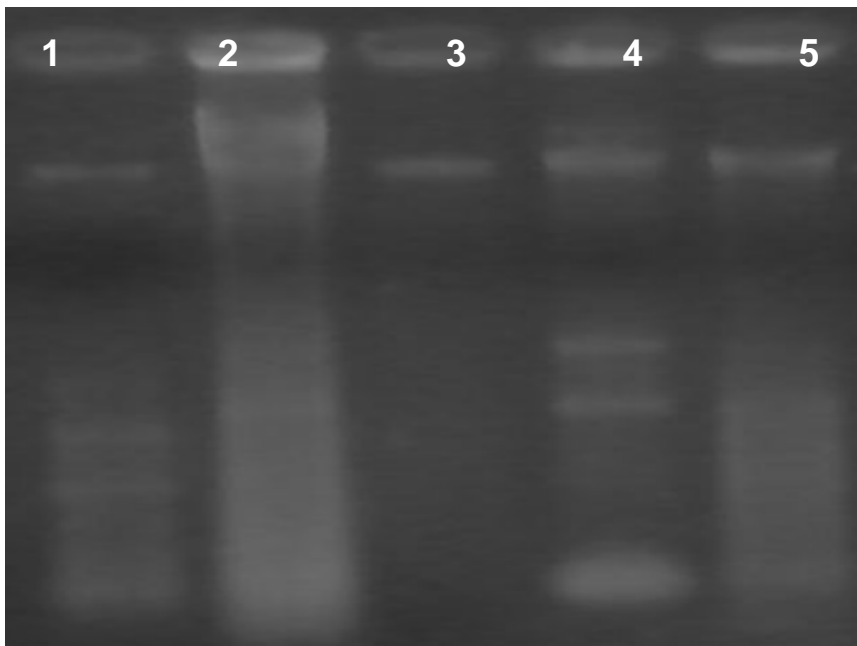


**Grafica 12.** Porcentaje de Supervivencia de *Solanum tuberosum* cv. Atlantic al finalizar el experimento notando que las inoculadas tuvieron una mayor supervivencia a comparación del control.

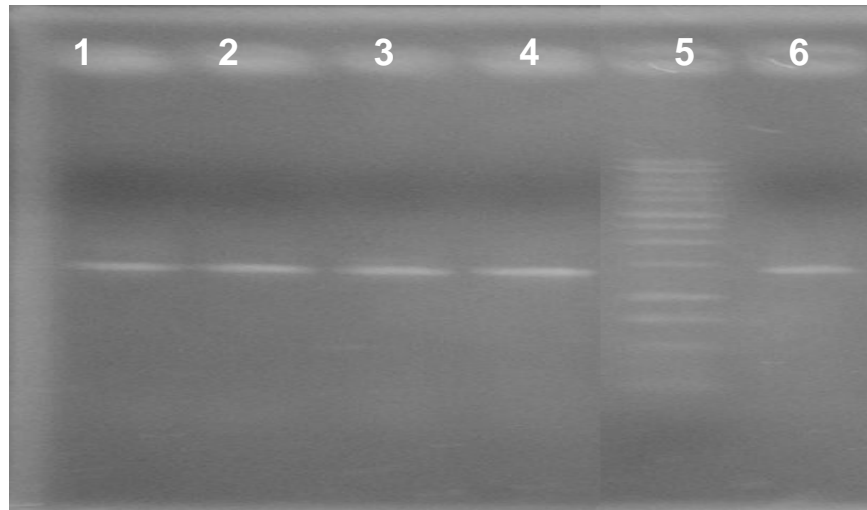
### **Purificación de DNA, Amplificación del 16SDNAr y corte con enzimas de restricción.**

La purificación de DNA fue exitosa (Fig 2) observando que el material genético obtenido fue adecuado para usarlo como plantilla para su amplificación.

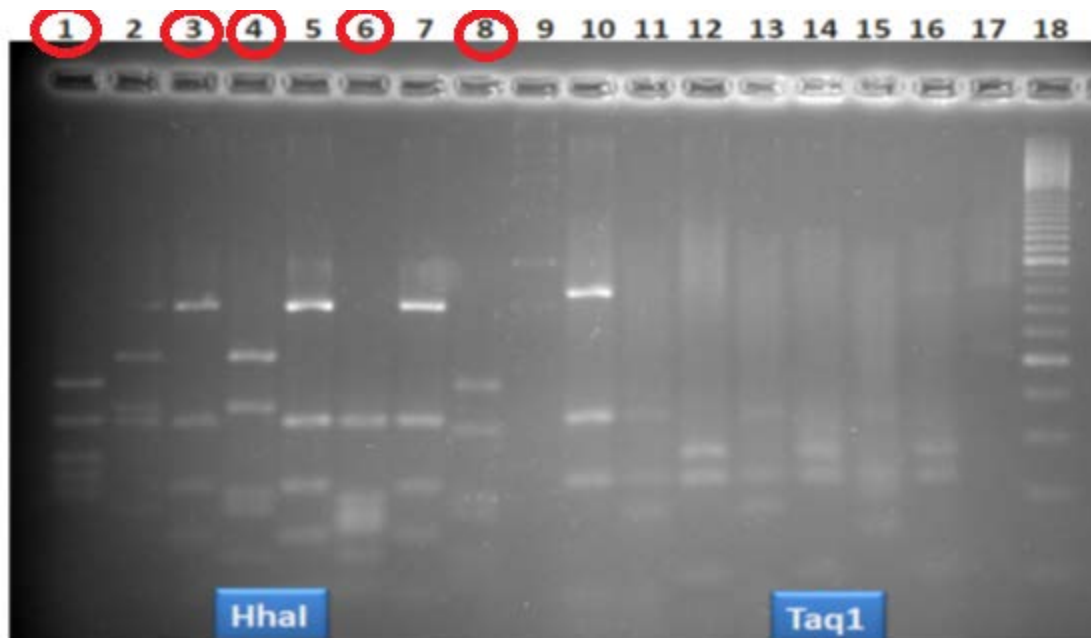
La amplificación del gen 16S DNAr se muestra en la Figura 3, observando que todas las cepas fueron amplificadas. El material amplificado se sometió a restricción con las enzimas Hha1 y Taq1 (Fig. 4), observando que la enzima Hha1 permitió una diferenciación de las bandas obtenidas para las seis cepas que conforman el inoculante multi-especies.



**Figura 2.** DNA genómico de las cepas que conforman al inoculante multi-especies. **1.-** *Sphingomonas* sp. OF178, **2.-** *Pseudomonas putida* KT2440, **3.-** *Burkholderia unamae* MTI-641, **4.-** *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15<sup>T</sup>, **5.-** *Azospirillum brasilense* SP<sup>7</sup>,



**Figura 3.** Amplificación del gen 16SDNAr de las cepas que conforman el inoculante multi-especies. 1.- *Sphingomonas* sp. OF178, 2.- *Pseudomonas putida* KT2440, 3.- *Burkholderia unamae* MTI-641, 4.- *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI5<sup>T</sup>, 5.- marcador de 1Kb, 6. *Azospirillum brasilense* SP7.



**Figura 4.** Patrón de restricción de las cepas que conforman al inoculante multi-especies con la enzima Hha1 y Taq1. (1 y 10) *Pseudomonas putida* KT2440, (3 y 12) *Sphingomonas* sp. OF178, (4 y 13) *Burkholderia unamae* MTI-641, (6 y 15) *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI5<sup>T</sup>, (8 y 17) *Azospirillum brasilense* SP7, (18) Marcador 100 pb. (Los números que no se especifican, son bacterias ajenas al inoculante multi-especies).

## Discusión

### **Evaluación del inoculante multi-especies durante los seis meses de conservación.**

Santillana (2006) evaluó la supervivencia de tres cepas de *Pseudomonas* sp. en turba durante tres meses, donde observó que la viabilidad de las cepas era similar al término de la evaluación, alcanzando un log del número de bacterias entre 5.5 y 6.4, estos datos se obtuvieron con la cepas *Pseudomonas putida* KT2440 en todas las condiciones exploradas de almacenamiento tanto de forma individual como en mezcla, observado los hasta los 6 meses de almacenamiento. Ya que a los tres meses del almacenamiento tanto de manera individual como en mezcla la supervivencia fue mayor a 80.

En el presente trabajo se observó que cuando se almacenó de forma individual a *Sphingomonas* sp. OF178 su tasa de supervivencia fue mayor en las condiciones de -20°C y 4°C a comparación de otras condiciones a las que fue sometida (luz, oscuridad temperatura ambiente y 30°C), esto coincide con lo reportado por Aislabie y col., (2000) quienes observaron que el género *Sphingomonas* sp ha sido aislado en varias ocasiones de ambientes extremos, tales como suelos árticos y antártico. Bajo estas condiciones extremas estas cepas pueden desarrollar adaptaciones tales como la modificación de lípidos para mantener la fluidez de la membrana, la acumulación de polioles y la producción de proteínas de choque frío y enzimas activas en frío.

La bacteria *Bradyrhizobium* sp. MS22 tiene una buena supervivencia tanto de manera individual como en mezcla; notando que de manera individual tiene una mejor supervivencia en las condiciones de 4°C y -20°C ya que a pesar de estar seis meses en almacenamiento se mantuvo en una BSR de 100 (7 log UFC/ml) lo cual contrasta con experimentos de Matos y Zuñiga (2003) quienes observaron que la viabilidad de *Bradyrhizobium* sp. disminuyó notablemente en almacenamiento durante 180 días con dos soportes no estériles: turba y suelo-composta; siendo más marcada esa disminución en suelo-composta. Esto se

debió al crecimiento de otros microorganismos en los soportes impidiendo que la cepa de interés tuviera una buena supervivencia, ya que el agotamiento de los nutrientes y la producción de tóxicos pudieran inhibir a la cepa estudiada. En la formulación líquida de este trabajo, que usa agua estéril como soporte, las bacterias en general sobreviven mejor ya que no tienen competencia contra otras bacterias. Esto podría explicar el por qué las cepas *Pseudomonas putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178 y *Bradyrhizobium* sp. MS22 de manera individual tienen una supervivencia mayor a pesar del estrés al que fueron sometidos ya que estas bacterias tienden a aprovechar todos los nutrientes que pueda tener el soporte. En el inoculante multi-especies no se le adiciono nutrientes, pero podría haber trozos de medio derivado del procesamiento con el que se realizó.

La supervivencia de las bacterias *Pseudomonas putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178 y *Bradyrhizobium* sp. MS22 no fue afectada a pesar de estar sometidas a temperaturas bajas, incluso de congelación. Bajo estas condiciones la fluidez de la membrana cambia, provocando la detención de los procesos de transporte a través de ella (Sánchez y Corrales, 2005), haciendo las actividades metabólicas más lentas. Los cambios que ocurren en membrana podrían ser claves para estudiarse en el futuro y conocer si son responsables de cambios en la supervivencia de bacterias observada en el presente trabajo. En el proceso de congelación se realiza la formación de cristales de hielo así como el aumento de la concentración de soluto y la eliminación de agua líquida por su conversión en hielo (Mazur, 1997), hay también una reducción de la velocidad metabólica, a tal punto que su metabolismo se hace imperceptible, pero suficiente para mantener al microorganismo vivo (Sánchez y Corrales, 2005).

Los mecanismos que las bacterias realizan para resistir a la congelación son: la producción de polisacáridos, que son exportados dentro del medio para formar una cápsula alrededor de la célula (Christensen, 1999), así se mantiene a salvo de los cristales de hielo que se forman en la congelación. Ciertas especies de *Pseudomonas* sp. tienen complejos de proteínas de nucleación de hielo que permiten el crecimiento en el hielo, o también tienen proteínas de aclimatación al frío las que contribuyen a que sea tolerante a congelación (Mc Grath, *et al.*, 1994).

Las proteínas más estudiadas son las proteínas anticongelantes (AFPs) las cuales son un subconjunto de proteínas de unión al hielo, y se encuentran en organismos resistentes al frío, actuando como inhibidoras del crecimiento de cristales de hielo y recristalización (Celik *et al.*, 2012).

Meynell (1958) observó que la tolerancia de *Escherichia coli* a las bajas temperaturas está influenciada por el estadio de crecimiento. Las células en fase logarítmica son extremadamente susceptibles a lesiones por enfriamiento rápido a 0°C, mientras que las células en fase estacionaria son insensibles a este estrés; lo que nos sugiere que las cepas de estudio fueron resistentes a bajas temperaturas ya que previo a su almacenamiento fueron crecidas hasta su fase estacionaria.

Bajo condiciones de almacenamiento a 30°C y fotoperiodo luz T<sub>a</sub> donde la temperatura aumenta de 26°C a 30°C el calor podría acelerar los procesos metabólicos de las bacterias teniendo como consecuencia la disminución de los nutrientes en el medio disminuyendo su viabilidad en los primeros meses de almacenamiento y al concluir los seis meses del experimento la viabilidad disminuyó notablemente, a comparación de los almacenados en condiciones de bajas temperaturas.

*Azospirillum brasilense* Sp7 de manera individual tiende a ser susceptible durante el almacenamiento en condiciones donde la temperatura osciló de 4 °C a -20 °C, ya que se observa una BSR menor a comparación de las otras condiciones (luz, oscuridad temperatura ambiente y 30°C). Sin embargo, en las condiciones donde la temperatura varió de 25°C a 30°C se observó un descenso en la supervivencia sin ser mayor que en las condiciones donde la temperatura fue menor de 4°C. lo que sugiere que el género *Azospirillum* sp. es poco tolerante a las condiciones de almacenamiento (Estrada-Bonilla, 2008) debido a que a 4 °C la supervivencia de la cepa está se ve afectada durante el almacenamiento y también en condiciones de 30°C a pesar de que esta temperatura se aproxima a su condición ideal de crecimiento (30°C-40°C) (Cassán *et al.*, 2008). La especie *A. brasilense* Sp7 en mezcla muestra una supervivencia parecida en todas las condiciones de resguardo lo que nos indica que al estar en interacción con otras cepas puede adquirir resistencia a bajas temperaturas ya que su BSR en las cinco

condiciones están entre un rango de 50-60 a comparación de manera individual, esto concuerda con lo dicho por. Pallo (2011) el cual evaluó la supervivencia de *Azospirillum* sp en diferentes soportes como sólidos y líquidos durante 180 días y observo que en algunos soportes como turba descendió a comparación de otros sustratos con nutrientes. En los soportes líquidos de *Azospirillum* sp se observó que a pesar de tener nutrientes en el medio ácido málico-Rojo Congo la población de *Azospirillum* sp disminuye. Sin embargo en medios ricos de nutrientes la supervivencia es mayor, pero implica un mayor costo en la producción y en la venta del producto.

*Burkholderia unamae* MTI-641<sup>T</sup> como *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5<sup>T</sup> de manera individual a los seis meses de almacenamiento en las cinco condiciones ya no es detectable en su medio de selección, excepto *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup> la cual en el la condición de 4°C aun es detectada. En acuerdo con Caballero-Mellado y col., (2004) al crecer a *B. unamae* MTI-641T en distintos medios a diferentes temperaturas, se observó que la temperatura como el medio de selección afectaba el crecimiento de la cepa por que se sugiere evaluar otros medios de selección a distintas temperaturas de crecimiento cuando se trate de recuperar la cepa, así pudiera ser que se logre recuperar cepas durante los 6 meses. Lo que se observó en la mezcla, fue que estas cepas a los seis meses tuvieron una supervivencia baja lo que indica que nos permite sugerir es que en consorcio las otras bacterias le pudieran brindan protección al estrés al que están sometidos.

### **Efecto del inoculante multi-especies en *Solamun tuberosun* cv. Atlantic.**

Las bacterias del inoculante multi-especies tienen una buena capacidad de adhesión en diversas semillas de maíz sin necesidad de usar un adherente (Morales-García., 2013) en la adhesión de *Solalum tuerosum* cv. Atlantic lo que se observó es que las que tienen una mejor capacidad de pegarse a la superficie del brote son *P. putida* KT2440. Este género ha sido reportado en la adhesión como colonización de papa, la cual se propagó de manera *in vitro* teniendo un mayor tamaño de la raíz y tallo, el peso seco y fresco de la planta fue mayor a

comparación de los controles (Frommel *et al.*,1991) así como en propagación de papa por medio de cultivo de tejido de una variedad de papa (alha) donde se observó que a los 7 días después de la inoculación la raíz se encontraba rodeada por una biopelícula de bacterias (Zuno-Floriano *et al.*, 2009). Otra cepa que resalta en la adhesión como colonización de la papa cv. Atlantic es *Sphingomonas* sp. OF178 la cual tiene una amplia capacidad de colonizar a las semillas de maíz teniendo números altos de log por UFC/ml (Morales García, 2013) así como en semillas de frijol (Juárez-Hernández, 2012). *Azospirillum brasilense* Sp7, es una de las bacterias más estudiadas por la capacidad de poder colonizar a las plantas gramíneas como el maíz y el trigo las cuales son de gran importancia económica. Sin embargo esta especie se le ha encontrado con la capacidad de colonizar a las leguminosas con buenos resultados (Juárez Hernández, 2012).

A pesar que el género *Bradyrhizobium* sp. se caracteriza por ser una bacteria que hace simbiosis mutualista con leguminosas, en estudios realizados por Cuadrado y col., (2009) encontró que este género puede colonizar a otras plantas de interés como es el caso de este experimento donde se observó que *Bradyrhizobium* sp. MS 22 fue capaz de adherirse y colonizar la planta de papa cv. Atlactic en números de log UFC/ml bajos a comparación de las cepas descritas anteriormente. *G. diazotrophicus* PAI 5<sup>T</sup> se ha inoculado especialmente en caña de azúcar de donde se aisló (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003) obteniendo buenos resultados en la adhesión como colonización de la planta notando un desarrollo mayor en las inoculados a comparación de los controles. En este experimento se observó que si es capaz de adherirse a la papa en número bajos sin embargo en la colonización (20 dpi) el número de log UFC/ml aumentaron un rango igualando a *P. putida* KT2440. La cepa *B. unamae* tiene la capacidad de colonizar el ambiente rizosférico como endófito de maíz (Caballero-Mellado *et al.*, 2004) teniendo efectos benéficos sobre el crecimiento de plantas, incrementando el peso seco de las plantas en el rango de 16-30%; en este experimento *B. unamae* MTI-641<sup>T</sup> fue capaz de colonizar a *Solanum tuberosum* cv. Atlactic.

A pesar de no obtener buenos resultados en la promoción de crecimiento de *Solanum tuberosum* cv. Atlactic habiendo una diferencia significativa en la

altura a los 10 dpi (días posteriores a la inoculación), esto pudo ser ya que a los cinco días después de la inoculación se le agregó el medio MSJ (medio nutritivo) lo que pudo ayudar a las bacterias como a la planta en el metabolismo y así notarse una diferencia de longitud a comparación con el control ya que la planta de papa consume diversos compuestos nitrogenados (Barabaz *et al.*, 2000) en la evaluación de las variedades de papa Atlantic y Desiree donde se notó que al aplicar el 100% de fertilizante mineral con biopreparados dio mejor resultados de hasta 4 y 5 t/ha, que con solo el biopreparado (Del Castillo y Montes de Oca, 1994).

Santillana (2006) evaluó una formulación hecha por tres cepas de *Pseudomonas* sp. en plantas el frijol, maíz, papa y tomate y no encontró diferencias significativas en el tamaño de las plantas sin embargo en el peso seco del maíz y frijol hubo diferencia significativa entre las plantas inoculadas de las controles. Moreno (1988) realizó la inoculación con *Glomus fasciculatum* en esquejes enraizados de dos variedades de papa Mariva y Tomasa en condiciones de campo donde no hubo diferencia significativa en la producción de tubérculos ni el peso seco de las plantas inoculadas y no inoculas. En el presente experimento no se obtuvo una diferencia significativa casi en todas las mediciones, sin embargo, no se realizó la medición del peso fresco ni del peso seco, quizás en esto pudiera haber alguna diferencia significativa de las inoculadas y no inoculas.

La producción de papa con el método desarrollado en el laboratorio es de bajo presupuesto así como fácil y eficaz, pero a pesar de tener las mayores precauciones y manejar todo en condiciones de esterilidad la supervivencia de las plántulas se vieron afectadas por enfermedades de tipo fitopatógenas, afectando en mayor cantidad a las plantas no inoculadas que a las que fueron inoculadas con las seis bacterias (inoculante-multi-especies) lo que sugiere que las bacterias que conforman el inoculante tiene la capacidad de producir sustancias inhibitorias que antagonizan microorganismos que puedan provocar enfermedades en la planta , como es el caso del genero *Pseudomonas* sp. la cual disminuyo la población de *Erwinia carotovora* en tubérculos semillas de la papa (Kloepper,1982). También Soler *et al.*, 2012 observó una disminución de la

enfermedad que causa *Spongospora subterranea* en *Solanum tuberosum* variedad Diacol Capiro el cual inoculo bacterias que aisló del interior o de la raíz de la papa (los microorganismos utilizados no fueron caracterizados).

Esto nos habré las posibilidades de encontrar bacterias benéficas que sirvan para biocontrol de enfermedades de papa las cuales para el agricultor son un problema que implica la utilización de diversos fungicidas lo cual es dañino para el medio ambiente como para el ser humano.

### **Diferenciación molecular de las cepas que conforman al inoculante multiespecies.**

La amplificación del gen 16S DNAr de las cepas que conforman el inoculante multi-especies y su posterior corte con la enzima HhaI podría ofrecer una diferenciación rápida de las cepas para su detección dentro del proceso de producción del inoculante multi-especies, como lo muestran los resultados de este trabajo. Además, el método podría apoyar a la detección molecular de las cepas cuando interaccionan con las plantas. En la actualidad no existen formas rápidas y moleculares para identificación de las cepas que conforman a los inoculantes bacterianos (Bashan, 1998) dentro de los procesos productivos, por lo que el corte con enzimas de restricción podría ser novedoso para la industria de los inoculantes. El método de detección rápida también nos puede dar garantía de que las cepas obtenidas a partir de rizósfera de plantas inoculadas corresponden a las que se inocularon y no son cepas similares captadas en los medios de selección. Por lo que esta estrategia será útil en la corroboración de las cepas de diversos experimentos resguardadas en congelación (Morales-García *et al.*, 2012)

## CONCLUSIONES:

- Se encontró diferencia significativa en el crecimiento de *Solanum tuberosum* cv. Atlantic a los diez dpi en las planta que fueron inoculadas.
- *Pseudomonas putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178 y *Bradyrhizobium* sp. MS22 tuvieron una supervivencia (BSR) mayor de 50 en condiciones de 4°C y -20°C de manera individual.
- La supervivencia en almacenamiento de manera individual de *Burkholderia unamae* MTI-641<sup>T</sup> como de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5<sup>T</sup> disminuyó a niveles no detectadas a los cinco meses.
- *Azospirillum brasilense* Sp7 se ve afectada en su supervivencia durante el almacenamiento de manera individual, sin embargo en mezcla tiene una supervivencia más elevada (BSR alrededor de 60) en las cinco condiciones a las que fue sometida.
- En mezcla las cepas *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5<sup>T</sup> y *Burkholderia unamae* MTI-641<sup>T</sup> fueron beneficiadas en la supervivencia; ya que a las 6 seis meses de almacenamiento son detectadas en sus medios selectivos.
- La condición ideal para un buen almacenamiento del inoculante multi-especies es a una temperatura de 4°C.
- Se recomienda utilizar el inoculante multi-especies antes de los cinco meses de almacenamiento.
- Las cepas que componen al inoculante multi-especies (excepto *Bradyrhizobium* sp. MS22) se pudieron diferenciar por la enzima Hhal

## PERSPECTIVAS

- ✓ Evaluar el inoculante multi-especies en tubérculos de papa.
- ✓ Evaluar la capacidad del inoculante como inhibidor de enfermedades fitopatógenas.
- ✓ Hacer una evaluación de supervivencia del inoculante multi-especies sometido a liofilización para un mayor tiempo de conservación.
- ✓ Evaluar diferentes enzimas para tener una mejor diferenciación de las cepas que componen el inoculante multi-especies.

## BIBLIOGRAFÍA.

Aislabie J., Forghat J., Saul D. Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near Scott Base, Antarctica. *Polar Biol.* 2000; 23: 183-188.

Antoun H. and Prévost D. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Z. A. Siddiqui (ed.), en: *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Springer. Printed in the Netherlands. 2005: 1–38.

Armenta B. A. D., García G. C.J., Camacho B. R., Apodaca S. M., Montoya L.G. y Pérez E. N. Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *Ra Ximhai*. 2010; 6: 51-56.

Arroyave-Cerón S.E. Subprograma de producción de hortalizas Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) La Alameda, Chimaltenango. 2005

Bashan Y. "Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture". *Biotechnology Advances*. 1998; 16: 729-770.

Bashan Y. y Holguin G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances can. *UJ.Microbiol.* 1997; 43: 103-121.

Basta T, Keck A, Klein J and Stolz A. Detection and Characterization of Conjugative Degradative Plasmids in Xenobiotic-Degrading *Sphingomonas* Strains. *J. Bacteriol.* 2004; 186: 3862-3872.

Benavides L. J., Quintero G., Guevara V. L., Jaimes C. D. C., Gutiérrez R.S.M., Miranda G. J. Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA - publicación científica* ISSN. 2006; 5: 1-116.

Biarñes A., Calin P. J. y de Jesus S.M. *Agronomía de la papa en México*. ORSTOM. 1995.

Böltner D., Godoy P., Muñoz-Rojas J., Duque E., Moreno-Morillas S., Sánchez L. y Ramos J. L. Rhizoremediation of lindane by root-colonizing *Sphingomonas*. *Microbial Biotechnology*. 2008; 1: 87–93.

Caballero-Mellado J. *Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas*. *Rev Latinoam Microbiol.* 2006; 48: 154-161.

Caballero-Mellado J., Martínez-Aguilar L., Paredes-Valdez G y Estrada-de los Santos P. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004; 54: 1165–1172.

Casaca Á. D. *Guías tecnológicas de frutas y verduras*. DICTA. 2005: 1-14.

Cassan D. F y García S. I. *Azospirillum* sp.; Cell physiology plant interactions and agronomic research in Argentina. 1a ed. Buenos Aires Argentina; 2008.

Cavalcante V. A. and Döbereiner, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil*. 1988; 108: 23–31.

Celik Y., Drori R., Pertaya-Braun N., Altan A., Barton T., Bar-Dolev M., “et al” Microfluidic experiments reveal that antifreeze proteins bound to ice crystals suffice to prevent their growth. *PNAS*. 2013; 10: 1309–1314.

Christensen B. E. Physical and chemical properties of extracellular polysaccharides associated with biofilms and related substances. In J. Wingender, T. Neu, and H.C. Flemming (ed.), *Microbial extracellular substances: characterization, structure and function*. Springer, New York, USA. 1999:144-154

Constante P. C. Empleo de rizobacterias como promotores de crecimiento vegetal en la asociación de avena (*Avena sativa* L.) con alfalfa (*Medicago sativa*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*). Quevedo–Ecuador. 2012.

Córdova-Bautista Y., Ferrera-Cerrato R., Obrador-Olán J. J., Córdova-Ávalos V. Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Musa AAA Simmonds*) cultivar ‘Gran enano’ y su potencial para integrar un biofertilizante. *Uniciencia*. 2009; 25(3):253-265.

Corral-Lugo A., Morales-García Y. E., Pazos-Rojas L. A., Ramírez-Valverde A., Martínez-Contreras R. D. y Muñoz-Rojas J. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo”. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2012; 14: 147-156.

Cuadrado B., Rubio G. y Santos W. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2009; 38: 78-104.

Del Castillo P. y Montes de Oca, F. Efecto del uso de bacterias solubilizadoras de fósforo y fijadoras de nitrógeno sobre el rendimiento de la papa (*Solanum tuberosum*). En: II Taller sobre biofertilización en los trópicos. 16-18 de noviembre. La Habana. *Cultivos Tropicales*. 1994; 15: 67.

Dibut B., Martínez-Viera R., Ortega M., Ríos Y., “col”. Situación actual y perspectiva de las relaciones endófitas planta-bacteria. Estudio de caso *Gluconacetobacter diazotrophicus*-cultivos de importancia económica. *Cultivos Tropicales*, 2009, vol. 30, no. 4, p. 16-23.

Estrada-Bonilla G. A. Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: efecto sobre la población, humedad y pH del producto. 2008.

Franco C. M. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con Hongos Formadores de micorrizas. Ed. Editorial de la universidad de Granada.2008.

Frommel M. I., Nowak J. y Lazarovits G. Growth enhancement and developmental modifications of in vitro growth potato (*Solanum tuberosum* spp. tuberosum) as affected by a non-fluorescent *Pseudomonas* sp. Plant Physiol. 1991; 96, 928-936.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. El sector alimentario en México. Número 26. 2012.

Hernández J. S., Díaz H. C., Rubio C. O. y Flores G. F. X. La industria de la papa en México: un diagnóstico de la situación actual. Centro internacional de la papa (CIP). 2000.

Jiménez D. R., Virgen C. G., Tabares F. S. y Olalde P. V. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. Avance y Perspectiva. 2001; 20: 395-400.

Juárez H. D. Evaluación de bacterias benéficas en la promoción de crecimiento de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). 2012.

Kennedy A. C. Rhizosphere, in: Principles and Applications of Soil Microbiology, D.M., Sylvia, J.J., Fuhrmann, P.G., Hartel, and D.A., Zuberer, eds., 2nd ed. Pearson, Prentice Hall, New Jersey.2005: 242-262.

Kloepper J. W. Effect of Seed Piece Inoculation with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Populations of *Erwinia carotovora* on Potato Roots and in Daughter Tubers.1983; 73: 217-219.

Lucy M., Reed E. y Glick B. R. Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek .2004; 86: 1-25.

Matos C.G. y Zuñiga D.D. viabilidad de cepas de rizobios en inoculantes basados en soportes no estériles. Ecología aplicada. 2003; 2: 81-85.

McGrath, J., Waegner S. y Gilichinski D. Cryobiological studies of ancient microorganisms isolated from Siberian permafrost, In D. Gilichinski (ed.), viable organisms in permafrost. Pushino Scientific Center Institute of Soil Science and Photosynthesis, Pushino, Russia.1994p. 48–67.

Meynell G. G. The Effect of Sudden Chilling on *Escherichia coli*. J. gen. Microbiol. 1958; 19: 380-389.

Morales-García Yolanda Elizabeth. Antagonismo entre bacterias de interés agrícola y evaluación de inoculantes. 2013: 1-108.

Morales-García Y. E., Aguilera-Méndez N., Huerta-Gómez A. del C., Fuentes-Ramírez L. E. y Muñoz-Rojas J. 2009. "Evaluación del antagonismo entre bacterias de interés agrícola y formulación de un inoculante multiespecies". Memoria VI encuentro Participación de la mujer en la Ciencia. In extenso. Biotecnología y Ciencias Agropecuarias. ISBN: 978-607-95228-0-3. León, Guanajuato, México.

Morales-García Y. E, Juárez-Hernández D., Muñoz-Gracia A., Hernández-Tenorio A. L. y Muñoz-Rojas J. 2011. "Efecto de un multi-inoculante con especies compatibles sobre maíz (*Zea mays*)". Memoria VIII encuentro Participación de la mujer en la Ciencia. In extenso. Biotecnología y Ciencias Agropecuarias. ISBN: 978-607-95228-2-7. León, Guanajuato, México.

Muñoz-Rojas J. y Caballero-Mellado J. Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. Microb Ecol. 2003; 46:454–464.

Muñoz-Rojas J. y Caballero Mellado, J., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito, en Martínez Romero, E. y Martínez Romero, J. (editores), Microbios en línea <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>, UNAM, México, 2001; 157-176.

Muñoz-Rojas J., Bernal P., Duque E., Godoy P., Segura A. y Ramos J. L. Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Freeze-Drying. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 2006; 72: 472–477.

Muñoz-Rojas J. Inoculante multiespecies potencia el crecimiento de plantas. Reportaje por milenio digital. 2013. [http://www.milenio.com/tendencias/Inoculante\\_multiespecies-ICUAP-plantas\\_FINNOVA-UAP\\_14\\_205319468.html](http://www.milenio.com/tendencias/Inoculante_multiespecies-ICUAP-plantas_FINNOVA-UAP_14_205319468.html).

Pallo B. Y. E. "Evaluación de soportes sólidos y líquidos, para la producción de un biofertilizante a base de *Azospirillum* spp. aplicable al cultivo de maíz (*Zea mays* L.)". 2011; 1-126.

Parra. Y y Cuevas F. potencial de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. Cultivo tropicales. 2001; 23: 31-41.

Ramos M. J. L., Haïdour A. y Duque M. O. E. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Serrano 117 28006 Madrid, ES. Microorganismos (*Pseudomonas putida*) y procedimiento para la degradación microbiológica de hidrocarburos aromáticos del tipo tolueno, xilenos o etilbenceno. Oficina española de patentes y marcas

Rico G. M. A. Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y *Actinomicetos* aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (Papa) cultivados en zonas alto andinas del Perú. 2009.

Sánchez L. L. C. y Corrales R. L. Congelación bacteriana: factores que intervienen en el proceso. *Nova*. 2005; 3: 109-113.

Santillana-Villanueva N. Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. *Ecol. apl.* 2006; 5: 87-91.

Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. CONABIO.

Soler A. J., Gilchrist R. E., Pérez Naranjo J. C. Evaluación de microorganismos con potencial de promoción de crecimiento vegetal y biocontrol de *Spongospora subterránea*. *Rev.colomb.biotecnol.*2012; 14: 157-170.

Viñals M. y Villar J. Avances en la formulación y aplicación de inoculantes bacterianos de uso agrícola. *Cultivos Tropicales*. 1999; 20: 9-17.

Zago M. S., Iglesias M. C., Leconte, M. C. y López J. Inoculación y co-inoculación en cultivo de sorgo. *Cátedra de Microbiología Agrícola*. 2006.

Zuno F. F. G., Estrada S. P., Gallegos I. J. A., Rocha G. N.E., Aldana M. M. L., Virgen C. G., "col" Producción in vitro de plántula de papa inoculada con *Pseudomonas* sp. *Terra latinoamericana*. 2009; 27: 207-217.