



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

POSGRADO EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
INSTITUTO DE CIENCIAS (ICUAP)

“Preservación efectiva mediante liofilización de cepas del inoculante multi- especies EMMIM-1”

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA

PRESENTA:

Biol. Hernández Tenorio Ana Laura

ASESOR DE TESIS:

D.C. Jesús Muñoz-Rojas



Puebla, Pue.
Octubre 2018

Tesis Dedicada:

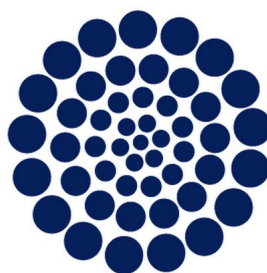
*A mis padres las personas que sacrificaron todo para que yo
alcanzaré mis sueños.*

Hernández Flores Emiliano y Tenorio Ruiz Laura.

A mi novio la persona que me enseña cada día a vencer mis miedos, a salir adelante, el que me enseña otra manera de amar y que me demuestra que con amor todo se puede lograr.

Salvador Alejandro Gonzales Escobedo.

Gracias por todo



CONACYT

El presente
realizó en el
ciencias de la

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, en el Centro
de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas.

trabajo se
instituto de

Agradecemos la beca brindada por CONACYT
(**620303/333944**) en el presente trabajo científico.

Esta tesis fue realizada con el financiamiento CONACYT,
VIEP, PRODEP y DITCo.



Agradecimientos.

Agradezco al D.C. Luis Ernesto

Fuentes Ramírez, D.C. Miguel Ángel Villalobos López, D.C. María del Rocío Bustillos Cristales y D.C: Yolanda Elizabeth Morales García que me siguieron en este camino difícil pero no imposible, gracias por sus observaciones y consejos.

Al Doctor Jesús Muñoz Rojas por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y por ser un gran apoyo todos estos años, así como por su amistad, a Elizabeth Morales García por su asesoría y consejos a lo largo de mi estancia en el laboratorio.

A mi amiga Ana Laura gracias por todos los años de amistad, gracias a ti estoy hasta aquí, gracias por siempre cuidarme y gracias a Uriel por darme la oportunidad de pertenecer a su pequeña familia siendo la madrina de tu hermosa niña Lauriel.

A mis amigos que a pesar de la distancia seguimos en contacto y sé que cuento con su apoyo: Tavo, Héctor, Néstor, Fonseca, Leo, Amy, Anali, Maribel, Maricela y Blanca por todos esos años de amistad gracias por apoyarme y escucharme.

A mis amigos del laboratorio la cual es una pequeña familia, Fernando gracias por apoyarme, escucharme y por decir las cosas tan claras, Osvaldo, no sé qué sería sin tus consejos y todo el conocimiento que me regalas, Dalia Juárez, Gracias por ser mi maestra y enseñarme lo que se, a Verónica por brindarme su amistad, y a todos aquellos que han pasado por el laboratorio y que se dieron la oportunidad de conocerme, que fueron mis compañeros y amigos. Jessi, Víctor, Joel, Cathy entre otros.

A mis amigos de la maestría gracias por el apoyo en clase, sé que muchas veces los hice enojar en las exposiciones, sin embargo, siempre estuvieron conmigo gracias por acompañarme a los lugares más feos que podía encontrar, gracias por recordarme los buenos tiempos en la universidad y hacer nuevos recuerdos con ustedes en la maestría fueron un gran apoyo, Mayra, Toño, Moni, Pablo.

A Mis amigas de trabajo, que a pesar de todo se supieron ganar mi cariño y mi aprecio, gracias por formar parte de una de las experiencias más bonitas que es el dar clases: Erika, Paty, Isme y Lupita.

A la familia González Escobedo por abrirme las puertas de su casa por la confianza que me brindan y por el apoyo dado en este tiempo: Alicia Escobedo Tapia, José Gustavo González Azate, Julio Heber y Gustavo.

A mis padres de los cuales estoy orgullosa, a mis hermanos y sobrinos que poco a poco ellos empiezan a forjar sus propios sueños y saben que siempre los apoyare.

INDICE

RESUMEN.

La población mundial aumenta cada año, estimando que sólo el 12% del suelo total es cultivable, por tanto, se han tomado medidas para incrementar la producción de comida, en los años cincuenta se implementó la conocida “revolución verde” la cual generó un aumento de producción, sin embargo, generó diversos problemas a la salud. En la actualidad se está implementado el uso de inoculantes bacterianos los cuales se definen como una formulación que contiene una o más especies bacterianas contenidas en un soporte; que tiene como función transportar a los microorganismos desde el sitio donde son producidos hasta el sitio donde serán inoculados. Recientemente se describió un inoculante multi-especies (EMMIM-1) compuesto por seis especies bacterianas compatibles y altamente competitivas; el cual se ha utilizado exitosamente en plantas de maíz, frijol, papa y jitomate en condiciones de laboratorio y en condiciones de campo. Por su impacto y para su comercialización es necesario que la inoculación sea práctica, económica y fácil de manejar para el agricultor, así mismo el inoculante debe tener una larga viabilidad en las condiciones de almacenamiento. Se sabe que el inoculante EMMIM-1 tiene una vida de anaquel de seis meses en condiciones de refrigeración (4 °C), sin embargo para su traslado es necesario que se mantengan las mismas condiciones. Por tal motivo las bacterias se sometieron al proceso de liofilización con y sin sacarosa 200 mM la cual desempeña la función de lioprotector evitando daños en la membrana citoplasmática durante este proceso. Se evaluó la supervivencia de las cepas durante un año mediante rehidrataciones rápidas (20 min) como prolongadas (24 h.). También se evaluó la adhesión, colonización y promoción de crecimiento en germinados de maíz rojo los cuales fueron inoculados con bacterias liofilizadas con y sin lioprotector en diferentes tiempos de resguardo (0, 3 y 6 meses después de liofilización). Con estos estudios se pudo observar que algunas bacterias que componen el inoculante fueron sensibles al proceso de liofilización. Algunas bacterias que no fueron contabilizadas en los medios selectivos durante su almacenamiento, fueron contabilizadas al estar en contacto con la raíz de la plantas de maíz notándose

diferencias en el crecimiento en plantas en comparación con las que fueron inoculadas con bacterias liofilizadas sin lioprotector.

INTRODUCCIÓN

La población del planeta aumenta cada año, se prevé que para el 2050 alcance los 9 mil millones de personas (Naciones Unidas, 2009). Teniendo en cuenta que tan solo el 12% del suelo total de la tierra es cultivable (FAO, 2011), será necesario implementar diferentes medidas para producir una gran cantidad de comida. Por tal motivo en la década de los cincuenta se implementó la aplicación excesiva de agroquímicos a los cultivos, dejando de lado la manera tradicional de cultivo. Se destaca que en los primeros años se observó un incremento de producción alimentaria; este acto fue nombrado como “revolución verde” (Gómez-Cárdenas *et al.*, 2016, Ceccon, 2008). Sin embargo, años después se demostró que los componentes de los agroquímicos se podían acumular en los suelos y se filtran hasta llegar a mantos freáticos, causando daños a diferentes insectos benéficos para la agricultura (CICOPLAFEST, 1991), adicionalmente estas sustancias son causantes de diversas enfermedades y algunas malformaciones en humanos (Benítez *et al* 2009, Badii & Varela, 2008) Uno de los elementos de los agroquímicos más utilizados en el campo es el nitrógeno combinado (NH_4^+ , NO_3^- , y otros).

El nitrógeno es un elemento esencial en el crecimiento de las plantas y ocupa el 80% de la atmósfera, en su forma molecular (N_2). Sin embargo, las plantas no pueden usar este nitrógeno de forma directa (Santi *et al.*, 2013). Del abono agregado a los cultivos tan solo el 50% es absorbido por las plantas causando que el sobrante contamine el suelo y aguas subterráneas por el proceso de lixiviación o por numerosos procesos químicos, físicos y biológicos teniendo un efecto negativo al medio ambiente (Gómez-Cárdenas *et al.*, 2016). Por tal situación en la actualidad se ha optado por nuevas alternativas de fertilizantes biológicos como el uso de microorganismos para aumentar la producción de los cultivos de interés agrícola (Pazos-Rojas *et al.*, 2016).

Existe una gran diversidad de especies bacterianas las cuales pueden colonizar diferentes ambientes, desde los polos donde las temperaturas mínimas

llegan muy debajo de cero grados centígrados, hasta los desiertos donde la temperatura es muy elevada durante el día y se presenta muy poca humedad. Incluso, las bacterias tienen como hábitat a otros seres vivos, habitando la superficie o el interior de ellos. En todos los casos mencionados las bacterias cumplen funciones específicas dependiendo del lugar donde habitan (Olembó, 1991; Olalde & Aguilera, 1998; Davis & Savage., 1974).

En las bacterias aisladas, se han podido identificar propiedades benéficas desde una perspectiva biotecnológica. Por ejemplo, se conocen microorganismos (levaduras, hongos y bacterias) que mediante la fermentación ayudan a la producción de diferentes productos como: cerveza, vinos, quesos, yogurt, entre otros (Maicas, 2000; Ramirez *et al.*, 2011). Así mismo, se conocen diferentes microorganismos que producen sustancias inhibitorias con las cuales se elaboran antibióticos (Stein., 2005). En biorremediación, hay bacterias que degradan compuestos tóxicos de origen natural o xenobióticos, cuando se asocian a las raíces de las plantas (rizo-remediación) (Hernández-Acosta *et al.*, 2003; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006). En la agricultura, algunas bacterias aisladas de la rizósfera (zona influenciada por los exudados de las raíces de las plantas) son capaces de promover el crecimiento vegetal; estas bacterias reciben el nombre de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, PGPR por sus siglas en inglés (Kloepper, & Schroth, 1978; Hiltner, 1904).

Las PGPR colonizan la rizósfera de las plantas, región en la que se exuda una amplia gama de compuestos orgánicos (Kennedy, 2005). Las bacterias usan esos compuestos como fuente de carbono, energía y a su vez promueven el crecimiento vegetal mediante la elongación de la raíz, la proliferación de pelos radiculares, que conducen a una mejor absorción de nutrientes y provocan que la planta incremente su tamaño (Caballero-Mellado, 2006). Las PGPR promueven el crecimiento de las plantas por medio de dos mecanismos generales: los mecanismos directos, y los mecanismos indirectos los cuales se describen a continuación:

Los Mecanismos directos, son aquellos donde las bacterias tienen una interacción directamente con partes de la planta, aportando diversos nutrientes

para su crecimiento como: la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, y producción de fitohormonas. (Molina-Romero *et al.*, 2015).

- **La fijación biológica de nitrógeno (FBN).** Es un proceso enzimático en el que el nitrógeno de la atmósfera (N_2) es reducido produciendo amoníaco (NH_3); el cual puede ser transformado posteriormente a otras moléculas como los nitritos. Los compuestos nitrogenados derivados de la FBN son incorporados por las plantas (Franche *et al.*, 2008), formando biomoléculas esenciales para el desarrollo de la planta.

- **Solubilización fosfatos.** Es el proceso donde se producen ácidos orgánicos por los microorganismos, que solubilizan fosfatos insolubles inmóviles como, fosfato tricálcico (Ca_3PO_4), fosfato de hierro ($FePO_4$) o fosfato de aluminio ($AlPO_4$), convirtiéndolos a fosfatos solubles móviles: ortofosfatos (H_2PO_4 y HPO_4); los cuales son absorbidos por las plantas mejorando su productibilidad (Beltrán-Pineda 2014; Achal *et al.*, 2007).

- **Producción de fitohormonas.** Diferentes PGPR producen y excretan diversas fitohormonas así como algunos compuestos volátiles. Las fitohormonas más estudiadas son las auxinas como el ácido-indol-acético (AIA), las citocininas, etileno, giberelinas y ácido abscísico (ABA). Estas hormonas tienen diferentes efectos sobre planta como: incrementar el sistema radicular, intervienen en el proceso de germinación, en la elongación del tallo, en división celular, aumentando el follaje de la planta, entre otras, (Davies, 1995; Castillo *et al.*, 2005).

Mecanismos indirectos, son aquellos donde las bacterias realizan diferentes interacciones con elementos externos que pueden dañar a la planta, ayudando a que se tenga un mejor entorno para su desarrollo. Algunos procesos incluyen: biocontrol y la degradación de compuestos xenobióticos (Molina-Romero *et al.*, 2015).

- **Biocontrol.** Desde el punto de vista de la interacción microorganismo-planta, el biocontrol es un mecanismo que regula las poblaciones de

microorganismos patógenos para la planta. Este podría deberse a una respuesta sistémica inducida en plantas por bacterias rizosféricas benéficas o bien mediante antagonismo de patógenos por bacterias benéficas (Molina-Romero *et al.*, 2015). Las bacterias rizosféricas producen metabolitos secundarios, que son excretados cerca de la superficie de la planta. Algunos de estos metabolitos son capaces de inducir una respuesta de defensa en plantas; que propicia la resistencia a ciertos patógenos (bacterias, hongos e incluso virus) (Sepúlveda- Jiménez *et al.*, 2003). A este fenómeno se le conoce como resistencia sistémica inducida por rizobacterias (ISR, por sus siglas en inglés). Por otro lado, algunas bacterias podrían producir sustancias inhibitorias como antibióticos, bacteriocinas y lipopéptidos los cuales actúan inhibiendo el crecimiento de los patógenos generando plantas sanas y con menos posibilidad a ser atacadas por un patógeno (Beneduzi *et al.*, 2012; Leon *et al.*, 2009; Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Molina-Romero *et al.*, 2015).

- Adicionalmente, la **degradación de xenobióticos** es el proceso por el que las bacterias al excretar enzimas (ligninas, lacasas, peroxidasas, entre otras) degradan compuestos tóxicos presentes en suelos, mejorando las condiciones donde se desarrollan las plantas. (Sánchez & Ortiz, 2011, Jiménez Delgadillo *et al.*, 2001; Barranco, 2016).

Inoculantes Microbianos

Debido a las características de los microorganismos se han elaborado “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).

Los inoculantes 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. 2) **Bioestimulantes**, cuando los microorganismos que contiene la formulación interactúan 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 xenobióticas. 4) **Biocontrolante**, cuando los microorganismos que contiene realizan antagonismo contra patógenos, lo que conduce a plantas más sanas.

Para una amplia utilización y elaboración de un inoculante, éste debe cumplir con ciertas condiciones: **Características químicas y físicas**, los inoculantes deben ser fácil de esterilizar, para tener una pureza total o parcial del producto así mismo el sustrato debe tener alta capacidad de retención de agua. **Cualidades de fabricación**, la fabricación del inoculante debe ser fácil, contando con el material industrial existente, tener un precio razonable con un suministro adecuado. **Cualidades de manejo**, el producto debe ser fácil de manejar y de aplicar por el agricultor. **Características ambientales**, no debe ser tóxico, debe ser biodegradable para que no cause daño en el agua o la atmósfera y una característica fundamental de un buen inoculante es la **calidad de almacenamiento**, donde el soporte le da al microorganismo un periodo largo en condiciones de almacenamiento (uno o dos años), contando con números deseados de microorganismos y una viabilidad exitosa para cumplir con el propósito deseado. (Bashan & Holguin, 1996). Por tal motivo se han realizado diferentes tipos de inoculantes en presentación sólida o líquida (Viñals *et al.*, 1999). **Conservación de bacterias a largo plazo.**

La preservación de bacterias es un paso muy importante, debido a que las bacterias representan un potencial por los diversos beneficios antes mencionados. Así que, si conservamos a estos microorganismos, estamos resguardando dicho potencial (Morales-García *et al.*, 2010) Existen métodos de conservación los cuales pueden ser de tres formas generales:

1.- Preservación a corto plazo; el cual consiste en realizar la resiembra continúa de la cepa y resguardarlas a temperatura de 4°C donde se mantiene de unos días hasta un mes dependiendo del comportamiento de la cepa (Morales-García *et al.*, 2010);

2.- Preservación a mediano plazo, consiste en el resguardo de células en ultra congeladores que las mantienen a -80°C. Sin embargo en este proceso las células pueden sufrir daños, ya que pueden formarse cristales de hielo rompiendo la membrana celular (Leslie *et al.*, 1995), por lo que se recomienda utilizar crio-protectores (azúcares, polímeros y alcoholes polihidroxilados) para proteger a la membrana celular de los cuales el glicerol es el más utilizado (Perry, 1995).

3.- Preservación a largo plazo, consiste en implementar la técnica de liofilización, la más utilizada para el resguardo de microorganismos, el proceso consiste en extraer el agua congelada por sublimación, bajo condiciones de alto vacío, pasando de un estado sólido a un estado gaseoso, una vez que las bacterias se liofilizan, estas pueden permanecer en un lugar fresco a temperatura ambiente por más de 20 años y cuando se deseen reutilizar estos liofilizados se hidratan reactivando la cepa resguardada.

Sin embargo, durante la liofilización las células pueden sufrir daños biológicos (daño en la membrana, desnaturalización de proteínas y ADN) lo cual puede deberse a dos causas principales: cambios en el estado físico de los lípidos y cambios en la estructura de las proteínas (Leslie *et al.*, 1995), además la membrana celular sufre una transición de fase de cristal líquida a gel (Crowe *et al.* 1988). Cuando se hidrata la membrana seca estando en fase de gel, ésta pasa a la fase de cristal líquida teniendo en este paso ruptura de membrana. Por tal motivo es importante utilizar un lio-protector el cual evita que la membrana en el proceso de liofilización pase a una fase de

gel, conservando la fase de cristal incluso en condiciones de temperatura ambiente (Leslie *et al.*, 1995).

Aún hay poco conocimiento en la forma adecuada para preservar a la mayoría de las bacterias por este método y de acuerdo con los datos con que se cuenta no existe un lio-protector universal para todas las cepas bacterianas y se debe explorar la supervivencia a la liofilización para cada caso particular (Morgan *et al.*, 2006).

Conservación de inoculantes microbianos, en la elaboración de inoculantes se han utilizado diferentes sustratos para una buena conservación de los microorganismos uno de los más utilizados es la turba la cual puede resguardar a las bacterias por un periodo de dos años en condiciones de esterilidad a una temperatura de 5°C. Sin embargo, si no se resguarda de manera adecuada es fácil que se contamine (Díaz & Mayek, 2008).

Otro material utilizado como soporte es el alginato donde las cepas se encapsulan con este material y se puede mantener a temperatura ambiente conservándolas por largo tiempo (14 años) (Bashan & González, 1999). Sin embargo, este proceso tiene algunas desventajas, ya que necesita un tratamiento adicional a la siembra, las bacterias deben moverse hacia la planta o semilla entre el suelo y la tecnología industrial para realizar este proceso es de altos costos, por lo que incrementaría el precio para el agricultor (Díaz & Mayek 2008). Hasta la fecha, una solución para el problema del tiempo de sobrevivencia de los microorganismos han sido las preparaciones secadas con aire seco o liofilizado (Morales-García, *et al.*, 2010). De esta manera, las bacterias en la formulación permanecen inactivas y resisten el estrés ambiental (Paau, 1988).

Por tal motivo en este trabajo se propone a la liofilización como una alternativa de resguardo, por lo que se evaluó en PGPR de intereses agrícola.

ANTECEDENTES

Promoción de crecimiento.

Los inoculantes microbianos se han utilizado desde hace algunos años, el más conocido es el mono-inoculante elaborado con *Azospirillum brasilense* el cual se ha utilizado en diferentes gramíneas (Boddey and Döbereiner 1982) obteniendo resultados del 35% más en producción de grano y en materia seca (Bashan y Holguin, 1996; García-Olivares *et al.*, 2012). Para incrementar su eficiencia se han diseñado inoculante con más de dos microorganismos y se han evaluado en diferentes plantas de interés como maíz, frijol, soja, tomate etc. (Morales-García, 2013).

Olivera *et al.*, (2009) evaluaron un inoculante compuesto de cinco especies diazotróficas aisladas y utilizadas en planta de caña de azúcar. Ellos observaron un incremento en el desarrollo de las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas. Las bacterias inoculadas se lograron aislar hasta 400 días después de la inoculación. Otro multi-inoculante elaborado con géneros bacterianos diferentes fue el de Alatorre-Cruz (2012), estas bacterias tenían resistencia a la desecación y fueron evaluadas en semillas de *Echinocactus platyacanthus* en este ensayo se observó diferencia significativa en el tamaño de las plántulas inoculadas con la mezcla de bacterias con respecto al control.

El hecho de utilizar varias bacterias en una misma formulación puede generar competencias por los nutrientes o generar inhibición de los otros organismos por tal motivo en el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) se hicieron estudios de antagonismo de cepas de diferentes géneros bacterianos: *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Azotobacter* y *Klebsiella* (Morales García *et al.*, 2009). Se encontró que seis bacterias pueden coexistir (*G. diazotrophicus* PAI 5^T, *Bradyrhizobium* sp. MS22, *B. unamae* MTI-641, *Sphingomonas* sp. OF178, *A. brasilense* Sp7 y *P.*

putida KT2440) y que esa coexistencia ocurre a pesar de que las seis son capaces de producir sustancias inhibitorias contra otras especies de bacterias, .Así mismo se evaluó la capacidad de adhesión, colonización y promoción de crecimiento en diversas plantas. Con los datos anteriores como base se formuló un inoculante líquido con esas seis especies bacterianas, denominado EMMIM-1, cuyo único soporte es agua (Muñoz-Rojas *et al.*, 2013; Morales-García, 2013). Con el uso de medios selectivos para cada especie, se realizaron estudios en condiciones de invernadero en los que se inocularon semillas de maíz criollo con la formulación multi-especies y semillas utilizando a las bacterias de manera individual, demostrando la capacidad que tienen cada una para adherirse a las semillas y colonizar la raíz de las plantas, bajo ambas condiciones exploradas. También se demostró, que la inoculación de la mezcla de bacterias provocó un mayor crecimiento de las plantas de maíz y rendimiento de mazorca con respecto a las plantas que se inocularon de manera individual y al control (Morales-García, 2013).

A partir de estos experimentos el inoculante se evaluó en diferentes plantas de interés agrícola de igual manera se comparó con un inoculante comercial formulado de *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 inoculante multi-especies EMMIM-1 con respecto a las plantas no inoculadas y plantas inoculadas con inoculante comercial (Morales García *et al.*, 2011). En este estudio se observó que con la formulación EMMIM-1, las plantas de maíz en condiciones de campo alcanzaron una mayor altura, un mayor grosor del tallo, así como una mayor producción con respecto a los demás tratamientos (Morales-García, 2013).

El inoculante multi-especies EMMIM-1 se ha evaluado en diversas plantas de interés agrícola como en frijol en condiciones de invernadero (Juárez-Hernández 2012), en papa tanto en laboratorio como en invernadero y en germinados de jitomate (Hernández-Tenorio., 2014, Santiago-Saenz., 2014, Juárez-Hernández., 2015) demostrando que las cepas utilizadas poseen una

excelente capacidad de adhesión, colonización y que estimulan el crecimiento en las plantas en comparación con los controles.

Evaluación de la estabilidad bacteriana en anaquel.

Bashan y Gonzales (1999) evaluaron el resguardo de dos cepas de interés agrícola *Pseudomonas fluorescens* y *Azospirillum brasilense* en trozos de alginato con y sin suplemento de leche descremada. El resguardo se realizó por 14 años a temperatura ambiente. Después de ese tiempo los autores observaron que aunque la población de ambas cepas había disminuido, seguía siendo significativa. Estas bacterias fueron inoculadas en plantas de trigo, observando una promoción de crecimiento efectiva.

Una forma de mantener la viabilidad de las células durante periodos prolongados es mediante la liofilización. Al respecto, Leslie *et al.*, (1995) sometieron a liofilización a dos cepas, una Gram positiva (*Bacillus thuringiensis* HD-1) y una Gram negativa (*Escherichia coli* DH5 α) agregando dos lioprotectores (trehalosa y sacarosa). En este experimento observó mayor supervivencia con trehalosa y sacarosa en comparación con las que no tenían lioprotector.

Zhao y Zhang (2005) liofilizaron dos cepas que intervienen en el proceso de la fermentación de vinos y observaron que al hidratar con el mismo lio-protector con el que liofilizaron tenían una buena supervivencia. En este caso, el extracto de levadura y el glutamato de sodio fueron los mejores protectores. Sin embargo, los disacáridos también mostraron buenos resultados en la supervivencia de estas cepas. Ortiz *et al.*, (2016) evaluaron diferentes tipos de conservación a corto, medio y largo plazo en cepas solubilizadoras de fosfatos, concluyendo que la liofilización tuvo un efecto positivo en la supervivencia. Sin embargo, las cepas que se resguardaron con glicerol al 20% mostraron mejor supervivencia. También se observó que la solubilización de fosfatos fue más estable en el método con glicerol al 30%.

P. putida KT2440, incluida en el inoculante EMMIM-1, se ha estudiado ampliamente en experimentos de desecación en los que se han usado diferentes protectores observando que el tratamiento con sacarosa a una concentración 200

mM protege exitosamente a la bacteria (Muñoz- Arenas *et al.*, 2006). La supervivencia de *P. putida* KT2440 sin protector se ve afectada tras la desecación y la viabilidad disminuye drásticamente hasta niveles no detectados. Sin embargo, estas bacterias pueden ser cultivadas nuevamente al ponerlas en contacto con germinados de maíz o exudados de plantas. Por ello se ha propuesto esta cepa tiene la capacidad de entrar a un estado viable no cultivable en una situación de estrés por desecación (Pazos-Rojas, 2011; Muñoz-Arenas, 2011).

Muñoz-Rojas *et al.*, (2006) evaluaron las condiciones para la conservación de la cepa *P. putida* KT2440 sometida al proceso de liofilización, observando que tuvo una mejor supervivencia al ser sometida en la fase estacionaria de su crecimiento y en presencia de los disacáridos como lioprotectores (trehalosa, maltosa y lactosa).

Hernández-Tenorio (2014) evaluó la conservación del inoculante EMMIM-1 en diferentes condiciones: temperatura ambiente, congelación (-20), 30 °C y 4 °C, tanto de manera individual como en mezcla, observando que en conjunto las bacterias pueden ser cultivables hasta los seis meses de resguardo a 4 °C.

JUSTIFICACIÓN

La utilización excesiva de los agroquímicos en cultivos de interés agrícola hace que se eleven los costos de la producción. Así mismo estos productos afectan de forma adversa a los seres vivos que se encuentran en el medio ambiente, tanto donde son utilizados como a distancia; ya que pueden sufrir lixiviación a mantos freáticos. Una alternativa para incrementar la producción de cultivos agrícolas, evitando o disminuyendo la utilización de los agroquímicos, es la utilización de inoculantes multi-especies. En este trabajo se planteó realizar estudios de liofilización de las bacterias que componen la formulación multi-especies EMMIM-1 evaluando la viabilidad, cultivabilidad y efectividad de las bacterias con la finalidad de obtener una formulación en polvo estable y que sea más adecuada para su transporte y su uso en la agricultura. En la actualidad el tiempo de anaquel de la formulación multi-especies es muy corta y se requiere refrigeración (6 meses a 4°C). Sin embargo, se requiere mayor tiempo de anaquel

para lograr una comercialización con tiempo suficiente y sin riesgos de disminución de efectividad del producto.

HIPÓTESIS

Las cepas que conforman al inoculante multi-especies EMMIM-1, sometido a liofilización con protectores, tendrán una mayor supervivencia y efectividad para adherirse, colonizar y promover el crecimiento de plantas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la viabilidad y efectividad PGPR de las cepas que conforman al inoculante multi-especies EMMIM-1 antes y después de la liofilización, con la finalidad de obtener un proceso efectivo de resguardo en anaquel de la formulación a largo plazo.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- ✓ Evaluar la supervivencia de las cepas bacterianas que conforman al inoculante multi-especies EMMIM-1 después de la liofilización, con y sin lioprotector, tanto de manera individual como en mezcla.
- ✓ Evaluar la capacidad de las cepas que conforman al inoculante multi-especies EMMIM-1 para adherirse a semillas y colonizar plantas de maíz después de haber sido liofilizadas y resguardadas.
- ✓ Evaluar la capacidad de las cepas que conforman al inoculante multi-especies para promover el crecimiento en plantas de maíz utilizando el inoculante multi-especies EMMIM-1 antes y después de la liofilización.
- ✓ Corroborar la identidad de las cepas del inoculante multi-especies EMMIM-1 que fueron inoculadas con respecto a las que fueron recuperadas en las plantas de maíz.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Experimento I: Preparación de las bacterias que componen inoculante multi-especies EMMIM-1 antes de someterlas al proceso de liofilización y su resguardo durante un año.

Los inoculantes bacterianos se formularon de forma líquida, como se describió por Morales-García (2013), tanto para las cepas independientes como para la mezcla. Para esto, las seis bacterias se sembraron en placas (40 cm X 40 cm) con aproximadamente 125 ml de medio de cultivo selectivo gelificado y se incubaron a 30 °C hasta alcanzar fase estacionaria (Tabla 1). Las células se colectaron con diferentes espátulas estériles y se re-suspendieron en 100 ml de agua destilada estéril. Se colocaron 20 ml de cada cepa bacteriana para realizar la mezcla y del resto de la suspensión se tomaron 20 ml de cada bacteria para preparar la suspensión de células independientes. Cada una de las suspensiones (independientes y en consorcio), se colocaron en tubos de polipropileno de 50 ml, se lavaron dos veces por centrifugación. Los paquetes celulares obtenidos se dividieron en dos tratamientos una parte fue re-suspendida con 150 ml de sacarosa 200 mM como protector y la otra con 150 ml de agua estéril. De cada tratamiento se tomaron 100 µl y se cuantificó el número de bacterias presente antes de someterlas a liofilización, mediante el método de Goteo por Sellado en Placa Masivo (GSPM) (Corral Lugo *et al.*, 2010). Para el recuento se usaron los medios de selección (Tabla 1).

De cada suspensión bacteriana se tomaron alícuotas de 250 µl que se colocaron en 150 tubos de polipropileno de 1.5 ml, se les colocaron tapones de algodón, se congelaron (-20 °C) por 12 h y se sometieron a liofilización por 30 h aproximadamente, hasta llegar a un vacío de 100 mT y una temperatura de -40 °C. Las muestras liofilizadas fueron tapadas y resguardadas a temperatura ambiente (19 a 23 °C).

Tabla 1. Bacterias utilizadas para formular al inoculante EMMIM-1, medios de selección y tiempo de incubación.

| Especie Bacteriana | Medio de Selección | Horas de Incubación |
|---|---|----------------------------|
| <i>P. putida</i> KT2440 | LB+Cm ¹⁰⁰ | 24 h |
| <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 | LB5%+Cm ³⁰ , CTX ³⁰ | 24h |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22 | LB+Azul de Bromotimol, Ge ¹⁰ , AK ³⁰ , TE ³⁰ | 24h |
| <i>B. unamae</i> MTI-641^T | BAC+CRO ³⁰ | 24h |
| <i>A. brasilense</i> Sp7 | Rojo Congo+ CRO ¹⁰ | 48h |
| <i>G. diazotrophicus</i> PAI 5^T | LGI+CAZ ¹⁰ | 48h |

Los números expresados en los superíndices de la columna “medio de selección” significan la cantidad de antibiótico adicionado en µg/ml los cuales son: Cloranfenicol (Cm), Cefotaxima (CTX), Gentamicina (Ge), Amikacina (Ak), Tetlaciolina (Te), ceftazidima (CAZ) y Ceftriaxona (CRO)

El número de bacterias (UFC/ml), se determinó mediante el método de Goteo por Sellado en Placa Masivo (GSPM) (Corral Lugo *et al.*, 2010). Para ello se tomaron cinco muestras inmediatamente después de la liofilización de ambos tratamientos. Éstas se hidrataron con 250 µl de agua destilada estéril por 20 min (rehidratación rápida), tomando los cuidados recomendados en trabajos anteriores (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Muñoz-Arenas *et al.*, 2006). Las células re-suspendidas fueron diluidas en factor 1/10 y cuantificadas con el método GSPM. Las placas se incubaron a 30°C, estas mismas muestras se resguardaron por 24 h a temperatura ambiente (rehidratación prolongada) y se volvió a realizar el monitoreo GSPM. Las placas se incubaron a 30°C, y dependiendo del tiempo de crecimiento de cada bacteria se prosiguió a contar las colonias para obtener la tasa de supervivencia bacteriana (BSR). La BSR se calculó por 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 (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006).

Este proceso se realizó a los días 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 etc. (cada 15 días posteriores a la liofilización hasta que ya no se observaron colonias en los medios de cultivo) (Figura 1).



Figura 1. Proceso de liofilización de las bacterias que componen el inoculante EMMIM-1 a un año de resguardo.

Experimento II: Realización y evaluación del inoculante multi-especies EMMIM-1 antes y después de la liofilización en semillas de maíz.

Los inoculantes se prepararon de forma individual y en mezcla similar a lo mencionado en el experimento I. Sin embargo, el volumen usado varió, debido a que se requieren volúmenes mayores para inocular semillas de maíz.

Se elaboraron dos tratamientos con sacarosa como lioprotector y sin lioprotector, en el cual solo se utilizó agua estéril, ambos tratamientos se realizaron tanto en mezcla como de manera individual.

Tratamientos con sacarosa como lioprotector. Cada cepa bacteriana se creció en una placa (40 cm X 40 cm), de forma masiva hasta fase estacionaria. El tapete celular se recolectó, en 100 ml de agua destilada estéril, y se realizaron dos lavados mediante centrifugación (5000 rpm /5 min). Nueve mililitros de las células lavadas se colocaron en 3 tubos de polipropileno de 50 ml de capacidad, con 3 ml cada uno, y se aforaron a 30 ml con agua destilada estéril. Se volvieron a centrifugar, el pellet se hidrato con 10 ml de sacarosa 200 mM (tres tubos por cada cepa de manera individual). Para la mezcla se tomaron 3 ml de cada cepa (seis cepas) y se mezclaron haciendo un volumen de 18 mL por tubo (se hicieron por triplicado), se aforaron a 30 ml con agua destilada, se centrifugaron y los pellets fueron hidratados con 10 ml de sacarosa 200mM (un total de 21 tubos con sacarosa tanto de manera individual como la mezcla).

Tratamientos sin lioprotector. Para los tratamientos sin lioprotector se realizó el mismo procedimiento antes mencionado, sin embargo, en la centrifugación para hidratar el pellet, a todos los tratamientos tanto de manera individual como en mezcla se les agregaron 10 mL de agua destilada estéril.

En todos los tratamientos se determinó el número de bacterias antes de la liofilización mediante el método de GSPM. Todos los tubos fueron tapados con algodón estéril y se congelaron a -20°C, por 12 h. Posteriormente, las muestras se sometieron a liofilización (100 mTors, y -40 °C en el condensador) por 30 h. Después de la liofilización, se tomó un tubo de cada tratamiento para llevar a cabo la rehidratación y evaluar el número de bacterias, capacidad de adhesión, colonización y promoción de crecimiento en germinados de maíz rojo criollo. Estos parámetros también se evaluaron a los 3 y 6 meses posteriores a la liofilización

(Tabla 2). Para ello, se tomó un tubo de cada tratamiento y se rehidrató con 30 ml de agua destilada estéril. Tanto a los 20 minutos de rehidratación (rehidratación rápida), como a las 24 h (rehidratación prolongada), se determinó el número de UFC/ml mediante el método GSPM, usando los medios selectivos para cada una de las cepas evaluadas y todos los medios en caso de monitoreo de las mezclas.

A las suspensiones bacterianas hidratadas de cada tratamiento, se les agregaron 25 germinados de maíz rojo. La germinación de los maíces se realizó de acuerdo con un protocolo establecido (Morales García *et al.*, 2010), donde se esteriliza superficialmente al maíz y se germina en placas de MSJ. Los germinados se dejaron una hora en la suspensión bacteriana respectiva y fueron sembrados en tubos de polipropileno de 50 ml con vermiculita estéril; sembrando un total de 25 plántulas de cada tratamiento.

La capacidad que tienen las bacterias para adherirse a los germinados, se evaluó entre las 12 a 24 h después de la inoculación. Para ello, se extrajeron de la vermiculita 5 semillas germinadas de cada tratamiento y cada una fue sumergida en 3 ml de agua destilada estéril. La suspensión generada fue agitada vigorosamente y el número de bacterias determinado mediante el método GSPM. Las semillas germinadas se colocaron bajo condiciones de cámara de plantas para su desarrollo (28 ° C, fotoperiodo luz/obscuridad 16/8, 80% de humedad relativa) y se regaron con 10 ml de una solución MSJ (Morales-García *et al.*, 2011).

Las plántulas emergentes fueron regadas periódicamente con agua destilada estéril y a los 15 días posteriores a la inoculación (dpi) se evaluó la colonización de las bacterias asociada a la rizósfera. Para esto, las plantas fueron extraídas de la vermiculita y la vermiculita fue sacudida de las plantas, la vermiculita finamente asociada a las raíces de las plantas fue re-suspendida en 20 mL de agua destilada estéril y a la suspensión generada se le determinó el número de bacterias mediante el método GSPM usando los medios de selección.

A los 20 dpi se evaluó la capacidad de promoción de crecimiento en 15 plantas de maíz, se determinó la altura, la región aérea de las plantas, la longitud de la raíz y se registró el peso fresco y peso seco de la región aérea y raíz. (Figura 2)

En cada tiempo analizado (0, 3 y 6 meses post liofilización), se incluyeron controles que consistieron en inocular germinados con las bacterias sin liofilizar del inoculante, tanto de manera individual como en mezcla. También se incluyó un tratamiento control con agua destilada estéril.

Tabla 2. Tratamientos utilizados para evaluar la efectividad del inoculante.

| Cepas Bacterianas | Tiempo 0 (Inmediatamente después de la liofilización) | Tiempo 1 (Tres meses posteriores de la liofilización) | Tiempo 2 (Seis meses después de la liofilización) |
|--|--|--|--|
| <i>P. putida</i> KT2440 <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22 <i>B. unamae</i> MTI-641^T <i>A. brasilense</i> Sp7 <i>G. diazotrophicus</i> PAI 5^T Mezcla-EMMIM1 | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Sin Liofilizar ➤ Con Sacarosa ➤ Sin sacarosa ➤ Control agua | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Sin Liofilizar ➤ Con Sacarosa ➤ Sin sacarosa ➤ Control agua | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Sin Liofilizar ➤ Con Sacarosa ➤ Sin sacarosa ➤ Control agua |

Los parámetros de las plantas como: tamaño del tallo y de raíz así como el peso seco de las mismas fueron analizados por *t*-Student, mediante el programa Sigma-Plot de Handel Scientific para detectar si se habían presentado diferencias significativas entre los tratamientos.



Figura 2. Evaluación del inoculante EMMIM-1 después de liofilizar en germinados de maíz, en diferentes periodos de almacenamiento.

Experimento III: Corroboración de las cepas aisladas en el experimento II mediante la técnica de ARDRA.

Las seis cepas bacterianas del inoculante multi-especies EMMIM-1, como las bacterias con características esperadas y aisladas del monitoreo mediante el método GSPM que se realizó posterior a la inoculación del maíz (adhesión y colonización de los distintos tratamientos y tiempos analizados), se crecieron en sus medios selectivos hasta su fase estacionaria.

A partir de cada suspensión bacteriana se extrajo el DNA genómico mediante el Kit de PROMEGA. El DNA se usó como molde para la amplificación del gen 16S RNAr utilizando 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. Tanto los productos de la extracción de DNA como para los de PCRs se realizó una electroforesis con geles de agarosa al 1% y se dejó a 100 volts por 30 min. Los geles se observaron en un transi-luminador de rayos UV.

El fragmento de 16S RNAr fue sometido a restricción con endonucleasa *HhaI* (Roché) bajo condiciones estipuladas por el fabricante (Morales-García *et al.*, 2014). Se incubó por 3 h a una temperatura de 37°C y se prosiguió con la electroforesis con un gel de agarosa al 3% con 100 volts por 1 h, el gel se visualizó en un transi-luminador, observando diferentes bandeos entre cada bacteria, en la visualización de todos los geles se tomaron fotografías (Figura 3).

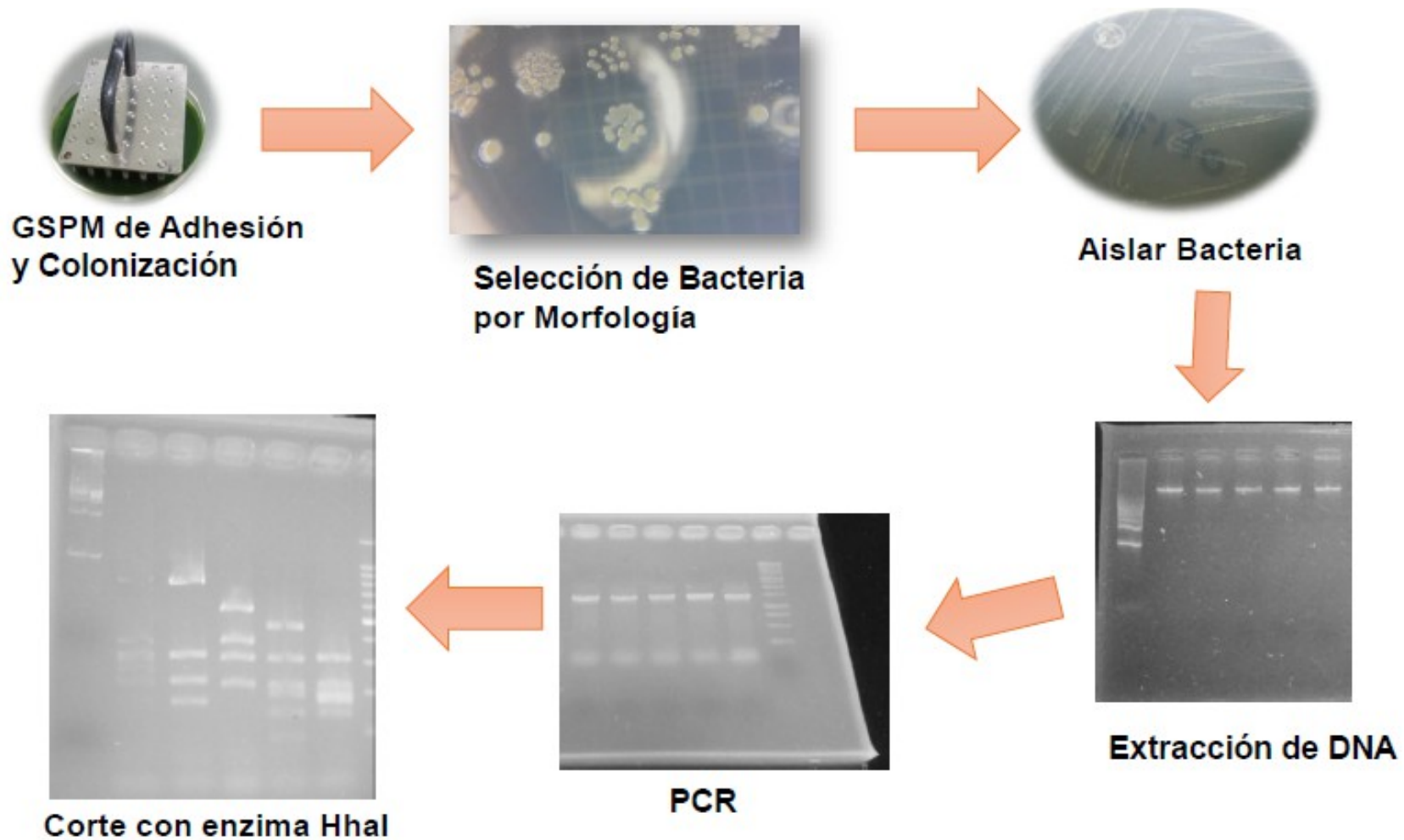


Figura 3. Proceso de recuperación de las cepas que fueron inoculadas en los germinados de maíz y comprobación de su identidad mediante la amplificación y corte con la enzima de restricción *HhaI*.

RESULTADOS

1.1.- Supervivencia a la liofilización de las bacterias que conforman a la formulación EMMIM-1.

Las suspensiones bacterianas independientes, antes de la liofilización, contenían entre 1×10^6 y 1×10^8 UFC/ml, tanto en suspensiones individuales como en mezcla, en agua o usando sacarosa como protector (Gráfica 1).

Gráfica 1. (a) Log UFC/ml de las bacterias de manera individual en ambos tratamientos sin lio protector y con lio protector (sacarosa) antes de la liofilización. (b) Log UFC/ml de las bacterias en mezcla antes de la liofilización.

El número de bacterias que sobrevivió después de la liofilización fue determinado cada 15 días después de la liofilización (DDL); (mencionado anteriormente), monitoreando el número células cultivables tanto mediante una rehidratación rápida como una rehidratación prolongada. Para muestras liofilizadas de manera individual que se monitorearon inmediatamente después de la liofilización (0 DDL; rehidratación rápida), sin lio protector se observó que *B. unamae* MTI-641 y *G. diazotrophicus* PAI5^T no crecieron en los medios. *P. putida* KT2440 sólo fue detectada a los 0 DDL, *Sphingomonas* sp. OF178 se observó hasta los 30 DDL, *A. brasilense* Sp7 hasta los 45 DDL y *Bradyrhizobium* sp. MS22 en todos los tiempos analizados. En presencia de lio protector (sacarosa) todas las cepas se detectaron después de una rehidratación (tanto rápida como prolongada). Sin embargo, hubo diferencias en la supervivencia en los diferentes tratamientos explorados. En la rehidratación rápida, *B. unamae* MTI-641 sólo fue detectada a los 0 DDL, *G. diazotrophicus* PAI5^T hasta los 15 DPL, *Sphingomonas* sp. OF178 se detectó hasta los 30 DPL, *P. putida* KT2440 y *A. brasilense* Sp7 se observaron hasta los 45 DDL y *Bradyrhizobium* sp. MS22 hasta los 355 DPL.

En una rehidratación prolongada (24 h) de células liofilizadas sin protector, nuevamente se observó que *B. unamae* MTI-641 no fue detectada en el medio de cultivo, en contraste *G. diazotrophicus* PAI5^T, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178 fueron detectadas hasta los 30 DDL. *A. brasilense* Sp7

se logró detectar hasta los 45 DDL y *Bradyrhizobium* sp. MS22 se detectó hasta los 105 días DDL. Sin embargo, en bacterias con lioprotector (sacarosa), se detectaron en forma cultivable durante un periodo mayor, como fue el caso de *P. putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178 las cuales se detectaron hasta el día 75 DDL, *A. brasilense* Sp7 se detectó al día 135 DDL, *B. unamae* MTI-641 se observó hasta el día 15 DDL, *G. diazotrophicus* PAI5^T se detectó en el medio de selección hasta el día 30 DDL, *Bradyrhizobium* sp. MS22 se observaron hasta el día 355 DPL (Tabla 3).

La supervivencia de las bacterias en mezcla sin lioprotector también estuvo afectada. En condiciones de rehidratación rápida *G. diazotrophicus* PAI5^T, *A. brasilense* Sp7 y *B. unamae* MTI-641 no se detectaron en los medios de cultivo a los 20 min después de la rehidratación, *P. putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178 se detectaron desde el tiempo cero (inmediatamente después de la liofilización) hasta los 60 DPL, *Bradyrhizobium* sp. MS22 a los 225 DDL. Para el tratamiento con sacarosa y rehidratación rápida, *P. putida* KT2440 se observó hasta los 60 días DDL, *Sphingomonas* sp. OF178, *B. unamae* MTI-641 se pudieron detectar hasta los 60 DDL, *G. diazotrophicus* PAI5^T se detectó durante los primeros 45 días DDL y *Bradyrhizobium* sp. MS22 fue detectado hasta el día 225 DDL.

Para tratamientos de bacterias liofilizadas en mezcla, sin protector y con rehidratación prolongada (24 h) se observó que *B. unamae* MTI-641 pudo crecer hasta los 60 DDL, *G. diazotrophicus* PAI5^T solo creció a los 0 DDL, mientras que *P. putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178 crecieron hasta los 60 DDL, en contraparte *Bradyrhizobium* sp. MS22 se observó hasta los 275 DDL. En el tratamiento con lioprotector se observó algo similar, *B. unamae* MTI-641 creció entre los primeros 60 DDL, *P. putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178 fueron detectadas hasta los 60 DDL, *G. diazotrophicus* PAI5^T se detectó al día 45 DDL *Bradyrhizobium* sp. MS22 se observó hasta 290 DDL. Para *A. brasilense* Sp7 no se observó crecimiento en ningún tratamiento (Tabla 4).

Tabla 3. Supervivencia de las bacterias sometidas a liofilización de manera individual

| | Tratamiento |
|-------------------------------|--|
| | Rehidratación rápida 20 minutos |
| | Rehidratación prolongada 24 horas |
| Bacterias | Sin lioprotector Con sacarosa como protector Sin lioprotector Con Sacarosa como protector |
| <i>P. putida</i> KT2440 | 0 DDL (44.950534 ± 1.33422172) 45 DDL (20.5450419 ± 18.8418184) 30 DDL (8.5566193 ± 19.1331824) 75 DDL (15.1842536 ± 20.792838) |
| <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 | 30 DDL (18.3696057 ± 16.7740592) 30 DDL (28.3297931 ± 30.0120265) 30 DDL (25.0204704 ± 22.9038643) |

Bradyrhizobium sp. MS22

75 DDL

(14.7052855 ± 20.1371609)

105 DDL

(25.7543904 ± 23.6306401)

355 DPL

(6.03775998 ± 13.5008417)

105 DPL

(29.1504456 ± 16.9904963)

355 DDL

(9.17673332 ± 20.5197995)

B. unamae MTI-641

ND

0 DDL

(36.4998741 ± 4.58208167)

ND

15 DDL

(15.842742 ± 21.9341885)

A. brasilense Sp7

45 DDL

(20.00628507 ± 27.39489581)

45 DDL

(48.7088882 ± 1.18686284)

45 DDL

(33.3070835 ± 20.0395916)

G. diazotrophicus PA15^T

135 DDL
(17.3018554 ± 23.6970549)

ND

15 DDL
(14.4060968 ± 19.8777786)

30 DDL
(17.06907411 ± 23.3759154)

30 DDL
(41.5257879 ± 25.8704153)

En cada tratamiento se muestra hasta el día donde se detectó la bacteria, entre paréntesis se muestra el valor de la tasa de supervivencia bacteriana (BSR), seguida de su desviación estándar. ND significa no detectado.

Tabla 4. Supervivencia de las bacterias sometidas a liofilización en mezcla.

| Bacterias | Tratamiento | | | |
|-------------------------------------|--|--|--|--|
| | Rehidratación rápida 20 minutos | | Rehidratación prolongada 24 horas | |
| | Sin lioprotector | Con sacarosa como protector | Sin lioprotector | Con sacarosa como protector |
| <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 | 60 DDL (43.4625301 ± 4.68305063) | 60 DDL (23.8221603 ± 3.89560656) | 60 DDL (35.708011 ± 9.15506656) | 60 DDL (57.4245131 ± 2.69096201) |
| <i>Sphingomonas</i> sp. OF178 | Entre 0 y 60 DDL (28.7334039 ± 3.01728129) | Entre 0 y 60 DDL (29.5072176 ± 3.72250927) | 60 DDL (33.7768645 ± 20.0052696) | 60 DDL (54.4627541 ± 8.97001133) |

| | | | | |
|--|--|---|--|--|
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. MS22 | 225 DDL (8.47859802 ±18.9587215) | 225 DDL (18.0307853 ± 25.0466599) | 275 DDL (14.7782705 ± 20.7923684) | 315 DDL (13.4750138 ± 18.6165402) |
| <i>B. unamae</i> MTI-641 | ND | Entre 0 a 60 DDL (29.7197869 ± 5.3236444) | Entre 0 a 60 DDL (29.3690725 ± 3.30548485) | Entre 0 a 60 DDL (29.4886193 ± 6.10416126) |
| <i>A. brasilense</i> Sp7 | ND | ND | ND | ND |
| <i>G. diazotrophicus</i> PAI5^T | ND | Entre 0 y 45 DDL (21.2902571 ± 29.1537539) | 0 DDL (80.0820997 ± 6.79828037) | 45 DDL (25.1159498 ± 34.8801472) |

En cada tratamiento se muestra hasta el día donde se detectó la bacteria, entre paréntesis se muestra el valor de la tasa de supervivencia bacteriana (BSR), seguida de su desviación estándar. ND significa no detectado

1.2.- Comparación de la capacidad de adhesión, de bacterias liofilizadas-rehidratadas contra bacterias no liofilizadas, en germinados de semillas de maíz rojo.

Los germinados fueron inoculados con bacterias sin liofilizar, bacterias después de liofilizadas (ddl) con sacarosa y bacterias después de liofilizadas (ddl) sin lioprotector; en todos los casos tanto de manera individual como en mezcla.

El log UFC/ml de las bacterias de manera individual sin liofilizar y las bacterias antes de la liofilizar con sacarosa como sin lioprotector se situó entre 5 y 8 (Gráfica 2). El log UFC/ml de las bacterias en mezcla sin liofilizar y las bacterias antes de liofilizar tanto con sacarosa como sin lioprotector fue entre 5 y 8; siendo *A. brasilense* Sp7 la bacteria con el menor número detectado (Gráfica 3).

Una vez transcurrido el tiempo de liofilización, se tomó una muestra (las otras dos fueron resguardadas a temperatura ambiente para su posterior evaluación a los 3 y 6 meses de resguardo). Las muestras se hidrataron por 20 min y 24 h. Se observó que, en una rehidratación rápida para tratamientos individuales, sin lioprotector, *G. diazotrophicus* PAI5^T no creció, sin embargo, en mezcla si se detectó. *A. brasilense* Sp7 no se detectó en mezcla, de manera individual si se capturó en el medio de selección, a 20 min de rehidratación. Todas las demás bacterias evaluadas crecieron con un valor de log UFC/ml de 1 a 4.

En la rehidratación prolongada tanto de manera individual como en mezcla se pudo detectar a todas las bacterias en números de log UFC/ml de 2 a 4.5 (Gráfica 4). En el tratamiento con sacarosa después de la liofilización tanto de manera individual como en mezcla se detectaron todas las bacterias en números de log UFC/ml entre 4 y 7 en una rehidratación rápida (20 min). Para una rehidratación prolongada se detectaron todas bacterias en sus medios selectivos entre 3.5 a 7 log UFC/ml; siendo *A. brasilense* Sp7 la de menor número (Gráfica 5).

Germinados de maíz de dos días de incubación fueron inoculados con cada una de las suspensiones bacterianas obtenidas tras la rehidratación prolongada de células liofilizadas; tanto para tratamientos con sacarosa, como sin lioprotector, de manera individual como en mezcla. Los tratamientos que se tomaron como controles fueron las bacterias sin liofilizar y un control con agua. Las semillas

inoculadas fueron sembradas en tubos conteniendo vermiculita, a cinco semillas de cada tratamiento se les determinó la capacidad de adhesión. Se observó que, de manera individual, en todos los tratamientos, las bacterias liofilizadas-rehidratadas se adhirieron a los germinados de maíz. Sin embargo, esta fue significativamente menor para los tratamientos sin sacarosa en comparación con los tratamientos sin liofilizar.

Para tratamientos liofilizados con sacarosa solo se observó diferencia significativamente menor para la adhesión de *A. brasilense* Sp7 con respecto a la misma bacteria sin liofilizar (Gráfica 6). La adhesión de células liofilizadas-rehidratadas fue mayor para tratamientos con células tratadas con lioprotector respecto a células no tratadas. Para las células liofilizadas en mezcla se observó un panorama general similar al comportamiento de adhesión de células individuales, pero con ciertas diferencias interesantes a resaltar. En tratamientos sin protector, para las células liofilizadas-rehidratadas no se detectó a *G. diazotrophicus* PAI5^T. En este tratamiento también se notó una disminución significativa en la adhesión de todas las bacterias detectadas con respecto a los controles sin liofilizar. En el caso del tratamiento con sacarosa, la capacidad de adhesión de células liofilizadas-rehidratadas de *Sphingomonas* sp. OF178 y *G. diazotrophicus* PAI5^T fue significativamente menor con respecto al de células sin liofilizar. *A. brasilense* Sp7 no se logró visualizar, en el tratamiento sin liofilizar (Gráfica 7).

1.2.1.-Comparación de la capacidad de colonización rizosférica, de bacterias liofilizadas-rehidratadas contra bacterias no liofilizadas, en plantas de maíz rojo

Quince días posteriores a la inoculación, se evaluó la colonización de las cepas de los distintos tratamientos en las plantas de maíz. Se observaron diferencias significativas para el tratamiento con sacarosa y sin sacarosa en las cepas *Bradyrhizobium* sp. MS22, *B. unamae* MTI-641 y *A. brasilense* Sp7 con respecto al control (bacterias sin liofilizar). Cabe destacar que *G. diazotrophicus* PAI5^T no fue detectada en la rizósfera de plantas inoculadas con células sin liofilizar y plantas inoculadas con células liofilizadas con sacarosa, ya que en las placas crecieron hongos haciendo imposible la visualización de bacterias. Sin

embargo, las demás bacterias si fueron detectadas y se consideraron como capaces de colonizar la rizósfera de las plantas de maíz (Gráfica 8).

La colonización rizosférica de las bacterias en mezcla se observó como sigue: en el tratamiento sin lioprotector *Bradyrhizobium* sp. MS22 y *A. brasilense* Sp7 tuvieron una colonización significativamente menor con respecto a las bacterias sin liofilizar. En el tratamiento con sacarosa se notó que *Bradyrhizobium* sp. MS22 y *B. unamae* MTI-641 tuvieron una diferencia significativa con respecto al control (bacterias sin liofilizar). *G. diazotrophicus* PA15^T no fue detectada en ninguno de los tratamientos, en el control agua las bacterias que aparecieron no coinciden con las morfologías de las bacterias que fueron inoculadas en los germinados de maíz (**Gráfica 9**).

Gráfica 2. Número de bacterias contenidas de manera individual en cada tratamiento antes de la liofilización.

Gráfica 3. Número de bacterias contenidas en la formulación EMMIM-1

Gráfica 6. Adhesión de bacterias de manera individual en los diferentes tratamientos, evaluados en los germinados de maíz rojo. El * y + nos indica diferencia significativa con respecto al tratamiento sin liofilizar, $P \leq 0.5$.

Gráfica 8. Colonización de bacterias de manera individual en los diferentes tratamientos evaluados en los germinados de maíz rojo. El * nos indica diferencia significativa entre las bacterias con los tratamientos liofilizados con respecto al tratamiento sin liofilizar con respecto al tratamiento sin liofilizar, con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

en los diferentes tratamientos antes de la liofilización.

Gráfica 4. Rehidratación de las bacterias después de la liofilización sin sacarosa de manera individual y en mezcla en una rehidratación rápida (20 min) como en una prolongada (24h).

Gráfica 5. Rehidratación de las bacterias con sacarosa después de la liofilización de manera individual como en mezcla en una rehidratación rápida (20 min) como en una prolongada (24h).

Gráfica 7. Adhesión de bacterias en mezcla de los diferentes tratamientos, evaluados en los germinados de maíz rojo. El * y + nos indica diferencia significativa con respecto al tratamiento sin liofilizar, $P \leq 0.5$.

Gráfica 9. Colonización de bacterias en mezcla de los diferentes tratamientos evaluados en los germinados de maíz rojo. El * nos indica diferencia significativa entre las bacterias después de la liofilización los tratamientos liofilizados con respecto al tratamiento sin liofilizar con respecto al tratamiento sin liofilizar, con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

1.3.- Comparación de la capacidad de adhesión, de bacterias liofilizadas-resguardadas durante 3 meses y rehidratadas contra bacterias no liofilizadas, en germinados de semillas de maíz rojo.

Pasado tres meses de resguardo las bacterias liofilizadas se hidrataron por 20 min y 24 horas tanto de manera individual y en mezcla, con y sin sacarosa. Se observó que la única cepa que creció tras la rehidratación rápida y prolongada fue *Bradyrhizobium* sp. MS22, creciendo con un valor de log UFC/ml entre 3 a 5 (Gráficas 10 y 11).

Se realizó la inoculación de los germinados de maíz con las bacterias rehidratadas por 24 horas y se determinó la adhesión bacteriana en cada tratamiento (12-24 horas). En los tratamientos liofilizados-resguardados 3 meses y rehidratados, solo se logró detectar un número entre 4 y 5 log de UFC/ml de células de *Bradyrhizobium* sp. MS22, tanto de manera individual como en mezcla, con y sin sacarosa (Gráficas 12 y 13). Se observó una diferencia significativamente menor de bacterias adheridas en el tratamiento de células liofilizadas individualmente con sacarosa en comparación del control (bacterias no liofilizadas).

1.3.1.- Comparación de la capacidad de colonización rizosférica, de bacterias liofilizadas-resguardadas durante 3 meses y rehidratadas contra bacterias no liofilizadas, en plantas de maíz rojo.

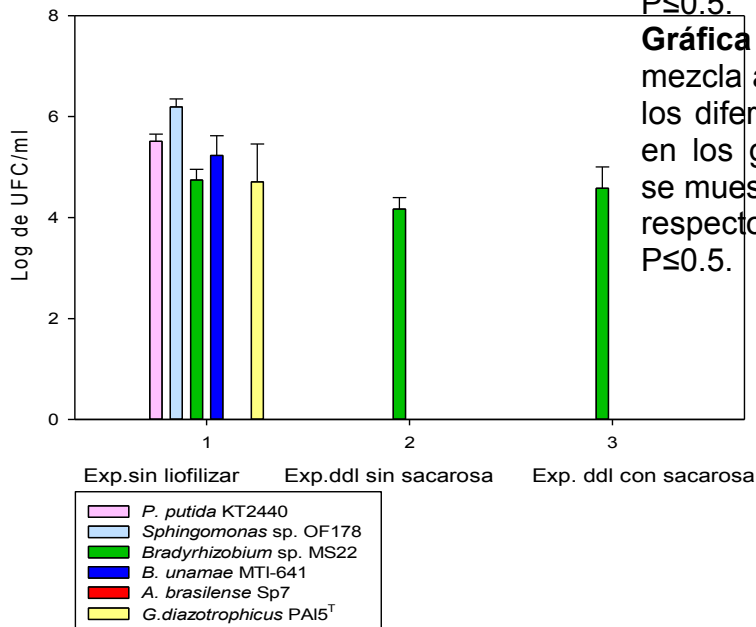
A los 15 días posteriores de la inoculación se evaluó la capacidad de colonización de las bacterias, notando que en los tratamientos de inoculación con células liofilizadas sin sacarosa-individuales, sólo se pudieron recuperar las cepas *Bradyrhizobium* sp. MS22 y *Sphingomonas* sp OF178 a pesar de que esta última bacteria no se detectó en la adhesión. En los tratamientos de células liofilizadas con sacarosa se pudieron detectar a tres cepas bacterianas asociadas a la rizósfera de las plantas: *Bradyrhizobium* sp. MS22, *Sphingomonas* sp OF178 y *A. brasilense* Sp7, estas dos últimas no se detectaron en la adhesión. En el tratamiento sin liofilizar *G. diazotrophicus* PAI5^T no se observó en el medio de cultivo por el crecimiento de hongos en la placa del medio selectivo (Gráfica 14).

En mezcla, para los tratamientos de las bacterias liofilizadas sin sacarosa se pudo detectar a *Bradyrhizobium* sp. MS22, *Sphingomonas* sp OF178 y *P. putida* KT2440 en la rizósfera de las plantas. En los tratamientos con sacarosa

crecieron *Bradyrhizobium* sp. MS22, *Sphingomonas* sp OF178 y *B. unamae* MTI-641, en el tratamiento sin liofilizar todas las bacterias pudieron colonizar la raíz de las plantas de maíz, excepto *G. diazotrophicus* PAI5^T que no fue posible detectar; ya que en la placa crecieron hongos impidiendo el crecimiento de la cepa (Gráfica 15).

Gráfica 10. Rehidratación de las bacterias a tres meses de resguardo sin sacarosa de manera individual y en mezcla, en una rehidratación rápida (20 min) como en una prolongada (24h).

Gráfica 11. Rehidratación de bacterias a tres meses de resguardo con sacarosa de manera individual y en mezcla, en una rehidratación rápida (20 min) como en una prolongada (24h)



manera individual a tres meses de resguardo en los diferentes tratamientos evaluados en los germinados de maíz rojo. El * nos indica diferencia significativa con respecto al tratamiento sin liofilizar, $P \leq 0.5$.

Gráfica 13 Adhesión de bacterias en mezcla a tres meses de resguardo en los diferentes tratamientos evaluados en los germinados de maíz rojo, no se muestra diferencia significativa con respecto al tratamiento sin liofilizar, $P \leq 0.5$.

Gráfica 12. Adhesión de bacterias de

Gráfica 14.- Colonización de bacterias resguardadas durante tres meses de manera individual en los diferentes tratamientos evaluados en germinados de maíz rojo. El * y + nos indica diferencia significativa entre los tratamientos liofilizados con respecto

al tratamiento sin liofilizar con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

Gráfica 15.- Colonización de bacterias resguardadas durante tres meses en mezcla de los diferentes tratamientos evaluados en germinados de maíz rojo. El * y + nos

indica diferencia significativa entre los
tratamientos liofilizados con respecto

al tratamiento sin liofilizar con una
probabilidad de $P \leq 0.5$

1.4 Comparación de la capacidad de adhesión, de bacterias liofilizadas-resguardadas durante 6 meses y rehidratadas contra bacterias no liofilizadas, en germinados de semillas de maíz rojo.

Las bacterias liofilizadas y resguardadas durante 6 meses se rehidrataron por 20 min (rehidratación rápida) y 24 por horas (rehidratación prolongada). *Bradyrhizobium* sp. MS22 fue la única bacteria que se detectó tras la rehidratación de estas células. Para tratamientos de cepas liofilizadas sin sacarosa tanto de manera individual como en mezcla registraron números log UFC/ml entre 3 y 5 (Gráfica 16). En los tratamientos de las bacterias liofilizadas con sacarosa se detectó un log de UFC/ml entre 2.5 y 3.5; tanto de manera individual como en mezcla, en ambas rehidrataciones (Gráfica 17). Los germinados de maíz se inocularon con la solución hidratada por 24 horas de cada tratamiento, evaluando la adhesión de las bacterias (12 h a 24h). Se observó que de manera individual tanto en el tratamiento donde las bacterias se liofilizaron sin sacarosa como con sacarosa solo se detectó a *Bradyrhizobium* sp. MS22, en un log de UCF/ml entre 2 y 4, teniendo una diferencia significativamente menor para las células liofilizadas con referencia a la cepa que no fue liofilizada (Gráfica 18). En el tratamiento sin liofilizar las bacterias se adhirieron a los geminados de maíz. Para la adhesión de las bacterias en mezcla ocurrió algo similar con referencia a las células individuales (Gráfica 19).

1.4.1.-Comparación de la capacidad de colonización rizosférica, de bacterias liofilizadas-resguardadas durante 6 meses y rehidratadas contra bacterias no liofilizadas, en plantas de maíz rojo

En la colonización se puede observar que en el tratamiento sin liofilizar de manera individual como en mezcla las seis bacterias que componen el inoculante EMMIM-1 fueron detectadas. Sin embargo, para las bacterias que fueron sometidas a la liofilización sólo se detectaron *Bradyrhizobium* sp. MS22 y *Sphingomonas* sp OF178 en inoculaciones con células individuales, notándose que en el tratamiento sin sacarosa el log de UFC/ml fue menor a 2 para el caso de *Sphingomonas* sp OF178 (Gráfica 20). En mezcla la cepa que creció en ambos tratamientos sin sacarosa como con sacarosa fue *Bradyrhizobium* sp. MS22 con un log de UFC/ml de 4 a 6 y *Sphingomonas* sp OF178 sólo pudo detectarse en el tratamiento sin sacarosa con un log de UFC/ml menor a 3 (Gráfica 21).

Gráfica 16. Rehidratación de las bacterias a seis meses de resguardo sin sacarosa de manera individual y en mezcla, en una

rehidratación rápida (20 min) como en una prolongada (24h).

Gráfica 17. Rehidratación de bacterias a seis meses de resguardo con sacarosa de manera individual y en **Gráfica 18** Adhesión de bacterias de manera individual a seis meses de resguardo en los diferentes tratamientos evaluados en los germinados de maíz rojo. El * nos indica diferencia significativa con respecto al tratamiento sin liofilizar, $P \leq 0.5$.

Gráfica 20. Colonización de bacterias resguardadas durante seis meses de manera individual en los diferentes tratamientos evaluados en germinados de maíz rojo. El * nos indica diferencia significativa entre los tratamientos liofilizados con respecto al tratamiento sin liofilizar con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

mezcla, en una rehidratación rápida (20 min) como en una prolongada (24h).

Gráfica 19. Adhesión de bacterias en mezcla a los seis meses de resguardo en los diferentes tratamientos evaluados en los germinados de maíz rojo, El * nos indica diferencia significativa con respecto al tratamiento sin liofilizar, $P \leq 0.5$.

Grafica 21. Colonización de bacterias resguardadas durante seis meses en mezcla de los diferentes tratamientos evaluados en germinados de maíz rojo. El * nos indica diferencia significativa entre los tratamientos liofilizados con respecto al tratamiento sin liofilizar con una probabilidad de $P \leq 0.5$

1.5 Evaluación de promoción de crecimiento de las plantas de maíz con los diferentes tratamientos bacterianos.

Plantas de 20 días de edad, inoculadas con células rehidratadas inmediatamente después de la liofilización, de los distintos tratamientos, fueron utilizadas para medir parámetros de crecimiento (longitud, peso fresco y peso seco). Los valores de los promedios obtenidos de los tratamientos inoculados fueron comparados mediante la prueba *t*-student con el programa Sigma-plot para evaluar diferencias significativas con referencia a plantas no inoculadas.

Para la longitud del tallo, las plantas inoculadas con *Sphingomonas* sp. OF178 muestran un tamaño estadísticamente mayor al de plantas control sin inocular (Gráfica 22). Las plantas inoculadas con células individuales de otros tratamientos no mostraron diferencias significativas con referencia a plantas no inoculadas. La longitud de tallos de plantas inoculadas con células liofilizadas sin protector, de *P. putida* KT2440, *Bradyrhizobium* sp. MS22, *B. unamae* MTI-641, *A. brasilense* SP7 y la mezcla (EMMIM-1), fue menor respecto al de plantas control sin inocular. La longitud de tallos de plantas inoculadas con células liofilizadas con sacarosa fue similar al de plantas no inoculadas (Gráfica 22).

Para la longitud de raíz de plantas inoculadas con células sin liofilizar, de *Sphingomonas* sp. OF178 *Bradyrhizobium* sp. MS22, *A. brasilense* Sp7 y la mezcla (EMMIM-1) fueron mayores al de plantas no inoculadas, pero no se observaron diferencias con plantas inoculadas con *P. putida* KT2440, *B. unamae* MTI-641 ó *G. diazotrophicus* PAI 5^T. Para plantas inoculadas con células liofilizadas sin protector solo aquellas que fueron inoculadas con *G. diazotrophicus* mostraron una diferencia significativa en la longitud de la raíz con respecto a las plantas no inoculadas. Todos los tratamientos de plantas inoculadas con células liofilizadas con sacarosa, excepto aquellas inoculadas con *G. diazotrophicus*, mostraron un incremento significativo en la longitud de la raíz con referencia al de las plantas control (Gráfica 23).

Para el peso seco de la raíz de las plantas inoculadas con bacterias sin liofilizar se observó incremento significativo solo en plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 o con *A. brasilense* Sp7. Para plantas que fueron inoculadas con

bacterias liofilizadas sin lioprotector, *Sphingomonas* sp. OF178, *Bradyrhizobium* MS22, *G. diazotrophicus* PAI5^T y la mezcla (EMMIM-1) mostraron incrementos significativos en el peso seco de raíz con respecto a las plantas control. Para plantas inoculadas con células liofilizadas con sacarosa, en todos los tratamientos, excepto el de *G. diazotrophicus* PAI5^T se observaron incrementos significativos del peso seco de raíz con referencia a las plantas control (Gráfica 24).

El peso seco de los tallos de plantas inoculadas con células sin liofilizar fue significativamente mayor para la mayoría de los tratamientos con referencia a plantas no inoculadas (control). Sin embargo, las plantas que fueron inoculadas con *B. unamae* MTI-641 y *Bradyrhizobium* sp. MS22 no mostraron diferencias significativas con respecto al control. El peso seco de plantas inoculadas con bacterias liofilizadas sin lioprotector fueron significativamente menores que el de plantas no inoculadas, excepto para los tratamientos con *G. diazotrophicus* y con la mezcla (EMMIM-1). El peso seco de las plantas inoculadas con células liofilizadas con sacarosa fue similar con referencia a las plantas control (Gráfica 25).

Grafica 22. Tamaño de los tallos de las plantas de maíz a los 20 días después de la inoculación en los diferentes tratamientos, las células fueron rehidratadas inmediatamente de la liofilización la letra b nos indica diferencia significativa con respecto al control, la letra c nos indica diferencia significativa siendo menor que el control, con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

Grafica 23. Tamaño de las raíces de las plantas de maíz a los 20 días después de la inoculación en los diferentes tratamientos, las células fueron rehidratadas inmediatamente de la liofilización la letra b nos indica diferencia significativa con respecto al control, la letra c nos indica diferencia significativa siendo menor que el control, con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

Gráfica 24. Peso seco de los tallos de las plantas de maíz a los 20 días después de la inoculación en los diferentes tratamientos, las células fueron rehidratadas inmediatamente de la liofilización la letra b nos indica diferencia significativa con respecto al control, la letra c nos indica diferencia significativa siendo menor que el control, con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

Gráfica 25. Peso seco de la raíz de las plantas de maíz a los 20 días después de la inoculación en los diferentes tratamientos, las células fueron rehidratadas inmediatamente de la liofilización la letra b nos indica diferencia significativa con respecto al control, la letra c nos indica diferencia significativa siendo menor que el control, con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

1.6. Promoción de crecimiento de plantas de maíz inoculadas con bacterias liofilizadas, resguardadas por tres meses y rehidratadas.

Para plantas inoculadas con bacterias liofilizadas sin lioprotector, con tres meses de resguardo, se observó un tamaño del tallo significativamente mayor en las plantas inoculadas con *B. unamae* MTI-641 y *G. diazotrophicus* PAI5T, con respecto a la longitud del tallo de plantas control. Además, las plantas inoculadas con células liofilizadas de *Bradyrhizobium* sp. MS22, *A. brasilense* Sp7 y *G. diazotrophicus* PAI5T en el tratamiento con sacarosa, mostraron incrementos significativos de la longitud del tallo con referencia a plantas control. En estos tratamientos hubo tallos que eran más pequeños que el control, como fue el caso de las plantas inoculadas con *B. unamae* MTI-641 en el tratamiento sin liofilizar, *Sphingomonas* sp. OF178, *Bradyrhizobium* sp. MS22 y *A. brasilense* Sp7, en el tratamiento sin sacarosa y *P. putida* KT2440 en el tratamiento con sacarosa (Gráfica 26).

La longitud de la raíz de las plantas inoculadas con bacterias sin liofilizar y de plantas inoculadas con bacterias liofilizadas sin protector fue significativamente menor al de plantas no inoculadas (Gráfica 25). Para plantas inoculadas con bacterias liofilizadas con sacarosa, los tratamientos con *P. putida* KT2440, *B. unamae* MTI-641 y la mezcla (EMMIM-1), mostraron una longitud de raíz menor con respecto al de plantas control (Gráfica 27).

El peso seco de los tallos de plantas inoculadas con bacterias no liofilizadas fue significativamente mayor que el de plantas control para los tratamientos con *P. putida* KT2440, *Sphingomonas* sp. OF178, *Bradyrhizobium* sp. MS22 y la mezcla (EMMIM-1). Para plantas inoculadas con células liofilizadas sin protector, los tratamientos con *B. unamae* MTI-641 y con la mezcla (EMMIM-1) mostraron un incremento significativo en el peso seco de los tallos con referencia a plantas no inoculadas. Sin embargo, para el tratamiento con *A. brasilense* Sp7 se observó un menor peso seco de los tallos con respecto a las plantas. En los tratamientos de bacterias liofilizadas con sacarosa no se observaron diferencias significativas con referencia al control (Gráfica 28).

En el peso seco de la raíz se observaron incrementos significativos en los tratamientos con células sin liofilizar en las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 y en la mezcla (EMMIM-1) con referencia a las plantas no inoculadas. También hubo un incremento en el peso seco de plantas inoculadas con células liofilizadas sin protector, para los tratamientos con *G. diazotrophicus* PAI5^T y la mezcla (EMMIM-1). Para plantas inoculadas con bacterias liofilizadas con sacarosa, *G. diazotrophicus* PAI5^T mostró incrementos significativos con respecto al control. (Gráfica 29).

Gráfica 26. Longitud del tallo de las plantas de maíz a los 20 días después de la inoculación en los diferentes tratamientos donde las células liofilizadas tenían tres meses de resguardo, la letra b nos indica diferencia significativa con respecto al control, la letra c nos indica diferencia significativa siendo menor que el control, con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

Gráfica 27. Longitud de la raíz de las plantas de maíz a los 20 días después de la inoculación en los diferentes tratamientos donde las células liofilizadas tenían tres meses de resguardo, la letra b nos indica diferencia significativa con respecto al control, la letra c nos indica diferencia significativa siendo menor que el control, con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

Gráfica 28. Peso seco de los tallos de las plantas de maíz a los 20 días después de la inoculación en los diferentes tratamientos donde las células liofilizadas tenían tres meses de resguardo, la letra b nos indica diferencia significativa con respecto al control, la letra c nos indica diferencia significativa siendo menor que el control, con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

Gráfica 29. Peso seco de las raíces de las plantas de maíz a los 20 días después de la inoculación en los diferentes tratamientos donde las células liofilizadas tenían tres meses de resguardo, la letra b nos indica diferencia significativa con respecto al control, la letra c nos indica diferencia significativa siendo menor que el control, con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

1.7. Promoción de crecimiento de plantas inoculadas con bacterias liofilizadas y resguardadas durante seis meses.

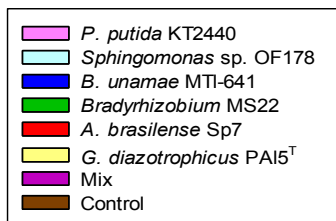
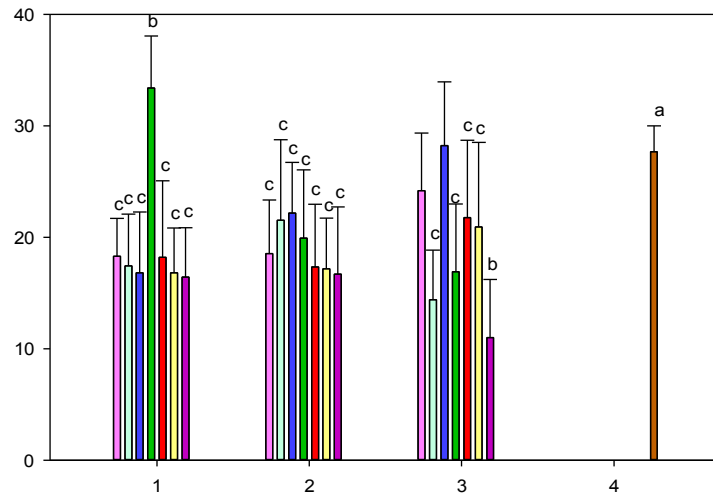
La longitud del tallo para tratamientos donde las bacterias no fueron liofilizadas, *Bradyrhizobium* MS22 y *Sphingomonas* OF178, no mostraron una diferencia significativa con referencia a plantas control; las demás cepas y la mezcla, si incrementaron significativamente el tamaño de los tallos. Para tratamientos de plantas inoculadas con bacterias liofilizadas sin protector, los tallos de las plantas inoculadas con *P. putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178 no mostraron diferencia significativa con referencia al control. En el caso de las plantas inoculadas con bacterias liofilizadas con sacarosa se observaron diferencias significativas para los tratamientos con *P. putida* KT2440, *A. brasilense* Sp7 y *G. diazotrophicus* PA15^T con respecto a las plantas control (Gráfica 30).

La longitud de raíces de plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. MS22 en el tratamiento donde las bacterias no fueron liofilizadas mostraron incrementos significativos con referencia a plantas control. La longitud de las raíces de las plantas de los demás tratamientos fue significativamente menor al de plantas control. La longitud de las raíces de plantas inoculadas con bacterias liofilizadas sin sacarosa fue de menor tamaño que la de plantas control. La longitud de raíces de plantas inoculadas con bacterias liofilizadas con sacarosa fueron significativamente menores, a excepción de aquellas inoculadas con *P. putida* KT2440 y *B. unamae* MTI-641 que no tuvo diferencias significativas con el control (Gráfica 31).

El peso seco del tallo de plantas inoculadas con bacterias no liofilizadas de *P. putida* KT2440, *Bradyrhizobium* MS22 y la mezcla (EMMIM-1), incrementaron significativamente el tamaño en referencia a plantas no inoculadas. Para plantas inoculadas con bacterias liofilizadas sin protector, *B. unamae* MTI-641, *P. putida* KT2440 y la mezcla, incrementaron significativamente el peso seco del tallo con referencia a plantas no inoculadas (Gráfica 32). Para plantas inoculadas con bacterias liofilizadas con sacarosa, no se observó diferencia significativa del peso seco de los tallos con respecto a plantas control, excepto para las inoculadas con

la mezcla que fueron significativamente menores en comparación con plantas control (Gráfica 32).

Para plantas inoculadas con bacterias sin liofilizar, el peso seco de la raíz de plantas inoculadas con *Sphingomonas* sp. OF178 y la mezcla (EMMIM-1) fue significativamente mayor con respecto al control. *B. unamae* MTI-641 mostró una diferencia significativa con referencia a las plantas control, pero con mayor variación en sus valores. Para plantas inoculadas con bacterias liofilizadas sin protector, en general no mostraron diferencias en el peso seco de raíz con respecto a plantas control. Sin embargo, los tratamientos con *Sphingomonas* sp. OF178 y *A. brasilense* SP7 tuvieron un peso seco menor con respecto a plantas control. Para plantas inoculadas con bacterias liofilizadas con sacarosa, no se observaron diferencias significativas en el peso seco de raíz con referencia a plantas control (Gráfica 33).



Gráfica 30. Longitud del tallo de

Gráfica 32. Peso seco de los tallos de las plantas de maíz a los 20 días después de la inoculación en los diferentes tratamientos donde las células liofilizadas tenían seis meses de resguardo, la letra b nos indica diferencia significativa con respecto al control, la letra c nos indica diferencia significativa siendo menor que el control, con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

las plantas de maíz a los 20 días después de la inoculación en los diferentes tratamientos donde las células liofilizadas tenían seis meses de resguardo, la letra b nos indica diferencia significativa con respecto al control, la letra c nos indica diferencia significativa siendo menor que el control, con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

Gráfica 31. Longitud de la raíz de las plantas de maíz a los 20 días después de la inoculación en los diferentes tratamientos donde las células liofilizadas tenían seis meses de resguardo, la letra b nos indica diferencia significativa con respecto al control, la letra c nos indica diferencia significativa siendo menor que el control, con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

Gráfica 33. Peso seco de las raíces de las plantas de maíz a los 20 días después de la inoculación en los diferentes tratamientos donde las células liofilizadas tenían seis meses de resguardo, la letra b nos indica diferencia significativa con respecto al control, la letra c nos indica diferencia significativa siendo menor que el control, con una probabilidad de $P \leq 0.5$.

1.8.- Corroboración de bacterias mediante corte por enzima de restricción *HhaI* recuperadas en la colonización de plantas de maíz.

A partir del ADN extraído de 5 bacterias que componen el inoculante EMMIM-1 se amplificó el gen 16S RNAr (Figura 4 y 5), excepto para *Bradyrhizobium* MS22 del cual no se pudo extraer su DNA, sin embargo, resulta muy fácil identificarla por su fenotipo y por el medio de selección donde crece. Una vez obtenido el gen 16S DNAr de las cinco bacterias se prosiguió a realizar el corte por la enzima de restricción *HhaI* como lo indica Morales García en el 2014. Se observaron patrones característicos de restricción para cada cepa (Figura 6).

Figura 4.- ADN de las bacterias que componen el inoculante EMMIM-1. 1.-Marcador 2.- *P. putida* KT2440, 3.- *Sphingomonas* sp. OF178, 4.- *B.*

unamae MTI-64, 5.- *A. brasilense* SP⁷, 6.-*G. diazotrophicus* PAI5^T.

Figura 5.- 16S RNAr de las bacterias que componen el inoculante EMMIM-1. 1.- *Sphingomonas*

sp. OF178, 2.- *P. putida* KT2440, 3.- *B. unamae* MTI-641, 4.-*G. diazotrophicus* PAI5^T, 5.-*A. brasilense* SP⁷ 6.-Marcador

Figura 6.- Patrones de restricción generados con la enzima *HhaI* para cada una de las cepas que componen la mezcla inoculante EMMIM-1.

1.- Marcador 100 Kb 2.-*P. putida* KT2440 3.- *Sphingomonas* sp.

OF178, 4.- *G. diazotrophicus* PAI5^T, 5.-*A. brasilense* SP⁷ 6.- *B. unamae* MTI-641 7.-*Bradyrhizobium* sp. MS22 8.- Marcador 1 Kb.

1.8.1 Caracterización de bacterias en los diferentes tiempos.

Al tiempo cero después de la liofilización las bacterias que fueron recuperadas en la colonización tenían la misma morfología con respecto a las que fueron

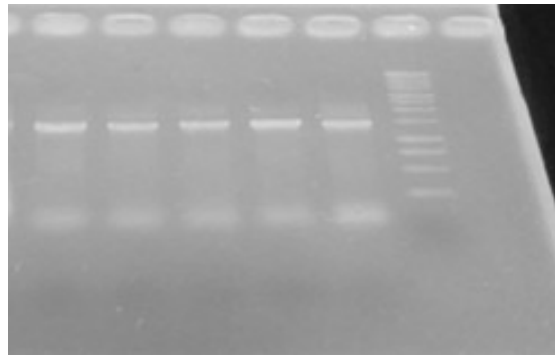
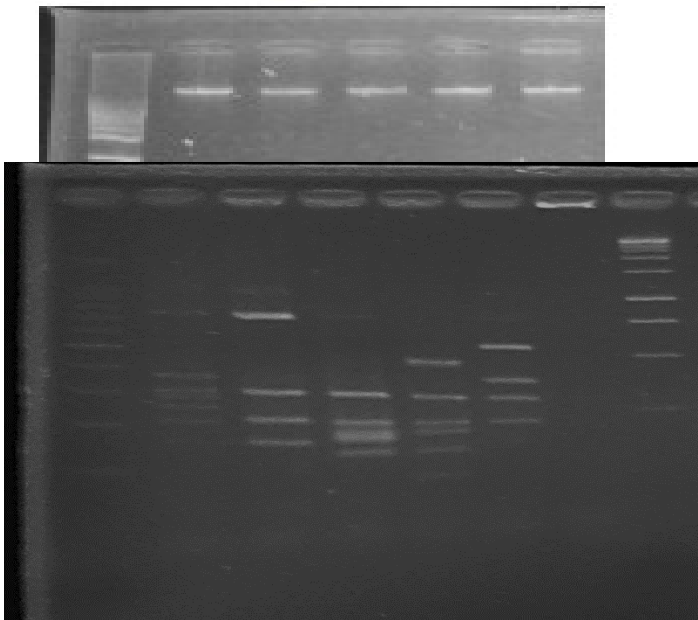


Figura 6.- Patrones de restricción generados con la enzima *HhaI* para cada una de las cepas que componen la mezcla inoculante EMMIM-1.

1.- Marcador 100 Kb 2.-*P. putida* KT2440 3.- *Sphingomonas* sp.

OF178, 4.- *G. diazotrophicus* PAI5^T, 5.-*A. brasilense* SP⁷ 6.- *B. unamae* MTI-641 7.-*Bradyrhizobium* sp. MS22 8.- Marcador 1 Kb.

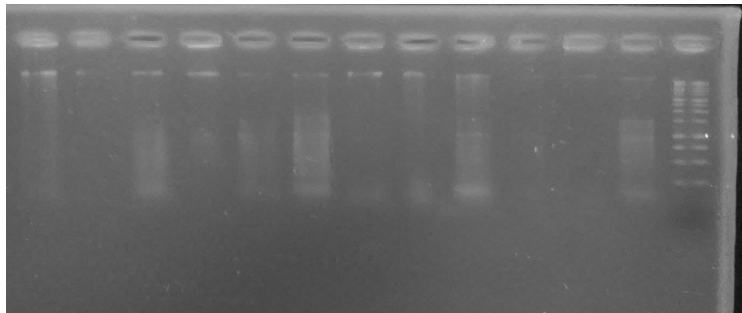
inoculadas, por lo que se tomaron algunas bacterias de los diferentes tratamientos, se aislaron, se propagaron y se extrajo su DNA (Figura 7), se amplificó su 16S RNAr (Figura 8) y se realizó el corte con la enzima de restricción *HhaI*. Se observó que las cepas aisladas de los diferentes tratamientos coincidían en sus bandas con las que fueron inicialmente inoculadas (Figura 9 y 10).

A las bacterias que fueron aisladas de la rizósfera se les asignó una clave conteniendo símbolos con los significados siguientes:

- ✓ ***** Significa bacterias liofilizadas con sacarosa.
- ✓ **n** Significa bacterias sin liofilizar
- ✓ **Ind.** Significa bacterias que fueron inoculadas de manera individual.
- ✓ **Mix.** Significa bacterias inoculadas en mezcla bacteriana EMMIM-1.

Aquellas que no tienen ningún símbolo eran del tratamiento donde las bacterias fueron liofilizadas sin lioprotector.

Figura 7. ADN de las cepas aisladas en el tratamiento inmediatamente después de la liofilización.



Ind P*, 2.- Ind P, 3.-Ind OF*, 4.- Ind OF, 5.-

MTL641, 6.-Ind Bu*, 7.- Ind Bu, 8. Mix Ab, 9.- Ind Ab*, 10.-Ind Gd*,11.- Pozo vacío, 12.-Mix Gd, 13.- Marcador

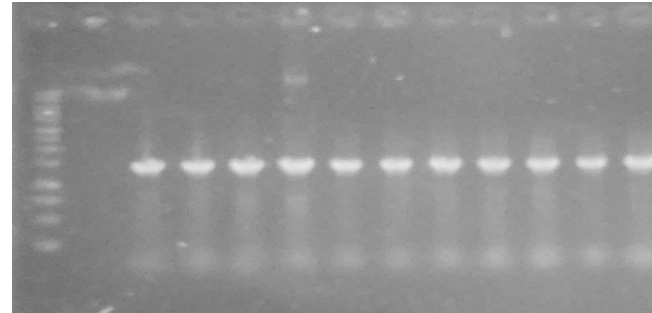


Figura 8. 16S RNAr de las cepas aisladas en el tratamiento inmediatamente después de la liofilización.

1.-Marcador, 2.-Ind P* (mal), 3.- Ind P*, 4.- Ind P, 5.-Ind OF*, 6.- Ind OF, 7.-MTL641, 8.-Ind Bu*, 9.- Ind Bu, 10. Mix Ab, 11.- Ind Ab*, 12.-Ind Gd*, 13.- Mix Gd.

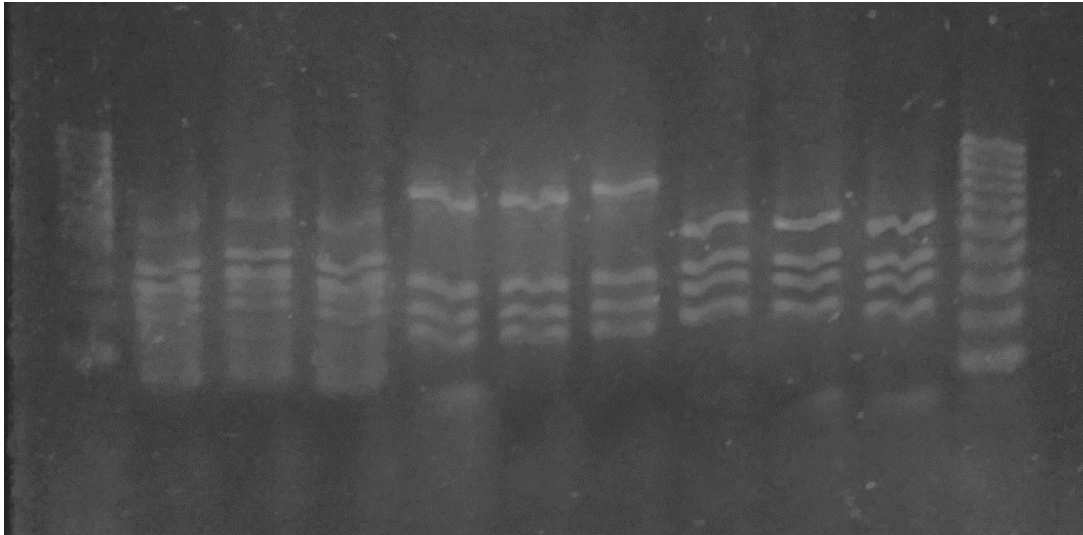


Figura 9. Corte por enzima de restricción *HhaI* de las cepas aisladas en plantas en el tratamiento inmediatamente después de la liofilización.

1.- Marcador de 1000 pb, 2.- KT2440, 3.- Ind P*, 4.- Ind P, 5.-OF178, 6.-Ind OF*, 7.- Ind OF, 8.-MTL641, 9.-Ind Bu*, 10.- Ind Bu, 11.- Marcador de 100 pb

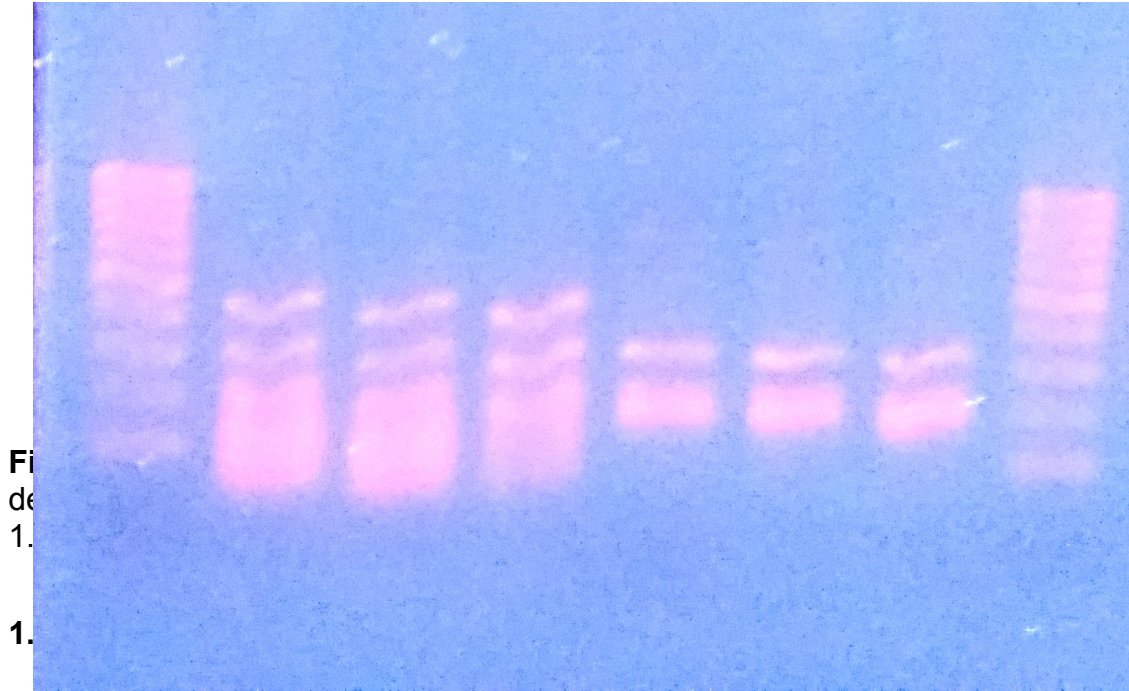


Figura 11. Electrolisis de ADN de plantas en el tratamiento de inmediatamente con células liofilizadas de tres meses. 1.- Mix Gd, 8.- Marcador de 100 pb.

Algunas colonias que fueron aisladas de la rizósfera de plantas inoculadas con bacterias liofilizadas con tres meses de resguardo fueron usadas para corroborar su identidad. Se extrajo el ADN (Figura 11), se amplificó el gen 16S RNAr (Figura 12) y se realizó el corte con la enzima de restricción *HhaI*.

Las cepas aisladas en el medio selectivo para *P. putida* KT2440, aunque eran similares en la morfología, su patrón de restricción mostro algunas diferencias en la cepa aislada del tratamiento después de la liofilización sin sacarosa de manera individual y con la cepa aislada del tratamiento en mezcla después de la liofilización con sacarosa y coincide con la cepa aislada en el tratamiento sin liofilizar en mezcla. En el caso de *Sphingomonas* sp. OF178 las bacterias que fueron aisladas coincidían de manera morfológica y a las que se les hizo el corte por enzima de restricción también coincidían en el bandeo con la cepa original (Figura 13).

En la identificación de *B. unamae* MTI-641 los patrones en las bandas son iguales sin embargo morfológicamente son diferentes, por tal motivo sólo se consideró la que coincidía con la morfología de la cepa (Mix Bu*). En el medio donde crece *A. brasilense* Sp7 no se pudo identificar de manera morfológica ya que no coincidían con la que fue inoculada y se pudo comprobar ya que las cepas tenían diferentes tipos de bandeos con referencia a la que fue inoculada. Sólo en el tratamiento donde se liofilizó de manera individual con sacarosa se puede identificar por su morfología, sin embargo, fue difícil poderla aislar y tenerla pura. *G. diazotrophicus* PAI5^T sin en cambio no se pudo detectar en ningún tratamiento a los tres meses de resguardo, las cepas que se aislaron de su medio selectivo no coincidían con la morfología ni con el tipo de bandeo generado por la enzima *Hhal* (Figura 14).

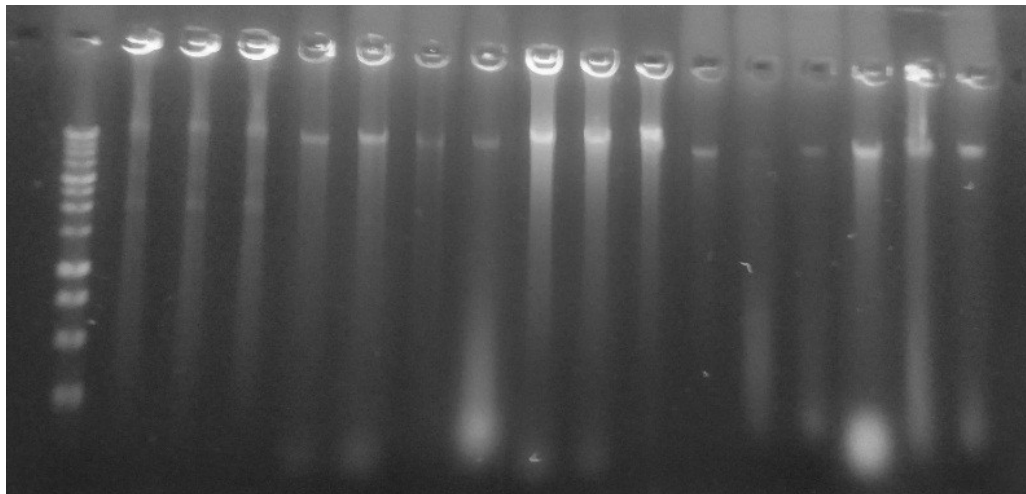


Figura 11.- ADN de las cepas aisladas en planta, el tratamiento de tres meses de resguardo después de la liofilización.

1.- Marcador, 2.-Mix P, 3.- Ind P, 4.-Mix P*, 5.-Mix OF, 6.- Mix OF*, 7.- Ind OF*, 8.-Ind OF, 9.-Mix Bu*, 10.-Mix Bu, 11.- Ind Bu,

12.-Mix Bu, 13.-Mix Ab, 14.-Ind Ab*, 15.-Ind Gd, 16.- Mix Gd 17.- ind Gd*.

en

- 1.-
- 5.-
- 9.-

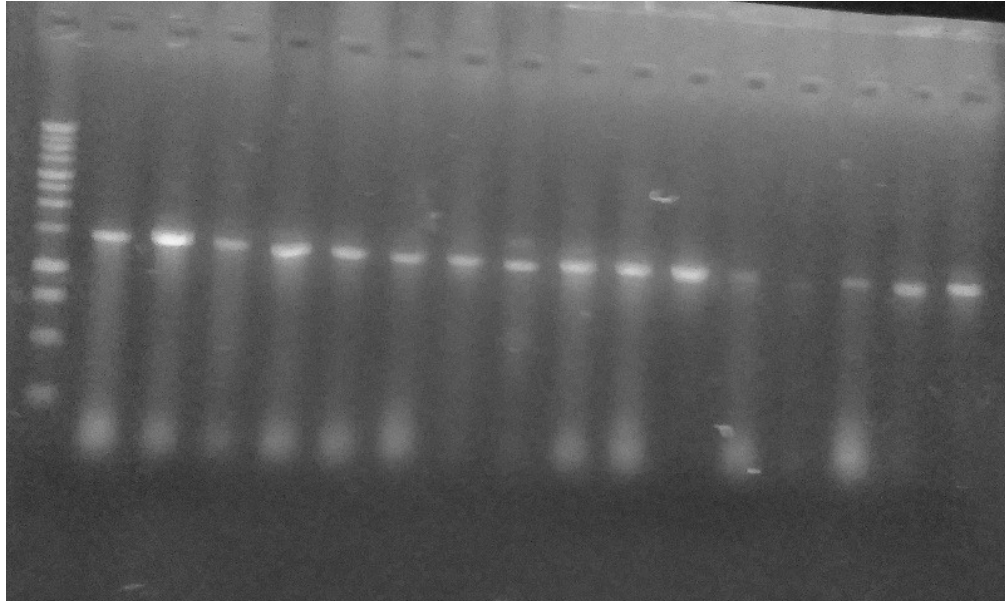
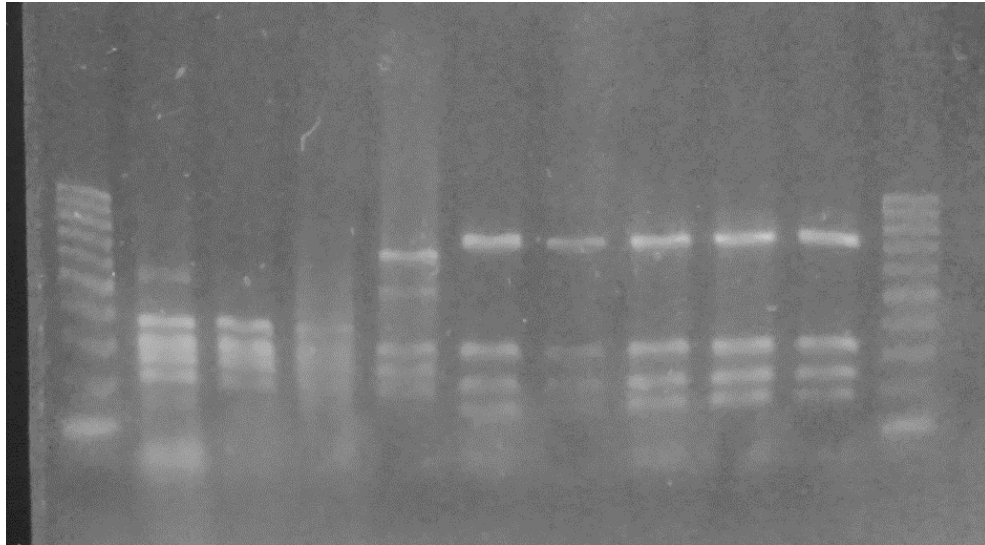


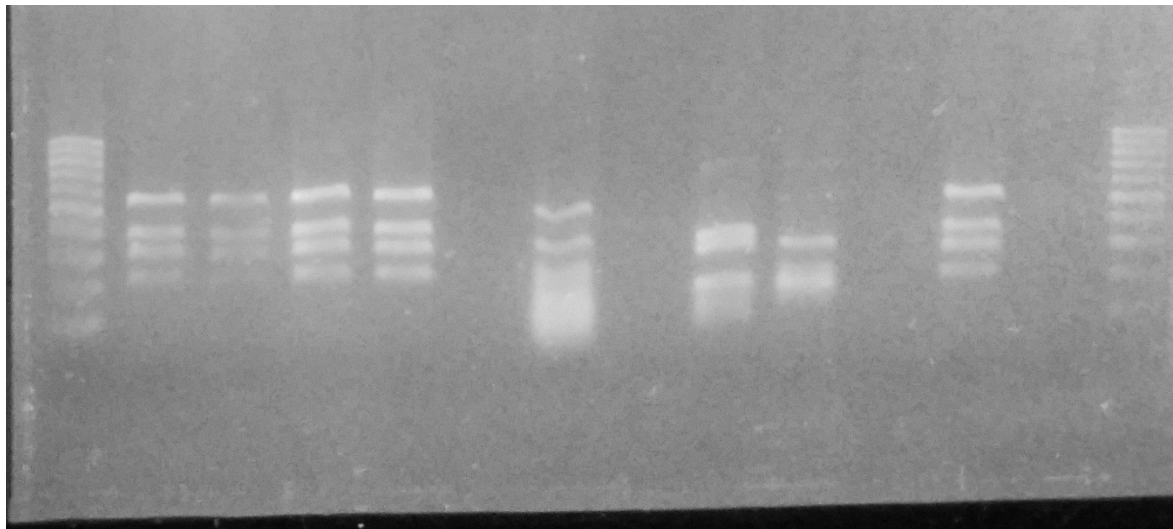
Figura 12.- 16S RNAr de las cepas aisladas planta, el tratamiento de tres meses de resguardo después de la liofilización. Marcador 3Kb, 2.-Mix P, 3.- Ind P, 4.-Mix P*, Mix OF, 6.- Mix OF*, 7.- Ind OF*, 8.-Ind OF, Mix Bu*, 10.-Mix Bu, 11.- Ind Bu, 12.-Mix Bu, 13.-Mix Ab, 14.-Ind Ab*, 15.-Ind Gd, 16.- Mix Gd 17.-Error, 18.-Error, 19.- ind Gd*.



100 pb

Figura 13. Corte por enzima de restricción *HhaI* de las cepas aisladas de plantas el tratamiento de tres meses de resguardo después de la liofilización.

1.- Marcador 100 pb, 2.-KT2440, 3.- Mix P, 4.- Ind P, 5.-Mix P*, 6.-OF178, 7.-Mix OF, 8.- Mix OF*, 9- Ind OF*, 10.-Ind OF, 11.- Marcador



plantas el tratamiento de tres meses de

.-SP7, 8.-Mix Ab, 9.-Ind Ab*, 10.- PAI5^T

1.8.3 Caracterización de bacterias obtenidas de plantas de maíz inoculadas con bacterias con seis meses de resguardo después de la liofilización.

A los seis meses de resguardo las bacterias que fueron recuperadas en los diferentes tratamientos ya no coincidían con algunas características morfológicas con la cepa inicialmente inoculada. Sin embargo, se prosiguió al aislamiento, a la extracción de ADN y a su amplificación del gen 16S RNAr (Figura 15 y 16). Con respecto a *Pseudomonas putida* KT2440, las cepas aisladas ya no coincidieron con la morfología, sin embargo al realizar el corte con la enzima de restricción, algunas cepas coincidían en bandeo; debido a que morfológicamente no eran iguales se decidió tomar como nula la recuperación de esta cepa a los seis meses de resguardo después de la liofilización. En el caso de *Sphingomonas* sp. OF178 las cepas aisladas si coincidían morfológicamente y con patrones de restricción esperados de la cepa; sólo en el tratamiento después de la liofilización con sacarosa en mezcla la cepa no fue detectada (Figura 17).

Para *B. unamae* MTI-641 fue complicado su aislamiento ya que en algunos tratamientos solo crecía una sola colonia, sin embargo, las bacterias que se pudieron aislar y las cuales no coincidían o se parecían morfológicamente se les hizo el corte por enzimas de restricción observando que *B. unamae* de manera individual liofilizada sin sacarosa tenía el mismo tipo de bandeo y morfológicamente si coincidía con la que fue inoculada. *A. brasilense* Sp7 y *G. diazotrophicus* PAI5^T no fueron detectadas en ningún medio selectivo y algunas colonias que crecieron se tomaron para hacer el ensayo, sin embargo, el patrón de restricción no fue el mismo con respecto a la cepa que fue inicialmente inoculada (Figura 18).

1.-
6.-
11.-
16.-

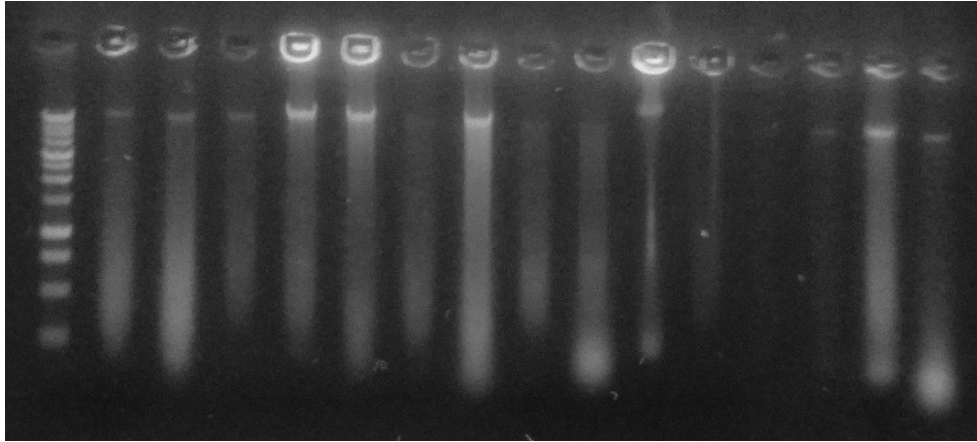


Figura 15. ADN de las cepas aisladas en planta, en el tratamiento a los seis meses de resguardo después de a liofilización.

Marcador, 2.-Mix P, 3.-Ind P, 4.-Mix P*, 5.-Ind P*, Ind P, 7.-Ind OF*, 8.-Mix OF*, 9.-Ind OF, 10.-Ind Bu, Mix Bu*, 12.-error, 13.- error, 14.- Mix Ab, 15.-Mix Ab, Ind Ab.

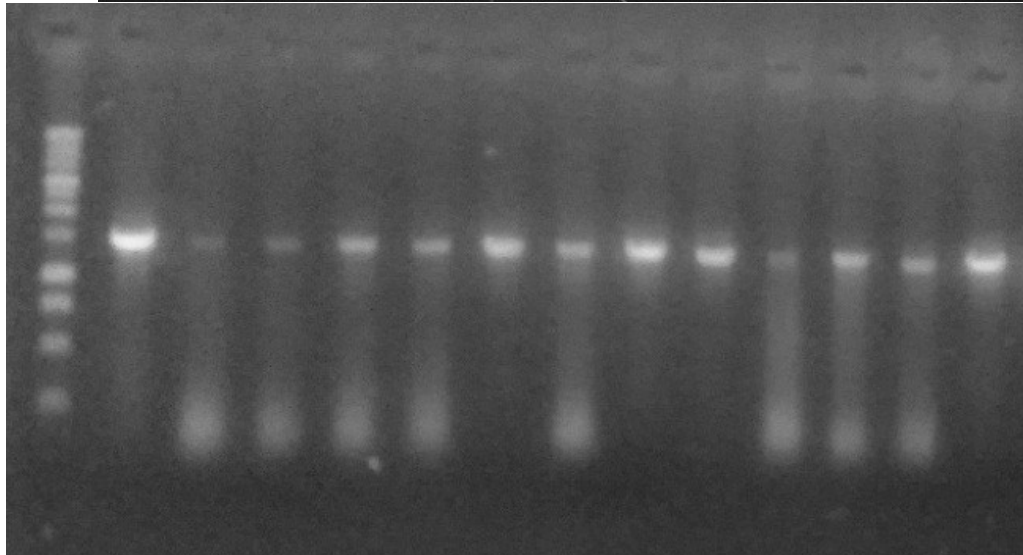
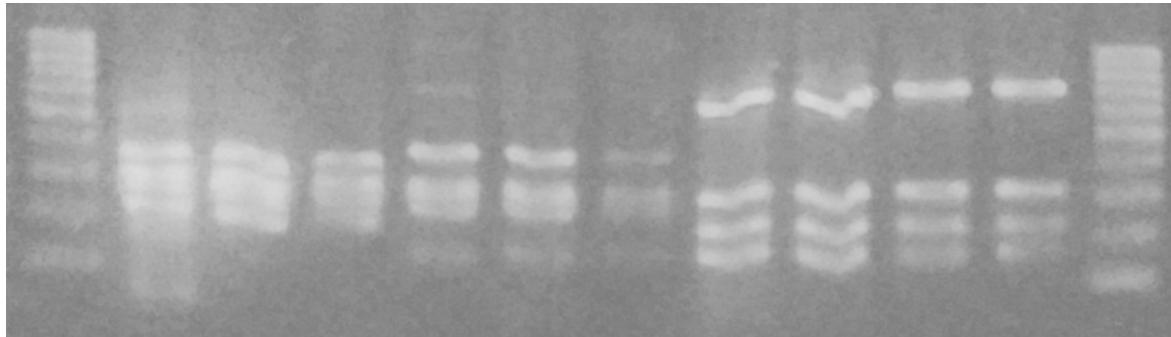


Figura 16. 16S RNAr de las cepas aisladas en planta, en el tratamiento a los seis meses de resguardo después de a liofilización.

1.- Marcador, 2.-Mix P, 3.-Ind P, 4.-Mix P*, 5.-Ind P*, 6.- Ind P, 7.-Ind OF*, 8.-Mix OF*, 9.-Ind OF, 10.-Ind Bu, 11.- Mix Bu*, 12.- Mix Ab, 13.-Mix Ab, 14.- Ind Ab.



de 100 pb.

ntas el tratamiento de seis meses de
 Ind OF*, 10.-Mix OF*, 11.-Ind OF, 12 Marcador



Figura 18. Corte por enzima de restricción *HhaI* de las cepas aisladas de plantas el tratamiento de seis meses de resguardo después de la liofilización.

1.- Marcador de 100 pb, 2.-MTI 641, 3.-Ind Bu, 4.- Mix Bu*, 5.- SP7, 6.- Mix Ab, 7.-Mix Ab, 8.- Ind Ab, 9.- Marcador 100 pb.

DISCUSIÓN.

En la actualidad se han descrito muchas bacterias con la capacidad de potenciar el crecimiento de plantas (Molina-Romero *et al.*, 2015; Vejan *et al.*, 2016), estas incluyen bacterias endofíticas, epífitas, rizosféricas y del rizoplano (Taulé., 2011). Más recientemente se ha propuesto que las formulaciones multiespecies son más efectivas para promover el crecimiento de plantas (Molina-Romero *et al.*, 2017; Morales-García *et al.*, 2013). En particular la formulación EMMIM-1, que se encuentra conformada por *G. diazotrophicus* PAI 5T, *Bradyrhizobium* sp. MS22, *B. unamae* MTI-641, *Sphingomonas* sp. OF178, *A. brasilense* Sp7 y *P. putida* KT2440, es una formulación líquida que tiene un tiempo de anaquel de 6 meses en refrigeración a una temperatura de 4 °C (Hernández-Tenorio, 2014) y que ha sido exitosa para promover el crecimiento de diversas variedades de maíz (Morales García y colaboradores., 2011), así como de papa, frijol, jitomate y otras plantas (Juárez-Hernández, 2012, Santiago-Saenz, 2014).

El transporte del inoculante EMMIM-1 y el mantenimiento de la viabilidad de las bacterias que lo conforman podrían ser muy costosos, por lo que es necesario desarrollar conocimiento para diseñar formulaciones en polvo que permitan una vida de anaquel prolongado sin comprometer la viabilidad y un transporte que no requiera de temperaturas bajas.

En este trabajo se evaluó la supervivencia de las bacterias que conforman a la formulación multi-especies EMMIM-1 a condiciones de liofilización, como posible metodología para elaborar una formulación en polvo. La supervivencia bacteriana a la liofilización ha sido poco explorada para los diversos microorganismos y requiere de lio-protectores para que las bacterias toleren el proceso (Morales-García *et al.*, 2010). Los lio-protectores son de naturaleza química variable e incluyen azúcares, polialcoholes, aminoácidos, mezclas complejas (por ejemplo, la leche) y se ha observado que no

existe un lio-protector universal que proteja a todos los microorganismos del proceso de liofilización (Morales-García *et al.*, 2010, Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2006). Sin embargo, algunos disacáridos como la trehalosa y la sacarosa han mostrado resultados favorables para incrementar la supervivencia de algunas bacterias ante el proceso de liofilización; aunque es necesario destacar que todos estos trabajos se han realizado con propósitos de preservación (Leslie *et al.*, 1995; Morales-García *et al.*, 2010; Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). En todos los casos, las bacterias son resguardadas bajo condiciones de vacío en liofilos, generalmente en volúmenes pequeños de alrededor de 500 μL , de esta forma las células son protegidas de posibles efectos de oxidación hasta el momento en que son rehidratadas y donde el vacío se pierde (Ríos, M. 2003).

Aunque el nivel de supervivencia sea mínimo, para propósitos de preservación basta con que sobrevivan algunas células para volver a recuperar la cepa que fue resguardada. En contraparte para los inoculantes bacterianos se requiere mantener la viabilidad de por lo menos 1×10^5 UFC/mL, número que ha sido reportado para que sea efectiva una formulación destinada a la inoculación de semillas (Juárez-Hernández, 2012; Morales-García *et al.*, 2013). Además, para un inoculante en polvo se requiere liofilizar un mayor volumen, para el caso específico de la formulación multi-especies EMMIM-1, se requieren liofilizar 250 ml para cada dosis y un resguardo en condiciones de vacío podría significar incrementar los costos del producto ya que requeriría de un envase especial para mantener esas condiciones.

Por esta razón en el presente trabajo se decidió explorar la capacidad de supervivencia de las bacterias que conforman a la formulación multi-especies a condiciones de liofilización, en presencia y ausencia de lio-protector (sacarosa) y su posterior resguardo en condiciones de temperatura ambiental y en presencia de aire. Además, se exploró si las bacterias liofilizadas tenían la capacidad de mantenerse viables tras la rehidratación inmediatamente después de la liofilización y en distintos periodos de resguardo. Adicionalmente se exploró la capacidad de los microorganismos para promover el crecimiento de plantas.

1.9. Supervivencia de las bacterias que componen el inoculante EMMIM-1 después de la liofilización.

La supervivencia bacteriana a la liofilización se ha explorado con propósitos de preservación, pero no tenemos conocimiento de estudios de liofilización de mezclas bacterianas (Morales-García *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2016). La supervivencia de las bacterias que componen al inoculante EMMIM-1 fue variable tras la liofilización tanto cuando se sometieron de manera individual como en mezcla. Recientemente, se ha observado que *P. putida* KT2440 entra a un estado viable no cultivable durante la desecación en aire y regresa al estado cultivable en la rehidratación prolongada o en contacto con la rizósfera de plantas (Muñoz-Arenas, 2011; Pazos-Rojas, 2011). En este trabajo se exploró el número de bacterias que se lograban rescatar después de la liofilización usando dos alternativas de rescate, con una rehidratación rápida (20 min) y con una rehidratación prolongada (24 h), observando algunas diferencias en el número de células rescatadas. Por ejemplo *B. unamae* MTI-641 de manera individual como en mezcla en una rehidratación rápida no se logra observar en ambos tratamientos (con y sin sacarosa) sin embargo en una rehidratación prolongada si se observó en el medio de selección. Algo similar ocurrió con *G. diazotrophicus* PAI5^T, que no se detectó en tratamientos sin sacarosa, de manera individual o en mezcla, sin embargo, en una rehidratación prolongada se logró cuantificar en el medio de selección.

En general, las bacterias se lograron detectar en días posteriores a la liofilización cuando se les hidrataba por 24 horas (rehidratación prolongada) en comparación con 20 min (hidratación rápida), lo que nos sugiere que la mayoría de las bacterias de este trabajo entra en estado viable no cultivable tras la desecación y retorna al estado cultivable tras una rehidratación prolongada. Muñoz-Rojas *et al.*, 2006 observaron que *P. putida* KT2440 sobrevive mejor a la liofilización cuando es crecida hasta fase estacionaria y también cuando se le adicionan lioprotectores como trehalosa, maltosa y sacarosa. En este trabajo de tesis las bacterias que fueron sometidas con lioprotector (sacarosa 200 mM) sobrevivieron

mejor en comparación con los tratamientos sin protector, inmediatamente después de la liofilización, pero la protección aparentemente no fue efectiva durante el almacenamiento en presencia de aire. En el proceso de liofilización, a medida que el agua se sublima de las células, las cabezas de los fosfolípidos se acercan entre sí, generando cadenas acilo y generando interacciones Van der Waals esta interacción hace que la membrana entre a una fase de gel, posteriormente cuando las células secas se hidratan pasan de una fase de gel a una fase cristalina líquida, durante esta transición de fase la membrana puede sufrir rupturas, por ende puede haber fugas de material genético, proteínas generando la muerte celular (Potts *et al.*, 2005 y Crowe *et al.*, 1988). Cuando se agrega sacarosa como lioprotector, el azúcar ayuda a que las células resistan al proceso de liofilización y rehidratación, aparentemente porque la membrana se mantiene en una fase cristalina líquida, evitando daño en la membrana celular ya que no entra en la fase de gel (Leslie B.S *et al* 1995, Crowe *et al* 1988).

Sin embargo, algunas cepas que componen el inoculante EMMIM-1 (Ej. *B. unamae* MTI-641 y *G. diazotrophicus* PAI5^T), que fueron resguardadas con lioprotector tanto de manera individual como en mezcla, mostraron mayor sensibilidad a este proceso, pudiéndose observar a pocos días después de la liofilización (ddl) en los medios de selección en comparación con las demás bacterias, esto refuerza la idea de que no existe un lioprotector universal para resguardar todas las bacterias debido a sus características específicas (Morgan *et al.*, 2006).

Leslie, *et al.*, (1995) evaluaron a la sacarosa y trehalosa (100 mM) como lioprotectores de *Escherichia coli* DH5a y *Bacillus thuringiensis* HD-1 y observaron que la sacarosa tiene un efecto positivo en la protección de estas dos cepas, sin embargo, la trehalosa ofreció una ligera mayor protección en este proceso. La sacarosa también protege a *L. brevis* y *O. oeni* durante el proceso de liofilización (Zhao y Zhang, 2005), sin embargo, se observaron mejores resultados de protección usando soluciones de extracto de levadura y glutamato de sodio. Interesantemente, la rehidratación de los liofilos se realizó con lactosa, sacarosa y otras soluciones utilizadas como lioprotectores inicialmente, observado que al

hidratar con sacarosa tuvieron una mejor supervivencia (Zhao y Zhang, 2005). En contraparte, en nuestros ensayos, las muestras liofilizadas se hidrataron con agua destilada estéril. Es concebible que, si las muestras de nuestros ensayos se rehidrataran con otras soluciones o si se utilizaran otros lioprotectores, la viabilidad de las bacterias del inoculante podrían ser mayor.

Las bacterias liofilizadas pueden sobrevivir hasta 30 años a temperatura ambiente en condiciones de vacío (Peiren *et al* 2016), de hecho *P. putida* KT2440 y sus mutantes derivadas se ha resguardado por largos periodos bajo condiciones de vacío en un banco denominado “Pseudomonas Center” (Morales-García *et al.*, 2010). Sin embargo, en el presente trabajo de tesis, las muestras fueron almacenadas en presencia de aire, lo que genera reacciones de oxidación y un estrés muy fuerte para las células incrementando la muerte celular (Lopez- Cruz 2017; (Baker & Orlandi, 1995). La única cepa que se conservó durante casi un año (355 días) fue *Bradyrhizobium* sp. MS22 en presencia de lioprotector, de manera individual con una hidratación prolongada (24 h). No obstante, la supervivencia podría incrementar dependiendo del volumen de la muestra, las variaciones del protocolo de liofilización o del tipo de lioprotector que se ocupe (Peiren *et al* 2015). Cabe destacar que la supervivencia de *Bradyrhizobium* sp. MS22 fue diferente cuando se evaluó de manera individual, donde la supervivencia fue menor con referencia a la mezcla ya que en este tratamiento se pudo detectar por más tiempo en ambas rehidrataciones sin lioprotector. En presencia del lioprotector la supervivencia fue mejor de manera individual en ambas rehidrataciones pudiéndose detectar en el medio selectivo por casi un año en comparación cuando se encuentra en mezcla.

A. brasilense SP7 puede almacenarse durante 14 años a temperatura ambiente en esferas de alginato (Bashan & Gonzales 1999), conservando un número de bacterias viable y suficiente para una inoculación efectiva, pero esta forma de almacenamiento podría resultar muy costosa para propósitos agrícolas debido a los elevados costos del alginato. En contraparte, otras evaluaciones indican que *A. brasilense* es poco tolerante a las condiciones de almacenamiento y que la

temperatura es un factor limitante (Estrada-Bonilla, 2008). Esta bacteria en mezcla con otras bacterias y en una formulación líquida (inoculante EMMIM-1) sobrevive bien a 4 °C, sin embargo, cuando se resguarda de manera individual *A. brasilense* mostró una mejor supervivencia (Hernández Tenorio., 2014). En el presente trabajo de tesis se observó que cuando la bacteria fue liofilizada en mezcla, esta no pudo ser detectada y de manera individual creció hasta los 135 días con lioprotector en una rehidratación prolongada (24 h). Las seis bacterias de la formulación líquida EMMIM-1 pueden coexistir a pesar que cada una tiene la capacidad de producir sustancias inhibitorias (Morales García 2013). Por lo tanto la incapacidad de detección de *A. brasilense* Sp7 en mezcla después de la liofilización, podría ser debido a que en el medio donde se selecciona esta bacteria (rojo congo, Bashan *et al* 1993), también crece *Sphingomonas sp* OF178. Esta última tiene una tasa de replicación mayor a la de *A. brasilense*, generando un sobre crecimiento de la primera y enmascarando el crecimiento de la segunda.

Otra limitante podría ser el método para la cuantificación que usamos, ya que la gota del GSPM es de aproximadamente 2 µl (Corral-Lugo 2010), generando que la cantidad de muestra no sea suficiente para que la bacteria sea detectada en el medio selectivo por lo cual podrían optarse a utilizar otros métodos de cuantificación como el goteo en placa (Herigstad *et al.*, 2001) o el recuento en placa por plateo (Hoben & Somasegaran, 1982) donde las cantidades de la muestra es mayor.

1.10. Capacidad de las bacterias liofilizadas para adherirse y colonizar las plantas de maíz rojo en diferente tiempo de resguardo

Sin duda, el resguardo de las bacterias tras la liofilización es un punto crítico para mantener una adecuada supervivencia (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006; Morales-García *et al.*, 2010). Sin embargo, no hay trabajos que muestren la capacidad de las bacterias para mantener sus características de adhesión, colonización y capacidad promotora del

crecimiento de plantas tras la liofilización. Por esta razón en el presente trabajo se exploró si las bacterias de la formulación multi-especies fueron capaces de adherirse y colonizar a las plantas después de la rehidratación de células liofilizadas de diferentes periodos de resguardo.

Los germinados de maíz inoculados con las bacterias rehidratadas durante 24 horas, procedentes de liofilizados con diferentes tiempos de resguardo se compararon con germinados inoculados con bacterias no liofilizadas. En plantas inoculadas con bacterias no liofilizadas, todas las bacterias se adhirieron correctamente en números como anteriormente ha sido reportado, tanto de manera individual como en mezcla (Morales García., 2013). Para germinados inoculados con células liofilizadas sin sacarosa, tanto de manera individual como en mezcla, y rehidratadas inmediatamente después de la liofilización, las bacterias se adhirieron en números menores habiendo una diferencia significativa con respecto a tratamientos inoculados con las bacterias que no fueron liofilizadas. En el tratamiento con sacarosa se obtuvieron números altos en la adhesión, sin embargo, en algunas cepas tanto de manera individual como en mezcla se observaron diferencias significativas con respecto a las bacterias del tratamiento sin liofilizar. Esto pudo deberse al número de bacterias con las que fueron inoculadas ya que el log de UCF/ml fue menor a lo reportado por Morales García (2013) y Hernández Juárez (2012).

La colonización se evaluó a los 15 días posteriores de la inoculación donde se observó que las bacterias sí pudieron colonizar la rizosfera de las plantas de maíz, notando que *P. putida* KT2440 y *Sphingomonas* sp. OF178 en los tratamientos con células liofilizadas sin sacarosa, de manera individual como en mezcla, no mostraron diferencia significativa con respecto a los tratamientos con células sin liofilizar. En general, en los tratamientos donde las bacterias se sometieron a liofilización se observaron algunas diferencias significativas con respecto al control (bacterias sin liofilizar). Estos resultados nos sugieren que durante el proceso de liofilización algunas bacterias se vieron afectadas y a pesar de la rehidratación prolongada (24h) no lograron activar todos sus mecanismos. Los resultados de la capacidad de

adherencia y colonización en germinados de maíz rojo podrían ser específicos de esa variedad como se ha reportado para caña de azúcar (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003).

G. diazotrophicus PAI5^T no fue contabilizada en algunos tratamientos debido al crecimiento de hongos en el medio de selección. Se sabe que esta cepa es una bacteria endófito por lo que pudo penetrar tejidos de las plantas (Dobereiner., 1989), se ha estudiado el comportamiento de esta cepa en *A. thaliana* donde a los 50 días posteriores a la inoculación se observó en los tejidos vasculares de la raíz (xilema) (De souza *et al.*, 2015), sin embargo, en este trabajo para poder detectarla se utilizó el método del número más probable con medios semigelificados (Muñoz-Rojas *et al.*, 2016); donde sí se pudo visualizar crecimiento de *G. diazotrophicus* PAI5^T pero no se pudo cuantificar en medios gelificados en placa.

La adhesión de las bacterias resguardadas durante tres y seis meses después de la liofilización solo fue observada para *Bradyrhizobium* sp. MS22, las otras cepas no fueron detectadas. A pesar de que esta bacteria tuvo una larga viabilidad en condiciones de liofilización, se pudo notar que mientras más sea el tiempo de resguardo la capacidad de adherencia en los germinados de maíz va disminuyendo.

En la colonización de los tratamientos evaluados a los tres y seis meses de resguardo se pudieron recuperar morfologías bacterianas parecidas a las inoculadas y mediante el análisis de corte con enzima de restricción se pudo notar que *Sphingomonas* sp OF178, *P. putida* KT2440, *A. brasilense* SP7, *B. unamae* MTI-641 y *Bradyrhizobium* sp. MS22 se recuperaron a los 3 meses y a los 6 meses solo *Sphingomonas* sp OF178 y *Bradyrhizobium* sp. MS22, lo que nos sugiere que las bacterias entraron a un estado viable no cultivable (excepto *Bradyrhizobium* sp. MS22) por el proceso de resguardo después de la liofilización y al estar en contacto con los exudados de las plantas de maíz pudieron recuperar su cultivabilidad. Esto coincide con lo observado por Pazos Rojas (2011) donde observó que *P. putida* KT2440

entra a una fase viable no cultivable durante la desecación en aire y retorna a un estado cultivable tras la rehidratación prolongada y más aceleradamente tras la rehidratación con exudados de plantas.

Entre especies de bacterias hay diferencias morfológicas y de secuencia en su gen 16S RNAr, por lo tanto, el corte con enzimas de restricción nos puede mostrar diferencia entre las distintas especies (Malik *et al.*, 2008). La enzima utilizada en este trabajo con la cual se pudieron identificar diferencias en los patrones de las 5 cepas (Morales García., 2014) se debió a que las bacterias son de diferentes especies, pero no implica que pueda diferenciar entre cepas del mismo género.

1.11. Promoción de crecimiento de las plantas inoculadas con bacterias sometidas a liofilización.

Con respecto a los datos obtenidos en este trabajo se pudo notar que los tratamientos donde los germinados de maíz fueron inoculadas con el inoculante EMMIM-1 sin liofilizar, se notaron que a los 20 ddi en los diferentes tiempos del experimento hubo diferencias significativas con respecto al control no inoculado, esto concuerda con lo observado por Olivera *et al.*, (2002) quienes reportaron que al inocular un consorcio de cepas en plantas de caña de azúcar, estas tuvieron un mayor tamaño con respecto a las que no fueron inoculadas, de igual manera Morales García en el 2013, al evaluar la promoción de crecimiento a los 10,20 y 30 días después de la inoculación en plantas de maíz con el inoculante EMMIM-1 pudo notar que a los 10 días ya había una diferencia entre el peso seco de la raíz de las plantas inoculadas con respecto a los controles, sin embargo, a los 30 ddi las diferencia significativas de promoción de crecimiento son más evidentes estadísticamente.

Las bacterias que fueron inoculadas de manera individual sin liofilizar en los tratamientos a diferentes tiempos se pudieron observar de igual manera diferentes resultados con respecto al peso y tamaño del tallo y la raíz, pero las bacterias que fueron constantes en tener diferencias significativas con respecto al control fueron: *Sphingomonas* sp. OF178 y *P. putida* KT2440.

Sphingomonas sp. OF178 se ha reportado como una bacteria degradadora de compuestos tóxicos (Boltner *et al.*, 2008) y también como una bacteria promotora del crecimiento en plantas de maíz (Morales García en el 2013), de igual marea se ha observado efecto PGPR en plantas de frijol por Juárez Hernández., 2012. El género *Pseudomonas* se ha ocupado en diferentes cultivos de interés agrícola como en tomate, papa, maíz entre otros (Santillana., 2006, Yair., 2014) obteniendo diferencias significativas con las plantas inoculadas con respecto al control, también es utilizado como control biológico, por su capacidad de inhibir a hongos (Stephan *et al.*, 2016).

Para los tratamientos evaluados con bacterias liofilizadas tanto en mezcla como individuales sin lioprotector los datos estadísticos fueron comunes en la mayoría de los tratamientos, donde había diferencia significativa con respecto al control, siendo el control mayor que los tratamientos, los tratamientos donde se utilizó el lioprotector hubo variantes significativas con respecto al control entre los periodos de siembra del experimento. Sin embargo en ambos tratamientos a partir del mes 3 ddl las bacterias ya no fueron detectadas en el medio selectivo a una rehidratación prolongada, por lo que nos indica que el proceso de liofilización está afectando la viabilidad de las cepas. Esto se ha observado por Leslie *et al.*, (1995), que indican que la liofilización puede causar daños a la membrana y concomitantemente una disminución en la viabilidad de algunos microorganismos. Al mismo tiempo, algunas características de los microorganismos podrían estar afectadas después de dicho proceso, por ejemplo, las cepas del género *Pseudomonas* sp se ven afectadas en la viabilidad y la eficiencia de inhibir el crecimiento de hongos patógenos (Stephan *et al.*, 2016).

Además, los lioprotectores influyen sobre las capacidades fisiológicas de las cepas, por ejemplo, se ha observado la inestabilidad de bacterias solubilizadoras después de la liofilización, generando una disminución en la solubilización de fosfatos en algunas cepas (Ortiz *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren que el proceso de liofilización pudo causar daños más notorios en cepas que fueron liofilizadas sin algún lioprotector, los cuales estén interviniendo en la promoción del crecimiento.

CONCLUSIONES.

- ✓ La mayoría de las bacterias que componen el inoculante EMMIM-1 sometidas a liofilización con lioprotector tuvieron una mejor supervivencia en anaquel.
- ✓ Las bacterias que fueron sensibles al proceso de liofilización fueron *B. unamae* MTI-641 y *G. diazotrophicus* PA15^T.

- ✓ *Bradyrhizobium* sp. MS22 fue resistente al proceso de liofilización al contabilizarse hasta el año de resguardo de manera individual con sacarosa.
- ✓ La adhesión como la colonización se ve afectada por el proceso de liofilización sin lioprotector y al estar en contacto con la planta.
- ✓ La promoción de crecimiento de las plantas de maíz fue mejor en las bacterias liofilizadas con lioprotector en comparación con las que no tenían lioprotector.
- ✓ La corroboración de las bacterias inoculadas fue posible inmediatamente después de la liofilización, en los tiempos siguientes de las evaluaciones algunas bacterias ya no se detectaron.
- ✓ *Sphingomonas* sp OF178 se pudo corroborar al estar en contacto con las raíces de las plantas en los tiempos de 3 y 6 meses después de la liofilización a pesar de ya no ser contabilizada.

BIBLIOGRAFIA.

- Achal, V., Savant, V. V., & Reddy, M. S. (2007). Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), 695-699.
- Badii, M. H., & Varela, S. (2015). Insecticidas organofosforados: efectos sobre la salud y el ambiente. *CULCyT*, (28).
- Baker, C. J., & Orlandi, E. W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual review of phytopathology*, 33(1), 299-321.
- Barranco-Cuellar, V. (2016) Efectos de benomilo sobre el crecimiento de *Salvia hispánica* L. Y uso de bacterias rizosfericas para contrarrestar efectos tóxicos. (Tesis licenciatura) Facultad de ingeniería ambiental, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances*, 16(4), 729-770.
- Bashan, Y., & González, L. E. (1999). Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(2), 262-266.
- Bashan, Y., & Holguin, G. (1996). *Azospirillum*–plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). *Canadian Journal of Microbiology*, 43(2), 103-121.

- Bashan, Y., Holguin, G., & Lifshitz, R. (1993). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, 331-345.
- Beltrán Pineda, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Artículo de revisión de la Revista Corpoica: Ciencia y Tecnología Agropecuaria, Vol. 15, No. 1.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, 35(4), 1044-1051.
- Benitez Leite, S., Macchil, M. L., & Acosta, M. (2009). Malformaciones congénitas asociadas a agrotóxicos. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 48(3), 204-217.
- Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current opinion in plant biology*, 4(4), 343-350.
- Boddey, R. M., & Döbereiner, J. (1982, February). Association of *Azospirillum* and other diazotrophs with tropical gramineae. In *International Congress of Soil Science* (Vol. 12, pp. 28-47).

- Böltner, D., Godoy, P., Muñoz-Rojas, J., Duque, E., Moreno-Morillas, S., Sánchez, L., & Ramos, J. L. (2008).

Rhizoremediation of lindane by root-colonizing *Sphingomonas*. *Microbial biotechnology*, 1(1), 87-93.

- Caballero-Mellado, J. (2006). Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 154-161.
- Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez-Bravo, J., & Acosta, M. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. In *Anales de Biología* (Vol. 27, pp. 137-142).
- Ceccon, E. (2008). La revolución verde: tragedia en dos actos. *Ciencias*, 91(091).
- Cerrato, R. F., Avelizapa, N. G. R., Varaldo, H. M. P., Alarcón, A., & Villanueva, R. O. C. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. Caracterización y biorremediación de sitios contaminados con residuos de perforación. Fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Factibilidad de reactores de suelos activados para la biorrestauración de suelos

pesados. El papel de las microalgas en la biorremediación de aguas contaminadas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 179-187.

- Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST) 1991. Catálogo Oficial de Plaguicidas 1991. 469 pp.
- Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., Rudolph, A. S., Wistrom, C. A., Spargo, B. J., & Anchordoguy, T. J. (1988). Interactions of sugars with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 947(2), 367-384.
- Davis CP, Savage DC. (1974). Habitat, succession, attachment, and morphology of segmented, filamentous microbes indigenous to the murine gastrointestinal tract. *Infect Immun* 10: 948–956.
- De Souza, A. R., De Souza, S. A., De Oliveira, M. V. V., Ferraz, T. M., Figueiredo, F. A. M. M. A., Da Silva, N. D., ... & De Souza Filho, G. A. (2015). Endophytic colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion, plant physiology, and activation of plant defense. *Plant and soil*, 399(1-2), 257-270.
- Díaz-Franco, A., & Mayek-Pérez, N. (2008). *La biofertilización como tecnología sostenible*. Plaza y Valdés.
- Döbereiner, J. (1989). Isolation and identification of root associated diazotrophs. In *Nitrogen fixation with non-legumes*(pp. 103-108). Springer, Dordrecht.
- Estrada-Bonilla G. A. 2008. Calidad de inoculantes almacenados a diferentes temperaturas: efecto sobre la población, humedad y pH del producto.

- FAO. 2011. El estado de los recursos de tierras y aguas del mundo para la alimentación y la agricultura. La gestión de los sistemas en situación de riesgo. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Roma, y Mundi-Prensa, Madrid.
- Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2008). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*, 321, 35-59.
- García-Olivares, J. G., Mendoza-Herrera, A., & Mayek-Pérez, N. (2012). Efecto de *Azospirillum brasilense* en el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipas, México. *Universidad y ciencia*, 28(1), 79-84.
- Gómez-Cárdenas, C., Sarmiento, L., Acevedo, D., Pino, N., Linares, M. P., Valery, A., & de Molina, Z. M. (2016). Salidas de nitrógeno en el agroecosistema de plátano (*Musa AAB*) al sur del lago de Maracaibo.
- Herigstad B., Hamilton M., Heersink J. 2001. How optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 44 (2): 121-129.
- Hernández-Acosta, E., Ferrera-Cerrato, R., del Carmen Gutiérrez-Castorena, M., Rodríguez-Vázquez, R., Rubiños-Panta, J. E., & Fernández-Linares, L. (2003). Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. *Terra Latinoamericana*, 21(4), 493-502.
- Hernández-Tenorio A.L. 2014 Viabilidad de bacterias de un inoculante multi-especies y su efecto a corto plazo, en el crecimiento de *Solanum tuberosum* cv. Atlantic. (Tesis de licenciatura) Escuela de biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Hiltner, L. (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderden berucksichtigung und Brache. Arb. Dtsch. Landwirtsch. Gesellschaft 98, 59–78.
- Hoben H. J., Somasegaran P. 1982. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. In inoculants made from presterilized peatt. *Applied and Environmental Microbiology*. 44 (5): 1246-1247.
- Jiménez, R., Virgen, G., Tabares, S., & Olalde, V. (2001). Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agrobiotecnología. *Avance y perspectiva*, 20, 395-400.
- Juárez-Hernández. D. 2012. Tesis de licenciatura. Evaluación de bacterias benéficas en la promoción de crecimiento de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). (Tesis de licenciatura). Escuela de biología Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Juárez-Hernández. D. 2015. Estudios de interacción de *Pseudomonas putida* KT2440 con bacterias de la formulación emmim-1 en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). (Tesis de Maestría) Posgrado en Ciencias (Microbiología). Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- 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 and Schroth M N 1978 Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *In Proc. 4th Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria*. Vol 2, pp 879–882. INRA, Angers, France.
- Kosanke, J. W., Osburn, R. M., Shuppe, G. I., & Smith, R. S. (1992). Slow rehydration improves the recovery of dried bacterial populations. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 520-525.

- Kosanke, J.W., Osburn, R.M., Shuppe, G.I. and Smith, R.S. (1992)
- Kosanke, J.W., Osburn, R.M., Shuppe, G.I. and Smith, R.S. (1992)
- Kosanke, J.W., Osburn, R.M., Shuppe, G.I. and Smith, R.S. (1992)
- Kosanke, J.W., Osburn, R.M., Shuppe, G.I. and Smith, R.S. (1992)
- Kosanke, J.W., Osburn, R.M., Shuppe, G.I. and Smith, R.S. (1992)
- Kosanke, J.W., Osburn, R.M., Shuppe, G.I. and Smith, R.S. (1992)
- Leon-Reyes, A., Spoel, S. H., De Lange, E. S., Abe, H., Kobayashi, M., Tsuda, S., & Pieterse, C. M. (2009). Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiology*, 149(4), 1797-1809.
- Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H., & Crowe, L. M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and environmental microbiology*, 61(10), 3592-3597.
- López-Cruz L.E. 2017. Estudio del papel que tiene el estrés oxidativo en la tolerancia a desecación en bacterias de interés agrícola. (Tesis de maestría) Posgrado en Ciencias (Microbiología). Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Lugo, A. C., García, Y. E. M., Rojas, L. A. P., Valverde, A. R., Contreras, R. D. M., & Rojas, J. M. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de " Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Revista colombiana de biotecnología*, 14(2), 147-156.
- Maicas, S., Natividad, À., Ferrer, S., & Pardo, I. (2000). Malolactic fermentation in wine with high densities of non-proliferating *Oenococcus oeni*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(8-9), 805-810.

- MALIK, S., BEER, M., MEGHARAJ, M., y NAIDU, R. 2008. «Review article: The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water». En: Environment International, 34, pp. 265-276.
- Morales García, Y. E., Pazos Rojas, L. A., Bustillos Cristales, M. D. R., Krell, T., & Muñoz Rojas, J. (2010). Método rápido para la obtención de maíz axénico a partir de semillas.
- Morales-García Y. E, Juárez-Hernández D., Muñoz-García 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.
- 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 YE. 2013., Antagonismo entre bacterias de interés agrícola y evaluación de inoculantes. (Tesis de doctorado) Posgrado en Ciencias (Microbiología). Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Morales-García, Y., Duque, E., Rodríguez-Andrade, O., De la Torre, J., Martínez-Contreras, R., Pérez-Terrón, R., & Muñoz Rojas, J. (2010). Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología*, 14(2), 11-29.

- Morales García Yolanda Elizabeth, Rodríguez Andrade Osvaldo, Hernández Tenorio Ana Laura, Molina Romero Dalia y Muñoz Rojas Jesús. (2014). CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS CONTENIDAS EN UN INOCULANTE MULTIESPECIES. IX Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; a review. *Journal of microbiological methods*, 66(2), 183-193.
- Muñoz-Arenas L. C., Pazos- Rojas L. A., Morales-García Y. E., Toribio-Rosales C., Bustillos-Cristales M. R. and Muñoz-Rojas J. 2006. Supervivencia de *P. putida* KT2440 a condiciones de desecación natural. Artículo In extenso, en Memorias del V encuentro Nacional de Biotecnología-IPN. Área temática 3, Pp. 50-54. En: Durán-Páramo y Salgado-Manjarrez (eds.). Instituto Politécnico Nacional, México, D. F
- Muñoz-Arenas L. C., Pazos- Rojas L. A., Morales-García Y. E., Toribio-Rosales C., Bustillos-Cristales M. R. and Muñoz-Rojas J. 2008. Evaluación de exudados de maíz (Raíz) para proteger a *P. putida* KT2440 de la desecación. En Memorias del VII Congreso Internacional, XII Congreso Nacional y III Congreso Regional de Ciencias Ambientales. Área temática Tecnología y Biotecnología Ambiental.
- Muñoz-Arenas. 2011. Estrategias de *Pseudomonas putida* KT2440 para enfrentar el proceso de desecación. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias (Microbiología). Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Muñoz-Rojas, J., & Caballero-Mellado, J. (2003). Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial ecology*, 46(4), 454-464.

- Muñoz-Rojas, J., Bernal, P., Duque, E., Godoy, P., Segura, A., & Ramos, J. L. (2006). Involvement of cyclopropane fatty acids in the response of *Pseudomonas putida* KT2440 to freeze-drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 472-477.
- Muñoz-Rojas, J., Morales-García, Y., Baez-Rogelio, A., Quintero-Hernández, V., Rivera-Urbalejo, P., Pérez- y-Terrón, R (2016). Métodos económicos para la cuantificación de microorganismos. Science Associated Editors, L. L. C, 13: 978-1-944162-16-0
- Naciones Unidas 2009. *Perspectivas de la población mundial: revisión de 2008*. Nueva York, División de Población de las Naciones Unidas.
- Olalde Portugal, V., & Aguilera Gómez, L. I. (1998). Microorganismos y biodiversidad. *Terra Latinoamericana*, 16(3).
- Olembo, R. 1991. Importance of microorganisms and invertebrates as components of biodiversity. pp. 7-15. In: D.L. Hawksworth (ed.). *The biodiversity of microorganisms and invertebrates: Its role in sustainable agriculture*. Redwood Press, Melksham, UK.
- Oliveira, A. L. M., Stoffels, M., Schmid, M., Reis, V. M., Baldani, J. I., & Hartmann, A. (2009). Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *European journal of soil biology*, 45(1), 106-113.
- Ortiz, T., Ocampo, V., Prada, L. D., & Franco-Correa, M. (2016). Métodos de conservación para actinobacterias con actividad solubilizadora de fósforo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 32-39.

- Paau, A. S. (1988). Formulations useful in applying beneficial microorganisms to seeds. *Trends in Biotechnology*, 6(11), 276-279.
- Pazos-Rojas L.A. 2011. Estudios biológicos sobre la supervivencia de *Pseudomonas putida* KT2440 a la desecación. (Tesis de maestría) Posgrado en Ciencias (Microbiología). Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Pazos-Rojas, L. A., Marín-Cevada, V., Morales-García, Y. E., Baez, A., Villalobos-López, M. A., Pérez-Santos, M., & Muñoz-Rojas, J. (2016). Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. *Rev. Iberoamer. Cienc*, 20.
- Peiren J, Buyse J, De Vos P, Lang E, Clermont D, Hamon S, Begaud E, Bizet C, Pascual J, Ruvira MA, Macian MC, Arahall DR (2015) Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(8):3559–3571. doi:[10.1007/s00253-015-6476-6](https://doi.org/10.1007/s00253-015-6476-6)
- Peiren, J., Hellemans, A., & De Vos, P. (2016). Impact of the freeze-drying process on product appearance, residual moisture content, viability, and batch uniformity of freeze-dried bacterial cultures safeguarded at culture collections. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(14), 6239-6249.
- Perry SF (1995) Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Methods Mol.Biol.* 38: 21-30.
- Potts, M., Slaughter, S. M., Hunneke, F. U., Garst, J. F., & Helm, R. F. (2005). Desiccation tolerance of prokaryotes: application of principles to human cells. *Integrative and Comparative Biology*, 45(5), 800-809.

- Ramirez-Ramirez, J. C., Rosas Ulloa, P., Velazquez Gonzalez, M. Y., Ulloa, J. A., & Arce Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud.
- Ríos, M. D. C. (2003). El estrés oxidativo y el destino celular. *Química viva*, 2(1).
- Romero, D. M., Cristales, M. D. R. B., Andrade, O. R., García, Y. E. M., Saenz, Y. S., & Lucio, M. C. Rojas, J.M (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 17(2), 24-34.
- Santi, C., Bogusz, D., & Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of botany*, 111(5), 743-767.
- Santillana-Villanueva N. Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas* sp. *Ecol. apl.* 2006; 5: 87-91.
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3).
- Slow rehydration improves the recovery of dried bacterial popula-
- Slow rehydration improves the recovery of dried bacterial popula-
- Slow rehydration improves the recovery of dried bacterial popula-
- Slow rehydration improves the recovery of dried bacterial popula-
- Slow rehydration improves the recovery of dried bacterial popula-
- Slow rehydration improves the recovery of dried bacterial popula-
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 56(4), 845-857.

- Stephan, D., Da Silva, A. P. M., & Bisutti, I. L. (2016). Optimization of a freeze-drying process for the biocontrol agent *Pseudomonas* spp. and its influence on viability, storability and efficacy. *Biological control*, 94, 74-81.
- Taulé, C. (2011). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a variedades de caña de azúcar en Uruguay: identificación, caracterización y estudios de interacción.
- tions. *Canadian Journal of Microbiology*
- tions. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 520–52
- tions. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 520–525
- tions. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 520–525
- tions. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 520–525
- tions. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 520–525
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. *Molecules*, 21(5), 573.
- Viñals, M., & Villar, J. (1999). *Avances en la formulación y aplicación de inoculantes bacterianos de uso agrícola* (No. 175). York, División de Población de las Naciones Unidas.
- Zhao, G., & Zhang, G. (2005). Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 99(2), 333-338.