



**UNIVERSIDAD POPULAR
AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA**

**DECANATO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y FACULTAD
DE BIOTECNOLOGÍA**

**Encapsulación de *Azotobacter vinelandii* en
alginato-Na como inoculante de plántulas de tomate**

TESIS

Para obtener el título de:
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Martha Elba Sánchez Rodríguez

Directora:

M.C. Victoria Conde Ávila

Co-director:

Dr. Luis Daniel Ortega Martínez

Puebla, Puebla, 17 de febrero de 2020





UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla
Departamento de Ciencias Biológicas
Ingeniería en Biotecnología

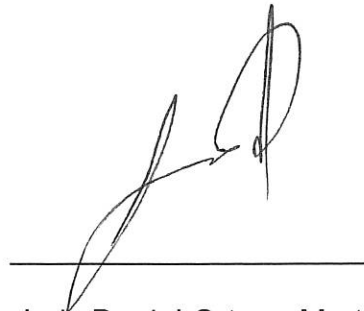
SE APRUEBA LA TESIS:

**Encapsulación de *Azotobacter vinelandii* en
alginato-Na como inoculante de plántulas de tomate**

De la alumna: Martha Elba Sánchez Rodríguez



M.C. Victoria Conde Avila
Director de Tesis



Dr. Luis Daniel Ortega Martínez
Codirector de Tesis

Puebla, México Enero de 2020

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por estar siempre presente en todos los momentos de mi vida, por apoyarme en todos los momentos difíciles, por enseñarme y motivarme a siempre seguir adelante y por todo su amor incondicional que siempre me ha brindado.

A mi padre por apoyarme siempre en mi educación, por sus palabras de aliento para seguir adelante y por cada momento compartido junto a mí.

A mis hermanos por ser mis compañeros de vida y maestros en diferentes aspectos, por estar siempre presentes, por su apoyo incondicional y por siempre protegerme.

A mis amigas Fer y Mel por tantos años de amistad, por acompañarme en los momentos importantes, por cada momento de fiesta y felicidad compartidos.

A Héctor que se ha convertido en uno de mis mejores amigos, que ha estado ahí en mis momentos de debilidad y tristeza, pero también en los de mucha felicidad, por ser mi confidente y compañero de tantas aventuras.

A mis amigas Leslie, Celeste, Zianya y Jessi con quienes compartí grandes momentos durante la carrera, les agradezco por estar siempre ahí y por ese apoyo mutuo que nos dábamos para mejorar en las materias, por tantas aventuras juntas y por todas las que faltan por vivir.

A Vicky por ser mi directora de tesis y por ser mi mentora y apoyo para aprender cosas nuevas en el laboratorio, por ayudarme en todo este proceso y por motivarme a terminar y trabajar duro.

Al Dr. Luis Daniel por apoyarme en la realización de la tesis, por darme las herramientas necesarias y por darse el tiempo para resolver mis dudas.

Al Dr. Elie por apoyarme en las técnicas moleculares, por su paciencia y por ser un gran profesor y mentor durante la carrera.

A todos mis compañeros de laboratorio que estuvieron ahí ayudándome y aconsejándome, principalmente a Paty, Laura y Javier.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
I. CAPÍTULO I.....	8
1.1 INTRODUCCIÓN.....	8
1.2 MARCO TEÓRICO.....	12
1.2.1 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV).....	12
1.2.2 Género <i>Azotobacter spp.</i>	12
1.2.3 <i>Azotobacter vinelandii</i>	13
1.2.4 Mecanismo fijación de nitrógeno	14
1.2.5 Inoculantes microbianos	15
1.2.6 Suelos supresivos	15
1.2.7 Inmovilización celular	16
1.2.8 Alginato-Na.....	17
1.2.9 Importancia del Tomate (<i>Lycopersicon sp.</i>) en México	17
1.2.10 Valor nutricional	19
1.2.11 Taxonomía y morfología	19
1.2.12 Fenología del cultivo de tomate	21
1.2.13 Requerimientos climáticos y edáficos	22
1.2.14 Fundamentos de PCR.....	23
1.2.15 Electroforesis	24
1.2.16 PCR en tiempo real	25
1.3 JUSTIFICACIÓN	27
1.4 OBJETIVO GENERAL	28
1.5 OBJETIVOS ESPECIFICOS	28
1.6 HIPÓTESIS	28

Artículo científico: Encapsulación de *Azotobacter vinelandii* en alginato-Na como inoculante de plántulas de tomate

II. Bibliografía

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la organización de los genes involucrados en las síntesis de las nitrogenasas utilizadas por <i>A. vinelandii</i> en la fijación de nitrógeno.....	14
Figura 2. Principales países exportadores de tomate en 2016.....	18
Figura 3. Representación de las etapas fenológicas del tomate.....	22
Figura 4. Etapas en un ciclo de PCR.....	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Azotobacter vinelandii</i>	13
Tabla 2. Producción nacional de tomate.....	18
Tabla 3. Valores nutricionales del tomate.....	19
Tabla 4. Taxonomía del tomate <i>Lycopersicon esculentum</i>	19

RESUMEN

La inmovilización es un método caracterizado por restringir a las células a un área delimitada conservando su viabilidad metabólica. Dicha técnica y sus métodos representan una alternativa para mejorar la capacidad de adaptación de las bacterias frente a la exclusión competitiva por microorganismos autóctonos, así como de interacciones y factores ambientales que limitan su bioaumentación. Especies del género *Azotobacter* son de interés debido a su eficiencia como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV). Sin embargo, su inoculación en suelo puede presentar dificultades relacionadas con su sobrevivencia y efectividad a largo plazo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *Azotobacter vinelandii* encapsulada en perlas de alginato-Na como inoculante de plántulas de tomate (*Solanum Lycopersicum* L). La inoculación con *A. vinelandii* en forma libre y encapsulada favoreció indistintamente el crecimiento de las plántulas. Por su lado, al usar el inóculo encapsulado aumentó el porcentaje de germinación, el diámetro del tallo y longitud de raíces en comparación con el inóculo líquido, así como la concentración de NO₃ y Na. La encapsulación de *A. vinelandii* restringe espacialmente su distribución en el suelo, pero no limita su establecimiento en la rizósfera inmediatamente después de la inoculación. Sin embargo, la viabilidad de la bacteria se vio limitada después de 30 d independientemente del método de inoculación.

Palabras clave: alginato, inmovilización, RPCV

ABSTRACT

Immobilization is a specific method for restricting cells in a delimited area while retaining their metabolic viability. This technique and its methods represent an alternative to improve the ability of bacteria to adapt to competitive exclusion by native microorganisms, as well as interactions and environmental factors that limit their bioaugmentation. Species of the genus *Azotobacter* are of interest due to their efficiency as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). However, its inoculation in the soil can present difficulties related to its survival and long-term difficulties. The objective of this work was to evaluate the effect of *Azotobacter vinelandii* encapsulated in alginate-Na pearls as inoculant of tomato seedlings (*Solanum Lycopersicum* L). Inoculation with *A. vinelandii* in free and encapsulated form indistinctly favored seedling growth. On the other hand, when using the encapsulated inoculum, the percentage of germination, stem diameter and root length compared to the liquid inoculum are varied, as well as the concentration of NO₃ and Na. The encapsulation of *A. vinelandii* spatially restricts its distribution in the soil, but does not limit its establishment in the rhizosphere immediately after inoculation. However, the viability of the bacteria was limited after 30 specific days of the method of inoculation

Key words: alginate, Immobilization, PGPR

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

La inoculación de plantas con bacterias y simbiontes para mejorar el rendimiento de los cultivos es una tecnología que se ha llevado a cabo durante décadas (Bashan et al., 2014). Las especies de *Azotobacter* pertenecen al grupo las rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas (RPCV) (Chennappa et al., 2018). El género *Azotobacter* tiene la capacidad de producir diferentes tipos de sustancias como metabolitos secundarios, tales como aminoácidos, fitohormonas, antibióticos, antifúngicos y sideróforos (Vejan et al., 2016). Recientemente, se ha reportado que degradan diferentes tipos de plaguicidas y compuestos fenólicos (Chennappa et al., 2019).

Azotobacter vinelandii, es una bacteria gram negativa que destaca por su eficiencia en la fijación asimbiótica de nitrógeno (N), producción de sustancias promotoras de crecimiento y de control biológico, así como por la generación de metabolitos de interés industrial (Gurikar et al., 2016). *A. vinelandii* produce vitaminas del grupo B (niacina, rivo flavina y biotina) y aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, arginina, prolina, etc.) que son claves en procesos celulares del metabolismo de grasas, carbohidratos y proteínas (Revillas et al., 2000). Han reportado que produce auxinas como el ácido acético de indol (AIA), responsable de la división, diferenciación y crecimiento de células vegetales (Reshma et al., 2018), así como fitorreguladores de crecimiento de acción hormonal como de ácido giberélico (AG) (Upadhyay et al., 2009). Excreta también, compuestos antifúngicos (azotobacin, azotochelin, aminoquelin, protochelin y 2,3-dihidroxiacidobenzoico) (Nagaraja et al., 2016) y sustancias volátiles como el cianuro de hidrógeno (HCN) que inhibien el crecimiento de microorganismos fitopatógenos como hongos de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* (Chennappa et al., 2018).

Por otro lado, pese a sus potenciales efectos benéficos, la incorporación de *A. vinelandii* en el suelo puede presentar dificultades relacionadas con su sobrevivencia, colonización y efectividad en el suelo a largo plazo (Mrozik y Piotrowska-Saget 2010).

En general, poco después de que las suspensiones de bacterias se inoculan en el suelo sin un portador adecuado, la población disminuye rápidamente para la mayoría de las especies de RPVC (Bashan et al., 2014). Este fenómeno, combinado con la escasa producción de biomasa bacteriana, la dificultad para mantener sus actividades metabólicas ante el estrés abiótico y el estado fisiológico en el momento de la aplicación, pueden limitar su estabilizamiento en la rizosfera. Estas bacterias

inoculadas, deben competir con el microbioma nativo, a menudo mejor adaptado, y soportar la depredación por la microfauna del suelo. Es por ello que algunos autores no recomiendan la inoculación de RPCV en forma de diluciones celulares líquidas en suelo (Nakkeeran et al., 2005). En consecuencia, una función importante a considerar en la formulación de inoculantes es proporcionar un microentorno más adecuado, combinado con protección física durante un período prolongado para prevenir una rápida disminución de la viabilidad de dichos microorganismos (Bashan et al., 2002).

En este sentido, la inmovilización celular es una técnica que se emplea con el propósito de favorecer el establecimiento y colonización de microorganismos benéficos, ya que puede brindarles mayor viabilidad, tolerancia y protección a factores externos (Yañez-Ocampo et al., 2009). La encapsulación microbiana, el más común de los métodos de inmovilización, es caracterizada por atrapar microorganismos vivos en una matriz polimérica y mantener su viabilidad (Mustapha et al., 2018). Con este propósito, ha surgido interés en el empleo de diferentes materiales y técnicas con la finalidad de incrementar la productividad y viabilidad de células, así como mantener su actividad metabólica por periodos prolongados de tiempo (Jeshitha et al. 2015). El uso de esta tecnología debe proporcionar de forma deseable, condiciones apropiadas y prolongadas para el desarrollo celular, nula toxicidad o potencial contaminante, así como propiedades constantes para ser usados en agua y suelos (Covarrubias et al., 2012).

La encapsulación en matrices poliméricas es generalmente experimental en el campo de la tecnología de inoculación de bacterias con fines agrícolas y ambientales (Vejan et al., 2016). No obstante, cuando se emplea la inmovilización microbiana en los procesos de bioaumentación e inoculación, comúnmente se logran mayores rendimientos y porcentajes de colonización al incorporarlos bajo la protección de la encapsulación, surgiendo como una alternativa tecnológica con potenciales aplicaciones (Nagaraja et al., 2016).

Las investigaciones que se han enfocado en la búsqueda de alternativas para la optimización de tecnologías de inoculación bacteriana empleando alguna técnica de inmovilización son escasas. Se usan principalmente dos tipos de procesos, los basados en retención física (como el atrapamiento en matrices porosas o encapsulación en membranas) y aquellos en los que se emplea un enlace químico (p.e. la formación de biopelículas). La inmovilización puede llevarse a cabo empleando materiales inorgánicos naturales, polímeros naturales o materiales sintéticos. Si bien la mayoría de

estos inoculantes se utilizan a pequeña escala para la producción de cultivos, la mayoría los inoculantes poliméricos se emplean de modo experimental. Para usos agrícolas y ambientales, estos polímeros incluyen materiales como el alginato, agar, λ y κ carragenina, pectina, quitosano, goma de frijol y polímeros patentados. Entre ellos, el alginato es el material de elección para la mayoría de las encapsulaciones de microorganismos (Talwar y Ninnekar 2015). Las ventajas de las formulaciones de alginato son su naturaleza no tóxica, biodegradabilidad, asequibilidad y liberación lenta de los microorganismos atrapados controlada por la estructura polimérica (Kadacol, Kamanavalli y Shouche 2011).

Al respecto, las perlas de alginato (1–4 mm de diámetro) se han usado para encapsular RPCV y hongos micorrízicos. *Streptomyces* sp. fue atrapado en un portador de alginato-caolín (silicato de aluminio) y se sometió a liofilización. Este inoculante se formuló como un polvo seco o humectable mediante la adición de almidón, talco y caolín para mejorar la supervivencia de *Streptomyces* sp. Las pruebas de estas formulaciones mostraron grandes variaciones en la eficacia del control biológico del patógeno fúngico *Rhizoctonia* en tomate (Sabaratnam y Traquair 2002).

La encapsulación de RPCV *Bacillus subtilis* en perlas de alginato enriquecidas con ácido húmico produjo una alta viabilidad con una pérdida celular mínima por 5 meses; y a diferente pH, dicha formulación produjo una liberación celular constante de la bacteria y mostró resultados exitosos en la inoculación de lechugas (Young et al. 2006).

Cuando se inoculó *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* en plantas de trigo en bolsas para su desarrollo en una cámara de crecimiento, ambas especies colonizaron y produjeron efectos de crecimiento iguales a los de cepas libres (Bashan y González 1999). Por otro lado, Vassilev et al. (2001) demostraron que la inoculación con un hongo (*Glomus deserticola*) y una levadura solubilizante de fósforo (P) (*Yarrowia lipolytica*) atrapada en alginato puede ser una técnica eficaz para el establecimiento y crecimiento de plantas de tomate en suelos deficientes de nutrientes. Del mismo modo, Krell et al. (2017) han sugerido que la inmovilización en alginato aumenta el endofitismo y tolerancia a contaminantes.

No obstante, una limitante del uso de dicha tecnología de inoculación ha sido la heterogeneidad del suelo, la supervivencia en condiciones de confinamiento, su interacción con los materiales de soporte o atrapamiento y la estabilidad mecánica de los materiales empleados en la inmovilización. Además son limitadas las investigaciones en las que se evalúe la viabilidad de las RPVC en

experimentos *in situ* empleando técnicas moleculares para el monitoreo de la viabilidad de los microorganismos inoculados.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *A. vinelandii* encapsulada en perlas de alginato-Na como inoculante de plántulas de tomate (*Solanum Lycopersicum* L) en suelo.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 Rizoacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV)

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) habitan en la rizósfera del suelo. Dichas bacterias, de manera directa o indirecta, facilitan el enraizamiento y crecimiento de las plantas por lo que han sido consideradas agentes de fertilización biológica. Además, son una excelente alternativa al uso de fertilizantes nitrogenados (FN) y agroquímicos, debido a que la inoculación de con este tipo de bacterias optimiza el uso de FN, sin afectar el crecimiento o rendimiento de los cultivos (Armenta-Bojórquez et al. 2009).

Las RPCV crecen ya sea de forma endófito o libre a las plantas y estimular su crecimiento por diversos mecanismos, como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización y mineralización de fosfato, la producción de índoles, sideróforos, entre otros (Pii et al. 2015).

Entre los géneros bacterianos que pertenecen a las RPCV se encuentran: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Serratia*.

1.2.2 Género *Azotobacter*

Las bacterias del género *Azotobacter* pertenecen a la familia *Azotobacteriaceae* y representa el grupo principal de bacterias heterotróficas asimbióticas fijadoras de nitrógeno que habitan principalmente en suelos (Sartaj et al. 2013).

Las bacterias *Azotobacter* reaccionan como Gram negativos, sus células son ovoides y miden aproximadamente 2µm a 4µm de diámetro, son aerobias, pero algunas pueden vivir en condiciones bajas de oxígeno y tienen flagelos periticos que les permiten moverse (Saribay 2003).

Para el óptimo crecimiento de este tipo de bacterias se requiere de un pH de 7.0-7.5 y una temperatura de 30°C (Saribay 2003).

En cuanto a sus cualidades metabólicas, reducen el nitrato, producen sulfuro de hidrógeno, hidrolizan el almidón, producen promotores de crecimiento (giberelinas, auxinas y citoquininas) (Santana et al. 2002), además de fijar asimbióticamente nitrógeno, solubilizar fosfato y pueden biodegradar algunos plaguicidas (Holt 2000).

La producción de fitohormonas como auxinas, citosinas y giberlinas es muy importante, ya que estas favorecen el desarrollo radicular aumentando así la toma de agua y nutrientes, producción de etileno, producción de cianidas, fijación del N₂ atmosférico, etc. (Rossi 2016).

El género *Azotobacter* es capaz de fijar en promedio 20 kg N/ha por año (Rawia et al. 2009). Este tipo de bacterias también participan en otras vías metabólicas promotoras del crecimiento vegetal por su actividad antagonista contra los patógenos de plantas en suelo y la activación del potencial bioinoculante rizosférico para la mejora del rendimiento de las plantas (Lakshminarayana et al. 2000). Entre las especies de *Azotobacter* destacan: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. paspali*, *A. armeniacus*, *A. nigricans* y *A. salinestri*.

Estudios han demostrado que la inoculación con *Azotobacter* en cultivos de maíz aumenta significativamente la altura de la planta, el peso y el rendimiento del grano, este último hasta en un 35% con respecto al testigo (Bandhu et al. 2013).

1.2.3 *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es una bacteria móvil, mesófila, fijadora de nitrógeno, su morfología puede variar desde bacilos hasta cocos dependiendo del medio en el que se crezca, además, es poliploide, por lo que posee varias copias de su cromosoma calculándose que puede llegar a tener hasta 80 copias. Su tamaño llega a variar desde 2 a 5 µm de diámetro (Nagpal et al. 1989).

A. vinelandii es una bacteria de interés biotecnológico debido a su capacidad metabólica y genética para la fijación de nitrógeno en presencia de oxígeno. También ha sido objeto de estudios por su capacidad de producir polímeros como el polihidroxibutirano y el alginato utilizado como agente gelificante en la industria alimenticia y farmacéutica (Espín 2002).

Tabla 1. Taxonomía de *Azotobacter vineleandii*

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobactetia
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Azotobacter</i>
Especie	<i>Azotobacter vinelandii</i>

(Uniprot Consortium, 2009).

1.2.4 Fijación de N por *A. vinelandii*

A. vinelandii, así como las demás bacterias del género *Azotobacter*, llevan a cabo reacciones de conversión de N_2 a NH_4 debido a la catálisis enzimática, principalmente nitrogenasas, requiriendo además de una fuente de carbono, nitrógeno, magnesio, potasio, calcio, hierro y fósforo.

Como fuente de carbono y energía, normalmente son utilizados ácidos orgánicos, azúcares o sus derivados como el manitol, la fructosa, glucosa, sucrosa, fumarato, piruvato, etc. (Holt 2000). Como fuente de nitrógeno pueden usar nitrato, sales de amonio y aminoácidos.

A. vinelandii es capaz de fijar nitrógeno en aerobiosis debido a que posee un sistema integrado de protección de su nitrogenasa que comprende: protección conformacional, protección respiratoria, autoprotección y otros cambios morfológicos y fisiológicos que le permiten crecer diazotróficamente en condiciones totalmente aeróbicas (Manchal et al. 2000).

Azotobacter vinelandii tiene tres diferentes tipos de nitrogenasas para la fijación de nitrógeno, nitrogenasa 1 codificada por el gen *nifHDK*, nitrogenasa 2 que es dependiente de vanadio, es codificada por los genes *vnf* y se encuentran en los operones *vnfHorfFd* y *vnfDGK* y nitrogenasa 3 que se genera en condiciones deficientes de molibdeno y vanadio, es codificada por el gen *anfHDK* (Betancourt 2002).

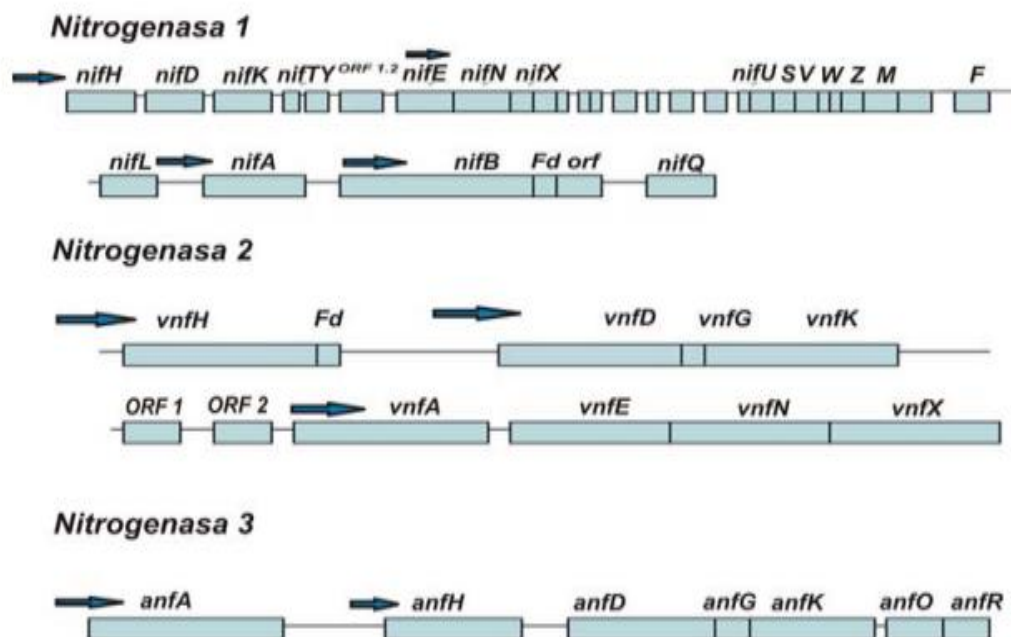


Fig. 1. Esquema de la organización de los genes involucrados en las síntesis de las nitrogenasas utilizadas por *A. vinelandii* en la fijación de nitrógeno. (Betancourt 2002).

1.2.5 Inoculantes microbianos

En los últimos años el efecto de la inoculación de microorganismos que estimulan el crecimiento de plantas ha sido de gran interés para la producción de bioinsumos (Sotelo et al. 2012).

La forma de inoculación de rizobacterias sobre las plantas es sencilla y versátil, ya que pueden ser aplicadas en la semilla, raíz o el suelo (Shen et al. 2013; Cordero-Ramírez et al., 2013; Zaidi et al., 2015). La respuesta de las plantas ante la inoculación varía de forma considerable y está en función de la especie de rizobacteria aplicada, el hospedero, tipo de suelo, condiciones ambientales, concentración del inóculo y modo de inoculación (Becerra-Castro et al 2011; Cabello-Conejo et al., 2014).

La inoculación de plantas utilizando RPCV es una técnica ampliamente utilizada comercialmente en la agricultura, pero variables como la formulación del inóculo y el método de inoculación no han tenido efectos confiables y consistentes en condiciones de campo (Malusá et al. 2012). El método de inoculación es un aspecto determinante en el proceso de colonización, actividad y permanencia de las células bacterianas en la rizósfera de las plantas, además de que influye de forma indirecta sobre los mecanismos de acción que promueven el crecimiento en las plantas (Krzyzanowska *et al.* 2012; He *et al.*, 2016). Para que la formulación del inóculo sea exitosa, este debe ser estable en un rango amplio de temperatura, humedad, salinidad, radiación UV, estrés hídrico, y pH (García et al. 2011).

Entre los métodos de inoculación de rizobacterias se ha usado la micro y macroencapsulación, que ha demostrado ser más eficientes que la inoculación en forma líquida, debido a su cualidad de proveer protección y estabilidad a las células bacterianas, permitiéndoles sobrevivir por más tiempo en la rizósfera de las plantas (Bashan et al., 2014; Schoebitz Belchí, 2016).

1.2.6 Suelos supresivos

Se conocen como suelos supresivos a aquellos suelos que impiden el establecimiento de patógenos o el desarrollo de enfermedades que afectan a diferentes cultivos (Herman 2011). Sus principales características bióticas son: alta tasa de actinomicetos y elevado potencial de metabolismo y cometabolismo de los agentes vivos que se encuentren en él.

Este tipo de suelos presentan microorganismos (Hongos, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y levaduras) que pueden estimular las defensas de las plantas o presentar una actividad antagonista contra diferentes fitopatógenos, y a su vez tener un efecto benéfico en las plantas (Whipps 2001).

Diversos mecanismos están implicados en la protección y estimulación del crecimiento de las plantas, entre los que se destaca la asociación benéfica de una planta con alguna RPCV. Esta asociación involucra mecanismos de acción directa y/o indirecta. Los mecanismos de acción directa incluyen la solubilización de P, solubilidad del Fe^{3+} mediante la producción de sideróforos poniendo este ion a disposición de la planta y producción de fitohormonas. Los mecanismos de acción indirecta se refieren a la supresión de Fe a los patógenos, producción de bacteriocinas o antibióticos e inducción de defensa en las plantas (ISR) (Rossi 2016).

La protección bacteriana contra los microorganismos fitopatógenos del suelo depende de dos hechos: la capacidad de colonización del agente de biocontrol y la producción de sideróforos o antibióticos que supriman el crecimiento de estos patógenos (Kloepper et al. 1988).

Se sabe que las interacciones microbio-microbio, son clave en el desarrollo y función de la rizósfera y que las poblaciones de microorganismos pueden interactuar de manera sinérgica, neutral o bien antagonista. Esta actividad microbiana que funciona por mecanismos de competencia por nutrientes o sitios de colonización se da de forma natural, sin embargo de esta forma no existe un control y los resultados son impredecibles (Rossi 2016).

El mecanismo principal de la interacción en el suelo entre la bacteria y la raíz consta de dos etapas. La primera de ellas cuando los microorganismos son agregados por inoculación en la superficie de las semillas, se pone en contacto con la radícula cuando esta emerge y acompañan a las raíces en su crecimiento. En la etapa siguiente los agentes biocontroladores ponen en funcionamiento los mecanismos necesarios para sobrevivir en el ecosistema en el cual ingresaron dependiendo de la habilidad que estos poseen para competir con la flora y la rizosfera natural (Holbrook et al. 1998).

1.2.7 Inmovilización celular

La inmovilización celular (IC) es un método que se caracteriza por restringir a las células a permanecer en un área delimitada ofreciendo una protección del estrés ambiental y que a su vez, les permite mantener actividades metabólicas, catabólicas y catalíticas (Mustapha et al. 2018). Esta técnica es ampliamente utilizada en procesos médicos e industriales. En los últimos años ha incrementado el interés por su uso en biorremediación, control biológico, aplicación de agroquímicos, etc.

Existen diferentes métodos para la realizar la inmovilización celular, entre los que se encuentran la agregación natural, el atrapamiento y la encapsulación, siendo este último el más utilizado (Fernández-López et al. 2017)

Los polímeros orgánicos son ampliamente utilizados para la encapsulación, debido a que se reticulan formando una matriz que temporalmente encapsula o inmoviliza microorganismos y después son liberados gradualmente durante la degradación del polímero (Malusá et al., 2012).

Diferentes materiales y soportes han sido evaluados para potenciar la eficiencia de las RPCV. L, las características principales que estos materiales deben tener son: nula toxicidad, estabilidad mecánica, eficiencia, practicidad, bajo costo y tener la capacidad de formar superficies porosas (Pradeep y Subbaiah 2016).

Entre los principales materiales de origen orgánico utilizados en esta técnica se encuentran la celulosa, agares, alginatos, k-carragenina, quitina, colágeno, carbón activado, esponja de *Loffa cylindrica*, biochar, fibras de restos vegetales y granos (Conde-Avila et al. 2020).

1.2.8 Alginato-Na

El Ca-alginato es un eficiente polímero natural (copolímero de los grupos D-ácido-manurónico y L - ácido gulurónico) no tóxico, utilizado ampliamente en la inmovilización de cultivos microbianos en sistemas *in vitro* (Kumar et al. 2017).

Entre sus propiedades físicas se encuentran: facilidad de formación de la cubierta para la encapsulación y capacidad de modificación de la matriz polimérica, además, bajo este sistema, los microorganismos se liberan lentamente por disolución del gel formado al estar en contacto con agentes quelantes de calcio como el citrato de sodio y fosfato de potasio (Mohammad et al. 2008).

1.2.9 Importancia del Tomate (*Lycopersicon sp.*) en México

El tomate o jitomate cuyo nombre científico es *Lycopersicon esculentum* es originario de Sudamérica y fue introducido por los españoles a Europa después del descubrimiento de América. En un principio, era utilizada como planta ornamental, pero a partir del siglo XIX comenzó a utilizarse como planta agrícola (Goodier 1999).

Es considerada la hortaliza de mayor valor económico con 5,02 millones de hectáreas plantadas en el mundo y una producción total reportada de 170,7 millones de toneladas de frutos cosechados al año (FAOSTAT 2014).

En términos de valor de la producción, el tomate es la hortaliza número uno en México. Es el segundo cultivo con mayor producción después del chile.

Tabla 2. Producción nacional de tomate

Año	Superficie Sembrada (Ha)	Superficie Cosechada (Ha)	Producción (T)	Rendimiento (T/Ha)	Valor producción (Millones de pesos)
2014	52,374.91	50,962.65	2,875,164.08	56.42	15,735,506.33
2015	50,595.56	49,703.32	3,098,329.41	62.34	20,639,978.73
2016	51,861.10	51,299.14	3,349,154.22	65.29	23,871,404.06
2017	50,373.33	50,222.83	3,469,707.28	69.08	25,483,434.73
2018	49,415.72	49,209.47	3,780,950.01	76.83	31,150,517.30

(SIAP, 2019).

México es el principal proveedor a nivel mundial de jitomate con una participación en el mercado internacional de 25.11% del valor de las exportaciones mundiales. En el periodo 2003-2016 hubo un incremento en la producción (54.25%) y en las exportaciones (77.87%) convirtiéndolo en uno de los cultivos con mayor productividad (SIAP, 2017).

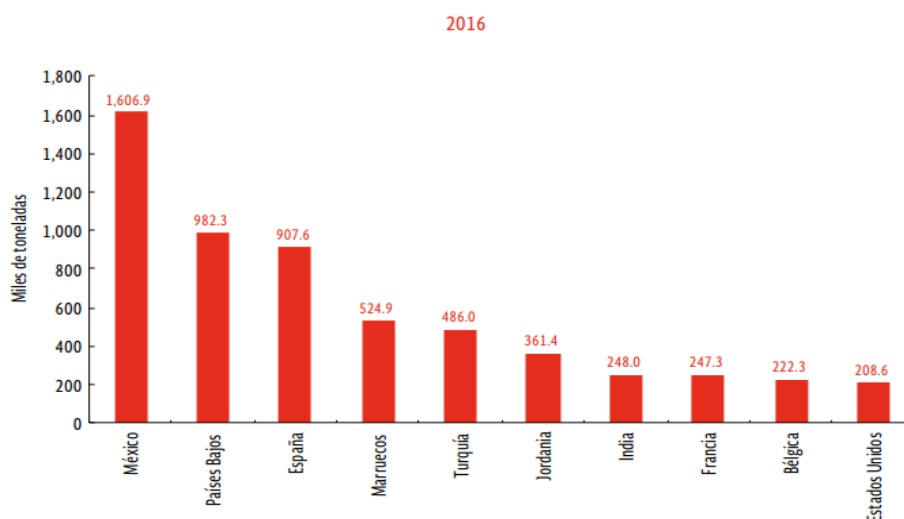


Figura 2. Principales países exportadores de tomate en 2016 (SIAP, 2017).

1.2.10 Valor nutricional

Es una de las hortalizas que contiene las vitaminas y minerales necesarias en la alimentación humana. Se encuentra constituido por minerales, carbohidratos, grasas, proteínas, vitaminas, licopeno, α y β caroteno, luteína, zeaxantina y β -crioxantina (Kumari et al. 2011).

Tabla 3. Valores nutricionales del tomate

Propiedades	Valores
Calorías	22
Agua	94 g
Carbohidratos	3.5 g
Grasas	0.11 g
Proteínas	1 g
Fibra	1.4 g
Vitamina B6	0.11 mg
Vitamina C	26 mg
Vitamina E	1.2 mg
Vitamina A	900 UI

(Pénelo, 2018).

1.2.11 Taxonomía y morfología

Taxonomía

Tabla 4. Taxonomía del tomate *Lycopersicum esculentum*

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanes
Familia	Solanaceae
Género	Solanum
Especie	<i>Solanum Lycopersicum</i> / <i>Lycopersicum esculentum</i>

(Jano, 2006)

Morfología

En cuanto a sus características morfológicas, el tomate es una planta perenne que se cultiva anualmente, puede desarrollarse de tres formas; erecta, rastrera o semirrecta. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas).

- Sistema radicular

El sistema radicular del tomate está constituido por raíz principal, raíces secundarias y raíces adventicias. La raíz puede llegar a medir 1.5 m (Molina et al. 2010).

- Tallo

El tallo presenta un grosor que va entre 2-4 cm en su base, sobre el que se desarrollan hojas, tallos secundarios e inflorescencias. Durante el primer periodo de su desarrollo se mantiene en posición erecta y posteriormente su peso lo hace recostarse en el suelo. Su ramificación es monopodial hasta la aparición de la primera inflorescencia que se convierte en simpodial.

Su estructura consta de epidermis, pelos glandulares, corteza o córtex, cilindro vascular y tejido medular (Molina et al. 2010).

Las variedades comerciales se clasifican de acuerdo a los hábitos de crecimiento en: de crecimiento determinado y de crecimiento indeterminado. Las de crecimiento determinado presentan inflorescencias junto con cada una o dos hojas y el ápice terminal se diferencia en un racimo floral. Los de crecimiento indeterminado presentan inflorescencias más espaciadas, un porte más alto y el brote terminal es vegetativo (Molina et al. 2010).

- Hojas

Las hojas embrionarias (cotiledones) son fusiformes agudas, siendo las primeras hojas simples y las posteriores compuestas, alternas pinnatisectas, imparipinnadas (7 ó 9 foliolos), con folios dentados o lobulados y con pelos glandulares (Molina et al. 2010).

- Flor

Se agrupan en racimos simples o ramificados, con pedúnculos cortos, está compuesto de cáliz con 5 o más sépalos y corola con 5 pétalos de color amarillo dispuestos helicoidalmente, presenta un igual número de estambres que alternados con los pétalos forman un cono estaminal que envuelve al gineceo. También presenta un ovario plurilocular (Molina et al. 2010).

- Fruto

Es una baya plurilocular (de 2 a 30 lóculos) de color rojo o amarillo, de forma globular, achatada o piriforme. Tiene un diámetro de 3 a 16 cm y puede alcanzar un peso que oscila entre unos pocos miligramos a 600 gramos. Se encuentra constituido por el pericarpio, tejido placentario y las semillas (Molina et al. 2010).

- Semilla

Presenta un color café claro recubierta por vellosidades, es reniforme aplastada y tiene de 3 a 5 milímetros de diámetro (Molina et al. 2010).

1.2.12 Fenología del cultivo de tomate

La fenología del cultivo comprende las etapas que forman su ciclo de vida. Según la etapa fenológica en la que se encuentre la planta varían sus demandas nutricionales, necesidades hídricas, susceptibilidad o resistencia a insectos y enfermedades. En el caso del tomate se observan 3 etapas durante su ciclo de vida: Inicial, vegetativa y reproductiva (Pérez et al. 2000).

- Etapa inicial

Empieza con la germinación de la semilla. Está caracterizada por el rápido aumento en la materia seca, la planta invierte su energía en la síntesis de nuevos tejidos de absorción y fotosíntesis.

- Etapa vegetativa

Comienza a partir de los 21 días posteriores a la germinación y tiene una duración de entre 25 a 30 días antes de la floración. En esta etapa se requiere de mayores cantidades de nutrientes para satisfacer las necesidades de las hojas y ramas en crecimiento y expansión.

- Etapa reproductiva

Esta etapa inicia a partir de la fructificación, tiene una duración de entre 30 a 40 días y se caracteriza porque la planta detiene su crecimiento y los frutos extraen los nutrientes necesarios para su crecimiento y maduración.

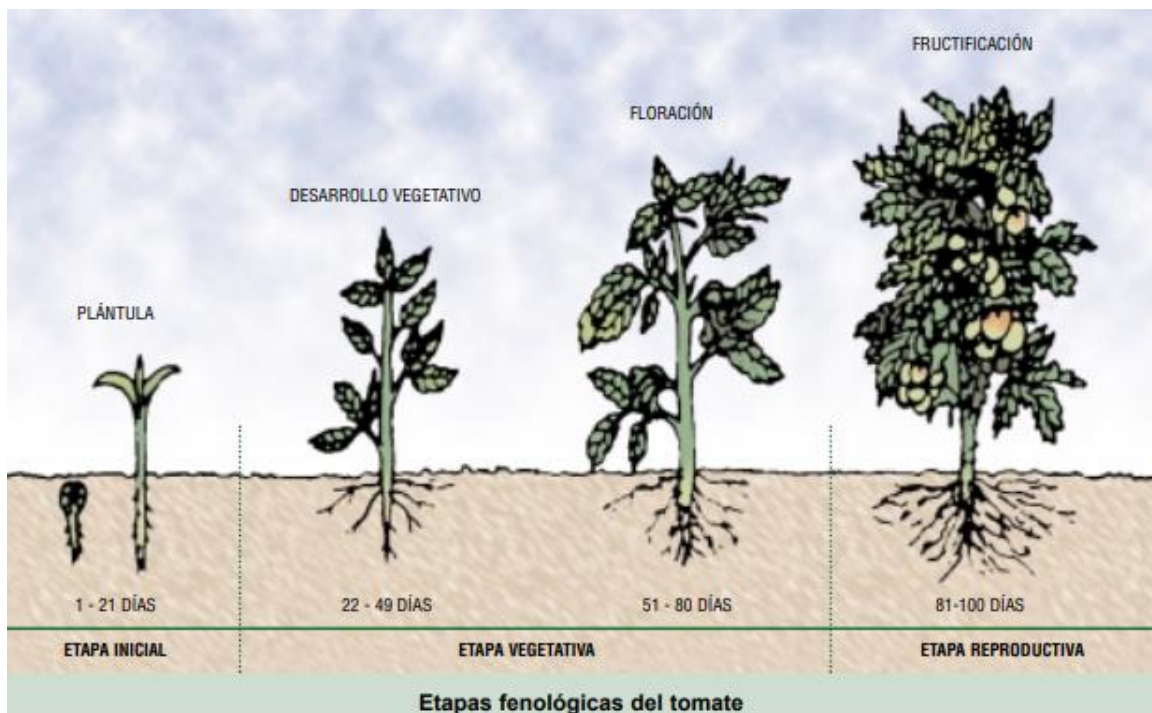


Figura 3. Representación de las etapas fenológicas del tomate (Inicial, vegetativa y reproductiva) (Pérez et al. 2000).

1.2.13 Requerimientos climáticos y edáficos

- **Clima**

El tomate es una especie de estación cálida razonablemente tolerante al calor y la sequía y sensible a las heladas. Aunque se produce en una gran variedad de condiciones climáticas y de suelo, prospera mejor en climas secos con temperaturas moderadas (Monardes 2009).

- **Temperatura**

La temperatura óptima para el desarrollo del cultivo oscila entre 20°C y 30°C durante el día y entre 10°C y 17°C durante la noche. Las temperaturas superiores a 30°C e inferiores a 12°C reducen la fructificación y afectan la fecundación de los óvulos (Díaz 2007).

- **Humedad relativa (HR)**

La Humedad relativa óptima para el cultivo de tomate debe ser entre 60 y 80%, debido a que se favorece el desarrollo normal de la polinización y se garantiza una buena producción (Infoagro Systems S.L. 2016). Valores superiores favorecen el desarrollo de enfermedades del follaje y el agrietamiento del fruto (Pérez et al. 2000).

- **Altitud**

El tomate puede ser cultivado desde los 20 a los 2000 msnm, esto depende de la capacidad de adaptación de cada variedad o híbrido (Pérez et al. 2000).

- **Luminosidad**

El tomate es un cultivo que requiere de una buena iluminación, por lo que la luminosidad reducida puede afectar negativamente los procesos de floración, fecundación y desarrollo vegetativo de la planta. Durante los periodos críticos del desarrollo vegetativo de la planta la interrelación entre la temperatura diurna, nocturna y la luminosidad es fundamental (Infoagro Systems S.L 2016).

- **Suelo**

El cultivo de tomate no es muy exigente en términos del suelo, por lo que puede producirse en una amplia gama de condiciones de suelo, aunque los mejores resultados se obtienen en suelos profundos (1m o más), de texturas medias, permeables y sin impedimentos físicos en su perfil. Suelos con temperaturas entre los 15°C y 25°C favorecen su óptimo establecimiento y crecimiento. El tomate tolera la acidez y crece mejor en pH de 5.0 a 6.8. Es tolerante a una salinidad con valores máximos de 6400 ppm (Infoagro Systems S.L. 2016).

1.2.14 Fundamentos PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente (Tamay et al. 2013).

Esta técnica permite la amplificación selectiva de cualquier segmento de ADN, conociendo las secuencias que lo flanquean, debido a esto es ampliamente utilizada en diferentes campos de investigación.

Debido a que esta técnica permite una determinación y cuantificación de material genético de bacterias, hongos, etc. es utilizada para realizar un seguimiento y saber que sucede con estos después de ser aplicados.

Los elementos importantes para realizar la técnica son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima (Taq ADN polimerasa), los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y agua libre de nucleasas. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión (Tamay et al. 2013).

Desnaturalización: Es la etapa en la que las cadenas de ADN son calentadas y separadas, esto generalmente ocurre a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos.

Hibridación: En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado que ya ha sido separado e hibridan con su secuencia complementaria, para que esto ocurra es necesario que la temperatura de hibridación (T_m) sea la óptima y generalmente oscila entre 50-60 °C.

Extensión: En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. Al final del ciclo de habrán formado los amplicones.

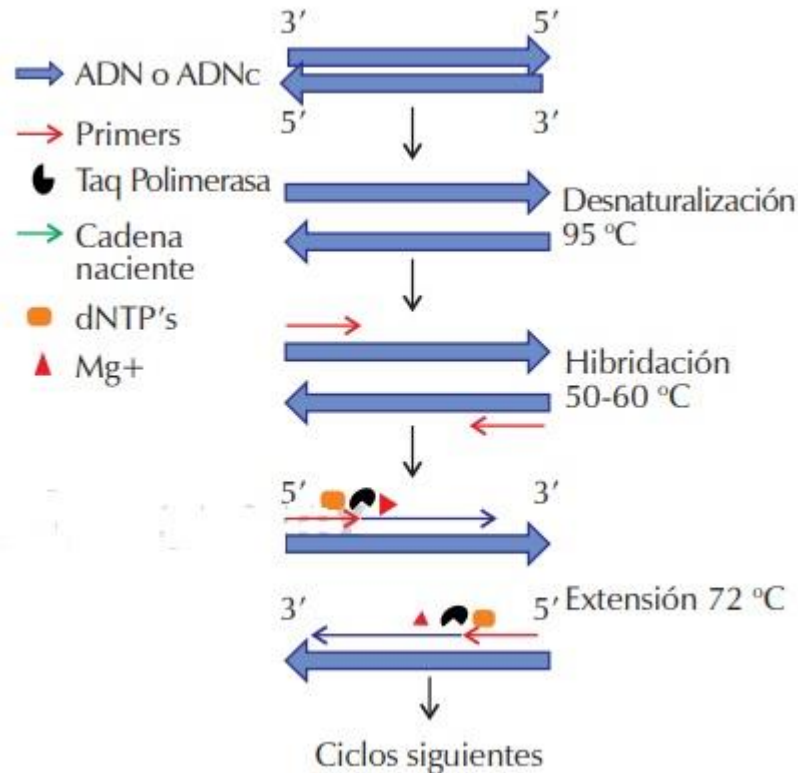


Figura 4. Etapas en un ciclo de PCR. (Temay et al. 2013).

Esta reacción sucede en los equipos conocidos como termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos.

Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa.

1.2.15 Electroforesis

La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Como los ácidos nucleicos tienen carga negativa proporcionada por el grupo fosfato, durante la electroforesis migran hacia el polo positivo (Lee et al. 2012).

Los elementos necesarios para realizar esta técnica son agarosa, un buffer que puede ser TAE o TBE, un marcador de peso molecular y bromuro de etidio.

Cuando los amplicones son corridos en el gel es necesario que estos sean cargados con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado. El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón. El bromuro de etidio es una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena que cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas (Lee et al. 2012).

1.2.16 PCR tiempo real

El objetivo de la PCR en tiempo real, también conocida como q-PCR (quantitative PCR) es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de fluorescencias. Se basa en el mismo principio que la PCR punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente (Higuchi, 1993).

Se le llama en tiempo real a esta técnica ya que permite medir la cantidad de ADN sintetizado en cada ciclo de amplificaciones, además a diferencia de la PCR punto final esta técnica permite cuantificar la cantidad de ADN en la muestra (Bustin et al, 2005).

Posee características importantes como alta especificidad, amplio rango de detección (de 1 a 10⁷ equivalentes genómicos de la secuencia blanco) (Brechtbuehl et al. 2001) y rapidez en la visualización del producto ya que no es necesario realizar una electroforesis posterior.

Los ingredientes necesarios para la PCR en tiempo real, son los mismos utilizados en la PCR punto final, sólo que generalmente la enzima, dNTP's, Mg⁺, el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados vienen juntos en una solución conocida como Master mix (Bustin et al, 2005).

Los equipos utilizados en la q-PCR están conformados por un termociclador y un detector de luz que capta la fluorescencia emitida en cada uno de los tubos utilizados durante la reacción de amplificación (Costa, 2004).

El termociclador del equipo debe ser capaz de mantener una temperatura uniforme para todas las muestras y ser lo suficientemente rápido en la transición de temperaturas de una etapa a otra (desnaturalización del ADN molde, alineamiento de los oligonucleótidos y síntesis). El sistema fluorométrico consiste en una fuente de energía para excitar a los fluoróforos (a una determinada longitud de onda de excitación) y un sistema de detección, que permita monitorear la señal emitida (a una longitud de onda de emisión).

Los fluoróforos utilizados para seguir la amplificación del ADN durante la PCR en tiempo real pueden ser de dos tipos: a) fluoróforos con afinidad por el ADN y b) sondas específicas para fragmentos del ADN.

Fluoróforos con afinidad por el ADN: Estos fluoróforos emiten fluorescencia cuando se unen al ADN. La intensidad de la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentración del ADN de doble cadena. El compuesto más utilizado es SYBR Green, el cual se une al surco menor del ADN de doble cadena. Mientras más ADN de doble cadena haya en el tubo de reacción, mayores serán la unión y la señal de fluorescencia del SYBR Green. Este sistema es muy económico y permite el empleo de un solo fluoróforo en diferentes ensayos. Sin embargo, presenta varias desventajas, ya que no es posible hacer reacciones múltiples (en donde se amplifican varios genes en la misma reacción), además de que la señal emitida no es específica, porque el fluoróforo se une a cualquier amplicón del ADN.

Sondas específicas: Los sistemas de detección específicos para una secuencia de interés se pueden dividir en tres tipos: a) sondas de hidrólisis, b) sondas de hibridación y c) sondas de horquilla. Todas se basan en el principio FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer por sus siglas en inglés), que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un donador (reportero) y un aceptor (apagador o quencher), los cuales emiten fluorescencia a diferente longitud de onda. Cuando el

reportero y el apagador se encuentran próximos, el apagador absorbe toda la fluorescencia del reportero. Cuando este par de moléculas se separa, la fluorescencia del reportero no puede ser absorbida por el apagador y en consecuencia puede ser detectada por el fotodetector (revisado en Valasek y Repa 2005, Kubista et al. 2006).

1.3 JUSTIFICACIÓN

La encapsulación es una técnica que proporciona a las bacterias un microentorno y protección física manteniendo así su viabilidad para variadas aplicaciones.

Sin embargo, como tecnología de inoculación agrícola, la encapsulación es generalmente experimental, y aunque ha incrementado el interés por su aplicación, son escasas las investigaciones en las que se evalué su efecto como alternativa a los métodos de inoculación tradicionales de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en suelo.

1.4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de *Azotobacater vinelandii* encapsulada en alginato-Na como inoculante de plántulas de tomate (*Lycopersicum* sp.) mediante q-PCR y variables morfológicas vegetales

1.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia de *A. vinelandii* encapsulada en alginato-Na en raíces y suelo.
- Medir variables agronómicas de plántulas de tomate inoculadas con *A. vinelandii* encapsulada en alginato-Na.

1.6 HIPÓTESIS

La inoculación con *A. vinelandii* encapsulada en alginato-Na favorece la permanencia de la bacteria en suelo y el desarrollo de plántulas de tomate.

Encapsulación de *Azotobacter vinelandii* en perlas de alginato-Na como inoculante de plántulas de tomate

Martha Elba Sánchez-Rodríguez, Luis Daniel Ortega Martínez¹, Elie Girgis el Kassis¹, Octavio Loera², Beatriz Pérez-Armendáriz¹, **Victoria Conde-Avila¹**

¹Facultad de Biotecnología, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, México. 13 Poniente No. 1927 Col. Barrio de Santiago, C.P.72410, Puebla, Pue. México. ²Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra Secc. 09340 Ciudad de México, CDMX. victoria.conde@upaep.mx

Resumen

La inmovilización es un método caracterizado por restringir a las células a un área delimitada conservando su viabilidad metabólica. Dicha técnica y sus métodos representan una alternativa para mejorar la capacidad de adaptación de las bacterias frente a la exclusión competitiva por microorganismos autóctonos, así como de interacciones y factores ambientales que limitan su bioaumentación. Especies del género *Azotobacter* son de interés debido a su eficiencia como rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV). Sin embargo, su inoculación en suelo puede presentar dificultades relacionadas con su sobrevivencia y efectividad a largo plazo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *Azotobacter vinelandii* encapsulada en perlas de alginato-Na como inoculante de plántulas de tomate (*Solanum Lycopersicum* L). La inoculación con *A. vinelandii* en forma libre y encapsulada favoreció indistintamente el crecimiento de las plántulas. Por su lado, al usar el inóculo encapsulado aumentó el porcentaje de germinación, el diámetro del tallo y longitud de raíces en comparación con el inóculo líquido, así como la concentración de NO₃ y Na. La encapsulación de *A. vinelandii* restringe espacialmente su distribución en el suelo, pero no limita su establecimiento en la rizósfera inmediatamente después de la inoculación. Sin embargo, la viabilidad de la bacteria se vio limitada después de 30 d independientemente del método de inoculación.

Palabras clave: alginato, inmovilización, RPCV

1. Introducción

La inoculación de plantas con bacterias y simbiontes para mejorar el rendimiento de los cultivos es una tecnología que se ha llevado a cabo durante décadas (Bashan et al., 2014). Las especies de *Azotobacter* pertenecen al grupo las rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas (RPCV) (Chennappa et al., 2018). El género *Azotobacter* tiene la capacidad de producir diferentes tipos de sustancias como metabolitos secundarios, tales como aminoácidos, fitohormonas, antibióticos, antifúngicos y sideróforos (Vejan et al., 2016). Recientemente, se ha reportado que degradan diferentes tipos de plaguicidas y compuestos fenólicos (Chennappa et al., 2019).

Azotobacter vinelandii, es una bacteria gram negativa que destaca por su eficiencia en la fijación asimbiótica de nitrógeno (N), producción de sustancias promotoras de crecimiento y de control biológico, así como por la generación de metabolitos de interés industrial (Gurikar et al., 2016). *A. vinelandii* produce vitaminas del grupo B (niacina, rivo flavina y biotina) y aminoácidos (ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, arginina, prolina, etc.) que son claves en procesos celulares del metabolismo de grasas, carbohidratos y proteínas (Revillas et al., 2000). Han reportado que produce auxinas como el ácido acético de indol (AIA), responsable de la división, diferenciación y crecimiento de células vegetales (Reshma et al., 2018), así como fitorreguladores de crecimiento de acción hormonal como de ácido giberélico (AG) (Upadhyay et al., 2009). Excreta también, compuestos antifúngicos (azotobacin, azotochelin, aminoquelin, protochelin y 2,3-dihidroxiacidobenzoico) (Nagaraja et al., 2016) y sustancias volátiles como el cianuro de hidrógeno (HCN) que inhibien el crecimiento de microorganismos fitopatógenos como hongos de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* (Chennappa et al., 2018).

Por otro lado, pese a sus potenciales efectos benéficos, la incorporación de *A. vinelandii* en el suelo puede presentar dificultades relacionadas con su sobrevivencia, colonización y efectividad en el suelo a largo plazo (Mrozik y Piotrowska-Saget 2010).

En general, poco después de que las suspensiones de bacterias se inoculan en el suelo sin un portador adecuado, la población disminuye rápidamente para la mayoría de las especies de RPVC (Bashan et al., 2014). Este fenómeno, combinado con la escasa producción de biomasa bacteriana, la dificultad para mantener sus actividades metabólicas ante el estrés abiótico y el estado fisiológico en el momento de la aplicación, pueden limitar su estabilizamiento en la rizosfera. Estas bacterias inoculadas, deben competir con el microbioma nativo, a menudo mejor adaptado, y soportar la depredación por la microfauna del suelo. Es por ello que algunos autores no recomiendan la inoculación de RPCV en forma de diluciones celulares líquidas en suelo (Nakkeeran et al., 2005). En consecuencia, una función importante a considerar en la formulación de inoculantes es proporcionar un microentorno más adecuado, combinado con

protección física durante un período prolongado para prevenir una rápida disminución de la viabilidad de dichos microorganismos (Bashan et al., 2002).

En este sentido, la inmovilización celular es una técnica que se emplea con el propósito de favorecer el establecimiento y colonización de microorganismos benéficos, ya que puede brindarles mayor viabilidad, tolerancia y protección a factores externos (Yañez-Ocampo et al., 2009). La encapsulación microbiana, el más común de los métodos de inmovilización, es caracterizada por atrapar microorganismos vivos en una matriz polimérica y mantener su viabilidad (Mustapha et al., 2018). Con este propósito, ha surgido interés en el empleo de diferentes materiales y técnicas con la finalidad de incrementar la productividad y viabilidad de células, así como mantener su actividad metabólica por periodos prolongados de tiempo (Jeshitha et al. 2015). El uso de esta tecnología debe proporcionar de forma deseable, condiciones apropiadas y prolongadas para el desarrollo celular, nula toxicidad o potencial contaminante, así como propiedades constantes para ser usados en agua y suelos (Covarrubias et al., 2012).

La encapsulación en matrices poliméricas es generalmente experimental en el campo de la tecnología de inoculación de bacterias con fines agrícolas y ambientales (Vejan et al., 2016). No obstante, cuando se emplea la inmovilización microbiana en los procesos de bioaumentación e inoculación, comúnmente se logran mayores rendimientos y porcentajes de colonización al incorporarlos bajo la protección de la encapsulación, surgiendo como una alternativa tecnológica con potenciales aplicaciones (Nagaraja et al., 2016).

Las investigaciones que se han enfocado en la búsqueda de alternativas para la optimización de tecnologías de inoculación bacteriana empleando alguna técnica de inmovilización son escasas. Se usan principalmente dos tipos de procesos, los basados en retención física (como el atrapamiento en matrices porosas o encapsulación en membranas) y aquellos en los que se emplea un enlace químico (p.e. la formación de biopelículas). La inmovilización puede llevarse a cabo empleando materiales inorgánicos naturales, polímeros naturales o materiales sintéticos. Si bien la mayoría de estos inoculantes se utilizan a pequeña escala para la producción de cultivos, la mayoría los inoculantes poliméricos se emplean de modo experimental. Para usos agrícolas y ambientales, estos polímeros incluyen materiales como el alginato, agar, λ y κ carragenina, pectina, quitosano, goma de frijol y polímeros patentados. Entre ellos, el alginato es el material de elección para la mayoría de las encapsulaciones de microorganismos (Talwar y Ninnekar 2015). Las ventajas de las formulaciones de alginato son su naturaleza no tóxica, biodegradabilidad,

asequibilidad y liberación lenta de los microorganismos atrapados controlada por la estructura polimérica (Kadacol, Kamanavalli y Shouche 2011).

Al respecto, las perlas de alginato (1–4 mm de diámetro) se han usado para encapsular RPCV y hongos micorrízicos. *Streptomyces* sp. fue atrapado en un portador de alginato-caolín (silicato de aluminio) y se sometió a liofilización. Este inoculante se formuló como un polvo seco o humectable mediante la adición de almidón, talco y caolín para mejorar la supervivencia de *Streptomyces* sp. Las pruebas de estas formulaciones mostraron grandes variaciones en la eficacia del control biológico del patógeno fúngico *Rhizoctonia* en tomate (Sabaratnam y Traquair 2002).

La encapsulación de RPCV *Bacillus subtilis* en perlas de alginato enriquecidas con ácido húmico produjo una alta viabilidad con una pérdida celular mínima por 5 meses; y a diferente pH, dicha formulación produjo una liberación celular constante de la bacteria y mostró resultados exitosos en la inoculación de lechugas (Young et al. 2006).

Cuando se inoculó *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* en plantas de trigo en bolsas para su desarrollo en una cámara de crecimiento, ambas especies colonizaron y produjeron efectos de crecimiento iguales a los de cepas libres (Bashan y González 1999). Por otro lado, Vassilev et al. (2001) demostraron que la inoculación con un hongo (*Glomus deserticola*) y una levadura solubilizante de fósforo (P) (*Yarrowia lipolytica*) atrapada en alginato puede ser una técnica eficaz para el establecimiento y crecimiento de plantas de tomate en suelos deficientes de nutrientes. Del mismo modo, Krell et al. (2017) han sugerido que la inmovilización en alginato aumenta el endofitismo y tolerancia a contaminantes.

No obstante, una limitante del uso de dicha tecnología de inoculación ha sido la heterogeneidad del suelo, la supervivencia en condiciones de confinamiento, su interacción con los materiales de soporte o atrapamiento y la estabilidad mecánica de los materiales empleados en la inmovilización. Además son limitadas las investigaciones en las que se evalúe la viabilidad de las RPVC en experimentos *in situ* empleando técnicas moleculares para el monitoreo de la viabilidad de los microorganismos inoculados. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *A. vinelandii* encapsulada en perlas de alginato-Na como inoculante de plántulas de tomate (*Solanum Lycopersicum* L) en suelo.

2. Materiales y métodos

2.1 Cepa de estudio

La cepa *A. vinelandii* CDBB-1952 fue obtenida de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigación de Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN), México. Para su

propagación fue cultivada en medio NBRC (composición en $\text{gr}\cdot\text{L}^{-1}$: extracto de levadura, 1; D-manitol, 5; K_2HPO_4 , 0.7; KH_2PO_4 , 0.1; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1; pH 7 ± 0.05). Se inocularon matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo NBRC y se cultivaron a 28°C por 72h a 120 rpm para obtener la máxima población bacteriana. Posteriormente, la biomasa se recolectó mediante centrifugación a $1000 \times g$ durante 20 minutos y luego se descartó el sobrenadante. La biomasa recuperada se mezcló con solución salina (0.09%) para la inoculación de cultivos sucesivos. La cepa se sometió a criopreservación a -80°C empleando una solución con glicerol al 4% para posteriores cultivos y preparación de inóculo.

2.2 Encapsulación en alginato-Na

Para la encapsulación de *A. vinelandii* en perlas de alginato-Na, la biomasa obtenida después de la preparación del inóculo se mezcló en una solución estéril de alginato-Na a una concentración final del 2% (p/v) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h (Yañez-Ocampo et al., 2009). Se añadió por goteo una alícuota de la suspensión de alginato-*A. vinelandii* a una solución estéril de cloruro de calcio (CaCl_2) al 0.1 M con agitación constante (Fig.1), de la que se formaron en promedio 20 perlas/ml con 3-5 mm de diámetro.

2.3 Localización y condiciones del experimento

El experimento se realizó en el Centro de Innovación Tecnológica en Agricultura Protegida situado a una latitud de $20^\circ 50'$, al sur $17^\circ 52'$ de latitud norte; al este $96^\circ 43'$, al oeste $99^\circ 04'$ de longitud oeste. Se dispuso de bandejas de polietileno especiales para producción de plántulas con 50 cavidades ($2.5 \times 2.5 \times 7\text{cm}$), las cuales se desinfectaron por 24 h con una solución de Cl al 5% y posteriormente fueron lavadas con agua y llenadas con el sustrato. El sustrato empleado fue una mezcla comercial de turba holandesa (Sunshine® sun gro Horticulture Inc.), agrolita y vermiculita en una proporción de 3,2,1.

2.4 Preparación del inóculo

Se prepararon dos tratamientos de inoculación, el primero en solución líquida empleando medio de cultivo NBRC con *A. vinelandii* y el segundo por encapsulación en alginato-Na como se describió anteriormente. Para ambos tratamientos se cultivó *A. vinelandii* hasta alcanzar una densidad celular de 1.61×10^9 UFC/mL. La densidad del inóculo se estimó preparando una dilución seriada de base 10 en solución salina colocando 20 μl sobre placas de agar NBRC por triplicado, incubadas durante 24 horas a 28°C , y luego contando las unidades formadoras de colonias (UFC) desarrolladas en las placas.

Para la inoculación del sustrato se aplicaron 2 mL de inóculo de *A. vinelandii* en solución y encapsulada en perlas de alginato-Na por plántula con diez repeticiones por tratamiento. Se añadió un tratamiento testigo sin inóculo al que se le aplicó solo agua destilada. Al finalizar se adicionó un riego hasta alcanzar la capacidad de campo del sustrato.

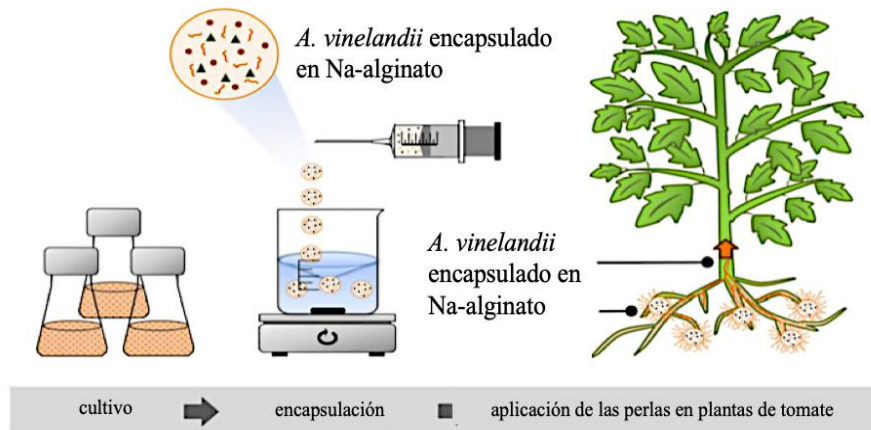


Fig. 1. Representación de la encapsulación e inoculación de *A. vinelandii* modif. (Krell et al. 2018).

2.5 Siembra

Posterior a la inoculación con los tratamientos correspondientes, las semillas de tomate (*S. Lycopersicum* L.) variedad Sun 7705 fueron sembradas a 5 mm de profundidad colocando una semilla por cavidad en los semilleros con 10 repeticiones por tratamiento. Finalmente se aplicaron riegos cada 24h por aspersion en forma manual (10 ml por cavidad).

2.6 Determinación de los parámetros morfológicos vegetales

Para la determinación de los parámetros morfológicos se tomaron mediciones independientes de 10 plántulas por tratamiento. Para determinar el porcentaje de germinación se evaluó la aparición de la radícula a los 3 y 4 días después de la siembra (dds) como indicador. La emergencia de las plántulas se evaluó desde el día 4 hasta los 15 dds, para ello, se cuantificó diariamente el número de plántulas cuyos cotiledones fueron vistos atravesando la superficie del sustrato. A a los 30 dds se evaluó la altura de la plántula, raíces y diámetro del tallo utilizando una cinta metálica milimetrada (con error de lectura de 0.05cm). Los puntos de referencia para la altura fueron la base del tallo y la yema apical a partir de la base del tallo a la cofia. Las mediciones del diámetro del tallo se realizaron a 5 cm de su base con un vernier (6"/150mm®).

2.6 Extracción de ADN y PCR en tiempo real para la detección de *A. vinelandii*

La extracción de ADN se realizó en tres momentos, a los 7, 14 y 30 días después de la inoculación empleando el kit Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymoresearch®) de muestras de suelo y de raíces según fuera el caso de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Para la amplificación por PCR se uso una mezcla de reacción que contenía 12.5 µL de la mezcla de polimerasa SYBR® Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo Scientific™), 2.5 µL de la mezcla de los cebadores N205 directo y reverso (10µM) (Ehaliotis et al., 1999), 1 µL de ADN genómico extraído de muestras de suelo o raíz y 9 µL de agua Milli-Q® para obtener un volumen final de reacción de 25 µL. Se incluyó un blanco con agua Milli-Q® estéril filtrada y todas las muestras fueron analizadas por duplicado. La reacción se llevo a cabo en un termociclador Rotor-Gene® Q Series 6000 software 2.3.1 (QIAGEN®). El programa de ciclado fue el siguiente: desnaturalización inicial por 5 min a 95°C, 45 ciclos de desnaturalización por 10s a 95°C, hibridación y extensión por 10s a 60°C. Para verificar la especificidad de los amplicones, se generó una curva de disociación aplicando un gradiente de temperatura creciente de de 55°C a 99°C. El producto de PCR amplificado se analizó por similitud de las curvas de disociación y cuantificó por espectrofotometría en un equipo NanoDrop 2000® (Thermo Scientific™) (Ehaliotis et al., 1999).

2.7 Diseño y análisis estadístico

Se empleo un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento. Todos los datos obtenidos se examinaron para determinar la normalidad y la homogeneidad de la varianza utilizando la prueba de Anderson-Darling y Levene respectivamente. Para el análisis estadístico se aplicó un ANOVA de una vía y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey con el programa estadístico Minitab® 18. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los datos se presentan como valores medios \pm desviaciones estándar.

3. Resultados

3.1 PCR en tiempo real

El resultado de la PCR en tiempo real se visualizó mediante el gráfico de amplificación. Como se puede observar en las Figs. 2a, 3a y 4a, mientras ocurre la amplificación, la fluorescencia emitida por el colorante SYBR® Green es medida en cada ciclo y resulta proporcional a la acumulación de producto de PCR (ADN doble hebra). Las curvas de amplificación presentaron el perfil sigmoideo tanto para el control positivo de *A. vinelandii* como las muestras que procedían de la extracción en suelo (Fig. 2a), con sus tres

fases características: inicial, exponencial y no exponencial o meseta. Una de las desventajas del colorante empleado es que no discrimina entre productos de PCR específicos y no específicos, ya que se une a todo ADN de doble hebra. Por este motivo fue necesario proseguir con el análisis de las curvas de disociación para verificar la especificidad de los amplicones. Del análisis se desprende una gráfica que muestra la cinética de disociación de los fragmentos amplificados en los distintos momentos del muestreo (Figs. 2b, 3b y 4b). En la Fig. 2b se puede observar un único pico de disociación, estrecho y definido que corresponde a *A. vinelandii* control procedente del cultivo empleado como inóculo, y uno para cada muestra extraída del suelo después de la inoculación con *A. vinelandii* líquido y encapsulado en perlas de alginato-Na, indicando la especificidad de la reacción que corresponde con la temperatura de disociación (T_m) de los productos de PCR esperada (Ehaliotis et al., 1999). Las curvas de disociación del control positivo y las muestras de la extracción en suelo de *A. vinelandii* presentaron un pico entre 89°C y 91 °C.

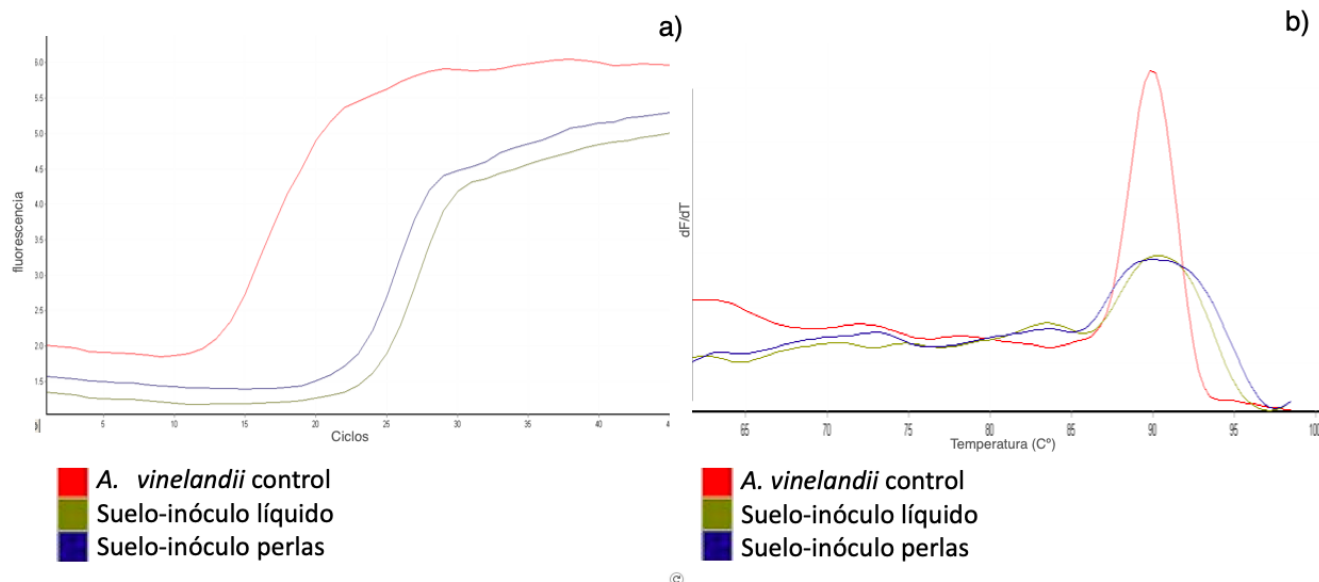


Fig. 2. a) Curvas de amplificación de muestras de suelo tras 7 d de haber sido inoculadas. En el eje Y se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje X los ciclos de la reacción. b) Curvas de disociación de muestras con *A. vinelandii* en cultivo axénico (control) y de suelo inoculado con *A. vinelandii* en suspensión en medio líquido y encapsulado en perlas de alginato-Na. En el eje Y se refleja el cambio en la fluorescencia sobre el cambio en la temperatura ($-dF/dT$) y en el eje X la temperatura en °C.

a)

b)

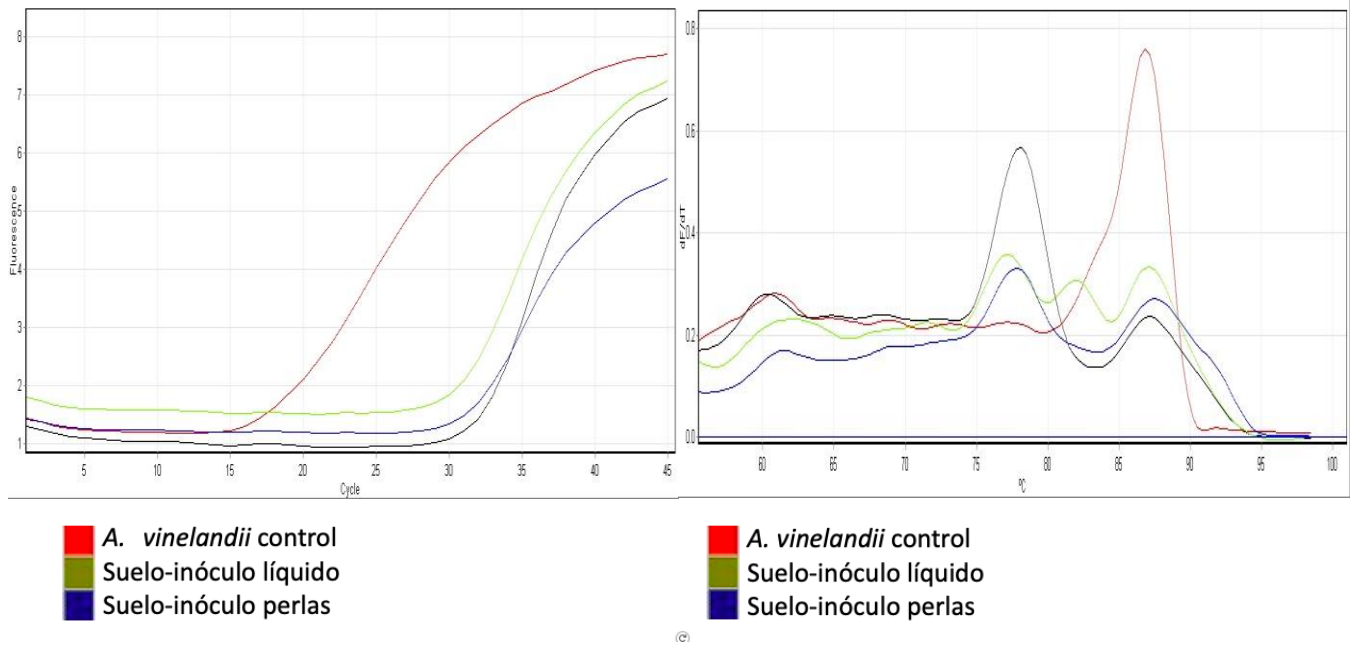


Fig. 3 a) Curvas de amplificación de muestras de suelo tras 14 d de haber sido inoculadas. En el eje Y se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje X los ciclos de la reacción. b) Curvas de disociación de muestras con *A. vinelandii* en cultivo axénico (control) y de suelo inoculado con *A. vinelandii* en suspensión en medio líquido y encapsulado en perlas de alginato-Na. En el eje Y se refleja el cambio en la fluorescencia sobre el cambio en la temperatura ($-dF/dT$) y en el eje X la temperatura en $^{\circ}C$.

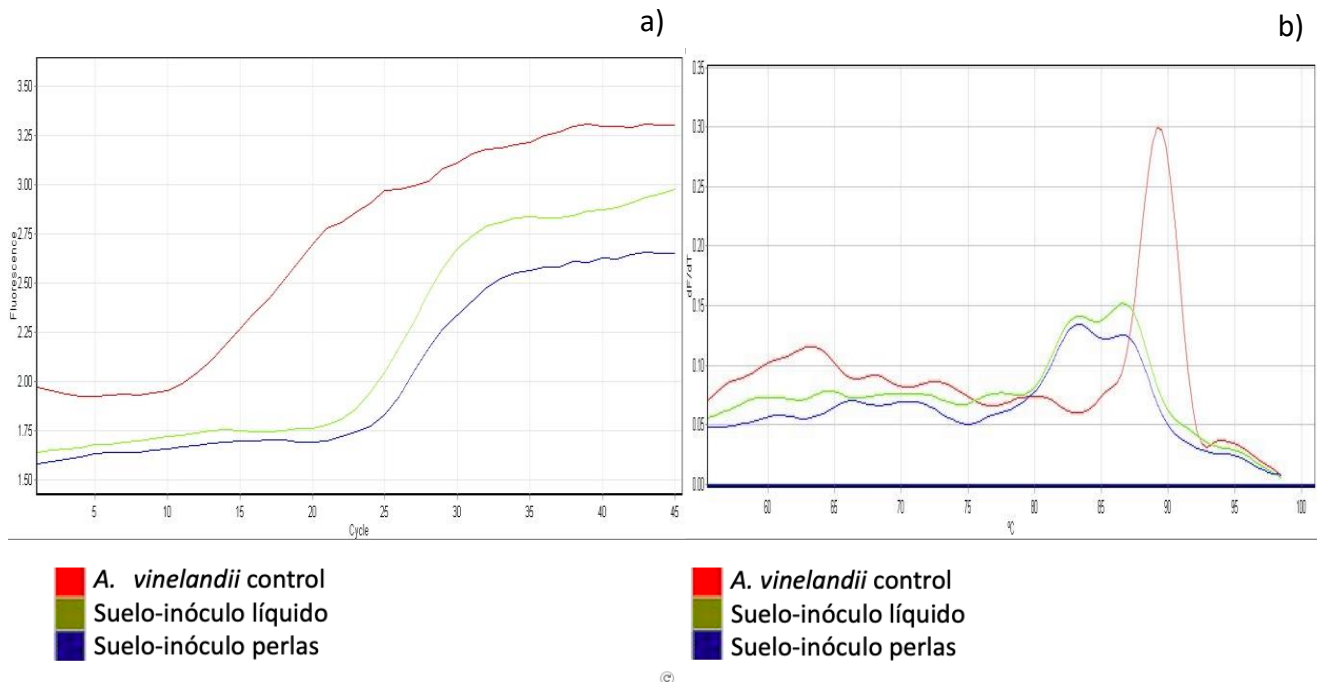


Fig. 4 a) Curvas de amplificación de muestras de suelo tras 30d de haber sido inoculadas. En el eje Y se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje X los ciclos de la reacción. b) Curvas de disociación de muestras con *A. vinelandii* en cultivo axénico (control) y de suelo inoculado con *A. vinelandii* en suspensión en medio líquido y encapsulado en perlas de alginato-Na. En el eje Y se refleja el cambio en la fluorescencia sobre el cambio en la temperatura ($-dF/dT$) y en el eje X la temperatura en $^{\circ}C$.

3.2 Cuantificación de ADN de *A. vinelandii*

Se detectó y cuantificó el ADN de *A. vinelandii* en muestras de suelo y de raíz inoculadas en forma de suspensión en medio líquido y encapsulada en alginato-NA, no obstante, en las muestras de suelo se obtuvo una mayor cantidad de ADN genómico al emplear el inóculo líquido (45.4 NG/ μ l), mientras en las raíces no hubo diferencias en la cantidad de ADN (54.7 y 47.9 NG/ μ l) en el muestreo a los 7 d de la inoculación con *A. vinelandii* libre y encapsulada (Tabla 1) .

Tabla 1. Cuantificación de ADN de *A. vinelandii* en raíces y suelo inoculado en forma líquida y encapsulado en perlas de alginato-Na.

Extracción	Testigo sin inóculo	ADN (NG/ μ l)		<i>p</i>
		Inóculo líquido	Inóculo perlas alginato-Na	
raíz	-	54.7^a (11.9)	47.9^a (5.6)	0.37
suelo	-	45.4^a (6.7)	23.6^b (4.7)	0.05

Se presenta la media en negritas y entre paréntesis la desviación estándar de cuatro repeticiones independientes seleccionadas aleatoriamente. Las medias con la misma letra entre columnas de una misma fila no presentan diferencias estadísticas significativas.

3.3 Parámetros morfológicos vegetales

En cuanto al porcentaje de germinación de las semillas de tomate, éste incrementó en un 20% al usar el inóculo encapsulado con respecto al tratamiento sin *A. vinelandii* y 10% con respecto al inóculo líquido. Por otro lado, la altura de las plántulas fue mayor en los tratamientos con *A. vinelandii* con inóculo líquido (27cm) y encapsulado en perlas de alginato-Na (26.67 cm) en comparación al tratamiento sin inóculo (19.87 cm). De igual modo, se obtuvo mayor diámetro del tallo, así como de la concentración de NO₃ y Na. En el resto de las variables no se presentaron diferencias significativas (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de germinación y variables morfológicas de plántulas de tomate inoculadas con *A. vinelandii*

Se presenta la media en negritas \pm desviación estándar. Letras distintas en las mismas columnas indican diferencias estadísticas significativas, según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

4. Discusión

Los dos aspectos principales que dominan el éxito de la inoculación son la efectividad del aislado bacteriano y la tecnología de aplicación adecuada. Se sabe que las RPCV producen diferentes tipos de metabolitos secundarios en condiciones óptimas de desarrollo. Estas sustancias tienen una influencia directa en el crecimiento general de las plantas de varios cultivos agrícolas lo cual explica su efectividad como inoculantes (Chennappa et al., 2018; Myresiotis et al., 2012; Ahmad et al. 2005). En este sentido, nuestros resultados son similares con lo reportado para el cultivo de tomate donde se han presentado

Tratamientos	Germinación	Diámetro del tallo	Altura	Raíz	NO ₃ ⁻	K	Na	Ca
	%	mm	cm			ppm		
Testigo sin inóculo	70^c	21.1^c \pm 1.1	19.8^b \pm 1.1	10.4^c \pm 0.82	816.8^b \pm 46	114.6^a \pm 4	124^b \pm 10	4075.6^a \pm 65
Inóculo líquido	80^b	2.82^b \pm 1.1	27^a \pm 3.0	13.8^b \pm 0.57	985^b \pm 11	122.6^a \pm 12	129.8^b \pm 11	4136^a \pm 54
Inóculo perlas alginato-Na	90^a	2.91^a \pm 1.1	26.6^a \pm 3.4	17.6^a \pm 1.1	1153^a \pm 45	126.2^a \pm 11	161.8^a \pm 5	4144.4^a \pm 11

efectos positivos al inocular bacterias y hongos bajo diferentes formas de inoculación e inmovilización.

Ayala et al. (2014) encontraron que las semillas que germinan en menor tiempo son más homogéneas y vigorosas, por lo que sugieren que una germinación lenta produce plántulas heterogéneas, pequeñas y menos vigorosas, en este sentido, nuestros resultados son similares a los mostrados por Delgado et al. (2003) quienes concluyeron que las cepas 28 (*Azotobacter paspali*) aceleraron el porcentaje de germinación entre el 61,7 y el 55 % en los primeros 50 días en *Coffea arabica* L. Por su parte, Marquina et al., (2018) mencionan que, en plantas de pimentón var. Cacique Gigante, la inoculación con aislados rizosféricos aumentaron el porcentaje de germinación de las semillas, con incrementos de hasta 23 %. Además, indujeron plántulas más homogéneas y vigorosas. Algunos autores atribuyen este efecto a la producción de ácido giberélico producido por bacterias del género *Azotobacter* (Upadhyay et al., 2009).

Además se obtuvo mayor crecimiento vegetativo y morfología de la planta similares a los obtenidos Escobar., et al (2017), quienes indican que cuatro cepas nativas de *Azotobacter* spp, productoras

de ácido indolacético, fijadoras de N y solubilizadoras de roca fosfórica influenciaron positivamente en el desarrollo vegetativo de tomate cv. Río Grande.

Algunos autores concluyen que la efectividad agrobiológica de algunas RPCV es posible gracias al estímulo positivo ejercido en el crecimiento que se establece con un alto nivel poblacional en la rizosfera de las plantas inoculadas (Terri et al., 2005). No obstante, también se reporta que bajo la inoculación con microorganismos encapsulados en alginato, varios parámetros de crecimiento de plantas fueron iguales en los tratamientos inoculados libremente (Vassilev et al., 2001). Tal es el caso de *G. deserticola* libre y encapsulada en alginato, que requirió de la inoculación doble para obtener diferencias estadísticas significativas de todas las variables analizadas. Las tasas más altas de este crecimiento, se obtuvieron en co-inmovilización, es decir, cuando dos microorganismos fúngicos fueron atrapados en el portador aumentando la micorrización de las raíces de plantas de tomate (Vassilev et al., 2001).

Particularmente la inmovilización del hongo *Metarhizium brunneum* en perlas de alginato-Ca, promovió la formación selectiva de micelio por una combinación de presión osmótica y viscosidad, mejoras en la supervivencia del secado del micelio encapsulado, mayor endofitismo en tejido de tallo de tomate después de la aplicación de micelio a las raíces, así como en la colonización, estabilizamiento en la rizosfera y el efecto simbiótico. Cabe mencionar que cambios en las formulaciones (como técnicas de secado en la formación de perlas de alginato para la encapsulación) han permitido además el crecimiento del hongo en una mayor variedad de tipos de suelo (Krell et al. 2018).

Diferentes autores sugieren que el inoculante con alginato húmedo utilizado como semilla del hongo blanco (*Agaricus bisporus*) tuvo un período de adaptación más corto y una tasa de crecimiento más alta que la semilla líquida y la semilla de grano convencional. Las mejoras se atribuyen a la alta capacidad de carga de biomasa de las perlas, la protección micelial en el microentorno de las perlas y la distribución espacial de las perlas en el sustrato (Friel y McLoughlin 1999). Por otro lado, formulaciones de alginato (macroperlas con y sin leche descremada y recubrimiento de semillas) de *B. subtilis* y *Pseudomonas corrugata* se encontraron superiores a los inoculantes líquidos o inoculantes a base de carbón para plantas de maíz a bajas temperaturas, mejorando su permanencia en ambientes extremos (Trivedi et al. al., 2005).

Rekha et al. (2007) sugieren que la encapsulación en perlas de alginato seco prolonga la supervivencia de las PGPB, *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* inmovilizados en dos tipos de inoculantes alginato-perla (con y sin suplemento de leche descremada) y luego se secaron y se

almacenaron a temperatura ambiente durante 14 años. La población en cada tipo de cuenta había disminuido, pero sobrevivieron números significativos (105–106 UFC / g cuentas).

Finalmente son escasos los trabajos en los que además del efecto en variables vegetales, se evalúe la viabilidad de los microorganismos inoculados cuando se emplea algún método de inmovilización. Al respecto, (Krell et al., 2018) demostraron por microscopia y PCR en tiempo real que a 21 d de inocular al hongo *M. brunneum* encapsulado en alginato-Ca en raíces de plantas de tomate en diferentes tipos de suelo, el 64% de las plantas inoculadas con el encapsulado presentaron un endofitismo mayor particularmente al usar perlas húmedas. En nuestro caso *A. vinelandii* mostró un compartamiento diferente durante los tiempos de muestreo, ya que a 7d de la inoculación los resultados de PCR en tiempo real mostraron su establecimiento en la rizósfera tanto con el inóculo líquido como el encapsulado. Sin embargo a los 14d se ve disminuida su presencia en el suelo para finalmente no ser detectada por los métodos moleculares después de 30 d de inoculada pese a los efectos significativos en las variables agronomicas.

5. Conclusiones

En este trabajo destacamos el uso de alginato-Na como material para la encapsulación de la RPCV *A. vinelandii* y que su desempeño en la inoculación de plántulas de tomate fue positivo para variables agronómicas importantes, como son la germinación, el diámetro del tallo, así como el tamaño de plántula y de raíces. Por otro lado, la encapsulación de *A. vinelandii* en perlas de alginato-Na, pese a que restringe espacialmente su distribución en el suelo, no limita su ingreso a las raíces de la plántula permitiendo su establecimiento en la rizósfera durante el primer estadio fenológico del cultivo. Finalmente mostramos evidencia novedosa sobre la encapsulación de *A. vinelandii* en el cultivo de tomate como inoculante con propósitos de promoción del crecimiento, reducción de fertilización química y posible protección contra patógenos por las bondades de la bacteria. Estos hallazgos proporcionan una base valiosa para probar la encapsulación de esta y otras RPCV como inoculantes y alientan el desarrollo de formulaciones que mejoren la colonización en el suelo de la rizósfera y mantengan su viabilidad durante el ciclo completo de producción, ya que en este trabajo la viabilidad de la bacteria se vió limitada después de 30 d independientemente del método empleado.

6. Referencias

- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan MS. (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolated of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biotechnology*. 29: 29–34. Recuperado de: <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/121463>
- Bashan, Y., de-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., Hernandez, J.P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil*. 378:1–33. DOI:[10.1007/s11104-013-1956-x](https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x)
- Bashan, Y., Gonzalez, L.E. (1999). Long-term survival of the plant- growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51:262–266. DOI: [10.1007/s002530051391](https://doi.org/10.1007/s002530051391)
- Bashan, Y., Hernandez, JP., Leyva, L.A. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*. 35(5): 359-368. Recuperado de: <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0481-5>
- Chennappa, G., Naik, M.K., Amaresh, Y.S., Nagaraj, H., Sreenivasa, M.Y., (2018). Panpatte, D., Jhala, Y.K., Vyas, R., Shelat, H.N. (Eds.). Microorganisms for green revolution. *Azotobacter - A potential bio-fertilizer and bio inoculants for sustainable agriculture*. In: Vol. 1. Springer Nature, Singapore, pp. 78–87.
- Chennappa, G., Udaykumar, N., Vidya, M., Nagaraja, H., Amaresh, Y.S., Sreenivasa, M.Y. (2019). Chapter 19 *Azotobacter*—A Natural Resource for Bioremediation of Toxic Pesticides in Soil Ecosystems. En: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Shankar Singh J, Singh DP. (eds.), Elsevier, pp. 267-279. ISBN 9780444641915. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64191-5.00019-5>.
- Covarrubias, S.A., de-Bashan, L.E., Moreno, M., Bashan, Y. (2012). Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93:2669–2680. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22038243>
- Ehaliotis, C., Papadopoulou, K., Kotsou, M., Mari, I., Balis, C. (1999). Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during aerobic biological treatment of olive-mill wastewater.

FEMS *Microbiology Ecology*. 30(4): 301-311. Recuperado de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10568839>

- Friel, L.T., McLoughlin, A.J. (1999). Immobilization as a strategy to increase the ecological competence of liquid cultures of *Agaricus bisporus* in pasteurised compost. *FEMS Microbiology Ecology* 30:39–46.
- Gurikar, C., Naik, M.K., Sreenivasa, M.Y. (2016). *Azotobacter*: PGPR Activities with Special Reference to Effect of Pesticides and Biodegradation. En: *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. Singh D, Singh H & Prabha R. (eds), Springer, New Delhi. pp. 229-244.
- Jesitha, K., Nimisha, K.M., Manjusha, C.M., Harikumar, P.S. (2015). Biodegradation of Endosulfan by *Pseudomonas fluorescens*. *Environmental Processes*. 2(1): 225–240. Recuperado de:
<https://doi.org/10.1007/s40710-015-0059-5>
- Kadakol, J.C., Kamanavalli, C.M., Shouche, Y. (2011). Biodegradation of carbofuran phenol by free and immobilized cells of *Klebsiella pneumonia* ATCC13883T. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27: 25-29. doi: 10.1007/s11274-010-0422-7. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0422-7>
- Krell, V., Jakobs-Schönwandt, D., Vidal, S., Patel, A. (2018). Encapsulation of *Metarhizium brunneum* enhances endophytism in tomato plants. *Biological Control*. 116: 62-73. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.05.004
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiology Research*. 165: 363–375. doi: [10.1016/j.micres.2009.08.001](https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.08.001)
- Mustapha, M.U., Halimoon, N., Lutfi, W., Johari, W., Abdul, Shukol M.Y. (2018). Soil Microorganisms and their potential in pesticide biodegradation: A review. *The Journal of Agricultural Science*. 44(2): 39-61 doi: [10.21608/jsas.2018.3465.1061](https://doi.org/10.21608/jsas.2018.3465.1061).
- Myresiotis, C.K., Vryzas, Z., Mourkidou, E.P., (2012). Biodegradation of soil applied pesticides by selected strains of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on bacterial growth. *Biodegradation* 23, 297–310.
- Nagaraja, H., Chennappa, G., Rakesh, S., Naik, M.K., Amaresh, Y.S., Sreenivasa, M.Y. (2016). Antifungal activity of *Azotobacter nigricans* against trichothecene-producing *Fusarium* species associated with cereals. *Food Sciences and Biotechnology*. 25 (4), 1197–1204.

- Nakkeeran, S., Fernando, W.G., Siddique Z (2005) Plant growth promoting Rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. *Biocontrol Biofertilization*. 257–296.
- Rekha, P.D., Lai, W.A., Arun, A.B., Young, C.C. (2007). Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresources Technologies*. 98:447–451.
- Reshma, P., Naik, M.K., Aiyaz, M., Niranjana, S.R., Chennappa, G., Sheikh, S.S., Sayyed, R.Z., (2018). Induced systemic resistance by 2, 4-diacetylphloroglucinol positive fluorescent pseudomonas strains against rice sheath blight. *Indian Journal of Experimental Biology*. 56, 207–212.
- Revillas, J.J., Rodelas, B., Pozo, C., Toledo, M.V., Gonzalez-Lopez, J., (2000). Production of B-group vitamins by two *Azotobacter* strains with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions. *Journal of Applied Microbiology*. 89 (3), 486–493.
- Rojan, P.J., Tyagi, R.D., Brar, S.K., Surampalli, R.Y., Prévost, D. (2011) Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical Reviews in Biotechnology*. 31:3, 211-226, DOI: 10.3109/07388551.2010.513327
- Sabaratnam, S., Traquair, J.A. (2002). Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biology Control*. 23:245–253
- Talwar, M.P., Ninnekar, H.Z. (2015). Biodegradation of pesticide profenofos by the free and immobilized cells of *Pseudoxanthomonas suwonensis* strain HNM. *Journal of Basic Microbiology*. 55: 1-10. doi: [10.1002/jobm.201400978](https://doi.org/10.1002/jobm.201400978)
- Trivedi, P., Pandey, A., Palni, L.M.S. (2005). Carrier-based preparations of plant growth-promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. *World Journal Microbiology and Biotechnology*. 21:941–945.
- Upadhyay, S.K., Singh, D.P., Saikia, R., (2009). Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Current Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9464-1>.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Nasrulhaq Boyce, A. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules*. 2016; 21(5):573.
- Yañez-Ocampo, G., Sánchez-Salina, E., Jimenez-Tobon, G.A., Penninckx, M., Ortiz-Hernández, M.L. (2009). Removal of two organophosphate pesticides by bacterial consortium immobilized in alginate or tezontle. *Journal of Hazardous Materials*. 168: 1554-1561. doi: [10.1016/j.jhazmat.2009.03.047](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.047)

- Young, C.C., Rekha, P., Lai, W.A., Arun, A.B. (2006). Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. *Biotechnology and Bioengineering* 95:76–83.
- Zohar-Perez, C., Ritte, E., Chernin, L., Chet, I., Nussinovitch, A. (2002). Preservation of chitinolytic *Pantoea agglomerans* in a viable form by cellular dried alginate-based carriers. *Biotechnology Progress* 18:1133–1140.

BIBLIOGRAFÍA

- Armenta-Bojórquez AD, Airola-Gallejos VM, Apodaca-Sánchez MA. 2009. Selección de aislados nativos de *Bacillus subtilis* para la producción de plántulas de tomate en Sinaloa. Primer Simposium Internacional de Agricultura Ecológica. INIFAP. Cd. Obregón, Sonora, México. 252-256 pp.
- Bandhu RB, Parbati A. 2013. Effect of *Azotobacter* on growth and yield of maize. *SAARC Journal Agriculture*. 11(2): 141-147.
- Bashan YJP, Hernandez LA, Leyva, M Bacilio. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*. 35: 359-368.
- Becerra CC, Prieto FA, Álvarez LV, Cabello CMI, Acea MJ, Kidd PS, Monterroso C. 2011. Nickel solubilizing capacity and characterization of rhizobacteria isolated from hyperaccumulating and non-hyperaccumulating subspecies of *Alyssum serpyllifolium*. *Int. J. Phytorem*. 13(S1):229-244.
- Betancourt D. 2002. Characterization of diazotrophs containing Mo independent nitrogenases from diverse natural environments. Tesis de maestría en Microbiología North Carolina State University. Pp 1-22.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. 2005. Quantitative real-time RT-PCR-a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*. 34: 597-601.
- Cabello-Conejo MI, Becerra CC, Prieto FA, Monterroso C, Saavedra FA, Mench M, Kidd PS. 2014. Rhizobacterial inoculants can improve nickel phytoextraction by the hyperaccumulator *alyssum pintodasilvae*. *Plant Soil*. 379(1-2):35-50.
- Cordero-Ramírez JD, López RR, Figueroa LAM, Mancera LM.E, Martínez AJC, Apodaca SMÁ, Maldonado MIE. 2013. Native soil bacteria isolate in Mexico exhibit a promising antagonistic effect against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Dí* 53(10):838-847.
- Díaz C. 2007. Caracterización Agro cadena de Tomate. Dirección Regional Central Occidental. M.A.G. Grecia, Costa Rica. 46 p.
- Espín G. 2002. Biología de *Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: www.microbiología.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_09/Capitulo09.pf
- FOSTAT. 2014. FAO Statistical pocketbook 2014. Recuperado de: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/383d384a-28e6-47b3-a1a2-2496a9e017b2>
- García G, K V H, Poggio GF, Esparza RJ, Barrera CJ. 2011. Small microcapsules of crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis* by an emulsification/internal gelation method. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 34: 701-708.
- Goodier J. 1999, Fresh Produce Desk Book, *Reference Reviews*, Vol. 13 No. 6, pp. 25-26. DOI: 10.1108/rr.1999.13.6.25.321
- He Y, Wu Z, Ye BC, Wang J, Guan X, Zhang J. 2016. Viability evaluation of alginate-encapsulated *Pseudomonas putida* Rs-198 under simulated salt-stress conditions and its effect on cotton growth. *European Journal of Soil Biology*. 75(1):135-141.

- Herman A, Dousooulin J, Moya E. 2016. Suelos supresivos a enfermedades radicales : “declinación del mal de pie (*Gaeumannomyces graminis var . tritici*) en trigo ”, un estudio de caso . DOI: 10.4206/agrosur.2011.v39n2-01
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 1993; 11: 1026-1030
- Holbrook CC, Noe J.P, Gorbet DW, Stephenson MG. 1998. Evaluation of peanut breeding lines with resistance to the peanut root - knot nematode. *Crop Science*, 38:260-262.
- Holt J. 2000. *Bergey’s manual to determinative bacteriology*. Novena Edición. Baltimore, Maryland. Ed Williams & Wilikins. USA. Pp 77, 105, 118, 135.
- Infoagro Systems SL. 2016. El cultivo de tomate: Parte I. (en línea). Madrid, España. s.p. Recuperado de: http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_del_tomate__parte_i_.asp
- Jano F. 2006. *Cultivo y Producción de Tomate*. 1ª ed. Lima: Editorial. Ripalme.
- Krzyzanowska D, Obuchowski M, Bikowski M, Rychlowski M,afra S. 2012. Colonization of potato rhizosphere by gfp-tagged *Bacillus subtilis* MB73/2, *Pseudomonas* sp. P482 and *Ochrobactrum* sp. A44 shown on large sections of roots using enrichment sample preparation and confocal laser scanning microscopy. *Sensors* 12(12):17608-17619.
- Kumari R, Kaur I, Bhatnagar AK. 2011. Effect of aqueous extract of *Sargassum johnstonii* setchell and gardner on growth, yield and quality of *Lycopersicon esculentum* Mill. *JApplPhycol* 23:623–633.
- Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *Plant Science.*, 6:60-64.
- Kumar A, Nain L, Singh N. 2017. Alginate immobilized enrichment culture for atrazine degradation in soil and water system. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 52: 229.236. doi: 10.1080/03601234.2016.1270680
- Lakshminarayana KR, Shukla B, Sindhu SS, Kumari P, Narula N and Sheoran RK. 2000. Analogueresistant mutants of *Azotobacter chroococcum* derepressed for nitrogenase activity and early ammonia excretion having potential as inoculants41 for cereal crops. *Indian Journal of Experimental Biology*. 38:373–378.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012; 62: 3923. 7.
- Malusá E, L Sas-Paszt, J Ciesielska. 2012. Technology for beneficial microorganisms inocule used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*. 2012: 1-12.
- Manchal J, Vanderleyden J. 2000. The “oxygen paradox” of dinitrogen-fixin bacteria. *Biological Fertilized Soils*. Vol 30. Pp 363-373.
- Mohammad BT, Bustard MT. 2008. Fed batch bioconversion of 2-propanol by a solvent tolerant strain of *Alcaligenes faecalis* entrapped in Ca-alginate gel. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35(7): 677-684. DOI: 10.1007/s10295-008-0325-x
- Molina N, Verón R, Altamirano J. 2010. *Producción Hortícola Correntina Análisis técnico y económico del tomate en la campaña 2010*. Publicación Técnica N° 40. Inta-estación experimental agropecuaria bella vista. Centro regional corrientes. ISSN 1515-9299
- Monardes H, Escalona V, Alvarado P, Urbina C, Martin A. 2009. *Manual de Cultivo de Tomate. (Lycopersicum esculentum Mill)*. Nodo Hortícola VI; Chile.
- Monge J. 2016. Liro 42: Generalidades del híbrido. Informe técnico. Alajuela, Costa Rica. Almatropic S.A. 1 p.

- Muñoz DB. 2017. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal : Mecanismos y aplicaciones, 1–44.
- Mustapha MU, Halimoon N, Lutfi W, Johari W, Abdul Shukol MY. 2018. Soil Microorganisms and their potential in pesticide biodegradation: A review. *J The Journal of Agricultural Science*. 44(2): 39-61 DOI: 10.21608/jsas.2018.3465.1061.
- Nagpal P, Jafri S, Readdy M, Das H. 1989. Multiple Chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. Vol 171. Pp 3133-3138.
- Pénelo L. 2018. Tomate: propiedades, beneficios y valor nutricional. La vanguardia. Recuperado de: lavananguardia.com
- Pérez J, Hurtado G, Aparicio V, Arqueta Q, Larín M. 2000. Guía Técnica del Cultivo de Tomate. CENTA. El Salvador.
- Pii Y, Penn A, Terzano R, Crecchio C, Mimmo T, Cesco S. 2015. Plant Physiology and Biochemistry Plant-microorganism-soil interactions influence the Fe availability in the rhizosphere of cucumber plants, 87, 45–52.
- Pradeep V, Subbaiah UM. 2016. Use of Ca-alginate immobilized *Pseudomonas aeruginosa* for repeated batch and continuous degradation of Endosulfan. *3Biotech*. 6:124. DOI: 10.1007/s13205-016-0438-2
- Rawia EA, Nemat MA, Hamouda HA. 2009. Evaluate Effectiveness of Bio and Mineral Fertilization on the Growth Parameters and Marketable Cut Flowers of *Matthiola incana* L. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 2009, 5,509-518.
- Rossi MS 2016. Suelos supresivos: capacidad biopesticida contra “Phytophthora palmivora en *Olea europea* L.”
- Santana M, Vasquez C, Martinez M, Franco M. 2002. Evaluación de cepas de *Azotobacter spp.* y de bacterias solubilizadoras de fosfato (BFS), como biofertilizante mixto en cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium var. Regal Suerte*). Tesis de microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Pp24
- Saribay G. 2003. Growth and nitrogen fixation dynamics of *Azotobacter Chroococcum* nitrogen-free and own contacting medium. Tesis de Maestría en Ciencias Aplicadas. Departamento de ingeniería en alimentos. The middle East Technical University. Turkia. Pp 1-45.
- Sartaj AW, Subhash C, Tahir A. 2013. Potential Use of *Azotobacter chroococcum* in Crop Production: An Overview. *Current Agriculture Research Journal*. 1(1), 35-38.
- Schoebitz M, Belchí MD. 2016. Encapsulation techniques for plant growth-promoting rhizobacteria. *In: bioformulations for sustainable agriculture*. Kumar, N.; Mehnaz, S. and Balestrini, R. (Eds.). Springer India. 251-265 pp.
- Shen J, Li C, Mi G, Li L, Yuan L, Jiang R, Zhang F. 2013. Maximizing root/rhizosphere efficiency to improve crop productivity and nutrient use efficiency in intensive agriculture of China. *Journal of Experimental Botany*. 64 (5):1181-1192
- Sotelo L, Jimenez J, Tarsicio A, Cueto M. 2012. Effect of inoculation of microorganisms on radish growth (*Raphanus sativus*) *10*(1), 21–31.
- Tamay L, Ibarra C, Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real.

- Uniprot Consortium. 2009. "*Azotobacter vinelandii* DJ". Recuperado de: <http://www.uniprot.org/taxonomy/322710>
- Whipps JM. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52:487-511.
- Zaidi A, Ahmad E, Khan MS, Saif S, Rizvi A. 2015. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective. *Scientia Horticulturae*. 193(1):231-239