



**UNIVERSIDAD POPULAR AUTONOMA DEL ESTADO DE PUEBLA**

**DECANATO DE CIENCIAS BIOLOGICAS**

**FACULTAD DE BIOTECNOLOGIA**

**Título de tesis:**

**Evaluación de *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837  
inmovilizada en tezontle para la producción de microgreens**

**Tesis**

**Para obtener el título en:**

**Maestría en Biotecnología**

**PRESENTA:**

**Luis René Pinto Trinidad**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Luis Daniel Ortega Martínez**

**CODIRECTOR DE TESIS:**

**Dra. Victoria Conde Avila**



**Heroica Puebla de Zaragoza, Puebla.**



**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

Decanato de Ciencias Biológicas

Facultad de Biotecnología

Ingeniería en Biotecnología

Se aprueba la tesis:

***Evaluación de Azotobacter vinelandii ATCC 12837  
inmovilizada en tezontle para la producción de microgreens***

Autor:

Luis René Pinto Trinidad

Comité de revisión:

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'L. Ortega', written over a horizontal line.

Dr. Luis Daniel Ortega Martínez  
Director

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Victoria Conde', written over a horizontal line.

Dra. Victoria Conde Avila  
Codirector

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Carmen Martínez', written over a horizontal line.

Dra. Carmen Martínez Valenzuela  
Asesor externo

## Contenido

Capítulo I.....	6
Antecedentes.....	6
Capítulo 2.....	10
Marco Teórico.....	10
1. Microgreens.....	10
2. Sistemas de producción.....	11
3. Fertilizantes.....	15
4. Microorganismos utilizados en la agricultura.....	16
5. Genero <i>Azotobacter</i> .....	17
6. Inmovilización celular.....	21
7. Metanálisis.....	26
Planteamiento del problema.....	27
Justificación.....	28
Hipótesis.....	28
Objetivos.....	29
Objetivos específicos.....	29
Capítulo 3 Artículo científico.....	31
Metodología.....	38
2. Área de estudio.....	38
3. Cepas de estudio.....	39
4. Inmovilización celular.....	39
5. Determinación de los parámetros.....	39
6. Extracción de ADN de las diazotrofas y su análisis por PCR en tiempo real.....	40
7. Diseño y análisis estadístico.....	41
Bibliografía.....	42

## Resumen

En la actualidad la población mundial crece de manera exponencial, es por ello que una de las grandes problemáticas a resolver en el mundo actualmente es la demanda de alimentos, su mejoramiento nutricional, así como su rápida producción. Es así que uno de los productos con mayor aceptación actualmente son los microgreens los cuales son plántulas comestibles jóvenes y tiernas, producidas a partir de semillas de varias especies. En los últimos años se ha acelerado su producción y consumo, siendo una tendencia creciente a nivel mundial. Para ello se han contado con diversas herramientas para su producción, la agricultura protegida por ejemplo cuenta con los sistemas hidropónicos el cual es un sistema de producción en donde las plantas crecen en agua con fertilizantes sin necesidad de suelo, por ende, se ven limitadas a la diversidad de microorganismos edáficos. *A. vinelandii*, destaca entre las bacterias rizosféricas promotoras de crecimiento vegetal ya que las favorece asimbióticamente al fijar nutrientes, sintetizar metabolitos reguladores, fitohormonas y antibióticos. Cuando se utilizan microorganismos en hidroponía, son agregados a la solución nutritiva o inoculados en el trasplante, sin embargo, las condiciones químicas y físicas del medio reducen su viabilidad. Existen diferentes métodos para mejorar su sobrevivencia y efectividad, uno de ellos es la inmovilización celular sin embargo son escasas las investigaciones que propongan la inmovilización en un sustrato, más específico, en el Tezontle. En este sentido, nuestro objetivo fue evaluar el efecto de un sustrato hidropónico (Tezontle) inoculado con *A. vinelandii* para la producción de microgreens. Los resultados mostraron un aumento en el tamaño y peso de raíces en los tratamientos con el sustrato hidropónico e igual concentración de nitratos para todos los tratamientos excepto el testigo.

## **Abstract**

Nowadays the world population grows exponentially, which is why one of the great problems to be solved in the world today is the demand for food, its nutritional improvement as well as its rapid production. Thus, one of the most widely accepted products currently are microgreens, which are young and tender edible seedlings, produced from seeds of various species. In recent years its production and consumption has accelerated, being a growing trend worldwide. For this, they have had various tools for their production, protected agriculture, for example, has hydroponic systems, which is a production system where plants grow in water with fertilizers without the need for soil, therefore, they are limited to the diversity of edaphic microorganisms. *A. vinelandii* stands out among the rhizospheric bacteria that promote plant growth since it favors them asymbiotically by fixing nutrients, synthesizing regulatory metabolites, phytohormones and antibiotics. When microorganisms are used in hydroponics, they are added to the nutrient solution or inoculated in the transplant; however, the chemical and physical conditions of the medium reduce their viability. There are different methods to improve their survival and effectiveness, one of them is cell immobilization, however there are few investigations that propose immobilization in a more specific substrate in the Tezontle. In this sense, our objective was to evaluate the effect of a hydroponic substrate (Tezontle) inoculated with *A. vinelandii* for the production of microgreens. The results showed an increase in the size and weight of the roots in the treatments with the hydroponic substrate and the same concentration of nitrates for all the treatments except the control.

## Capítulo I

### Antecedentes

La producción de hortalizas en México genera recursos económicos principalmente por alto consumo, mismo que impacta en la salud humana (Baslam *et al.*, 2011). Su consumo reduce enfermedades cardiovasculares, cáncer, entre otras (Jacobo *et al.*, 2009). La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es uno de los principales cultivos en México, se cultiva en suelo a campo abierto, bajo régimen de temporal o riego (SIAP, 2018). Sin embargo, los sistemas agrícolas convencionales han generado problemas de salud y al medio ambiente por el uso excesivo de fertilizantes y plaguicidas, lo que ha obligado a la búsqueda de alternativas para la producción hortícola, como la agricultura protegida (AP). La AP modifica la forma de producir alimentos minimizando las restricciones, efectos y fenómenos climáticos adversos (Moreno *et al.*, 2014).

Durante los últimos años, todas las ciencias están experimentando avances tecnológicos importantes. Afortunadamente la agricultura también se está beneficiando de toda esta revolución tecnológica; en este sentido, se ponen a disposición del agricultor variedades más competitivas y productivas que las tradicionales, nuevos materiales (sistemas de fertirrigación, materiales de cobertura, etc.) que permiten un control ambiental más exhaustivo en alguna de las fases del proceso productivo de las plantas. Sin embargo, los sistemas agrícolas convencionales han generado problemas de salud y al medio ambiente por el uso excesivo de fertilizantes y plaguicidas, lo que ha obligado a la

búsqueda de alternativas para la producción hortícola, como la agricultura protegida (AP). La AP modifica la forma de producir alimentos minimizando las restricciones, efectos y fenómenos climáticos adversos (Moreno Reséndez, 2014). Un ejemplo claro son los microgreens los cuales son verduras cosechadas antes de su etapa de madurez, sus nutrientes se encuentran en una forma más concentrada que en la planta desarrollada y contienen más clorofila que los germinados.

Una de las principales estrategias de producción en la AP es la hidroponía (Velasco *et al.*, 2016), la cual disminuye el impacto ambiental ocasionado por fertilizantes (Croitoru *et al.*, 2015). Se caracteriza por ser una tecnología para el cultivo vegetal en agua que contiene fertilizantes con o sin el uso de un medio artificial en sustitución al suelo para proveerla de soporte mecánico como arena, grava, vermiculita, lana de roca, etc (Baca *et al.*, 2016; De la Rosa-Rodríguez *et al.*, 2016; Nisha, Somen, Kaushal, Narendra, y O.P. Chaurasia, 2018).

El sistema hidropónico, al no emplear el suelo, limita a la planta de la diversidad de microorganismos edáficos, que incluyen más de  $10^5$  especies (Dohrmann *et al.*, 2013), mismos que son responsables de llevar a cabo entre 80-90% de los procesos observados en el suelo (Nannipieri *et al.*, 2003); como el metabolismo de elementos, descomposición de materia orgánica, solubilización de minerales, fotosíntesis, supresividad, mantenimiento de la estructura y función del suelo, degradación de compuestos xenobióticos, entre otros (Pankhurst *et al.*, 1997; Pal y McSpadden, 2006; Pankratova, 2006; Ryan *et al.*, 2008, Conde *et al.*, 2019). en este sentido destacan las diazotrofas promotoras de crecimiento vegetal

(RPCV) las cuales favorecen asimbióticamente a las plantas fijando nutrientes, sintetizando metabolitos reguladores, fitohormonas y antibióticos. Cuando se emplean en el sistema hidropónico son agregadas a la solución nutritiva (SN) o se inoculan las raíces (Darwin *et al.*, 2015). Sin embargo, las condiciones químicas y físicas del medio reducen la viabilidad. Así mismo, el uso diferentes medios de soporte y tipos de sistemas hidropónicos pueden no proveer del ambiente más adecuado para el desarrollo de microorganismos (Seungjun Lee y Jiyoun Lee, 2015), en este sentido existen diferentes métodos para conservar la viabilidad de los microorganismos, uno de ellos es la inmovilización celular, caracterizado por restringir a las células a un área delimitada conservando sus actividades metabólicas, catabólicas y catalíticas (Conde-Avila *et al.*, 2020).

Junto a todos estos cambios tecnológicos se observa cómo se está sustituyendo, de manera cada vez más importante, el cultivo tradicional en suelo por el cultivo hidropónico y en sustrato (Abad y Noguera, 1997). Lógicamente, este fenómeno ha sido más pronunciado en aquellos sectores más intensivos de la agricultura, como es el caso de la producción hortícola y ornamental. Las propiedades de tipo físico resultan de enorme importancia para el correcto desarrollo de la planta; cabe señalar, que una vez colocada ésta en el contenedor resulta prácticamente imposible modificar sus parámetros físicos iniciales.

El uso de tezontle como medio de cultivo se ha estudiado en la producción de hortalizas (Baca *et al.*, 1991) desde hace unos 15 años. El tezontle es un material considerado como inerte desde el punto de vista químico, cuyo extracto de saturación tiene

un pH próximo a la neutralidad, su capacidad de intercambio catiónico es muy baja, buena aireación, retención de humedad que varía con el diámetro de las partículas, generalmente está libre de sustancias tóxicas y tiene buena estabilidad física (Bastida, 1999), además de su bajo costo de adquisición (Castellanos y Vargas-Tapia, 2003). Por ello ha crecido el interés en comparar diferentes sistemas y sustratos para la producción de tomate en invernadero, en cuanto a rendimiento y optimización en el uso del agua y nutrimentos (Inden y Torres, 2004).

## Capítulo 2

### Marco Teórico

#### 1. Microgreens

Con frecuencia, también llamados “confeti de verduras”, los microgreens son verduras tiernas las cuales son utilizadas para realzar color, textura o sabor de ensaladas, o simplemente para adornar una amplia variedad de platillos. Son la primera verdadera etapa de la hoja y se vende con el tallo, cotiledones (hojas de semillas) y las primeras hojas adheridas. La producción de microgreens puede realizarse desde el hogar, siendo una actividad relativamente fácil. Sin embargo, el tiempo de la cosecha varía mucho de un cultivo a otro (Food and Drug Administration, 2019).

Actualmente ha crecido el interés por los alimentos frescos y funcionales, esto ha sido aún más impulsado por el creciente interés que tienen los consumidores por hacerse de dietas las cuales favorezcan a la salud y a llegar a la longevidad. Los microgreens acumulan un potencial inmenso para adaptarse a una producción a microescala y, por ende, para mejorar el valor nutricional en la dieta humana.

Los factores principales que se toman en cuenta previo a la cosecha de la producción de microgreens, como lo es, por ejemplo, la selección de especies, si utilizara una fertilización, la biofortificación, cuanta luz necesitara, entre otras cosas, se abordan con respecto a la fisiología y a la calidad del cultivo, así como su manejo postcosecha (Kyriacou *et al.*, 2016).

## **2. Sistemas de producción**

La variedad de sistemas de producción tradicionales se divide principalmente en tres, esto para darle una nutrición adecuada a las plantas. La primera procede de los desechos biológicos de la vida animal, la segunda deriva a partir de la descomposición de la vida vegetal, y la última proviene de las rocas o sustratos que se encuentran en los suelos. . Cabe resaltar que estos elementos se encuentran presentes en una delgada capa de 40 cm superficiales del suelo, donde ocurre la descomposición orgánica que permite la supervivencia de la vida vegetal (Hernández, 2017).

Desde la llegada de la revolución verde en la década de los sesenta (Rucoba *et al.*, 2014) se presentaron diversos avances tecnológicos que incluían desde equipos tecnológicos como maquinaria hasta fertilizantes, pesticidas y sistemas de riego, esto con el fin de alcanzar mejores resultados, sin embargo, el mal manejo de dicha tecnología derivó en la disminución en el rendimiento de las cosechas, esto, desencadenado a partir de la

poca fertilidad del suelo. Es así como se empieza a optar con tecnologías más amigables con el medio ambiente para así disminuir los impactos ecológicos.

Sin embargo, una desventaja presentada en los sistemas de producción tradicionales son que con la implementación de este se requiere de una mayor cantidad de personas para apoyar en la mano de obra, inversión en tiempo y, lo más a destacar es que este tipo de sistemas principalmente es utilizado para el autoconsumo del productor. (Sánchez, 2021).

Por otra parte, el sistema hidropónico es una herramienta que permite el cultivo de plantas sin suelo, es decir sin tierra. Un cultivo hidropónico es utilizado para cultivar plantas cuyo crecimiento es posible gracias al suministro adecuado de los requerimientos hídrico-nutricionales, a través del agua y solución nutritiva. Con la técnica de cultivo sin suelo es posible obtener hortalizas de excelente calidad y sanidad, permitiendo un uso más eficiente del agua y los nutrientes. Basados en la experiencia, los rendimientos por unidad de área cultivada son altos debido a una mayor densidad, mayor productividad por planta y eficiencia en el uso de los recursos agua, luz y nutrientes. No es una metodología moderna para el cultivo de plantas, sino una técnica ancestral; en la antigüedad hubo culturas y civilizaciones que utilizaron esta metodología como medio de subsistencia. Generalmente asociamos esta forma de cultivo con grandes invernaderos para el cultivo de plantas y el empleo de la más compleja tecnología, sin embargo, los orígenes de la hidroponía fueron muy simples en su implementación. El desarrollo actual de la

técnica de los cultivos hidropónicos está basado en la utilización de mínimo espacio, mínimo consumo de agua y máxima producción y calidad. (Cultivo en hidroponía, 2015)

Mediante esta técnica no se pierden de vista las necesidades de las plantas, como luz, temperatura, agua y nutrientes. La disponibilidad de agua y nutrientes, los niveles de radiación y temperatura del ambiente, la densidad de siembra o disposición de las plantas en el sistema hidropónico, la acción de patógenos o plagas, etc., incidirán fuertemente en el rendimiento del cultivo. El modernismo permitió la introducción de los avances de la informática para el control y ejecución de actividades, que han hecho de la automatización del cultivo hidropónico una realidad. (Cultivo en hidroponía, 2015)

Debido a la rápida urbanización e industrialización no solo está disminuyendo la tierra cultivable sino también las prácticas de la agricultura convencional debido al amplio rango de impactos negativos al ambiente (Nisha *et al.*, 2018), mientras que el uso de la hidroponía crece debido a que provee un sustancial grado de control (Jones, 1982)

Para destacar sus ventajas y funcionar de manera correcta, esta técnica requiere una solución nutritiva (SN) para el crecimiento de las plantas y a pesar de que por sí misma consume una gran cantidad de agua, la eficiencia del agua es mayor comparada con la agricultura a cielo abierto (Parks, 2011). Sin embargo, debido al encarecimiento de los fertilizantes (Huang, 2009) y al impacto negativo en el ambiente (Giuffrida y Leonardi, 2009; Nakano *et al.*, 2010; Massa *et al.*, 2010), en hidroponía se buscan sistemas más eficientes.

Hasta el año 2013 estaban bajo cubierta 20,000 ha, de las cuales 12,000 son de invernaderos y 8000 de estructuras denominadas casa-sombra (AMHPAC, 2013; Ponce, 2013). En estas condiciones la hidroponía le gana terreno a la producción en suelo debido a que se logra mayor eficiencia y control del riego y la nutrición mineral, ausencia inicial de plagas, enfermedades y malezas, facilidad de esterilización de los sustratos, posibilidad de usar aguas duras o con mayor salinidad, mayor rendimiento y calidad, y más sanidad e inocuidad, entre otras (Cánovas y Magán, 2003; Alarcón, 2006; Raviv y Lieth, 2008).

En los sistemas hidropónicos cerrados, donde sí existe recirculación de SN, es más eficiente el uso del agua y los nutrimentos que se aplican para el crecimiento y desarrollo de un cultivo, ya que la SN que drena del sistema (drenaje) es captada y utilizada nuevamente en el mismo sistema de producción; sin embargo, un aspecto que limita la reutilización de la SN y con esto la eficiencia en el uso del agua y de los nutrimentos es la obtención de un rendimiento menor, disminución de la calidad, acumulación de toxinas (fitotoxicidad) deficiencias minerales y el riesgo de diseminación de microorganismos que causan enfermedad en la raíz del cultivo (Déniel *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2014).

La productividad refleja un uso eficiente del agua, en los sistemas hidropónicos y en especial los cerrados se pueden alcanzar ahorros de agua desde 20% (Sánchez del Castillo, *et al.*, 2014), 30 a 40% (Komosa *et al.*, 2011) o hasta 46% (Dasgan y Ekici, 2005).

Los sistemas hidropónicos con recirculación de la solución nutritiva ahorran agua y fertilizantes, pero con el tiempo es difícil mantener el balance nutricional y controlar las

enfermedades que atacan a la raíz, lo que causa un rendimiento menor respecto a sistemas donde dicha solución no se recircula (Sánchez Del Castillo, *et al.*, 2014).

### **3. Fertilizantes**

En el estudio de la nutrición de las plantas se entiende por macronutrientes elementos minerales que forman parte de materia seca de vegetales, los cuales tienen una proporción superior a 1000 ppm, esta cantidad es equivalente a un gramo (gr) por kilogramo (kg). Como macronutrientes esenciales podemos encontrar al nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre.

Por otra parte, y de forma análoga, los micronutrientes son aquellos elementos minerales que se encuentran en entornos de 100 ppm = 0.1 gr por kg de materia seca, de acá destacan el hierro, manganeso, cobre, zinc y molibdeno (Calderón, 2000).

Los fertilizantes actualmente es un insumo agrícola indispensable para que los cultivos tengan un rendimiento de calidad, así como una mayor producción, estos son sustancias ricas en nutrientes las cuales se utilizan para el mejoramiento de las características del suelo y para un mayor desarrollo en cultivos.

Existen tres tipos de fertilizantes. Los fertilizantes químicos, los cuales son nutrientes que se elaboran a través de la mano del hombre y que, generalmente, son de origen

mineral, animal, vegetal o sintético. Dentro de este tipo de fertilizantes se encuentran los elaborados con nutrientes principales como lo son el nitrógeno, el fósforo y el potasio. Por otra parte, se encuentran los fertilizantes orgánicos, los cuales se formulan naturalmente o con una nula participación del hombre, son de origen mineral, animal, vegetal o mixto, un ejemplo de estos son el estiércol, con el que se elaboran compostas. Por último se encuentran los fertilizantes inorgánicos, que son sustancias derivadas de rocas y minerales las cuales se aplican en el suelo o en sustratos, esto para elevar la fertilidad de los cultivos, un ejemplo es la harina de roca. (secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2019)

#### **4. Microorganismos utilizados en la agricultura**

Existe una diversidad de microorganismos que actualmente son utilizados para la correcta funcionalidad en sistemas agrícolas, un amplio espectro de dichos organismos son las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV), estas son bacterias de diversas especies que favorecen el crecimiento y productividad vegetal. Entre los géneros más conocidos están las *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Azospirillum*. Las BPCV se clasifican en dos grupos, uno utiliza su metabolismo para la solubilización de fosfatos, para producir hormonas, para fijar nitrógeno, entre otras acciones, lo cual, otorga un beneficio a las diversas actividades enzimáticas e incrementa la adsorción de agua y minerales, así como el desarrollo en planta y raíz (Bashan y Holguin, 1998). El otro grupo consiste en que las BPCV tienen un control biológico, el cual promueve el crecimiento de la planta indirectamente, dando protección contra patógenos. (Bashan y Holguin, 1998).

A partir del 2013, el mundo alcanzo una población de 7 mil millones de habitantes, lo cual ha obligado a incrementar la producción de los alimentos para satisfacer necesidades de la población. Ante esto, se ha recurrido cada vez más al uso de fertilizantes, agroquímicos, sustratos, monocultivos, entre otras cosas. Una alternativa es la aplicación de los microorganismos benéficos al suelo en formulaciones que sirvan como bioinoculantes (Intagri, 2011).

Dichos microorganismos han sido aplicados en diversos productos agrícolas, como semillas, tubérculos o raíces ya que son capaces de colonizar y estimular el crecimiento de las plantas y los cultivos, mejorando así su rendimiento (Chanway *et al.*, 1989).

En la actualidad se han identificado numerosas bacterias con la capacidad de fijación de nitrógeno, sin embargo, solo algunas destacan por su potencial de ser utilizados como biofertilizantes, mismos que resultan de gran interés para productores. Entre los más destacados encontramos diversos géneros como *Beijerinckia*, *Derxia* , *Azospirillum* y *Azotobacter* siendo este último uno de los más destacados.

## **5. Genero *Azotobacter***

Beijerinck (1901) fue la primera persona que aisló y cultivó especies de *Azotobacter*. Más tarde, varias otras especies de *Azotobacter* han sido aisladas y descritas como *A.*

*vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. insignis*, *A. macrocytogenes*, *A. paspali*, *A. chroococcum*, *A. salinestris*, *A. armeniacus*, *A. brasilense*, *A. agilis*, *A. tropicalis* y *A. nigricans* (Mulder y Brontonegoro 1974; Page y Shivprasad 1991; Kizilkaya 2009). La diversidad y las aplicaciones beneficiosas de *Azotobacter* fueron bien documentadas por diferentes ecosistemas de las últimas dos décadas por su actividad promotora del crecimiento de las plantas para la agricultura sostenible (Aquilanti *et al.* 2004; Jiménez *et al.* 2011). Entre las diferentes especies, *A. chroococcum* y *A. vinelandii* son habitantes comunes que se encuentran en los suelos de la rizosfera. Su presencia en el suelo está influenciada por muchos factores como el pH del suelo, contenido de materia orgánica, calcio, fósforo, potasio y otros microorganismos presentes en el suelo (Rangaswami *et al.* 1964).

La familia *Azotobacteraceae* está representada por dos géneros, *Azotobacter* (Beijerinck, 1901) y *Azomonas* (Winogradsky, 1938). La eliminación de los géneros *Beijerinckia* y *Derxia* de *Azotobacteraceae* se basó en análisis cistron de ARNr (De Smedt *et al.*, 1980) y sus similitudes como se observa en el experimento de hibridación de ARNr (De Vos *et al.*, 1985). Tales experimentos mostraron que *Beijerinckia* y *Derxia* no están estrechamente relacionados con el género *Azotobacter* y *Azomonas*, pero que ellos pertenecen a otras subdivisiones o grupos, es decir, a subclases alfa y beta, respectivamente de Proteobacterias. Por otra parte, investigaciones sobre similitudes de rRNA de varias bacterias gramnegativas basadas en valores de  $t_m(e)$  de los híbridos dna-rRNA mostraron que *Azotobacter* y las *Azomonas* están estrechamente relacionadas entre sí y a la rama de *Pseudomonas* fluorescentes de ARNr.

La última rama o grupo pertenece a la Superfamilia I en la nomenclatura de De Ley y sus compañeros de trabajo o el grupo gamma/subdivisión o subclase de la bacteria púrpura definido por Woese *et al.* (1985a, 1985b) o el de las proteobacterias, según lo definido por Stackebrandt (1988).

El género *Azotobacteraceae* está caracterizado por bacterias asimbióticas y son aerobias heterotróficas, las cuales tienen como principal propiedad la capacidad de fijar molecularmente  $N_2$  atmosférico en nitrógeno-libre o medio de nitrógeno pobre con un compuesto orgánico de carbono (preferentemente azúcares, alcoholes o ácidos orgánicos) como fuente de energía. Sin embargo, la fijación de  $N_2$  no es exclusiva de esta familia, ya que pueden presentarla otras bacterias no relacionadas. Además, algunos representantes de esta familia pueden producir crecimiento asociativo con plantas superiores. Por estas razones, los representantes de esta familia generalmente se conocen como fijadores asimbióticos de N.

Los representantes de las *Azotobacteraceae* son habitantes regulares del suelo, incluidos los aéreos, polvo transportado, de hábitats acuáticos y superficie de plantas como el entorno externo de raíces (rizosfera) y hojas (filosfera).

*A. chroococcum* y *A. vinelandii* también se encuentran en hábitats marinos. Algunas especies proliferan mayormente en la rizosfera de plantas que, en el suelo mismo, y se ha demostrado en algunos casos que este crecimiento asociativo es benéfico para la planta porque el N se vuelve biodisponible (Döereiner, 1966).

Para *Azotobacter paspali* y el pasto *Paspalum notatum* la asociación parece ser más específica debido a la especie (Döbereiner, 1966, 1970). También en las superficies de las hojas miembros de este grupo (especialmente *A. chroococcum*) a menudo se encuentran principalmente en hojas envejecidas

La bacteria prolifera a expensas de los exudados ricos en azúcar y pobres en N de la planta. Los exudados actúan como una especie de medio de enriquecimiento. Para la filosfera, se ha sugerido que el N fijo está disponible para la planta (Ruinen, 1961).

El género *Azotobacter* son organismos de suelo, agua, rizosfera vegetal y filosfera; por lo tanto, todos estos sustratos pueden usarse como inóculo. Muchos miembros de este género producen grandes cantidades de limo capsular (polisacárido). No forman endosporas, pero algunas forman microquistes de paredes gruesas, que, a diferencia de las esporas, son células vegetativas enquistadas sin cambios citológicos antes de su germinación. Las células muestran motilidad por flagelos periticos o no son móviles. Las células son gramnegativas. Aunque algunas especies parecen ser variables de Gram (por ejemplo, lo establecido por, Jensen y Peterson, 1954; Kirakosyan y Melkonyan, 1964; Norris y Kingham, 1968; Johnstone, 1974), pero Thompson y Skerman (1979) atribuyen estos resultados a la decoloración incompleta de frotis gruesos

Las células son móviles en *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. armeniacus* y *A. paspali*, pero la motilidad está ausente en *A. beijerickii* y *A. nigricans*. (Hendrik, 2006).

## 6. Inmovilización celular

La inmovilización celular (IC) es un método caracterizado por restringir a las células a un área delimitada conservando sus actividades metabólicas, catabólicas y catalíticas (cita). Asimismo, dependiendo del tipo de inmovilización tanto las células como las enzimas pueden ser inmovilizadas de forma permanente o temporal para ser utilizadas repetida y continuamente en diversos procesos químicos. Por lo tanto, la inmovilización debería ser definida como una técnica capaz de reutilizar o dar uso continuo de biocatalizadores y células. Por lo tanto, la sencillez y el bajo costo de los métodos de inmovilización juegan un papel fundamental en la selección de protocolos de inmovilización. Es por ello que por medio de la inmovilización es posible no solo controlar la ubicación de las células o las enzimas sino también modificar sus propiedades selectivamente.

La investigación sobre inmovilización de organismos unicelulares ha generado gran interés en la comunidad científica, debido a sus ventajas técnicas y económicas. Entre las principales ventajas que presentan los sistemas biotecnológicos que utilizan células inmovilizadas se encuentra su facilidad para el manejo de una mayor densidad celular comparado con los procesos tradicionales, un mejor control en sistemas continuos y la posible recuperación de la biomasa para su posterior reutilización. Aunque cabe mencionarse que existen ventajas y desventajas en los métodos de inmovilización de las células microbianas, y los métodos generales ideales aplicables a la inmovilización de las

células aún no se han desarrollado plenamente. En general, los materiales para inmovilizar células deben cumplir importantes requisitos como: ser grado alimenticio (según sea el caso), bajo costo, disponibilidad, no degradables y aptos para condiciones de pH y temperatura bajas (Bakoyianis *et al.*, 1992 y 1996; Bardi y Koutinas, 1994; Fumi *et al.*, 1987; Shimobayashi y Tominaga, 1986). Los métodos de inmovilización de células más usados son la autofloculación (Verstrepen y Klis, 2006; Stewart y Russel, 1986), la adsorción sobre soportes (Bardi *et al.*, 1996) y la incorporación de levaduras en matrices sólidas.

Para llevar a cabo la IC se emplean diferentes técnicas de acuerdo con los objetivos de esta. Entre los principales métodos se emplea la floculación, adsorción a una superficie o matriz porosa, por enlace covalente, por atrapamiento, agregación natural y encapsulación, siendo esta última técnica la más utilizada (Fernández-López *et al.*, 2017).

Los principales usos de la IC han sido los procesos industriales y médicos cuya finalidad es la obtención eficiente de productos (aminoácidos, ácidos orgánicos, antibióticos y enzimas) (Najafpour 2007, Zucca y Sanjust 2014, Gotovtsev *et al.*, 2015). En los últimos años se ha retomado el interés por el uso de IC, especialmente en áreas como la biorremediación, control biológico, aplicación de agroquímicos, entre otras. Por su parte, la biodegradación de contaminantes es una de las más recientes y potenciales aplicaciones de la IC orientada a favorecer los procesos de degradación de diversas sustancias tóxicas (Fernandez-López *et al.*, 2017), ya que como se ha mencionado, en el área ambiental es frecuente encontrar limitaciones para la incorporación de microorganismos libres en los sitios a remediar. Es por ello por lo que surgió un interés renovado en el empleo de estas

técnicas con la finalidad de incrementar la productividad y viabilidad de células, así como mantener su actividad catalítica 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 y propiedades constantes para ser usados en agua y suelos.

Cuando se emplea la IC de microorganismos degradadores en los procesos de remoción y/o degradación de contaminantes, comúnmente se logran mayores rendimientos y porcentajes de remoción al incorporarlos bajo la protección de la inmovilización, surgiendo como una alternativa tecnológica ambiental. Sin embargo, Una limitante del uso de IC en la remediación in situ ha sido la supervivencia de los microorganismos en condiciones de confinamiento, su interacción con los materiales de soporte o atrapamiento y la estabilidad mecánica de los materiales empleados en la inmovilización.

A la fecha sólo algunas investigaciones se han enfocado en la búsqueda de alternativas para la optimización de tratamientos biológicos en la degradación de plaguicidas empleando métodos de IC. 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).

El método más estudiado para la aplicación práctica de la IC es la encapsulación por considerarse simple y efectivo (Adinarayana, Jyothi, Ellaiah, 2005). Este dispone de distintos materiales, en su mayoría geles poliméricos que mantienen a las células resguardadas al interior de una membrana, sin embargo, bajo este método pueden ocurrir restricciones relacionadas con la estabilidad de la matriz que se forma, además de la transferencia de masas por funcionar como un sistema de liberación lento (Kadakol, Kamanavalli y Shouche, 2011). En contraste, las técnicas que emplean la formación de biopelículas o atrapamiento celular aprovechan la agregación natural y las interacciones iónicas que las unen para mejorar las vías degradativas (Stewart, Ganesan y Solomon, 2015).

En este sentido, debido a que la estructura de los materiales para la IC está profundamente relacionada con la adherencia, actividad degradativa microbiana y conservación de dicha actividad, es fundamental la selección y búsqueda de soportes adecuados (Pattanasupong, 2004; Talwar y Ninnekar, 2015). Al respecto, distintos materiales y soportes han sido evaluados para potenciar la eficiencia de degradación de forma que se adecuen a las condiciones en las que serán requeridos (Pattanasupong, 2004; Khalid *et al.*, 2018). Entre las características que los materiales para IC deben poseer preferentemente son, nula toxicidad, estabilidad mecánica, eficiencia, practicidad y bajo costo, además de la capacidad de ser o formar superficies porosas para brindar las condiciones ideales de inmovilización (Pradeep y Subbaiah, 2016).

Los materiales, soportes o matrices que se han empleado para la encapsulación y atrapamiento de células en la degradación de plaguicidas son muy variados. Se pueden

distinguir algunos tanto inorgánicos como arcillas, silicatos, cristales, cerámica, tierra diatomácea, espuma de poliuretano, sol gel, poliacrilamida, agarosa, alcohol polivinílico, piedras volcánicas porosas y fibra de nylon; así como de origen orgánico como la celulosa, agares, alginatos, k-carragenina, quitina, colágeno, carbón activado, esponja de Loffa cylindrica, biochar, fibras de restos vegetales y granos.

## 7. Metanálisis

Especie	UFC	Sustrato	Cultivo	Resultados	Referencias
<i>Azospirillum brasilense</i> ; <i>Bacillus sphaericus</i>	-----	Solución nutritiva	Plátano	No hubo diferencia significativa entre tratamiento y testigo. Aumenta producción de materia seca	(Baset <i>et al.</i> ,2007)
<i>Ochrobactrum anthropi</i> ; <i>Micobacterium sp.</i> ; <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Sphingomonas sp.</i>	10 <sup>8</sup> UFC	Tezontle	Melón	No se encontraron diferencias significativas  <i>Bacillus cereus</i> dio mayor altura y el <i>Ochrobactrum anthropi</i> en el diametro	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2013)
				La mejor respuesta a la inoculación con diazótrofos se logrará utilizando variedades de caña de azúcar adaptadas a baja fertilidad en condiciones de bajo contenido de nitrógeno.	(Gomes <i>et al.</i> , 2019)
Diazotrofas			Caña de azúcar		
<i>Azospirillum lipoferum</i> AC45-II, A. <i>brasilense</i> AC46-I, A. <i>irakense</i> AC49- VII and A. <i>irakense</i> AC51- VI	10 <sup>8</sup> UFC/ml	Arena	Trigo	El máximo y mínimo de actividades de nitrogenasa se observaron en AC49-VII y AC45-II, respectivamente. En consecuencia, el más alto y	(Aliasgharзад <i>et al.</i> ,2014)

---

Las  
producciones  
mínimas de  
auxina se  
lograron con  
AC46-I y AC45-  
II,  
respectivamente.

Metaanálisis. *Índice de potencial de diversos sustratos y su uso como biofertilizante*

## **Planteamiento del problema**

En los sistemas hidropónicos cerrados, donde sí existe recirculación de SN, es más eficiente el uso del agua y los nutrimentos que se aplican para el crecimiento y desarrollo de un cultivo, ya que la SN que drena del sistema (drenaje) es captada y utilizada nuevamente en el mismo sistema de producción; sin embargo, un aspecto que limita la reutilización de la SN y con esto la eficiencia en el uso del agua y de los nutrimentos es la obtención de un rendimiento menor, disminución de la calidad, acumulación de toxinas (fitotoxicidad) deficiencias minerales y el riesgo de diseminación de microorganismos que causan enfermedad en la raíz del cultivo (Déniel *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2014).

La productividad refleja un uso eficiente del agua, en los sistemas hidropónicos y en especial los cerrados se pueden alcanzar ahorros de agua desde 20% (Sánchez del Castillo, *et al.*, 2014), 30 a 40% (Komosa *et al.*, 2011) o hasta 46% (Dasgan y Ekici, 2005).

Los sistemas hidropónicos con recirculación de la solución nutritiva ahorran agua y fertilizantes, pero con el tiempo es difícil mantener el balance nutricional y controlar las

enfermedades que atacan a la raíz, lo que causa un rendimiento menor respecto a sistemas donde dicha solución no se recircula (Sánchez Del Castillo, *et al.*, 2014).

Por ende, el inconveniente al que se afronta en un futuro de la producción de este tipo de AP se ve envuelta en temas delicados debido a diversidad de factores, y la encapsulación empleada en la actualidad no da una solución directa como la creación de un sustrato hidropónico.

### **Justificación**

La hidroponía es una tecnología para el cultivo de plantas en agua que contiene fertilizantes, con o sin el uso de un medio artificial para proveer soporte mecánico como arena, grava, vermiculita, lana de roca, etc. en sustitución del suelo, el cual al no emplearse limita a la planta de una inmensa diversidad bacteriana, en especial de RPCV como *A. brasilense*, *A. vinelandii* y *A. chroococcum* que benefician a las plantas por fijar nutrientes, sintetizar metabolitos reguladores de crecimiento, fitohormonas, entre otras sustancias. En el cultivo hidropónico se pueden adicionar las bacterias a la SN, no obstante, las condiciones químicas y físicas podrían reducir su viabilidad, en este sentido existen diferentes métodos para conservarlas, sin embargo, la inmovilización celular en tezontle posibilita el contacto de microorganismos con la planta.

### **Hipótesis**

La encapsulación radicular con *A. vinelandii* en tezontle permite su establecimiento en la rizosfera y favorece el desarrollo de microgreens cultivadas en un sistema hidropónico.

### **Objetivos.**

Evaluar el efecto de *A. vinelandii* inmovilizadas en tezontle en la producción de microgreens mediante técnicas microbiológicas y moleculares para el desarrollo de un sustrato hidropónico

### **Objetivos específicos**

- Determinar la viabilidad de *A. vinelandii* inmovilizados en tezontle de diferentes granulometrías y expuestas a un sistema hidropónico cerrado.
- Cuantificar en plantas de amaranto, arugula y chia  $\text{NO}_3$ , Ca, P, K, Mg.
- Determinar el largo de raíz, tallo, número de hojas, peso fresco y peso seco de amaranto, arugula y chia.



### Capítulo 3 Artículo científico

#### **Evaluación de *Azotobacter vinelandii* atcc 12837 inmovilizada en tezontle para la producción de microgreens**

#### **Evaluation of *Azotobacter vinelandii* atcc 12837 immobilized in tezontle for the production of microgreens**

Luis Rene Pinto<sup>1</sup> Luis Daniel Ortega Martinez<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Biotecnología, Decanato de Ciencias Biológicas, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, 21 sur 1103, Barrio de Santiago, C.P. 72410, Puebla, Pue., México.

\*Autor de correspondencia [Luisdaniel.ortega@upaep.mx](mailto:Luisdaniel.ortega@upaep.mx)

#### **Resumen**

En la actualidad la población mundial crece de manera exponencial, es por ello que una de las grandes problemáticas a resolver en el mundo actualmente es la demanda de alimentos, su mejoramiento nutricional, así como su rápida producción. Es así que uno de los productos con mayor aceptación actualmente son los microgreens los cuales son plántulas comestibles jóvenes y tiernas, producidas a partir de semillas de varias especies. En los últimos años se ha acelerado su producción y consumo, siendo una tendencia creciente a nivel mundial. Para ello se han contado con diversas herramientas para su producción, la agricultura protegida por ejemplo cuenta con los sistemas hidropónicos el cual es un sistema de producción en donde las plantas crecen en agua con fertilizantes sin necesidad de suelo, por ende, se ven limitadas a la diversidad de microorganismos edáficos. *A. vinelandii*, destaca entre las bacterias rizosféricas promotoras de crecimiento vegetal ya que las favorece asimbióticamente al fijar nutrientes, sintetizar metabolitos reguladores, fitohormonas y antibióticos. Cuando se utilizan microorganismos en hidroponía, son agregados a la solución nutritiva o inoculados en el trasplante, sin embargo, las condiciones

químicas y físicas del medio reducen su viabilidad. Existen diferentes métodos para mejorar su sobrevivencia y efectividad, uno de ellos es la inmovilización celular sin embargo son escasas las investigaciones que propongan la inmovilización en un sustrato, más específico, en el Tezontle. En este sentido, nuestro objetivo fue evaluar el efecto de un sustrato hidropónico (Tezontle) inoculado con *A. vinelandii* para la producción de microgreens. Los resultados mostraron un aumento en el tamaño y peso de raíces en los tratamientos con el sustrato hidropónico e igual concentración de nitratos para todos los tratamientos excepto el testigo.

### **Abstract**

Nowadays the world population grows exponentially, which is why one of the great problems to be solved in the world today is the demand for food, its nutritional improvement as well as its rapid production. Thus, one of the most widely accepted products currently are microgreens, which are young and tender edible seedlings, produced from seeds of various species. In recent years its production and consumption has accelerated, being a growing trend worldwide. For this, they have had various tools for their production, protected agriculture, for example, has hydroponic systems, which is a production system where plants grow in water with fertilizers without the need for soil, therefore, they are limited to the diversity of edaphic microorganisms. *A. vinelandii* stands out among the rhizospheric bacteria that promote plant growth since it favors them asymbiotically by fixing nutrients, synthesizing regulatory metabolites, phytohormones and antibiotics. When microorganisms are used in hydroponics, they are added to the nutrient solution or inoculated in the transplant; however, the chemical and physical conditions of the medium reduce their viability. There are different methods to improve their survival and effectiveness, one of them is cell immobilization, however there are few investigations that propose immobilization in a more specific substrate in the Tezontle. In this sense, our objective was to evaluate the effect of a hydroponic substrate (Tezontle) inoculated with *A. vinelandii* for the production of microgreens. The results showed an increase in the size and weight of the roots in the treatments with the hydroponic substrate and the same concentration of nitrates for all the treatments except the control.

## Introducción

La producción de hortalizas en México genera recursos económicos principalmente por alto consumo, mismo que impacta en la salud humana (Baslam et al., 2013). Su consumo reduce enfermedades cardiovasculares, cáncer, entre otras (Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zeballos, 2009).

Sin embargo, los sistemas agrícolas convencionales han generado problemas de salud y al medio ambiente por el uso excesivo de fertilizantes y plaguicidas, lo que ha obligado a la búsqueda de alternativas para la producción hortícola, como la agricultura protegida (AP). La AP modifica la forma de producir alimentos minimizando las restricciones, efectos y fenómenos climáticos adversos (Moreno Reséndez, 2011).

Una de las principales estrategias de producción en la AP es la hidroponía (Velasco et al., 2016), la cual disminuye el impacto ambiental ocasionado por fertilizantes (Croitoru et al., 2015). Se caracteriza por ser una tecnología para el cultivo vegetal en agua que contiene fertilizantes con o sin el uso de un medio artificial en sustitución al suelo para proveerla de soporte mecánico como arena, grava, vermiculita, lana de roca, etc (Baca et al., 2016; De la Rosa-Rodríguez et al., 2016; Nisha, Somen, Kaushal, Narendra, y O.P. Chaurasia, 2018).

Con frecuencia, también llamados “confeti de verduras”, los microgreens son verduras tiernas las cuales son utilizadas para realzar color, textura o sabor de ensaladas, o simplemente para adornar una amplia variedad de platillos. Son la primera verdadera etapa de la hoja y se vende con el tallo, cotiledones (hojas de semillas) y las primeras hojas adheridas. La producción de microgreens puede realizarse desde el hogar, siendo una actividad relativamente fácil. Sin embargo, el tiempo de la cosecha varía mucho de un cultivo a otro (Food and Drug Administration, 2019).

Actualmente ha crecido el interés por los alimentos frescos y funcionales, esto ha sido aún más impulsado por el creciente interés que tienen los consumidores por hacerse

de dietas las cuales favorezcan a la salud y a llegar a la longevidad. Los microgreens acumulan un potencial inmenso para adaptarse a una producción a microescala y, por ende, para mejorar el valor nutricional en la dieta humana.

En el estudio de la nutrición de las plantas se entiende por macronutrientes elementos minerales que forman parte de materia seca de vegetales, los cuales tienen una proporción superior a 1000 ppm, esta cantidad es equivalente a un gramo (gr) por kilogramo (kg). Como macronutrientes esenciales podemos encontrar al nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre.

Por otra parte, y de forma análoga, los micronutrientes son aquellos elementos minerales que se encuentran en entornos de 100 ppm = 0.1 gr por kg de materia seca, de acá destacan el hierro, manganeso, cobre, zinc y molibdeno (Calderón, 2000).

Los fertilizantes actualmente es un insumo agrícola indispensable para que los cultivos tengan un rendimiento de calidad, así como una mayor producción, estos son sustancias ricas en nutrientes las cuales se utilizan para el mejoramiento de las características del suelo y para un mayor desarrollo en cultivos.

Existen tres tipos de fertilizantes. Los fertilizantes químicos, los cuales son nutrientes que se elaboran a través de la mano del hombre y que, generalmente, son de origen mineral, animal, vegetal o sintético. Dentro de este tipo de fertilizantes se encuentran los elaborados con nutrientes principales como lo son el nitrógeno, el fósforo y el potasio. Por otra parte, se encuentran los fertilizantes orgánicos, los cuales se formulan naturalmente o con una nula participación del hombre, son de origen mineral, animal, vegetal o mixto, un ejemplo de estos son el estiércol, con el que se elaboran compostas. Por último se encuentran los fertilizantes inorgánicos, que son sustancias derivadas de rocas y minerales las cuales se aplican en el suelo o en sustratos, esto para elevar la fertilidad de los cultivos, un ejemplo es la harina de roca. (secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2019)

Existe una diversidad de microorganismos que actualmente son utilizados para la correcta funcionalidad en sistemas agrícolas, un amplio espectro de dichos organismos son las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV), estas son bacterias de diversas especies que favorecen el crecimiento y productividad vegetal. Entre los géneros más conocidos están las *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Azospirillum*. Las BPCV se clasifican en dos grupos, uno utiliza su metabolismo para la solubilización de fosfatos, para producir hormonas, para fijar nitrógeno, entre otras acciones, lo cual, otorga un beneficio a las diversas actividades enzimáticas e incrementa la adsorción de agua y minerales, así como el desarrollo en planta y raíz (Bashan y Holguin, 1998). El otro grupo consiste en que las BPCV tienen un control biológico, el cual promueve el crecimiento de la planta indirectamente, dando protección contra patógenos. (Bashan y Holguin, 1998).

La inmovilización celular (IC) es un método caracterizado por restringir a las células a un área delimitada conservando sus actividades metabólicas, catabólicas y catalíticas (cita). Asimismo, dependiendo del tipo de inmovilización tanto las células como las enzimas pueden ser inmovilizadas de forma permanente o temporal para ser utilizadas repetida y continuamente en diversos procesos químicos. Por lo tanto, la inmovilización debería ser definida como una técnica capaz de reutilizar o dar uso continuo de biocatalizadores y células. Por lo tanto, la sencillez y el bajo costo de los métodos de inmovilización juegan un papel fundamental en la selección de protocolos de inmovilización. Es por ello que por medio de la inmovilización es posible no solo controlar la ubicación de las células o las enzimas sino también modificar sus propiedades selectivamente.

La investigación sobre inmovilización de organismos unicelulares ha generado gran interés en la comunidad científica, debido a sus ventajas técnicas y económicas. Entre las principales ventajas que presentan los sistemas biotecnológicos que utilizan células inmovilizadas se encuentra su facilidad para el manejo de una mayor densidad celular comparado con los procesos tradicionales, un mejor control en sistemas continuos y la posible recuperación de la biomasa para su posterior reutilización. Aunque cabe mencionarse que existen ventajas y desventajas en los métodos de inmovilización de las

células microbianas, y los métodos generales ideales aplicables a la inmovilización de las células aún no se han desarrollado plenamente. En general, los materiales para inmovilizar células deben cumplir importantes requisitos como: ser grado alimenticio (según sea el caso), bajo costo, disponibilidad, no degradables y aptos para condiciones de pH y temperatura bajas (Bakoyianis et al., 1992 y 1996; Bardi y Koutinas, 1994; Fumi et al., 1987; Shimobayashi y Tominaga, 1986). Los métodos de inmovilización de células más usados son la autofloculación (Verstrepen y Klis, 2006; Stewart y Russel, 1986), la adsorción sobre soportes (Bardi et al., 1996) y la incorporación de levaduras en matrices sólidas.

Para llevar a cabo la IC se emplean diferentes técnicas de acuerdo con los objetivos de esta. Entre los principales métodos se emplea la floculación, adsorción a una superficie o matriz porosa, por enlace covalente, por atrapamiento, agregación natural y encapsulación, siendo esta última técnica la más utilizada (Fernández-López et al., 2017).

Por lo antes mencionado el objetivo del presente fue evaluar *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 inmovilizada en tezontle para la producción de microgreens

## Resultados

El peso fresco, así como la captación de No3 presentan diferencias significativas entre tratamientos, de igual manera una variable que presenta las diferencias significativas es el tamaño de granulometría de el tezontle, proporcionado por Bastida *et al.* sin embargo, se destaca la ventaja costo beneficio del uso de MO's a comparación de fertilizantes sintéticos.

ANOVA TUKEY						
Variable	Subconjunto para alfa = 0.01					
	Peso fresco	Largo de Raiz	No3	K++	Na	Ca++
Tezontle granulometria .1 cm - Testigo	2.5e	3.5cd	15.5e	10c	4d	3b
Tezontle granulometria .5 cm - Testigo	2.8de	3.3cd	15.3e	11.3c	6abc	2.6b
Tezontle granulometria 1 cm - Testigo	2.9d	3d	16.6e	10.6c	7a	2.6b
Tezontle granulometria .1 cm - Bacteria inmovilizada	3.8c	4.3abc	29.3ab	17a	4.3cd	3.6ab
Tezontle granulometria .5 cm - Bacteria inmovilizada	4c	5.3abc	32.3a	12.6bc	6.6ab	5ab
Tezontle granulometria .1 cm - SN	5b	5.3abc	24.6cd	16ab	5bcd	4ab
Tezontle granulometria .5 cm - SN	5.3a	5.3abc	23cd	17.3a	6abc	6a
Tezontle granulometria 1 cm - Bacteria inmovilizada	5.4a	5.3abc	27bc	12c	6abc	3b
Tezontle granulometria 1 cm- SN	5.5a	5.3abc	22.6d	17.3a	4.6cd	4.3ab

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 2.842.  
b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Correlaciones						
	Largo de raíz	No3	k	Na	Ca	Particula
Biomasa	.821**	.538**	.685**	-0.068	.503**	-.623**
Largo de raíz	1	.611**	.677**	-0.057	.754**	-.527**
no3		1	.458*	0.006	.445*	-.877**
k			1	-0.338	.555**	-0.323
Na				1	0.007	-0.098
Ca					1	-0.307

\*\* . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

\* . La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

De igual manera se destacan las correlaciones significativas en biomasa, largo de raíz, y captación de calcio, tal y como lo menciona Canovas y Castellanos (2009).

## Referencias

Baslam, m., garmendia, i., & goicoechea, n. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi (amf)

improved growth and nutritional quality of greenhouse-grown lettuce. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(10), 5504–5515.

<https://doi.org/10.1021/jf200501c>

Moreno-medina da, sánchez-salinas e, ortiz-hernández ml. 2014. Removal of methyl parathion and coumaphos pesticides by a bacterial consortium immobilized in luffa cylindrica. *Revista internacional de contaminacion ambiental*. 30:51–63.

<http://scielo.unam.mx/pdf/rica/v30n1/v30n1a5.pdf>.

Croitoru m. D., d. L. Muntean, i. Fülöp and a. Modroiu (2015) growing patterns to produce ‘nitrate-free’ lettuce (*lactuca sativa*). *Food additives & contaminants: part a* 32:80-86, <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.979887> cunha a. R. Da, i.

Velasco, e., roth, m., norford, l., & molina, l. T. (2016). Does urban vegetation enhance carbon sequestration? *Landscape and urban planning*, 148, 99–107.

<https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2015.12.003>

Baca c g a, b s alcalde, g a martínez, l r james, i d barrera(1991) efecto de la solución nutritiva, riego, el sustrato y la densidad de siembra en tres cultivos hortícolas en la hidroponía al aire libre. li melón y jitomate. *Agrociencia* 2:33-55.

Food and Drug Administration. 2019. Draft Guidance for Industry: Reducing Microbial Food Safety Hazards in the Production of Seed for Sprouting. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/draft-guidance-industry-reducing-microbial-food-safetyhazards-production-seed-sproutin>

Bashan, Y. y G. Holguin. 1998. A proposal for the division of "plant growth-promoting rhizobacteria" into two classifications: biocontrol-plant growth-promoting bacteria and plant growth-promoting bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1225-1228.

## **Metodología**

### **2. Área de estudio**

La investigación se desarrolló en las inmediaciones de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, con coordenadas 19°02'55"N 98°12'59"O. Específicamente, en los laboratorios de la facultad de ciencias biológicas, de la misma manera, se hará uso de los invernaderos de la empresa BioDIY.

Se utilizó un sistema hidropónico cerrado.

### **3. Cepas de estudio**

Las cepas fueron obtenidas 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 gr/L-1: extracto de levadura, 1; D-manitol, 5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1; pH 7±0.05). Se inocularon matraces Erlenmeyer de 1000 mL con 250 mL de medio de cultivo NBRC y 250 gr de sustrato y se cultivaron a 28° C por 72h a 120 rpm para obtener la máxima población bacteriana.

### **4. Inmovilización celular**

Las bacterias diasotrofaz fueron obtenidas después de la preparación del inóculo. Se determinó las características físicas de los germinados. Se inoculó en el medio NRBC en donde se colocará el tezontle con diferentes tamaños de partículas (1, 0.5 y 0.1 cm) para la retención de humedad, en donde la actividad del espacio poroso total logró la inmovilización de las bacterias en el sustrato. Los tratamientos fueron los tamaños de partículas (1, 0.5 y 0.1 cm) y el testigo (tezontle).

### **5. Determinación de los parámetros**

Se realizaron mediciones cada 72 horas posteriores al trasplante y se realizaron mediciones del germinado utilizando una cinta milimétrica (con error de lectura de 0.05 cm). Los puntos de referencia fue el tamaño del germinado. Las concentraciones de NO<sub>3</sub>, Ca, Mg, Na, K, mediante los sensores horiba®

## **6. Extracción de ADN de las diazotrofas y su análisis por PCR en tiempo real**

La extracción de ADN genómico de las diazotrofas se realizó 3 meses después de la inoculación empleando el kit Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymoresearch) de muestras de suelo y de raíces de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Para la amplificación por PCR se usó 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 serán analizadas por duplicado. La reacción se llevará a cabo en un termociclador Rotor-Gene® Q Series 6000 software 2.3.1 (QIAGEN). El programa de ciclado será 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 las ampliaciones,

se generará una curva de disociación aplicando un gradiente de temperatura creciente de 55°C a 99°C.

## **7. Diseño y análisis estadístico**

Se empleo un diseño de bloques completamente al azar con 3 repeticiones por tratamiento. Para el análisis estadístico se aplicó un ANOVA de una vía y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey con el programa estadístico SPSS<sup>®</sup>. Se consideró un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Los datos se presentan como valores medios  $\pm$  desviaciones estándar.

## **Resultados y discusión**

## **Bibliografía**

Abad, m. Y p. Noguera. 1997. Los sustratos en los cultivos sin suelo. Pp. 101-150. In:

manual de cultivo sin suelo. M. Urrestarazu (ed.). Universidad de almería. Servicio de publicaciones.

Adinarayana K, Jyothi B, Ellaiah P. 2005. Production of alkaline protease with immobilized

cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique. AAPS.

Pharmaceutical Science & Technology. 6:E391–E397. doi: 10.1208/pt060348

Alarcón V. A. (2006) Proyectos en cultivo sin suelo ¿Cómo empezar? In: Cultivos sin Suelo.

V. A. Alarcón (ed.). Compendios de Horticultura 17. Ediciones de Horticultura, S. L.

Reus. España. pp:11-21.

AMHPAC, Asociación Mexicana de Horticultura Protegida A. C. (2013) Mexico boasts

nearly 21 thousand hectares under protected agriculture.

<http://www.houseofproduce.com/news/production/?storyid=141> (Octubre 2013).

- Baca c g a, b s alcalde, g a martínez, l r james, i d barrera(1991) efecto de la solución nutritiva, riego, el sustrato y la densidad de siembra en tres cultivos hortícolas en la hidroponía al aire libre. li melón y jitomate. *Agrociencia* 2:33-55.
- Bashan, Y. y G. Holguin. 1998. A proposal for the division of "plant growth-promoting rhizobacteria" into two classifications: biocontrol-plant growth-promoting bacteria and plant growth-promoting bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1225-1228.
- Baslam, m., garmendia, i., & goicoechea, n. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi (amf) improved growth and nutritional quality of greenhouse-grown lettuce. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(10), 5504–5515.  
<https://doi.org/10.1021/jf200501c>
- Bastida a (1999) el medio de cultivo de las plantas. Sustratos para hidroponía y producción de plantas ornamentales. Serie de publicaciones agribot no. 4 uach. Preparatoria agrícola, chapingo, mex. 72 p.
- Beneficial bacteria and fungi in hydroponic systems: types and characteristics of hydroponic food production methods. (2015, 12 noviembre). Sciencedirect.  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423815301758>
- Cánovas M. F. y C. J. Magán (2003) Cultivos sin suelo. In: Técnicas de Producción en Cultivos Protegidos. F. F. Camacho (ed). Instituto Cajamar. Madrid, España. pp:409-453
- Castellanos j z, p vargas tapia (2003) el uso de sustratos en la horticultura bajo invernadero. In: manual de producción hortícola en invernadero. J z castellanos (ed). 2a ed. Intagri. México. Pp:124-150

- Castellanos, J. Z.; Borbón M., C. 2009. Panorama de la horticultura en México. pp. 1-18. In: J.Z. Castellanos (Ed.). Manual de producción de tomate en invernadero.1ª ed. INTAGRI. México.
- Chanway, C.P., R.K. Hynes y L.M. Nelson. 1989. Plant growthpromoting rhizobacteria: Effects on growth and nitrogen fixation of lentil (*Lens esculenta* Moench.) and pea (*Pisumsativum* L.). *Soil Biol. Biochem.* 21: 511-517.
- Conde-avila, v., ortega-martínez, l. D., loera, o., el kassis, e. G., dávila, j. G., valenzuela, c. M., & armendáriz, b. P. (2020). Pesticides degradation by immobilised microorganisms. *International journal of environmental analytical chemistry*, 1–31. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1715375>
- Croitoru m. D., d. L. Muntean, i. Fülöp and a. Modroiu (2015) growing patterns to produce ‘nitrate-free’ lettuce (*lactuca sativa*). *Food additives & contaminants: part a* 32:80-86, <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.979887> cunha a. R. Da, i.
- Fernández-López MG, Popoca-Ursino C, Sánchez-Salinas E, Tinoco-Valencia R, Folch-Food and Drug Administration. 2019. Draft Guidance for Industry: Reducing Microbial Food Safety Hazards in the Production of Seed for Sprouting. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/draft-guidance-industry-reducing-microbial-food-safetyhazards-production-seed-sproutin>
- Franck déniel, david renault, yves tirilly, georges barbier, patrice rey. A dynamic biofilter to remove pathogens during tomato soilless culture. *Agronomy for sustainable development*, springer verlag/edp sciences/inra, 2006, 26 (3), pp.185-193. Ffhal-00886353

Fumi, M., Trioli, G. y Colagrande, O. 2017. Preliminary assessment on the use of immobilized yeast cells in sodium alginate for sparkling wine processes. *Biotechnology Letters*. 9(5): 339–342

Giuffrida F. and C. Leonardi (2009) Nutrient solution concentrations in soilless closed system. *Acta Horticulturae* 807:463-468.

Gonzalez Chingaté, E. J., Liévano, K. S., & Cubillos, D. D. (2020). Evaluación de la efectividad de antagonismo de *Trichoderma* sp. sobre diferentes hongos Fitopatógenos presentes en el cultivo de maíz (*Zea mays*). *Ciencias agropecuarias*, 6(1), 19–34. <https://doi.org/10.36436/24223484.279>

Gotovtsev PM, Yu E, Yuzbasheva KV, Gorin V V, Butylin GU, Badranova NI, Perkovskaya EB, Mostova ZB, Namsaraev NI, Rudneva AV, Komova RG, Vasilov, Sineokii SP. 2015. Immobilization of microbial cells for biotechnological production: Modern solutions and promising technologies. *Journal: Applied Biochemistry and Microbiology*. 51(8): 792. doi:10.1134/S0003683815080025

Hernández, B. (2017). Evaluación del rendimiento en sistemas hidropónicos. Universidad Autónoma del Estado de México. México.

Huang W. Y. (2009) Factors Contributing to the Recent Increase in U.S. Fertilizer Prices, 2002-08. *Agricultural Resources Situation and Outlook Number AR-33*. U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service, Washington, DC. 21 p

Inden, h. And torres, a. (2004) comparison of four substrates on the growth and quality of tomatoes. *Acta horoticultureae*, 644, 205-215.

Jesitha K, Nimisha KM, Manjusha CM, Harikumar PS. 2015. Biodegradation of Endosulfan by *Pseudomonas fluorescens*. *Environmental Processes*. 2(1): 225–240. doi:

<https://doi.org/10.1007/s40710-015-0059-5>

Jimenez DJ, Montana JS, Martinez MM (2011) Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter* in organic vegetable grown Colombian soils. *Braz J Microbiol* 42:846–858

Kadakol JC, Kamanavalli CM, 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>

Khalid S, Han J-I, Hashmi I, Hasnain G, Ahmed MA, Khan SJ, Arshad M. 2018. Strengthening calcium alginate microspheres using polysulfone and its performance evaluation: Preparation, characterization and application for enhanced biodegradation of chlorpyrifos. *Science of The Total Environment*. 631–632:1046-1058. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.101

Komosa, a., piróg, j., weber, z., & markiewicz, b. (2011). Comparison of yield, nutrient solution changes and nutritional status of greenhouse tomato grown in recirculating and non-recirculating nutrient solution systems. *Journal of plant nutrition*, 34(10), 1473–1488. <https://doi.org/10.1080/01904167.2011.585204>

Kyriacou, M. C., Roupael, Y., di Gioia, F., Kyrtziz, A., Serio, F., Renna, M., de Pascale, S., & Santamaria, P. (2016). Micro-scale vegetable production and the rise of

microgreens. *Trends in Food Science & Technology*, 57, 103–115.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.005>

Massa D., L. Incrocci, R. Maggini, G. Carmassi, C. A. Campiotti and A. Pardossi (2010)

Strategies to decrease water drainage and nitrate emission from soilless culture of greenhouse tomato. *Agriculture Water Management* 97:971-980.

Moreno-medina da, sánchez-salinas e, ortiz-hernández ml. 2014. Removal of methyl parathion and coumaphos pesticides by a bacterial consortium immobilized in luffa cylindrica. *Revista internacional de contaminacion ambiental*. 30:51–63.

[Http://scielo.unam.mx/pdf/rica/v30n1/v30n1a5.pdf](http://scielo.unam.mx/pdf/rica/v30n1/v30n1a5.pdf).

Najafpour RG. 2007. *Biochemical Engineering and Biotechnology*. Elsevier, Holanda. ISBN:

9780080468020. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/biochemical-engineering-and-biotechnology/najafpour/978-0-444-52845-2>

Nakano Y., H. Sasaki, A. Nakano, K. Suzuki and M. Takaichi (2010) Growth and yield of tomato plants as influenced by nutrient application rates with quantitative control in closed rockwool cultivation. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 79:47-55

Nannipieri, p. Et al., 2003. Microbial diversity and soil functions. *European journal of soil science*, 54, 655–670.

Ortega Martínez, Luis Daniel, Martínez Valenzuela, Carmen, Ocampo Mendoza, Juventino, Sandoval Castro, Engelberto, & Pérez Armendáriz, Beatriz. (2016). Eficiencia de sustratos en el sistema hidropónico y de suelo para la producción de tomate en invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(3), 643-653. Recuperado en 10 de noviembre de 2021, de

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342016000300643&lng=es&tlng=es.](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000300643&lng=es&tlng=es)

Ponce C. P. (2013) Panorama de la Agricultura Protegida en México.

<http://www.hortalizas.com/articulo/35512/panorama-de-laagricultura-protegida-en-mexico> (Julio 2013).

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

Raviv M. and H. Lieth (2008) Significance of soilless culture in agriculture. In: *Soilless Culture Theory and Practice*. M. Raviv and H. Lieth (eds.). Ed. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. pp:1- 11.

Rucoba, A., Abraham, R., Núñez, H., García, D., López, E. (2014). Calidad, comercialización y rentabilidad de fresa en el sistema de producción tradicional y agroecológico en Guanajuato. *10(3)*. 334-349.

[www.custoseagronegocioonline.com.br/numero3v10/Artigo%2015%20fresa.pdf](http://www.custoseagronegocioonline.com.br/numero3v10/Artigo%2015%20fresa.pdf)

San Martín-Hernández, Cesar, Ordaz-Chaparro, Victor M., Sánchez-García, Prometeo, Beryl Colinas-Leon, María T., & Borges-Gómez, Lizette. (2012). Calidad de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) producido en hidroponia con diferentes granulometrías de tezontle. *Agrociencia*, 46(3)

Sánchez, F. (2021). Diferencias entre la Agricultura Tradicional y Agricultura Moderna.

<https://fidelsanchezalayo.com/diferencias-entre-la-agricultura-tradicional-y-agricultura-moderna/>

Sánchez-del-Castillo F., E. del C Moreno-P., E. Contreras-M. y E. V. González (2006)

Reducción del ciclo de crecimiento en pepino europeo mediante trasplante tardío.

Revista Fitotecnia Mexicana 29:87-90.

Sánchez-del-Castillo, Felipe, González-Molina, Lucila, Moreno-Pérez, Esaú del C., Pineda-

Pineda, Joel, & Reyes-González, C. Efraín. (2014). Dinámica nutrimental y

rendimiento de pepino cultivado en hidroponía con y sin recirculación de la

solución nutritiva. Revista fitotecnia mexicana, 37(3), 261-269. Recuperado en 27

de octubre de 2021, de

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-)

[73802014000300013&lng=es&tlng=es.](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802014000300013&lng=es&tlng=es)

Sharma, n., acharya, s., kumar, k., singh, n., & chaurasia, o. (2018). Hydroponics as an

advanced technique for vegetable production: an overview. *Journal of soil and*

*water conservation*, 17(4), 364. <https://doi.org/10.5958/2455-7145.2018.00056.5>

Stewart EJ, Ganesan M, Solomon MJ. 2015. Artificial biofilm establish the role of matrix

interactions in staphylococcal biofilm assembly and disassembly. *Scientific Reports*.

5: 1–14. doi: 10.1038/srep13081

Talwar MP, Ninnekar HZ. 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

Velasco, e., roth, m., norford, l., & molina, l. T. (2016). Does urban vegetation enhance

carbon sequestration? *Landscape and urban planning*, 148, 99–107.

<https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2015.12.003>

Zucca P, Sanjust E. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization:

Methods and Mechanisms. *Molecules*. 2014; 19(9):14139-14194.

<https://doi.org/10.3390/molecules190914139>