



UNIVERSIDAD POPULAR AUTONOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

DECANATO DE CIENCIAS BIOLOGICAS

FACULTAD DE BIOTECNOLOGIA

Título de tesis:

Encapsulación radicular de *Lactuca* sp. con alginato-Na y
Azotobacter vinelandii en sistema hidropónico

Tesis

Para obtener el título de:
Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:

Luis René Pinto Trinidad

DIRECTOR DE TESIS:

M.C. Victoria Conde Avila

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Luis Daniel Ortega Martínez



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.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se lo dedico con todo el amor y cariño a mi familia, a mis padres, Gilda Trinidad fuentes y René Pinto Ruiz, de igual forma a mi hermano Gilberto David, quien a pesar de todas las circunstancias nos apoyamos en lo que podíamos y siempre estábamos pendientes el uno del otro, gracias por su eterno sacrificio para darme la oportunidad de estudiar en la UPAEP así también les agradezco su enorme esfuerzo para darme una carrera. Dedicado de igual forma a mis abuelos quienes siempre estuvieron pendientes de mi y siempre me incluían en sus oraciones.

A mis compañeros y amigos presentes y pasados, quienes sin esperar nada a cambio compartieron todo el tiempo conmigo a lo largo de estos cinco años, gracias por compartir conocimientos, muchas alegrías y por siempre estar en las tristezas.

Gracias al Dr. Luis Daniel Ortega Martínez y a la Maestra Victoria Conde Avila por su eterna confianza y por brindarme todas las herramientas necesarias a lo largo de este proyecto.

Por último, gracias a mi alma mater, la UPAEP, gracias porque en sus instalaciones sin duda alguna además de adquirir todos los conocimientos que ofrecen pase los mejores instantes de mi vida universitaria.

Gracias a todos, gracias totales.

Contenido

Resumen	4
Abstract CORREGIR SEGUN CAMBIOS	4
Introducción.....	5
Capítulo 1: Marco Teórico	6
1.1 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV)	6
1.2 Efectos en la planta y la raíz.....	8
1.3 El género <i>Azotobacter</i>	9
1.4 Bacterias <i>Azotobacter vinelandii</i>	12
1.5 Inmovilización de células.....	14
1.6 Hidroponía	21
Capítulo 2: Propósitos y organización.....	25
1.1 Objetivos	25
1.1.1 Objetivo general	25
1.1.2 Objetivos específicos	25
1.2 Justificación	25
1.3 Hipótesis	26
Capítulo 3: Encapsulación radicular con alginato-Na y <i>Azotobacter vinelandii</i> en un sistema hidropónico	26
Referencias bibliográficas.....	36

Resumen

La hidroponía es un sistema de producción en el que las plantas crecen en una solución nutritiva (SN) que consta de agua con fertilizantes en ausencia de suelo, por lo que se ven limitadas de 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 SN 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 con alginato-Na, no obstante, son escasas las investigaciones que propongan el atrapamiento de microorganismos en raíces encapsuladas para su uso en sistemas de cultivo hidropónico. En este sentido, nuestro objetivo fue evaluar el efecto de la encapsulación radicular de *Lactuca* sp. con alginato-Na y *A. vinelandii* en un sistema hidropónico. Los resultados mostraron un aumento en el tamaño y peso de raíces en los tratamientos con encapsulación e igual concentración de nitratos para todos los tratamientos excepto el testigo. Pese a lo anterior, no resultó positiva la amplificación de ADN genómico de *A. vinelandii* en extracciones de raíces que procedían de dichos tratamientos.

Abstract

Hydroponics is a production system in which plants grow in a nutrient solution (SN) consisting of water with fertilizers in the absence of soil, so they are limited in the diversity of edaphic microorganisms. *A. vinelandii*, stands out among the rhizospheric bacteria that promote plant growth since it assimilates them favorably by fixing nutrients, synthesizing regulatory metabolites, phytohormones and antibiotics. When microorganisms are used in hydroponics, they are added to the SN 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 with alginate-Na, however, there are few investigations that propose the entrapment of microorganisms in encapsulated roots for use in hydroponic culture systems. In this sense, our objective was to evaluate the effect of root encapsulation of *Lactuca sp.* with alginate-Na and *A. vinelandii* in a hydroponic system. The results showed an increase in the size and weight of roots in treatments with encapsulation and the same concentration of nitrates for all treatments except the control. Despite the above, the genomic DNA amplification of *A. vinelandii* in root extractions that came from these treatments was not positive.

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). 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 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).

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 rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) como *A. vinelandii*, 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 Jiyoung Leea, 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). En variadas investigaciones destacan los beneficios de la técnica, no obstante, se ha evaluado escasamente la encapsulación radicular con alginato-Na y *A. vinelandii* en sistema hidropónico. El objetivo fue evaluar el efecto de la encapsulación radicular de *Lactuca* sp. con alginato-Na y *A. vinelandii* en un sistema hidropónico.

Capítulo 1: Marco Teórico

1.1 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV)

Las BPCV son bacterias de diversas especies que favorecen el crecimiento y productividad vegetal. Entre los géneros más conocidos están las *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* y *Azospirillum*. Pueden clasificarse en dos grupos, el primero, BPCV vegetal y el segundo, bacterias que actúan suprimiendo otros microorganismos. Las del primer grupo

utilizan su metabolismo para solubilizar fosfatos, producir hormonas y fijar nitrógeno (N), entre otras acciones, lo cual beneficia a las plantas estimulando su actividad enzimática e incrementando la adsorción de agua y minerales, así como el desarrollo radicular. (Bashan y Holguin, 1998). El segundo grupo es el de BPCV con la capacidad de control biológico, promueven el crecimiento de la planta indirectamente proveyendo de protección contra fitopatógenos. (Bashan y Holguin, 1998)

En 2013 la población en el mundo alcanzó los 7 mil millones de habitantes, este crecimiento ha obligado a incrementar la producción de alimentos para satisfacer las necesidades de dicha población. Para ello, se ha recurrido al uso de diversas técnicas o productos como fertilizantes, agroquímicos, plástico, semillas mejoradas, etc., dando como resultado una agricultura intensiva que se caracteriza por el alto consumo de insumos, laboreo excesivo, baja o nula incorporación de materia orgánica, monocultivos, pérdida de biodiversidad en el suelo y la desertificación de este. Una de las alternativas es la aplicación de microorganismos benéficos al suelo como bacterias rizosféricas en formulaciones que sirvan de bioinoculantes (Intagri, 2011)

Se ha retomado el interés en la utilización de BPCV en la producción de diversos cultivos, dichas bacterias han sido aplicadas a semillas, tubérculos o raíces ya que son capaces de colonizar las raíces de las plantas y de estimular el crecimiento de los cultivos mejorando el rendimiento (Chanway *et al.*, 1989). Los mecanismos que emplean las bacterias para la promoción de crecimiento vegetal aún no se han descrito por completo, sin embargo, se han sugerido efectos tanto directos como indirectos, tales como el aumento en solubilización de nutrientes, mejoramiento de absorción (Lifshitz *et al.*, 1987), producción de antibióticos para hongos, bacterias y virus (Hoffland *et al.*, 1997) y de fitohormonas (Schroth y Weinhold, 1986; Chanway, 1997). Otros efectos indirectos incluyen el aumento de fijación de N, y de la actividad de la nitrogenasa (Zhang *et al.*, 1996), los cuales actúan con la resistencia sistemática de la planta (Chanway, 1997).

Actualmente se han identificado numerosas bacterias con la capacidad de fijar N, pero solo algunas destacan por su potencial como biofertilizantes, mismos que resultan de

interés agrícola. Algunos de los géneros más destacados son *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia* y *Azospirillum*, Así como *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Bacillus*

1.2 Efectos en la planta y la raíz

Las bacterias juegan un papel importante para las plantas ya que al asociarse con ellas permiten aumentar su crecimiento, desarrollo y proveen de protección contra otros organismos antagónicos que causan enfermedades. Ecológicamente a esta relación benéfica entre las bacterias y las plantas se le denomina mutualismo el cual se define como la condición en la que ambos seres vivos de diversas especies viven juntos habitualmente (Aunque no necesariamente) con beneficio recíproco para el hospedero (Planta) y el simbionte (Bacteria).

Para que estos efectos ocurran deben realizarse asociaciones las cuales ocurren a nivel de la rizosfera, la cual es definida como toda aquella porción de suelo que está fuertemente influenciada por las raíces de las plantas, la cual a su vez se divide en tres partes: Rizoplano (Microorganismos pegados a la raíz), Endorrizosfera (Microorganismos dentro de la raíz) y Ectorrizosfera (Microorganismos que actúan de manera circundante a la raíz). Dicha asociación se inicia como respuesta al llamado “efecto rizosférico”, el cual sucede a través de un intercambio de señales que se disparan a partir de la interacción microbio-planta, con resultados claramente benéficos para los dos.

Cerca del 40% del carbono fijado en la fotosíntesis, en la parte aérea de la planta, puede ser excretado a la rizosfera, lo que afecta positivamente a la mayoría de las bacterias que ahí habitan, las cuales se nutren de los exudados de las raíces que emiten las plantas, como azúcares, vitaminas, factores de crecimiento, ácidos orgánicos, glúcidos y mucigel. (La ciencia y el hombre, 2003)

Las BPCV en las plantas son un grupo de diferentes microorganismos que pueden incrementar el crecimiento y la productividad vegetal, los géneros más conocidos y utilizados en la agricultura son: *Rhizobium*, *Pseudomonas*, y *Azospirillum*, *Actinoplanes*,

Agrobacterium, *Azobacter*, *Bacillus*, etc. Las BPCV presentan grandes ventajas para incrementar la productividad de los cultivos, pueden actuar favoreciendo el crecimiento vegetal de manera directa e indirecta. Estas bacterias presentan grandes ventajas para incrementar la productividad de diversos cultivos, estas pueden actuar favoreciendo el crecimiento de manera directa o indirecta.

Algunos de los efectos directos van desde la fijación de N, producción y síntesis de sideróforos, la solubilización de minerales especialmente fósforo, la síntesis de diversas fitohormonas, así como la síntesis de la enzima ACC Deaminasa y algunos de los efectos indirectos van desde el biocontrol de fitopatógenos, desarrollo óptimo de raíces, producción de antibióticos y reducción de hierro. (Camelo *et al.*, 2011).

Para que estas funciones se lleven a cabo deben actuar a través de diversos mecanismos, realizando la tarea de bioestimulantes, fitoestimuladores o agentes de biocontrol. Las bacterias que actúan como fitoestimuladores, tienen la habilidad de producir o cambiar la concentración de los reguladores de crecimiento tales como: ácido indolacético, ácido giberélico, citocininas y etileno (Camelo *et al.*, 2011).

1.3 El género *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. salinestrus*, *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 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 fluorescens* 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 encuentra 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 (Döbereiner, 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).

1.4 Bacterias *Azotobacter vinelandii*

Es una especie microbiológica de bacteria la cual es gramnegativa quimioganotrofa. Dicha bacteria se reproduce mediante fisión binaria, viven en suelos o en aguas frescas y presentan una morfología ovoide y grande (de los 1,5 a 2 μm de diámetro), son pleomórficas desde bacilos hasta cocos además de que ser poliploide.

En la actualidad diversas investigaciones han estudiado las capacidades metabólicas y genéticas de la bacteria como la fijación de N atmosférico en presencia de oxígeno por tres sistemas de nitrogenasa, posee mecanismos de protección de nitrogenasa, tiene una alta capacidad respiratoria en condiciones diazotroficas o de fijación de N que es hasta 10 veces más alta que la de *Escherichia coli*, produce polímeros de uso industrial como el alginato y el polihidroxibutirato.

Las vitaminas son esenciales para las funciones fisiológicas de los seres vivos que son producidas por varios grupos de bacterias. El genero *Azotobacter* produce vitaminas en condiciones favorables, y las cepas de *A. vinelandii* producen niacina, ácido pantoténico, riboflavina y biotina que pertenecen a las vitaminas del grupo B. Se utilizan para mantener los procesos metabólicos de los seres vivos, pero la producción de vitaminas está controlada por varios factores físicos, como las condiciones de crecimiento, el pH, las temperaturas de incubación y la disponibilidad de fuentes de nitrógeno y carbono (Revillas *et al.*, 2000). La riboflavina es una vitamina B2 necesaria para una amplia variedad de procesos celulares, (G. Chennappa *et al.*, 91) y juega un papel clave en el metabolismo de grasas, cuerpos cetónicos, carbohidratos y proteínas, respectivamente (Almon 1958; Revillas *et al.*, 2000).

Los aminoácidos son también uno de los elementos importantes necesarios para el crecimiento y desarrollo de células. Pocos géneros bacterianos producen aminoácidos, entre ellos *A. vinelandii* produce ácido aspártico, serina, ácido glutámico, glicina, histidina, treonina, arginina, alanina, prolina, cisteína, tirosina, valina, metionina, lisina, isoleucina, leucina, triptófano y fenilalanina (Revillas *et al.*, 2000; López *et al.*, 1981).

Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro de bajo peso molecular que son producidos y utilizados por bacterias y hongos. Estos compuestos se producen en respuesta a la deficiencia de hierro que normalmente ocurre en suelos de pH neutro a alcalino, debido a la baja solubilidad del hierro a pH elevado (Johri *et al.*, 2003). Las especies de *Azotobacter* excretan sideróforos en condiciones limitadas de hierro. *A. vinelandii* produce cinco sideróforos diferentes, como el ácido 2,3-dihidroxibenzoico, aminocelina, azotocelina, protocelina y la azotobactina que actúan como antibióticos en la naturaleza. Los sideróforos se usan como agentes de administración de fármacos, que son importantes aplicaciones biotecnológicas, así como agentes antimicrobianos y remediación del suelo (Page y VonTigerstrom 1988; Mollmann *et al.* 2009; Kraepiel *et al.*, 2009; Barrera y Soto 2010). Las *BPCV* productoras de sideróforos pueden prevenir la proliferación de agentes patógenos secuestrando hierro en la vecindad de la raíz.

Las especies de *Azotobacter* actúan como agentes de biocontrol mediante la producción de antibióticos como 2,3 ácido dihidroxibenzoico, aminocelina, azotocelina, protocelina y azotobactina para combatir los fitopatógenos (Agarwal y Singh 2002; Mali y Bodhankar 2009; Kraepiel *et al.* 2009). La producción de antibióticos se considera uno de los mecanismos de biocontrol más estudiados para combatir los fitopatógenos.

La actividad antifúngica de *A. vinelandii* mostró una zona de inhibición máxima (40 mm) contra *F. oxysporum*, que se sabe que causan varias enfermedades en cultivos agrícolas, a chile y arveja principalmente (Cavaglieri *et al.*, 2005; Bhosale *et al.*, 2013). *Azotobacter* puede proporcionar protección contra hongos patógenos transmitidos por el suelo como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria* y *Helminthosporium* (Khan *et al.*, 2008; Mali y Bodhankar 2009).

1.5 Inmovilización de células

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 (Kadacol, 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 cilíndrica, biochar, fibras de restos vegetales y granos.

En la mayoría de los estudios, el uso de geles poliméricos aumenta la capacidad de degradación por factores relacionados con fenómenos de difusión (Cheng *et al.*, 2003, Yañez-Ocampo *et al.*, 2009) y permite a las células un intercambio propicio para soportar concentraciones que en forma libre no podrían. Lo anterior, confirmándose mediante modelos matemáticos, usados para establecer el diámetro óptimo para la difusión intermembranal de los contaminantes (con un óptimo de entre 2-3 mm) para el atrapamiento en geles (gel de poliacrilamida-quitosano y sol-gel) en la formación de matrices encapsuladoras (Martínez-Trujillo y García-Rivero, 2012).

La inmovilización por atrapamiento en Ca-alginato (copolímero de los grupos D-ácido-manurónico y L-ácido gulurónico) es el más común y eficiente polímero natural, no tóxico, empleado con éxito para inmovilizar cultivos microbianos en sistemas *in vitro* (Kumar, Nain y Singh, 2017). Lo caracterizan sus propiedades físicas, 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 y Bustard, 2008), condición que es benéfica bajo ciertas circunstancias, ya que la liberación lenta es conveniente en procesos de degradación en sistemas continuos en los que se busca preservar la actividad metabólica por periodos prolongados (Tallur *et al.*, 2015; Talwar y Ninnekar, 2015).

Sin embargo, pese a la efectividad del uso de encapsulación en alginatos para la remoción de plaguicidas en medios líquidos, no se ha recomendado su uso de igual modo para la aplicación en suelos por ser un material susceptible a la degradación y por su baja estabilidad mecánica (Ha *et al.*, 2009). Como alternativa, han sugerido incrementar el

porcentaje de alginato en la preparación de las cápsulas o complementar la matriz con la adición de otros polímeros o partículas como el alcohol polivinílico, polisulfón, arcilla de bontonita, agar o poliacrilamida (Abigail y Das, 2015; Idrees *et al.*, 2013; Talwar y Ninnekar, 2015; Khalid *et al.*, 2018; Fareed *et al.*, 2017; Mulla *et al.*, 2013), considerando que estas modificaciones alterarían también otras propiedades físicas relacionadas con la degradación. Por ejemplo, el alcohol polivinílico (PVA) fosforilado en combinación con el Ca-alginato forman una matriz más durable que puede interactuar para mejorar las propiedades de la matriz, sin representar riesgos negativos a los propios microorganismos o al ambiente (Siripattanakul *et al.*, 2009).

No se puede afirmar que el alginato de calcio sea el medio perfecto para inmovilizar las células. La destrucción de los geles de alginato de calcio por los agentes quelantes es un problema que puede superarse de manera muy simple, pero aumentando el costo del proceso de inmovilización. La limitación de la transferencia de oxígeno dentro de los geles puede ser un problema o una ventaja dependiendo del tipo de biocatalizador atrapado. Existe la posibilidad de realizar estudios extensos sobre los efectos fisiológicos resultantes de tales limitaciones de difusión; Bien puede ser que haya ventajas al usar perlas más grandes de alginato de calcio para atrapar ciertos biocatalizadores para beneficiarse de las limitaciones de difusión. (Bucke, 1987)

Por otro lado, en cuanto a la IC por atrapamiento o formación de biopelículas, las matrices o soportes naturales se han comenzado a evaluar con mayor frecuencia. Pattanasupong *et al.* (2004) propusieron el uso de fibras como soporte para la agregación de células con capacidad de degradar contaminantes y desde entonces se han evaluado otros materiales, fibras vegetales o sintéticas (Fernández-López *et al.*, 2017).

Entre las fibras sintéticas destaca la espuma de poliuretano cuya eficiencia de remoción de carbofuran fenol y cipermetrina alcanzó el 100 % al usarla como soporte (Kadakol *et al.*, 2011; Tallur *et al.*, 2015). Por otro lado, los soportes naturales usados con mayor frecuencia son residuos lignocelulósicos (Gangola *et al.*, 2015; Diez *et al.*, 2016; Fernández-López *et al.*, 2017), de los cuales se aprovechan las características

bioestructurales, que suelen ser reusables, no tóxicos y mecánicamente estables. En este punto podemos mencionar el uso de *Luffa cylindrica* L. como soporte natural. Se ha empleado la loofa en la IC de microorganismos como red entrecruzada de fibras que es óptima para la adhesión de células. La esponja de loofa ha sido considerada de los mejores soportes por sus características de renovabilidad, biodegradabilidad y uso simple en la degradación de organofosforados (Moreno-Medina *et al.*, 2014).

Del mismo modo se ha propuesto el uso de fibra de coco (Pattanasupong *et al.*, 2004), micronichos en gránulos de café (Barragán-Huerta *et al.*, 2007), bagazo de caña de azúcar (Liu *et al.*, 2015), biocamas con paja, turba y suelo (Diez *et al.*, 2016), fibras de *Opuntia sp.* y *Agave sp.* (Fernández-López *et al.*, 2017), entre otros; o bien, como enmiendas para adsorber y facilitar la disipación de plaguicidas como carbendazim, DDT, 2, 4-D, mesotriona, atrazina y MP, permitiendo las actividades enzimáticas requeridas para la degradación microbiana (Diez *et al.*, 2016). La ventaja de estas bioestructuras es la reusabilidad, nula toxicidad, estabilidad mecánica y espacio interestructural que permite el crecimiento de microorganismos sin problemas de ruptura o pérdida de difusión como puede suceder con las cápsulas formadas por polímeros.

Las enmiendas orgánicas son las estrategias de inmovilización que reducen la biodisponibilidad de los plaguicidas al interactuar químicamente con ellos (Khorram *et al.*, 2016), proporcionando materia orgánica para la sorción del contaminante y estimulación del crecimiento vegetal. Así, por ejemplo, Liu *et al.* (2015) probaron el uso de bagazo de caña como soporte para la inmovilización de *Bacillus pulmilus* en la degradación de mesotriona. El uso de este biomaterial promovió la rápida adaptabilidad de la bacteria y su crecimiento en suelo. Por otro lado, el biochar aumentó la sorción de compuestos orgánicos hidrofóbicos por el atrapamiento en sus microporos y estructuras condensadas (Yu *et al.*, 2011) y ha llamado la atención por reducir de la biodisponibilidad de plaguicidas (Mukherjee *et al.*, 2016). El biochar es el resultado del proceso denominado pirólisis en el que la materia orgánica sufre una descomposición térmica en ausencia de aire (Lehmann *et al.*, 2011). Se diferencia del carbón vegetal por su uso como enmienda del suelo (Lehmann

y Joseph, 2009). Aumenta el contenido de materia orgánica, C total, N total y relación C/N, provocando indirectamente cambios en la composición y abundancia de la comunidad biológica y mayor fertilidad del suelo (Jin, 2010). De hecho, las enmiendas orgánicas como el biochar crean interacciones entre microorganismos y plantas que permiten la remoción efectiva de contaminantes del suelo como el difenoconazol (Cheng *et al.*, 2017).

Moorman *et al.* (2001) utilizaron enmiendas orgánicas para mejorar la degradación de herbicidas en suelos contaminados. El uso de las enmiendas orgánicas disponibles, como compostas, los residuos de plantas, el abono verde, pueden ser una forma eficaz para mejorar la degradación y remoción de plaguicidas si se emplean en la IC de microorganismos degradadores.

Por otro lado, el metabolismo y sorción han sido reportados para plaguicidas como atrazina, carbofurán, carbaril entre otros, por comunidades en agregados en biopelículas en ríos (Tien *et al.*, 2013). En estos ambientes, mientras más tiempo se encuentra expuesto el biofilm al contaminante (methomyl), más se modifica la comunidad bacteriana debido a cambios inducidos por selección natural (Tien *et al.*, 2013). Entre otras particularidades, ha sido demostrado que los microorganismos agregados en forma de biopelículas son menos susceptibles a cambios ambientales como pH, temperatura, la presencia de sustancias tóxicas y sus metabolitos (Ohandja y Stuckey, 2006; Liu *et al.*, 2015; Toyofuku *et al.*, 2016), resultando efectivas en el tratamiento de aguas residuales por su simplicidad de uso y estabilidad (Zhu y Chen, 2002).

Por su parte, Abigail y Das (2015) usaron partículas de ladrillo como material inerte cuyas características permiten la formación de biofilm, siendo un material de bajo costo con propiedades mecánicas deseables en comparación con la baja robustez, poca durabilidad y aparente pérdida de actividad biológica del alginato, a lo que se ha propuesto además el uso de este en combinación con PVA al 2 y 4 % para mejorar sus propiedades físicas y favorecer la estabilidad del material en la remoción de atrazina.

De igual forma la inmovilización de levaduras en perlas de alginato y poliacrilamida se ha utilizado con éxito en la fermentación de vino blanco y en la producción de etanol (Cachon y Divies, 2001). Debido a cambios en la composición de las células por interacción con el soporte de alginato, estos catalizadores se vuelven más activos y se observa que la fermentación ocurre a mayor velocidad respecto a los casos en los que se emplean levaduras libres (Galazzo y Bailey, 1990). Otra ventaja importante de estos sistemas inmovilizados es que el soporte protege la levadura de la acción de inhibidores, metales pesados, fenoles y temperaturas extremas. Además, a diferencia de los flóculos de biomasa, estos sólidos al ser más sencillos de manejar permiten un mejor control de la actividad catalítica en reactores de tipo lote y continuos.

La inmovilización de células es un proceso prometedor sobre todo que tiene un enorme campo de aplicación, dicho proceso puede ayudar en el mejoramiento y producción de alimentos, fármacos, químicos y bioproductos de interés científico y económico (Fajardo *et al.*, 2011)

1.6 Hidroponía

Hidroponía, es una técnica que permite el cultivo de plantas en un medio libre de suelo. La hidroponía permite (en estructuras simples o complejas producir) plantas principalmente de tipo herbáceo aprovechando sitios o áreas como azoteas, suelos infértiles, terrenos escabrosos, invernaderos climatizados o no, etc. A partir de este concepto se desarrollaron técnicas que se apoyan en sustratos (medios que sostienen a la planta), o en sistemas con aportes de soluciones de nutrientes estáticos o circulantes, sin perder de vistas las necesidades de la planta como la temperatura, humedad, agua y nutrientes. En la actualidad se utiliza para referirse al cultivo sin suelo.

La hidroponía 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 se producen plantas principalmente de tipo herbáceo, aprovechando sitios o áreas no convencionales, sin perder de vistas 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)

El termino hidroponía se deriva del griego “hydro” que significa agua y “ponos” que significa trabajo, literalmente significa trabajo del agua. La palabra hidroponía fue acuñada por el profesor William Gericke a principios de los años treinta al describir el crecimiento de plantas con sus raíces suspendidas en agua que contiene nutrientes minerales. (Nisha, Somen, Kaushal, Narendra, y O.P. Chaurasia, 2018). En otras palabras, la hidroponía es una tecnología para desarrollar plantas en SN que contiene agua y fertilizantes, con o sin el uso de un medio artificial como arena, grava, vermiculita, lana de roca, etc. para proveer soporte mecánico a la planta (Jensen y Collins, 1985; Lara Herrera, 1999) basada en la utilización de mínimo espacio, mínimo consumo de agua y máxima producción y calidad (Beltrano y Gimenez, 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). Lo anterior, aunado al hecho de que es ampliamente reconocido que los suelos agrícolas presentan procesos de degradación tales como salinización, alcalinización, disminución de permeabilidad, desequilibrios nutritivos y desarrollo de enfermedades, pobre drenaje, suelo contaminado o suelo cargado con patógenos, la convierte en una tecnología predilecta debido a que ofrece incluso la posibilidad de usar áreas típicamente inadecuadas para la agricultura convencional como regiones áridas (Alconada *et al.*, 2011; Jensen, 1997).

Para destacar sus ventajas y funcionar de manera correcta, esta técnica requiere una solución nutritiva 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 hidroponía, las necesidades nutrimentales que tienen las plantas son satisfechas con los nutrimentos que se suministran en la SN. La cantidad y disponibilidad de micro y macronutrientes que requieren las plantas depende de la especie, la variedad, la etapa

fenológica y las condiciones ambientales para poder ser absorbidos por éstas (Carpena *et al.*, 1987; Adams, 1994; Cooper, 1996; Baca *et al.*, 2016).

Para que la SN tenga disponibles los nutrimentos que contiene, debe ser una solución verdadera, todos los iones se deben encontrar disueltos. La pérdida por precipitación de una o varias formas iónicas de los nutrimentos puede ocasionar su deficiencia en la planta (Steiner, 1961).

El cultivo hidropónico es el más intensivo y efectivo método de producción de la agricultura sin suelo, se ha desarrollado rápidamente para incrementar los productos agrícolas de la industria moderna, el cultivo hidropónico cerrado es un sistema que optimiza el recurso hídrico para la producción de vegetales, con una alta productividad en términos de cosecha por unidad de área (Salazar Moreno *et al.*, 2014).

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).

Capítulo 2: Propósitos y organización

1.1 Objetivos

1.1.1 *Objetivo general*

Evaluar el efecto de la encapsulación radicular de *Lactuca* sp. con alginato-Na y *A. vinelandii* en un sistema hidropónico mediante PCR en tiempo real y variables morfológicas.

1.1.2 *Objetivos específicos*

- 1- Cuantificar el ADN de *A. vinelandii* en las raíces encapsuladas
- 2- Medir variables morfológicas de la planta (tamaño de raíz y número de hojas)
- 3- Determinar las concentraciones de NO₃, Ca, Na, K, Ce y pH en la savia de la planta

1.2 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. vinelandii* 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 uno de los principales es la inmovilización celular, es un método caracterizado por

restringir a las células a un área delimitada conservando sus actividades metabólicas, catabólicas y catalíticas, diferentes investigaciones mencionan los beneficios de la técnica, sin embargo, poco se ha evaluado la encapsulación radicular con alginato de sodio y *A. vinelandii* en lechugas en sistema hidropónico.

1.3 Hipótesis

La encapsulación radicular con *A. vinelandii* en alginato-Na permite su establecimiento en la rizosfera y favorece el desarrollo de plantas de *Lectuca* sp. en cultivada en un sistema hidropónico.

Capítulo 3: Encapsulación radicular con alginato-Na y *Azotobacter vinelandii* en un sistema hidropónico

Root encapsulation with Na-alginate and *Azotobacter vinelandii* in a hydroponic system

Pinto Trinidad Luis Rene¹, Conde Avila Victoria¹, Iran Cerezo¹, Girgis El Kassis¹ Pérez Armendáriz Beatriz¹, Luis Daniel Ortega Martínez^{1*}

Universidad Popular Autónoma del estado de Puebla. Facultad de Biotecnología.

Autor de correspondencia *Luisdaniel.ortega@upaep.mx

Resumen

La hidroponía es un sistema de producción en el que las plantas crecen en agua con fertilizantes en ausencia de suelo, por lo que se ven limitadas de 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 hidropnía, 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 con alginato-Na, no obstante, son escasas las investigaciones que propongan el atrapamiento de microorganismos en raíces encapsuladas para su uso en sistemas de cultivo hidropónico. En este sentido, nuestro objetivo fue evaluar el efecto de la encapsulación radicular de *Lactuca* sp. con alginato-Na y *A. vinelandii* en un sistema hidropónico. Los resultados mostraron un aumento en el tamaño y peso de raíces en los tratamientos con encapsulación e igual concentración de nitratos para todos los tratamientos excepto el testigo. Pese a lo anterior, no resultó positiva la amplificación de ADN genómico de *A. vinelandii* en extracciones de raíces que procedían de dichos tratamientos.

Abstract.

Hydroponics is a production system in which plants grow in water with fertilizers in the absence of soil so these are limited can limit the plant's diversity of edaphic microorganisms, which includes more than 105 species in this sense bacteria growth promoters such as *A. vinelandii* which are associated with plants to synthesize plant growth regulating metabolites or phytohormones, as well as nutrient fixation, when used in the hydroponic system they are added to the SN or roots are inoculated, however, the conditions Chemical and physical environment reduce viability. There are different methods to preserve them, one of the main ones is cell immobilization with sodium alginate, however, research to encapsulate plant roots with the presence of bacteria is scarce, so the objective of the present was to evaluate the effect of *Lactuca* root encapsulation. *Sativa* with Alginate-Na and *A. vinelandii* in a hydroponic system, the results affected by the absence of root bacteria, without increasing the size and weight of the root and treatments with alginate and bacteria, nitrates without differences of differences In the statistics. It can be concluded that root encapsulation promotes root growth.

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). 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 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).

El sistema hidropónico, al no emplear el suelo, se puede limitar 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 rizobacterias promotoras de crecimiento vegetak (RPCV) como *A. vinelandii*, 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). En variadas investigaciones destacan los beneficios de la técnica, no obstante, se ha evaluado escasamente la encapsulación radicular con alginato-Na y *A. vinelandii* en sistema hidropónico. El objetivo fue evaluar el efecto de la encapsulación radicular de *Lactuca* sp. con alginato-Na y *A. vinelandii* en un sistema hidropónico.

Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en el centro de Innovación Tecnológica en Agricultura Protegida- UPAEP en el municipio de Atlixco, localizado en el centro Oeste del estado de Puebla, altitud promedio de 1840 msnm, 18 49 30 y 18 58 30 LN y 98 18 24 y 98 33 36 LO.

Se utilizó un sistema hidropónico cerrado.

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 gr·L⁻¹: extracto de levadura, 1; D-manitol, 5; K₂HPO₄, 0.7; KH₂PO₄, 0.1; MgSO₄·7H₂O, 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 × g durante 20 minutos y luego se descartó el sobrenadante.

Encapsulación radicular

Las bacterias *A. vinelandii* obtenidas después de la preparación del inóculo se mezclaron en una solución estéril de alginato-Na a una concentración final del 2% (p/v) Las raíces de las plantas fueron sumergidas en la solución, posteriormente se pasaron a una solución estéril de cloruro de calcio (CaCl_2) al 0.1 M para lograr la reacción de polimerización. Las plantas con raíz encapsulada fueron trasplantadas en módulos unitarios de NFT en el que se utilizó agua sin nutrientes. Los tratamientos fueron: plantas testigo (sin inóculo ni alginato), plantas control (alginato), plantas inoculadas (alginato + *A. vinelandii*) con 12 repeticiones por tratamiento.

Determinación de los parámetros morfológicos vegetales

Cada 7 días posterior al trasplante se midió la altura de la plántula utilizando una cinta metálica milimétrica (con error de lectura de 0.05cm). Los puntos de referencia fueron la base del tallo y la yema apical, así como la raíz partiendo de la base del tallo. Las concentraciones de NO_3 , Ca, Mg, Na, K, CE y Ph mediante los sensores horiba®

Extracción de ADN de *A. vinelandii* y análisis por PCR en tiempo real

La extracción de ADN genómico de *A. vinelandii* se realizó 27 d 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 (10 μM) (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 llevó a cabo en un termociclador Rotor-Gene \square 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 las ampliaciones, se generó una curva de disociación aplicando un gradiente de temperatura creciente de 55°C a 99°C.

Diseño y análisis estadístico

Se empleó un diseño de bloques con 3 repeticiones por tratamiento con seis plantas. 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 SPSS[®]. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los datos se presentan como valores medios \pm desviaciones estándar.

Resultados y discusión

Parámetros morfológicos de L. sp.

La longitud y peso de las hojas mostraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, destacando el tratamiento con la raíz encapsulada cuya altura fue de 18.5 cm y un peso de 20.7 gr. Los resultados son similares a los mencionados por Ivana *et al.* (2016) y Cerna *et al.* (2018), quienes reportaron aumentos en el crecimiento y rendimiento de *L. sativa* cultivada en suelo al inocular *Azotobacter*. Por su parte, Gutiérrez *et al.* (2019)

concluyeron que, en el sistema aeropónico, *Azotobacter* influyó positivamente en la longitud y peso de hojas.

La longitud de la raíz fue estadísticamente diferente entre tratamientos, particularmente en el tratamiento con alginato y bacterias (19 cm). Resultados similares a los de Cerna *et al.* (2018) quienes demostraron que *Azotobacter* produce hormonas de crecimiento vegetal como ácido indolacético cuyo efecto primario se refleja en un mayor desarrollo de raíces y partes aéreas de los vegetales (Brown & Burlingham, 1968), y se considera el principal compuesto asociado a tales resultados.

Los nitratos, el calcio, conductividad eléctrica y pH, no mostraron diferencias estadísticas, contrario a los resultados obtenidos por Gutiérrez *et al.* (2019), quienes mencionan que *Azotobacter* y otras BPCV mejoran la cantidad de elementos en la planta, de igual forma, León *et al.* (2012) menciona que *Azotobacter* ha sido utilizado extensamente en la producción agrícola mundial, ya que aportan a las plantas hasta el 50% de sus necesidades de N mediante la fijación asociativa a partir de N atmosférico.

Tabla 1. Morfología de plantas de lechuga en cultivo hidropónico

Tratamientos	Longitud hoja cm.	Longitud de raíz cm.	peso hojas gr.	peso raíz gr.	No3	Ca	Na	EC	pH
A	10.7 ^b	14 ^b	11.5 ^b	6.4 ^b	1250 ^a	335 ^a	305 ^a	4.2 ^a	490 ^a
T	11.5 ^b	6 ^b	14.5 ^{ab}	5.6 ^b	995 ^a	420 ^a	160 ^b	3.4 ^a	685 ^a
A+B	18.5 ^a	19 ^a	20.7 ^a	9.5 ^a	960 ^a	235 ^a	130 ^b	3.3 ^a	435 ^a

A (alginato), T (testigo) A+B (alginato + *A. vinelandii*)

Letras iguales en la misma fila no representan diferencias estadísticas significativas

PCR en tiempo real

El resultado de la PCR en tiempo real se observa en la Fig. 1. Las curvas de amplificación presentaron el perfil sigmoideo tanto para el control positivo de *A. vinelandii* pero no en las muestras que procedían de la extracción de raíces.

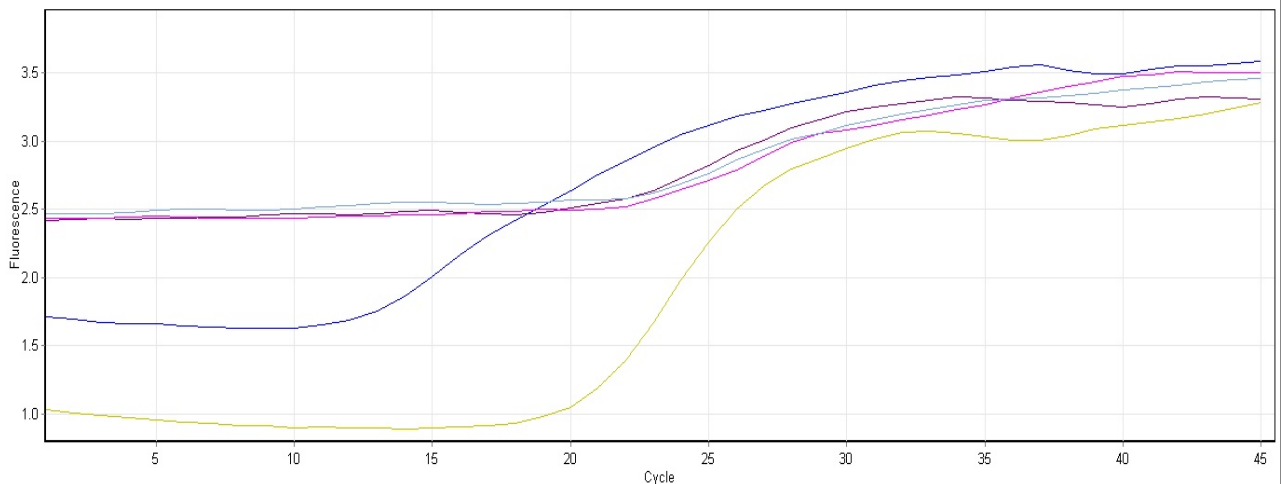


Fig. Curva de amplificación. Eje y se muestran cantidad de fluorescencia y en Eje X los ciclos de la reacción.

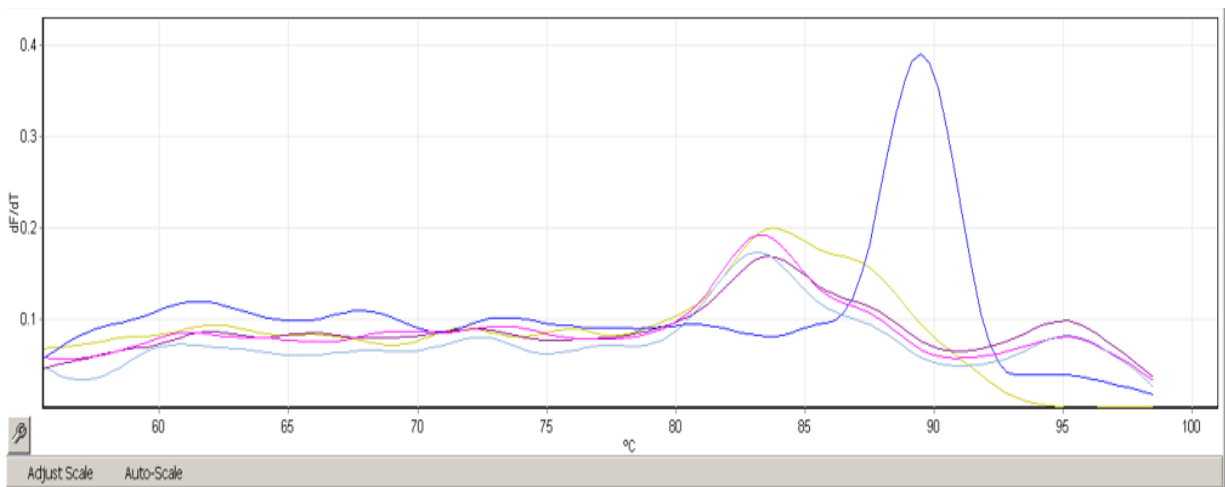


Fig. 2 Curva de análisis del punto de disociación de ADN de *A. vinelandii*. Se observa que a partir de los tratamientos la curva de análisis de disociación no es similar a de nuestro control positivo

Bibliografía

Seungjun L. 2015. Review Beneficial bacteria and fungi in hydroponic systems: Types and characteristics of hydroponic food production methods a Environmental Science Graduate Program, The Ohio State University, Columbus, OH, USA b Department of Food Science and Technology, The Ohio State University, Columbus, OH, USA c College of Public Health, Division of Environmental Health Sciences, The Ohio State University, Columbus, OH, USA

Rueda D., Valencia¹ G., Soria N., Rueda B., Manjunatha B., Kundapur R., Selvanayagam M., Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 6 (01), pp. 048-054, January, 2016 Available online at <http://www.japsonline.com> DOI: 10.7324/JAPS.2016.600108 ISSN 2231-3354 Effect of *Azospirillum* spp. and *Azotobacter* spp. on the growth and yield of strawberry (*Fragaria vesca*) in hydroponic system under different nitrogen levels

Kumar N., Dash B., Bihari S., Khokher D., Soni R. 2018. Evaluation of stress tolerance of *Azotobacter* isolates. *BIOLOGIJA*. Vol. 64. No. 1. P. 82–93 © Lietuvos mokslų akademija.

Cerna T., Salinas E., Soriano B. 2018. Sinergismo entre *Azotobacter chroococcum* y *Bradyrhizobium yuanmingense* en el crecimiento de *Lactuca sativa* “lechuga” Sinergism between *Azotobacter chroococcum* and *Bradyrhizobium yuanmingense* in the growth of *Lactuca sativa* "lettuce". Laboratorio de Microbiología Ambiental, Dpto. de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo

Tošić I., Golic Z., Radosavac A. 2016. Original research paper *Acta Agriculturae Serbica*, Vol. XXI, 42 (2016) 91-981 Effects of the application of biofertilizers on the microflora and yield of lettuce (*Lactuca sativa* L.) UDC: 635.52-184.7 COBISS.SR-ID: 228211724

Baslam M., F. Morales, I. Garmendia and N. Goicoechea (2013) Nutritional quality of outer and inner leaves of green and red pigmented lettuces (*Lactuca sativa* L.) consumed as salads. *Scientia Horticulturae* 151:103-111, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.12.023>

Velázquez J. and Cisneros L. 2009 Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: a new approach in data analysis for food and medicinal plants. *Journal of Food Science* 74:R107-R113, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01352.x>

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera- 2016 Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ciudad de México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Diciembre 2018).

Moreno E., Sánchez F., Gutiérrez J., González L. and Pineda J. 2015. Greenhouse lettuce production with and without nutrient solution recycling. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 21:43-55, <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2013.12.047>

Referencias bibliográficas

- Abigail AE, Das N. 2015. Removal of atrazine from aqueous environment using immobilized *Pichia kudriavzevii* Atz-EN-01 by two different methods. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 104: 53-58. doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.05.014
- 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
- Agarwal N, Singh HP (2002) Antibiotic resistance and inhibitory effect of *Azotobacter* on soil borne plant pathogens. *Indian J Microbiol* 42:245–246
- Almon L (1958) The vitamin B12 content of *Azotobacter vinelandii*. *J Nutr*:643–648
- Aquilanti L, Favilli F, Clementi F (2004) Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biol Biochem* 36:1475–1483
- Bakoyianis, V, Kanellaki, M., Kaliafas, A. y Koutinas, 1992. A. A. Low temperature wine making by immobilized cells on mineral Kissiris. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40(7): 1293–1296.
- Bakoyianis, V. y Koutinas, A. A. 1996. A catalytic multistage fixed-bed tower bioreactor in an industrial-scale pilot plant for alcohol production. *Biotechnology and Bioengineering*. 49: 197–203.

- Bardi, E. P., Bakoyianis, A., Kounitas, A y Kanellaki, M. 1996. Room temperature and low temperature wine making using yeasts immobilized on glutem pellets. *Process Biochemistry*. 31: 425-430.
- Bardi, E. y Koutinas, A. A. 1994. Immobilization of yeast on delignified cellulosic material for room temperature and low temperature wine-making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 221–226
- Barragán-Huerta B, Costa-Pérez C, Peralta-Cruz J, Barrera-Cortés J, Esparza-García F, Rodríguez-Vázquez R. 2007. Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean coffee. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 59: 239-244. doi: 10.1016/j.ibiod.2006.11.001
- Barrera DA, Soto E (2010) Biotechnological uses of *Azotobacter vinelandii* current state limits and prospects. *Afr J Biotech* 9:5240–5250
- 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.
- Bashan, Y., Holguin, G., Glick, B. 2007. Restoration of degraded soils mainly in deserts by native plants and plant growth promoting bacteria.
- Beijerinck MW (1901) Fixation of free living atmospheric nitrogen by *Azotobacter* in pure culture. *Koninel Netherlands Academic. Weteucchapp Prac* 11:561–582
- Beltrano, J. Gimenez, D. 2015. Cultivo en hidroponía. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). ISBN: 978-950-34-1258-9
- Bhosale HJ, Kadam TA, Bobade AR (2013) Identification and production of *Azotobacter vinelandii* and its antifungal activity against *Fusarium oxysporum*. *J Environ Biol* 34:177–182
- Cachon, R. y Divies, C. 2001. Immobilised cell technology in winery and fruit wine production. *Engineering and Manufacturing for Biotechnology*. 413-421.
- Cavaglieri LR, Andres L, Ibanez M, Etcheverry MG (2005) Rhizobacteria and their potential to control *Fusarium verticillioides*, effect of maize bacterisation and inoculums density. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87:179–187

- Chanway, C.P. 1997. Inoculation of tree roots with plant growthpromoting soil bacteria: An emerging technology for reforestation. *For. Sci.* 43: 99-112.
- 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.
- Cheng J, Lee X, Gao W, Chen Y, Pan W, Tang Y. 2017. Effect of biochar on the bioavailability of difenoconazole and microbial community composition in a pesticide-contaminated soil. *Applied Soil Ecology.* 121: 185-192. doi: 10.1016/j.apsoil.2017.10.009
- Cheng K, Wu J, Yang W, Hwang S. 2003. Evaluation of effective diffusion coefficient and intrinsic kinetic parameters on azo dye biodegradation using PVA-immobilized cell beads. *Biotechnology and Bioengineering.* 83: 821-832. doi: 10.1002/bit.10730
- Diez MC, Elgueta S, Santos C. Lima N. 2016. Atrazine dissipation in a biobed system inoculated with immobilized white-rot-fungi. *Archives of Agronomy and Soil Science.* doi: 10.1080/03650340.2016.1155699
- Döbereiner, J. 1966. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bacteria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Presquisa Agropecuária Brasileira* 1:357–365.
- Döbereiner, J. 1970. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abt. 2,* 124:224–230.
- Fareed A, Zaffar H, Rashid A, Shah MM, NaqviT.A. 2017. Biodegradation of N-methylated carbamates by free and immobilized cells of newly isolated strain *Enterobacter cloacae* strain TA7. *Bioremediation Journal.* 21:3-4: 119-127. doi: 10.1080/10889868.2017.1404964
- Fernández-López MG, Popoca-Ursino C, Sánchez-Salinas E, Tinoco-Valencia R, Folch-Fumi, M., Trioli, G. y Colagrande, O. 1987. Preliminary assessment on the use of immobilized yeast cells in sodium alginate for sparkling wine processes. *Biotechnology Letters.* 9(5): 339–342
- Galazzo, J. L. and Bailey, y J.E. 1990. Growing *Saccharomyces cerevisiae* in

- calcium-alginate beads induces cell alteration which accelerate glucose conversion to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*. 36: 417-426.
- Gangola S, Pankaj, Khati P, Sharma A .2015. Mycoremediation of Imidaclopridin the Presence of Different Soil Amendments using *Trichoderma longibrachiatum* and *Aspergillusoryzae* Isolated from Pesticide Contaminated Agricultural fields of Uttarakhand. *J Bioremediation & Biodegradation*. 6: 310. doi: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-6199.1000310>
- 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
- Ha J, Engler CR, Wild JR. 2009. Biodegradation of coumaphos, chlorferon, and diethylthiophosphate using bacteria immobilized in Ca- alginate gel beads. *Bioresource Technology*. 100(3): 1138–1142. doi:10.1016/j.biortech.2008.08.022
- Hendrik, J. 2006. The Family *Azotobacteraceae*. *Prokaryotes* 6:759–783
- Hoffland, E., P.A.H.M. Bakker y V.L.C. Loon. 1997. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance-reply. *Phytopathol*. 87: 2, 138.
- Idrees M, Eqani SAMAS y Bokhari H. 2013. Sol-gel immobilisation of methyl parathion degrading bacteria isolated from agricultural areas of Pakistan. *Chemistry and Ecology*. 29(8): 33-744. doi: 10.1080/02757540.2013.820714
- Jensen, V., Petersen, E. J. 1954. Studies on the occurrence of *Azotobacter* in Danish forest soils. 95–110. *Royal Veterinary and Agricultural College Yearbook 1954*. Kandrup & Wunsch. Copenhagen,
- 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

- Johnstone, D. B. 1974. Genus I. *Azotobacter* Beijerinck 1901, 567; Genus II. *Azomonas* Winogradsky 1938, 391. 254–256. R. E., Buchanan, and N. E., Gibbons (ed.) Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Johri BN, Sharma A, Viridi JS (2003) Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 84:49–89
- Kadacol 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
- Khan HR, Mohiuddin M, Rahman M (2008) Enumeration, isolation and identification of nitrogen fixing bacterial strains at seedling stage in rhizosphere of rice grown in non-calcareous grey flood plain soil of Bangladesh. *J Fac Env Sci Tech* 13:97–101
- Khorram MS, Zhang Q, Lin D, Zheng Y, Fang H, Yu Y. 2016. Biochar: a review of its impact on pesticide behavior in soil environments and its potential applications. *Journal of Environmental Sciences*. 44: 269-279. doi: 10.1016/j.jes.2015.12.027
- Kirakosyan, A. V., Melkonyan, Zh, S. 1964. New *Azotobacter agile* varieties from the soils of ARMSSR. (R). *Doklady Akademik Nauk Armyanskoj S.S.R.* 17:33–42.
- Kizilkaya R (2009) Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. *J Env Biol* 30:73–82
- Kraepiel A, Bellenger J, Wichard T, Morel F (2009) Multiple roles of siderophores in free living nitrogen-fixing bacteria. *Biometals* 22:573–581
- Kraepiel A, Bellenger J, Wichard T, Morel F (2009) Multiple roles of siderophores in free living nitrogen-fixing bacteria. *Biometals* 22:573–581

- 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
- Lehmann J, Joseph S. 2009. Biochar for environmental management: an introduction. In: Lehmann J, Joseph S. (Eds.). *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*. Earthscan. London. pp. 1-12. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/1dcd/dcb78cb7010fedb248f8c1f402ed5a0a731c.pdf>
- Lehmann J, Rilling Mc, Thies J, Massiello CA, Hockaday WC, Crowley D. 2011. Biochar effects on soil biota - A review. *Soil Biology & Biochemistry*. 43: 1812-1836. doi:10.1016/j.soilbio.2011.04.022
- Lifshitz, R, J.W. Kloepper y M. Kozlowski. 1987. Growth promotion of canola (reseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotics conditions. *Can. J. Microbiol.* 3: 390-395.
- Liu J, Chen S, Ding J, Xiao Y, Han H, Zhong G. 2015. Sugarcane bagasse as support for immobilization of *Bacillus pumilus* HZ-2 and its use in bioremediation of mesotrione contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99:10839–51. doi: 10.1007/s00253-015-6935-0
- Lopez JG, Toledo MV, Reina S, Salmeron V (1981) Root exudates of maize on production of auxins, gibberellins, cytokinins, amino acids and vitamins by *Azotobacter chroococcum* chemically defined media and dialysed soil media. *Toxicol Environ Chem* 33:69–78
- Mali GV, Bodhankar MG (2009) Antifungal and phytohormone potential of *Azotobacter chroococcum* isolates from ground nut (*Arachis hypogea* L.) rhizosphere. *Asian J Exp Sci* 23:293–297
- Mali GV, Bodhankar MG (2009) Antifungal and phytohormone potential of *Azotobacter chroococcum* isolates from ground nut (*Arachis hypogea* L.) rhizosphere. *Asian J Exp Sci* 23:293–297
- Mallol JL, Dantán-González E, Ortiz-Hernández ML 2017. Enhancing methyl parathion degradation by immobilization of *Burkholderia* sp. Isolated from agricultural soils. *Microbiology Open*. doi: 10.1002/mbo3.507

- Martínez-Trujillo MA, García-Rivero M. 2012. Revisión: Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11 (1): 55-73. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62024415005>
- Mauricio Camelo R.1, Sulma Paola Vera M.2, Ruth Rebeca Bonilla B.1, 3. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* (2011) 12(2), 159-166.
- Mhammad 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
- Mollmann U, Heinisch L, Bauernfeind A, Kohler T, Ankel-Fuchs D (2009) Siderophores as drug delivery agents: application of the Trojan horse strategy. *Biometals* 22:615–624
- 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>.
- Mukherjee S, Weihermüller L, Tappe W, Hofmann D, Köppchen S, Laabs V, Vereecken H, Burauel P. 2016. Sorption–desorption behaviour of bentazone, boscalid and pyrimethanil in biochar and digestate based soil mixtures for biopurification systems. *Science of The Total Environment*. 559: 63–73. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.03.145
- Mulder EG, Brontonegoro (1974) Free living heterotrophic nitrogen fixing bacteria. *Biol Nitro Fix* 57:205–222
- Mulla SI, Talwar MP, Bagewadi ZK, Hoskeri RS, Ninnekar HZ. 2012. Enhanced degradation of 2-nitrotoluene by immobilization cells of *Micrococcus* sp. Strain SMN-1. *Chemosphere*. 90: 1920-1924. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.10.030
- 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>

- Norris, J. R., Kingham, W. H. 1968. The classification of azotobacters. 95–105. Festschrift til Hans Laurits Jensen. Statens Planteavlslaboratorium. Lyngby, Denmark.
- Ohandja DG, Stuckey DC. 2006. Development of a membrane-aerated biofilm reactor to completely mineralise perchloroethylene in wastewaters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81 (11): 1736–1744. doi: 10.1002/jctb.1596
- Page W, Von Tigerstrom M (1988) Aminochelin, a catecholamine siderophore produced by *Azotobacter vinelandii*. *J Gen Microbiol* 134:453–460
- Page WJ, Shivprasad S (1991) *Azotobacter salinestris* spp. nov., a sodium dependent, microaerophilic and aerotolerant nitrogen fixing bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 41:369–376
- Pattanasupong A, Nagase H, Sugimoto E, Hori Y, Hirata K, Tani K, *et al.* 2004. Degradation of carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by immobilized consortium on loofa sponge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 98:28–33. doi: 10.1016/S1389-1723(04)70238-8
- 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
- Rangaswami G, Sadasivan KV (1964) Studies on occurrence of *Azotobacter* in soil types. *J Indian Soc Soil Sci* 12:43–49
- Revillas JJ, Rodelas B, Pozo C, Toledo MV, 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. *J Appl Microbiol* 89:486–493
- Ruinen, J. 1961. The phyllosphere. I. An ecologically neglected milieu. *Plant and Soil* 15:81–109.
- Salazar, R., Rojano, A., López, I. 2014. Water use efficiency in controlled agriculture. ISSN 2007-2422
- Schroth. M.N. y A.R. Weinhold. 1986. Root-colonizing bacteria and plant health. *HortSci*. 21: 1295-1298.

- Sharma, N., Acharya, S., Kumar, K., Prakash Chaurasia O.M. 2018. Hydroponics as an advanced technique for vegetable production: An overview. *Journal of Soil and Water Conservation* 17(4):364-371. DOI: 10.5958/2455-7145.2018.00056.5
- Shimobayashi, Y. y Tominaga, K. 1986. Application of biotechnology in the food industry. I. Brewing of white wine by a bioreactor. *Hokaidoritsu Kogyo Shikenjo Hokoku*. 285: 199–204.
- Siripattanakul S, Wirojanagud W, McEvot J, Caset FXM, Khan E. 2009. A feasible study of immobilized and free mixed culture bioaugmentation for treatin atrazine in infiltrate. *Journal of Hazardius Materials*. 168: 1373-1379. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.025
- 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
- Stewart, G. G., y Russell, I. 1986. One hundred years of yeast research and development in the brewing industry. *Journal of the Institute of Brewing*. 92: 537–558.
- Tallur PN, Mulla SI, Megadi VB, Talwar MP, Ninnekar HZ. 2015. Biodegradation of cypermethrin by immobilized cells of *Micrococcus* sp. strain CPN 1. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(3): 667–672. doi: 10.1590/S1517-838246320130557
- 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
- Tien C-J, Lin M-C, Chiu W-H, Chen CS. 2013. Biodegradation of carbamate pesticides by natural river biofilms in different seasons and their effects on biofilms community structure. *Environmental Pollution*. 179: 95–104. Doi: 10.1016/j.envpol.2013.04.009
- Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y, Nomura N. 2016. Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 80: 7–12. doi: 10.1080/09168451.2015.1058701
- Verstrepen, K. J., Derdelinchx, G., Verachtert, y Delvaux, F. R. 2003. Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 197-205 200.

- Yañez-Ocampo G, Sánchez-Salina E, Jimenez-Tobon GA, Penninckx M, Ortiz-Hernández ML. 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
- Yu XY, Mu CL, Gu C, Liu C, Liu XJ. 2011. Impact of woodchip biochar amendment on the sorption and dissipation of pesticide acetamiprid in agricultural soils. *Chemosphere*. 85: 1284–1289. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.07.031
- Zhang, F., N. Dashti, H. Hynes y D.L. Smith. 1996. Plant growth promoting rhizobacteria and soybean (*Glicine max L. Merr.*) nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. *Ann. Bot.* 77: 453-459.
- Zhu SM, Chen SL. 2002. The impact of temperature on nitrification rate in fixed film biofilters. *Aquacultural Engineering*. 26: 221e237. doi: 10.1016/S0144-8609(02)00022-5
- Zuca P, Sanjust E. 2014. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. 2014,. *Molecules*. 19: 14139–14194. doi: 10.3390/molecules190914139