

## Biofertilizantes de rizobacterias en el crecimiento de plántulas de chile Poblano

Vivian F. Quiroz-Sarmiento<sup>1</sup>

Juan J. Almaraz-Suarez<sup>2§</sup>

Gabriela Sánchez-Viveros<sup>1</sup>

Rosalba Argumedo-Delira<sup>3</sup>

Apolinar González-Mancilla<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Agropecuarias-Universidad Veracruzana. Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Xalapa, Veracruz. CP. 91000. (quirozvi@yahoo.com.mx; gabsanchez@uv.mx). <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México. CP. 56230. Tel. 595 9520200, ext. 1280. <sup>3</sup>Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica-Universidad Veracruzana. Luis Castelazo Anaya s/n, Col. Industrial Animas, Xalapa, Veracruz. CP. 91190. (rosasusana13@hotmail.com). <sup>4</sup>Facultad de Agricultura y Zootecnia-Universidad Juárez de Durango. Carretera Gómez Palacio-Tlahualilo km 35, Ejido Venecia, Durango. CP. 35170. (apolinar.gonzalez@uied.mx).

§Autor para correspondencia: jalmaraz@hotmail.com.

### Resumen

El chile Poblano (*Capsicum annuum* L.) es una variedad muy consumida en nuestro país, pero existen varios problemas que afectan su cultivo y producción. Considerando lo anterior, el objetivo de esta investigación fue elaborar y comparar el efecto de dos biofertilizantes con rizobacterias en el crecimiento de plántulas de chile Poblano. La investigación se realizó en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo en los años 2015-2016. El trabajo se desarrolló en tres etapas: 1) selección de medios de cultivo y dinámica de crecimiento de cuatro cepas de rizobacterias; 2) elaboración de dos bioformulaciones utilizando como acarreadores perlas de alginato y turba; asimismo, se evaluó la viabilidad de las rizobacterias por cinco meses; y 3) evaluación del efecto de las bioformulaciones en la promoción del crecimiento de plántulas de chile Poblano. Las cepas de *Serratia* presentaron el mayor crecimiento en el medio de cultivo TBS, mientras que las cepas de *Pseudomonas* tuvieron un alto crecimiento en caldo Luria-Bertani. La fase estacionaria de las cepas de *Pseudomonas* se alcanzó entre las 24-48 h y la de las cepas de *Serratia* entre las 12-44 h. La vida de anaquel de las dos formulaciones se mantuvo de  $1 \times 10^{12}$  a  $1 \times 10^9$  UFC durante cinco meses. La aplicación de perlas de alginato en los semilleros estimuló el crecimiento de las plántulas hasta 35% con respecto al testigo. La aplicación de biofertilizantes a base de perlas de alginato y turba es una buena opción para promover el crecimiento de plántulas de chile.

**Palabras claves:** *capsicum annuum*, biotecnología, inoculantes.

Recibido: agosto de 2019

Aceptado: octubre de 2019

## Introducción

La demanda por el uso de insumos biológicos en la agricultura se ha incrementado, debido a la necesidad de reducir la contaminación ambiental y producir alimentos sanos e inocuos. Una alternativa es la utilización de biofertilizantes microbianos como un medio para incrementar rendimiento, mejorar la rentabilidad de los cultivos, reducir el impacto de los agroquímicos en el ambiente y disminuir la presencia de contaminantes en los alimentos que consumimos (Soria *et al.*, 2001; Dinesh *et al.*, 2010).

En nuestro país la producción de chile ha disminuido en los últimos años por varios problemas, entre los que se encuentran la mala calidad de las plántulas que son trasplantadas en campo (Huerta *et al.*, 2007). Para el caso del cultivo de chile Poblano en México son pocos los estudios sobre el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en invernadero o campo. A nivel de semillero, la inoculación de rizobacterias se puede utilizar para obtener plántulas con mayor crecimiento, mejor sanidad y nutrición que les permitan un rápido establecimiento al trasplante en campo (Vessey, 2003).

La producción de un inoculante inicia con el aislamiento de cepas de rizobacterias de la rizosfera en medios específicos, seguido de la selección de las mejores cepas promotoras de crecimiento en ensayos a nivel de laboratorio, invernadero y campo (Bhattacharyya y Jhan, 2012). El empleo de una metodología apropiada hace posible la obtención del cultivo microbiano óptimo, para la producción de células bacterianas o sus metabolitos (Gómez y Batista, 2006). Por lo cual la selección de medios de cultivo económicos es importante en la producción de los bioinoculantes.

Sin embargo, los procesos de escalamiento de un biofertilizante pueden incrementar los costos de producción debido al tipo de formulación y a los medios de cultivo empleados para la multiplicación de las bacterias (Herrmann y Lesueur, 2013). Entre los procesos para la elaboración de un inoculante microbiano la elección del acarreador es de suma importancia. El soporte (acarreador) es la porción principal del inoculante. Los materiales de los que se compone el soporte y el tipo de formulación varían desde líquidas, suspensión, polvo, granular y geles.

El soporte tiene como función prevenir la pérdida de viabilidad de los microorganismos y tener la capacidad de proporcionar el número correcto de células viables en buenas condiciones fisiológicas en el momento de ser liberadas en invernadero o campo (Bashan *et al.*, 2014; Maheshwari *et al.*, 2015). Las materias primas utilizadas en la mayoría de los acarreadores son sustratos de origen orgánico o inorgánico; por ejemplo, turba, césped, talco, lignita, vermiculita, etc (Albareda *et al.*, 2008; Ardakani *et al.*, 2010; Angayarkanni *et al.*, 2014).

Otra opción viable es el uso de perlas de alginato como acarreadores. Los encapsulados no son tóxicos, se degradan fácilmente en el suelo, la liberación de las bacterias es lenta y su vida de anaquel puede ser mayor de 14 años (Lebsky *et al.*, 2001; Bashan *et al.*, 2002; Yubur *et al.*, 2007). Por lo cual el objetivo principal de esta investigación fue elaborar dos biofertilizantes a base de rizobacterias (*Serratia* y *Pseudomonas*) usando como acarreador perlas de alginato húmedas y turba para estimular el crecimiento de plántulas de chile Poblano. La hipótesis planteada fue que las perlas de alginato aumentan la supervivencia de las rizobacterias que resulta en una mayor efectividad en plántulas de chile Poblano.

## Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio e invernadero del Área de Microbiología del Suelo, del Programa de Edafología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, en el periodo comprendido de abril de 2015 a octubre de 2016. Se utilizaron cuatro cepas de rizobacterias: *Serratia liquefaciens* CPAC53, *Serratia plymuthica* CPPC55, *Pseudomonas tolaasii* P61 y *Pseudomonas yamanorum* OLSf5 de la colección microbiana del Laboratorio de Microbiología del Suelo. Estas cepas fueron aisladas de diferentes hospedantes y están caracterizadas como promotoras de crecimiento vegetal de cultivos de chile (González *et al.*, 2017; Angulo-Castro *et al.*, 2018).

### **Eta**pa 1: selección del medio de cultivo y dinámica de crecimiento de cada grupo bacteriano

Se utilizaron los medios: caldo nutritivo (CN) y caldo Luria-Bertani (LB) para las cuatro cepas de rizobacterias y un medio específico para cada género bacteriano; caldo King B (CK) para *Pseudomonas* y caldo triptona soya (TBS) para *Serratia*. Se emplearon frascos de vidrio con capacidad de 250 mL, a los cuales se les colocó un volumen de 150 mL de cada medio. Se tomó una asada de la cepa y se colocó en cada uno de los frascos en condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar.

Los frascos fueron incubados en un agitador orbital Thermo Scientific™ MaxQ™ 40000® a 180 rpm y una temperatura de 28 °C. El crecimiento bacteriano se cuantificó mediante densidad óptica, utilizando un espectrofotómetro marca Bio Tek modelo Synergy 2® a una longitud de onda de 600 nm. Para esto se tomaron alícuotas de 200 µL por triplicado de cada uno de los cultivos bacterianos, se depositaron en cada uno de los pozos de una microplaca (Costar® 3596, Corning Incorporated, NY) y se midió su densidad óptica; las muestras se tomaron a las 24, 48 y 72 h de incubación. Se estableció un experimento para cada género de bacterias (*Pseudomonas* o *Serratia*), donde se evaluó el crecimiento en tres medios de cultivo, esto en diseño experimental completamente al azar con 9 repeticiones por tratamiento.

Se realizó un análisis estadístico, mediante el paquete SAS para Windows (SAS Institute Inc. 2002), donde la variable de estudio fue la densidad óptica. Se hicieron análisis de varianza y prueba de comparación de medias por Tukey ( $\alpha= 0.05$ ). Una vez seleccionado el medio de cultivo para cada género bacteriano, el siguiente paso fue conocer la dinámica de crecimiento de cada una de las cuatro cepas de rizobacterias. Para el género *Serratia* se utilizó el medio TBS y para el género de *Pseudomonas* el medio LB. La metodología utilizada para esta fase fue similar a la empleada para la selección de los medios de cultivo.

Las cepas se inocularon en los medios y se midió la densidad óptica cada cuatro horas por 48 h y finalmente una última lectura a las 72 h, dando un total de 14 lecturas. El experimento se estableció utilizando un diseño experimental completamente al azar. Los tratamientos fueron las 4 cepas de rizobacterias con 9 repeticiones. Las 2 cepas de *Serratia* se cultivaron en medio TBS y las 2 cepas de *Pseudomonas* en medio LB. La variable medida fue la densidad óptica. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el paquete estadístico SAS para Windows (SAS Institute Inc. 2002), realizando un análisis de varianza y prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ).

## **Etapas 2: elaboración de los biofertilizantes y supervivencia de las rizobacterias**

La metodología que se empleó para la elaboración de las perlas fue la propuesta por Bashan (1986), con algunas modificaciones. Se utilizaron los mismos medios de cultivo señalados arriba para preparar el inóculo de las cepas de rizobacterias. A frascos con 750 mL de caldo se les agregó alginato de sodio al 2% y se esterilizó a 18 lb por 18 min. Se inocularon tres asadas de la cepa bacteriana en los frascos y se incubaron en un agitador orbital Thermo Scientific™ MaxQ™ 40000® a 180 rpm, a una temperatura de 28 °C por 48 h.

Las perlas fueron elaboradas utilizando una bomba peristáltica (Watson-Marlow 120U/DV®), para lo cual un extremo de la manguera de la bomba fue colocada dentro del frasco que contenía el medio de cultivo líquido y bombeado a 72 rpm, el otro extremo de la manguera se colocó encima de un vaso de precipitado de 2 L que contenía 1.5 L de una solución de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) al 0.1 M, en agitación constante en una plancha de agitación (Corning PC-420®) donde se iban depositando las gotas que posteriormente formarían las perlas, para lo cual éstas se dejaron en la solución en agitación por un lapso de tres horas.

Trascurrido ese tiempo las perlas se enjuagaron tres veces con una solución salina (NaCl 0.85%) y se colocaron en un colador para quitar el exceso de humedad. Todo el proceso de la elaboración de las perlas se llevó a cabo en una campana de flujo laminar. Finalmente, las perlas se colocaron en bolsas ziploc estériles y se conservaron en refrigeración a 4 °C. En el caso del biofertilizante de turba, ésta se neutralizó con carbonato de calcio y una pizca de carbón activado con la finalidad de adsorber algún tóxico que pudiera liberarse. La turba se esterilizó en una autoclave a 18 lb, por intervalos de tres horas por tres días.

Trascurrido el tiempo de esterilización se colocó en un horno de secado (FELISA, modelo 242-A®) a una temperatura de 72 °C por 48 h. Una vez estéril y seca la turba, se colocó 1 kg en una bolsa de plástico desinfectada y se le agregaron aproximadamente 100 mL de inóculo con una concentración de 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. La mezcla se homogenizó perfectamente, sin que se presentara saturación de humedad. Una vez impregnada la turba, se selló la bolsa y se incubó a 28 °C por 15 días (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993).

Trascurrido el tiempo de incubación se colocaron 100 g del biofertilizante en bolsas de polipropileno metálicas y se cerró al vacío con un sellador (Food Saber serie 3800®) y se conservaron en refrigeración a 4 °C.

Se evaluó la vida de anaquel (supervivencia) de las bacterias en las perlas de alginato y en la turba una vez al mes, por un periodo de cinco meses. Para cuantificar la carga bacteriana se utilizó la técnica de dilución y conteo en placas, en el caso de perlas de alginato se colocó 1 g de éstas en un tubo de dilución que contenía 9 mL (dilución 10<sup>-1</sup>) de una solución Buffer de fosfato (solución A (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + solución B (NaPO<sub>4</sub>) al 0.1 M con pH 6) y se dejó en agitación por 24 h con la finalidad de disolver las perlas completamente.

Con respecto al biofertilizante de turba se pesó 1 g de éste y se colocó en un tubo de dilución que contenía 9 mL de agua destilada estéril (dilución 10<sup>-1</sup>), el tubo se agitó por 40 min. En ambos casos, se tomaron 100 µL de la suspensión y se adicionaron a un tubo que contenía 900 µL de agua destilada estéril (dilución 10<sup>-2</sup>), el tubo se agitó y a partir de esta dilución se realizaron sucesivas

diluciones hasta  $10^{-9}$ . Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  y se colocaron en el centro de las cajas de Petri con agar nutritivo las placas fueron rastrilladas con una varilla de vidrio e incubadas a 28 °C por 48 h. Este procedimiento se realizó por triplicado.

El experimento se estableció utilizando un diseño experimental completamente al azar. Los tratamientos fueron cuatro cepas de rizobacterias (CPAC53, CPPC55, P61 y OLSf5) con tres repeticiones, tanto para las perlas de alginato como para la formulación de turba, dando un total de 12 unidades experimentales para cada formulación. La variable evaluada fue la supervivencia de las bacterias en las dos formulaciones. El conteo de las UFC fue expresado en unidades logarítmicas. Los datos obtenidos se analizaron mediante el paquete estadístico SAS para Windows (SAS Institute Inc. 2002) y se realizó un análisis de varianza y prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

### **Etapas 3: establecimiento del ensayo en invernadero**

Se utilizó un sustrato que contenía agrolita, peat moss y vermiculita en una relación 1:1:1. Se utilizaron contenedores de polipropileno con 30 cavidades. Para el biofertilizante de perlas de alginato los contenedores se cubrieron a la mitad de su capacidad con el sustrato. Se utilizaron 10 g de perlas por cada 100 g de sustrato, lo que correspondió a colocar 0.33 g por cavidad del semillero, después de colocar las perlas los contenedores fueron llenados en su totalidad con sustrato. En el caso del biofertilizante de turba, se mezclaron 10 g de la bioformulación con cada 100 g de sustrato. Las dos formulaciones contenían una concentración de  $10^9$  UFC  $\text{g}^{-1}$ .

Se emplearon semillas de una variedad criolla de chile Poblano de la región de la Sierra Nevada, específicamente del municipio de San Matías Tlalancaleca, Puebla. Las semillas fueron proporcionadas por el Sr. Leopoldo Ramírez Morales, quien ha practicado un proceso de selección sobre su variedad durante los últimos 20 años. La variedad es representativa de la región dado que el Sr. Ramírez, surte de plántulas a la gran mayoría de los productores de esa área. El ciclo de la variedad desde el almácigo hasta la última cosecha es de aproximadamente siete meses.

Las semillas fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 5 min y enjuagadas con agua destilada estéril cinco veces. Se coloraron dos semillas por cada cavidad del semillero. Las plántulas fueron regadas con agua destilada cada tres días y una vez por semana se aplicó solución nutritiva de Steiner al 10% (Ca  $(\text{NO}_3)$  0.106 g,  $\text{KNO}_3$  0.0312,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.0492 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.013 y mix de micronutrientes 0.017  $\text{L}^{-1}$ ), a todos los tratamientos incluyendo al testigo.

Después de 60 días las plántulas fueron cosechadas y se evaluaron las variables agronómicas: 1) número de hojas en cada plántula; 2) altura de las plántulas; 3) El área foliar se determinó con un medidor modelo LI-3100C marca Li-cor®; y 4) biomasa seca, donde el material vegetal se secó en un horno marca FELISA, modelo 242-A® por 48 h a 70 °C y se pesó en una balanza analítica marca Sartorius, modelo Analytic Ac 2105®. También se realizó un análisis del contenido de nutrientes: fósforo (P) y potasio (K) se determinaron utilizando un espectrofotómetro de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo marca Varian modelo 725-ES® y el contenido de nitrógeno (N) se determinó por digestión húmeda mediante el método de Kjeldahl (Bremner, 1996).

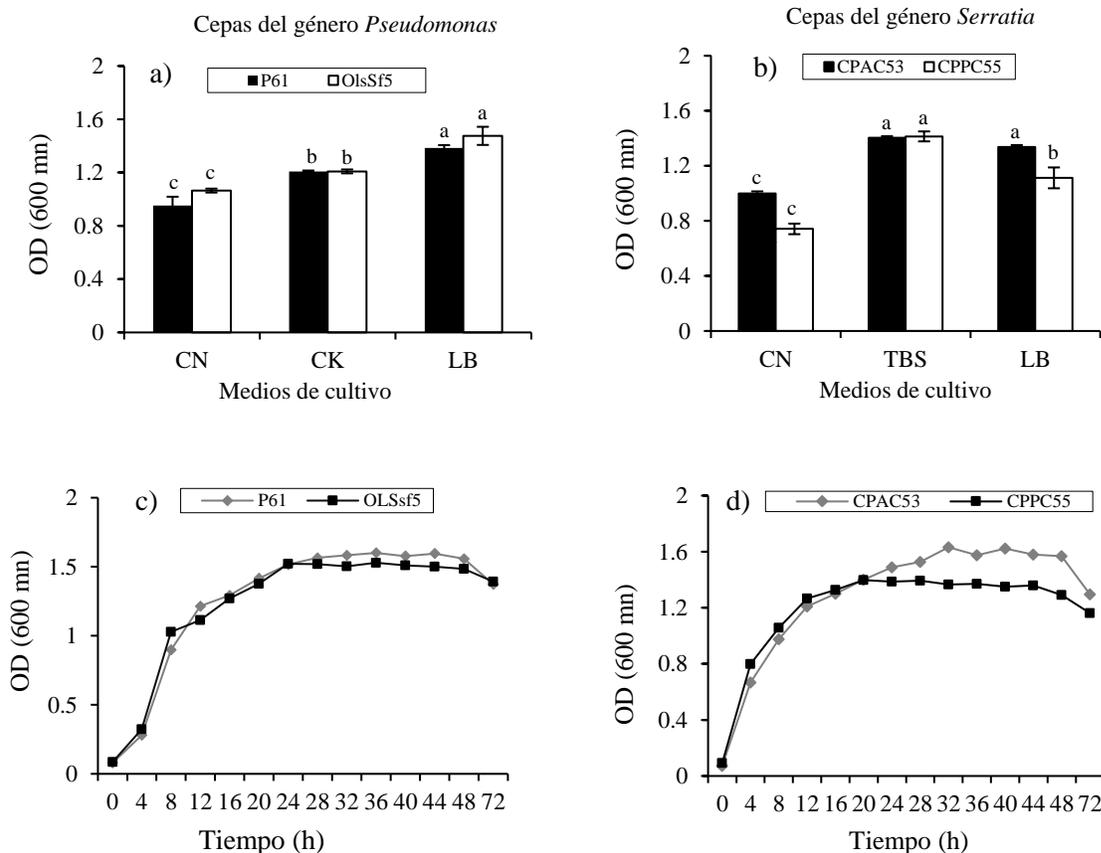
Los tratamientos utilizados fueron 4 cepas de rizobacterias en 2 bioformulaciones (perlas de alginato y turba); se incluyó un testigo sin inoculación, todos los tratamientos tuvieron 15 repeticiones y el diseño experimental usado fue bloques al azar. Los datos obtenidos de todas las

variables estudiadas (número de hojas, altura, biomasa, área foliar, N, P, K) fueron analizados mediante el paquete estadístico SAS para Windows (SAS Institute Inc. 2002), realizando un análisis de varianza y prueba de comparación de medias por Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

## Resultados y discusión

### Selección del medio de cultivo y dinámica de crecimiento

Con respecto al crecimiento de las rizobacterias en los diferentes medios de cultivo se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.01$ ) en ambos géneros bacterianos. Las cepas del género *Pseudomonas* presentaron el crecimiento más alto en el caldo LB con 1.3 unidades de densidad óptica, mientras que las cepas del género *Serratia* en caldo TBS con un crecimiento de 1.4 unidades de densidad óptica a las 72 h respectivamente (Figura 1a y 1b).



**Figura 1.** Selección de medios de cultivo líquido (a y b). Las barras representan el promedio de nueve repeticiones y las letras diferentes indican diferencias significativas. CN= caldo nutritivo; TBS= caldo triptona soya; LB= caldo Luria Bertani y CK= caldo King B; y dinámica de crecimiento de las cepas en los medios seleccionados (c y d). Para ambos métodos se utilizó la técnica de densidad óptica, medida a 600 nm (OD). Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

La dinámica de crecimiento de las dos cepas de *Pseudomonas* se evaluó en el medio LB, el cual fue el mejor para este género bacteriano. Se observó que el crecimiento se incrementó de un valor de 0.3 unidades a las 4 h hasta un valor de 1 unidad de densidad óptica a las 8 h, este periodo se le

conoce como fase exponencial, ya que en éste se alcanza la máxima velocidad de crecimiento. Después de lo anterior, se observó una fase pre-estacionaria entre las 8 y 24 h de cultivo, que es una fase de retardo del crecimiento, alcanzando un valor de 1.5 unidades de densidad óptica.

La fase estacionaria se presentó en el periodo de las 24 a 48 h, en este periodo ya no hubo crecimiento, y después de este tiempo el crecimiento disminuyó (Figura 1c). Para el caso de las cepas del género *Serratia* el medio de cultivo que se empleó fue el caldo TBS. Se observó una fase de crecimiento exponencial en el periodo de 0 y 8 h con 0.8 unidades de densidad óptica, seguida de la fase pre-estacionaria entre las 8 y 12 h con un valor alcanzado de 1.2 unidades de densidad óptica, mientras que la fase estacionaria se presentó entre las 12 h a las 44 h con un valor promedio de 1.3.

Unidades de densidad óptica en la cepa CPPC55 y de 1.6 unidades de densidad óptica en la cepa CPAC53 y finalmente después de las 48 h se presentó la muerte celular (Figura 1d). *Pseudomonas* y *Serratia* son dos géneros de bacterias altamente versátiles en la utilización de sustratos como fuente de carbono y no requieren vitaminas, lo que explica en gran parte su viabilidad en una variedad de medios de cultivo (Holt *et al.*, 1994). El género *Serratia* no requiere de muchos factores de crecimiento; puede crecer a temperaturas entre 10-36 °C, con pH de 5-9 y en presencia de NaCl (Grimont y Grimont, 1978).

En este trabajo se observó que las cuatro cepas de rizobacterias crecen bien en los tres medios de cultivos empleados, aunque las dos cepas del género *Pseudomonas* alcanzaron su mayor crecimiento en caldo LB, y las dos cepas del género *Serratia* en caldo TBS (Figura 1). Esto indica que las rizobacterias utilizadas no son exigentes en sus requerimientos nutricionales, tal como lo señalan los autores antes citados.

El medio TBS se ha usado para la propagación de cepas del género *Serratia* en varias investigaciones, entre sus componentes se encuentra la peptona de caseína, peptona de soya, NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y glucosa, que favorece el desarrollo de las bacterias. Por ejemplo, Czajkowski *et al.* (2012) utilizaron este medio en la propagación de una cepa de *Serratia plymuthica* para emplearla como controlador de la pudrición blanda en cultivos de papa.

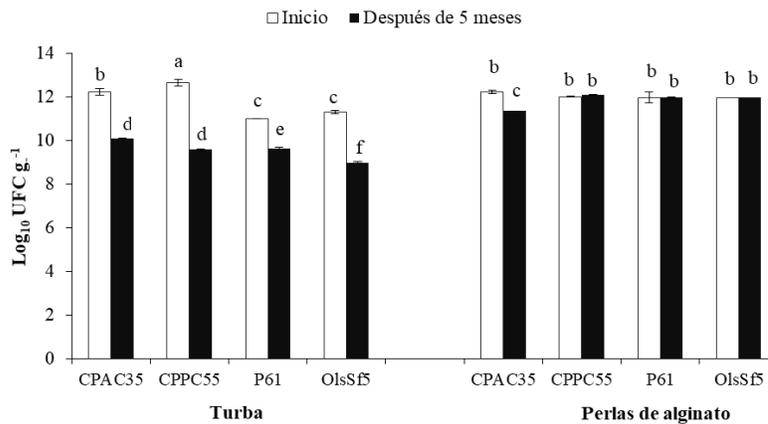
Con respecto a las dos cepas del género *Pseudomonas* el mayor crecimiento se obtuvo en caldo LB. Este medio está compuesto principalmente de triptona, extracto de levadura y NaCl, es uno de los más usados para el cultivo de especies bacterianas, debido a que es rico en nutrientes y es de fácil elaboración (Garboza *et al.*, 2011). El caldo nutritivo es uno de los medios de cultivo más utilizados para la activación y propagación de diferentes géneros bacterianos. Sin embargo, de los tres medios de cultivo utilizados en este estudio, el caldo nutritivo resultó poco eficiente para el crecimiento de las cepas de los géneros *Serratia* y *Pseudomonas* (Figura 1).

La selección de un medio de cultivo debe garantizar incrementos en los rendimientos de los procesos fermentativos de forma rápida y económica (Gómez y Batista 2006). El costo económico de cada uno de los reactivos a utilizar es un punto a considerar. Se pueden reducir costos en la multiplicación de rizobacterias al remplazar insumos grado reactivo del medio de referencia por fuentes nutricionales alternativas como son los residuos agroindustriales (Rivera y Botía, 2008) y extractos vegetales (Khalil *et al.*, 2016), que pueden ayudar a reducir costos.

## Supervivencia de las rizobacterias en los biofertilizantes

El tiempo de almacenamiento de las perlas fue por 150 días. Las cuatro cepas presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0.01$ ) en la supervivencia durante el almacenamiento en las dos formulaciones. La carga bacteriana inicial de las cuatro cepas en las perlas de alginato fue de alrededor de  $12 \text{ Log}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$  y la población de casi todas permaneció casi sin cambios a lo largo de los cinco meses de almacenamiento, excepto la cepa CPAC53 que tuvo una ligera caída con un valor de  $11.4 \text{ Log}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ .

Con respecto al biofertilizante a base de turba, las dos cepas de *Serratia* presentaron una carga inicial superior a  $12 \text{ Log}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$  y las cepas de *Pseudomonas* tuvieron una carga inicial de alrededor de  $11 \text{ Log}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ . En esta bioformulación la caída de la población de las cuatro cepas después de cinco meses de almacenamiento fue más alta que en las perlas de alginato, alcanzando valores entre  $10.1$  a  $9 \text{ Log}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ , en donde la cepa OLSf5 fue la que presentó la menor población. En general, la supervivencia fue mayor en perlas de alginato que en turba (Figura 2).



**Figura 2. Evaluación de la vida de anaquel de las rizobacterias en los dos biofertilizantes (turba y perlas de alginato) conservadas en refrigeración durante cinco meses.** Las barras representan el promedio de 15 repeticiones y las letras diferentes indican diferencia estadística significativa. Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

El alginato es el polímero con mayor potencial para la encapsulación de bacterias debido a que la cadena polimérica de ácidos manurónico y gulurónico se puede unir mediante iones de calcio para formar los geles. Esta conformación determina las propiedades del alginato tales como la solubilidad, la viscosidad y la capacidad de intercambiar iones con metales divalentes (Yabur *et al.*, 2007; De-Bashan y Bashan, 2008). Las perlas de alginato son de fácil bio-degradabilidad e inocuas; además por sus propiedades permiten una elevada supervivencia y una gradual liberación de bacterias de *Azospirillum* en el campo (Bashan, 1998; De-Bashan *et al.*, 2007).

En el presente estudio la mayor supervivencia de las bacterias se logró con las perlas de alginato. Las características propias de las cepas es uno de los atributos que se tienen que considerar para elegir el acarreador ya que no todos los microorganismos son aptos para ser encapsulados. El uso de perlas de alginato húmedas no está reportado en otros estudios, por lo que esta investigación podría abrir la pauta para considerar esta formulación como una buena alternativa en la producción de biofertilizantes utilizando rizobacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Serratia*.

Aunque *Azospirillum* es una de las bacterias más estudiadas y usadas en bioformulaciones (Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005), también hay otras bacterias que se han utilizado. Por ejemplo, Ivanova *et al.* (2005) observaron que *P. corrugata* es más sensible al almacenamiento que *Azospirillum*, en perlas de alginato su carga bacteriana disminuyó hasta  $10^3$  después de seis meses en almacén. En cambio, *Azospirillum* mantuvo una carga de hasta  $10^8$  UFC. Este mismo comportamiento lo observaron Trivedi *et al.* (2005) con la cepa *Bacillus subtilis*.

La turba es un acarreador ideal, que aporta nutrientes a los microorganismos y posee una gran superficie específica, así como un alto poder de retención de humedad y capacidad de amortiguamiento, lo que proporciona a los microorganismos protección ante condiciones ambientales adversas en campo (De-Bashan *et al.*, 2007). Aparte de la turba, son varios los materiales que se pueden usar como soportes en las formulaciones, entre estos se encuentran: el bagazo, estiércol, compost, polvo de coco, vermicompost, salvado de arroz, perlita, fosfato de roca, carbón, lignita, bentonita, talco y arcillas (Albareda *et al.*, 2008; Ardakani *et al.*, 2010; Bashan *et al.*, 2014). De las cuatro cepas de rizobacterias utilizadas en esta investigación, *S. plymuthica* CPPC55 fue que la que presentó el valor más alto de viabilidad durante el periodo de almacenamiento.

### Efecto de los biofertilizantes en plántulas de chile Poblano

Se presentaron diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.01$ ) entre las cepas de los dos biofertilizantes para las variables agronómicas evaluadas. Se observó que todos los tratamientos fueron superiores al testigo. Con respecto al área foliar los valores más altos se obtuvieron con las cepas CPAC53 y OLSf5 en perlas de alginato húmedas con valores entre 18.3 y 18.2 cm<sup>2</sup>, mientras que los valores más bajos se registraron en la cepa de OLSf5 con 12.8 cm<sup>2</sup> en turba y el testigo con 12.6 cm<sup>2</sup>. El mayor número de hojas promedio se presentó con la cepa CPAC53 en perlas de alginato y el menor número se obtuvo en el testigo.

El valor más alto de altura de las plántulas se presentó con las cepas CPAC53, CPPC55 y OLSf5 en perlas de alginato húmedas con un promedio de 13.3 cm, y la más baja fue en el testigo con 10.4 cm. La biomasa seca más alta se presentó con las cepas CPAC53, P61 y OLSf5 en perlas de alginato húmedas con valores entre 151.3 y 155.3 mg. El testigo tuvo una biomasa seca de sólo 91 mg (Cuadro 1). Con respecto a nutrimentos, el valor más alto de fósforo se presentó con la cepa OLSf5 en perlas de alginato con 2.4 µg y el más bajo en el testigo con 1.7 µg.

**Cuadro 1. Variables agronómicas evaluadas en las plántulas de chile Poblano en los dos biofertilizantes.**

Tratamientos	Cepa	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Número de hojas	Altura (cm)	Biomasa (mg)	P (µg)	K (µg)	N (µg)
Testigo	Sin inocular	12.6±0.5 <sub>c</sub>	5.7±0.2 <sub>c</sub>	10.4±0.4 <sub>d</sub>	91±2.9 <sub>c</sub>	1.7±0.06 <sub>e</sub>	14.9±0.6 <sub>c</sub>	6.7±0.04 <sub>d</sub>
Turba	CPAC53	17.2±0.6 <sub>ab</sub>	6.7±0.2 <sub>ab</sub>	12.7±0.2 <sub>ab</sub>	131.1±4.9 <sub>ab</sub>	1.9±0.06 <sub>cd</sub>	18.6±0.6 <sub>b</sub>	7.5±0.4 <sub>cd</sub>
	CPPC55	16.5±0.5 <sub>ab</sub>	6.5±0.1 <sub>abc</sub>	12.3±0.3 <sub>abc</sub>	121.5±4 <sub>b</sub>	2.1±0.05 <sub>bc</sub>	19.6±0.4 <sub>ab</sub>	8.1±0.06 <sub>bc</sub>
	P61	15.6±0.5 <sub>b</sub>	5.8±0.2 <sub>bc</sub>	10.9±0.4 <sub>cd</sub>	129.1 ±6.9 <sub>ab</sub>	2.2±0.04 <sub>bc</sub>	18.1±0.4 <sub>b</sub>	8.1±0.3 <sub>bc</sub>
	OLSf5	12.8 ±0.6 <sub>c</sub>	5.8 ±0.2 <sub>bc</sub>	11 ±0.4 <sub>cd</sub>	101.9 ±3.9 <sub>bc</sub>	1.9 ±0.1 <sub>d</sub>	16.1±0.7 <sub>c</sub>	7.3±0.3 <sub>d</sub>

Tratamientos	Cepa	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Número de hojas	Altura (cm)	Biomasa (mg)	P (μg)	K (μg)	N (μg)
Perlas de alginato	CPAC53	18.3±0.6 <sub>a</sub>	7.2±0.24 <sub>a</sub>	13.3±0.3 <sub>a</sub>	155.3±6.5 <sub>a</sub>	2.2±0.06 <sub>b</sub>	21±0.7 <sub>a</sub>	8.7±0.2 <sub>ab</sub>
	CPPC55	17.4±0.4 <sub>ab</sub>	6.7±0.1 <sub>ab</sub>	13.3±0.3 <sub>a</sub>	128.4±6.3 <sub>ab</sub>	2.1±0.02 <sub>bcd</sub>	18.1±0.4 <sub>b</sub>	7.2±0.06 <sub>d</sub>
	P61	16.8±0.5 <sub>ab</sub>	6.6±0.1 <sub>abc</sub>	11.4±0.4 <sub>bcd</sub>	154.8±8 <sub>a</sub>	2.1±0.1 <sub>bcd</sub>	18.5±0.8 <sub>b</sub>	8.7±0.4 <sub>ab</sub>
	OLsSf5	18.2±0.5 <sub>a</sub>	6.5±0.1 <sub>abc</sub>	13.3±0.2 <sub>a</sub>	151.3±11.3 <sub>a</sub>	2.4±0.05 <sub>a</sub>	21.1±0.6 <sub>a</sub>	9.2±0.2 <sub>a</sub>
CV (%)		13.7	13.2	10.3	19.7	8.2	7.7	7.6

Los datos representan la media ±desviación estándar n=15. Las letras diferentes dentro de la misma columna representan diferencias significativas, Tukey ( $\alpha=0.05$ ); CV= coeficiente de variación.

Los valores más altos de potasio se presentaron con las cepas CPAC53 y OLsSf5 en perlas de alginato con promedio de 21 y el más bajo en el testigo con 14.9 μg. Finalmente el valor más alto de nitrógeno se presentó en las plántulas tratadas con la cepa OLsSf5 en perlas de alginato con 9.2 μg y el más bajo con la cepa CPPC 55 en la misma formulación con 7.2 μg, y el testigo con 6.7 μg (Cuadro 1). Las plántulas de chile Poblano presentaron una respuesta similar a la inoculación con las cepas de BPCV en ambas formulaciones, exceptuando la cepa OLsSf5 que presentó su mayor efecto sobre las plántulas cuando se aplicó en perlas de alginato.

En general, se encontró una tendencia de un efecto ligeramente superior sobre las plántulas cuando se utilizó la formulación de perlas de alginato en comparación al uso de turba. En el campo agrícola, los polímeros son ampliamente utilizados con diferentes fines, por ejemplo, para hacer más eficiente la aplicación de plaguicidas en el control de patógenos de los cultivos y como biorremediadores de suelos contaminados (Puoci *et al.*, 2008). En el caso de biofertilizantes en la agricultura el uso de perlas de alginato es una opción para la entrega gradual de los microorganismos en las raíces de las plantas (Bashan *et al.*, 2014).

En nuestro caso se usó la formulación de perlas de alginato en semilleros de chile Poblano, mostrando que es igualmente efectiva que la formulación de turba, con la ventaja que protege a las bacterias y las libera gradualmente. En chile Poblano son pocos los estudios que se tienen sobre la calidad de plántulas. La obtención de plantas sanas y vigorosas en almácigo es vital para que éstas puedan establecerse en campo después del trasplante, lo que puede lograrse con un correcto manejo del sustrato, la fertilización y sanidad de la semilla (García *et al.*, 2011).

La combinación de prácticas de manejo en almácigo y el uso de bioformulaciones conduce al éxito en el establecimiento de las plantas en campo. Sin embargo, el uso de inoculantes no se incluye en las prácticas de manejo de chile Poblano (Huerta *et al.*, 2007). El uso de estos en almácigo puede reducir costos de cultivo, combatir el daño por fitopatógenos y aumentar el vigor de plántulas.

El uso de los biofertilizantes no es actual, pero en el caso del cultivo de chile Poblano no se cuenta con biofertilizantes en el mercado específicos para este cultivo para promover el crecimiento y sanidad.

Las formulaciones de perlas de alginato húmedas y turba utilizadas promovieron significativamente el crecimiento de las plántulas de chile Poblano a nivel de almácigo. Estas formulaciones pueden ser una opción en la producción de plántulas de chile sanas y vigorosas para trasplante. En el caso de las perlas de alginato, estas liberan lentamente a las bacterias en el suelo, lo cual puede brindar una ventaja sobre la turba cuando se aplican a los cultivos.

## Conclusiones

Las cepas de *Serratia* tuvieron el mayor crecimiento en caldo TBS y las cepas de *Pseudomonas* en caldo LB. De las dos formulaciones, las perlas de alginato húmedas mantuvieron la población más alta durante cinco meses. Las formulaciones que tuvieron el mayor efecto en chile Poblano fueron de las cepas *S. liquefaciens* CPAC53, *P. tolaasii* P61 y *P. yamanorum* OLsSf5 en perlas de alginato húmedas o en turba. Las bioformulaciones estimularon el crecimiento de las plántulas hasta 35% con respecto al testigo en almácigo. Ambas bioformulaciones pueden ser utilizadas para incrementar el crecimiento de plántulas de chile Poblano (*Capsicum annuum* L.) y optimizar la aplicación de nutrimentos.

## Literatura citada

- Albareda, M.; Rodríguez-Navarro, D. N.; Camacho, M. and Temrano, F. J. 2008. Alternatives to peat as carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biol. Biochem.* 40(11):2771-2779.
- Angayarkanni, T.; Subash, A. and Kamalakannan, A. 2014. Efficacy of talc-based formulation of *Pseudomonas fluorencens* on the management of leaf spot disease of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Helix.* 4(1):460-467.
- Angulo-Castro, A.; Ferrera-Cerrato, F.; Alarcón, A.; Almaraz-Suárez, J. J.; Delgadillo-Martínez, J.; Jiménez-Fernández, M. y García-Barradas, O. 2018. Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plántulas de 2 variedades de *Capsicum annuum* L. inoculadas con rizobacterias u hongos micorrizicos arbusculares. *Rev. Argentina de Microbiología.* 50(2):178-188.
- Ardakani, S. S.; Heydari, A.; Tayebi, L. and Mohammadi, M. 2010. Promotion of cotton seedlings growth characteristics by development and use of new bioformulations. *Inter. J. Bot.* 6(2):95-100.
- Bashan, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(5):1089-1098.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances.* 16(4):729-770.
- Bashan, Y.; De Bashan, E. L.; Hernández, P. J.; Puente, E. M.; Bacilio, M. y Leyva, A. L. 2008. Inoculantes microbianos sintéticos: ¿son el futuro?. *In: Díaz-Franco, A. y Meyek-Pérez, N. (Ed.). La Biofertilización como tecnología sostenible. México, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Editorial Casa y Valdés. México, DF. 167-189 pp.*
- Bashan, Y.; De-Bashan, L. E.; Prabhu, S. R. and Hernández, J. P. 2014. Advances in plant growth bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant Soil.* 378(1-2):1-3.
- Bashan, Y.; Hernández, J. P. and Leyva-Macario, L. A. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol. Fertility Soils.* 35(5):359-368.
- Bhattacharyya, P. N. and Jha, D. K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 28(4):1327-1350.
- Bremner, J. M. 1996. Nitrogen total. *In: Sparks, D. L. (Ed.). Methods of soil analysis. Part 3: Chemical Methods, Series 5. Madison, Wisconsin. Soil Science Society of America. 1085-1122 pp.*

- Czajkowski, R.; de Boer, W. J.; Van Veen, J. A. and Vander Wolf, J. M. 2012. Studies on the interaction between the biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A30, and blackleg-causing *Dickeya* sp. (biovar 3) in potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Pathology*. 61(4):677-688.
- De-Bashan, L. E. and Bashan, Y. 2008. Joint Immobilization of plant growth-promoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying plant-bacterium interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(21):6797-6802.
- De-Bashan, L. E.; Holguin, G.; Glick, B. R. and Bashan, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. *In: Ferrera-Cerrato, R. y Alarcón, A. (Ed.). Microbiología agrícola: hongos, bacterias y macrofauna, control biológico, planta microorganismo. México. Capítulo 8. Editorial Trillas. 170-224 pp.*
- Dinesh, R.; Srinivasan, V.; Hamza, S. and Manjusha, A. 2010. Short-term incorporation of organic manures and biofertilizers influences biochemical and microbial characteristics of soils under an annual crop [Turmeric (*Cucurma longa* L.)]. *Bio. Technol.* 101(12):4697-4702.
- Ferrera-Cerrato, F.; González, C. M. C. y Rodríguez, M. M. N. 1993. Manual de agromicrobiología. México. Editorial Trillas. 141 p.
- Fuentes-Ramírez, L. E. and Caballero-Mellado, J. 2005. Bacterial biofertilizers. *In: Siddiqui, Z. A. (Ed.). PGPR: biocontrol and biofertilization. The Netherlands, Springer, Dordrecht. 143-172 pp.*
- Garboza, F.; Frontado, R.; Noguera, N.; Avila, H.; Ojeda, L.; Ramirez, N.; Triana, J. y Triana F. 2011. Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*. *Rev. Sociedad Venezolana de Microbiología.* 31(2):138-143.
- García, M. C.; Taboada, G. O. R.; López, S. H.; López, P. A.; Mora, A. G. y Tlapal, B. B. 2011. Calidad de plántulas de chile ‘Poblano’ en la Sierra Nevada de Puebla, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 34(2):115-121.
- Gómez, G. y Batista, C. 2006. Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos Tropicales.* 27(3):17-25.
- González, M. A.; Almaraz, S. J. J.; Ferrera, C. R.; Rodríguez, G. M. P.; Taboada, G. O. R.; Trinidad, S. A.; Alarcón, A. y Arteaga, G. R. I. 2017. Caracterización y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de chile Poblano (*Capsicum annum* L.). *Rev. Inter. Contam. Amb.* 33(2):463-474.
- Grimont, P. A. and Grimont, F. 1978. The genus *Serratia*. *Ann. Rev. Microbiol.* 32:221-248.
- Herrmann, L. and Lesueur, D. 2013. Challenges of formulation and quality of biofertilizer for successful inoculation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(20):8859-8873.
- Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H.; Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. *Bergey’s manual of determinate bacteriology.* Baltimore, USA. 754 p.
- Huerta, D. A.; Rojas, S. F. y Fletes, I. O. 2007. Manual de chile Poblano: importancia económica y sociocultural. México. Colegio de Postgrados. Campus Puebla, Fundación Produce Puebla, AC. 80 p.
- Ivanova, E.; Teunou, E. and Poncelet, D. 2005. Alginate based macrocapsules as inoculants carriers for production of nitrogen fixing biofertilizers. *In: Nikolova, M. and Donev, A. (Ed). Proceedings of the Balkan Scientific Conference of Biology. Bulgaria. 90-108 pp.*
- Khalil, S.; Ali, T. A.; Skory, C.; Slininger, P. J. and Schisler, D. A. 2016. Evaluation of economically feasible, natural plant extract-based microbiological media for producing biomass of the dry rot biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* P22Y05 in liquid culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32(2):1-11.

- Lebsky, V. K.; Gonzalez-Bashan, L. E. and Bashan, Y. 2001. Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Canadian J. Microbiol. 47(1):1-8.
- Maheshawari, D. K.; Dubey, R. C.; Agarwal, M.; Dheeman, S.; Aeron, A. and Bajpai, V. K. 2015. Carrier based formulations of bioenotic consortia of disease suppressive *Pseudomonas aeruginosa* KRP1 and *Bacillus licheniformis* KRB1. Ecol. Eng. 81:272-277.
- Puoci, F.; Iemma, F.; Gianfranco, S. U.; Cirillo, G.; Curcio, M. and Picci, N. 2008. Polymer in agriculture: a review. Am. J. Agric. Biol. Sci. 3(1):299-314.
- Rivera, B. D. M. y Botía, D. M. R. 2008. Optimización de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en *Azospirillum brasilense* C16. No. PDF 089.
- SAS Institute Inc. 2002. SAS System for Windows Computer Program, Version 9.00. SAS Institute Inc., Cary.
- Soria, F. M. J.; Ferrera-Cerrato, R.; Barra, J. E.; González, G. A.; Santos, J. T.; Gómez, L. B. y Pérez, G. P. 2001. Producción de biofertilizantes mediante biodigestión de excreta líquida de cerdo. Terra. 19(4):353-362.
- Trivedi, P.; Pandey, A. and Palni, L. M. S. 2005. Carrier-based preparations of plant growth promoting bacterial inoculants suitable for use in cooler regions. World J. Microbiol. Biotechnol. 21(6-7):941-945.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil. 255(2):571-586.
- Yubur, R.; Bashan, Y. and Hernández-Carmona, G. 2007. Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. J. Appl. Phycol. 19(1):43-53.