Revista de la Sociedad Mexicana de

Biotecnología y Bioingeniería A.C.

Año 2013 Volúmen 17 Número 1
ISSN 0188-4786

Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería

Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotecnología
y Bioingeniería A.C.

MESA DIRECTIVA

Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
Presidente

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Vice-Presidente

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Secretaria

Dr. Mauricio Trujillo Roldán
Tesorero

Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Subsecretario

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez
Vocal Profesional

M. en B. Maria Teresa Torres Mancera
Vocal Estudiante

COORDINADOR EDITORIAL

Ing. Rubén Castillo Alamilla

FORMACION EDITORIAL

Ing. Rubén Castillo Alamilla

COMITÉ EDITORIAL

Dr. Sergio Sánchez Esquivel
Editor en Jefe
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
CINVESTAV

Dr. Fernando Luis García Carreño
CIBNOR

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
UAM-I

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Sara Solís Pereira
Instituto Tecnológico de Mérida

Dra. Elizabeth Langley McCarron
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Víctor Manuel Loyola
Centro de Investigación Científica de Yucatán

DISEÑO GRAFICO E IMAGEN

Lic. Nayeli Quinto **(SODIO NET)**

ADSCRIPCIONES Y PUBLICIDAD

Ing. Rubén Castillo Alamilla
Tel: (55) 5849 5859
Email: smbiotec@yahoo.com.mx

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM). Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título04-1999-082516265000-101. Los Conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. Tiraje 500 ejemplares.

Índice

Editorial

La Biotecnología de Hongos una Buena Oportunidad para la Colaboración 4
Dr. Guillermo Aguilar Osorio

Instrucciones para autores 6

ARTÍCULOS

Respuesta Fisiológica a la Fertilización por *Azotobacter chroococcum* AC1 y Fertilización Nitrogenada de Síntesis Sobre el Maíz (*Zea mays* L.) **en Invernadero**
Melissa Obando, Diego Rivera, Ruth Bonilla
11

EDITORIAL

La Biotecnología de Hongos una Buena Oportunidad para la Colaboración

Los hongos filamentosos han sido utilizados por la biotecnología como fábricas celulares de muchos productos; metabolitos primarios como el ácido cítrico, secundarios como los antibióticos y por supuesto las enzimas. Lo avances en los métodos moleculares han sido determinantes en el desarrollo de cepas industriales de gran productividad. Así mismo, y debido a su origen ancestral y gran diversidad, los hongos han sido un excelente modelo para estudios fisiológicos, bioquímicos, genéticos y de evolución en eucariontes. Se han descrito alrededor de 100,000 especies de hongos de los cuales, a pesar de la gran diversidad que se encuentra en la naturaleza, solo unos cuantos son utilizados. En nuestros días se tienen más de 100 genomas fungales secuenciados y muchos más en proceso. Esto ha ampliado el potencial de aplicación de los hongos más conocidos y utilizados (*Aspergillus, Penicillium, Trichoderma*), y ha incorporado el uso de otros menos estudiados.

En el mundo hay muchos esfuerzos tendientes a la organización y estudio de los hongos. Entre ellos muchos dedicados a la secuenciación de los genómas. Baste citar por ejemplo el proyecto *1000 Fungal Genomes*, propuesto y ejecutado por investigadores de Europa y Estados Unidos, el cual involucra instituciones como la CBS Central Bureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre, el Fungal Genetics Stock Center y la NRRL-USDA Culture Collection, entre otras. También se han creado diversas organizaciones que tratan conjuntamente de sistematizar el conocimiento de muchos hongos y generar estrategias para la secuenciación y anotación de los genomas de otros hongos, así como para el desarrollo de proyectos conjuntos (Eurofung Project, Fungal Genome Initiative, y otros). El reciente desarrollo de disciplinas como la genómica, proteómica y otras "omicas", conjuntamente con la bio-informática, han dado un impulso muy importante al desarrollo de las ciencias de la vida. Hoy es posible por ejemplo, mediante espectrometría de masas, identificar cientos de proteínas de diversos sistemas biológicos en un solo paso. Estas herramientas también han dado un impulso considerable al desarrollo de la biotecnología de hongos.

EDITORIAL

La biotecnología de hongos, en el sentido más amplio del término, se ha desarrollado considerablemente en el mundo, incluido nuestro país, observándose el surgimiento de numerosos grupos de investigación y publicaciones en el área. En México podemos observar que ocurre todo esto y además que existe una gran biodiversidad microbiana. Sin embargo, aun no se han dado pasos orientados a la consolidación de estrategias globales para la identificación y caracterización de un acervo de hongos autóctonos, ni para su secuenciación y anotación. Si bien existen esfuerzos a nivel individual o de algunos grupos de investigación, valdría la pena reunir al mayor número posible de grupos nacionales para desarrollar proyectos conjuntos, conseguir recursos y no desaprovechar la enorme biodiversidad con la contamos. Se puede empezar por convocar a los interesados en participar en algo que puede llamarse *"Iniciativa Mexicana para la Identificación y Aprovechamiento de la Diversidad Fúngica*". Es importante decir que se trata de conjuntar la experiencia en diversas aéreas del conocimiento, biología molecular, proteómica, genómica, fisiología, ingeniería bioquímica, taxonomía, fermentación, etc. Se puede también desarrollar una página que permita tener el directorio de los grupos que trabajan con hongos en México, que incluya sus líneas de investigación y que permita compartir protocolos, técnicas, etc., en fin, conjuntar esfuerzos para el beneficio colectivo.

En este sentido, no dudo que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería sería un elemento fundamental que podría catalizar un esfuerzo de esta magnitud. Existe la infraestructura, la capacidad, la experiencia y el talento, ¿Por qué no nos organizamos?

Dr. Guillermo Aguilar Osorio
Profesor Titular de tiempo completo
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México
Socio Fundador y ex-tesorero de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería
gao@unam.mx

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original así como de revisión en los campos de la biotecnología y bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas de la revista son el Español y el Inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones de trabajos originales y revisiones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, µl), de peso (kg, g, mg, µg), DNA, RNA y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde sus aspectos fundamentales hasta las aplicaciones de los mismos, incluyendo: microbiología, bioquímica y biología molecular, procesos y proyectos, así como biotecnología marina y biotecnología aplicada a la salud, alimentos, agricultura, veterinaria, enzimas y ambiente.

Los trabajos de investigación original serán divididos en las siguientes secciones: **Introducción, Materiales y métodos, Resultados, Discusión, Referencias y Agradecimientos**. Las secciones de **Resultados y Discusión** pueden presentarse combinadas.

Los trabajos de revisión incluirán el tema y subtemas que a juicio de los autores sean necesarios para la mejor presentación de la información. Estos trabajos pueden cubrir los siguientes contenidos:

1. ¿Qué es y para qué sirve la Biotecnología?. Es decir: descripciones que ilustren y divulguen los distintos campos de la biotecnología, sus alcances y limitaciones, su historia y sus perspectivas.

2. Las fronteras de la biotecnología: revisiones de nuevos campos o nuevas aplicaciones de la biotecnología. Por ejemplo: las perspectivas del uso de los genomas para el desarrollo de nuevas drogas o para el tratamiento de enfermedades metabólicas. Las perspectivas de la genómica (estudio sistemático de los genes y sus aplicaciones), la proteómica (predicción de la expresión de los genes en proteínas funcionales) y la fenómica (predicción de fenotipos o conductas de los organismos, en base a sus genes y a sus proteínas). El uso de la ingeniería genética para hacer ingeniería metabólica. Los nuevos tipos de reactores biológicos y los fenómenos de transporte implicados. Los nuevos esquemas de reacción, separación y control en procesos biotecnológicos.

3. Aplicaciones de la Biotecnología para resolver problemas o atender necesidades de la sociedad, con especial atención a sus aplicaciones ya vigentes en México. Esta sección será dedicada a una empresa o institución (pública o privada) que desee difundir los logros obtenidos en algún campo de la biotecnología. Por ejemplo: empresas productoras de antibióticos o productos biológicos, empresas de ingeniería ambiental que usen procesos biotecnológicos, empresas agropecuarias, forestales o de acuacultura que usen tecnologías biológicas avanzadas, o empresas de transformación de alimentos que utilicen enzimas, cultivos de microorganismos, etc. Esta lista es indicativa pero no exhaustiva.

4. Problemas de bioseguridad, bioética y biodiversidad relacionados con las aplicaciones de la biotecnología a la sociedad. Por ejemplo: análisis y comentarios sobre los debates acerca del uso de semillas transgénicas, los problemas de conservación y explotación de la biodiversidad mediante la biotecnología, los riesgos del uso de organismos transgénicos en diversos campos de la industria, los problemas de bioseguridad del uso de antibióticos y otros productos biotecnológicos.

5. La educación, la cultura y la difusión tecnológica en relación con la biotecnología. Por ejemplo: comentarios de planes y programas, de estilos y necesidades de la enseñanza, del enfoque interdisciplinario, en carreras o planes de estudio directamente ligados con la biotecnología. También necesidades y modalidades sobre programas de extensión educativa para la industria, para el público consumidor o para grupos selectos de personas interesadas en la biotecnología (políticos, funcionarios de empresas, líderes de opinión). El uso de la informática en la difusión de la biotecnología, y en general, el análisis de necesidades, métodos y alternativas para difundir los conocimientos de la biotecnología.

6. Oportunidades y propuestas para mejorar la cooperación y el desarrollo biotecnológicos. Por ejemplo: Análisis de las oportunidades vigentes de intercambio académico o comercial en biotecnología. Propuestas de nuevas formas de cooperación entre los sectores de investigación y la industria biotecnológica. Análisis y propuestas del uso óptimo de recursos humanos, financieros o materiales para mejorar la cooperación o el desarrollo de la biotecnología. En esta sección se dará espacio a los análisis, críticas o propuestas de los aspectos legales y fiscales que afecten e incluso puedan mejorar el desarrollo de la biotecnología en México. Tales como: la propiedad industrial, el régimen fiscal de las empresas, el costo del desarrollo biotecnológico y los subsidios o estímulos económicos para el desarrollo de la biotecnología.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apegarse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito será puesto en **negritas** con letra Arial o equivalente tamaño **14**. El título deberá estar centrado.

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño **12**. Los nombres de los

participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como el e-mail del autor corresponsal.

3. Se deberá añadir un **Resumen** de no más de 250 palabras en Español y un **Abstract** en Inglés de tamaño similar.

4. Se incluirán entre 3 a 6 **Palabras clave:** que permitan clasificar el artículo en una base de datos.
Estas palabras deberán de incluirse en Español y en Inglés (**Key words:**).

5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste de pondrá como primera línea en *cursivas* con letra Arial o equivalente tamaño **10**. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño **10**. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.

6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras. La impresión de las figuras e imágenes se hará en blanco y negro, por lo que se recomienda que muestren un buen contraste, en especial las figuras con varias líneas. Según el orden de aparición en el texto, las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto pero se anexarán en hojas separadas después de las **Referencias**.

7. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a tal fuente de información original, si ello fuera necesario. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García (1999) han demostrado que...”, o bien, “Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...”. Si la cita posee varios autores se escribira como sigue: “Gutiérrez *et al*. (2003), han demostrado….” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez *et al*., 2003) han mostrado…” Si la cita es es una página de Internet, ésta deberá ponerse completa entre paréntesis directamente en el texto donde se mencione. La lista de **Referencias** se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño **10**) de acuerdo al siguiente formato:

Para revistas:

García-Carreño F, Cota K & Navarrete del Toro MA (2008) Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*: conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6454-6459.

Para libros y capítulos de libros:

(Libro)

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

(Capítulo de libro)

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. *In:* Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Para patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Para congresos y reuniones: *Se aceptarán un máximo de dos citas de este tipo.*

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solis S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del Complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de Aspergillus HL. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Para citas provenientes de internet: *Se aceptará un máximo de dos citas de este tipo.*

Van Deuren J, Wang Z & Ledbetter J (1997) Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ª Ed. *Technology Innovation Office, EPA*. Disponible en: *http://www.epa.gov/tio/ remed.htm.*

Revistas electrónicas:

Sun J, Lu X, Rinas U, & Zeng AP (2007) Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biol*. 8: R182.

Para tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la Producción de safranal. Tesis de Maestra en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea. Las citas de internet, congresos y reuniones, deberán evitarse al máximo.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos solamente se reciben vía correo electrónico en la dirección smbiotec@yahoo.com.mx Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsal, por lo que se pide incluir una dirección de correo electrónico para este fin, así como para mantener comunicación con el editor sobre la evolución de la revisión y sobre la aceptación del mismo.

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC http://www.smbb.com.mx/ La publicación en línea precederá a la publicación impresa.

Respuesta Fisiológica a la Fertilización por *Azotobacter chroococcum* AC1 y Fertilización Nitrogenada de Síntesis Sobre el Maíz (*Zea mays* L.) en Invernadero

Melissa Obando[1], Diego Rivera[2], Ruth Bonilla[2]

[1] *Facultad de Agronomía-Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.*

E-mail: dmobandoc@unal.edu.co

[2] *Laboratorio de Microbiología de Suelos, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica, Centro de Biotecnología y Bioindustria-CBB. Bogotá D.C. E-mail:* dmriverab@unal.edu.co; *rbonilla@corpoica.org.co*

RESUMEN

La implementación de tecnologías sostenibles de biofertilización que complementen y mejoren la asimilación de nutrientes provenientes de la fertilización nitrogenada de síntesis química, se evaluó en plantas de maíz var. ICA - V508 mediante un ensayo en condiciones de invernadero; utilizando un diseño completamente al azar con 6 tratamientos que incluyeron fertilización combinada de naturaleza química (urea y nitrato de amonio) y biológica (*Azotobacter chroococcum* AC1). Se realizó una medición de variables agronómicas a los 15, 30 y 45 días después de la siembra. Los resultados obtenidos presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) de los tratamientos T2, T4 y T6 con respecto a los demás tratamientos en todos los parámetros evaluados. Así mismo, los recuentos de bacterias aeróbicas presuntivas de *Azotobacter* sp. evidenciaron diferencias significativas ($p<0.05$), presentando los valores más altos para el tratamiento T2, lo cual demuestra que la capacidad de las bacterias para estimular el crecimiento de las plantas no sólo depende de su abundancia, sino de su capacidad para proliferar a través de la raíz y su eficiencia en los mecanismos de promoción. El papel de *Azotobacter chroococcum* en este estudio sugiere que los biofertilizantes pueden ser utilizados como alternativas de uso eficiente y adecuado de los fertilizantes nitrogenados utilizados tradicionalmente.

Palabras clave: Biofertilización, Fertilización Nitrogenada, *Azotobacter chroococcum*

ABSTRACT

Implementation of sustainable technologies complementing and enhancing nutrient uptake from nitrogen biofertilization was evaluated in maize plants var. ICA - V508. The evaluation was performed under greenhouse conditions using a completely randomized design with 6 treatments, which included combined fertilization of chemical (urea and ammonium nitrate) and biological

nature (*Azotobacter chroococcum* AC1). Measurements of agronomic traits at 15, 30 and 45 days were performed after planting. In all evaluated parameters, the observed results were statistically significant ($p<0.05$) for treatments T2, T4 and T6. Also, the presumptive aerobic bacteria counts of Azotobacter showed significant differences ($p<0.05$), giving the highest values for treatment T2, which demonstrate that ability of bacteria to stimulate plant growth depends not only of its abundance, but also of its ability to proliferate through root and efficiency in its promotion mechanisms. The role of *Azotobacter chroococcum* in this study suggests that biofertilizers can be used as an efficient and appropriate alternative for the traditionally used nitrogen fertilizers.
Keywords: Biofertilizer, Nitrogen Fertilization, *Azotobacter chroococcum*

INTRODUCCIÓN

En Colombia el cultivo de maíz es uno de los renglones más importantes de la producción agrícola nacional y ha sido el cultivo colonizador en muchas regiones del país. Para el año 2009, la superficie sembrada fue de 542.053 ha con una producción de 1.446.879 ton. (Fenalce, 2010). El cultivo del maíz y su fertilización se maneja de acuerdo con las condiciones socioeconómicas de cada zona agroecológica; se siembra principalmente como monocultivo y una menor parte en asociación con ñame y arveja, en relevo con fríjol y papa; e intercalado con yuca, caña, café y otros cultivos perennes en su etapa de instalación.

La fertilización nitrogenada de síntesis química como única estrategia correctiva y de nutrición vegetal, cada día genera mayores inconvenientes por su inadecuado uso. Según estudios de FENALCE en el año 2008, se ha reconfirmado que el elemento más importante para la producción de maíz es el nitrógeno, con requerimientos en promedio para Colombia de 120 a 180 kg/ha. En este sentido, de los nutrientes minerales el nitrógeno es el de mayor costo, el que consume mayor energía en su producción, distribución, y potencialmente el más contaminante, siendo el más limitante en la producción de los cultivos. Además, se ha evidenciado la baja eficiencia de utilización de las fuentes nitrogenadas de síntesis (12-74%) la cual está asociada a elevada lixiviación y desnitrificación (Ben *et al*., 2007).

Existe evidencia de que diversas alternativas de tecnologías sostenibles de naturaleza biológica, están desarrollándose lentamente en nuestro país. No obstante, el descubrimiento del crecimiento asociativo de microrganismos promotores del crecimiento vegetal con capacidades particulares de fijación de nitrógeno de ciertas plantas C4, principalmente en los trópicos, se ha avisorado como una herramienta aplicable. Los microorganismos del suelo tienen una importancia sobresaliente en condiciones naturales, principalmente por su amplio espectro de actividades, que repercuten en el

desarrollo y nutrición vegetal (Box, 1996). *Azotobacter* sp. en particular, resulta ser un microrganismo nativo con grandes posibilidades de recuperación de sistemas degradados en nuestro país, que participa mediante diversos mecanismos como complemento en la fertilización tradicional en numerosos cultivos de importancia agrícola, incluyendo las gramíneas (Bonilla *et al*., 2002; Bonilla & Morales, 2007; Obando *et al.,* 2010; Rivera *et al*., 2011, Rivera *et al.,* 2012). Por tal razón, el objetivo de esta investigación fue determinar la respuesta fisiológica a la fertilización biológica y nitrogenada del maíz (*Zea mays* L.) y su posible contribución como herramienta complementaria a la fertilización tradicional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de crecimiento bacteriano e inoculación

Se realizaron suspensiones celulares a partir del ingrediente activo del fertilizante biológico comercial Monibac® (*Azotobacter chroococcum* AC1). El microorganismo se cultivó en medio de cultivo LB (Bertani, 1952) sin fuente de nitrógeno durante 24 h y se agitó a 120 rpm a 30 °C. Los controles de calidad presentaron 100% de pureza y viabilidad celular de 1 x10^8 UFC/mL. El proceso de inoculación se realizó mediante imbibición de la semilla e inoculación a razón de 5 mL por plántula en condiciones semicontroladas de invernadero. Por otra parte, se realizó el análisis del suelo con el fin de examinar las propiedades y características presentes (Tabla 1).

Tabla 1. Características fisicoquímicas del suelo utilizado en los ensayos en invernadero

P mg/kg	S	Ca	Mg	K	Na cmol(+)/kg	Fe	Cu	Mn	Zn	B	Materia orgánica	pH
4.1	3.1	4.23	0.86	1.44	0.26	123	1.9	2.9	2.8	0.06	15.3	5.9

Ensayo en invernadero

El material vegetal utilizado fueron semillas de maíz variedad certificada ICA-V508. El suelo se obtuvo de Corpoica C.I. Tibaitatá, Mosquera (Cundinamarca). Se utilizaron bolsas de plástico con capacidad de 3 kg con 2.5 kg de suelo. Para este estudio, el plan de fertilización fue modificado de acuerdo al análisis de suelo obtenido previamente (Tabla 1).

Los tratamientos evaluados para determinar la respuesta del maíz a la fertilización biológica y nitrogenada fueron los siguientes: **T1**: testigo absoluto; **T2**: fertilización biológica 100% (*A. chroococcum* AC1); **T3**: fertilización nitrogenada 100% (urea); **T4**: fertilización nitrogenada 100% (nitrato de amonio); **T5**: fertilización nitrogenada 100% (urea) + fertilización biológica 100% (*A. chroococcum* AC1); **T6**: fertilización nitrogenada 100% (nitrato de amonio) + fertilización biológica 100% (*A. chroococcum* AC1). Los muestreos se realizaron a los 15, 30 y 45 días después de la siembra (dds) y las variables evaluadas fueron: longitud parte aérea (LPA), longitud de la raíz (LR), peso fresco parte de la parte aérea (PFA), peso fresco de la raíz (PFR) y el recuento de bacterias aérobicas tentativas de *Azotobacter* sp. en medio LG (Döbereiner *et al*., 1995). Así mismo, se midieron los contenidos de nitrógeno total y de clorofila a los 45 días después de la siembra.

Análisis estadístico

Para el diseño, se establecieron seis tratamientos con 20 réplicas mediante un diseño de bloques completos al azar (DCA). Los datos fueron analizados utilizando el análisis de varianza ANOVA y Tukey HSD ($p<0.05$) utilizando el software estadístico SAS 9.0 para Windows.

RESULTADOS

Variables de longitud de la planta

En la medición de longitud de raíz-LR se presentaron diferencias significativas ($p<0.05$) de los tratamientos T6 para 15 y 30 días después de la siembra (dds) (Figura 1a). Así mismo, los tratamientos con inoculación biológica (T2 y T6) presentaron diferencias significativas a los 45 dds, superando hasta en un 50% a los tratamientos T1 y T3. Para la longitud de la parte aérea-LPA a los 15 dds, los tratamientos T2, T3, T5 y T6 estimularon la elongación de la parte aérea, presentando valores estadísticamente significativos en comparación con los demás tratamientos evaluados. A los 30 dds el tratamiento con 100% de inoculación biológica (T2), presentó diferencias estadísticamente significativas, superando en 12% y 15% los tratamientos T3 y T4 respectivamente. Para el caso de los 45 dds, los tratamientos T2 y T5 presentaron los mejores valores de longitud, lo cual evidencia que las variables de longitud para los tres tiempos muestreados tuvieron una incidencia significativa de los tratamientos con inoculación de *A. chroococcum* (Figura 1b).

V*ariables de peso en la planta*

En cuanto al peso seco aéreo-PSA a los 15 dds, se presentaron diferencias representativas para los tratamientos T4 y T6; mientras que, a los 30 dds, el comportamiento en ganancia de biomasa seca aumentó significativamente para los tratamientos T1, T3, T5 y T6; y disminuyó la eficiencia en acumulación para el tratamiento T4. Por su parte, los tratamientos T2, T4 y T6

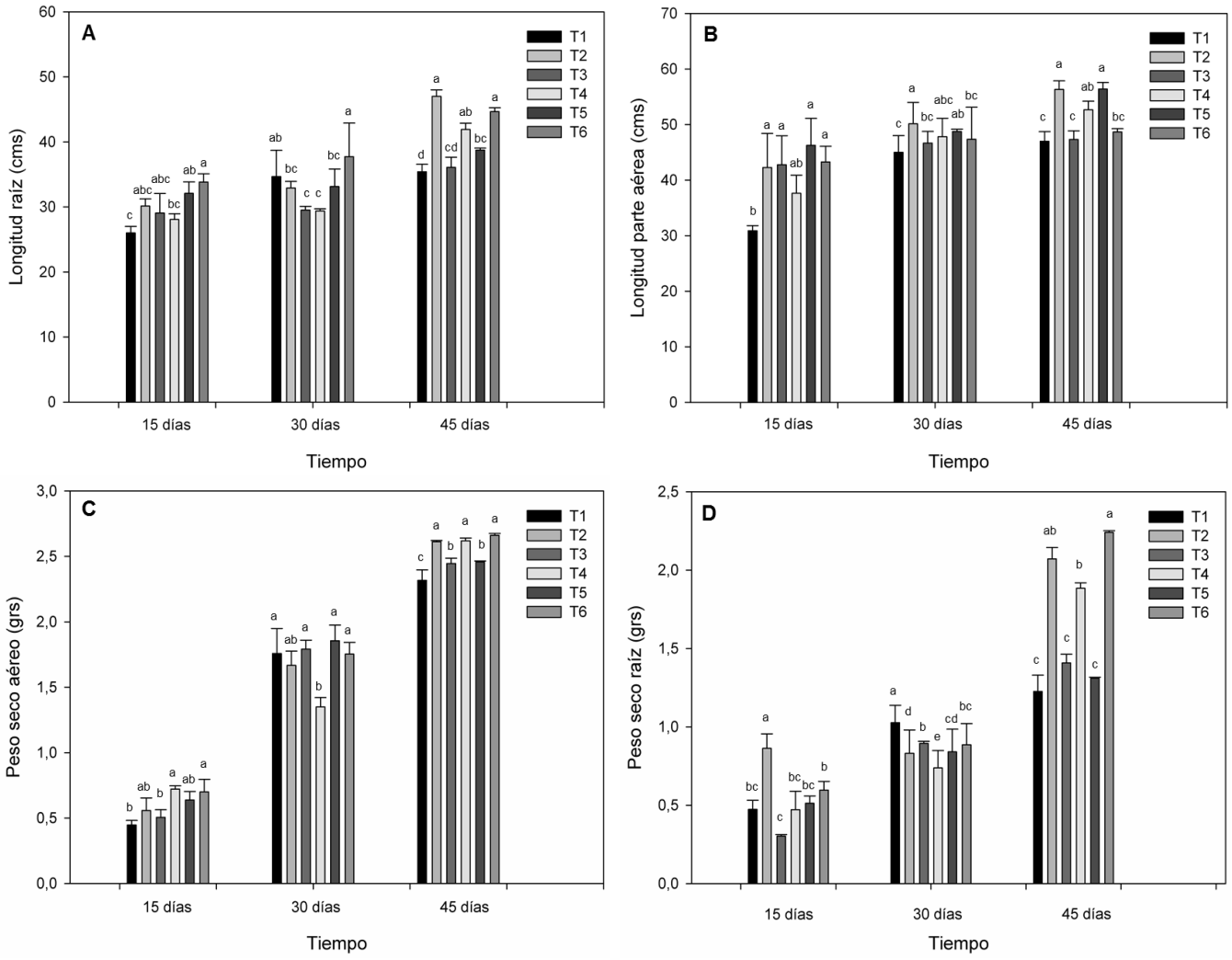


Fig 1. Respuesta del maíz a la fertilización biológica y química en tres épocas de muestreo. **a)** Longitud de la raíz **b)** Longitud de la parte aérea **c)** Peso seco de la parte aérea **d)** Peso seco de la raíz.

T1: testigo absoluto; **T2**: fertilización biológica 100% (AC1); **T3**: fertilización nitrogenada 100% (urea); **T4**: fertilización nitrogenada 100% (nitrato de amonio); **T5**: fertilización nitrogenada 100% (urea) + fertilización biológica 100% (AC1); **T6**: fertilización nitrogenada 100% (nitrato de amonio) + fertilización biológica 100% (AC1). ± Desviación estándar - Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ($p<0.05$).

mostraron valores estadísticamente significativos en peso seco aéreo-PSA; es decir, los tratamientos con fertilización combinada (100% nitrato de amonio y 100% de *A. chroococcum* AC1) puede igualar los valores de biomasa de los tratamientos con solamente 100% de fertilización nitrogenada

de nitrato de amonio e incluso, el tratamiento 100% biológico estimuló este parámetro igualando tratamientos que son fertilizados químicamente (Figura 1c). Para el peso seco de raíz-PSR, el tratamiento T2 presentó diferencias estadísticamente significativas a los 15 dds. No obstante, el testigo absoluto-TA aumentó significativamente la acumulación de nutrientes en raíces a los 30 dds, superando los demás tratamientos evaluados. A los 45 dds, los patrones de acumulación mejoraron en todos los tratamientos, presentando los valores más representativos, el tratamiento T6, el cual supera el contenido de biomasa seca radicular en más del 50 % en los tratamientos T3 y T4 y duplicó al testigo absoluto (Figura 1d).

Recuento de bacterias aerobias presuntivas de Azotobacter sp.

El tratamiento T2 presentó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto a todos los tratamientos y épocas de muestreo evaluadas. No obstante, el tratamiento T5 presentó valores representativos que aumentaron paulatinamente hasta los 45 dds, evidenciando que las poblaciones aeróbicas lograron establecerse en la rizósfera del maíz en presencia de nitrato de amonio (Tabla 2).

Tabla 2. Recuento de bacterias aerobias presuntivas de *Azotobacter* sp.

Tratamientos	15 dds (*) UFC/mL	30 dds (*) UFC/mL	45 dds (*) UFC/mL
T1	2.39 ± 0.53c	2.64 ± 0.14d	3.80 ± 0.05d
T2	7.74 ± 0.17a	8.66 ± 0.35a	7.90 ± 0.08a
T3	2.42 ± 0.09c	3.59 ± 0.22c	2.87 ± 0.01e
T4	4.52 ± 0.06b	4.46 ± 0.11b	3.71 ± 0.03d
T5	4.67 ± 0.17b	4.67 ± 0.17b	6.85 ± 0.06b
T6	2.79 ± 0.10c	2.90 ± 0.04d	4.89 ± 0.03c

(*) Análisis estadísticos con datos transformados en Log - UFC/ml: Unidades formadoras de Colonia por mililitro. ± Desviación estándar - Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo al test de Tukey HSD ($p<0.05$). **T1**: testigo absoluto; **T2**: fertilización biológica 100% (AC1); **T3**: fertilización nitrogenada 100% (urea); **T4**: fertilización nitrogenada 100% (nitrato de amonio); **T5**: fertilización nitrogenada 100% (urea) + fertilización biológica 100% (AC1); **T6**: fertilización nitrogenada 100% (nitrato de amonio) + fertilización biológica 100% (AC1).

Determinación del contenido de pigmentos (clorofila) y nitrógeno total – 45 dds

La producción de pigmentos fotosintéticos (Clorofilas A+B), presentó diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) en el tratamiento con 100% de inoculación con *A. chroococcum*. Así mismo, los resultados evidencian una baja producción de estos compuestos cuando la fertilización es 100% nitrogenada de síntesis, que incluso son

superados por el testigo absoluto (T1). En relación con el contenido de nitrógeno total, el tratamiento T5 presentó el mayor contenido de nitrógeno con respecto a los demás tratamientos evaluados, revelando que en un gran número de parámetros la combinación de fuentes tipo nitrato de amonio junto con *A. chroococcum* ejercen un efecto benéfico en la promoción de crecimiento del maíz, de acuerdo a las variables estudiadas en esta investigación (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido de pigmentos (clorofila) y nitrógeno total a los 45 dds

Tratamientos	Clorofilas A+B	Nitrógeno total
T1	6.08 ± 0.47c	1.95 ± 0.02d
T2	8.49 ± 0.17a	2.76 ± 0.05b
T3	5.18 ± 0.27d	2.71 ± 0.02b
T4	4.07 ± 0.15e	2.70 ± 0.05b
T5	6.95 ± 0.42b	2.82 ± 0.05a
T6	7.23 ± 0.17b	2.52 ± 0.03c

T1: testigo absoluto; **T2**: fertilización biológica 100% (AC1); **T3**: fertilización nitrogenada 100% (urea); **T4**: fertilización nitrogenada 100% (nitrato de amonio); **T5**: fertilización nitrogenada 100% (urea) + fertilización biológica 100% (AC1); **T6**: fertilización nitrogenada 100% (nitrato de amonio) + fertilización biológica 100% (AC1). ± Desviación estándar - Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en relación a cada variable evaluada de acuerdo a la prueba de Tukey HSD ($p<0.05$).

DISCUSIÓN

Biomasa y longitud de la planta

Las variables más influyentes en la evaluación de la acumulación de nutrientes y fotoasimilados se refleja en los incrementos de biomasa seca. Bajo las condiciones de evaluación de este estudio, los tratamientos con inoculación biológica incrementaron esta variable, aun cuando la fertilización fue 100% biológica. Investigaciones previas han demostrado que los microorganismos benéficos estimulan los procesos de germinación y el vigor de diferentes cultivos (Amruthesh *et al.,* 2003). En las últimas décadas, se ha investigado el papel de las bacterias de la rizósfera o rizobacterias de diversas gramíneas como caña de azúcar (Boddey *et al.,* 1995; Arteaga, 1997), trigo y sorgo (Baldani *et al.,* 1986), cebada y pastos tropicales (Döbereiner *et al.,* 1995; Bonilla, 2000) y maíz (Seldin *et al.,* 1998).

El efecto promotor de *Azotobacter chroococcum* expresado en el incremento de biomasa, longitud y contenido de nutrientes

se ha evidenciado en reportes recientes y en varios cultivos de importancia agronómica. Mehnaz y Lazarovits (2006) encontraron un aumento del 12% en biomasa seca en plantas de maíz inoculadas con *A. lipoferum* N7 con respecto a las plantas no inoculadas. Así mismo, Chandrasekar *et al.* (2005) reportaron con inoculantes a base de *Azotobacter* sp. un incremento del 12,1% en peso seco total en pastos del género *Echinochloa*. Castilla (2005) realizó la evaluación de líneas interespecíficas de arroz (*Oryza* spp.) a la inoculación con *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum amazonense* en el mismo suelo, concluyendo que esta inoculación con 50% de la fertilización nitrogenada produjeron plantas de arroz más vigorosas, con mayor biomasa aérea y radical.

El incremento del vigor de las plantas en sus primeras etapas de desarrollo, mediante la inoculación de cepas de *A. chroococcum* ha sido estudiado por Martínez *et al.* (1997) quienes reportan incremento en la altura del tomate desde un 34% hasta el 100%, de acuerdo a la variedad utilizada. Esto podría atribuirse a una mayor absorción de nutrientes y posterior producción mayor de fotoasimilados (Dibut, 2000; Pulido, 2002).

Recuento de bacterias aerobias presuntivas de Azotobacter sp.

El tratamiento inoculado con *A. chroococcum* presentó los mejores recuentos de bacterias aeróbicas en medio LG con respecto a todos los tratamientos y épocas de muestreo evaluadas. El tratamiento con fertilización con nitrato de amonio y *A. chroococcum* (T5), presentó los valores más representativos que aumentaron paulatinamente hasta los 45 dds, evidenciando que las poblaciones aeróbicas lograron establecerse en la rizósfera del maíz en presencia del fertilizante nitrogenado. De igual forma, la eficiencia en la estimulación de factores de crecimiento del maíz no estuvo estrictamente relacionado con el número de microrganismos obtenido en el recuento presuntivo de bacterias tipo *Azotobacteriaceae,* como lo mencionan Loper *et al.* (1985) quienes afirman que la capacidad de las bacterias para afectar el crecimiento de las plantas no sólo depende de su abundancia, sino de su capacidad para proliferar a través de la raíz e interactuar con la misma.

Según Kloepper & Beauchamp (1992) la dinámica de colonización de las raíces por las bacterias inoculadas es esencial para su establecimiento efectivo, siendo un factor crítico para la promoción del crecimiento vegetal. En las gramíneas, la composición cuantitativa y cualitativa de los microorganismos en la rizósfera varía entre especies e incluso entre genotipos de la misma especie, lo cual se atribuye principalmente a las variaciones intrínsecas de cada planta en particular, en términos de la cantidad y calidad de los exudados radicales (Rengel, 1997).

Contenido de pigmentos (clorofila) y nitrógeno total – 45 dds

El aumento estadísticamente significativo ($p<0.05$) de la extracción de nitrógeno por el maíz se observó en el tratamiento T5. En diversos reportes se han evidenciado la mejor asimilación de nutrientes cuando se complementa la fertilización con componentes biológicos, como lo mencionan Das *et al*. (2003) donde encontraron valores significativos de mayor acumulación de nitrógeno N_2 por el algodón con una aplicación combinada junto con *Azotobacter* M4 en comparación con la aplicación individual del fertilizante nitrogenado.

La absorción eficiente de nutrientes como el nitrógeno, puede verse estimulado por microrganismos promotores de crecimiento vegetal con capacidades en la fijación biológica del nitrógeno. Según Biswas *et al.* (2000) los microorganismos fijadores de nitrógeno (dentro de los cuales se encuentra el género *Azotobacter*) pueden promover el crecimiento vegetal mediante la transferencia del nitrógeno fijado, o mediante el mejoramiento de la absorción de nutrientes a través de la modulación de actividades hormonales en las plantas inoculadas. En este sentido, Bashan (1998) menciona que los microrganismos promotores de crecimiento vegetal como *Azospirillum* sp. provocan una absorción más efectiva de los nutrientes, lo que explica la acumulación de compuestos nitrogenados en la planta sin existir una aparente fijación de nitrógeno.

Por otro lado, el papel de *Azotobacter* sp. en la asimilación del nitrato podría estar relacionado por la elongación de pelos radiculares, lo cual mejoraría la capacidad para captar asimilados y agua. Como lo mencionan Larson & Ingemarsson (1989) quienes reportaron que la captación inicial de nitrato se produce través de la membrana plasmática de las células epidérmicas y corticales de la raíz; además, la absorción de nitrato depende de la eficiencia de las raíces en absorción de NO_3 (Parween *et al.,* 2011).

En relación al maíz, factores como tipo y época de aplicación del fertilizante nitrogenado (Monelik *et al.,* 1994) afectan el rendimiento del maíz y la disponibilidad de nitrógeno. Según las especificaciones de la variedad utilizada en este estudio, se recomienda llevar un programa fraccionado de fertilización a los 15, 30 y 45 días después de la siembra (dds) para obtener los mejores rendimientos (Guerrero, 1995; Campuzano, 2009). De acuerdo a esto, los resultados podrían servir como base para complementar fuentes combinadas que aseguren un óptimo patrón de acumulación y absorción de nutrimentos, en posteriores períodos de crecimiento del cultivo.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se realizó el presente estudio se concluye que *Azotobacter chroococcum* puede ser utilizado como alternativa complementaria del uso eficiente y adecuado de los fertilizantes nirogenados (tipo nitrato de amonio) aplicados tradicionalmente y además, se sugiere evaluar la dosificación de las fuentes de naturaleza nitrogenada química

complementada con biofertilizantes para la evaluación de modelos sostenibles de bajo costo sin aplicaciones excesivas de agroquímicos.

REFERENCIAS

Amruthesh K, Raj S, Kiran B, Shetty H & Reddy M (2003) Growth promotion by plant growthpromoting rhizobacteria in some economically important crop plants. VI International PGPR Workshop. Calicut. India. pp 97–103.

Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L, Döbereiner J (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 86-93.

Bashan Y (1998) Interaction of *Azospirillum* spp. in soil: a review, *Biol. Fertil. Soils.* 29: 246-256.

Ben R, Prévost D, Yezza, A & Tyagi RD (2007) Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review. *Biores. Technol.* 98: 3535-3546.

Biswas JC, Ladha JK & Dazzo FB (2000) Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64:1644.

Boddey RM., O.C. de Oliveira, S. Urquiaga, V.M. Reis, F.L. Olovares, V.L.D. Baldani and J. Dobereiner, 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contribution and prospects for improvements. Plant Soil, 174: 195-209.

Bonilla R, Novo R, Vanegas N, Galvis A, Martínez MM, Parra D & Vanegas O (2000) Generación de tecnologías para la utilización de la fijación no simbiótica de nitrógeno como alternativa de fertilización. Disponible en: http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/2006718144013_Fijacion%20no%20simbiotica%20de%20nitrogeno%20en%20trigo.pdf.

Bonilla R, Murillo J, Gnecco M, Valero L, Aaron M & Orozco G (2002) Mejoramiento y conservación de suelos algodoneros: Técnicas de labranza e Incorporación de abonos verdes. *Inn. y Camb. Tecn.* 2:53-59.

Bonilla R & Morales JG (2007) Monibac: Biofertilizante con base en cepas nativas de *Azobacter sp.* para incrementar la productividad y sostenibilidad del algodonero. *Inn. y Camb. Tecn.* 4:30–34.

Box JE (1996) Modern methods for root investigations. In: Y. Waisel *et al*., Plant roots the hidden half. Marcel Dekker Publishers, New York, USA, p. 193-237.

Chandrasekar B, Ambrose G & Jayabalan N (2005) Influence of biofertilizers and nitrogen source level on the growth and yield of *Echinocloa frumentacea* (Roxb.). *J. Agric. Technol.* (2): 223-234.

Campuzano DL (2009) Épocas de fraccionamiento de la fertilización N-P-K para mejorar la producción de grano de híbridos de maíz liberados por

CORPOICA. Oferta tecnológica. Disponible en: http://www.semicol.co /semillas/agricolas/maiz-ica-v-%E2%80% 93-508/flypage_new.tpl.html.

Castilla LA (2005) Evaluación de líneas interespecíficas de arroz (*Oryza* spp) a la inoculación con las bacterias fijadoras de nitrógeno *Azotobacter chrococcum* y *Azospirillum amazonense* en un *Typic haplustaf* de la meseta de Ibagué, Colombia. Tesis de Doctorado en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. Colombia. pp. 1-156.

Das A, Prasad M, Shivay YS & Subha KM (2004) Productivity and Sustainability of Cotton (*Gossypium hirsutum L.*) – Wheat (*Triticum aestivum L.*) Cropping System as Influenced by Prilled Urea Farmyard Manure and *Azotobacter*. *J. Agron. Crop. Sci.* 190: 298-304.

Dibut B (2000) Obtención de un bioestimulador del crecimiento y el rendimiento para el beneficio de la cebolla (*Allium cepa*). Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. INIFAT. La Habana. Cuba. pp. 1-100.

Döbereiner J, Baldani VL & Baldani JI (1995) Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas ñao leguminosas. Seropédica. EMBRAPA-SPI. pp. 12-28.

FENALCE (2008). Programa de producción de maíz en zona cafetera. Disponible en: www.agro.unalmed.edu.co

FENALCE (2010) El cultivo de Maíz. Historia y su importancia. Disponible en: www.fenalce.org/arch_public/maiz93.pdf

Guerrero R (1995) Fertilización de cultivos en clima medio. Segunda edición. 1995. Agriculturas para la vida. Cali.

Kloepper, JW & Beauchamp CJ (1992). A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 38: 1219–1232.

Kumar V, Behl RK & Narula N (2001). Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. *Microbiol. Res.* 156: 87–93.

Larson CM & Ingemarsson B (1989) Molecular aspects of nitrate uptake in higher plants. *In*: Wray JL, Kinghorn JR (ed). Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation. Oxford Science Publication. pp. 3–14.

Loper JE, Haack C & Schoth MN (1985) Population dynamics of soil *pseudomonas* in the rhizosphere of potato. *Appl. Environ. Microb.* 49: 416-422.

Martínez R, Dibut B, Casanova I & Ortega M (1997) Acción estimuladora de *Azotobacter chroococcum* sobre el cultivo del tomate en suelos Ferralítico Rojo. Efecto sobre los semilleros. *Agrotecnia de Cuba*. 27(1): 23-26.

Mehnaz S & Lazarovits G (2006). Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and

Azospirillum lipoferum on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb. Ecol*. 51:326-335.

Monelik G, Reneau RB & Martens DC (1994) Com yield and nitrogen uptake as influenced by tillage and applied nitrogen. *Plant. Nutr*. 17: 911-913.

Obando M, Burgos L, Rivera D, Garrido M, Baldani VL & Bonilla R (2010) Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al Eucalipto (*Eucalyptus sp.*) en Codazzi, Cesar. *Acta Biol. Colomb.* 15(3):105-120.

Parween T, Jan S, & Mahmooduzzafar & Fatma T (2011) Alteration in nitrogen metabolism and plant growth during different developmental stages of green gram (*Vigna radiata* L.) in response to chlorpyrifos. *Acta Physiol. Plant.* 33:2321–2328.

Rengel Z (1997) Root exudation and microflora populations in rhizosphere of crop genotypes differing in tolerance to micronutrient deficiency. *Plant Soil* 196: 255–260.

Rivera D, Obando M, Garrido M & Bonilla R (2011) Efecto de agroquímicos peletizados en semillas de algodón sobre el biofertilizante Monibac®, con base en *Azotobacter chroococcum*. *Rev. Bio. Agro* 9(2): 130 – 138.

Rivera D, Obando M, Bonilla R (2012) Estandarización de un medio de cultivo a partir de fuentes agroindustriales para la multiplicación de Azospirillum brasilense. Revista *Respuestas* 17(2): 31-38.

Seldin L, Rosado AS, da Cruz DW, Nobrega A, van Elsas JD & Paiva E (1998) Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(10): 3860-3868.



www.smbb.com.mx