

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**



**INOCULANTES COMERCIALES EN BAJA CALIFORNIA, MÉXICO: CALIDAD Y CAPACIDAD DE
BIOCONTROL DE HONGOS FITOPATOGENOS**

COMMERCIAL INOCULANTS IN BAJA CALIFORNIA, MEXICO: QUALITY AND CAPACITY OF
BIOCONTROL OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE:

INGENIERO BIOTECNÓLOGO AGROPECUARIO

PRESENTA:

ESEQUIEL IZARRARAZ ARCE

PRESIDENTE:

M. C CECEÑA DURAN CARLOS

Ejido Nuevo León, Mexicali, B.C.

Diciembre de 2020

La presente tesis “INOCULANTES COMERCIALES EN BAJA CALIFORNIA, MÉXICO: CALIDAD Y CAPACIDAD DE BIOCONTROL DE HONGOS FITOPATOGENOS” realizada por Esequiel Izarraraz Arce, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

Ing. Biotecnólogo Agropecuario

Comité Particular

M.C Carlos Ceceña Duran

Presidente

Dr. Daniel Gonzales Mendoza

Sinodal

Dra. Olivia Tzintzun Camacho

Sinodal

Dr. Onécimo Grimaldo Juarez

Secretario

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, bajo la dirección del M.C Carlos Ceceña Duran.

I. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres que tuvieron la confianza y voluntad apoyándome incondicionalmente, por sus consejos y palabras de apoyo que hicieron posible seguir adelante hasta culminar esta etapa de mi vida.

A mi tutor de tesis el M.C Carlos Ceceña Duran por su apoyo, orientación y atenderme en el tema de estudio. Por brindarme conocimientos y las herramientas necesarias para realizar esta investigación.

A mis asesores el Dr. Daniel Gonzales Mendoza, Dra. Olivia Tzintzun Camacho y al Dr. Onécimo Grimaldo Juarez. Por su atinada dirección en el desarrollo de esta investigación y revisión del documento. Por brindarme consejos, conocimientos y el apoyo en las actividades de este trabajo.

Quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron en mi camino, ofreciendo lo necesario para tener una formación y seguir adelante con mi carrera.

II. DEDICATORIA

A mis padres:

Quiero dedicar esta tesis a mis padres los cuales siempre estuvieron apoyándome en todo momento de mi carrera y mi vida, gracias por brindarme su amor, tiempo y dedicación para concluir mi educación profesional.

A mis maestros:

Dedico esta tesis a mis maestros los cuales me brindaron sus conocimientos para así poder llevar a cabo este trabajo, al Dr. Daniel González Mendoza por su tiempo y dedicación en la elaboración de esta investigación, sin el conocimiento brindado por ellos a lo largo de mi carrera no sería posible esta tesis.

A mis familiares:

Dedico esta tesis a esos familiares que me brindaron de su apoyo en este trayecto de mi vida en especial a mis abuelas que siempre me ofrecieron palabras de aliento para seguir adelante y cumplir con mis objetivos.

INDICE

I. AGRADECIMIENTOS	4
II. DEDICATORIA.....	5
III. LISTA DE TABLAS	7
IV. LISTA DE FIGURAS	7
V. RESUMEN.....	8
VI. ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. REVISION DE LITERATURA	14
2.1. Importancia del valle de Mexicali en la producción agrícola de Baja California.....	14
2.2. Principales enfermedades de cultivos en el valle de Mexicali.....	15
2.3. Definición de Inoculantes.....	18
2.4. Microorganismos que benefician a las plantas.....	21
2.5. Microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPR).....	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	28
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	28
4.2. Objetivos Específicos	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1. Evaluación de viabilidad de los inoculantes	29
5.2. Evaluación de la capacidad antagónica de los inoculantes formulados con bacterias	29
5.3. Evaluación de la capacidad antagónica de los inoculantes formulados con hongos	30
5.4. Evaluación de pureza de los inoculantes	31
5.5. Cálculos para las UFC/g o UFC/mL	31
5.6. Análisis estadísticos	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
7. CONCLUSIONES.....	41
8. BIBLIOGRAFIA.....	42

III. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Procedencia y tipo de inoculantes evaluados.....34

Tabla 2. Criterios específicos que debe presentar la etiqueta..... 35

Tabla 3. Valores de UFC presente en los inoculantes comerciales evaluados...37

IV. LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Efecto inhibitorio de las bacterias aisladas de los productos Bacillus 1537 (F), Enerbac (G1 y G2) y Bio-Tilis (H) sobre diferentes hongos fitopatógenos.....39

Figura 2.- Efecto inhibitorio de los hongos aislados de los productos Agroderma (A), Fus-Out (B), Funqui (C), Bioben (D) y T-22 (E), sobre diferentes hongos fitopatógenos.....40

V. RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la viabilidad celular, criterios de empaque y capacidad antagónica contra *Alternaria alternata*, *Macrophomina* sp., *Fusarium solani*, y *Botrytis* sp., de bioproductos de control biológico comercializados en Baja California, México. Los resultados mostraron que los productos Agroderma, Bacillus 1537 y Fus-Out, no presentaron registro sanitario. Por otra parte, la viabilidad de los inoculantes evaluados mostros que los valores de UFC/g o UFC/mL, fueron inferiores a los indicados por las etiquetas de los inoculantes comerciales. A si mismo los resultados de antagonismos mostraron que solo el producto formulado a base de Bacillus 1537 de LabsaBio fue el único que presento un efecto inhibitorio sobre la mayoría de los hongos fito-patógenos evaluados. En el caso de los productos formulados a base de hongos micopárasitos únicamente el producto Funqui, presento la capacidad de inhibir el crecimiento de todos los fito-patógenos evaluados en un 50%. Finalmente, se cuenta con una amplia presencia de inoculantes comerciales en Baja California, los cuales provienen de diferentes zonas del país y presentan poco efecto contra los microorganismos nativos del valle de Mexicali.

Palabras claves: Inoculantes, calidad, formulación, fitopatógenos, Baja California

VI. ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate cell viability, packaging criteria and antagonistic capacity against *Alternaria alternata*, *Macrophomina* sp., *Fusarium solani*, and *Botrytis* sp., of biological control products marketed in Baja California, Mexico. The results showed that the products Agroderma, Bacillus 1537 and Fus-Out, did not present sanitary registry. On the other hand, the viability of the evaluated inoculants showed that the CFU / g or CFU / mL values were lower than those indicated by the labels of the commercial inoculants. The results of antagonisms showed that only the formulated product based on Bacillus 1537 from LabsaBio was the only one that presented an inhibitory effect on most of the phytopathogenic fungi evaluated. In the case of the products formulated based on mycoparasite fungi only the product Funqui, presented the capacity to inhibit the growth of all the phytopathogens evaluated in 50%. Finally, there is a wide presence of commercial inoculants in Baja California, which come from different areas of the country and have little effect on the microorganism's native to the Mexicali Valley.

Key words: inoculants, quality, formulation, phytopathogens, Baja California

1. INTRODUCCIÓN

El Noroeste de México se caracteriza por su clima semidesértico con precipitaciones pluviales que van de 50 a 500 mm (González-Mendoza et al., 2015). No obstante aun con las limitaciones ambientales esta región es una de las zonas agrícolas más productivas del país, la cual participa con el 29% del valor de la producción de hortalizas con relación al resto del país (Avendaño y Varela, 2010). Esto resultado en parte de la asociación de los productores con empresas distribuidoras internacionales de frutas y hortalizas, lo cual ha favorecido ventajas competitivas locales, básicamente en materia de costos e infraestructura que permite comercializar un elevado volumen de productos a nivel local e internacional (Zloliniski, 2011).

Sin embargo, en el Noroeste de México estados como Baja California, la producción agrícola puede verse afectada por los costos, eficacia e impacto del uso de agroquímicos que son empleados para el control de diversos fitopatógenos como hongos, virus e insectos, que pueden ocasionar importantes pérdidas durante la pre y poscosecha de los cultivos (Gonzalez-Soto et al., 2017).

Esto ha generado que los productores incorporen en sus sistemas de producción alternativas sustentables que permitan ayudar a controlar la incidencia de fitopatógenos, como el uso de bioplaguicidas formulados con microorganismos con actividad antagónica (Tranier *et al.*, 2014). En donde la eficacia de los productos microbianos usados como agentes de biocontrol, depende de su grado de especificidad con respecto a los patógenos y condiciones ambientales en donde se

utilizan (Amatuzzi *et al.*, 2017). De tal forma que la eficacia del agente de control biológico comercial empleado representa un punto crítico para mejorar su adopción por los productores en los diferentes sistemas de producción (Benintende, 2010).

Un inoculante microbiano o bioinoculante es una formulación que contiene células vivas o latentes de cepas eficientes para fijar nitrógeno, solubilizar fósforo, mejora de absorción de nutrientes, control biológico de enfermedades transmitidas por el suelo, efectos nutricionales y hormonales. (Bashan *et al.*, 2004). El uso de los microorganismos ha sido factible por el aumento de la producción agrícola que se genera, los microorganismos utilizados en los inoculantes son clasificados dentro de dos grupos: el primer grupo incluye microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar sustancias que promueven el crecimiento de la planta, fijando nitrógeno atmosférico, solubilizando hierro y fósforo inorgánico y mejorando la tolerancia al estrés abiótico por las plantas. El segundo grupo incluye microorganismos los cuales son capaces de disminuir o prevenir los efectos de deterioro causado por microorganismos fitopatógenos (Lucy *et al.*, 2004). Sin embargo, Kloepper y Mariano (2000) mencionan que puede haber microorganismos que puedan estar en los dos grupos, que además de promover el crecimiento de la planta, inhiben los efectos de microorganismos patógenos. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* produce auxinas que promueven el crecimiento de tomate e inducen resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum*, el cual provoca marchitez y pudrición de las raíces (Gupta *et al.*, 2000).

En México durante la década de los 70's y 80's, se presentó un auge en el uso de inoculantes a base de cepas de *Rhizobium*, principalmente en su aplicación para la

fijación biológica de nitrógeno en cultivos de soya y garbanzo, donde se logró sustituir la fertilización nitrogenada en Sinaloa (Armenta-Bojórquez, 2010).

Actualmente, en el Valle de Mexicali la aplicación de inoculantes en la producción agrícola se ha posicionado como una alternativa biotecnológica viable para el control de patógenos o mejoramiento fisiológico de la planta. Sin embargo, estudios sobre la determinación de la calidad de estos productos biotecnológicos son escasos a nivel regional. En la actualidad, en Baja California existen empresas nacionales o transnacionales que comercializan inoculantes para diversos cultivos; sin embargo, dichos productos pueden variar en su calidad.

En Baja California, especialmente en el valle de Mexicali, los productores, asesores agrícolas y las autoridades gubernamentales, se enfrentan al hecho de que existe una limitada información sobre la eficacia de productos microbianos comerciales usados como agentes de biocontrol contra los hongos fitopatógenos que afectan a los cultivos de la región. De tal forma que en el presente estudio se analizó la viabilidad celular y la capacidad antagónica contra *Alternaria alternata*, *Macrophmina* sp., *Fusarium solani*, *Botrytis* sp., de siete inoculantes comerciales con acción de control biológico comercializados en Baja California, México.

Por lo que el presente estudio pretende proporcionar información que permita en un futuro establecer las bases para el establecimiento de una normativa a nivel estatal que garantice un mínimo de control de calidad en los inoculantes especialmente en parámetros como: a) número de microorganismos adecuados al momento de su empleo, b) nula presencia de otros microorganismos contaminantes y c) un soporte

adecuado que garantice su supervivencia. De tal forma que se garantice a los asesores privados y consumidores finales que el producto empleado (inoculantes) cumple con la finalidad para la cual fueron fabricados.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Importancia del valle de Mexicali en la producción agrícola de Baja California

El estado de Baja California cuenta con una superficie total de 7 011 300 hectáreas, de las cuales son cultivables 431 600 (6.2%). Se distinguen dos regiones agropecuarias en la entidad: el valle de Mexicali, donde se practica una agricultura de riego en parte tecnificada; y la zona costa, que incluye cultivos de temporal y de riego con alto grado de tecnificación (Avendaño y Varela, 2010).

El municipio de Mexicali colinda al norte con Estados Unidos de América al este con estado de Sonora y el Golfo de California. Este municipio presenta cuatro climas diferentes de dentro del grupo de secos-áridos, con escasa precipitación alrededor de 132mm por año. La temperatura raramente es inferior a 3 °C (37 °F) o superior a 45 °C (113 °F). Aun con estas limitaciones ambientales el desarrollo de Mexicali fue impulsado inicialmente por la actividad agrícola.

En el Valle de Mexicali es donde se practica la agricultura de riego, abarcando más de 200, 000 hectáreas irrigadas. Los principales cultivos en el municipio son: trigo, cebada, algodón, alfalfa, avena, ajonjolí, cártamo, sorgo forrajero, "rye grass", hortalizas para exportación y consumo regional; chile, cebolla, col, rabanito, cilantro, lechuga, brócoli, betabel, coliflor, jitomate, tomatillo, pepino, calabaza, quelite y espárrago. Otros cultivos son sandía, melón, maíz, elote, vid, nopal y frijol.

Por la abundancia de agua y más de 200 mil hectáreas de tierras fértiles, la actividad agrícola ha tenido gran relevancia en este municipio. La región del valle

de Mexicali presenta una zona productiva para el país y un centro de inversión principalmente norteamericano constituyéndolo como un elemento central del desarrollo agrícola (Anguiano, 1994).

El Valle de Mexicali ofrece al inversionista, las condiciones ideales para establecer agroindustrias, empaques de granos y alimentos.

2.2. Principales enfermedades de cultivos en el valle de Mexicali

En la siguiente revisión se muestra información relacionadas con las principales enfermedades y cultivos con un mayor desarrollo socioeconómico en el valle de Mexicali, según los resultados obtenidos en el curso de fitopatología de hortalizas impartido en Instituto de Ciencias Agrícolas.

Las enfermedades de cualquier cultivo representan un elemento limitante para la producción agrícola. Los agentes que causan enfermedades en las plantas se caracterizan por ser infecciosos (bióticos o vivos) y no infecciosos (abióticos o no vivos) (Agrios, 1997). Los agentes infecciosos incluyen las bacterias, hongos, micoplasmas, nemátodos y virus. Los agentes no infecciosos incluyen, desbalances nutricionales, estrés ambiental y toxicidad química causada por plaguicidas y contaminantes del aire (Mendoza, 1994).

El estado de Baja California comprendida como una importante entidad en producción agrícola, pertenece a una zona climática semiárida, donde el 98.8 % de

la superficie dedicada al cultivo de hortalizas se realiza mediante una agricultura moderna (SAGARPA, 1999).

Sin embargo, las especies hortícolas en el estado, han sido afectadas por fitopatógenos de diversos grupos, siendo los hongos los principales agentes causales (Ceceña, 2000); influenciados probablemente por la práctica de monocultivo y la liberación de variedades mejoradas con especial atención al factor de rendimiento (Mendoza, 1996).

Las enfermedades causadas por hongos, y de común ocurrencia en los cultivos de hortalizas, aumentan su incidencia y severidad en la medida en que se incrementan las lluvias y la humedad en el ambiente, limitando de esta forma el buen desarrollo de los cultivos y la producción (Instituto Colombiano Agropecuario [ICA], 2012). De igual forma el tipo de producción en invernadero pueden ser propicias para la infección, desarrollo y diseminación de muchos organismos fitopatógenos (Lehmann-Danzinger, 2004; Agrios, 1997).

Hay diversos tipos de enfermedades, y se clasifican según el área de la planta afectada: cuello y raíz (radicales) y enfermedades aéreas (foliares), donde las radicales se traslocan dentro de la planta, de manera sistemática lejos del punto de contacto.

Siendo los microorganismos patógenos habitantes naturales del suelo, los cultivos se encuentran expuestos a más de un tipo de enfermedad afectando la parte aérea como la radicular. Por otra, parte un solo microorganismo patógeno puede atacar una amplia gama de cultivos.

Durante el verano las condiciones cálidas y de alta humedad relativa favorecen la presencia de enfermedades (Narro *et al.*, 2005). El cultivo de brócoli es una de las hortalizas con mayor susceptibilidad a enfermedades que atacan principalmente sus hojas, flores y raíces; las cuales se pueden presentar durante el crecimiento y desarrollo de la planta provocando pudriciones de raíz, malformaciones foliares y reducción del rendimiento. Algunas enfermedades que se presentan en el brócoli son mancha negra (*Alternaria brassicae*), mildiu (*Pernospora parasítica*), *Botrytis cynerea* (Fertilidad de Suelos S. de R.L, FERTILAB).

Entre algunas enfermedades de importancia se encuentran los que son producidos por los hongos *Pythium spp* produciendo secadera de la plántula en tomatillo (*Physalis ixocarpa*) y melón (*Cucumis melo*), *Rhizoctonia spp* en el espárrago (*Asparagus officinalis* L.) que producen caída de la plántula y necrosis de los vasos conductores, marchitez de la planta asociados a los géneros *Verticillium spp*, causando marchitez en el cultivo del melón y tomatillo, *Fusarium spp* produciendo pudrición basal afectando al brócoli, melón y cebollín y pudriciones radiculares causadas por *Phytophthora spp*.

Entre otros géneros de hongos fitopatógenos, se encuentra *Alternaria spp* causando la mancha foliar en el cultivo del tomatillo y brócoli, tizon foliar en el melón y mancha purpura en el cebollín, el tizón temprano del tomate (*Solanum lycopersicum*) y la papa (*Solanum tuberosum*), y el tizón de las crucíferas entre muchos otros hospederos; *Macrophomina spp* provoca la pudrición carbonosa en más de 500

especies incluyendo *Brassica oleracea* (col), *Citrus spp*, *Cucumis spp*, *Medicago sativa* (alfalfa), *Solanum tuberosum* (papa), *Sorghum bicolor* (sorgo), y *Zea mays* (maíz) (Donna Henderson, 2010).

2.3. Definición de Inoculantes

Un inoculante o fertilizante biológico es una formulación que contiene uno o varios microorganismos viables para favorecer la nutrición y/o promover el crecimiento de las plantas (pueden sustituir parcial o totalmente a los fertilizantes químicos, por lo que son de gran importancia la sustentabilidad de la agricultura particularmente en regiones económicamente deprimidas).

De manera sintetizada podemos decir que son productos que contienen microorganismos, que al ser inoculados pueden vivir asociados o en simbiosis con las plantas y le ayudan a su nutrición y protección (Vessey, 2003). Estos microorganismos se encuentran de forma natural en el suelo y abarcan diversos grupos. Sin embargo, su población es afectada por el manejo de suelo y uso excesivo de agroquímicos (Caballero-Mellado *et al*, 1992; Grageda-Cabrera *et al.*, 2003).

No fue hasta 1683 que Von Leewenhoek describió la existencia de bacterias que se tuvo conocimiento sobre estos microorganismos, sin embargo, su utilización para estimular el crecimiento de las plantas se remonta siglos atrás. Teofrasto (287 a.C.) y Virgilio (30 a.C.) sugerían mezclar el suelo donde se habían cultivado leguminosas con suelo donde no se habían cultivado, para remediar sus defectos y adicionarle fuerza (Tisdale y Nelson, 1975).

Desde el siglo XVIII se inocularon hongos en plántulas de encino para incrementar la producción de trufas, que son hongos que tienen alto valor económico por su enorme importancia gastronómica. Las trufas eran colocadas en los "cajetes" donde las plántulas de los encinos eran sembradas. Esto ocurrió mucho antes de que en 1885 se acuñara el vocablo "micorriza" (Smith y Read, 1997).

A finales del siglo XIX, la práctica de mezclar suelo con semillas, se convirtió en un método recomendado para inocular leguminosas en Estados Unidos; poco después, Nitragin registró la primera patente para inocular plantas con bacterias del género *Rhizobium* spp. En los años 1930's y 1940's, la inoculación con bacterias rizosféricas asociativas con cepas de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus* fue utilizada a gran escala en Rusia y Europa del Este (Grageda-Cabrera, 2011).

Después de la Segunda Guerra Mundial todo apuntaba que el futuro de los biofertilizantes era promisorio en el desarrollo de la agricultura del siglo XX. Sin embargo, la asombrosa industrialización y urbanización que surgió después de 1945, demandó una gran cantidad de materias primas y alimentos. Es aquí donde la demanda de los fertilizantes, que son capaces de generar una rápida respuesta productiva, tuvieron su extensa utilización (Duxbury, 1994).

Aunque por casi 100 años se han producido comercialmente inoculantes a base de *Rhizobium* spp., con las crisis energéticas en la década de 1970, el estudio de los biofertilizantes avanzó rápidamente en algunos países europeos y asiáticos; sin embargo, el avance fue menor en México y países latinoamericanos (Okon y Labandera-González, 1994).

Actualmente, existe una gran variedad de biofertilizantes con diversas funciones y atendiendo al tipo de cultivo. En general, los biofertilizantes más difundidos se componen de hongos micorrícicos y bacterias (All-Taweil *et al.*, 2009; Pooja *et al.*, 2007).

Los inoculantes pueden clasificarse según el soporte, ya sea líquido o sólido como la turba y según la cantidad de cepas que contenga: monocepa (una cepa) y multicepa (varias cepas). Los inoculantes más comunes son los que utilizan turba como soporte. Su ventaja radica en una mayor protección a los rizobios, brindada por la turba, frente a factores adversos del suelo, altas temperaturas, deshidratación, biocidas sobre la semilla, etc. Recientemente se han incorporado al mercado los inoculantes con soportes líquidos. En estos casos, la sobrevivencia de los rizobios en la semilla es menor, ya que, no proveen la protección de la turba (Carlos Labandera Microbiología de Suelos-MGAP).

La eficacia de la inoculación depende de varios factores: disponer de un inoculante potencialmente eficiente, aplicar un método adecuado de inoculación, el uso de un soporte estéril y asegurar una buena supervivencia del inoculante en la raíz, para lograr una buena colonización. Los requerimientos para que un inoculante sea potencialmente eficiente son: a) proveer un adecuado número de rizobios al momento de su utilización, b) que no contenga microorganismos contaminantes o que éstos se presenten en bajo número, c) que produzca una efectiva nodulación,

y d) que el soporte utilizado tenga las propiedades adecuadas para la supervivencia de los rizobios (Revista Argentina de Microbiología (2010)).

Existen diversos estándares de calidad para la comercialización de los inoculantes según el país donde se elabora en algunos de ellos se establecen valores mínimos de recuento de células viables de rizobios que van desde 5×10^7 hasta 1×10^9 UFC/g o mL de inoculante. Otra aproximación sobre estándares de inoculantes se realiza sobre la base del número de rizobios viables aplicados sobre la semilla. De esta manera se tiene en cuenta tanto la cantidad de rizobios por g o mL de inoculante como la dosis de aplicación recomendada por el fabricante. Además de establecer la ausencia de contaminantes en el producto para que pueda ser comercializado.

Para que un inoculante pueda ser efectivo debe de cumplir los requerimientos establecidos anteriormente, además de seguir con un protocolo de almacenamiento ya que, condiciones de humedad y calor pueden influir en la calidad.

Otro punto que se debe considerar es el método de inoculación, el origen de la cepa, el cultivo, así como el suelo donde se piensa emplear.

2.4. Microorganismos que benefician a las plantas

Un desafío para la producción agrícola es encontrar la manera sostenible de combatir los patógenos, plagas y estrés abiótico. Las plantas están asociadas con microorganismo complejos, que tienen la capacidad de promover el crecimiento de

las plantas y la tolerancia al estrés, apoyar la nutrición de las plantas y antagonizar los patógenos de las plantas (Timmusk, S *et al.*, 2017), ya sea, reduciendo la gravedad de la enfermedad, induciendo mecanismos de defensa de las plantas y produciendo productos anti-herbívoros (Arnold *et al.*, 2003).

En el suelo se pueden encontrar una enorme cantidad de organismos diferentes, de tamaño y funciones muy variable. Son fundamentales para el desarrollo de la vida en el planeta, jugando un papel relevante en la formación y estructuración del suelo y en la movilización de nutrientes (Crops for Better Soil).

En condiciones naturales, tanto la planta como los órganos del suelo y su rizósfera se encuentran los microorganismos endófitos refiriéndose a los microorganismos que no provocan daño aparente a las plantas (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013); las raíces están colonizados por bacterias, hongos, actinomicetos, protozoos y algas. Noventa y cinco por ciento de todos los microorganismos colonizadores son bacterias (Glick, 2012).

Hay tres tipos de microorganismos que establecen simbiosis con las raíces de las plantas: bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGRP, hongos formadores de micorrizas arbusculares y bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico. Cada tipo de microorganismo realiza una función específica, por ejemplo, fijar nitrógeno, solubilizar fósforo, mejoramiento en la absorción de nutrientes, control biológico de enfermedades transmitidas por el suelo, efectos nutricionales y hormonales (Bashan *et al.*, 2004); Entendiendo esto, los microorganismos cumple un papel fundamental en la fertilidad del suelo, de esta manera la integración de interacciones

beneficiosas planta-microorganismo puede representar una solución sostenible prometedora para mejorar la producción agrícola.

2.5. Microorganismos promotores del crecimiento de las plantas (PGPR)

Se denomina como PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) a un conjunto de bacterias que habitan en la rizósfera de las plantas y que producen en ellas todo tipo de beneficios. Favorecen su crecimiento, mejorando la disponibilidad o la absorción de minerales y otro tipo de compuestos (nitratos, fosfatos, etc.), ayudan a la producción de hormonas necesarias en el desarrollo de los vegetales (fitohormonas, giberelinas, etc).

Kloepper y Schroth (1981) introdujeron el término "rizobacterias" refiriéndose a las comunidades bacterianas del suelo, que, competitivamente colonizaban las raíces de las plantas y estimulaban su crecimiento, reduciendo de este modo la incidencia de enfermedades en ellas. Estos microorganismos son capaces de colonizar el sistema radicular de las plantas clasificándose en tres grupos principales, a) las que pueden colonizar el tejido de la planta formando nódulos (simbióticas), b) las que se hospedan en estructuras internas de la planta (endofíticas), y c) las que se encuentran cerca del sistema radicular de la planta (bacterias de vida libre) (Kloepper *et al.*, 1989).

Géneros bacterianos como *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Serratia* pertenecen a PGPR (Gray y Smith, 2005).

Diversos estudios indican el beneficio que aportan estos microorganismos a diversos cultivos como *Oryza sativa*, *Triticum spp.*, *Sorghum spp*, *Sacharum officinarum*, *Zea mays* (Okon, 2005; James, 2000; Andrews *et al.*, 2003; Berg, 2009) y pasturas (Lugtenberg y Kamilova, 2009); teniendo una acción fitopatógena a través de la competencia por espacio y nutrientes, estimulando la capacidad defensiva de la planta huésped y produciendo compuestos fungitoxicos de bajo peso molecular y enzimas extracelulares hidrolíticas (Abd-Elsalam y Hafez, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el uso excesivo de agroquímicos y una sobre explotación de los recursos naturales para producir más alimento genera un impacto negativo en la diversidad, estabilidad y productividad del suelo.

El uso de agroquímicos en el valle de Mexicali ha estado relacionado estrechamente con los modelos de producción agrícola implementados desde el origen de la región hasta la actualidad. Los cambios en estos modelos han significado distintos tipos, cantidades y peligrosidad de los agroquímicos fabricados y utilizados en el municipio, así como diferentes tipos y niveles de impactos ambientales (en el suelo, agua y aire) y daños a la salud de la población expuesta, asociados a su uso o producción (Moreno y López, 2005; Valdez *et al.*, 2000; Guardado, 1976).

La investigación científica y tecnológica en las últimas décadas ha permitido el estudio de microorganismos del suelo que favorecen el desarrollo de las plantas. Los beneficios que presenta el uso de microorganismos en la agricultura pueden concretarse de la siguiente manera: a) Fitoestimulantes, estimulan la germinación de las semillas y el enraizamiento por la producción de reguladores del crecimiento, vitaminas y otras sustancias.

b) Biofertilizantes, incrementan el suministro de los nutrimentos por su acción sobre los ciclos biogeoquímicos, tales como la fijación de N₂, la solubilización de elementos minerales o la mineralización de compuestos orgánicos.

c) Mejoradores, mejoran la estructura del suelo por su contribución a la formación de agregados estables.

d) Agentes de control biológico de patógenos, desarrollan fenómenos de antagonismo microbio-microbio.

e) Biorremediadores, eliminan productos xenobióticos tales como pesticidas, herbicidas y fungicidas.

f) Mejoradores ecofisiológicos, incrementan la resistencia al estrés tanto biótico como abiótico (Bowen y Rovira, 1999).

En los diferentes países latinoamericanos, existe una amplia gama de factores tanto favorables como desfavorables que influyen en la calidad, producción y distribución de los biofertilizantes. En ocasiones, las empresas no cuentan con almacenes apropiados a gran escala o la estructura necesaria para su transportación. En otros, la tecnología e infraestructura para su producción no está desarrollada. Es evidente que se necesita un organismo regulatorio que ejerza un fuerte control de los inoculantes presentes en el mercado para evitar que el agricultor adquiera productos de baja calidad (Elliott y Lynch, 1995).

En México, la producción actual de biofertilizantes se realiza por pequeñas empresas, instituciones de educación e investigación y por el INIFAP, apoyada por el gobierno federal y/o por gobiernos estatales. A pesar de este desarrollo, la distribución y aplicación a gran escala ha tenido serias dificultades, principalmente por problemas de promoción y distribución (Grageda-Cabrera 2011).

Los inoculantes han sido una alternativa viable para disminuir el uso de los fertilizantes químicos y para nutrir los cultivos e incrementar su productividad sin deteriorar el suelo. Sin embargo la calidad de dicho producto puede no ser la óptima

para su utilización en campo, esto se debe a la gran diversidad de cepas nativas, control de producción y la falta de estudios sobre la calidad de los productos que se comercializan en el estado. Por este motivo, este estudio genera conocimiento sobre los parámetros que se tienen que evaluar para estos tipos de productos como lo son lo inoculantes comerciales.

4. HIPÓTESIS

Al menos un producto no cumplirá con todos los requisitos que establecen las normas oficiales mexicanas.

La respuesta antagónica de los inoculantes se verá afectada por la región de procedencia de los microorganismos empleados en los productos.

La concentración de unidades formadoras de colonias (ufc) tendrá un impacto significativo en la respuesta de los inoculantes.

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la calidad de inoculantes microbianos comerciales disponibles en el valle de Mexicali.

4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la información básica presente en la ficha técnica del producto comercializado en base a la norma oficial mexicana NOM-182-SSA1-2010.

- Determinar el número de células viables presentes en el producto y su relación con la dosis indicada por el productor.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron ocho inoculantes comerciales y se clasificaron con base en su procedencia, tipo de organismos (hongos o bacterias) y nombre comercial (Tabla 1). Los cuales fueron analizados en el laboratorio de biotecnología agrícola del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, Baja California, México.

5.1. Evaluación de viabilidad de los inoculantes

La viabilidad de los ocho productos microbianos se determinó mediante el conteo del número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) utilizando el método de recuento en placa de diluciones en base diez en medio Agar Dextrosa Papa (ADP) y Agar Nutritivo (AN) para hongos y bacterias, respectivamente. Además se determinaron para cada producto el cumplimiento de los siguientes criterios en el empaque: 1) registro sanitario, 2) número de lote y 3) fecha de caducidad, teniendo en cuenta los protocolos establecidos en el manual de procedimientos técnicos para el control de calidad de inoculantes de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana **NOM-182-SSA1-2010**.

5.2. Evaluación de la capacidad antagónica de los inoculantes formulados con bacterias

El efecto antagónico se determinó mediante bioensayos *in vitro* siguiendo la metodología de cultivo dual con algunas modificaciones. Para esto, los hongos fitopatógenos se sembraron previamente en medio PDA y se incubaron durante

siete días a 30°C. Los aislados bacterianos se sembraron en caldo nutritivo durante 24 horas, en condiciones de agitación a 150 rpm y temperatura de 30°C. La concentración celular se ajustó a 10^8 cel.mL⁻¹, para inocular superficialmente cuatro puntos de la caja Petri y colocando en la parte media un fragmento del hongo patógeno previamente crecido utilizando un obturador de 5 mm de diámetro, finalmente las cajas inoculadas fueron incubaron a 30°C. Se realizaron tres réplicas por aislado. La actividad antagónica de los aislados se determinó a través de la medición del diámetro de crecimiento del hongo fitopatógeno en presencia del antagonista bacteriano a los 9 días. Como control negativo se utilizaron tres placas donde se encontraban solamente los hongos. Con las mediciones obtenidas se procedió al cálculo del porcentaje de inhibición de acuerdo a lo propuesto por Matar *et al.*, (2009).

5.3. Evaluación de la capacidad antagónica de los inoculantes formulados con hongos

Para comprobar la capacidad antagónica de los productos a base de hongos, se colocó por triplicado los hongos antagonistas en un extremo de la caja de Petri, con un disco de 5 mm de PDA con crecimiento fúngico activo. Después de un periodo de incubación a temperatura ambiente (25°C) y con base en la velocidad de crecimiento de los hongos, en el extremo opuesto de la caja de Petri, se colocó otro disco de agar de 5 mm con el hongo patógeno a confrontar. El crecimiento de los organismos en cada uno de los enfrentamientos fúngicos, fue evaluado cada tercer día. Se consideraron tres repeticiones para cada enfrentamiento y para el tratamiento testigo. La evaluación final fue considerada a los 9 días, cuando el

patógeno cubrió totalmente la caja de Petri en el tratamiento testigo (sin hongo antagonista). El porcentaje de inhibición se estimó con base en la diferencia obtenida entre el crecimiento obtenido de patógeno confrontado con la cepa antagonista y el crecimiento de la cepa del respectivo patógeno sin antagonista a los nueve días (Maciel *et al.*, 2014).

5.4. Evaluación de pureza de los inoculantes

La pureza de los inoculantes se determinó mediante el conteo del número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) utilizando el método de recuento en placa de diluciones en base diez en medio Agar Dextrosa Papa (ADP) y Agar Nutritivo (AN) para hongos y bacterias, respectivamente (Fernández, 2006). Así como características microscópicas de las cepas, tomando en cuenta los protocolos establecidos en el manual de procedimientos técnicos para el control de calidad de inoculantes de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana **NOM-182-SSA1-2010**.

5.5. Cálculos para las UFC/g o UFC/mL

- 1) Contar sólo aquellas cajas (diluciones) que contengan de 30 a 300 colonias.
- 2) Con la siguiente ecuación calcular las UFC/g s.s.

$$\text{UFC/g s.s.} = (\text{NC} * 1/\text{FD} * 1/ \text{V}) / (\text{P} * \text{FH}).$$

Donde:

UFC/ g s. s. = unidades formadoras de colonias / g de suelo seco.

NC = número de colonias en una caja.

FD = factor de dilución que corresponde a la dilución de donde se tomó la muestra con la que se inocula la caja (10⁻² a 10⁻¹⁰).

V= volumen inoculado en la caja = 0.1 mL.

P = peso de la muestra húmeda = 1 g.

FH = factor de corrección de humedad (1-(%humedad/100)).

5.6. Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza a las variables de los experimentos y se aplicó la prueba T de Student utilizando el programa Statistica para Window versión 6.0.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una de las principales limitaciones en la producción intensiva en el Noroeste de México, es la dependencia en el uso de agroquímicos (Moreno-Ramírez, et al., 2015). Por lo que el empleo de microorganismos puede ser una alternativa biotecnológica para el control de enfermedades en el valle de Mexicali (Vargas-Bejarano et al., 2012). En este sentido en el presente estudio se encontró que los productos evaluados provienen de diferentes zonas geográficas que distan en a las condiciones ambientales observadas en Baja California, especialmente en el valle de Mexicali (Tabla 1). Lo anterior puede representar un riesgo a corto y mediano plazo con la diversidad microbiana nativa presente en los suelos. Esto debido a que la población de microorganismos benéficos nativos que tienen el potencial de favorecer aspectos de biocontrol de patógenos, pueden verse desplazados, por la acción de microorganismos de otras regiones (Han et al., 2006).

Inoculante	Tipo de organismo	Empresa	Procedencia
BIOBEN	<i>Trichoderma harzianum</i>	Agrícola innovación	México, D.F.
T-22	<i>Trichoderma harzianum rifai</i>	Plant Health Care de Mexico	México, D.F.
Funqui	<i>Trichoderma viride</i> cepa Q07	SinQuímica	Ahome, Sinaloa
Agroderma	<i>Trichoderma harzianum</i>	LabsaBio	Culiacan, Sinaloa
Bio-Tilis	<i>Bacillus subtilis</i>	Vergel	Mexico, D.F.

Enerbac	Complejo de 13 bacterias benéficas	Agrícola innovación	México, D.F.
Fus-Out	<i>Trichoderma harzianum</i>	Vergel	Mexico, D.F.
Bacillus 1537	<i>Bacillus stearotemrphillus</i>	LabsaBio	Culiacan, Sinaloa

Tabla 1. Procedencia y tipo de inoculantes evaluados.

En cuanto a la información sobre los criterios específicos en el empaque de cada producto evaluado como: 1) registro sanitario, 2) número de lote y 3) fecha de caducidad.

Los resultados mostraron que los inoculantes Agroderma, Bacillus 1537 y Fus-Out, no presentaron registro sanitario (Tabla 2). Siendo únicamente el producto T-22 el que cumplió con el 100% de los criterios específicos en etiqueta. Aun cuando existe un potencial en el uso de inoculantes microbianos (bioinsumos) en México, son pocos los trabajos que registren el cumplimiento de la normatividad vigente en los bioinsumos que se venden en el país. A diferencia de países como Colombia y Argentina quienes han documentado estudios sobre la calidad de bioinsumos, y su apego con la normatividad exigida por las instituciones gubernamentales de cada uno de los países antes mencionados (Benintende, 2010; Zambrano-Moreno et al., 2015).

Tabla 2. Criterios específicos que debe presentar la etiqueta de un inoculante comercial.

PRODUCTO	Registro Sanitario	Número de Lote	Fecha de Caducidad
-----------------	---------------------------	-----------------------	---------------------------

Agroderma	No presenta	+	+
Bioben	+	+	No es precisa
T-22	+	+	+
Enerbac	+	+	No es precisa
Fus-Out	No presenta	+	+
Bacillus 1537	No presenta	+	+
Funqui	+	+	No es precisa
Bio-Tilis	+	+	+

Por otra parte la pureza de los inoculantes evaluados mostro que los valores de UFC/g o UFC/mL, fueron inferiores a los indicados por las etiquetas de los inoculantes comerciales a partir de la dilución 10-3 (Tabla 3). Adicionalmente, el 28% de los productos presentó contaminantes, principalmente microorganismos diferentes a los indicados. Siendo T-22 y Agroderma, los que mostraron colonias no identificadas. Resultados similares han sido previamente reportados en otros países, por ejemplo, Gómez *et.al.*, (1997) evaluaron inoculantes comerciales provenientes de diversas compañías de Argentina y señalaron que la calidad promedio era deficiente. Sin embargo, estudios recientes como el de Benintende (2010) reportó que el 76% de los productos evaluados superó la cantidad de microorganismos indicados por el productor. Lo que sugiere que se ha mejorado la calidad de los productos ofrecidos en el mercado argentino de inoculantes, aunque la situación aún no es ideal.

Tabla 3. Valores de UFC presente en los inoculantes comerciales evaluados.

PRODUCTO	UFC/gr	UFC/ mL	Log ₁₀ UFC/g	Log ₁₀ UFC/mL
Agroderma	NP	1x10 ⁸ /4.2x10 ⁵	NP	5.62
Bioben	1x10 ⁷ /5.1x10 ⁵	NP	5.7	NP
T-22	1x10 ⁷ /1.02x10 ⁶	NP	6.00	NP
Enerbac	NP	1x10 ² / 1.06x10 ⁶	NP	6.02
Bio-Tilis	NP	1x10 ⁷ / 1.04x10 ⁵	NP	5.02
Bacillus 1537	NP	1 x10 ¹¹ / 2x10 ⁶	NP	6.30
Funqui	NP	1 x10 ⁸ / 7x10 ³	NP	3.84
Fus-Out	NP	1 x10 ⁷ / 5x10 ⁴	NP	4.69

NP: no aplica; valores en rojo corresponde a lo marcado por el fabricante.

No obstante, en el caso de Baja California específicamente el valle de Mexicali, los estudios son escasos, por lo que controles de fabricación y comercialización son necesarios para asegurar la calidad de los productos que se comercializan. Es importante indicar que el desarrollo de bioinsumos eficientes involucra aspectos como escalamiento, almacenamiento, conservación y evaluación de su eficiencia *in vitro* y en *in vivo* en condiciones similares en donde se pretende emplear (Timmusk *et al.*, 2017). En este aspecto, nuestros resultados de antagonismos mostraron que los productos formulados con bacterias antagónicas: Bacillus 1537 de LabsaBio, Enerbac, y Bio-Tilis, presentaron efectos diversos sobre el crecimiento de los siguientes hongos fitopatógenos, *Alternaria alternata*, *Macrophmina sp.*,

Fusarium solani, *Botrytis sp.* (Fig. 1). En donde los productos formulados con bacterias mostraron poco efecto contra *Fusarium solani*. No obstante, el producto formulado a base de Bacillus 1537 de LabsaBio fue el único que presentó un efecto inhibitorio sobre éste y el resto de los patógenos evaluados (Fig. 1). Es importante mencionar que en el caso de los productos ENERBAC y Bio-Tilis, la información que presentan sus fichas técnicas no concuerdan con los resultados obtenidos en el presente estudio, específicamente contra *Fusarium solani*. Particularmente, estos resultados fueron superiores al registrado por los productos formulados con hongos micoparásitos. De los cuales, solo el producto Funqui, presentó la capacidad de inhibir el crecimiento de todos los fitopatógenos evaluados en un 50%, los demás productos Fus-Out, Agroderma, y Bioben mostraron efectos inhibitorios variables, siendo los patógenos *Botrytis sp.* (60 %), *Fusarium solani* (60%), y *Alternaria alternata* (50%) en donde se observó las mayores inhibiciones (Fig. 2).

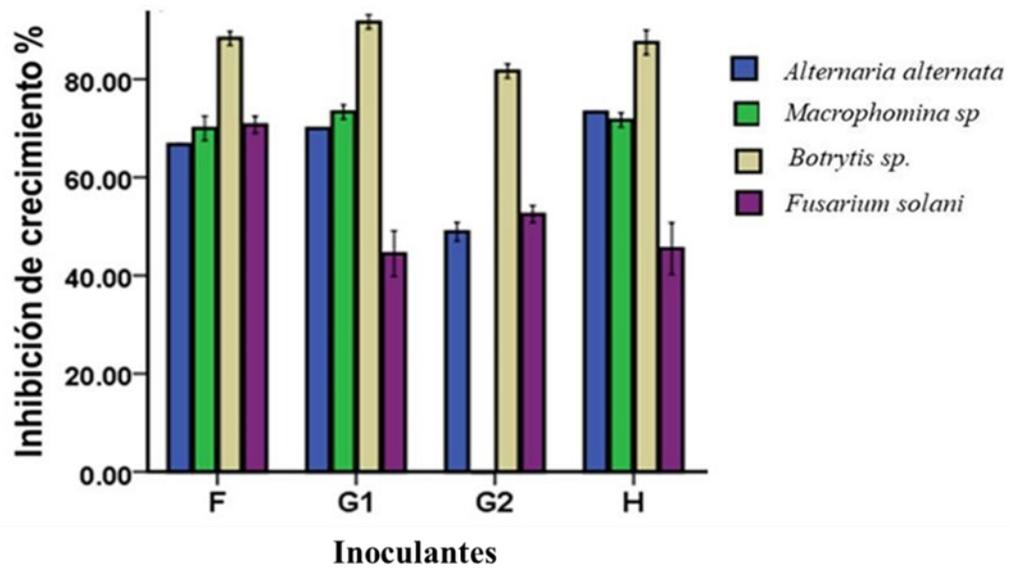


Figura 1. Efecto inhibitorio de las bacterias aisladas de los productos *Bacillus* 1537 (F), Enerbac (G1 y G2) y Bio-Tilis (H) sobre diferentes hongos fitopatógenos.

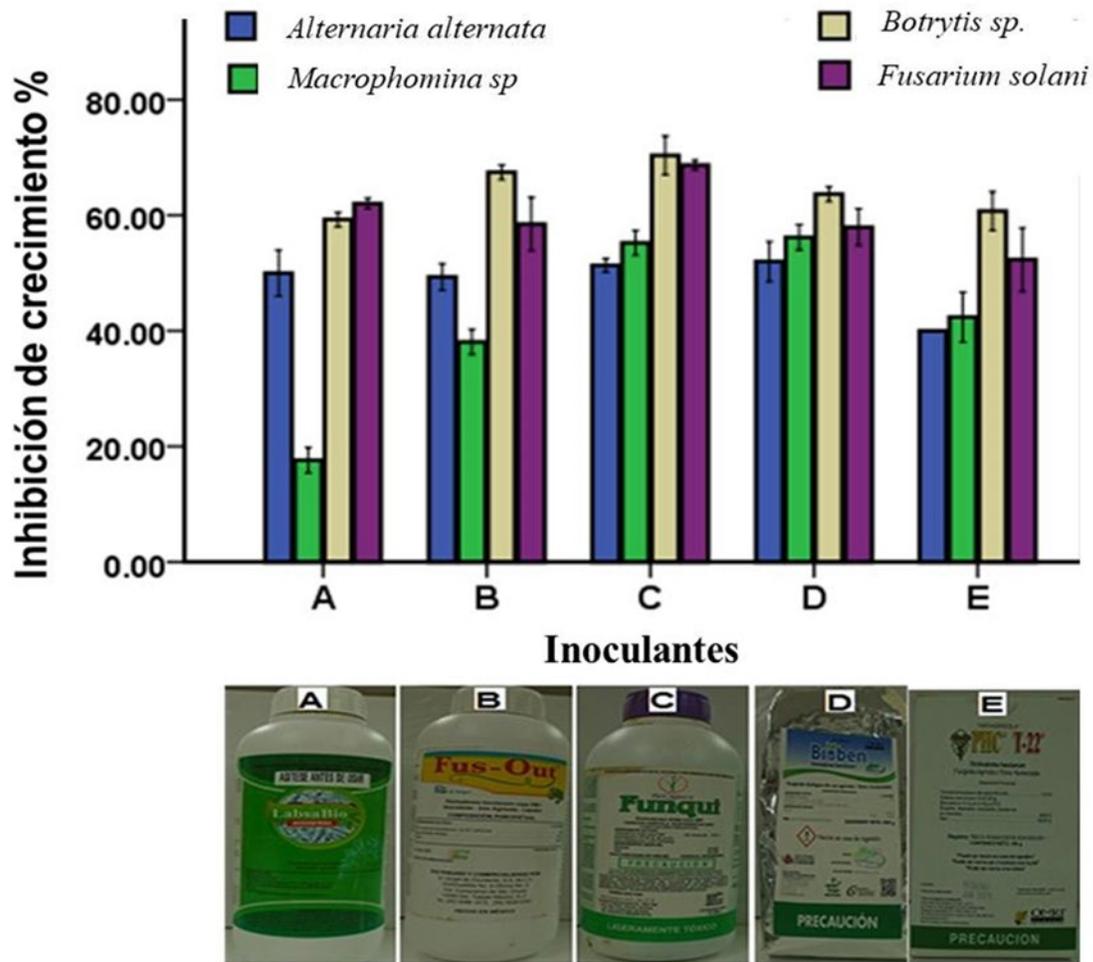


Figura 2. Efecto inhibitorio de los hongos aislados de los productos Agroderma (A), Fus-Out (B), Funqui (C), Bioben (D) y T-22 (E), sobre diferentes hongos fitopatógenos.

Cabe destacar que el producto T-22, fue el que menor efecto inhibitorio presento frente a todos los patógenos evaluados. Los resultados de antagonismo de los diferentes productos evaluados mostraron que en el caso del patógeno *Alternaria alternata* y *Fusarium solani* solo el producto Funqui a base de *Trichoderma viridie*

resulto ser el que mayor efecto antagónico presento (Fig. 2). Por otra parte, la mayoría de los productos mostraron un efecto inhibitorio importante sobre *Botrytis* al inhibir el crecimiento más de un 60%. En contraste los productos a base de hongos antagónicos presentaron poco efecto en la inhibición de *Macrophomina phaseolina* (Fig.1).

7. CONCLUSIONES

Actualmente se cuenta con una amplia presencia de inoculantes comerciales en el valle de Mexicali, los cuales provienen de diferentes zonas del país en donde la tecnología de producción de inoculantes de calidad está disponible. No obstante, los productos formulados a base de hongos micoparásitos que actualmente se emplean presentan poco o nulo efecto a los microorganismos nativos del valle de Mexicali. El control de calidad es una herramienta necesaria para mejorar los inoculantes que se ofrecen en el mercado del valle de Mexicali. Por lo que es necesario un programa nacional que verifique la calidad de inoculantes que se comercializan en el Noroeste de México.

Agradecimientos

Se agradece a la Universidad Autónoma de Baja California, y a SEDAGRO-Baja California por el apoyo otorgado para la realización del proyecto.

8. BIBLIOGRAFIA

Armenta-Bojorquez D, García GC, Camacho BJR, Apodaca SMA, Gerardo ML. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo agrícola de México. *RaXimhai* 6: 51-56.

Bashan Y, Holguin G, De-Bashan LE. (2004). *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003) *Can J Microbiol.* 50:521–577

Benintende, S. (2010). Calidad de inoculantes comerciales para el cultivo de soja en la Argentina: concentración de rizobios viables y presencia de contaminantes. *Revista argentina de microbiología*, 42(2), 129-132.

Gómez M, Silva N, Hartmann A, Sagardoy M, Catroux G. (1997). Evaluation of commercial soybean inoculants from Argentina. *World J Microbiol Biotechnol*, 13: 167-73.

Gupta A, Gopal M, Tilak KV (2000) Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. *Indian J Exp Biol* 38:856–862.

Kloepper JW, Mariano RLR (2000) Rhizobacteria to induce plant disease resistance and enhance growth – theory and practice. In: International symposium on biological control for crop protection, Rural Development Administration, Suwon, South Korea, pp 99–116.

Lucy M, Reed E, Glick BR (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Review Antonie Van Leeuwenhoek* 86:1–25.

Oscar Arath Grageda-Cabrera^{1§}, Arturo Díaz-Franco¹, Juan José Peña-Cabriales² y José Antonio Vera-Nuñez² (2012) Impacto de los biofertilizantes en la agricultura Impact of biofertilizers in agriculture