

**Producción masiva de *Azospirillum* spp.,
formulación, control de calidad y su uso en la
agricultura: Revisión de Literatura**

Ludwin Arnaldo Aguilar Gutiérrez

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Producción masiva de *Azospirillum* spp., formulación, control de calidad y su uso en la agricultura: Revisión de Literatura

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Ludwin Arnoldo Aguilar Gutiérrez

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2020

Producción masiva de *Azospirillum* spp., formulación, control de calidad y su uso en la agricultura: Revisión de Literatura

Presentado por:

Ludwin Arnoldo Aguilar Gutiérrez

Aprobado:




Rogelio Trabanino (Nov 13, 2020 14:08 CST)

Rogelio Trabanino, M.Sc.
Asesor Principal



Rogel Castillo, M.Sc.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria



Carolina Avellaneda, Ph.D.
Asesora



Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Vicepresidente y Decano Académico



Yuliana Sorto (Nov 13, 2020 15:39 CST)

Yuliana Sorto, Microbióloga
Asesora

Producción masiva de *Azospirillum* spp., formulación, control de calidad y su uso en la agricultura: Revisión de Literatura

Ludwin Arnaldo Aguilar Gutiérrez

Resumen. *Azospirillum* pertenece al género de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), encontradas en la rizosfera de las plantas en diferentes regiones del mundo. Estas bacterias tienen la capacidad de incrementar la biodisponibilidad de elementos minerales y fijar nitrógeno. Otra característica importante de la bacteria es la producción de sustancias reguladoras de crecimiento vegetal como auxinas, giberelinas, citoquininas y ácido 3-indolacético (AIA). La unión de todos estos mecanismos de acción da como resultado una mejor absorción de nutrientes y agua, obteniendo una planta más vigorosa, productiva y tolerante a condiciones climáticas adversas. El objetivo de esta revisión de literatura fue realizar una recopilación de métodos de producción de *Azospirillum* spp., tipos de formulación, almacenamiento, control de calidad y su uso en la agricultura. Para el aislamiento de la bacteria se utilizan muestras de suelo, raíces y tejido vegetal, seguidamente la identificación, selección y producción de cultivos puros a partir de las cepas seleccionadas con medios de cultivos especializados. Actualmente en el mercado nos encontramos con biofertilizantes sólidos a base de turba y suspensiones líquidas. La aplicación en campo de estos biofertilizantes se puede realizar a la semilla o al suelo.

Palabras clave: Bacteria, biodisponibilidad, biofertilizante, diazótrofo, fijación de nitrógeno.

Abstract. *Azospirillum* is part of the gender of plant grow promoting bacteria (PGPB), found in the rhizosphere of plants in different regions of the world. These bacteria can increase the availability of mineral elements and nitrogen fixation. Another important characteristic is the production of plant growth regulating substances such as auxins, gibberellins, cytokinins and 3-indoleacetic acid (IAA). The combination of all these mechanisms of action results in the best absorption of nutrients and water, obtaining a more vigorous, productive plant that is tolerant to adverse weather conditions. The objective of this study was to carry out an investigation of massive production methods of *Azospirillum* spp., possible formulations, storage, quality control and its use in agriculture. Soil, root, and plant tissue samples are used for the isolation of the bacteria, followed by the identification, selection and production of pure cultures from the selected strains with specialized culture media. Currently on the market we find biofertilizers based on peat, liquid suspensions, and micro encapsulations with alginate. Field application of these biofertilizers can be done to the seed or the soil.

Keywords: Bacteria, bioavailability, biofertilizer, carrier, diazotrophic.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| Portadilla..... | i |
| Página de firmas..... | ii |
| Resumen..... | iii |
| Índice General..... | iv |
| Índice de Cuadros y Figuras | v |
| | |
| 1.INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2.METODOLOGÍA | 3 |
| 3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 4 |
| 4.CONCLUSIONES..... | 17 |
| 5.RECOMENDACIONES..... | 18 |
| 6.LITERATURA CITADA | 19 |

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

| Cuadros | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Medio de cultivo líquido para la producción de <i>Azospirillum</i> spp..... | 13 |
| 2. Comparación entre los métodos de producción en medio líquido y sólido. | 14 |
| 3. Valores sugeridos para las pruebas de calidad descritas anteriormente. | 16 |

| Figuras | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Mecanismos de acción de <i>Azospirillum</i> en plantas. | 5 |
| 2. Cambios en la arquitectura del sistema radicular en plántulas de 12 días inoculadas con <i>Azospirillum</i> | 6 |
| 3. Colonias de <i>Azospirillum</i> en medio de cultivo Rojo Congo..... | 8 |
| 4. Crecimiento de <i>Azospirillum</i> en medio NFb semisólido..... | 9 |
| 5. Flujograma para la producción de biofertilizante en turba a base de <i>Azospirillum</i> spp. | 10 |
| 6. Flujograma para la producción de biofertilizante líquido a base de <i>Azospirillum</i> spp..... | 12 |
| 7. Recuento esquemático de colonias en placa. | 15 |
| 8. Aplicación de biofertilizante con maquina mezcladora | 16 |

1. INTRODUCCIÓN

Desde el siglo pasado, se ha dado un drástico aumento en la población mundial, según el último informe demográfico de las Naciones Unidas (2019) la población alcanzó los 7,700 millones a mediados del 2019 y la FAO (2009) estimó que en el 2050 llegará a los 10,000 millones. La agricultura afronta un gran desafío, producir más alimentos para una población en constante crecimiento. Para el 2050 se requiere un incremento aproximado del 70% de la producción actual, sin embargo, esto no garantiza la seguridad alimentaria para todos (FAO 2018).

La agricultura y ganadería se está expandiendo e intensificando a nivel mundial para poder satisfacer la creciente demanda de alimentos, esto tiene como consecuencia un aumento en la necesidad de insumos agrícolas tales como fertilizantes, pesticidas, entre otros. Un enfoque importante de la agricultura es aumentar los rendimientos, en este sentido, uno de los factores determinantes sobre este parámetro es la fertilidad del suelo, a pesar de que los suelos han perdido fertilidad a lo largo de los años, se ha logrado aumentar los rendimientos con la adición de fertilizantes, particularmente fuentes N, P, K, S, entre otros (FAO 2018).

La tendencia mundial ha sido inclinarse hacia el uso indiscriminado e ineficiente de fertilizantes mineralizados, sobre todo nitrogenados y fosfatados para aumentar la producción. La agricultura es de los principales causantes de tres importantes gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera, que son, dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O), asimismo la principal fuente de contaminación de agua (Sosa *et al.* 2019). Está demostrado que el N y P están directamente relacionados con la eutrofización e hipoxia de aguas superficiales y la contaminación de aguas subterráneas por nitratos (FAO 2009). La contaminación se da cuando se aplica más fertilizante de lo que el cultivo puede absorber, este se lixivia y/o volatiliza, antes de ser aprovechados por la planta, llegando así a la atmósfera y a las fuentes de agua. China, que es el mayor consumidor de fertilizantes en el mundo, pierde aproximadamente el 50% por lixiviación y volatilización. Hoy en día, el mundo consume diez veces más fertilizantes minerales que en 1960 (FAO 2018).

A pesar de que la agricultura es de los principales contaminantes, también puede desempeñar un papel importante en revertir o mitigar los daños al medio ambiente (FAO 2002). Actualmente, la investigación científica está buscando nuevas alternativas que minimicen el uso de los fertilizantes, manteniendo altos rendimientos. El suelo es un ecosistema de enorme riqueza microbiana, capaz de realizar procesos que favorecen la sostenibilidad de este (Corrales *et al.* 2014). Los estudios sobre los microorganismos del suelo son numerosos, en estos se ha encontrado un grupo de bacterias conocidas como Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV), capaces de fijar nutrientes, especialmente N, y producir fitohormonas que promueven un mayor desarrollo radicular y aéreo (Clavijo *et al.* 2012; Gouda *et al.* 2018).

La fijación biológica de nitrógeno realizada por bacterias es una alternativa viable, económica y ambientalmente amigable, para suplir la inclusión de fuentes de nutrientes de origen sintético. *Azospirillum* spp. es un género de bacterias diazotróficas, promotoras de crecimiento vegetal, encontradas en el suelo de diferentes regiones del mundo y se ha demostrado que tienen una alta especificidad con raíces de gramíneas (Cárdenas *et al.* 2010). Estas bacterias se asocian a las raíces

de las plantas y tienen la capacidad de fijar nitrógeno, producir auxinas, giberelinas y citoquininas, traduciéndose en un mayor desarrollo de la planta y reduciendo de esta manera el uso de fertilizantes (Domingues *et al.* 2020). Es por su gran importancia para la agricultura y su potencial como biofertilizante que esta revisión tiene como objetivo:

- Recopilar información acerca de los diferentes métodos de producción masiva de bacterias del género *Azospirillum*.
- Investigar y describir dos procesos de producción masiva de *Azospirillum* spp en un medio sólido y un medio líquido.
- Investigar y describir un proceso de control de calidad y una formulación que proporcione una vida de anaquel prolongada a la bacteria.

2. METODOLOGÍA

La revisión de literatura se realizó entre los meses de julio a octubre de 2020, partiendo desde una búsqueda de artículos en sitios como “Research Gate”, “Google Scholar”, Biblioteca Wilson Popenoe, entre otras. Para realizar la búsqueda fue necesario la utilización de palabras o frases clave como, bacteria, biodisponibilidad, biofertilizante, diazótrofo, fijación de nitrógeno, inoculante, portador. En otras ocasiones para buscar archivos en inglés se utilizaron palabras como “biofertilizers”, además en algunos sitios como “Research Gate” fue necesario crear una cuenta para tener acceso a los artículos. Se utilizaron 52 documentos desde el año 1968 hasta el 2020 como referencia de aislamiento y producción masiva.

Se seleccionaron los documentos que incluyeran los métodos más sencillos de aislamiento de la bacteria y de formulación de inoculantes, posteriormente se dividieron según el o los métodos de producción que mencionara el artículo. Tomando en cuenta como variables la efectividad del método, parámetros de control de calidad, población final de bacterias, vida de anaquel y aplicación en campo, se procedió a realizar un análisis de los resultados de cada investigación. Para esta revisión no hubo exclusión de documentos por su fecha de publicación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de la bacteria

Descripción del género *Azospirillum*. *Azospirillum* es un género de bacterias descubiertas por la Dra. Johana Döbereiner en Brasil. Es la bacteria promotora de crecimiento vegetal (BPCV) más estudiada desde hace cuatro décadas. A la fecha, se han identificado 15 especies de *Azospirillum* en el mundo, todas con alta especificidad en gramíneas y forrajeras (Domingues *et al.* 2020). *Azospirillum* es fijadora de nitrógeno, se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo, han sido detectadas en zonas templadas, tropicales y subtropicales (Parra y Cuevas 2001). Se encuentran mayormente asociadas en la rizosfera de raíces de distintos cultivos, pero principalmente maíz, sorgo, arroz, caña de azúcar, trigo y pastos forrajeros (Bashan 1999; Sagadevan *et al.* 2014).

Los cambios en las plantas, provocados por *Azospirillum* spp, residen en la arquitectura de las raíces. La inoculación promueve el desarrollo de raíces laterales y adventicias, pelos radicales y ramificación de los pelos radicales, generalmente este mayor desarrollo en las raíces se da por la presencia de fitohormonas y algunas moléculas asociadas. Estas plantas obtienen mayor capacidad de absorción de minerales y agua, teniendo como resultado plantas más vigorosas (Bashan *et al.* 2011).

Actualmente son reconocidas seis especies en el género *Azospirillum* como las más importantes. Las dos primeras en ser descritas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense*, siendo éstas las más ampliamente estudiadas (Tarrand *et al.* 1978). Posteriormente fueron descritas las especies *A. amazonense* (Magalhães *et al.* 1983), *A. halopraeferans*, *A. irakense* y *A. largimobile* (Reinhold *et al.* 1987). Recientemente, en honor de quien impulsara los estudios con este género bacteriano y descubriera otros diazótrofos, se ha propuesto la especie candidata *A. doebereineriae* (Hartman *et al.* 2000). Hoy en día, *Azospirillum* spp. se comercializa en distintos países del mundo. El mercado brasileño es el más destacado. Este éxito comercial es el resultado de los beneficios proporcionados a la agricultura (Domingues *et al.* 2020).

Fisiología. *Azospirillum* es un género de bacterias de vida libre, Gram negativas, con forma celular de bacilos, ligeramente curvos, presentan un diámetro de $1,0 \mu\text{m} \times 2,1-3,8 \mu\text{m}$. Poseen movilidad en espiral debido a la presencia de flagelos y contienen cantidades elevadas de poli- β -hidroxibutirato (PHB), hasta el 50% del peso seco celular. A nivel morfológico, el género *Azospirillum* presenta la característica de que sus colonias, poseen una forma circular ovoide con paredes gruesas similares a quistes; superficie: rugosa y brillante, de bordes ondulados; consistencia: cremosa y adquieren una coloración rojo oscuro o escarlata por absorción del colorante Rojo Congo (Sangoquiza *et al.* 2018). Este género de bacterias resulta negativo para las pruebas bioquímicas Vogues-Prokauer, fermentación del dulcitol, rojo metilo, producción de H_2S y de gas, peptonización y alcalinización de la leche (Martínez *et al.* 2010).

Son denominadas como diazótrofos (bacterias que hacen fijación de nitrógeno atmosférico), endófitos facultativos ya que algunas especies tienen la capacidad de penetrar en la raíz y colonizar espacios intercelulares. La bacteria es atraída a las raíces por quimiotaxis, basada en compuestos

presentes en los exudados radicales y posteriormente suele unirse a la superficie de la raíz para colonizar espacios inter e intracelulares. Estas no forman estructuras especiales. Crece en ambientes microaerófilicos (concentraciones bajas de oxígeno disuelto).

Mecanismo de acción. Estas bacterias tienen la capacidad de incrementar la biodisponibilidad de minerales, por medio del proceso de fijación de nitrógeno. La única manera de aprovechar este recurso de la atmósfera es mediante microorganismos capaces de realizar la fijación biológica de nitrógeno, lo cual es posible, gracias a la actividad del complejo enzimático llamado nitrogenasa, que está constituido por dos hierro proteínas: la proteína (I), llamada hierro-molibdeno-proteína, y la proteína (II), llamada hierro-proteína (Figura 1). La enzima requiere de la colaboración de otras dos proteínas: ferredoxina y flavodoxina, que actúan como donadores de electrones y reductores naturales de la nitrogenasa. Los electrones son transportados a la nitrogenasa por la ferredoxina y llegan a la hierroproteína, ésta activa a la Mo-Fe-proteína y se produce la reducción de nitrógeno, siendo luego fijado como compuesto aminado (Mantilla *et al.* 2007).

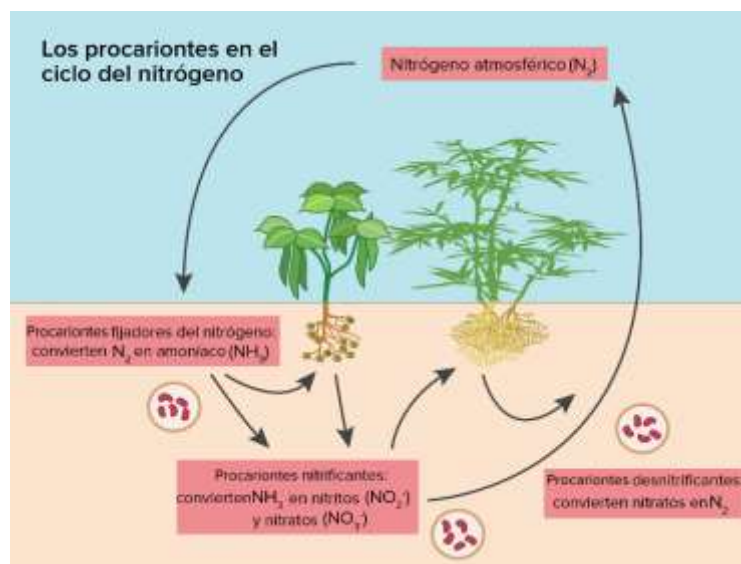


Figura 1. Mecanismos de acción de *Azospirillum* en plantas. Inducción a la producción de fitohormonas y tolerancia sistémica, mediada por antioxidantes, ajuste osmótico, producción de fitohormonas y estrategias de defensa como la expresión de genes relacionados con la patogénesis. Fuente: Fukami *et al.* (2018)

Otra característica es la estimulación de enraizamiento, esto ocurre por medio de la síntesis de sustancias reguladoras de crecimiento vegetal como auxinas, giberelinas, citoquininas y ácido 3-indolacético (AIA) que es la principal fitohormona producida por la bacteria (Figura2). El AIA es una auxina conocida por estimular respuestas rápidas en el crecimiento, incremento en la elongación celular, la división celular y su diferenciación (Cárdenas *et al.* 2010), estas estimulan la densidad y longitud de pelos radicales. La unión de todos estos mecanismos de acción da como resultado la mejor absorción de nutrientes y agua, obteniendo una planta más vigorosa, productiva y tolerante a condiciones climáticas adversas (Cassán *et al.* 2010).

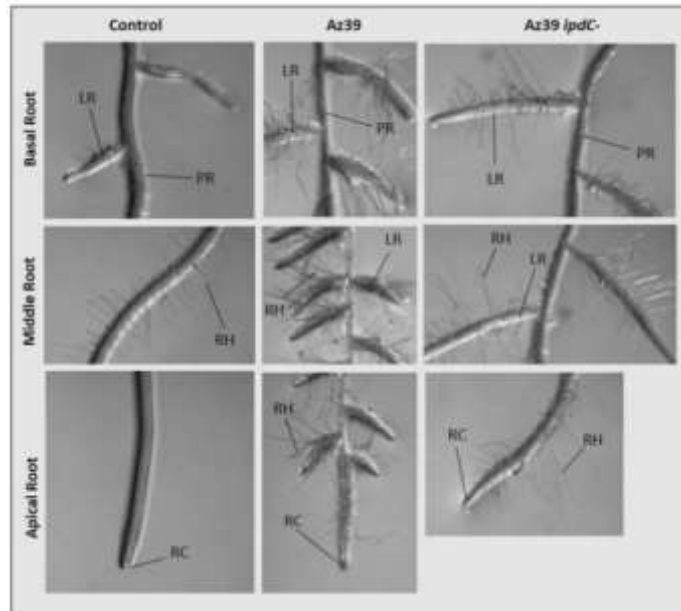


Figura 2. Cambios en la arquitectura del sistema radicular en plántulas de 12 días inoculadas con *Azospirillum*. Las imágenes muestran diferentes zonas de la raíz: raíz basal, media y apical. Raíz primaria (PR), raíces laterales (LR), pelos radicales (HR), cofia (RC). Fuente: Cassán *et al.* (2020).

Producción de biofertilizante a base de *Azospirillum* spp.

Un biofertilizante es un producto que está formado por microorganismos vivos o en estado de latencia, capaces de realizar funciones como la fijación de nitrógeno, movilización de fósforo, potenciar nutrientes, entre otras sustancias activas. La aplicación de estos organismos tiene como objetivo promover el rendimiento de los cultivos, mejorando su crecimiento y desarrollo (Cassán *et al.* 2015). El biofertilizante debe tener propiedades que garanticen la cantidad correcta de células viables al momento de ser utilizado en campo. Es indispensable que su manejo sea sencillo para el agricultor, lograr una liberación rápida y controlada y de igual manera que pueda ser aplicado con maquinaria agrícola (Bashan 1998).

Es necesario que el portador (turba o suspensión líquida) provea un microambiente adecuado que evite la rápida disminución de las bacterias en campo (Bashan 1998). Durante la asimilación de estas en el suelo, se enfrentan a factores bióticos y abióticos tales como, interacción y/o competencia con microorganismos nativos, depredación por protozoos, cambios constantes de la humedad del suelo, adsorción del suelo, entre otros. Para superar estas barreras y colonizar exitosamente las raíces del cultivo, las bacterias deben adquirir la capacidad física de moverse a través del suelo (Bashan y Holguin 1997). En los siguientes subcapítulos se describen dos posibles biofertilizantes a base de *Azospirillum* utilizando un portador sólido (turba) y un portador líquido (medio de cultivo) para ser aplicados en varios cultivos con distintos fines.

Aislamiento de *Azospirillum* spp. La bacteria se encuentra asociada en suelo, específicamente en la rizosfera de diferentes regiones del mundo y en distintas partes de la planta (Cassán *et al.* 2015).

El aislamiento de la bacteria se realiza a partir de muestras de rizosfera, raíces y tejido vegetal de cultivos como maíz, sorgo o arroz (Rodríguez-Cáceres 1982).

Toma y procesamiento de muestras. El suelo de donde se extraerá la muestra, idealmente, debe ser uniforme y es necesario conocer los usos que se le ha dado en ciclos anteriores, textura, cantidad de materia orgánica y pH (Mendoza *et al.* 2004). Se deben tomar submuestras en diferentes puntos del área para obtener una muestra representativa y hacer un croquis o mapa del área indicando la posición de cada una de ellas. El muestreo se debe realizar al azar. Cada submuestra de suelo se debe realizar a una profundidad de 30 cm y sí es posible obtener el mismo volumen. Posteriormente, hay que colocarlas todas en un recipiente y mezclarlas de manera que se obtenga una muestra homogénea de 1 kg que represente toda el área (INTA 2012).

Estudios realizados por Mendoza *et al.* (2004) aseguran que la concentración de bacterias en el tejido vegetal disminuye conforme la planta va llegando a madurez, siendo la etapa de floración en la que se encuentra mayor concentración de bacterias. Idealmente, las muestras deben ser tomadas durante la etapa de floración del cultivo en cuestión. Las muestras de raíces deben colocarse en bolsas limpias de polietileno y ser enviadas inmediatamente al laboratorio.

El aislamiento de la bacteria se puede llevar a cabo a partir de muestras de suelo, raíces y tejido vegetal. Para el aislamiento del suelo, se deben tomar 10 g de muestra para disolver en 90 mL de solución salina al 85% o solución de sacarosa al 10%. A partir de esta dilución (10^{-1}) se realizan diluciones seriadas hasta obtener una concentración 10^{-6} (Mantilla-Paredes *et al.* 2009). Las muestras de raíces y tejido vegetal primero deben lavarse con agua del grifo para remover el suelo, luego se procede a lavar con agua estéril y se cortan trozos de 10 cm, se secan con papel toalla. A continuación, se pesan muestras de 10 g de muestra de tejido vegetal para ser molidas en 10 mL de solución salina al 85% y luego realizar diluciones seriadas hasta 10^{-6} . (Cassán *et al.* 2015). Se deben aplicar 0.1 mL de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} de suelo y/o tejido vegetal en el centro de las placas Petri que contengan medio de cultivo Rojo Congo e incubar a 35°C durante 48 a 72 horas y con la ayuda de una espátula Drigalski, previamente esterilizada, se extiende la dilución sobre toda la superficie (Cassán *et al.* 2010).

Identificación de las cepas. Numerosas bacterias diazótrofes fijadoras de N_2 han sido identificadas y clasificadas en diversos géneros incluyendo *Klebsiella*, *Azobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Pseudomonas* entre otras. Estas bacterias han sido aisladas de rizosfera, suelo, superficie de raíz y del interior de la raíz donde ocasionalmente se encuentran en gran cantidad (Bashan y Holguin, 1997). Rodríguez-Cáceres (1982), reportó el Rojo Congo como un excelente medio de cultivo para el reconocimiento de colonias de *Azospirillum* en placas Petri. Los aislados producen una coloración roja escarlata, con un diámetro de 1.5-3 mm, consistencia seca, abundante crecimiento, forma redonda o irregular, bordes ondulados y superficie rugosa (Cassán *et al.* 2015) (Figura 3). Otras bacterias asociadas a las raíces muestran características totalmente distintas en este medio de cultivo (Hossain *et al.* 2015). En la superficie del medio se debe cultivar 0.1 mL de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e incubar a 35°C durante 72 horas.

Otra técnica para asumir la presencia de la bacteria es evaluando la capacidad de fijación de nitrógeno del microorganismo. Para esto, es necesario el uso de medios compatibles con sus requisitos fisiológicos para la síntesis de nitrogenasa; deben ser semisólidos, libres de nitrógeno y con concentraciones bajas de oxígeno. Para la determinación de actividad nitrogenasa de

Azospirillum spp se debe utilizar el medio de cultivo NFb (Nitrogen Free broth), con la adición de malato como fuente de carbono, pH cercano a 7.0 y preparado con una baja concentración de agar (de Brujin 2015). Este medio de cultivo, por su composición, permite el aislamiento predominante de distintas especies de *Azospirillum* spp (Cassán *et al.* 2015). En la superficie del medio se debe inocular 0.1 mL de la dilución 10^{-5} y extender en todo el plato Petri para conseguir el aislamiento de colonias. Los tubos deben ser incubados a 35 ± 1 °C por 4-7 días o hasta observar crecimiento y presencia de una biopelícula (Mantilla-Paredes *et al.* 2009; Canto *et al.* 2004).

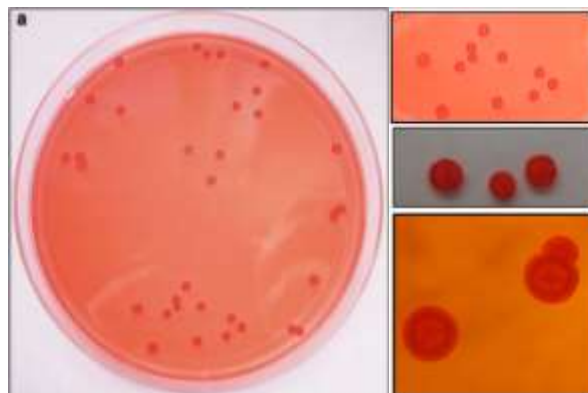


Figura 3. Colonias de *Azospirillum* en medio de cultivo Rojo Congo
Fuente: Cassán *et al.* (2015).

Ninguna cepa de *Azospirillum* hidroliza el almidón y la gelatina; la mayoría de las especies son catalasa positiva; presenta actividad reductora de acetileno y nitratos, produce indol, reacciona ante la ureasa; fermentación negativa de lactosa, glucosa, xilosa, celobiosa, galactosa y manitol; positiva para arabinosa y fructosa; utilización de citratos negativa; alcaliniza la leche y pruebas de motilidad positiva (Martínez *et al.* 2010). Además del uso de pruebas bioquímicas y medios selectivos para la identificación de *Azospirillum* spp., es posible realizar una caracterización a través de enfoques genotípicos, fenotípicos, utilizando los cebadores Azo494-F/Azo756-R con electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (Cassán *et al.* 2015).

La forma más económica y sencilla de preservar estas bacterias una vez identificadas, es en el medio de aislamiento NFb, en tubos inclinados o en tubos Eppendorf, con aceite mineral estéril, glicerol o glicerina líquida al 50% a una proporción 1:1 en la superficie del cultivo y sellar con un tapón de goma. A veces es necesario hacer varias repeticiones, ya que al abrir el tubo se tiende a provocar la muerte de los microorganismos. Esto puede ser almacenado de -20 a -70 °C (Dobereiner *et al.* 1995; de Brujin 2015). Otro método es la liofilización, se suspenden en 3 mL de la solución de liofilización en alícuotas de 0.2 mL distribuidas en ampollas de liofilización que se deshidratan según el procedimiento recomendado para especies de rizobios (Döbereiner *et al.* 1995).

Evaluación de capacidad diazotrófica y microaerofílica. La medición de la capacidad diazotrófica (capacidad de promover el crecimiento vegetal) y microaerofílica (crecimiento en concentraciones bajas de oxígeno disuelto), es otro de los pasos importantes en el control de calidad

de los biofertilizantes. Esto se realiza con la técnica de recuento por el Número Más Probable (NMP). Se necesita realizar diluciones seriadas del producto hasta 10^{-7} para cultivarlas en medio NFb semisólido. De cada dilución se hacen cinco repeticiones. En cada tubo con 5 mL de medio, se colocan 100 μ L de dilución. Esto se debe incubar a una temperatura de 35 °C hasta observar presencia de cambio de viraje del indicador de Bromotimol Azul y formación de película, siendo estos tubos positivos (Puente y García 2010) (Figura4).



Figura 4. Crecimiento de *Azospirillum* en medio NFb semisólido, evaluación de capacidad diazotrófica y microaerófila con el indicador de Azul de bromotil.

Fuente: Cassán *et al.* (2015).

Preparación del inóculo. Los inoculantes son cultivos viables con un alto número de microorganismos, suspendidos o mezclados en un portador (turba o suspensión líquida). Generalmente, estos cultivos se realizan en fermentadores y se busca utilizar un medio de cultivo económico, pero eficiente. La mayoría de los medios de cultivo utilizados para la producción de inoculantes comerciales están patentados, por ello su composición no es revelada. Se sabe que algunos de los medios de uso general son el caldo nutritivo, caldo Luria-Bertani, entre otros, sin embargo, con estos medios no se obtienen rendimientos óptimos de crecimiento (Bashan *et al.* 2010). Por tanto, Bashan *et al.* (2010), desarrollaron dos modificaciones al medio TGEA (Agar Triptona Glucosa Extracto de Levadura), en estas se reemplazaron la D-Glucosa del medio original por: (1) Gluconato de sodio: 5 g/L (Cultivo BTB1) y (2) Glicerol: 8 mL/L (Cultivo BTB2). Este medio es ideal para la producción masiva de *Azospirillum* spp., se obtienen 10^{11} células/mL en 18 horas. Se utiliza glicerol de grado industrial.

Las colonias puras se reactivan en un medio de caldo nutritivo a 36 ± 1 °C por 24 horas a 120 rpm en matraces Erlenmeyer de 100 mL, las células se cosechan por centrifugación a $4,000 \times g$ y se enjuagan dos veces en solución estéril de NaCl al 0.85%. Se utilizan 4 mL de esta suspensión como inóculo en cada medio BTB1 o BTB2 que debe contener 240 mL en matraces Erlenmeyer de 1,000 mL. Luego del proceso de esterilización y enfriamiento ambos medios deberían estar totalmente mezclados. El pH de este medio de cultivo es de 6.8 (Okon *et al.* 1976). Estos medios inoculados se dejan en incubación durante 48 horas a una temperatura de 35 ± 1 °C a 200 rpm (Bashan *et al.* 2010).

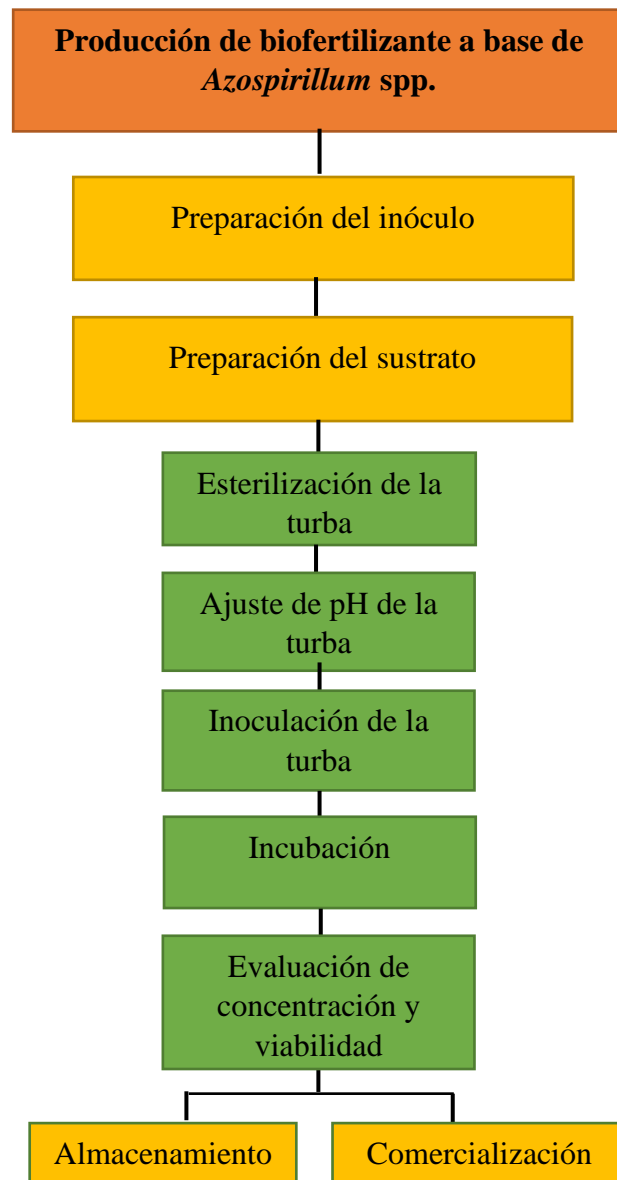


Figura 5. Flujograma para la producción de biofertilizante en turba a base de *Azospirillum* spp.

Biofertilizante en turba

Las turbas se forman por acumulación de gran cantidad de restos orgánicos parcialmente descompuestos a consecuencia de la presencia de un medio saturado de agua, que origina condiciones anaerobias que retardan considerablemente la descomposición de los restos vegetales, de esta manera se acumulan llegando a formar capas de gran espesor. Son suelos orgánicos pertenecientes a la orden de los histosoles (USDA 1968). Los biofertilizantes a base de turba han sido de los más utilizados en pequeñas y grandes industrias para la inoculación de rizobacterias. Con la turba, las bacterias siguen metabólicamente activas, y en algunos casos, se siguen multiplicando durante el almacenamiento, siempre y cuando la turba tenga suficientes nutrientes, humedad y una temperatura constante. Desde el punto de vista microbiológico, los

microorganismos contaminantes son el principal problema que afecta la calidad y vida útil de los biofertilizantes a base de turba, es necesario obtener un portador estéril antes de la adición del cultivo puro de bacterias. La turba normalmente se esteriliza mediante irradiación gamma o con autoclave, también es distribuida por distintas casas comerciales empacada en bolsas estériles de diferentes presentaciones (Tittabutr *et al.* 2012).

Esterilización. La esterilización de la turba con autoclave se realiza con el método de tindalización, dado que el calentamiento excesivo de la turba puede liberar compuestos tóxicos para las bacterias (Bashan 1998), se somete a esterilización dos veces a temperaturas entre 80 y 100°C durante 60 min, con un período de espera de 18 horas. Este período se da para que los microorganismos contaminantes que hayan quedado vivos en la primera esterilización se desarrollen y luego sean eliminados en la segunda esterilización. Este método es utilizado en materiales que no soportan un calentamiento presurizado. Según Tittabutr *et al.* (2012) con este método, el número de UFC inoculados en la turba esterilizada se mantuvo durante 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente. La turba estéril tiene importantes ventajas, las poblaciones de bacterias benéficas es bastante alta, se puede adicionar nutrientes para aumentar la población final de la bacteria, el control de calidad desde el punto de vista microbiológico es el mejor (Bashan 1998).

Ajuste de pH. El pH ideal para el inoculante es de 6.8-7.0 (Cassán *et al.* 2015). Primero que nada, se debe determinar el pH de la turba por el método de dilución 1:2 con agua destilada, este método consiste en usar una parte de turba por dos partes de agua destilada estéril, dejar equilibrar la solución por 30 min y luego colocar en un papel filtro y exprimir, por último, se procede a medir el pH del lixiviado con un medidor de pH. Si es necesario ajustar el pH, se puede utilizar carbonato de calcio en una relación de 0.11g de CaCO₃ por cada gramo de turba antes de añadir el cultivo de bacterias. Para producciones a gran escala se recomienda una inclusión del 11% de CaCO₃ en relación con la cantidad total de turba a utilizar (Cassán *et al.* 2010). Si se utiliza CaCO₃, debe mezclarse bien y asegurar que este haya reaccionado con la turba, si es necesario, hay que esperar a que la mezcla reaccione. La relación entre CaCO₃ e H⁺ en la turba, dependerá de la humedad y el contenido de materia orgánica y arcilla, así como la capacidad buffer de la turba. La cal agrícola es la mejor piedra caliza para ajustar el pH (Torres *et al.* 2001).

Inoculación de la turba. Existen pequeñas variaciones en la preparación del inoculante en el medio de turba, en su mayoría se basan en el siguiente procedimiento: Para la preparación de 420 g de inoculante en bolsas de polietileno previamente esterilizadas, se mezclan 210 g de turba, previamente pasadas por un tamiz de 40 mesh y 84 mL de agua para estéril; 126 mL del inóculo bacteriano elaborado 24 horas antes, idealmente con 5×10^9 UFC/mL. La mezcla dentro de las bolsas polietileno debe incubarse durante 7 días a 33 ± 2 °C. Es necesario agitar o mover las bolsas cada dos días. El número final de bacterias en el inoculante debe encontrarse en un rango de 1×10^7 y 1×10^8 UFC/g de inoculante (Cassán *et al.* 2015).

Almacenamiento del biofertilizante. La dosis requerida es de 420 g de inoculante por bolsa de semilla de 22.7 kg. Las bolsas deben ser almacenadas a una temperatura de 4 °C, de esta manera podrá durar durante 12 a 24 meses. Previo a la aplicación en campo, estas bolsas de inoculantes deben almacenarse un día a 30 ± 2 °C para que las bacterias empiecen a aclimatarse (Cassán *et al.* 2015).

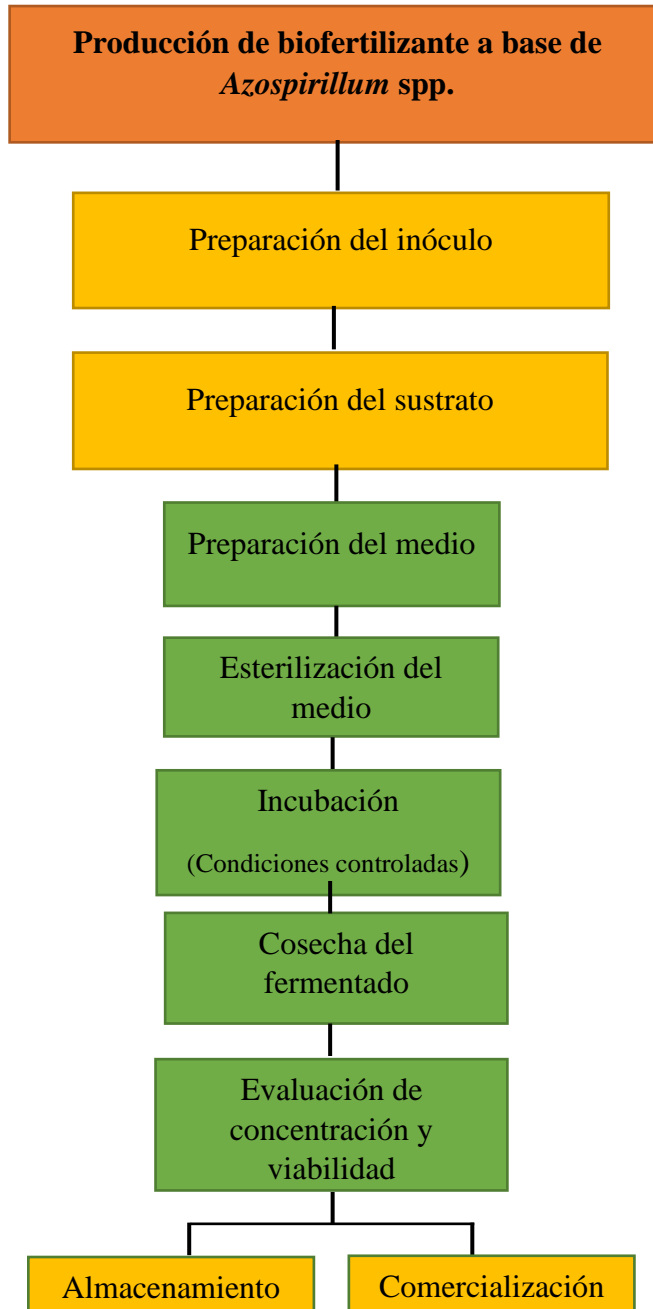


Figura 6. Flujograma para la producción de biofertilizante líquido a base de *Azospirillum* spp.

Biofertilizante en suspensión líquida

Los biofertilizantes líquidos son cultivos microbianos o suspensiones modificadas con sustancias que pueden mejorar la adherencia, estabilización y capacidades de tenso activo y dispersión de la bacteria. Las formulaciones líquidas permiten al fabricante incluir suficientes cantidades de nutrientes, protectores celulares e inductores responsables de la formación de células, esporas, quistes para mejorar el rendimiento. La principal ventaja de estos biofertilizantes es que son fáciles de manipular y el fabricante puede agregar suficientes cantidades de nutrientes y protectores celulares (Cassán *et al.* 2015). Para la preparación del biofertilizante líquido, se debe homogenizar

los ingredientes del medio seleccionado en agua directamente en el biorreactor de acuerdo con el volumen de trabajo de este (Cuadro 1). Considerando como fuente principal de carbono el succinato de malato (Okon *et al.* 1976).

Cuadro 1. Medio de cultivo líquido para la producción de *Azospirillum* spp.

| Ingrediente | Cantidad en gramos por litro de dH₂O |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Fosfato de potasio K ₂ HP ₀₄ | 6.0 |
| Sulfato de magnesio MgSO ₄ 7H ₂ O | 4.0 |
| Cloruro de sodio NaCL | 0.2 |
| Cloruro de calcio CaCl ₂ | 0.1 |
| Cloruro de hierro FeCl ₃ | 0.02 |
| Molibdato de sodio NaMoO ₄ 2H ₂ O | 0.01 |

Fuente: (Okon *et al.* 1976)

Ajuste de pH. El pH ideal para el inoculante es de 6.8 a 7.0. Se procede a medir el pH directamente del medio de cultivo con un medidor de pH de laboratorio. Si es necesario ajustar el pH del medio se tomar una alícuota de 50 mL, y de ser necesario ajustar al pH indicado utilizando HCl 0.1N o NaOH 0.1N. Es necesario medir el pH de nuevo para asegurarse de tener el pH óptimo. En el caso de producción en biorreactores generalmente estos traen un medidor de pH incorporado. Para ello primero se debe calibrar el medidor de pH y luego ajustar el pH del medio (Bashan *et al.* 2010).

Esterilización. La esterilización del medio de cultivo líquido se realiza en autoclave a 121 °C por 30 minutos para producción a pequeña escala. Para producción a gran escala se utilizan biorreactores en los cuales de igual manera se puede llevar a cabo el proceso de esterilización. Con la esterilización del medio se asegura que el medio esté libre de cualquier contaminante que pueda interferir con el desarrollo de la bacteria de interés (Bashan y Levanony 1988). Una vez esterilizado el medio de cultivo se deja enfriar. La esterilización del medio de cultivo es importante ya que garantiza la pureza del producto y desde el punto de vista microbiológico mejora y facilita el proceso de control de calidad.

Inoculación del medio. Para la preparación de un litro de biofertilizante líquido la inoculación del medio se hace con 10 mL del inóculo bacteriano elaborado 24 horas antes, idealmente con 5×10^9 UFC/mL. Para producciones a gran escala se recomienda usar una relación del 1% de inóculo expresado en volumen en el medio líquido de crecimiento. Una vez inoculado se procede al proceso de incubación en un biorreactor fermentador a 30 ± 2 °C. El cultivo se lleva a cabo en condiciones aeróbicas haciendo pasar 300 litros de aire por minuto por un tiempo de 52 horas. La biomasa celular estará disponible para ser utilizada en semillas o el suelo (OMPI, 1996). La dosis de aplicación es de 310 mL de la formulación líquida por saco de semilla de 22.7 kg.

Almacenamiento del biofertilizante. Opcionalmente se puede añadir un protector celular que es cualquier sustancia que brinda mayor estabilidad a las membranas celulares, con el cual el biofertilizante mantiene una densidad celular óptima (1×10^9 UFC/mL), al menos durante ocho meses, aumentando de esta manera su vida de anaquel. Algunos protectores celulares disponibles en el mercado son alginato de sodio, goma arábiga, trehalosa, glicerol, polisorbato 20 y las

combinaciones de estos. El protector celular se adiciona en una proporción del 0.1 a 2.5% peso/volumen del vehículo (Contreras *et al.* 2017). Según Sivasakthivelan y Saranraj (2013), las formulaciones líquidas de *Azospirillum* spp. mantienen las poblaciones de bacterias en 10^8 durante 10 meses, almacenada en envases PET (Tereftalato de polietileno) a temperatura ambiente. Las ventajas de los medios sólidos son: escasa inversión en equipos y personal con experiencia limitada; no obstante, para producciones a gran escala los medios líquidos siguen siendo la mejor alternativa (Sagadevan *et al.* 2014). En el Cuadro 2 se hace una comparación de los dos métodos de producción detallados anteriormente en el documento.

Cuadro 2. Comparación entre los métodos de producción en medio líquido y sólido.

| Factor | Líquido | Sólido |
|-------------------------------------------|----------------|---------------|
| Inversión inicial | Alta | Baja |
| Experiencia técnica | Alta | Básica |
| Producción a escala industrial | Media | Barata |
| Labor requerida a nivel industrial | Baja | Media |

Fuente: Cassán *et al.* (2010).

Control de calidad

La calidad de los biofertilizantes está ligada a la efectividad de los microorganismos y es importante entregar la cantidad de bacterias declaradas en el envase. Es necesario evaluar la viabilidad de *Azospirillum* spp., en relación con esto, la finalidad del portador (turba o suspensión líquida) es mantener su viabilidad. Debe estar exento de organismos patógenos o contaminantes, por esta razón es indispensable realizar pruebas de detección de contaminantes para evitar la pérdida de viabilidad por competencia de espacio y de nutrientes en el portador y para asegurar que se entrega un producto de alta pureza (Cassán *et al.* 2015).

Recuento de células viables. El recuento de células viables se realiza con la técnica de siembra en placa por extensión en superficie en medio Rojo Congo (Cassán *et al.* 2010). Para realizar la prueba en inoculantes líquidos, se deben extraer 10 mL del producto con una jeringa estéril, diluir la muestra en 90 mL de solución fisiológica y 0.04 mL de solución stock de Tween 80. Esta dilución (10^{-1}) se debe agitar entre hasta el punto de homogenización con un agitador magnético y un Erlenmeyer de 250 mL a 250 rpm con barra magnética teflonada. De esta solución stock se realizan diluciones seriadas hasta 10^{-7} .

Para inoculantes a base de turba se extraen 10 g de producto para ser disueltos en 90 mL de solución salina al 85% o solución sacarosa al 10%. A partir de esta dilución (10^{-1}) se realizan diluciones seriadas hasta obtener 10^{-6} . Se deben sembrar por triplicado 0.1 mL de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} en placas Petri con medio Rojo Congo (15-20 mL). La siembra se realiza por extensión en superficie con espátula. Estas deben incubarse entre 28 y 30 °C por 48 horas. Se cuentan las placas que presentan entre 30 y 300 colonias, las colonias típicas de *Azospirillum* spp. se caracterizan por ser rojo escarlata, circulares, convexas de 1-3 mm de diámetro y con los bordes elevados. El resultado se expresa como UFC/mL⁻¹ y se calcula usando la fórmula [1]. Se recomienda que contenga 1×10^9 UFC/mL⁻¹ (Cassán *et al.* 2010) (Cuadro3).

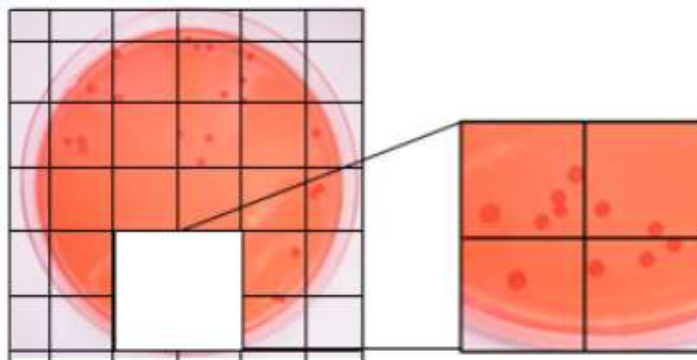


Figura 7. Recuento esquemático de colonias en placa.

Fuente: Cassán *et al.* (2010).

Fórmula. El resultado se expresa como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL⁻¹) y es calculado con la fórmula 1. Donde el número de colonias es el número promedio de colonias presentes en las tres placas de lectura, el factor de la alícuota es 10 si se utiliza 0,1 ml para esparcir en las placas, y el factor de dilución es el inverso de la dilución en la que se cuentan las colonias para obtener el resultado (Rodríguez 1982).

$$\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1} = \text{número de colonias contadas} \times 10 \times \text{factor de dilución} \quad [1]$$

Detección de contaminantes. Para la evaluación de microorganismos contaminantes sugerimos la siembra directa desde el envase contenedor, con asa y por agotamiento o estriado en placas con Medio TSA (Agar Trypticosa Soya) para bacterias en general y Agar Sabouraud para hongos. Adicionalmente sugerimos la realización de la coloración de Gram y la observación de una muestra directa al microscopio. Se busca la presencia de microorganismos con características tintoriales y morfologías no compatibles con *Azospirillum* spp., es decir bastones Gram (+) o Gram (-) de gran tamaño, cocos y vibrios. Adicionalmente se debe determinar la morfología celular de *Azospirillum* spp. debido a su dimorfismo celular (Cassán *et al.* 2010) (Cuadro3).

Cuadro 3. Valores sugeridos para las pruebas de calidad.

| Parámetros | Valores sugeridos |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Recuento de células viables | 1×10^8 - 1×10^9 UFC por mL/g de inoculante |
| Detección de contaminantes | Medio Sabouraud (ausencia de crecimiento de hongos) |
| pH | Medio Trypticase soya agar (ausencia de crecimiento de bacterias de otro género) |
| Recuento por número más probable | 6.8 – 7.0 |
| | 1×10^8 - 1×10^9 NMP de bacterias presuntivas |

Fuente: (Bashan *et al.* 2010; Cassán *et al.* 2010; Puente *et al.* 2010)

Aplicación en campo

Aplicación a las semillas. Antes de la siembra, se añade la turba a la semilla, con o sin agua o adherente. El biofertilizante y la semilla pueden ser mezclados con las manos o bien con una maquina mezcladora, sí se utiliza agua, debe dejar aerear las semillas ya aplicadas durante un 30 min (Figura 8). En el caso de utilizar una formulación líquida, este se aplica directamente sobre la semilla. Las semillas requeridas se mezclan con el biofertilizante y se dejan secar a sombra durante 30 min. Se debe tener cuidado con semillas que han sido previamente tratadas con algún tipo de plaguicida, que puede matar a la bacteria (Cassán *et al.* 2015).



Figura 8. Aplicación de biofertilizante con maquina mezcladora

Fuente: Kaifeng Youdo Machinery Co., Ltd. (2020)

4. CONCLUSIONES

- Los medios líquidos y sólidos de producción masiva de bacterias del género *Azospirillum* y es necesario elegir un portador que brinde las condiciones óptimas a la bacteria para su sobrevivencia durante el almacenamiento y que además sea de bajo costo.
- Para la producción masiva de *Azospirillum* spp podemos encontrar formulaciones sólidas a bases de turba y suspensiones líquidas en biorreactores como las descritas en esta revisión de literatura.
- Es indispensable realizar pruebas de control de calidad para asegurar la efectividad del producto y duración, entre las pruebas más comunes están recuento de células viables, detección de contaminantes y la evaluación de capacidad diazotrófica y microaerofílica.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios de laboratorio y campo con el fin de evaluar la efectividad y el proceso de producción masiva de *Azospirillum* spp.
- Se recomienda realizar caracterización molecular de las especies nativas de *Azospirillum* identificadas en Zamorano.
- Ejecutar el protocolo de producción en medio sólido y líquido propuesto en esta revisión de literatura en la EAP Zamorano y compararlo con los resultados obtenidos en otros estudios.
- Realizar un estudio entre distintos métodos líquidos y sólidos de producción masiva para determinar el que mejor se adapte a las condiciones de la EAP Zamorano.

6. LITERATURA CITADA

- Bashan Y, Levanony H. 1988. Adsorption of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd to soil, sand, and peat particles. *Microbiology Society*. 134(7): 1811-1820. doi:10.1099/00221287-134-7-1811.
- Bashan Y, Holguin G. 1997. *Azospirillum*–plant relationships: environmental and physiological advances *Canadian Journal of Microbiology*. 43(2):103-121. doi:10.1139/m97-015.
- Bashan Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Elsevier*. 16(4):729-770. doi:10.1016/S0734-9750(98)00003-2.
- Bashan Y. 1999. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. *Biology and Fertility of Soils*. 29(3):246–256. doi:10.1007/s003740050549
- Bashan Y, De-Bashan LE. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *En Advances in agronomy*. 108: 77-136. Doi: 10.1016/S0065-2113(10)08002-8
- Bashan Y, Trejo A, De-Bashan LE. 2011. Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*. 47(8):963-969. doi: 10.1007/s00374-011-0555-3
- Canto-Martín JC, Peralta SM, Avelino DM. 2004. Effect of inoculation with *Azospirillum* sp. habanero chili plants (*Capsicum chinense* Jacquin). *Tropical and subtropical agroecosystems*. [consultado el 15 de ago. de 2020]. 4(1):21-27. <https://www.redalyc.org/pdf/939/93940104.pdf>
- Cárdenas DM, Garrido MF, Bonilla RR, Baldani VL. 2010. Isolation and identification of *Azospirillum* sp. in Guinea grass (*Panicum maximum* Jacq.) of the Valle del Cesar. *CAB Direct*. [consultado el 12 de ago. de 2020]. 33(3). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103364549>
- Cassán F, Penna C, Creus C, Radovancich D, Monteleone E, Salamone IG, Lett L. 2010. Protocolo para el control de calidad de inoculantes que contienen *Azospirillum* sp. Buenos Aires, Argentina: Asociación Argentina de Microbiología. [consultado el 15 de ago. De 2020]. https://www.academia.edu/12138584/PROTOCOLO_PARA_EL_CONTROL_DE_CALIDAD_DE_INOCULANTES_QUE_CONTIENEN_Azospirillum_sp
- Cassán FD, Okon Y, Creus CM. 2015. *Handbook for Azospirillum: Technical issues and protocols*. Springer international publishing. 1(1):514. ISBN: 978-3-319-06542-7.
- Clavijo C, Chipana V, Centeno J, Zúñiga D, Guillén C. 2020. Isolation, characterization and identification of diazotropic bacteria from the rhizosphere of the *European Olea* "olive" crop in Tacna Peru. *Ecol. Apl*. [consultado el 13 de ago. de 2020]. 11(2):89-102. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162012000200006.
- Contreras SM, Dávila G, Flores Hernández FY, Marino EN, Bolaños RE. 2017. Biofertilizante para aumentar el rendimiento de cultivos. Organización mundial de la propiedad intelectual. [consultado el 26 de sep. de 2020].

<https://patentimages.storage.googleapis.com/bb/d4/cd/0285479b5e3555/WO2017086770A2.pdf>

- Corrales Ramírez LC, Arévalo Galvez ZY, Moreno Burbano VE. 2014. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova*. 12(21):67-79. doi: <https://doi.org/10.22490/24629448.997>.
- De Bruijn FJ. 2015. Biological nitrogen fixation. In *Principles of Plant-Microbe Interactions*. [consultado el 13 de agosto 2020]. 215-224 pag. <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-08575-3>
- Döbereiner J, Baldani V, Baldani J. 1995. Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas não-leguminosas. EMBRAPA-SPI. 60 p. ISBN: 8585007656.
- Domingues-Duarte CF, Cecato U, Trento-Biserra T, Mamédio D, Galbeiro S. 2020. *Azospirillum spp.* en gramíneas y forrajeras. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. 11(1):223-240. doi: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>
- Fages, Jacques. (1992). An industrial view of *Azospirillum* inoculants. Formulation and application technology. [consultado el 26 de ago. de 2020]. 13:15-26. <https://dal.space.library.dal.ca/bitstream/handle/10222/77206/VOLUME%2013-NUMBER%201,2,3-1992-PAGE%2015.pdf?sequence=1>
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2002. World agriculture: towards 2015/2030 – Sumary report. Roma, Italia. [consultado el 11 de ago. de 2020]. <http://www.fao.org/3/y3557e/y3557e.pdf>
- [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2009. La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050. Como alimentar al mundo 2050. Roma, Italia. [consultado el 10 de ago. de 2020]. http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2018. More people, more food, worse water? A global review of water pollution from agriculture. Roma, Italia. [consultado el 10 de ago. de 2020] <http://www.fao.org/3/ca0146en/CA0146EN.pdf>
- Fukami J, Cerezini P, Hungria M. 2018. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*. 8(1):73. doi: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>.
- Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological research*. 206:131-140. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
- Guimarães VF, Klein J, Barbosa-Ferreira M, Kestring Klein D. (2020). Promotion of rice growth and productivity as a result of seed inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Afric. J. of Agric. Research*. 16(6):765-776. Doi: <https://doi.org/10.5897/AJAR2020.14723>
- Hartmann A, Stoffels M, Eckert B, Kirchhof G, Schloter M. 2000. Analysis of the presence and diversity of diazotrophic endophytes. *CAB direct*. [consultado el 10 de ago. de 2020]. 727-736 p. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20001907340>

- Hossain MM, Jahan I, Akter S, Rahman N, Rahman B. 2015. Isolation and identification of *Azospirillum* isolates from different paddy fields of North Bengal. Research in pharmacy and biotec. [consultado el 10 de ago. de 2020]. 3(1):74-80. http://www.academia.edu/download/50471082/Isolation_and_identification_of_Azospiri20161121-7108-11791t0.pdf
- Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO. 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. Plant and soil. 331(1-2):413-425. doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>
- [INTA] Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2012. Técnicas de toma y remisión de muestras de suelos. Argentina. [Consultado el 15 de ago. de 2020]. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmptecnicas_de_toma_y_remisin_de_muestras_de_suelos.pdf
- Laís-Zago S. Efeito do encapsulamento na conservacao do *Azospirillum brasilense*. Universidad Federal do Paraná. Palotina, Brasil. [consultado el 15 de ago. del 2020] 75 p. <https://core.ac.uk/download/pdf/147518906.pdf>
- Magalhaes FM, Baldani JI, Souto SM, Kuykendall JR, Dobereiner J. 1983. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An. Acad. Brasil. Cienc. [consultado el 18 de ago. de 2020]. 55:417-430. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302560110>
- Mantilla CL, Villalba-Anaya M, Oviedo-Zumaqué LE. 2007. Non-symbiotic bacterial diazotrophs from of agricultural crops of San Carlos, Córdoba, Colombia. Rev. Col. Biotecnol. [consultado el 18 de ago de 2020]. 9(2):6-14. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77690202.pdf>
- Mantilla-Paredes AJ, Cardona G, Peña-Venegas CP, Murcia U, Rodríguez M, Zambrano MM. (2009). Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. Revista de biología tropical. [consultado el 25 de ago. de 2020]. 57(4):915-927. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=s0034-77442009000400002&script=sci_arttext
- Mendoza A, Cruz A, Jacques C. 2004. Aislamiento, selección, producción, y evaluación de un inoculante basado en cepas nativas de *Azospirillum* en el Norte de Tamaulipas. Simposio de Biofertilización. México. [consultado el 15 de ago. de 2020]. https://www.researchgate.net/publication/266020799_Aislamiento_seleccion_produccion_y_evaluacion_de_un_inoculante_basado_en_cepas_nativas_de_Azospirillum_en_el_Norte_de_Tamaulipas_pdf
- Okon Y, Stephan L, Albrecht, and Burris 1976. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. Journal of bacteriology. [consultado el 15 de sep. de 2020]. 127(3):1248-1254. <https://jb.asm.org/content/jb/127/3/1248.full.pdf>
- [OMPI] Organización Mundial de la Propiedad Intelectual. 1996. Solicitud internacional publicada en virtud del tratado de cooperación en materia de patentes (PCT). Fertilizante Bacteriano y Procedimiento de Obtención. [consultado el 25 de sep. de 2020].

<https://patentimages.storage.googleapis.com/52/06/20/fcad84990bea1f/O1996034840A1.pdf>

W

- Paccinin GG, Braccini AL, Dan LGM, Scapim CA, Ricci TT, Bazo GL. 2012. Efficiency of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* on agronomic characteristics and yield of wheat. Paraná, Brasil. *Industrial Crops and Products*. 43(1):393-397. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.052>
- Parra Y, Cuevas F. 2001. Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. La Habana, Cuba: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. [consultado el 15 de ago. de 2020] https://www.redalyc.org/pdf/1932/193218120004.pdf?fbclid=IwAR0O3_pTXF09e2Dqkqgp__U8ZqdFQmS5gBswYr1uqVZVTjGSacb n3UIaZvU
- Puente ML, García JE. 2010. Revisión del uso de *Azospirillum brasilense* como promotor del crecimiento en trigo y maíz en Argentina. Uso Actual y Potencial de Microorganismos para Mejorar la Nutrición y el Desarrollo en Trigo y Maíz. Argentina: Instituto de Tecnología Agropecuaria. [consultado el 02 de sep. de 2020]. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_microorganismos_trigo_maiz.pdf
- Reinhold B, Hurek T, Fendrik I, Pot B, Gillis M, Kersters K, Thielemans S, and J. De Ley. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 37(1):43-51. Doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-37-1-43>
- Rodríguez Cáceres EA. 1982. Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. [consultado el 18 de ago. de 2020]. 44(4):990-991. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC242127/pdf/aem00179-0232.pdf>
- Sabra W, Zeng A, Sabry S, Omar S, Deckwer W. 1999. Effect of phosphate and oxygen concentrations on alginate production and stoichiometry of metabolism of *Azotobacter vinelandii* under microaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52:773-780. doi: <https://doi.org/10.1007/s002530051590>
- Sagadevan P, Rajakumar R, Suresh SN, Ranjithkumar R, Karthikeyan P, Rathish S. 2014. Isolation and mass inoculum production of *Azospirillum* from Paddy field soil. *International Journal of Biosciences and Nanosciences*. [Consultado el 15 de ago. del 2020]. 1(6):141-145. https://www.researchgate.net/publication/271512573_Isolation_and_mass_inoculum_production_of_Azospirillum_from_Paddy_field_soil
- Sangoquiza CA, Viera Y, Yáñez CF. 2018. Biological response of *Azospirillum* spp. to different types of stress. *Revista Centro Agrícola*. [Consultado el 15 de ago. de 2020] 45(1):40-46. <http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/html/v45n1/body/cag05118.html>
- Sivasakthivelan P, Saranraj P. 2013. *Azospirillum* and its formulations. *International Journal of Microbiological Research*. 4(3):275-287. doi:10.5829/idosi.ijm
- Sosa BA, García YS. 2019. Emission of greenhouse gases in the soil under the green manure effect. *Mesoamerican Journal of Agronomy*. 30(3):767-782. Doi: <http://dx.doi.org/10.15517/am.v30i3.36103>

- Schoebitz MI. 2006. Aislamiento y caracterización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera de *Lolium perenne* L. de suelo volcánico (modelo género *Azospirillum* spp.) [Tesis de pregrado]. Chile: Universidad Austral de Chile. 77 p; [consultado el 15 de ago. de 2020]. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fas364a/doc/fas364a.pdf>
- Tarrand JJ, Krieg NR, and J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24(8):967-980. doi: 10.1139/m78-160
- Tittabutr P, Teamthisong K, Buranabanyat B, Teaumroong N, Boonkerd N. 2012. Gamma irradiation and autoclave sterilization peat and compost as the carrier for rhizobial inoculant production. Journal of Agricultural Science. 4(12):59-67 doi: 10.5539/jas.v4n12p59
- Torres A, Camberato D, Lopez R, Micklebart M. 2001. Producción comercial de cultivos bajo invernadero y vivero. Indiana: Purdue University. [consultado el 14 de sep. de 2020]. <http://www.extension.purdue.edu/extmedia/HO/HO-237-SW.pdf>
- United Nations. 2019. World population prospects 2019. 19na. ed. New York: United Nations, Department of Economic and Social Affairs. xiii.4. 46p. ISBN: 978-92-1-148316-1f
- [USDA] United States Department of Agriculture. 1968. Histosob and elassifieation. Supplemmt to 7th Aproximalion soil elassifieation System. Washington: USDA: Soil Survey Staff [consultado el 14 de sep. de 2020]. https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs142p2_050914.pdf
- Vermani MV, Kelkar SM, Kamat MY. 1997. Studies in polysaccharide production and growth of *Azotobacter vinelandii* MTCC2459, a plant rhizosphere isolate. Letters in applied microbiology. [consultado el 14 de sep. de 2020] 24:379–383. <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1046/j.1472-765X.1997.00137.xr>