

Instituto Politécnico Nacional

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

*APLICACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN CELULAR EN EL
DESARROLLO DE UN PRODUCTO DE INTERÉS AGRONÓMICO.*

Que para obtener el Título de Ingeniero Biotecnólogo

PRESENTAN:

JOHANA JAZMÍN GALLARDO CASAS

LAURA GUADALUPE MATUS FLORES

DIRECTOR DE PROYECTO:

Dr. ENRIQUE DURÁN PÁRAMO



México, D.F. Mayo 2007

Simbología.

Ácido giberélico	AG ₃
Ácido indolacético	AIA
Ácido salicílico	AS
Agar de Dextrosa Sabouraud	ADS
Agar Nutritivo	AN
Agar Papa y Dextrosa	PDA
Agar Rosa de Bengala	ARB
Caldo de cultivo	CN
Medio mixto 1	MM1
Medio mixto 2	MM2
Revoluciones por minuto	rpm

I. Índice:

	Página
Resumen	12
1. Introducción	14
2. Antecedentes	16
2.1 Biocontrol de plagas de plantas	16
2.2 Biofertilización	17
2.3 Reguladores del crecimiento de plantas	17
2.4 Fijación de Nitrógeno en plantas por medio de microorganismos	19
2.5 <i>Trichoderma sp</i>	20
2.6 <i>Gibberella Fujikuroi</i>	23
2.7 <i>Azospirillum</i>	24
2.8 Inmovilización celular	25
2.9 Liofilización	26
2.10 Método combinado para estabilizar las funciones biológicas de los microorganismos.	27
2.11 Productos de interés agronómico similares	27
3. Justificación	28
4. Objetivos	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos específicos	29
5. Diagrama experimental	30
6. Metodología	31
6.1 Activación de los microorganismos	31
6.2 Identificación de microorganismos utilizados	31
6.3 Identificación microscópica de hongos	31

6.4 Identificación de hongos por la técnica de Ridell (Microcultivo)	32
6.5 Identificación microscópica de bacterias con la técnica de tinción de Gram	32
6.6 Identificación macroscópica de bacterias	33
6.7 Pruebas de biocompatibilidad en caja Petri	33
6.8 Determinación de biomasa	34
6.9 Técnica de inmovilización celular por atrapamiento	34
6.10 Determinación de la viabilidad de microorganismos inmovilizados	35
6.11 Técnica de estabilización y mantenimiento de los microorganismos (paso final para la elaboración de un biofertilizante)	36
7. Resultados y discusión	37
8. Diseño del producto final de interés Agronómico.	71
9. Conclusiones y perspectivas.	72
10. Bibliografía	73
11. Cartas de aceptación de proyecto	75

II. Índice de figuras

Página

Fig. 1 Fotografía del hongo *Trichoderma harzianum*, a) observación microscópica con el objetivo de 40X mostrando los típicos esporangióforos en forma de cruz., y b) observación del crecimiento del hongo medio de cultivo sólido. 23

Fig. 2 Fotografía del hongo *Gibberella fujikuroi* a) Colonia de en caja de Petri, en medio de cultivo sólido; b) observación microscópica del hongo tomada con el objetivo de 40X. 24

Fig. 3 Reactivación de los microorganismos en medio de cultivo líquido (CN) y medio de cultivo sólido AN, PDA, ARB, ADS. 38

Fig.4 Fotografía microscópica de a) *Azospirillum brasilense*, observada con el objetivo de 100X, b) *Trichoderma harzianum* y c) *Gibberella fujikuroi* observadas con el objetivo de 40X. 39

Fig. 5 Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en diferentes medios; a) medio AN y b) medio PDA. 40

Fig. 6 Crecimiento de *Gibberella fujikuroi* en diferentes medios; a) cepa NRRL-2284 en el medio AN, b) cepa NRRL-2278 en el medio AN, y c) cepa NRRL-2278 en el medio PDA. 41

Fig.7 Crecimiento de *Gibberella fujikuroi* cepa NRRL-2284 en MM1, a) acidificado con 0.25mL de ácido tartárico y b) sin acidificar. 41

Fig.8 Crecimiento de *Gibberella fujikuroi* cepa NRRL-2278 en MM1 acidificado con 0.25mL de ácido tartárico. 42

- Fig. 9** a) Crecimiento de *Gibberella fujikuroi* en el medio ARB, en el centro se encuentra la cepa NRRL-2284 y en la orilla la NRRL-2278, y b) Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en ARB. 42
- Fig. 10** Crecimiento de *Gibberella fujikuroi* en diferentes medios; a) cepa NRRL-2284 en el medio AN, y b) cepa NRRL-2284 en el medio PDA sin acidificar. 42
- Fig. 11** Crecimiento de *Gibberella fujikuroi* en el medio ADS, en el centro se encuentra la cepa NRRL-2284 y en la orilla la NRRL-2278. 43
- Fig.12** Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en MM1 a) acidificado con 0.25mL de ácido tartárico y b) sin acidificar. 43
- Fig.13** Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en: a) MM2, b) medio PDA sin acidificar, y c) medio ADS. 44
- Fig.14** Crecimiento de *Azospirillum brasilense* en el medio rojo congo. 44
- Fig.15** Pruebas de biocompatibilidad de los hongos *Trichoderma harzianum*, *Gibberella fujikuroi* y *Azospirillum* en el medio de cultivo AN. 45
- Fig.16** Pruebas de biocompatibilidad de los hongos *Trichoderma harzianum* y *Gibberella fujikuroi* en el medio de cultivo AN acidificado. Obsérvese que los microorganismos no se inhiben entre sí. 45
- Fig.17** Pruebas de biocompatibilidad de los hongos *Trichoderma harzianum* y *Gibberella fujikuroi* en el medio MM1; a) acidificado, y b) sin acidificar. 46
- Fig. 18** Medios de cultivo diseñados, utilizados para la selección del medio ideal para el crecimiento de los microorganismos. 47
- Fig. 19** Fotografía del sistema montado para la inmovilización de los microorganismos. La explicación se detalla en la metodología. 65

Fig. 20 En el cristalizador se encuentra la solución CaCl_2 la cual va a servir para que al contacto del alginato con los iones de calcio gelifique formando las esferas. 66

Fig. 21 Microorganismos inmovilizados por la técnica de atrapamiento en citrato de calcio para ser disueltos. 66

Fig. 22 Microorganismos inmovilizados en medio de cultivo líquido. 67

Fig. 23 Presentación de producto final 71

III. Índice de tablas.

	Página
Tabla 1 Efecto de la variación de la temperatura en el crecimiento de los microorganismos, en medio de cultivo líquido (CN).	38
Tabla 2 Morfología macroscópica de los hongos, observada en medio de cultivo sólido	39
Tabla 3 Morfología colonial de <i>Azospirillum brasilense</i> .	40
Tabla 4 Biomasa obtenida de <i>Trichoderma harzianum</i> , en los diferentes medios de cultivo diseñados.	47
Tabla 5 Biomasa obtenida de <i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL-2284, en los diferentes medios diseñados.	48
Tabla 6 Biomasa obtenida de <i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL-2278, en los diferentes medios de cultivo diseñados.	49
Tabla 7 Biomasa obtenida de <i>Azospirillum brasilense</i> , en los diferentes medios de cultivo diseñados.	50
Tabla 8 Biomasa obtenida de <i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL-2284, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C.	52
Tabla 9 Biomasa obtenida de <i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL-2284, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C.	54
Tabla 10 Biomasa obtenida de <i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL-2278, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C.	55

Tabla 11 Biomasa obtenida de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C. 57

Tabla 12 Biomasa obtenida de la cinética de *Trichoderma harzianum*, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C. 58

Tabla 13 Biomasa obtenida de la cinética de *Trichoderma harzianum*, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C. 60

Tabla 14 Biomasa obtenida de la cinética de *Azospirillum brasilense* en el medio de cultivo líquido (CN) a pH 6.5 y a una temperatura de 30°C. 61

Tabla 15 Biomasa obtenida de la cinética de *Azospirillum brasilense*, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C. 63

Tabla 16 Determinación de la viabilidad de *Azospirillum brasilense* inmovilizado, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C. 68

Tabla 17 Determinación de la viabilidad de *Gibberella fujikuroi* inmovilizado, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C. 69

Tabla 18 Determinación de la viabilidad de *Trichoderma harzianum* inmovilizado, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C. 70

III. Índice de gráficas

Página

Gráfica.1 Determinación del crecimiento de *Trichoderma harzianum*, en los diferentes medios de cultivo diseñados. 48

Gráfica.2 Determinación del crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, en los diferentes medios de medio de cultivo diseñados. 49

Gráfica 3 Determinación del crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278, en los diferentes medios de cultivo diseñados. 50

Gráfica.4 Determinación de biomasa de *Azospirillum brasilense*, en los diferentes medios de cultivo diseñados. 51

Gráfica.5 Determinación del crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C. 53

Gráfica 6 Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C. $\mu_{\max}(h-1) = 0.0101$ 53

Gráfica 7 Determinación del crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C. 54

Gráfica 8 Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C. $\mu_{\max}(h-1) = 0.007$ 55

Gráfica 9 Determinación del crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C. 56

Gráfica 10 Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278 en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C. $\mu_{\max}(h-1) = 0.0099$ 56

Gráfica.11 Determinación del crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C. 57

Gráfica 12 Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C. $\mu_{\max}(h-1) = 0.0199$ 59

Gráfica 13 Determinación del crecimiento de *Trichoderma harzianum*, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C. 59

Gráfica 14 Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Trichoderma harzianum*, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C. $\mu_{\max}(h-1) = 0.0141$ 59

Gráfica.15 Determinación del crecimiento de *Trichoderma harzianum*, en el medio de cultivo líquido (ACM) a pH de 6 y a una temperatura de 30°C. 60

Gráfica 16 Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Trichoderma harzianum*, en el medio de cultivo líquido (ACM) a pH de 6 y a una temperatura de 30°C. $\mu_{\max}(h-1) = 0.0066$ 61

Gráfica 17 Determinación del crecimiento de *Azospirillum brasilense* en el medio de cultivo líquido (CN) a pH 6.5 y a una temperatura de 30°C. 62

Gráfica 18 Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Azospirillum brasilense* en el medio de cultivo líquido (CN) a pH 6.5 y a una temperatura de 30°C. $\mu_{\max}(h-1) = 0.0408$ 62

Gráfica 19 Determinación del crecimiento de *Azospirillum brasilense* en medio de cultivo líquido (ACM) a pH 6 y a una temperatura de 30°C. 63

Gráfica 20 Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Trichoderma harzianum* en el medio de cultivo líquido (ACM) a pH 6 y a una temperatura de 30°C.
 $\mu_{\max}(h-1) = 0.4146$ 64

Gráfica 21 Determinación de la viabilidad de *Azospirillum brasilense* el medio de cultivo líquido (CN) a pH 6.5 y a una temperatura de 30°C. 68

Gráfica 22 Determinación de la viabilidad de *Gibberella fujikuroi* el medio de cultivo líquido (CN) a pH 6.5 y a una temperatura de 30°C. 69

Gráfica 23 Determinación de la viabilidad de *Trichoderma harzianum* el medio de cultivo líquido (CN) a pH 6.5 y a una temperatura de 30°C. 70

Resumen.

La agronomía es una de las actividades más importantes realizada a nivel mundial, sin embargo se ha visto insuficiente en los últimos años debido a la creciente demanda de alimentos, entre otros factores. Uno de los problemas que comúnmente presenta la agronomía son las plagas y enfermedades en los cultivos así como la falta de nutrientes en el suelo, razones por las cuales los investigadores han utilizado el biocontrol (aumento de microorganismos benéficos para los cultivos) para tratar de remediar dichos problemas.

Por lo anterior el presente trabajo tiene como objetivo principal la elaboración de un producto de interés agronómico destinado al control biológico de algunas de las plagas y enfermedades de las plantas causadas por microorganismos patógenos, así como la estimulación del crecimiento de plantas.

Para lograr este propósito se trabajó tres microorganismos con características específicas que nos serán útiles para elaborar un producto de interés agronómico que resulte no sólo efectivo sino también de bajo costo.

Dentro de los microorganismos estudiados se encuentran dos hongos: *Trichoderma harzianum* y *Gibberella fujikuroi*, y una bacteria del género *Azospirillum sp.*

Cada microorganismo requiere de medios específicos para crecer, por lo que una de las tareas fue la de realizar pruebas necesarias para determinar el grado de compatibilidad que existe entre dichos microorganismos haciéndolos crecer en conjunto en medios diseñados para este fin.

Una vez realizadas las pruebas de compatibilidad, se determinó el medio de cultivo ideal para su mayor crecimiento a nivel laboratorio.

Se realizaron las pruebas necesarias para determinar su velocidad máxima de crecimiento; de esta manera podremos determinar el tiempo necesario para que los

microorganismos lleguen a la fase de crecimiento de mayor producción de metabolitos. La biomasa obtenida se recuperará para posteriormente inmovilizarla.

La inmovilización nos permitirá mantener a los microorganismos viables y en la etapa de mayor actividad biológica, así como de mayor producción de fitohormonas.

Una vez realizada la inmovilización celular se efectuaron las pruebas necesarias para saber si los microorganismos perdieron actividad biológica después de dicho proceso.

Como paso final del proyecto se realizó una liofilización para estabilizar al microorganismo y obtener una presentación comercial del producto.

1. Introducción.

La agronomía es una de las actividades más ampliamente realizada no sólo en nuestro país, sino también en el mundo. Ésta se encarga de la producción de alimentos sin embargo, se ha vuelto insuficiente en los últimos años debido a la gran demanda de alimentos.

Uno de los problemas más comunes que la agronomía presenta es la falta de nutrientes en los cultivos, provocando la esterilidad de la tierra y por ende una baja productividad. Aunado a esto, la gran diversidad de plagas y enfermedades causadas por microorganismos patógenos que invaden los cultivos dificultando la obtención de productos agrícolas.

El ser humano para remediar dicho problema ha utilizado indiscriminadamente plaguicidas logrando el control parcial de las plagas y enfermedades en los cultivos, pero al mismo tiempo ha generado un desequilibrio ecológico ya que los agroquímicos se filtran en los suelos hasta llegar a los mantos acuíferos causando la contaminación de los mismos.

Es por esta razón que los abonos artificiales (agroquímicos), si bien aumentan por un tiempo los rendimientos, producen un cambio importante en las plantas, volviéndolas enfermizas y delicadas. Los investigadores han demostrado que el uso de biocontroles permiten reducir significativamente el número de plagas y enfermedades en los cultivos.

Por todas estas razones, se está empleando agentes biológicos para aumentar el número de microorganismos benéficos en el suelo, acelerando los procesos microbianos y aumentando la cantidad de nutrientes asimilables por la planta, y al mismo tiempo disminuyendo la cantidad de especies patógenas para la planta. Dichos microorganismos compiten entre sí por los nutrientes, entre éstos encontramos: bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios, favoreciendo la fijación de nutrientes en el suelo, sobre todo el nitrógeno.

En el presente trabajo se abordarán las investigaciones realizadas en torno al control biológico de los cultivos usando como base primordial algunos hongos filamentosos, dentro de los cuales podemos mencionar a los del género *Trichoderma*. Este tipo de

hongo produce antibióticos que impiden el crecimiento e inhibe el desarrollo de bacterias u hongos que compiten con él por los nutrientes. Las especies de *Trichoderma* que frecuentemente se utilizan para el control biológico, son las especies *harzianum* y *viride*. En el presente trabajo se utilizará la especie *harzianum*.

Otros de los hongos utilizados para el control de plagas y enfermedades de las plantas son aquéllos que pertenecen al género *Gibberella* (en este caso se trabajará con *Gibberella fujikuroi*). El cual es conocido por promover el crecimiento de los tallos a causa de la producción de giberelinas, que son un grupo de fitohormonas que aparte de promover el crecimiento revierten el enanismo, e inducen la floración y reducen el tiempo de desarrollo del cultivo (Halevy, 1985).

Se estudiará también un microorganismo del género *Azospirillum sp.*, el cual tiene la capacidad de fijar el nitrógeno, además de producir una serie de nutrientes que van a permitir a las plantas crecer y desarrollarse.

Por lo anterior se desea desarrollar un producto agronómico que reúna las características más importantes de los beneficios que los microorganismos mencionados proporcionan a las plantas para el control de plagas y aumento del crecimiento de las mismas.

DESARROLLO DE PRODUCTOS SIMILARES

- Centro de Biotecnología Genómica desarrolló un biofertilizante de *Azospirillum brasilense* con una fitohormona de crecimiento vegetal.
- Canná hecho a partir de *Trichoderma* cubre las raíces de las plantas con una capa protectora que proporcionan protección contra bacterias más peligrosas como *pythium*.
- PHC® Agarrón® es un regulador de crecimiento vegetal elaborado por bio fermentación de cepas seleccionadas del hongo *Gibberella fujikuroi*.

2. Antecedentes.

Es conocida la importancia de determinados microorganismos presentes en el suelo. Estos microorganismos (benéficos o patógenos) constituyen su parte viva y son los responsables de la dinámica de su transformación y desarrollo.

En la agricultura tradicional se alternaban las líneas de cultivo en el suelo, o bien se dejaba descansar la tierra durante un tiempo. Actualmente, en la agricultura intensiva, el suelo apenas está sin cultivo y se planta siempre en la misma línea de terreno; por lo anterior se degrada rápidamente.

Las razones anteriores nos hacen emplear el denominado "Biocontrol de plagas", que consiste en aumentar el número de microorganismos benéficos en el suelo para acelerar todos los procesos microbianos, aumentar la cantidad de nutrientes asimilables por la planta e inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos.

2.1 Biocontrol de plagas de plantas.

El biocontrol ayuda a una fertilización tradicional, reduciendo el uso de energía de la planta al momento de absorber los distintos nutrientes, disminuye la degradación del agroecosistema y compensa la pérdida de nutrientes del suelo por lixiviados, sobre todo de nitrógeno.

Estos microorganismos actúan a la vez como agentes de control biológico, con lo que se reducen aquellos microorganismos indeseables en el suelo y se favorecen los organismos útiles para los cultivos, mejorando de esta forma la producción de los cultivos.

Existen muchos hongos en el suelo que son benéficos para las plantas. Un hongo, está constituido por una serie de filamentos a los que se les denomina hifas. Al conjunto de hifas del hongo se le denomina micelio. Existen hongos llamados Micorrizas cuya función es proveer de nutrientes a la planta, principalmente fósforo y nitrógeno. Otro grupo de hongos tienen como función la protección de la raíz de la planta contra microorganismos patógenos, un ejemplo son los hongos del género *Trichoderma* que ayudan por diferentes

mecanismos (parasitismo, mico toxinas, competencia por alimento y espacio etc.), a combatir y controlar los principales hongos patógenos o indeseables.

Otros grupos de microorganismos son las bacterias que fijan el nitrógeno atmosférico (ejemplo: *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*), y las Algas (ejemplo: *Azolla*).

2.2 Biofertilización.

Los microorganismos del suelo son los componentes más importantes de éste, ya que constituyen su parte viva y son los responsables de la dinámica de transformación y desarrollo de los nutrientes del suelo y de los fertilizantes. En un sólo gramo de tierra podemos encontrar millones de microorganismos benéficos para los cultivos.

Dentro de los microorganismos benéficos tenemos: bacterias, hongos, algas y protozoarios. La “*Biofertilización*” se está empleado para aumentar el número de microorganismos benéficos para el suelo, acelerando así todos los procesos microbianos que aumentan la cantidad de nutrientes asimilables por los cultivos protegiéndolos contra las enfermedades, es decir, mejoran la fertilidad de un suelo.

Una Biofertilización correcta es compatible con una fertilización tradicional y ayuda reduciendo el uso de energía de la planta al absorber los distintos nutrientes, disminuye la degradación del agro-ecosistema y reduce la pérdida de nutrientes del suelo por lixiviados, sobre todo de nitrógeno como ya se mencionó. Por esta razón, día a día, el uso de biofertilizantes en sustitución de agroquímicos cobra mayor importancia.

2.3 Reguladores del crecimiento de plantas.

El uso de los reguladores de crecimiento de plantas es muy frecuente en nuestro país, principalmente en la floricultura, la cual destaca ampliamente a nivel internacional ya que el consumo de flores y plantas es elevado.

Se han generado nuevas tecnologías de producción de flores y plantas. Dentro de éstas: la aplicación de insumos químicos y, en particular, reguladores de crecimiento. Su aplicación práctica abarca el crecimiento y desarrollo total de la planta, y su uso ha

logrado iniciar, acelerar o inhibir una serie de procesos, modificando el crecimiento y elevando la calidad de la planta durante su propagación (Rudnicki, 1989).

Las principales aplicaciones comerciales de esta técnica en la floricultura son la micropropagación, la germinación de semillas, el cultivo de embriones, la producción de plantas libres de enfermedades (Havely, 1995).

Las auxinas sintéticas, como los ácidos indolbutírico y naftalenacético, son las más usadas por tratarse de compuestos relativamente estables e insensibles a la degradación del sistema enzimático natural de las plantas. Promoviendo el crecimiento de éstas por estimulación del alargamiento celular, y controlan el desarrollo de los brotes laterales mediante la dominancia apical, por lo que se han usado para inhibir el desarrollo de las yemas axilares en crisantemos.

Las citocininas intervienen fundamentalmente en la división celular, siendo el cultivo *in vitro* el proceso comercial más intenso. Retrasan la senescencia de la planta, ya que inhiben el amarillamiento de las hojas y mantienen el color verde del follaje (Halevy, 1985).

Uno de los reguladores de mayor consumo es el ácido giberélico (AG_3) y se utiliza para acelerar el crecimiento de la planta, incrementar la longitud de los tallos florales e inducir la floración, sobre todo en el cultivo de rosa, crisantemo y clavel, que son las especies de mayor producción nacional.

El ácido giberélico es una hormona que promueve el crecimiento al estimular la división y el alargamiento celular, utilizadas para inducir la floración y reducir el tiempo de desarrollo del cultivo. A bajas concentraciones inducen la elongación del tallo, así mismo sustituyen parcial o totalmente los requerimientos del frío de las plantas que requieren de vernalización (Halevy, 1985).

Los retardantes son compuestos orgánicos sintéticos que retrasan o inhiben la división y el alargamiento celular de los meristemos subapicales del tallo, regulando de esta manera la altura de las plantas sin provocar malformaciones. La mayoría de éstos se

consideran antigiberélicos, por inhibir la síntesis natural de giberelinas en las plantas. Se aplican generalmente en plantas de macetas (Rademacher, 1995).

Otro de los reguladores es el ácido salicílico (AS) el cual ha sido investigado con amplitud para aumentar la longevidad de las flores cortadas, por su capacidad de promover el cierre de estomas.

En la actualidad existen varias empresas que utilizan el cultivo *in vitro* para la propagación de sus especies. En su mayoría, emplean hormonas vegetales grado reactivo en las distintas etapas de desarrollo *in vitro* de las plantas (inducción, multiplicación y enraizamiento) Estos productos son importados, por lo que la técnica y las investigaciones derivadas del uso dependen en gran medida del exterior. Las hormonas de mayor empleo son las auxinas (IBA, ANA, AIA, y 2,4-D), las citocininas: (BA,K) y las giberelinas (AG₃).

2.4 Fijación de Nitrógeno en plantas por medio de microorganismos.

Se ha encontrado que algunas bacterias presentan una capacidad impresionante en la fijación biológica de nitrógeno libre y no simbiótico, beneficiando a la planta.

Estas bacterias elaboran una serie de metabolitos como vitaminas, enzimas y otros compuestos benéficos para la planta, que van a ser absorbidos por las raíces. Todos estos nutrientes estimulan el crecimiento y desarrollo de las plantas, aumentando la porosidad y capacidad de retención de nutrientes presentes en el suelo.

La mayor actividad de estos microorganismos se realiza desde la superficie del suelo, hasta unos 20 centímetros de profundidad. Sus colonias permanecen adheridas en las partículas del suelo y sobre las raíces de las plantas, ya que así les aportan sustancias orgánicas, que son utilizadas como alimento.

Por ejemplo, la bacteria denominada *Azospirillum* (*Spirillum lipoferum* reclasificada en 1973, por Peña-Cabriales y Dobereiner), realiza la fijación biológica del nitrógeno, es decir, transforma el nitrógeno molecular del suelo o la atmósfera, en nitrato o amonio.

Esta bacteria también solubiliza mejor el fósforo del suelo, por lo que cuando desciende la

temperatura y se producen las típicas pigmentaciones violetas en las hojas de los cultivos, con esta bacteria, el fósforo se encuentra más fácilmente asimilable por la planta.

2.5 *Trichoderma sp.*

Este género está clasificado dentro de la familia de los Mucedinaceos, es un hongo filamentosos. El modo de acción de esta especie de hongo está determinada por las actividades enzimáticas, la competencia por nutrientes, la antibiosis, el hiperparasitismo y la estimulación de defensas de la planta, teniendo un comportamiento saprofito. confiriéndole facultades de antagonismo contra hongos patógenos de plantas, producen diversas enzimas hidrolíticas y moléculas con actividad antibiótica que les permiten controlar la actividad de los parásitos microbianos de plantas.

El parasitismo directo no es el único método que tiene *Trichoderma* para invadir a otros hongos. También produce antibióticos que le permiten inhibir el desarrollo de otros hongos o bacterias, que compiten por nutrientes y espacio.

Trichoderma es un fungicida con un amplio espectro de acción. Es eficaz contra diversos organismos; tanto en el suelo contra pudriciones de raíces como *Armillaria*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phitophtora*, *Fusarium*, enfermedades que se presentan en numerosas especies tanto anuales como perennes; o bien, contra enfermedades de órganos aéreos como *Botritis* o *Stereum*.

Los hongos del género *Trichoderma sp.* producen diversas enzimas hidrolíticas y moléculas con actividad antibiótica que les permiten controlar biológicamente la actividad de los parásitos de plantas, este género está presente en casi todos los suelos agrícolas. Las especies de *Trichoderma* que frecuentemente se utilizan para el control biológico, son las especies *T. harzianum* y *T. viride*. De las cuales la primera ha sido de las más estudiadas.

Al colonizar desechos vegetales producen una infección primaria y gracias a los nutrientes de esos desechos, el patógeno logra contaminar los órganos sanos (saprofito). *Trichoderma harzianum* compete y coloniza más rápidamente los desechos vegetales y

retarda la instalación de otros hongos, produce también numerosos antibióticos como son: la trichodermina, suzukacilina, alimenticina, alameticina, dermadina, penicilina, los trichotecenos, las trichorzianimas, entre otros (Oliver J. y Germain R., 1983). Los antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático debilitando al agente patógeno y haciéndolo más sensible a los antibióticos solubles, lo que se conoce como un hiperparacitismo de origen enzimático.

Trichoderma manifiesta propiedades parasitarias contra diversos hongos, produciendo alteraciones en las hifas del huésped. Inicialmente realiza un reconocimiento y adherencia sobre la pared del patógeno. En segundo término, promueve la hidrólisis de las hifas del patógeno por medio de las enzimas producidas (xilinasas, quitinasas, pectinasas, glucanasas, celulasas, lipasas, proteasas, y glucosidasas entre otras).

La forma más común que tiene el *Trichoderma* de parasitar a otros hongos, es el parasitismo directo. Una vez que *Trichoderma* se ha enrollado alrededor de las hifas del huésped, secretando enzimas hidrolíticas que ayudan a disolver (degradar) la pared celular de las hifas del huésped, facilitando la inserción de estructuras especializadas y el micelio de *Trichoderma*, absorbiendo los nutrientes del interior del huésped. Al final el micelio del huésped queda vacío y con perforaciones, provocadas por la inserción de las estructuras especializadas de *Trichoderma*. Este proceso permite que *Trichoderma* penetre dentro huésped, degradando su contenido citoplasmático, utilizándolo parcialmente o totalmente como nutriente, este proceso es uno de los que realiza ante la presencia del género *Rhizoctonia*, el cual es un patógeno de raíces de tomate.

Se puede mencionar incluso, que este hongo es capaz de detectar la pared celular del microorganismo patógeno, y emitir un antibiótico específico para este.

Sin embargo, para lograr una competencia efectiva, es necesario que *Trichoderma* colonice el sustrato primero, o al mismo tiempo que el patógeno. La competencia a nivel del sistema radicular se produce por las secreciones de importantes cantidades de nutrientes de las raíces.

Es decir, este hongo desarrolla lo que se denomina “nicho ecológico”; ocupa el sitio físico,

y en el mismo se alimenta, se reproduce, etc., por lo que es muy difícil que otro hongo u otro organismo patógeno, pueda colonizar la misma porción de suelo.

Trichoderma es un hongo que crece relativamente rápido, con un micelio aéreo ligeramente algodonoso como se muestra en la Fig. 1, que desprende un ligero olor a coco. La reproducción se logra a través de abundante formación de conidias de color verde opaco y ocasionalmente blanco.

También se debe considerar la formación de clamidosporas, que corresponde a hifas (células del hongo) cuyas paredes son más gruesas de lo normal y pueden actuar como esporas. Las formulaciones comerciales de *Trichoderma* normalmente están hechas a base de esporas y/o clamidosporas, dependiendo de la forma de fabricación.

Este hongo tiene también una serie de efectos secundarios en el suelo. Emite vitaminas que absorbe la raíz, con lo que la planta crece más rápido y emite también gran cantidad de enzimas, que hacen que la raíz se alimente mejor. Estos efectos secundarios del hongo en suelo y raíces, se producen de forma simultánea con el ataque del hongo al patógeno.

Como ya se mencionó *Trichoderma harzianum* llega a desarrollar lo que se conoce como nicho ecológico alimentándose de los hongos que invade, en caso de que no tenga ningún hongo para alimentarse, requiere de una fuente de nitrógeno, fósforo, potasio y microelementos para alimentarse, mejora también la estructura del suelo.

Las fitoalexinas son producidas como respuesta a heridas. La cumarina actúa como una defensa de la planta contra patógenos. *Trichoderma harzianum*, induce altos niveles de fitoalexinas evita que otros hongos patógenos se establezcan, y controla diferentes enfermedades de plantas provocadas por hongos. Este hongo no es sistémico, es decir no entra en ningún momento dentro de la planta.

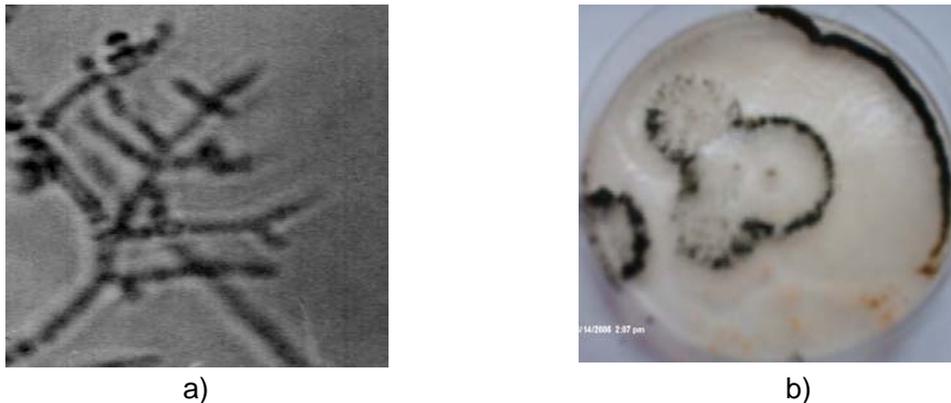


Fig. 1 Fotografía del hongo *Trichoderma harzianum*, a) observación microscópica con el objetivo de 40X mostrando los típicos esporangióforos en forma de cruz., y b) observación del crecimiento del hongo en medio de cultivo sólido.

2.6 *Gibberella fujikuroi*.

Otros hongos utilizados para el control de plagas son aquellos que pertenecen al género *Gibberella sp.*

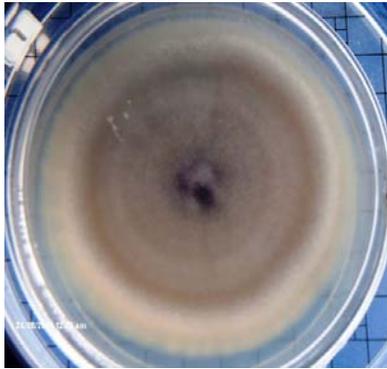
Este género es ampliamente utilizado para el control de enfermedades en las plantas, así como para revertir el enanismo en plantas superiores.

Además de que es uno de los microorganismos más usados para la producción de giberelinas (ácido giberélico), las cuales como ya se mencionó anteriormente son fitohormonas que regulan el crecimiento de plantas.

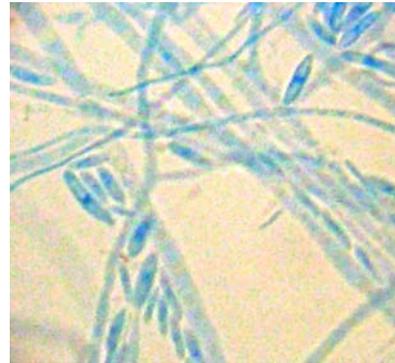
El ácido giberélico es un metabolito secundario, utilizado en plantas para el alargamiento del tallo, reversión del enanismo, inducción de la floración, etc.

Dentro de este género encontramos a la especie *G. fujikuroi*, la cual es la más utilizada a nivel industrial para la producción de ácido giberélico. Este hongo filamentoso presenta un aspecto algodonoso, inicialmente las colonias presentan un color blanco el cual cambia a un color morado, principalmente en el centro, como se muestra en la Fig. 2.

A pesar de que este hongo crece a temperaturas menores a la ambiental, éste tiene una temperatura óptima de crecimiento de 32 °C.



a)



b)

Fig. 2.- Fotografía del hongo *Gibberella fujikuroi* a) Colonia en caja de Petri, en medio de cultivo sólido; b) Observación microscópica del hongo tomada con el objetivo de 40X.

2.7 *Azospirillum*.

El género *Azospirillum* sp., pertenece al grupo de las denominadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Actualmente son reconocidas seis especies en el género *Azospirillum*. sp. (Tarrand, 1978). Las dos primeras en ser descritas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense*, siendo éstas las más estudiadas. Posteriormente se describieron las especies *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense* y *A. largomobile* siendo el nombre de esta especie corregido a *A. largimobile*. Pocos años antes esta especie fue considerada como un sinónimo de la especie *A. lipoferum*. Recientemente, en honor de quien impulsará los estudios con este género bacteriano y descubriera otros diazótrofos, se ha propuesto la especie *A. doebereinae*.

Pocos años después del redescubrimiento de *Azospirillum* y hasta alrededor de 1993, este género fue el más estudiado entre las bacterias asociadas a plantas, considerado como uno de los microorganismos benéficos. La capacidad de *Azospirillum* para estimular el crecimiento de las plantas y de aumentar el rendimiento de los cereales promovió numerosos estudios sobre la ecología, fisiología y genética de esta bacteria. En la actualidad su uso comercial comienza a extenderse en diferentes países, incluido México.

Esta bacteria es aislada a partir de suelo rizosférico o de superficie de raíces (rizoplasma) de numerosas plantas. También se le aísla del interior de las raíces o tallos de algunas plantas.

Azospirillum tiene la capacidad de producir auxinas, citocininas y giberelinas en medios de cultivo (Horemans, 1986). No obstante, el mecanismo analizado con mayor amplitud ha sido la producción de auxinas, especialmente la del ácido indolacético (AIA). El AIA producido por las bacterias puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas conduciendo a la estimulación del crecimiento de las mismas (Bar, T., and Y. Okon 1992).

En cultivos de *Azospirillum*, además de AIA se han encontrado otros compuestos indólicos y metabolitos relacionados tales como el ácido indol pirúvico, indol láctico, indol acetamida, indol acetaldehído, indol etanol e indol metanol, triptamina, antranilato y otros compuestos indólicos no identificados. En diferentes estudios se ha tratado de obtener mutantes incapaces de sintetizar AIA, sin embargo, en el mejor de los casos solamente se logró obtener mutantes hipoproductoras de este compuesto. Esto sugirió la existencia de más de una vía biosintética del AIA en *Azospirillum*. Actualmente se conoce que *Azospirillum* puede sintetizar AIA a través de tres vías. En tanto que las vías del ácido indol pirúvico y la del indol acetamida son dependientes del triptófano, la tercera es una vía independiente de este aminoácido, desconociéndose el precursor del AIA. Resultados recientes permiten sugerir que la indol piruvato descarboxilasa es una enzima común tanto a la vía del indol pirúvico como a la vía no dependiente de triptófano.

En México la aplicación de esta bacteria en diferentes cultivos ha rebasado con mucho lo hecho en otros países.

2.8 Inmovilización celular.

La inmovilización celular se puede definir como un sistema que restringe el movimiento libre de las células. En otras palabras la inmovilización de células es la unión o su incorporación en un sistema de fase sólida específica que permite la estabilización de las funciones biológicas de los microorganismos ya que permite el intercambio de sustratos, productos, inhibidores, etc. Pero, al mismo tiempo, separa la biomasa celular catalítica de la fase que contiene los sustratos y productos.

La tecnología de inmovilización celular disminuye la mayoría de los problemas que plantea la fermentación utilizando células libres. Este sistema tiene la ventaja de poder manejar la densidad celular, previa al inicio de la fermentación. Además, facilita el sistema de operación del proceso de fermentación continua, evitando el paso de eliminar las células del fermentador. La inmovilización celular acopla el crecimiento microbiano de los procesos metabólicos de interés industrial. Es así, que diversos grupos de investigación han empleado este sistema de células inmovilizadas para la obtención de varios productos de interés industrial, como el tratamiento de desechos de residuos líquidos y sólidos.

Las células inmovilizadas tienen ciertas ventajas como la estabilización de las funciones biológicas ya que permite la intensificación del proceso. Otra ventaja muy importante es la retención de los microorganismos en la fase de crecimiento de mayor interés. Un aspecto que debe tomarse en cuenta es la consistencia del soporte a utilizar, ya que este debe de ser suave para que permita la viabilidad celular, la integridad de la membrana o la actividad.

Existe varios métodos para inmovilizar, los cuales podemos clasificar en dos grupos fundamentales: el que requiere de la reacción química entre las células y el material de soporte para formar una unión covalente, y el método que atrapa o encierra a la célula sin que se produzca una reacción química.

2.9 Liofilización.

La liofilización consiste en eliminar el agua de las células mediante el cambio de estado del agua de sólido a gas provocado por bajas temperaturas en condiciones de vacío: se congela una solución acuosa de la sustancia química que se desea liofilizar y, a esa baja temperatura que impide cambios químicos de deterioro, se le somete a un alto vacío para evaporar el agua por sublimación (pasar el agua del estado sólido al estado gaseoso, sin pasar por el estado líquido). Es una forma de secar un producto químico o biológico a temperaturas bajas sin el deterioro que produciría el calentamiento.

La liofilización es ampliamente usada para la conservación de plasma sanguíneo, conservación de los microorganismos en las diferentes fases del crecimiento, productos alimenticios: detiene el crecimiento de microorganismos (hongos, moho, etc.), inhibe el deterioro de sabor y color por reacciones químicas, pérdida de propiedades fisiológicas y facilita el almacenamiento y la distribución.

Es una técnica bastante costosa y lenta si se le compara con los métodos tradicionales de secado, pero resulta en un mayor rendimiento y en productos de mayor calidad, ya que al no emplear calor, evita en gran medida las pérdidas nutricionales y organolépticas.

2.10 Método combinado para estabilizar las funciones biológicas de los microorganismos

Combinando el método de inmovilización con el método de liofilización se logra obtener un producto más estable que solo empleando uno de estos, ya que las células inmovilizadas se conservan en la fase de crecimiento de nuestro interés para su uso en la agricultura, ya que al rehidratarse, las células volverán a tener actividad biológica, independientemente de que la estructura final de este producto utilizando ambas técnicas, resulta ser la más adecuada para su uso.

2.11 Productos de interés agronómico similares

Actualmente se comercializan biofertilizantes elaborados a partir de los microorganismos con los que se trabajó pero ninguno en forma conjunta por lo que este proyecto es innovador, alguno de estos productos son:

- Centro de Biotecnología Genómica desarrolló un biofertilizante de *Azospirillum brasilense* con una fitohormona de crecimiento vegetal.
- Canná hecho a partir de *Trichoderma* cubre las raíces de las plantas con una capa protectora que proporcionan protección contra bacterias más peligrosas como *pythium*.
- PHC® Agarrón® es un regulador de crecimiento vegetal elaborado por biofermentación de cepas seleccionadas del hongo *Gibberella fujikuroi*.

3. Justificación.

La agronomía es una actividad de suma importancia, ya que es ella quien provee al ser humano de los alimentos necesarios. Sin embargo la creciente demanda de los alimentos debido al aumento de población, el uso indiscriminado de agroquímicos, las plagas y enfermedades en los cultivos, han generado un déficit de nutrientes en los cultivos, así como la contaminación de los mantos acuíferos, razones por las cuales los investigadores han buscado nuevas alternativas, entre las cuales han utilizando el biocontrol para solucionar dicho problema de una manera eficaz, barata y que no resulte perjudicial para el medio ambiente.

La necesidad de desarrollar un producto que favorezca el crecimiento y desarrollo de las plantas tiene una aplicación de suma importancia en el sector agrícola.

Se ha demostrado que estos biofertilizantes no solo proporcionan los nutrientes necesarios para las plantas, sino también se utilizan como control biológico de plagas y enfermedades, remediando de esta manera los problemas ya mencionados. De lo contrario, se genera una pérdida considerable de alimentos, y por ende, pérdidas económicas.

Este proyecto tiene como finalidad el estudio de aquellos microorganismos benéficos para el suelo, y a partir de éstos elaborar un producto de interés agronómico que resulte efectivo y barato.

4. Objetivos.

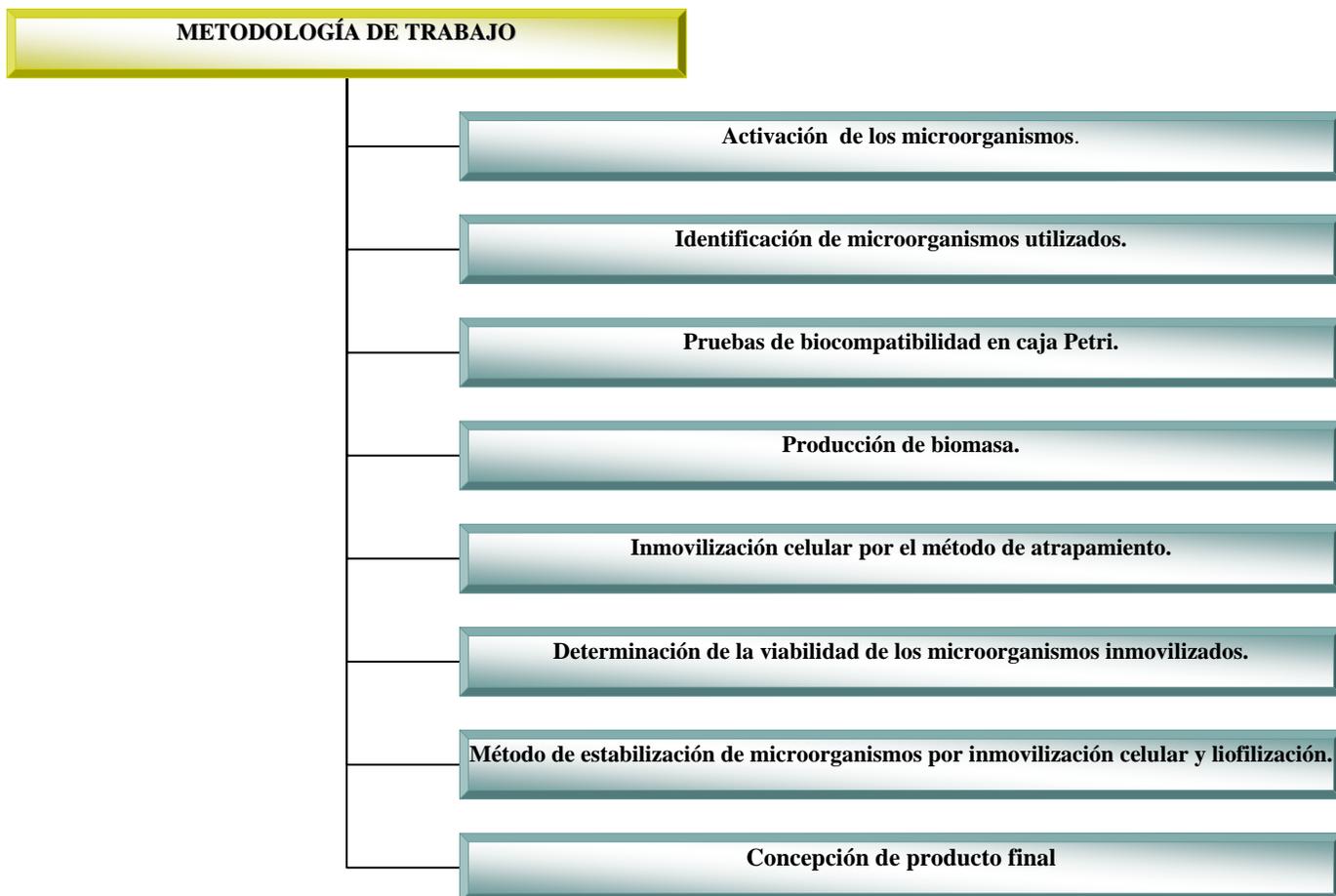
4.1 Objetivo general:

Desarrollar un producto bioactivo para el control biológico de plagas y la estimulación del crecimiento de plantas con aplicación en agronomía.

4.2 Objetivos específicos:

1. Determinar la biocompatibilidad de los hongos *Trichoderma harzianum* y *Gibberella fujikuroi* y la bacteria *Azospirillum brasilense*.
2. Desarrollar medios de cultivo específicos por el crecimiento en conjunto y de forma individual de los microorganismos involucrados en el proyecto.
3. Evaluar la viabilidad de los microorganismos *Trichoderma harzianum*, *Gibberella fujikuroi* y *Azospirillum brasilense* inmovilizados por el método de atrapamiento.
4. Concebir un producto de interés agronómico para el biocontrol de plagas en las plantas y la estimulación del crecimiento de éstas.

5. Diagrama experimental.



6. Metodología.

6.1 Activación de los microorganismos.

Microorganismos utilizados en el presente proyecto dentro de lo que se encuentran dos cepas de *Gibberella fujikuroi* (NRRL 2278 y NRRL 2284), una de *Trichoderma harzianum* y una bacteria de *Azospirillum brasilense* los cuales fueron reactivados colocándolos en medio de cultivo líquido de Caldo Nutritivo (CN).

Para el caso de los hongos *Trichoderma harzianum* y *Gibberella fujikuroi*, se sembraron en cajas de Petri en medios sólidos (Agar Nutritivo (AN) y, Agar Papa y Dextrosa (PDA)), las cuales fueron incubadas a diferentes temperaturas durante 7 días, para determinar la temperatura óptima de crecimiento.

En el caso de *Azospirillum brasilense*, una vez que creció en medio de cultivo líquido, se sembró en Agar Nutritivo (AN), colocándolas, al igual que los hongos, a diferentes temperaturas, el tiempo de incubación fue de 48h.

Estas cepas se tienen que sembrar por lo menos cada tres meses, de lo contrario la viabilidad de dichos microorganismos se pierde.

6.2 Identificación de microorganismos utilizados.

Para poder identificar a los microorganismos con los que se trabajó se determinó su morfología microscópica y la morfología colonial.

6.3 Identificación microscópica de hongos.

- En un portaobjetos limpio se coloca una gota del colorante azul de algodón.
- Tomar con el asa micológica estéril una muestra de la colonia del hongo y colocarla sobre el colorante.
- Colocar un cubreobjetos sobre la preparación, sellar con barniz de uñas y esperar a que seque.
- Observar al microscopio con los objetivos de 10X y 40X.
- Realizar las anotaciones necesarias.

6.4 Identificación de hongos por la técnica de Ridell (Microcultivo).

- Cortar cuadros de PDA de una caja de Petri de 1cm de lado y 3mm de espesor con un bisturí estéril y caliente.
- Colocar el cuadro de PDA en un portaobjetos que se encuentra sobre una varilla de vidrio doblada en forma de V en una caja de Petri (previamente esterilizada).
- Tomar con el asa el inóculo del hongo previamente seleccionado.
- Inocular por picadura en cada uno de los lados del cuadro de agar.
- colocar sobre el agar un cubreobjetos y se presiona ligeramente para que se adhiera al medio.
- Adicionar 5 mL de glicerol al 10% en la caja de Petri.
- Incubar a 28°C durante 48h.
- Realizar observaciones cada 12h para identificar los cuerpos fructíferos.
- Si el hongo ya se ha desarrollado y se puede identificar, se quita el glicerol con una pipeta Pasteur.
- Adicionar 5 mL de formaldehído al 10% durante 10min para inactivar el hongo.
- Desprender con cuidado el cubreobjetos que se encuentra sobre el cuadro de agar y colocarlo sobre un portaobjetos que contenga una gota de azul de algodón, sellar la preparación con barniz de uñas transparente.
- Observar las preparaciones al microscopio con los objetivos de 10X y 40X.

6.5 Identificación microscópica de bacterias con la técnica de tinción de Gram.

- Se lleva a cabo la preparación de un frotis:
 - ❖ Se coloca una gota de agua sobre el portaobjetos previamente limpio.
 - ❖ Se toma una muestra del cultivo a identificar, se coloca sobre la gota de agua y se mezcla extendiéndola para obtener una película delgada.
 - ❖ Se deja secar el frotis a temperatura ambiente.
 - ❖ Fijar el frotis con calor (pasándolo rápidamente por la flama del mechero de 2 a 3 veces).
 - ❖ Dejar enfriar el portaobjetos antes de teñir.

- Cubrir el frotis con cristal violeta (colorante primario) durante 1min.
- Lavar el frotis con agua para eliminar el exceso de colorante.
- Cubrir el frotis con Lugol (mordente) durante 1min.
- Lavar nuevamente el frotis.
- Colocar alcohol-acetona (de colorante), durante 30seg.
- Lavar inmediatamente con agua.
- Cubrir el frotis con safranina (colorante secundario) durante 1min.
- Lavar el frotis con agua.
- Dejar secar el frotis, colocarle una gota de aceite de inmersión y observarlo al microscopio con el objetivo de 100X.

6.6 Identificación macroscópica de bacterias.

- Para llevar a cabo la identificación colonial de bacterias es necesario realizar primero un aislamiento de colonias.
 - ❖ Técnica de estría cruzada.
 - Se esteriliza el asa bacteriológica y se toma una muestra (realizar diluciones previas), se desliza el inóculo sobre el medio de cultivo procurando no romper el agar.
 - Quemar y enfriar el asa antes de realizar otro estriado.
 - Terminado el estriado se incuba la caja a la temperatura deseada.
- Una vez aisladas las colonias se observan las características de éstas (diámetro, aspecto, color, forma, elevación, superficie, borde, consistencia, luz reflejada, luz transmitida).

6.7 Pruebas de biocompatibilidad en caja Petri.

- Para llevar a cabo las pruebas de biocompatibilidad se sembraron los diferentes microorganismos, en la misma caja Petri.
- Se incubaron a la temperatura de 30°C, durante 2 semanas.
- Se observaron cada 24h.

6.8 Determinación de biomasa.

Se realizaron cinéticas de crecimiento para determinar la velocidad máxima de crecimiento. Para ello se tomaron muestras de 10mL (en el caso de la bacteria cada 2h y en el caso de los hongos cada 24h), en el caso de los hongos se centrifugaron las muestras a 15000 rpm durante 30min y se recuperó el precipitado, y se determinó la cuantificación de biomasa por peso seco.

- Se pesaron membranas de papel de nitrocelulosa con un poro de 0.45 μm y se colocaron en un Sweenex.
- Se pasó la muestra por el Sweenex y por filtración se separó la biomasa.
- Se colocó la membrana durante 24h en el desecador para mantenerlo a peso constante y se procedió a pesar la membrana.
- Se realizó la diferencia de estos dos pesos para determinar la biomasa.

6.9 Técnica de inmovilización celular por atrapamiento.

Para poder llevar a cabo la inmovilización por atrapamiento se realizaron los siguientes pasos.

- Se montó el sistema para inmovilización. (Fig. 19)
- El medio de cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 15min. a 4°C para el caso de la *Azospirillum brasilense* y a 15000 rpm durante 30 min. a 4°C para el caso de *Trichoderma harzianum* y *Gibberella fujikuroi*.
- Se recupera el precipitado por decantación, y se obtiene la biomasa.
- Se coloca el precipitado en un matraz con alginato al 2% se mezcla, con ayuda de un agitador magnético.
- Se coloca el capilar en la mezcla el cual con ayuda de una bomba peristáltica succiona la mezcla.
- La suspensión es goteada a través de una aguja hacia una solución de CaCl_2 0.3M, en donde al entrar en contacto el alginato con los iones de calcio gelifica formando las esferas. Tanto esta solución como la de la mezcla deberán estar en agitación constante. (Fig. 19)

- Una vez terminada la formación de esferas es necesario que éstas permanezcan reposando en dicha solución, durante aproximadamente 20min (Durán, 1997).
- Después de transcurrido el tiempo de reposo se lavarán con agua estéril para eliminar los residuos de CaCl_2 .
- Se almacena en tubos limpios y estériles.

6.10 Determinación de la viabilidad de los microorganismos inmovilizados.

Para determinar la viabilidad de los microorganismos después de la inmovilización es necesario primero determinar cuantas esferas equivalen a 1mL del gel, para ello se cuenta la cantidad de esferas que resultan en un volumen determinado; el nuestro se trabajó con 30mL y se dividió entre 30 para determinar cuántas esferas representan un mililitro de gel.

Se colocaron las esferas equivalentes a 1mL en un tubo que contiene solución de citrato de sodio 0.1M y se agitó con ayuda del vórtex, se colocan en un baño de agua caliente que se encuentra a una temperatura de 40°C , se agitan constantemente para disolver el gel y liberar de esta manera a los microorganismos, que estaban inmovilizados.

De las esferas disueltas se realizaron diluciones 10^{-5} y 10^{-6} para sembrar por duplicado y determinar la viabilidad de los microorganismos después de la inmovilización (para el caso de hongos solo se realiza para observar crecimiento ya que no se puede hacer un conteo de unidades formadoras de colonias).

Las esferas obtenidas en la inmovilización se colocaron en los diferentes medios líquidos, para realizar cinéticas de crecimiento tomando como muestras las esferas equivalentes a 1mL. Se filtraron y se determinó la biomasa por peso seco.

6.11 Técnica de estabilización y mantenimiento de los microorganismos (paso final para la elaboración de un biofertilizante).

Para la presentación final del producto se realizó una liofilización, para ello se congeló la muestra de los microorganismos inmovilizados, una vez congelados se colocó en la cámara de vacío (en la liofilizadora), para evaporar el agua existente en la muestra. Mediante diversos ciclos de congelación- evaporación se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original.

Se colocó la muestra inmovilizada en tubos falcon de 50mL estériles, se procedió posteriormente a colocar en el congelador los microorganismos inmovilizados a una temperatura de -37°C durante 24h, pasado este tiempo se colocó la muestra en la liofilizadora durante 24h, obteniendo un producto final en polvo.

7. Resultados y discusión.

Activación de los microorganismos.

Se trabajó con cuatro diferentes cepas, dos de las cuales pertenecen al hongo *Gibberella fujikuroi* de la colección del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica, clasificadas como: NRRL-2278 y NRRL-2284. Otra cepa perteneciente al hongo *Trichoderma harzianum* fue proporcionada de la colección del Laboratorio de Bioconverciones de la UPIBI.

Como ya se mencionó se trabajó con una bacteria de *Azospirillum brasilense* cepa Sp7 obtenida del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional.

Se sembraron las cepas proporcionadas en un medio de cultivo líquido rico en nutrientes (caldo de cultivo (CN)), para reactivar a los microorganismos, variando al mismo tiempo la temperatura (ver Tabla 1 y Fig, 3). Observándose en el caso de la bacteria un crecimiento a las 48h, y en el caso de los hongos se observó poco crecimiento a los 4 días de sembrarse siendo a los 10 días cuando se llevó a cabo un crecimiento mayor. La temperatura óptima de crecimiento fue de 30° C, ya que es en ésta donde se encuentra mayor cantidad de biomasa. Posteriormente se sembraron en medio de cultivo sólido Agar Nutritivo (AN), para confirmar la reactivación de los microorganismos, y al mismo tiempo observar su morfología colonial.

Posteriormente se emplearon distintos medios de cultivos sólidos (Agar Papa y Dextrosa (PDA), Agar Rosa de Bengala (ARB) y Agar de Dextrosa Sabouraud (ADS)), esto se realizó con la finalidad de observar cuál de estos medios proporciona los nutrientes más adecuados para el crecimiento del microorganismo.



Fig. 3 Reactivación de los microorganismos en medio de cultivo líquido (CN) y medio de cultivo sólido AN, PDA, ARB, ADS.

Tabla 1 Efecto de la variación de la temperatura en el crecimiento de los microorganismos, en medio de cultivo líquido (CN).

Temperatura. (°C)	<i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL- 2278	<i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL-2284	<i>Trichoderma harzianum.</i>	<i>Azospirillum brasiliense</i>
25	+	+	+	+
28	+	+	++	++
30	+++	+++	+++	+++
31	+++	+++	+++	
34	+	+	+	++
37	+	+	+	++

El efecto de la temperatura es uno de los parámetros más importantes que se deben tomar en cuenta, ya que cada uno de los diferentes microorganismos crecen en un intervalo restringido de temperaturas. Como se puede observar en la tabla anterior los microorganismos con los que se trabajó pueden crecer en un rango de temperaturas menores a la ambiental y mayores a 35 °C, tomando en cuenta que se obtuvo mayor cantidad de biomasa a la temperatura de 30°C.

Identificación de microorganismos utilizados.

Se realizaron tinciones con azul de algodón y microcultivos para la identificación morfológica tanto colonial como microscópica de cada uno de los hongos con los que se trabajó Fig. 4b y 4c, comprobando que se trataba de *Trichoderma harzianum* y *Gibberella fujikuroi*.

Para el caso de la bacteria, se realizó la Técnica de Tinción de Gram, dando como resultado (bacilos cortos Gram -), en Fig. 4a

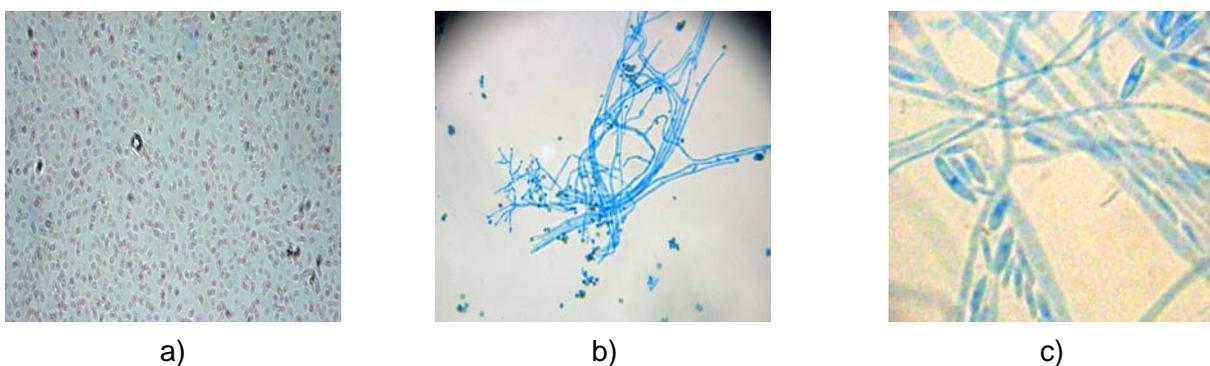


Fig.4 Fotografía microscópica de a) *Azospirillum brasilense*, observada con el objetivo de 100X, b) *Trichoderma harzianum* y c) *Gibberella fujikuroi* observadas con el objetivo de 40X.

Las características microscópicas y macroscópicas de los microorganismos, observadas se resumen en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Morfología macroscópica de los hongos, observada en medio de cultivo sólido.

Características	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL 2284	<i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL 2278
Tamaño (cm)	3.5	5.7	3.3
Color	Verde	Morado	Cremita
Aspecto	Filamentosa lacerada	Filamentosa aterciopelado	Algodonosa

Tabla 3. Morfología colonial de *Azospirillum brasilense*.

Características	Bacteria: <i>Azospirillum brasilense</i> .
Tamaño (mm)	0.5-2
Forma	Circular
Elevación	Convexa
Borde	Entero
Color	Amarillo
Superficie	Lisa
Aspecto	Húmedo
Consistencia	Suave
Luz reflejada	Mate
Luz transmitida	Translucidas

Como ya se mencionó anteriormente, después de activar a los microorganismos y de determinar su morfología, se sembraron en medio sólido para determinar el medio en el que crecían mejor. Utilizándose AN, PDA, ARB y ADS, también se realizaron mezclas de los cultivos.

Dentro de nuestros resultados, mostrados en la Fig. 5, se tiene el crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* en los medios AN y PDA donde se puede observar que hay un mayor crecimiento del hongo en el medio PDA, además del color y aspecto de las colonias, ya que es en este medio donde se encuentra el hongo esporulando.

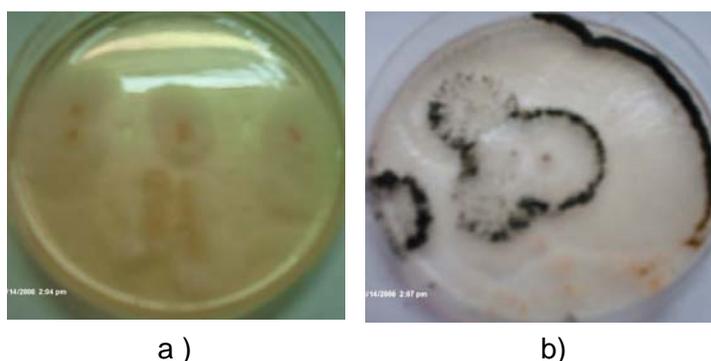


Fig. 5 Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en diferentes medios; a) medio AN y b) medio PDA.

En el caso de *Gibberella fujikuroi*, al igual que a *Trichoderma* se sembraron en los medios AN y PDA, se observó que hay un mayor crecimiento del hongo en el medio AN, ya que las colonias presentaban un diámetro mayor que en PDA además de que el color de la colonia cambia para este caso, tal y como se muestra en la Fig.6.



a)

b)

c)

Fig. 6 Crecimiento de *Gibberella fujikuroi* en diferentes medios; a) cepa NRRL-2284 en el medio AN, b) cepa NRRL-2278 en el medio AN y c) cepa NRRL-2278 en el medio PDA.

Otra de las pruebas que se realizaron fue la de mezclar medios de cultivo sintéticos e inocularlos para determinar en donde se obtiene el mejor crecimiento. La primera mezcla (medio mixto 1 (MM1)) fue entre AN y PDA, acidificando algunas cajas con ácido tartárico se observó que para el caso de *Gibberella fujikuroi* en ambas cepas crece mejor en el medio sin acidificar. Como se muestra en las figuras. 7 y 8 se puede apreciar la morfología de éste hongo.



a)

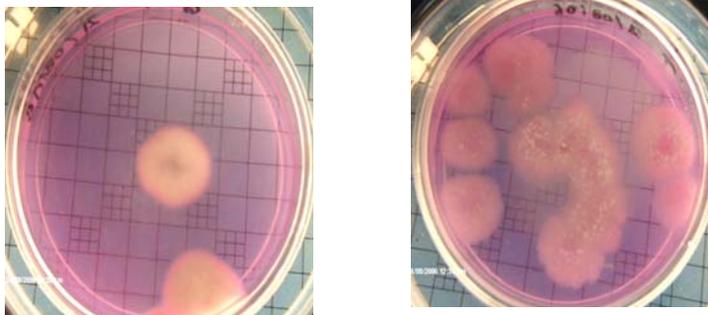
b)

Fig.7 Crecimiento de *Gibberella fujikuroi* cepa NRRL-2284 en MM1, a) acidificado con 0.25mL de ácido tartárico y b) sin acidificar.



Fig.8 Crecimiento de *Gibberella fujikuroi* cepa NRRL-2278 en MM1 acidificado con 0.25mL de ácido tartárico.

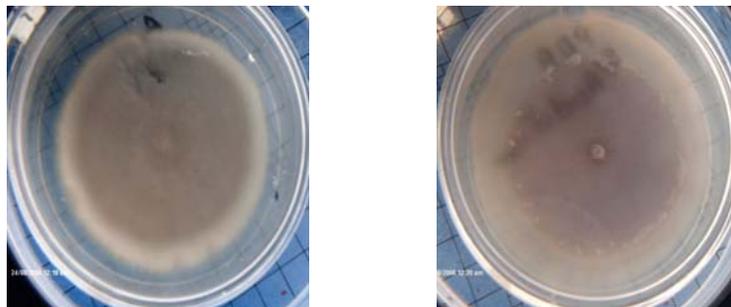
A pesar de que el medio ARB es específico para hongos se muestra en la Fig. 9 que el crecimiento de los hongos tratados es diferente, esto se vio ya que *Trichoderma harzianum* presenta menor crecimiento que *Gibberella fujikuroi*. En las figuras 10 se muestra como crecen los microorganismos en los medios AN y PDA, siendo estos los mejores medios de cultivo.



a)

b)

Fig. 9 a) Crecimiento de *Gibberella fujikuroi* en el medio ARB, en el centro se encuentra la cepa NRRL-2284 y en la orilla la NRRL-2278, y b) Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en ARB.



a)

b)

Fig. 10 Crecimiento de *Gibberella fujikuroi* en diferentes medios; a) cepa NRRL-2284 en el medio AN, y b) cepa NRRL-2284 en el medio PDA sin acidificar.

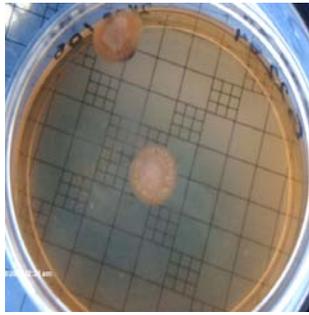


Fig. 11 Crecimiento de *Gibberella fujikuroi* en el medio ADS, en el centro se encuentra la cepa NRRL-2284 y en la orilla la NRRL-2278.

Se realizaron mezclas de medios sintéticos para el crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum*, los resultados obtenidos se muestra en las figuras (13, 14), en las cuales podemos observar que este microorganismo crece mejor en el medio MM1 con respecto a los demás medios de cultivo, quedando en segundo lugar el medio ADS (ver fig. 11 y 12), el medio MM2 (mezcla de PDA y ADS) resultó ser el menos efectivo.

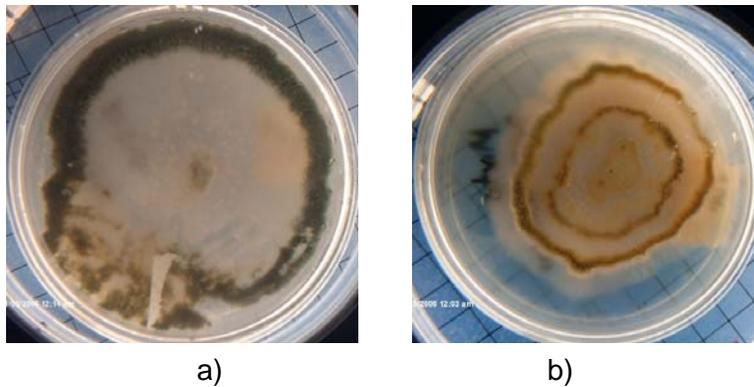


Fig.12 Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en MM1 a) acidificado con 0.25mL de ácido tartárico y b) sin acidificar.

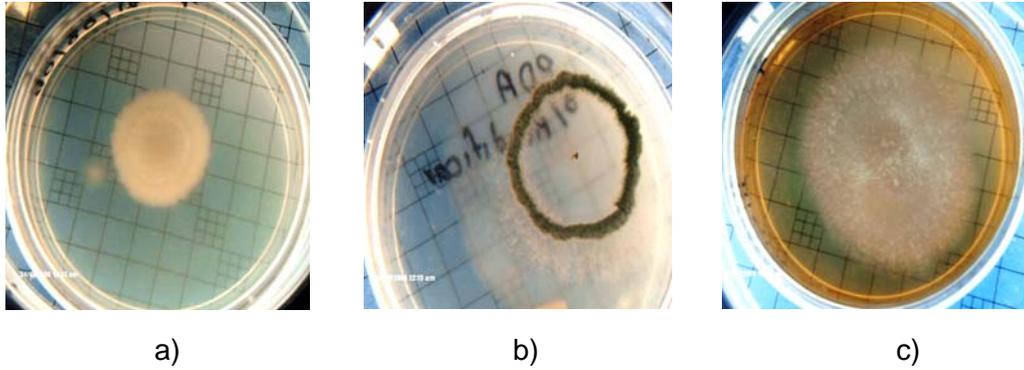


Fig.13 Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en: a) MM2, b) medio PDA sin acidificar, y c) medio ADS.

Azospirillum brasilense, sin embargo, crece muy bien en el medio AN, en el cual presenta colonias de diferentes diámetros, en la Fig. 14 se muestra el medio en el que se encontraba la bacteria antes de resembrarla en caldo nutritivo.



Fig.14 Crecimiento de *Azospirillum brasilense* en el medio rojo congo.

Pruebas de biocompatibilidad en caja de Petri.

Se observó que *Trichoderma harzianum* empieza a invadir a *Gibberella fujikuroi* después de un tiempo aproximado de tres semanas (ver fig.15), sin embargo al realizar las pruebas de viabilidad se comprobó que *Gibberella* no se inactiva, por lo que solo es invadido pero no atacado, comprobándose así la biocompatibilidad de los hongos. Lo que significa que presenta lo que se conoce como tolerancia biológica. Esto indica que los dos hongos son compatibles.

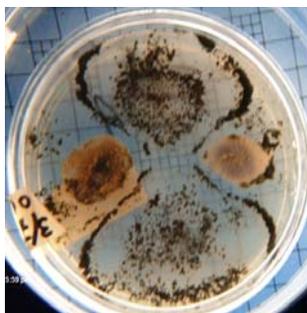


Fig.15 Pruebas de biocompatibilidad de los hongos *Trichoderma harzianum*, *Gibberella fujikuroi* y *Azospirillum* en el medio de cultivo AN.

Posteriormente se realizó el sembrado de los tres microorganismos donde *Azospirillum* creció más rápidamente, cuando los hongos crecieron aparentemente invadieron a esta sin embargo después de realizar pruebas de viabilidad se comprobó que no se inactiva, por lo que solo es invadido pero no atacado, comprobándose así la biocompatibilidad de los microorganismos.

Otra de las pruebas para determinar la biocompatibilidad de los microorganismos fue variando las condiciones del medio, acidificando el medio AN con ácido tartárico, observándose que *Gibberella fujikuroi* crece más rápido que *Trichoderma harzianum* (ver fig.16).



a)



b)

Fig.16 Pruebas de biocompatibilidad de los hongos *Trichoderma harzianum* y *Gibberella fujikuroi* en el medio de cultivo AN acidificado. Obsérvese que los microorganismos no se inhiben entre sí.

Los medios mixtos se acidificaron también para determinar el comportamiento de los microorganismos. En el caso del MM1 sin acidificar podemos observar que *Gibberella fujikuroi* crece más que *Trichoderma harzianum*, sin embargo en el medio acidificado se observó crecimiento, como se muestra en la Fig.17, se puede observar que existe compatibilidad entre ellos.

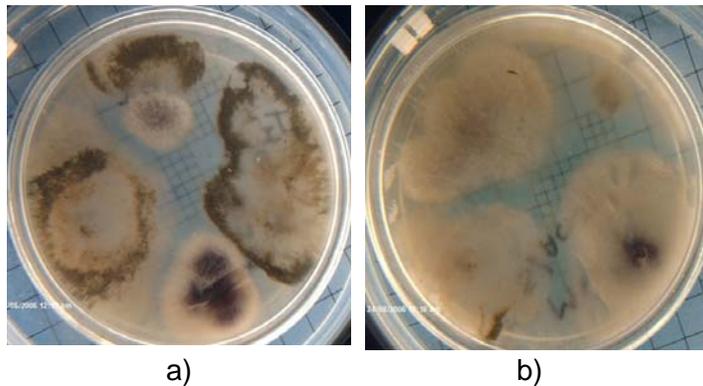


Fig.17 Pruebas de biocompatibilidad de los hongos *Trichoderma harzianum* y *Gibberella fujikuroi* en el medio MM1; a) acidificado, y b) sin acidificar

Ocurre lo mismo para el caso de la bacteria ya que ambos hongos la invaden pero no la inactiva, esto queda demostrado con las pruebas de viabilidad que se le realizaron.

Diseño del medio de cultivo.

Se hicieron a crecer los microorganismos en diferentes medios diseñados para seleccionar, en base al crecimiento microbiano, el medio ideal para realizar la producción a gran escala. En la siguiente figura (18) se pueden observar los diferentes medios diseñados.

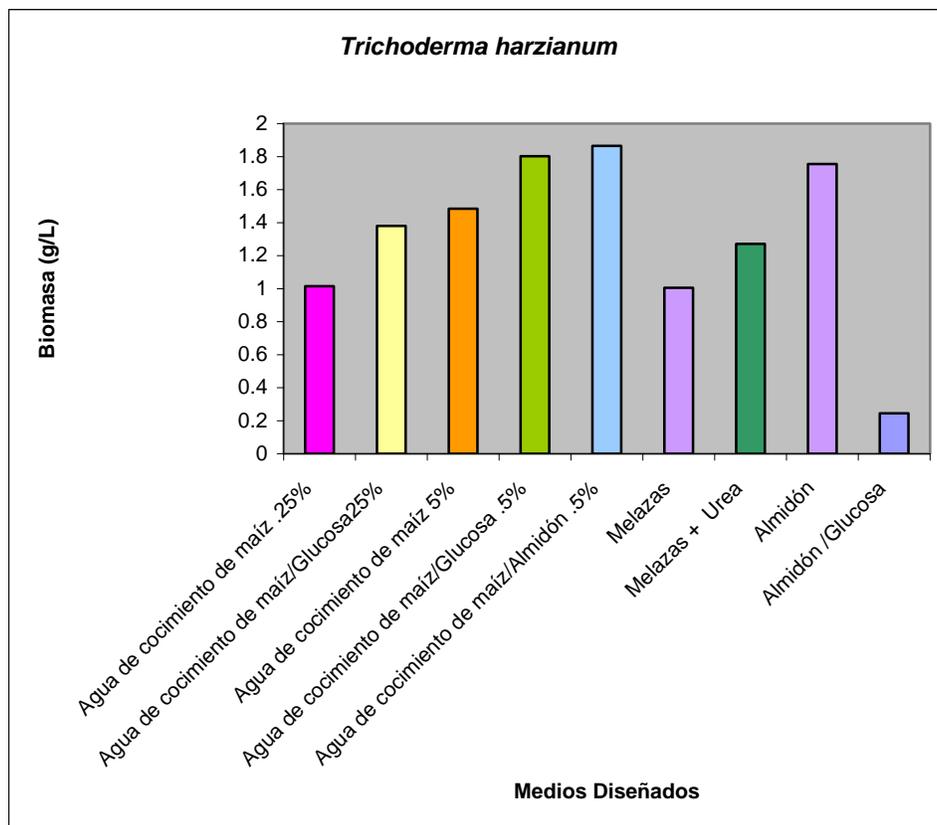


Fig. 18 Medios de cultivo diseñados, utilizados para la selección del medio ideal para el crecimiento de los microorganismos.

Para seleccionar el medio ideal, se determinó la biomasa obtenida por cada microorganismo en los diferentes medios por peso seco. Ver gráficas (1-4).

Tabla 4. Biomasa obtenida de *Trichoderma harzianum*, en los diferentes medios de cultivo diseñados.

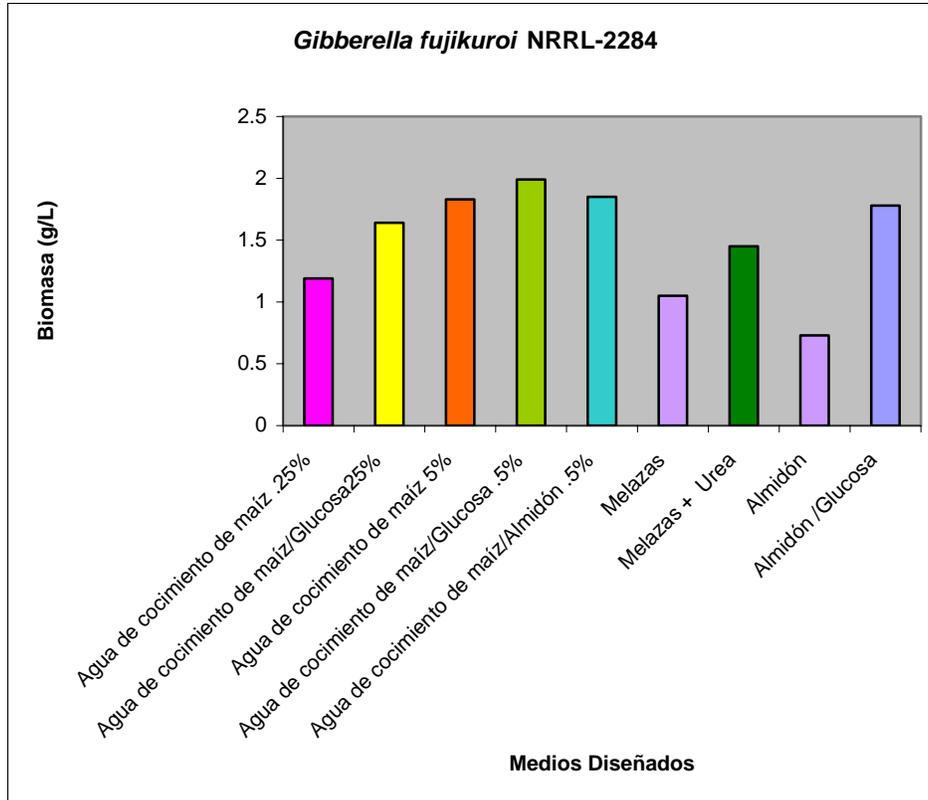
<i>Trichoderma harzianum</i>	
Medio de cultivo	Biomasa (g/L)
Agua de cocimiento de maíz .25%	1.02
Agua de cocimiento de maíz/Glucosa25%	1.38
Agua de cocimiento de maíz 5%	1.48
Agua de cocimiento de maíz/Glucosa .5%	1.80
Agua de cocimiento de maíz/Almidón .5%	1.86
Melazas	1.01
Melazas + Urea	1.27
Almidón	1.76
Almidón /Glucosa	0.24



Gráfica.1 Determinación del crecimiento de *Trichoderma harzianum*, en los diferentes medios de cultivo diseñados.

Tabla 5. Biomasa obtenida de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, en los diferentes medios diseñados.

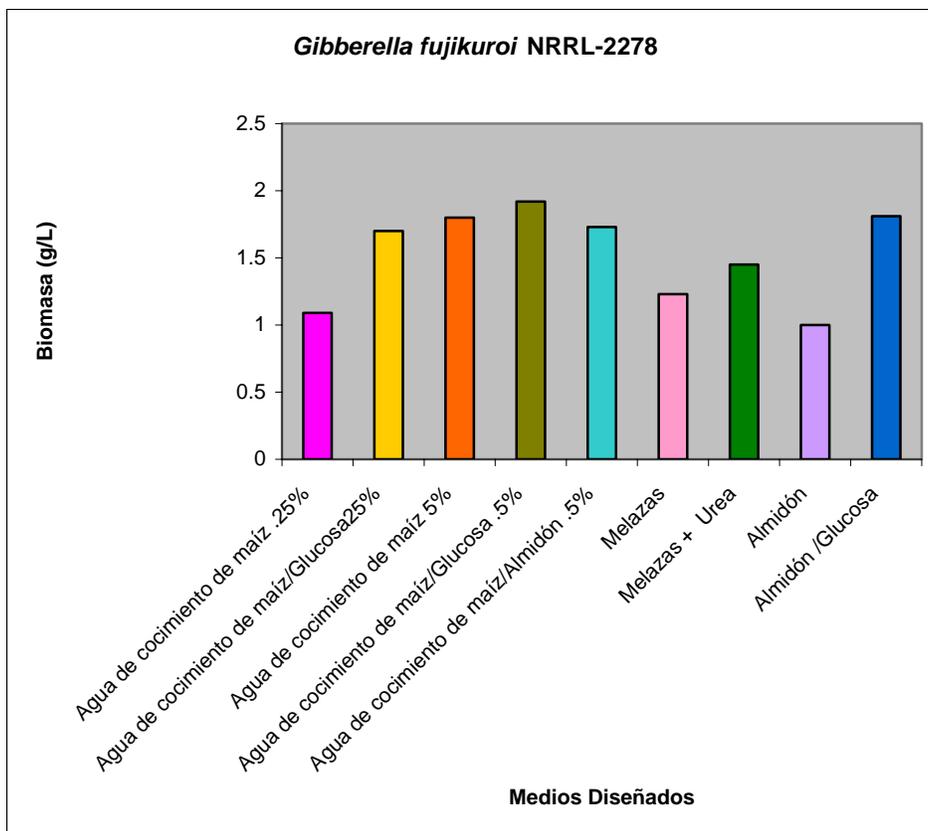
<i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL-2284	
Medio de cultivo	Biomasa (g/L)
Agua de cocimiento de maíz .25%	1.19
Agua de cocimiento de maíz/Glucosa 25%	1.64
Agua de cocimiento de maíz 5%	1.83
Agua de cocimiento de maíz/Glucosa .5%	1.99
Agua de cocimiento de maíz/Almidón .5%	1.85
Melazas	1.05
Melazas + Urea	1.45
Almidón	0.73
Almidón /Glucosa	1.78



Gráfica.2 Determinación del crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, en los diferentes medios de medio de cultivo diseñados.

Tabla 6. Biomasa obtenida de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278, en los diferentes medios de cultivo diseñados.

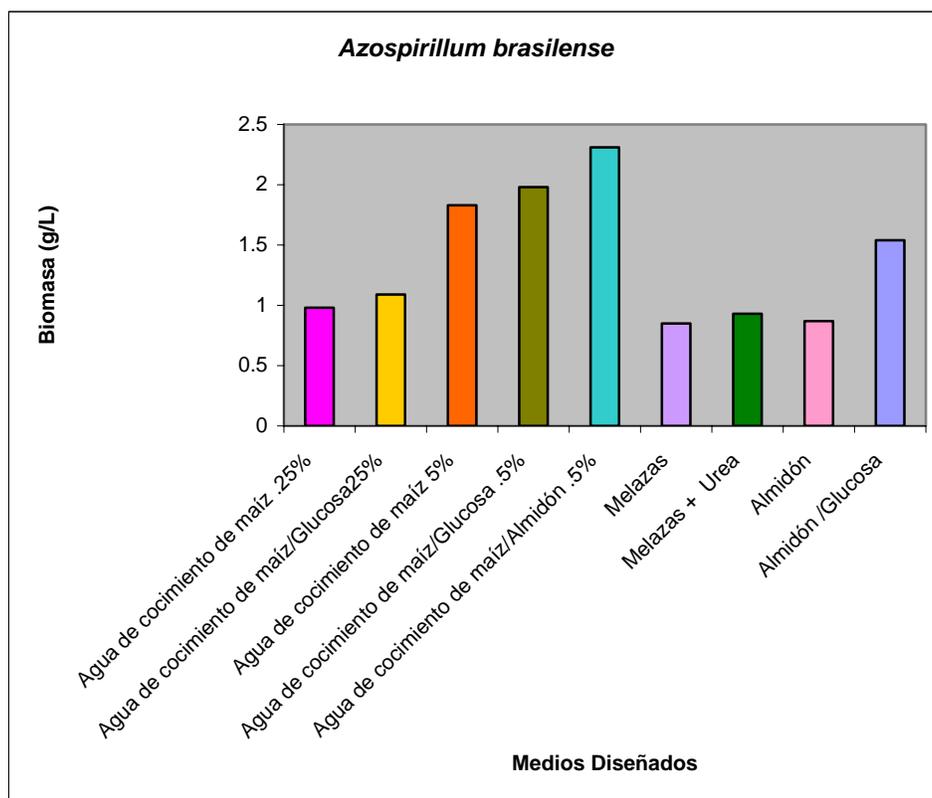
<i>Gibberella fujikuroi</i> NRRL-2278	
Medio de cultivo	Biomasa (g/L)
Agua de cocimiento de maíz .25%	1.09
Agua de cocimiento de maíz/Glucosa 25%	1.7
Agua de cocimiento de maíz 5%	1.8
Agua de cocimiento de maíz/Glucosa .5%	1.92
Agua de cocimiento de maíz/Almidón .5%	1.73
Melazas	1.23
Melazas + Urea	1.45
Almidón	1
Almidón /Glucosa	1.81



Gráfica 3 Determinación del crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278, en los diferentes medios de cultivo diseñados.

Tabla 7. Biomasa obtenida de *Azospirillum brasilense*, en los diferentes medios de cultivo diseñados.

<i>Azospirillum brasilense</i>	
Medio de cultivo	Biomasa (g/L)
Agua de cocimiento de maíz .25%	0.98
Agua de cocimiento de maíz/Glucosa25%	1.09
Agua de cocimiento de maíz 5%	1.83
Agua de cocimiento de maíz/Glucosa .5%	1.98
Agua de cocimiento de maíz/Almidón .5%	2.31
Melazas	0.85
Melazas + Urea	0.93
Almidón	0.87
Almidón /Glucosa	1.54



Gráfica.4 Determinación de biomasa de *Azospirillum brasilense*, en los diferentes medios de cultivo diseñados.

Como se puede ver en las gráficas anteriores, los medios diseñados en los que hay mayor crecimiento de los microorganismos (biomasa) son: ACM, ACM/Glucosa, ACM/Alm., y Almidón, razón por la cual el medio elegido fue ACM/Alm, ya que es el medio de cultivo que presenta mayor crecimiento. Se realizaron las pruebas para determinar el crecimiento de microorganismos, al igual que en el medio líquido CN.

A pesar de que se obtuvo buen crecimiento en Melazas se deshecho la idea de trabajar con este medio, ya que resulta difícil manipularlo (separar la biomasa).

Como se puede ver en la gráfica 1 *Trichoderma harzianum* presenta buen crecimiento en los medios de ACM/Glucosa, ACM/Alm., y en Almidón.

Determinación de biomasa.

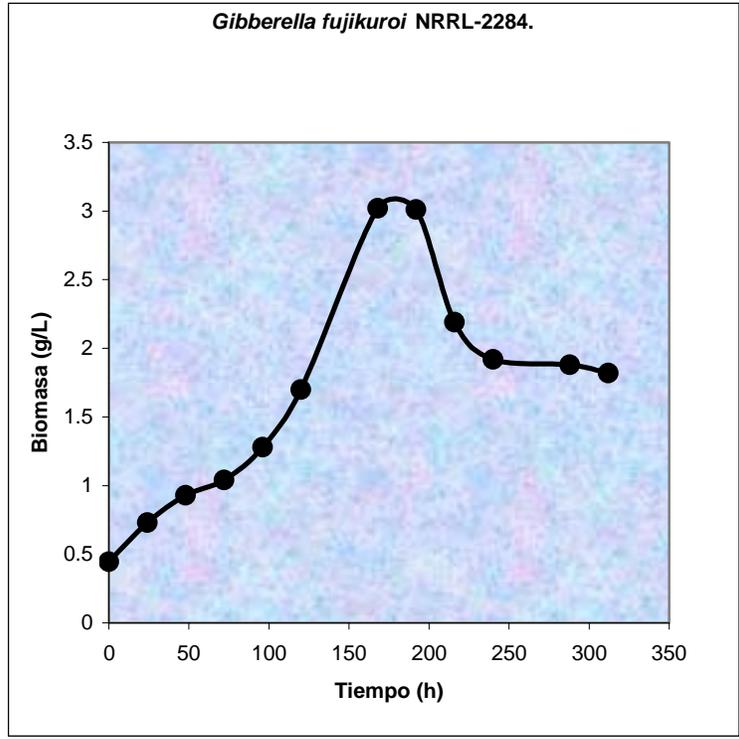
Se realizaron cinéticas donde se observó el tiempo de crecimiento, la velocidad específica de crecimiento, y la cantidad de biomasa producida en determinado tiempo (crecimiento celular). La masa celular de los microorganismos con los que se trabajó, se determinó por peso seco, para ello se tomó una muestra de los microorganismos en los medios ACM/Alm. y CN a diferentes tiempos. En el caso de la bacteria se filtró la muestra, mientras que para los hongos se centrifugó a 6000 rpm durante 30min, se recuperó la biomasa obtenida y se puso a secar a 70°C, durante 24 h. Posteriormente se pesó la biomasa antes y después de ponerlo a secar.

En las tablas de la 8 a la 15, y las gráficas de la 5 a la 20 se puede observar el comportamiento de los microorganismos, en los medios ACM/Alm. y CN.

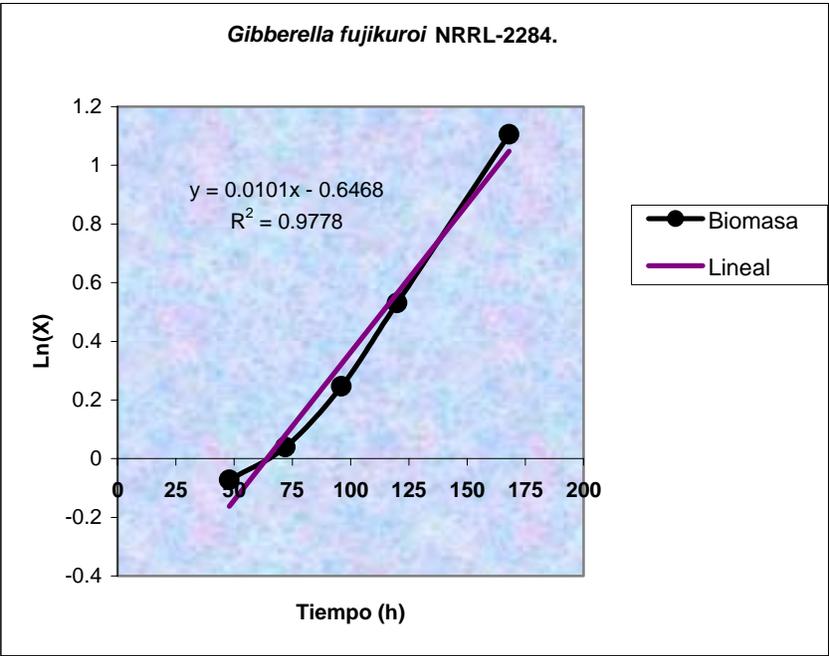
Tabla 8.- Biomasa obtenida de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C.

Tiempo (h.)	X(g/mL)	X(g/L)	Ln(X)
0	0.000445	0.445	-0.809681
24	0.00073	0.73	-0.31471074
48	0.00093	0.93	-0.07257069
72	0.00104	1.04	0.03922071
96	0.00128	1.28	0.24686008
120	0.0017	1.7	0.53062825
168	0.00302	3.02	1.10525683
192	0.00301	3.01	1.10194008
216	0.00219	2.19	0.78390154
240	0.00192	1.92	0.65232519
288	0.00188	1.88	0.63127178
312	0.00182	1.82	0.5988365

$\mu_{max}(h-1)$	0.0101
------------------	--------



Gráfica.5 Determinación del crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C.

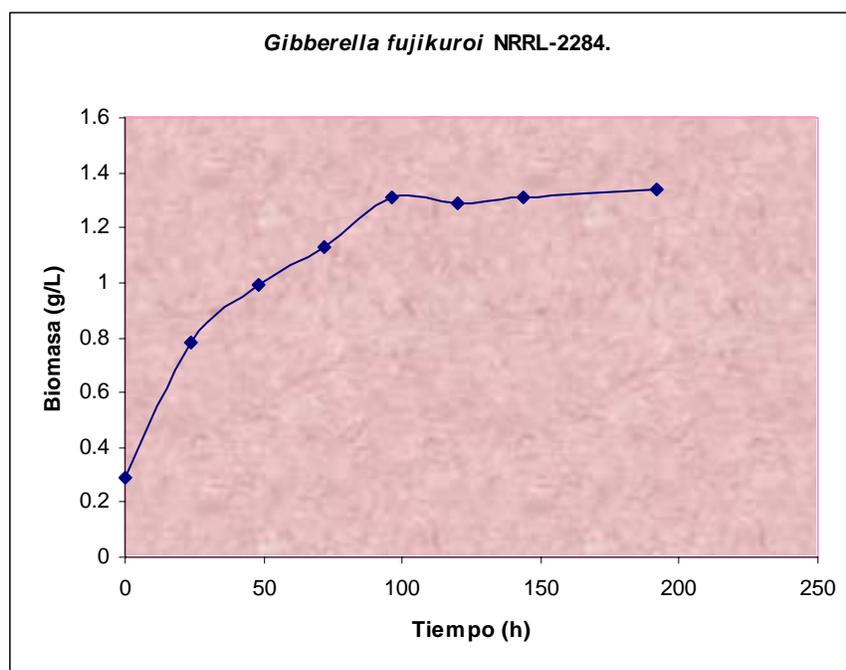


Gráfica 6. Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C. $\mu_{max}(h-1) = 0.0101$

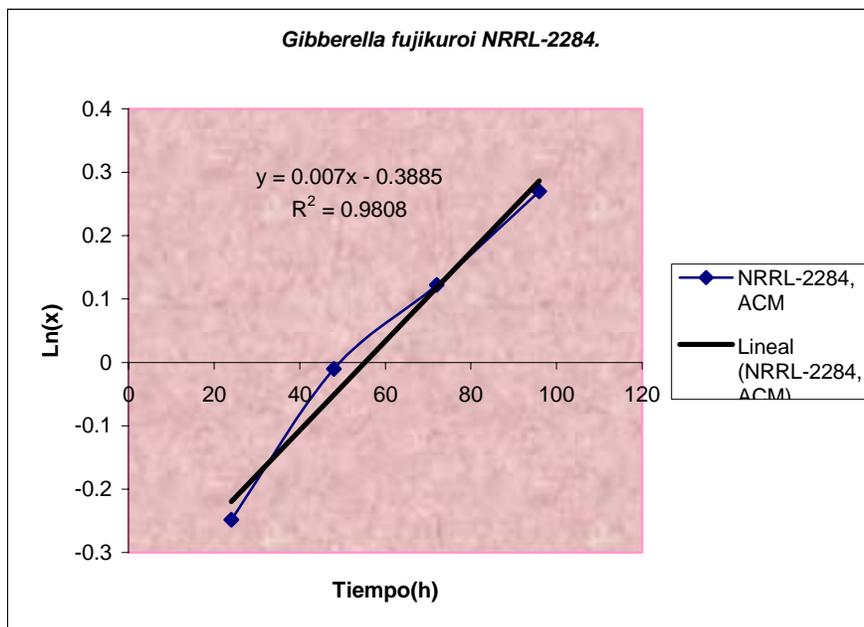
Tabla 9.- Biomasa obtenida de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C.

Tiempo(h)	X(g/mL)	X(g/L)	Ln(x)
0	0.00029	0.29	-1.23787436
24	0.00078	0.78	-0.24846136
48	0.00099	0.99	-0.01005034
72	0.00113	1.13	0.12221763
96	0.00131	1.31	0.27002714
120	0.00129	1.29	0.25464222
144	0.00131	1.31	0.27002714
168	0.00163	1.63	0.48858001
192	0.00134	1.34	0.29266961

$\mu_{max}(h^{-1})$	0.007
---------------------	-------



Gráfica 7 Determinación del crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C.

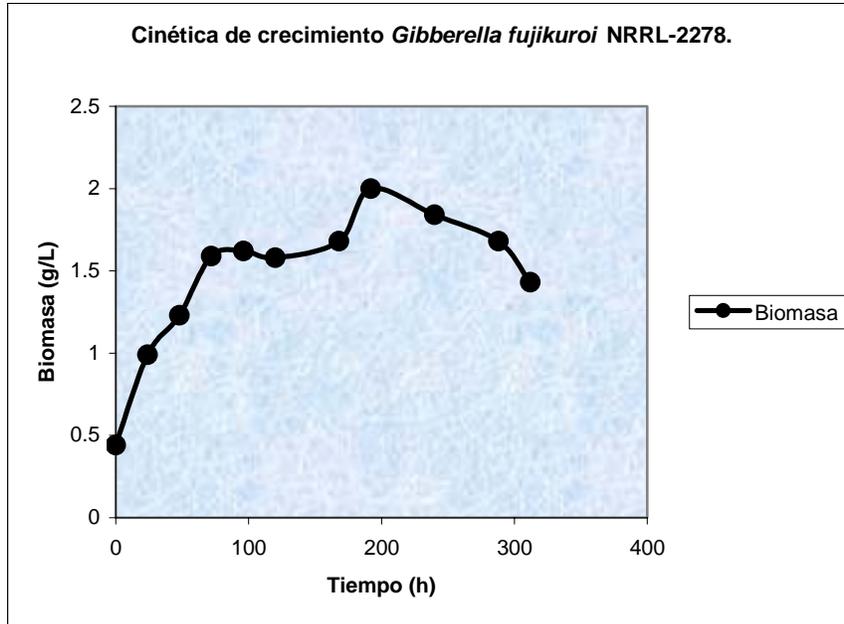


Gráfica 8. Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C. $\mu_{\max}(h^{-1}) = 0.007$

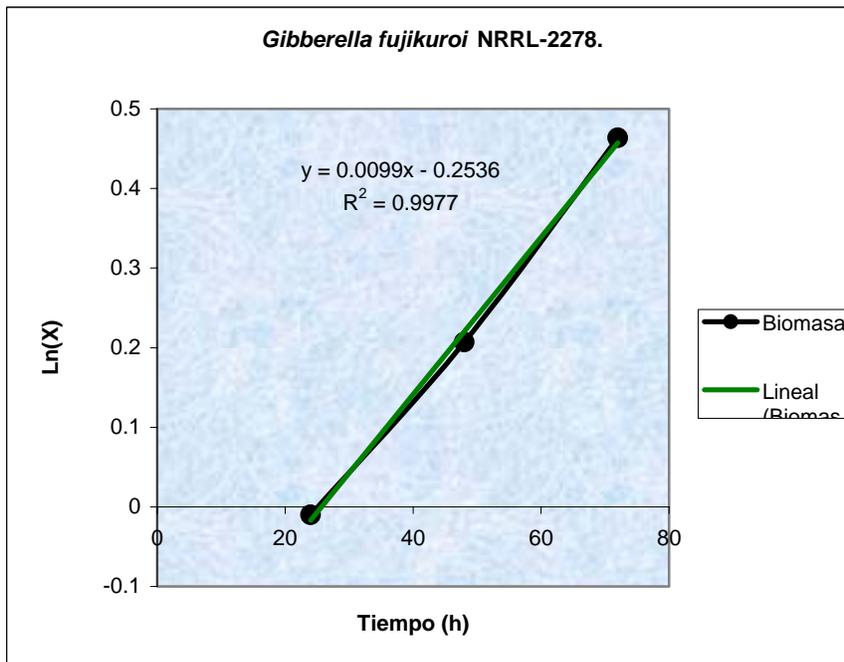
Tabla 10. Biomasa obtenida de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C.

Tiempo (h.)	X(g/mL)	X(g/L)	Ln(X)
0	0.00044	0.44	-0.82098055
24	0.00099	0.99	-0.01005034
48	0.00123	1.23	0.20701417
72	0.00159	1.59	0.46373402
96	0.00162	1.62	0.48242615
120	0.00158	1.58	0.45742485
168	0.00168	1.68	0.51879379
192	0.002	2	0.69314718
240	0.00184	1.84	0.60976557
288	0.00168	1.68	0.51879379
312	0.00143	1.43	0.35767444

$\mu_{\max}(h^{-1})$	0.0099
----------------------	--------



Gráfica 9. Determinación del crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C.

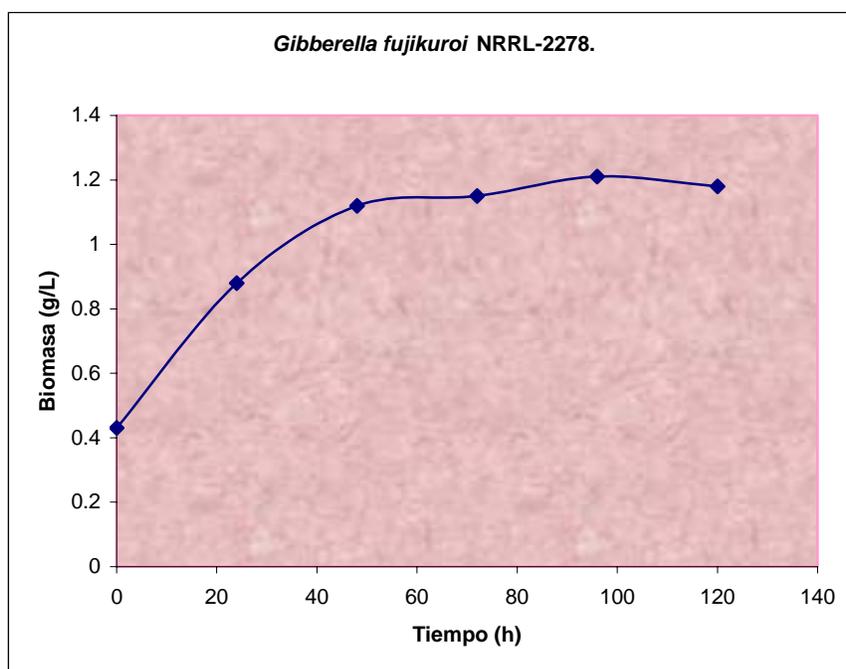


Gráfica 10. Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278 en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C. $\mu_{max}(h^{-1}) = 0.0099$

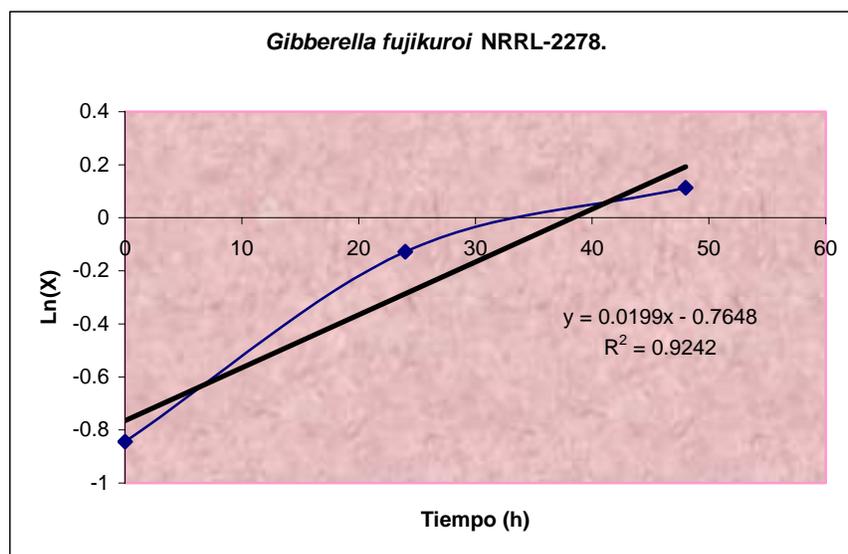
Tabla 11.- Biomasa obtenida de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C.

Tiempo (h)	X(g/mL)	X(g/L)	Ln(X)
0	0.00043	0.43	-0.84397007
24	0.00088	0.88	-0.12783337
48	0.00112	1.12	0.11332869
72	0.00115	1.15	0.13976194
96	0.00121	1.21	0.19062036
120	0.00118	1.18	0.16551444
144	0.00112	1.12	0.11332869
168	0.00105	1.05	0.04879016
192	0.00098	0.98	-0.02020271

$\mu_{max}(h^{-1})$	0.0199
---------------------	--------



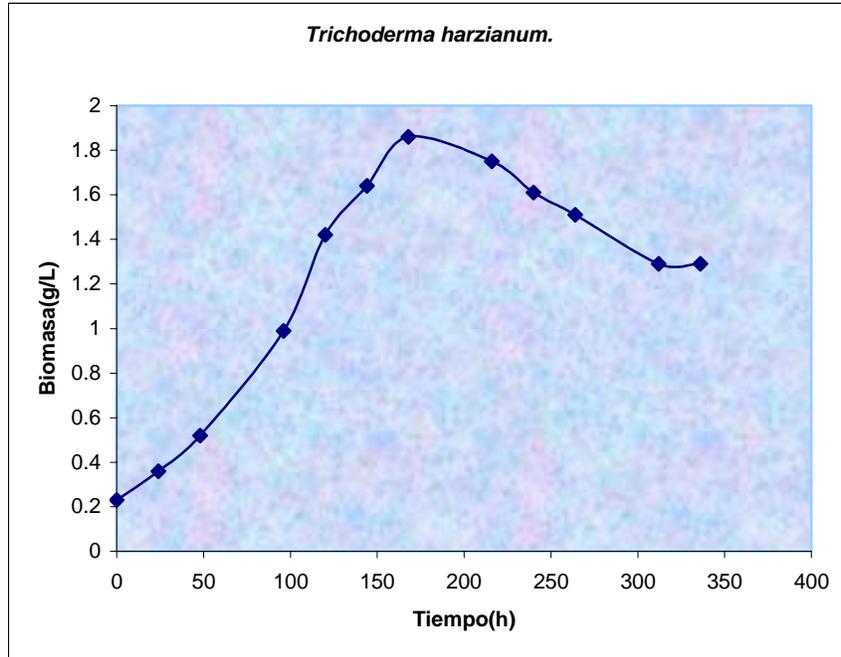
Gráfica.11 Determinación del crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C.



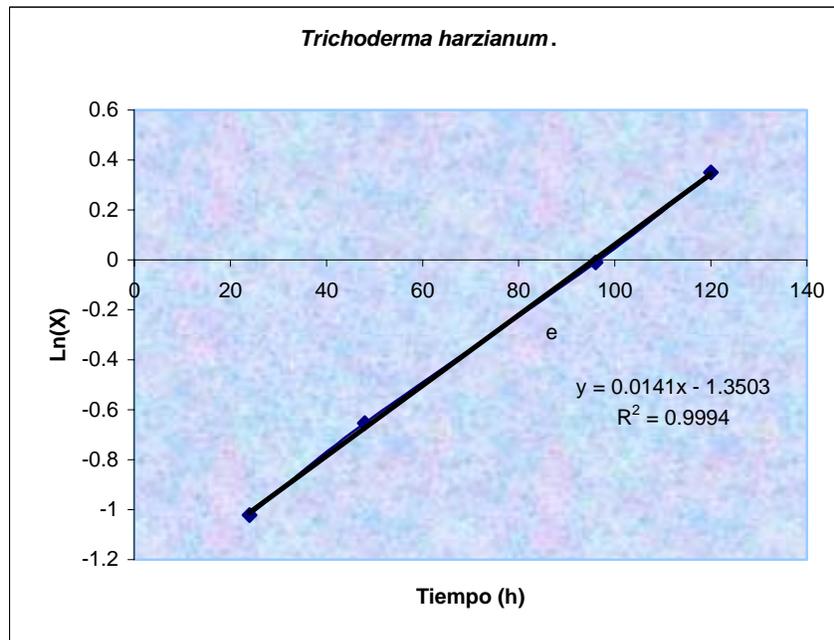
Gráfica 12. Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C. $\mu_{\max}(h-1) = 0.0199$

Tabla 12.- Biomasa obtenida de la cinética de *Trichoderma harzianum*, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C.

Tiempo(h.)	Biomasa(g/L)	Ln(X)g
0	0.23	-1.46967597
24	0.36	-1.021651248
48	0.52	-0.653926467
96	0.99	-0.010050336
120	1.42	0.350656872
144	1.64	0.494696242
168	1.86	0.620576488
216	1.75	0.559615788
240	1.61	0.476234179
264	1.51	0.412109651
312	1.29	0.254642218
336	1.29	0.254642218
$\mu_{\max}(h-1)$	0.0141	



Gráfica 13. Determinación del crecimiento de *Trichoderma harzianum*, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C.

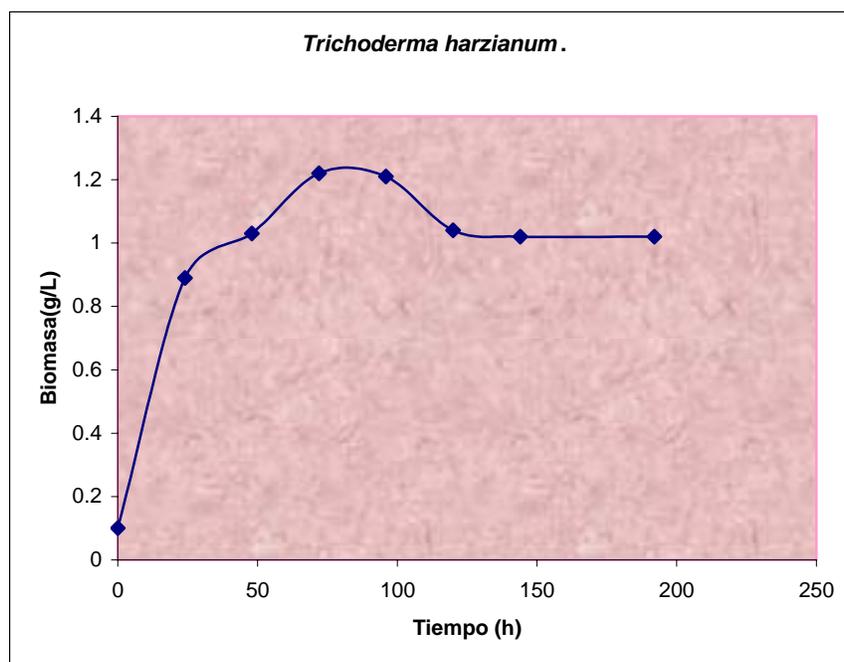


Gráfica 14. Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Trichoderma harzianum*, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C. $\mu_{max}(h-1) = 0.0141$

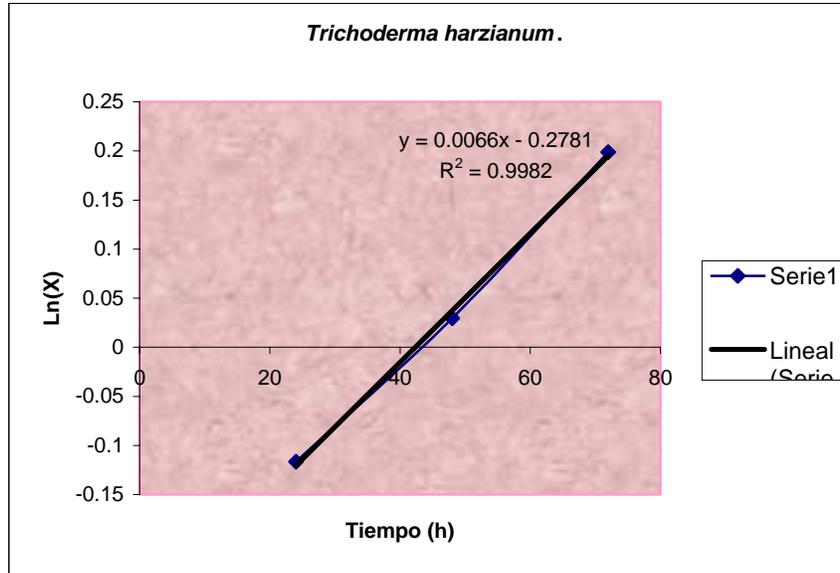
Tabla 13. Biomasa obtenida de la cinética de *Trichoderma harzianum*, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C.

Tiempo (h.)	X(g/mL)	X(g/L)	Ln(X)
0	0.0001	0.1	-2.30258509
24	0.00089	0.89	-0.11653382
48	0.00103	1.03	0.0295588
72	0.00122	1.22	0.19885086
96	0.00121	1.21	0.19062036
120	0.00104	1.04	0.03922071
144	0.00102	1.02	0.01980263
192	0.00102	1.02	0.01980263

$\mu_{max}(h^{-1})$	0.0066
---------------------	--------



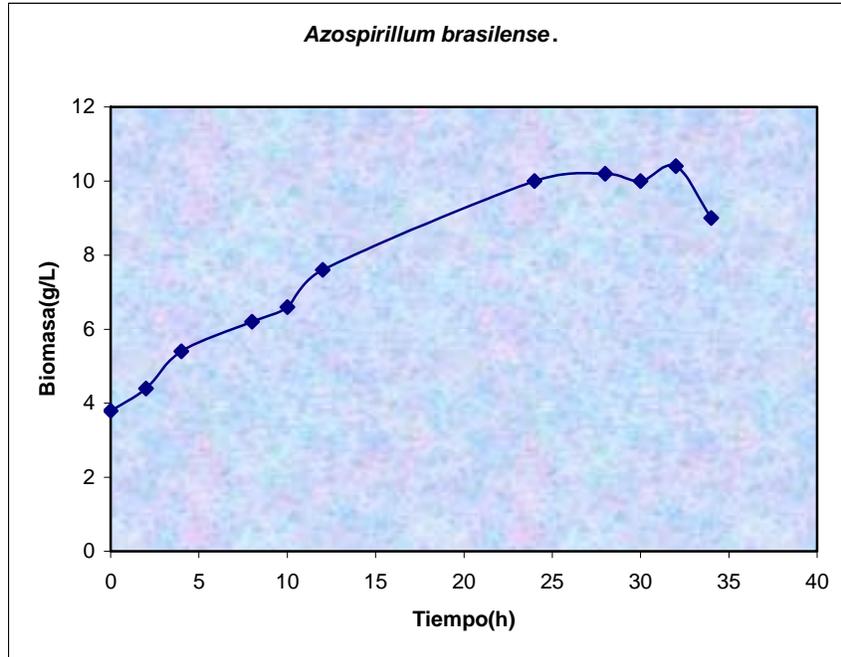
Gráfica.15 Determinación del crecimiento de *Trichoderma harzianum*, en el medio de cultivo líquido (ACM) a pH de 6 y a una temperatura de 30°C.



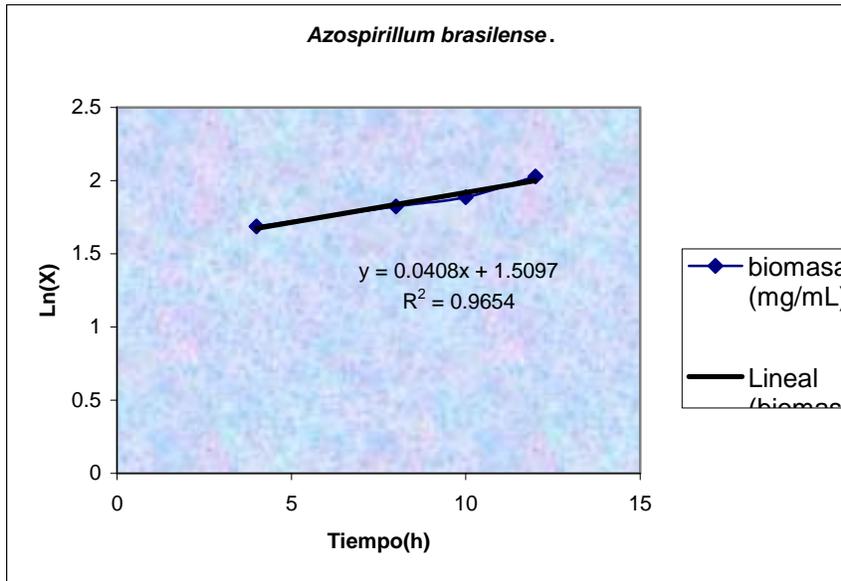
Gráfica 16. Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Trichoderma harzianum*, en el medio de cultivo líquido (ACM) a pH de 6 y a una temperatura de 30°C.
 $\mu_{max}(h-1) = 0.0066$

Tabla 14.- Biomasa obtenida de la cinética de *Azospirillum brasilense* en el medio de cultivo líquido (CN) a pH 6.5 y a una temperatura de 30°C.

Tiempo(h)	X(g/L)	Ln (X)
0	3.8	1.33500107
2	4.4	1.48160454
4	5.4	1.68639895
8	6.2	1.82454929
10	6.6	1.88706965
12	7.6	2.02814825
24	10	2.30258509
28	10.2	2.32238772
30	10	2.30258509
32	10.4	2.34180581
34	9	2.19722458
$\mu_{max}(h-1)$	0.0408	



Gráfica 17. Determinación del crecimiento de *Azospirillum brasilense* en el medio de cultivo líquido (CN) a pH 6.5 y a una temperatura de 30°C.

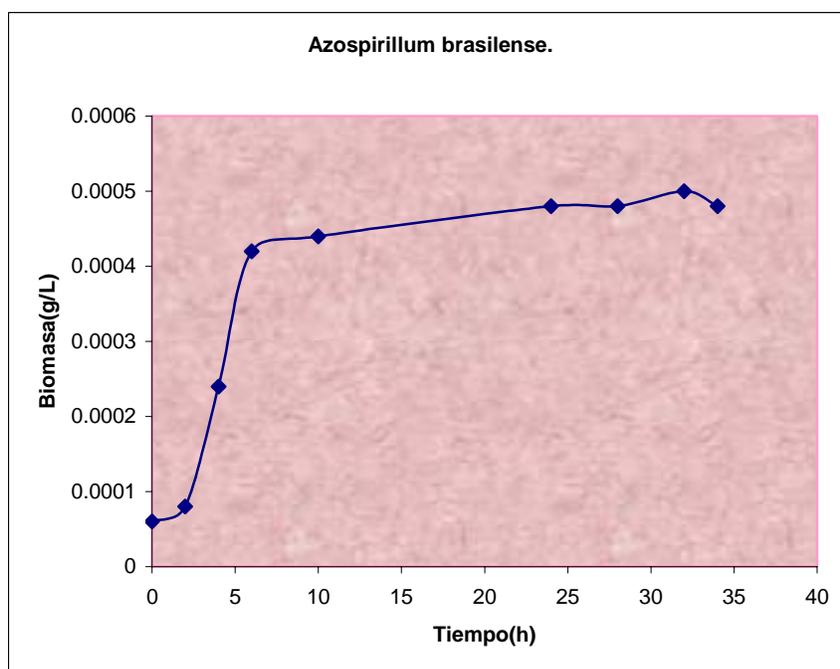


Gráfica 18. Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Azospirillum brasilense* en el medio de cultivo líquido (CN) a pH 6.5 y a una temperatura de 30°C.
 $\mu_{max}(h-1) = 0.0408$

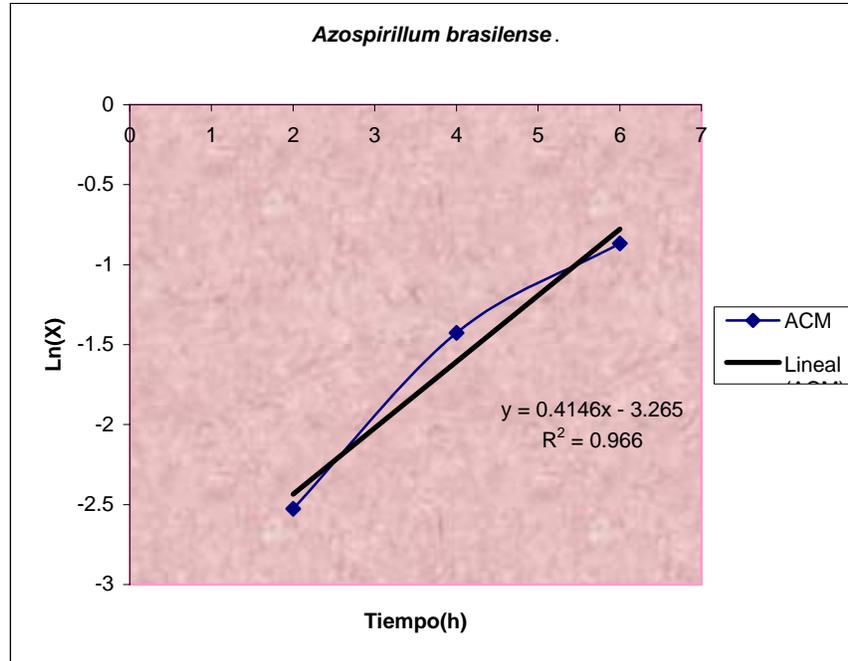
Tabla 15.- Biomasa obtenida de la cinética de *Azospirillum brasilense*, en el medio de cultivo líquido (ACM), a un pH de 6 y a una temperatura de 30°C.

Tiempo(h)	X(g/L)	Ln(X)
0	0.06	-2.81341072
2	0.08	-2.52572864
4	0.24	-1.42711636
6	0.42	-0.86750057
10	0.44	-0.82098055
24	0.48	-0.73396918
28	0.48	-0.73396918
32	0.5	-0.69314718
34	0.48	-0.73396918

$\mu_{max}(h^{-1})$	0.4146
---------------------	--------



Gráfica 19. Determinación del crecimiento de *Azospirillum brasilense* en medio de cultivo líquido (ACM) a pH 6 y a una temperatura de 30°C.



Gráfica 20. Determinación de la velocidad específica de crecimiento de *Trichoderma harzianum* en el medio de cultivo líquido (ACM) a pH 6 y a una temperatura de 30°C. $\mu_{max}(h-1) = 0.4146$

En las gráficas 5 y 7 observamos que *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, presenta un tiempo de crecimiento máximo a las 168 h., en ambos medios (ACM/Alm. y CN), sin embargo la velocidad específica de crecimiento disminuyó en el medio ACM/Alm. Para el caso de *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278 el tiempo de crecimiento máximo varió de 192h obtenidas en CN, a 96h en el medio ACN/Alm., variando la velocidad específica de crecimiento de $0.0099h^{-1}$ a $0.0199h^{-1}$, lo cual nos indica que la cepa NRRL-2278 se adaptó mejor a este medio.

Trichoderma harzianum disminuyó su tiempo de crecimiento máximo de 168h en CN a 72h en ACM/Alm., a pesar de que su tiempo de crecimiento es menor su velocidad específica de crecimiento disminuyó indicando que su afinidad por la fuente de carbono presente en el medio no fue la ideal para dicho microorganismo.

Azospirillum brasilense en cambio tuvo un tiempo de crecimiento igual para ambos medios, y su velocidad específica de crecimiento no presentó una variación significativa.

La velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) aumentó o disminuyó en los medios utilizados, esto se debe en parte a la naturaleza del medio así como a la disminución del sustrato, ya que la μ_{max} está dada en función de la concentración de la fuente de carbono y de la adaptación del microorganismo al medio de cultivo.

Inmovilización celular por el método de atrapamiento.

En el caso de la inmovilización celular se montó el equipo (ver Figuras 19, 20) y se realizó la técnica de atrapamiento como ya se mencionó en la metodología. Se determinó el número de esferas equivalentes a 1mL de gel dando un total de 40 esferas. Este parámetro nos servirá más tarde para determinar la biomasa de los microorganismos por mililitro de alginato y así poder evaluar la viabilidad de dichos microorganismos.

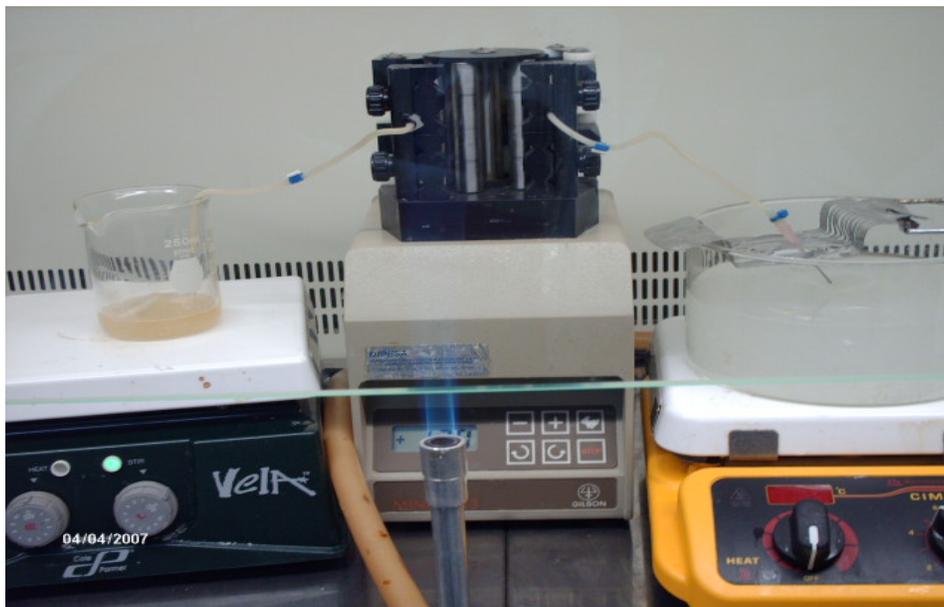


Fig. 19 Fotografía del sistema montado para la inmovilización de los microorganismos. La explicación se detalla en la metodología.



Fig. 20 En el cristalizador se encuentra la solución CaCl_2 0.3M la cual va a servir para que al contacto del alginato con los iones de calcio gelifique formando las esferas.

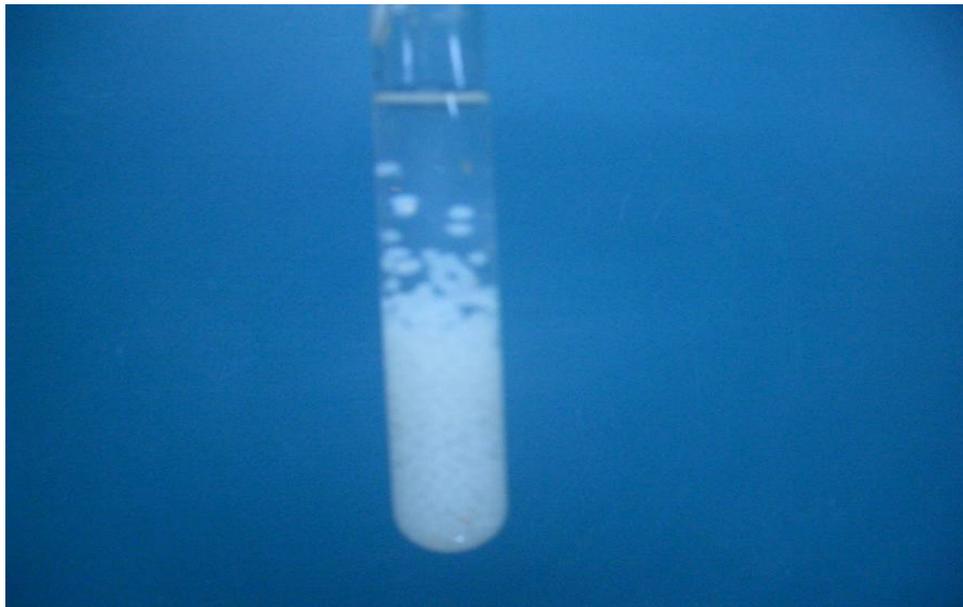


Fig. 21 Microorganismos inmovilizados por la técnica de atrapamiento en citrato de calcio para ser disueltos.

Determinación de la viabilidad

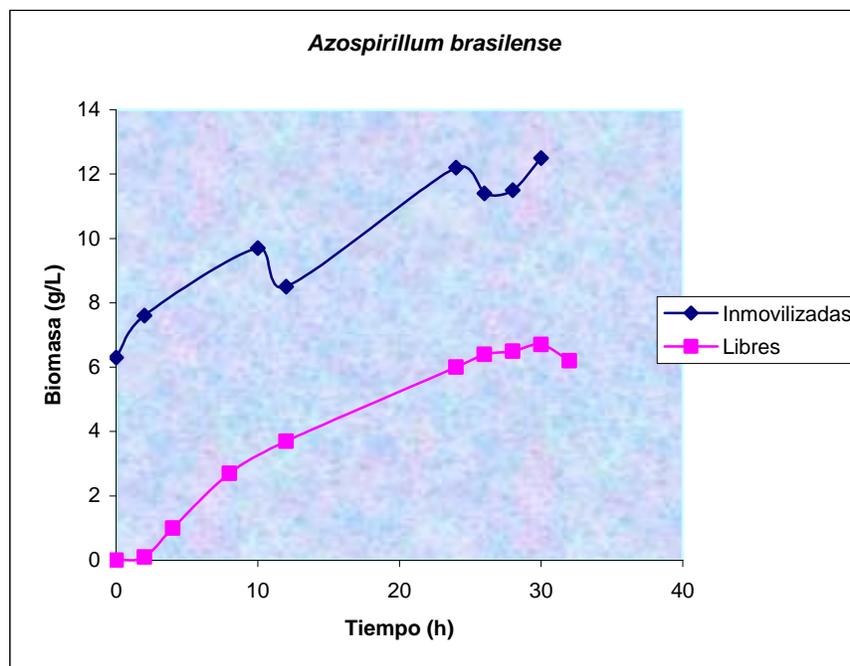
Se realizaron cinéticas de crecimiento de los microorganismos inmovilizados colocando las esferas formadas en los medios utilizados (ACM/Alm. y CN), posteriormente se tomaron muestras en determinados tiempos (para el caso de la bacteria se tomaron muestras cada 2 h, mientras que para el caso de los hongos la toma de muestras fue cada 24h), en la Fig. 22 podremos ver el crecimiento de los microorganismos inmovilizados.



Fig. 22 Microorganismos inmovilizados en medio de cultivo líquido.

Tabla 16.- Determinación de la viabilidad de *Azospirillum brasilense* inmovilizado, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C.

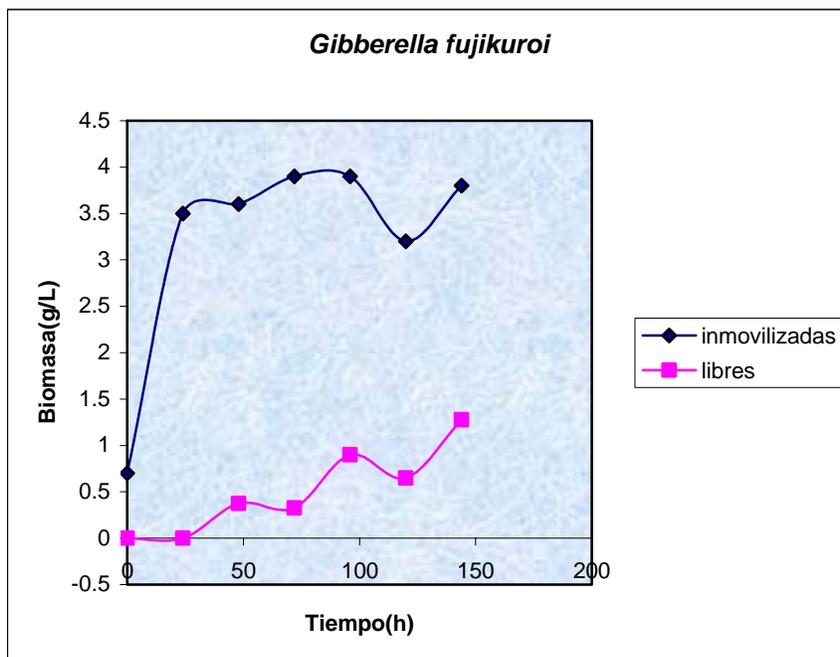
Tiempo (h)	Inmovilizadas		Libres	
	X(g/L)	Ln(X)	X(g/L)	Ln(X)
0	6.3	1.84054963	0	0
2	7.6	2.02814825	0.1	-2.30258509
4	5.8	1.75785792	1	-1.1013E-13
8	14.6	2.68102153	2.7	0.99325177
10	9.7	2.27212589	3.7	1.30833282
12	8.5	2.14006616	6	1.79175947
24	12.2	2.50143595	6.4	1.85629799
26	11.4	2.43361336	6.5	1.87180218
28	11.5	2.44234704	6.7	1.90210753
30	12.5	2.52572864	6.2	1.82454929



Gráfica 21. Determinación de la viabilidad de *Azospirillum brasilense* en el medio de cultivo líquido (CN) a pH 6.5 y a una temperatura de 30°C.

Tabla 17.- Determinación de la viabilidad de *Gibberella fujikuroi* inmovilizado, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C.

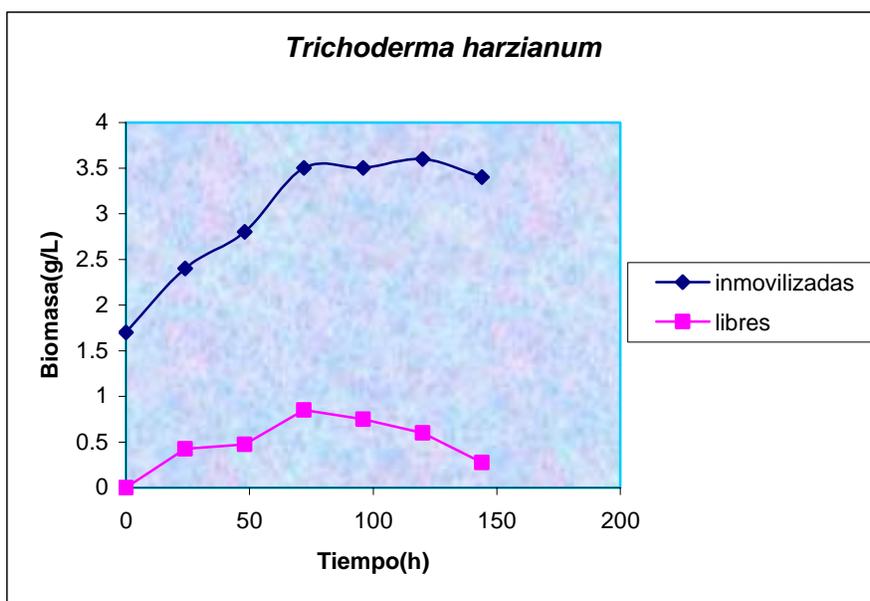
Tiempo(h)	Libres		Inmovilizadas	
	X(g/L)	Ln(X)	X(g/L)	Ln(X)
0	0	0	0.7	-0.35667494
24	0	0	3.5	1.25276297
48	0.375	-0.98082925	3.6	1.28093385
72	0.325	-1.1239301	3.9	1.36097655
96	0.9	-0.10536052	3.9	1.36097655
120	0.65	-0.43078292	3.2	1.16315081
144	1.275	0.24294618	3.8	1.33500107



Gráfica 22. Determinación de la viabilidad de *Gibberella fujikuroi* el medio de cultivo líquido (CN) a pH 6.5 y a una temperatura de 30°C.

Tabla 18.- Determinación de la viabilidad de *Trichoderma harzianum* inmovilizado, en el medio de cultivo líquido (CN), a un pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C.

	Libres		Inmovilizadas	
Tiempo(h)	X(g/L)	Ln(X)	X(g/L)	Ln(X)
0	0	0	1.7	0.53062825
24	0.425	-0.85566611	2.4	0.87546874
48	0.475	-0.74444047	2.8	1.02961942
72	0.85	-0.16251893	3.5	1.25276297
96	0.75	-0.28768207	3.5	1.25276297
120	0.6	-0.51082562	3.6	1.28093385
144	0.275	-1.29098418	3.4	1.22377543



Gráfica 23. Determinación de la viabilidad de *Trichoderma harzianum* el medio de cultivo líquido (CN) a pH 6.5 y a una temperatura de 30°C.

Como se puede observar en las gráficas 21 a la 23 la inmovilización celular permite mantener viables a los microorganismos, estabilizándolos al mismo tiempo, permitiendo el libre intercambio de nutrientes entre los microorganismos inmovilizados y el medio que los rodea.

8. Diseño del producto final de interés Agronómico.

Como parte final del proyecto se desarrolló la concepción del producto final de interés agronómico siguiendo los siguientes pasos:

- La producción de biomasa se realizó en el medio diseñado para tales fines que es ACM/Alm. Se sembró en un matraz semilla del 25% de capacidad del volumen final de la fermentación, con cada uno de los microorganismos (*Trichoderma harzianum*, *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284, *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278 y *Azospirillum brasilense*) se incubó a 30 °C., pasado el tiempo de incubación se realizó la fermentación a 30 °C. durante 96 h para el caso de los hongos y 30°C por 32 h. para el caso de la bacteria.
- Obtenida la biomasa se inmovilizó en alginato al 2%(ver metodología para inmovilización).
- Se liofilizó (ver metodología para liofilización).
- Se mezclaron las esferas liofilizadas de cada uno de los microorganismos en proporción 1:1:1, para empaquetarlas al vacío. El empaque se selló para obtener la presentación final.
- Por cada 100mL de medio ACM/Alm. se obtuvo 3.3 g de producto final, que se compone de la siguiente manera: *Trichoderma harzianum* 0.9010g, *Gibberella fujikuroi* NRRL-2284 0.9860g, *Gibberella fujikuroi* NRRL-2278 0.877g y *Azospirillum brasilense* 0.4985g.



Fig. 23 Presentación de producto final

9 Conclusiones.

- La temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos utilizados fue de 30° C.
- Se observó que los microorganismos *Gibberella fujikuroi*, *Azospirillum brasilense* y *Trichoderma harzianum* son biocompatibles, esto es que entre ellos no inhiben su crecimiento.
- Se determinó de manera gráfica la velocidad específica de crecimiento, de los microorganismos, para determinar el tiempo requerido para obtener la mayor cantidad de biomasa.
- Se seleccionó el medio de cultivo de uso industrial ideal para el crecimiento de los microorganismos el medio fue agua de cocimiento de maíz con almidón.
- Se determinó el tiempo requerido para la obtención de la máxima producción de biomasa que son 168 h. para *Gibberella fujikuroi* NRRL 2284 ,192 h. para *Gibberella fujikuroi* NRRL 2278, 168 h. para *Trichoderma harzianum*, 32 h. *Azospirillum brasilense* .
- Se confirmó que los microorganismos inmovilizados conservan su viabilidad.
- Se estabilizaron los microorganismos por la técnica de liofilización.
- Se concibió el producto final, el cual consiste en esferas liofilizadas, donde contiene a los microorganismos.

Perspectivas

- Desarrollar un método para comprobar la eficacia del producto desarrollado.
- Realizar pruebas en invernaderos par comprobar la eficacia del producto desarrollado.
- Desarrollar un método para determinar las proporciones de cada microorganismo para un mejor producto.
- Realizar pruebas para determinar las dosis de producto por unidad de cultivo.

10. Bibliografía.

1. Abdel-Salam, M. S., and W. Klingmüller. "Transposon Tn5 mutagenesis in *Azospirillum lipoferum*: isolation of indole-3-acetic acid mutants. Mol. Gen. Genet. 210" 1987, pp: 165-170.
2. Bar, T., and Y. Okon. 1992. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. Can. J. Microbiol. 39:81-86.
3. Brook, "Biología de los microorganismos", 10ª ed., Ed. Prentice Hall, Madrid 2002 pp.6-8, 64, 159-162, 354, 372-374, 383-387, 583, 598, 623-686.
4. Durán P., E., Etude du comportement physiologique de *Bacillus subtilis* ATCC-21556 confiné et en suspension: suivi des métabolites et d'activités enzymatiques endo et exocellulaires, Tesis de doctorado, Université de Technologie de Compiègne, Francia, 1997.
5. Halevy, A.H. "Recent Advances in the Use of Growth Substances in Ornamental Horticulture", in Plant Growth Substances, N.Y., 1985, M. Bopp, Springer Verlag, pp. 392-398.
6. Halevy, A.H. "The Use of Plant Bioregulators in Ornamental Crops", Acta Horticulturae, USA 1995, pp. 37-42.
7. Horemans, S., K. De Koninck, J. Neuray, R. Hermanss, and K. Vlassak. 1986. Production of plant growth substances by *Azospirillum* sp. And other rhizosphere bacteria. Symbiosis 2:341-346.
8. KONEMAN, Elmer; ALLEN, Stephen; DOWELL, V. R.; JANDA, William; SOMMER, WINN, Washington; "Diagnóstico microbiológico; Texto y Atlas a color"; Editorial Panamericana, 3ª ed., Buenos Aires, Argentina, 1992, pp: 440-451.
9. Oliver J., Germain R. 1983, Etude des antibiotiques volatils des *Trichoderma*. 'Les antagonismes microbiens'. Les colloques de l'INRA., 18, 17-34.
10. Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM Cuernavaca, Morelos1, México, AP. P. 565-A.
11. Quintero R., R., "Ingeniería bioquímica: teoría y aplicaciones.", Ed. Alhambra Mexicana, México 1993, pp.: 195.
12. Rademacher, W. "Growth Retardants Biochemical Features and Applications in Horticultura", Acta Horticulturae, USA 1995, pp. 57-73.

13. Ronald M. Atlas, "Handbook of Microbiological Media", 2^a edition, Ed. Lawrence C. Parks, New York 1997, pp.1279.
14. Rudnicki, R.M. "Symposium, Growth Regulators and Polish Ornamental Horticulturae, an opening Address", Acta Horticulture, 251, 1989, pp. 19-21.
15. Scragg A., "Biotecnología para ingenieros: Sistemas biológicos en procesos tecnológicos.", Ed LIMUSA, México 2005, pp.: 243-262.
16. Tarrand, J. J., N. R. Krieg, and J. Döbereiner. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol. 24:967-980.
17. Tips on the Use of Chemical Growth Regulators on Floriculture Crops, Ohio, USA, 1992, The Ohio Florist Association, 90 p.



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



México D. F. a 13 de noviembre del 2006
Of. No. SA-UPIBI-1660-2006

GALLARDO CASAS JOHANA JAZMÍN
ALUMNA DEL 7º SEMESTRE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
Presente

Comunico a Usted que, como resultado de la evaluación del Comité de Proyecto Terminal, con fecha 24 de marzo del 2006, queda registrado su Proyecto Terminal en la modalidad de "PROYECTO DE INVESTIGACIÓN" denominado "APLICACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN CELULAR EN EL DESARROLLO DE UN PRODUCTO DE INTERÉS AGRONÓMICO", bajo la dirección del Dr. Enrique Durán Páramo.

De cumplir con las condiciones que abajo se indican, será acreditada la Opción Curricular de Titulación. Así mismo, me permito recordarle que el trabajo experimental deberá concluir en el octavo semestre y entregar, en el mismo, el informe técnico final, de conformidad con los lineamientos que para tal fin establezca el mencionado Comité.

CONDICIONES

- 1.- Permanecer en la misma modalidad en el Proyecto Terminal I, II y III
- 2.- Obtener una calificación igual o superior a 8.0 en Proyecto Terminal I, Proyecto terminal II y en Proyecto Terminal III
- 3.- Cumplir con el 90% de asistencia a las actividades asignadas
- 4.- Cumplir con los demás requisitos que se fijan en el programa de estudios de la asignatura

Sin otro particular por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PAZ"



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
DIRECCIÓN ACADÉMICA

ccp Expediente de Proyecto Terminal
Archivo



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



México D. F. a 13 de noviembre del 2006
Of. No. SA-UPIBI-1666-2006

MATUS FLORES LAURA GUADALUPE
ALUMNA DEL 7º SEMESTRE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
Presente

Comunico a Usted que, como resultado de la evaluación del Comité de Proyecto Terminal, con fecha 24 de marzo del 2006, queda registrado su Proyecto Terminal en la modalidad de "PROYECTO DE INVESTIGACIÓN" denominado "APLICACIÓN DE LA INMOVILIZACIÓN CELULAR EN EL DESARROLLO DE UN PRODUCTO DE INTERÉS AGRONÓMICO", bajo la dirección del Dr. Enrique Durán Páramo.

De cumplir con las condiciones que abajo se indican, será acreditada la Opción Curricular de Titulación. Así mismo, me permito recordarle que el trabajo experimental deberá concluir en el octavo semestre y entregar, en el mismo, el informe técnico final, de conformidad con los lineamientos que para tal fin establezca el mencionado Comité.

CONDICIONES

- 1.- Permanecer en la misma modalidad en el Proyecto Terminal I, II y III
- 2.- Obtener una calificación igual o superior a 8.0 en Proyecto Terminal I, Proyecto terminal II y en Proyecto Terminal III
- 3.- Cumplir con el 90% de asistencia a las actividades asignadas
- 4.- Cumplir con los demás requisitos que se fijan en el programa de estudios de la asignatura

Sin otro particular por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

DR. GUSTAVO VALENCIA DEL TORO
SUBDIRECTOR ACADÉMICO



INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE
BIOTECNOLOGÍA
SUBDIRECCION ACADÉMICA

ccp Expediente de Proyecto Terminal
Archivo

GVD/ERICD