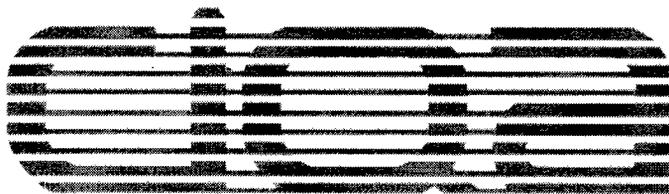


CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



**USO Y APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTES Y
BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE LAS
PLANTAS CON AGROPLASTICULTURA**

CASO DE ESTUDIO

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA

OPCIÓN: AGROPLASTICULTURA

PRESENTA:

ING. GUILLERMO SALOMÓN MOLINA ABADÍA

SALTILLO, COAHUILA

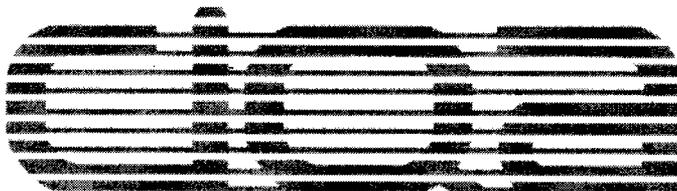
ciaa
CENTRO DE INFORMACIÓN

03 OCT 2008

AGOSTO, 2008

RECIBIDO

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



**HACE CONSTAR QUE EL CASO DE ESTUDIO TITULADO
USO Y APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTES Y
BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE LAS
PLANTAS CON AGROPLASTICULTURA**

PRESENTADO POR:

ING. GUILLERMO SALOMÓN MOLINA ABADÍA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
OPCIÓN: AGROPLASTICULTURA**

Ha sido dirigido por:


DR. HUGO LIRA SALDÍVAR

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



A TRAVÉS DEL JURADO EXAMINADOR HACE CONSTAR QUE EL CASO DE ESTUDIO:

USO Y APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTES Y BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS CON AGROPLASTICULTURA

QUE PRESENTA:

ING. GUILLERMO SALOMÓN MOLINA ABADÍA

HA SIDO ACEPTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

ESPECIALIZACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
OPCIÓN: AGROPLÁSTICULTURA

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ortega', written over a horizontal line.

PRESIDENTE

Dra. Hortensia Ortega Ortiz

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'L. Valdez', written over a horizontal line.

VOCAL

Dr. Luis A. Valdez Aguilar

SALTILLO, COAHUILA

AGOSTO, 2008

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de poder comenzar y concluir mis estudios de la especialidad, sobre todo brindarme los conocimientos necesarios para llegar a este momento.

A mis Padres y Hermanos, ya que ellos me han ayudado de muchas formas a poder lograr mis metas propuestas y cumplir mis sueños, Dios los bendiga y los guarde por siempre los Amo mucho.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) que brinda grandes oportunidades para el desarrollo científico y tecnológico del país, sobre todo con el apoyo económico para los estudios de posgrado, Gracias.

Al Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) por los invaluable conocimientos que ayudan a los egresados a reforzar los conocimientos y sobre todo por el completo apoyo brindado durante mi estancia en este centro.

A mi asesor Dr. Hurgo Lira Saldívar, por brindarme sus consejos para mejorar la formación académica y humana, a mis maestros de la Especialidad de Agroplásticos, por compartir sus conocimientos y ayudarnos a formar en lo humano y profesionalista, en especial a los maestros del Departamento de Agroplásticos, de corazón Gracias.

De una forma especial a mis amigos y compañeros que hicieron que mi estancia a lado de ellos fuera agradable y que brindaron parte de su tiempo para compartir conocimientos y sobre todo una buena amistad.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
Índice de Cuadros	iv
Índice de Figuras	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo General	3
Objetivos Específicos.....	3
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
Hongos micorrízicos.....	4
Microorganismos fijadores de nitrógeno.....	6
Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (RPCP).....	8
BIOFERTILIZANTES	10
Asociaciones simbióticas entre microorganismos y plantas	13
Función de las <i>micorrizas</i> en las plantas	14
Beneficios de las <i>micorrizas</i>	14
Tipos de <i>micorrizas</i>	15
Beneficios de las ecto y endomicorrizas en el crecimiento y desarrollo de las plantas y suelos.	21
Proceso de infección de las <i>micorrizas</i>	24
Infección de hongos micorizizicos arbusculares (HMA).....	25
Transferencia de nutrientes del suelo a la planta por medio de las <i>micorrizas</i>	27
Nutrición fosfatada en plantas micorrícicas, mecanismos de acción y supresión de la colonización.....	28
Nutrición nitrogenada con <i>micorrizas</i>	30
Costo energético de la planta en la simbiosis micorrícica.....	32

Fijación bacteriana de n_2 como biofertilizante microbiano	32
Bacterias que fijan N_2 simbióticamente	32
Proceso de infección de la asociación leguminosa- <i>Rhizobium</i>	37
La fijación biológica de nitrógeno por <i>Rhizobium</i>	39
Producción de <i>Rhizobium</i>	40
Efecto del pH en la simbiosis leguminosa- <i>Rhizobium</i>	41
Otros beneficios y perspectivas con <i>Rhizobium</i>	42
RHIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS (RPCP) Y ANTAGONISTAS DE FITOPATÓGENOS.....	43
Mecanismos de acción de las RPCP.....	44
Ejemplos de rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas.....	48
Influencia de las rizobacterias en el crecimiento de las plantas	48
Factores que afectan la función y estructura de las comunidades bacterianas del suelo.....	51
Efectos de la inoculación con RPCP en bacterias residentes o nativas.....	53
Las rizobacterias como control natural de agentes patógenos	55
Control biológico con microorganismos antagónicos	56
Mecanismos de acción del control biológico	61
Uso de microorganismos antagonistas y promotores de crecimiento en la solarización.....	65
III. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO.	65
IV. ÁREAS DE OPORTUNIDAD	67
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	68
VI. REFERENCIAS.....	70

Índice de Cuadros

Cuadro 1.	Ubicación taxonómica de los hongos micorrícicos arbusculares.....	4
Cuadro 2.	Diferentes tipos de <i>micorrizas</i> y sus características morfológicas (Granados <i>et al.</i> , 2001)	20
Cuadro 3.	Mecanismos de acción directos e indirectos de las RPCP (Dos Santos, 2005).	45
Cuadro 4.	Importancia social de las RPCP	47

Índice de Figuras

Figura 1.	Esquema general de las estructuras desarrolladas por los hongos micorrícicos arbusculares dentro y fuera de la raíz colonizada.....	6
Figura 2.	Los principales componentes y organelos de las bacterias.....	9
Figura 3.	Esquemas que ilustran la invasión de la micorriza producida por <i>Glomus sp.</i> en la región de la endodermis del sistema radicular de las plantas.....	17
Figura 4.	Ilustración que muestra las raíces modificadas en la ectomicorriza formada por un hongo desconocido sobre la planta llamada <i>Fagus sylvatica</i>	18
Figura 5.	Simbiosis del hongo con la raíz de los diferentes tipos de <i>micorrizas</i> (Rivera, 2007).....	21
Figura 6.	Descripción del ciclo de vida de <i>Glomus intraradices</i>	27
Figura 7.	Transferencia de nutrientes en las células de las raíces con <i>micorrizas</i>	28
Figura 8.	Transporte de fósforo (P) en plantas micorrizadas..	30
Figura 9.	Mecanismo propuesto para el transporte de nitrógeno a la planta en <i>micorrizas</i> arbusculares..	31
Figura 10.	Raíces de la planta de chícharo (<i>Pisum sativum</i>) con nódulos fijadores de nitrógeno de la bacteria <i>Rhizobium</i>	38

I. INTRODUCCIÓN

La agricultura orgánica o ecológica plantea nuevos desafíos para las instituciones de investigación y educación superior en México y el mundo, ya que es muy importante recurrir a nuevas tecnologías como los biofertilizantes y las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas. Debido a las posibilidades reales que estos tienen de contribuir al desarrollo de una agricultura sustentable, a mantener la calidad del ambiente y los ecosistemas, la generación de ingresos y la inocuidad alimentaria. Una elección respaldada científicamente sobre la agricultura orgánica, dentro de una gama de opciones agrícolas sustentables, pondría a los gobiernos en condiciones de orientar su investigación y sus actividades de extensión para aprovechar de manera integrada con otras alternativas sustentables de agricultura, las oportunidades comerciales disponibles en el ámbito nacional e internacional. En relación a lo recomendado por los países miembros de la FAO, el Programa Sobre Agricultura Orgánica o Ecológica (Rueda *et al.*, 2007), incluye las siguientes áreas de acción:

1. Sistemas y redes para proveer información sobre aspectos de producción, conservación, procesamiento, etiquetado y mercadeo de productos orgánicos; información técnica sobre requerimientos de producción, e información comercial sobre oportunidades de mercado.
2. Herramientas de apoyo a políticas gubernamentales.
3. Nuevas opciones en la implementación de agro-insumos respaldados científicamente para su aplicación en los sistemas sustentables u orgánicos productivos y eficientes.
4. Asistencia técnica a los países para estudios y apoyo a los gobiernos sobre la producción, certificación y comercialización de productos orgánicos certificados; obtener acceso a mercados internacionales; capacitación en el proceso de producción ecológica u orgánica; asistencia técnica para desarrollar una legislación nacional apropiada, desarrollar capacidad de certificación, de investigación, y extensión y promover el intercambio de experiencias entre investigadores de diversos países.

Lo anterior debido a que a nivel mundial la agricultura orgánica es uno de los varios enfoques de la agricultura sustentable y una de las alternativas de producción de alimentos que se enfoca a la inocuidad del ambiente. Asimismo, compartiendo otras direcciones de la agricultura sustentable como son: promover agroecosistemas sociales y ecológicamente sustentables, lo que significa diversificar y estabilizar los ingresos rurales; aumentar la biodiversidad y la sustentabilidad del entorno agrícola (Lira-Saldivar *et al.*, 2007).

La utilización excesiva de los fertilizantes sintéticos resulta en mayores costos de producción y en la contaminación de suelos y aguas; también ha ocasionado un proceso de deterioro de los escasos recursos y una creciente dificultad para renovarlos. En las dos últimas décadas, una de las áreas de estudio que actualmente están impactando en la agricultura, es la aplicación de biofertilizantes a través del empleo de microorganismos como bacterias y hongos que viven en simbiosis con las plantas, lo cual ha resultado muy positivo para fertilizar de manera orgánica diversos cultivos. Algunos microorganismos con efecto benéfico en las plantas pueden tener un gran potencial como agentes biocontroladores y biofertilizantes (Rueda *et al.*, 2007); dentro de este grupo de microorganismos se distinguen tres grandes grupos:

- Hongos micorrízicos.
- Microorganismos fijadores de nitrógeno.
- Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (RPCP).

En la plasticultura el uso de técnicas modernas como solarización y biofumigación en suelos acolchados con plásticos transparentes de bajo espesor y con la adición de microorganismos antagonistas y promotores del crecimiento vegetal están teniendo un fuerte impulso en todo el mundo como medios viables en sistemas de producción sustentables para el control biológico de enfermedades; por lo tanto, la integración de la solarización más el uso de microorganismos antagonistas ha generado resultados favorables en la sanidad y calidad de los productos agrícolas cosechados.

Objetivo General

Utilizando la información reciente de la literatura científica, se deberán identificar los principales géneros y especies de bacterias y hongos rizosféricos que pueden ser empleados como biofertilizantes.

Objetivos Específicos

- Señalar las técnicas empleadas para su producción masiva a nivel de planta piloto y a escala industrial; esto mismo se deberá realizar para las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas.
- Identificar el uso potencial de estos microorganismos para productores agrícolas a nivel ejidal y agricultores con mayores recursos económicos, así como la manera de emplearlas con las técnicas de agroplasticultura.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Hongos Micorrízicos

La palabra *Micorriza*, se formó a partir del término griego *mykos* (hongo) y del vocablo latín *RHIZA* (raíz). La historia de las *Micorrizas*, se remonta a unos 400 millones de años, especialmente al período DEVÓNICO, a partir del cual los hongos y las plantas evolucionaron hasta lo que son hoy en día. El botánico alemán Albert Bernard Frank, en el año 1885, creó el término *Micorriza*, para designar la asociación que se producía entre las hifas de algunos hongos del suelo, con los órganos subterráneos de la gran mayoría de las plantas superiores. Muchos autores identifican a las *micorrizas* como: “*la asociación simbiótica entre determinadas especies de hongos del suelo y las raicillas (pequeñas raíces), de diferentes especies de plantas*”. Es decir que, se trata de la unión armónica e íntima, de ayuda mutua y fraternal, entre un hongo y las raicillas de una planta (Rivera, 2007). En el Cuadro 1 se muestra la ubicación taxonómica de los hongos micorrízicos arbusculares.

Cuadro 1.- Ubicación taxonómica de los hongos micorrízicos arbusculares. Fuente: INVAM, 1998

Orden	Glomales					
Suborden	<i>Glominae</i>				<i>Gigasporinae</i>	
Familia	<i>Acaulosporaceae</i>		<i>Gomaceae</i>		<i>Gigasporaceae</i>	
Género	<i>Acauluspora</i>	<i>Entrophosphora</i>	<i>Glomus</i>	<i>Sclerocytis</i>	<i>Gigaspora</i>	<i>Scutellospora</i>

Las *micorrizas* son pequeñas raíces o pelos radicales de muchas especies, en su mayoría árboles, que se han infectado con hongos y forman una asociación de larga vida en la que el hongo vive dentro o sobre las células de las raíces, en la Figura 1 se muestran las estructuras que desarrollan las micorrizas dentro y fuera de la raíz. Ocurren algunos cambios morfológicos, en particular la formación de raíces cortas y muy ramificadas. Ciertos factores

desconocidos parecen estar involucradas en el establecimiento de asociaciones micorrízicas. La simbiosis micorrízica no es unilateral. El hongo absorbe nutrientes del huésped los cuales son vitamina B, alfa cetoácidos y aminoácidos. Por otra parte, la absorción de nutrientes minerales por las raíces se incrementa considerablemente, tal vez por la permeabilidad en las células radicales. Las asociaciones micorrízicas pueden ser complejas y extensas, involucrando más de un macrosimbionte. Se pensó originalmente que las plantas heterotróficas carentes de clorofila del género *Monotropa* (pipa de indios y otras) que viven en el suelo de bosques templados de coníferas, eran saprófitas; ahora se sabe que ellas obtienen su nutrición de los árboles vecinos mediante el paso de sales y de carbohidratos vía hifas de las *micorrizas*, las cuales están asociadas con sus propias raíces y las de los árboles cercanos (Ruíz, *et al.*, 2001).

Las *micorrizas* facilitan la absorción de todos los elementos minerales, pero sobre todo, la de los menos solubles y poco móviles en el suelo, es decir, el fosfato, el cobre y el zinc. El fósforo orgánico y el fósforo mineral insoluble que integra la mayor parte de este elemento presente en el suelo, son casi inaccesibles a las plantas. El fósforo, además de ser muy poco móvil, se encuentra en muy baja concentración alrededor de la raíz. Merece una mención especial el papel que tienen los hongos en el metabolismo del nitrógeno, especialmente las *ectomicorrizas* que son capaces de absorber varias formas nitrogenadas y transferir este nitrógeno a la planta en forma de aminoácidos. ([Http://www.biologia.edu.ar/fungi/micorrizas.html](http://www.biologia.edu.ar/fungi/micorrizas.html))



Figura 1. Esquema general de las estructuras desarrolladas por los hongos micorrízicos arbusculares dentro y fuera de la raíz colonizada. (a) ilustra el aspecto de las esporas formadas en el micelio externo, (b) los arbusculos o estructuras de intercambio entre el hongo y la planta a nivel intracelular y (c) el entramado de hifas que constituye el micelio externo (Fuente: http://www.ivic.ve/bid_fonacitII/micorrizas/Micorrizasconcepto.htm).

Microorganismos fijadores de nitrógeno

Los procesos naturales de fijación biológica del nitrógeno (FBN) tienen un papel importante en la activación de los sistemas agrícolas sustentables por su beneficio ambiental. El incremento de su aplicación puede mitigar la necesidad del uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos con su consiguiente efecto benéfico al ciclo del nitrógeno, el calentamiento global y el saneamiento de las aguas subterráneas y superficiales. Este proceso depende básicamente de la acción de los microorganismos en conjunto con las plantas. Existen algunas especies de microorganismos que poseen la habilidad de convertir el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4^+) mediante la acción de la enzima nitrogenasa. Estas especies son denominados diazotrofos y requieren de energía para realizar su metabolismo (Urzúa, 2005).

Dentro de los diazotrofos capaces de realizar este proceso se encuentran los denominados fijadores de vida libre, los cuales fijan N_2 atmosférico sin la cooperación de otras formas vivas, siendo la familia *Azotobacteriaceae* la que agrupa uno de los géneros más importantes utilizados en la biofertilización a diferentes cultivos. El género *Azotobacter* es uno de los microorganismos utilizados como biofertilizantes que más se aplica e investiga en Cuba y

en otras partes del mundo. Sus propiedades benéficas se ponen de manifiesto en una gran variedad de hortalizas, granos y otras plantas; se considera de menor importancia agrícola por incorporar modestas cantidades de nitrógeno al suelo. Bhattacharya y Chaudhuri (1993) reportan que *Azotobacter* es capaz de fijar de 20 a 30 kg. de N ha⁻¹ año, pero tanto *Azotobacter* como *Azospirillum* en determinadas condiciones su efecto beneficioso no solo se debe a la cantidad de N₂ atmosférico fijado, sino a la capacidad de producir vitaminas y sustancias estimuladoras del crecimiento como: ácido indolacético, ácido giberélico, citoquininas y vitaminas; las cuales influyen directamente en el desarrollo vegetal.

Otro grupo de microorganismos que se convierten en fijadores de N₂ cuando viven en asociaciones simbióticas con organismos superiores de vida son las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium*, las que establecen relaciones simbióticas con plantas leguminosas. Entre los diferentes sistemas biológicos capaces de fijar N₂ atmosférico, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa contribuye con la mayor cantidad aportada al ecosistema y a la producción de alimentos. Aunque hay diversas asociaciones que apoyan a la fijación biológica del N₂, en la mayoría de los lugares agrícolas la fuente primaria (80%) del nitrógeno fijado biológicamente ocurre a través de dicha simbiosis. Se estima que ésta puede oscilar entre 200 y 250 kg * N ha* año (FAO, 2004), calculándose que puede alcanzar el 20 % de la cantidad fijada anualmente sobre el planeta; por lo tanto, constituye la asociación más elaborada y eficiente entre plantas y microorganismos.

La primera indicación de que las plantas pueden fijar el nitrógeno del aire se obtuvo en 1833 por Boussingault, quien demostró que las leguminosas pueden aumentar el contenido de nitrógeno en el suelo. En 1886 los fisiólogos alemanes H. Wilfarth y H. Hellriegel demostraron que las bacterias que viven en los nódulos de las leguminosas eran las responsables del proceso. Las leguminosas son el grupo principal de plantas que fijan nitrógeno simbiótico siendo el simbiote una bacteria del género *Rhizobium*. Ciertas plantas no leguminosas tienen nódulos con microorganismos que pueden fijar nitrógeno. Por ejemplo; aliso (*Alnus* spp.), mirto de pantano (*Myrica gale*) y el *Hippophae rhamnoides* (Torres *et al.*, 2001).

Las ventajas de esta simbiosis son múltiples:

1. La planta puede autoabastecerse de nitrógeno, elevando considerablemente su contenido de proteínas.
2. Puede aportar nitrógeno a un cultivo acompañante de especies diferentes a las leguminosas (ej.: praderas asociadas compuestas por gramíneas y leguminosas).
3. Puede dejar nitrógeno disponible en el suelo para el cultivo siguiente en la rotación, siempre que se incorporen los rastrojos y se mineralice el nitrógeno. Una variante corresponde al uso de abonos verdes donde se establece un cultivo de leguminosas con el único objetivo de incorporarlo al suelo para promover la mineralización de su nitrógeno y suplir así, las necesidades del cultivo siguiente en la rotación.
4. La eficiencia de la utilización del nitrógeno fijado por parte de la planta es cercana al 100%; a continuación se muestra la utilización del nitrógeno fijado más energía metabólica de la planta y la acción enzimática utilizados en la reacción normal para que el nitrógeno se utilizado por la planta:
$$\text{N}_2 + 16 \text{ ATP} + 8\text{e}^- + 8\text{H}^+ \xrightarrow{\text{nitrogenasa}} 2\text{NH}_3 + 8\text{H}_2 + 16 \text{ ADP} + 16 \text{ Pi}$$
en comparación sólo con 50-60% de los fertilizantes nitrogenados aplicados al suelo.

Es necesario puntualizar que las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados sintéticos se pierden parcialmente por lixiviación, volatilización, desnitrificación e inmovilización microbiana, pudiendo convertirse en contaminantes de suelos, plantas, aguas, animales e, inclusive, para los seres humanos (Granados *et al.*, 2001).

Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas (RPCP)

Las bacterias son una colección de diversos microorganismos procariotas que poseen diferente morfología y fisiología. Las bacterias pueden ser según su forma: esféricas (cocos), bacilares (bacilos) o retorcidas en hélice (vibriones y espirilos). Algunas poseen flagelos o cilios que les permite moverse en un medio líquido. Unas son fotosintéticas, como las cianobacterias, que obtienen energía de la luz solar y carbono del dióxido de carbono. Otras bacterias obtienen energía del metabolismo de compuestos inorgánicos como el amonio y el

sulfuro. Se conoce un gran número de bacterias de vida libre o asociativa que fijan N_2 , pero solo algunas destacan por su potencial como biofertilizantes o promotoras de crecimiento. Entre los géneros más conocidos dentro del grupo de aerobias están *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derrxia* y *Azospirillum*; en las aerobias facultativas se presentan *Enterobacter*, *Pseudomonas*, y *Bacillus* y los géneros de bacteria anaerobia *Metanobacterium*, *Clostridium* y *Desulfovibrio* (Ferrera-Cerrato, 1995 y Rodríguez, 1995). La Figura 2 muestra un esquema que ilustra los componentes u organelos principales de una bacteria.

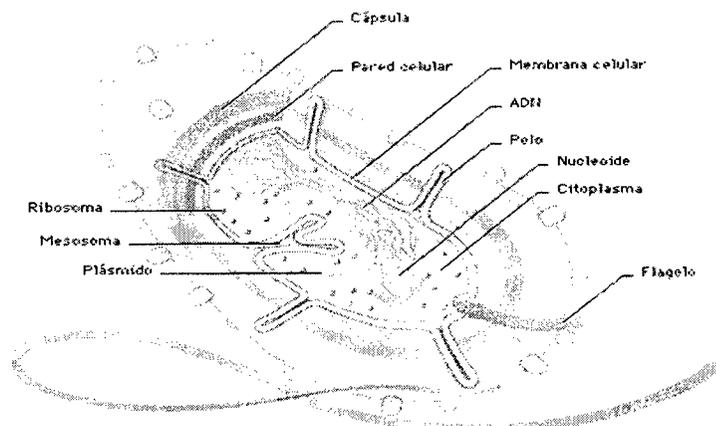


Figura 2. Principales componentes y organelos de las bacterias.
(Fuente: www.monografias.com/trabajos39/bacterias/bac1.gif)

La propuesta de la biotecnología ecológica es ofrecer alternativas al control químico de las enfermedades de las plantas, como los pesticidas o fertilizantes químicos (Dobbelaere *et al.*, 2003). Entre estas opciones ecológicas, esta el desarrollo de inoculaciones de rizobacterias promotoras del crecimiento en la planta para incrementar su uso globalmente. Por ejemplo, actualmente hay cerca de 25 millones de ha de soya inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* en Sudamérica y cerca de 500,000 ha de trigo y maíz inoculados en Argentina y México con productos comerciales de *Azospirillum* (Izaguirre-Mayoral *et al.*, 2007).

Las bacterias promotoras de crecimiento son conocidas como RPCP o PGPR (*Promoting Growth Plant Rhizobacteria*) y fue definido por Kloepper (1989) como bacterias habitantes de la raíz que estimulan significativamente el crecimiento de las plantas e incrementan la tolerancia a otros microorganismos causantes de enfermedades.

Las RPCP son bacterias exógenas introducidas en los agroecosistemas que actúan positivamente en el desarrollo de la planta. Sin embargo, la reproducibilidad de las bacterias corrige el potencial de los efectos de la inoculación en la asociación de la raíz de la planta con comunidades microbianas que son fuentes a las que se le deben prestar más atención. Para conocer esto se debe comprender en detalle las interacciones mutualistas entre inoculantes y los microorganismos requeridos residentes en la rizósfera. Mecanismos usados por las RPCP pueden ser directos o indirectos; lo anterior conlleva a la secreción de reguladores de crecimiento, y lo último que ocurre durante la producción de compuestos antimicrobianos es la reducción de los efectos letales de los fitopatógenos. Los diferentes modos de acción pueden conducir a diferentes relaciones entre un inoculante y las comunidades microbianas de la raíz. Las comunidades de rizobacterias también son afectadas por la planta, ingeniería genética, el estrés ambiental y las prácticas agrícolas. Estos factores parecen determinar la estructura de la comunidad más que un agente activo exógeno introducido a las RPCP en niveles altos (Dos Santos, 2005).

La mayoría de las RPCP son activadas cuando se aproximan o entran en contacto con la raíz de la planta inoculada, es decir en la rizósfera. La mayoría de las comunidades de rizobacterias son atraídas hacia el suelo y pocas son originadas de la asociación semilla-microorganismo (Costa *et al.*, 2006). La rizósfera es un complejo habitable para la acción del desarrollo radicular (principalmente a la residencia de los microorganismos) con componentes bióticos y abióticos del suelo, que también responden a estos medios. La introducción de una gran cantidad de bacterias exógenas como inóculo afecta el potencial de los microorganismos nativos, al igual, un inóculo puede ser afectado por estos. Tales interferencias pueden ser incrementadas y disminuir el efecto de las RPCP efectivas, de allí la necesidad de estudiar la ecología microbiana de la rizósfera siguiendo las aplicaciones de RPCP (Dos Santos, 2005).

BIOFERTILIZANTES

Durante las cuatro décadas pasadas hemos sido testigos de la proliferación de la población humana y la multiplicación de la producción de alimentos. La nutrición mineral de la planta ha desempeñado un papel clave en el incremento en el suministro de alimento. El aumento en la producción de los cultivos ha sido posible a través del uso comercial de los

fertilizantes hechos por el hombre. El uso de fertilizantes nitrogenados se ha incrementado nueve veces y los fosforados más de cuatro veces (Vance, 2001). El enorme aumento en la fertilización nitrogenada y fosforada, además de la introducción de técnicas de alta productividad y de sistemas intensivos agrícolas, han permitido que estos sucedan con costos relativamente bajos (Vance, 2001). El incremento del uso de fertilizantes y los sistemas de alta producción también han generado problemas en el medio ambiente, tales como el deterioro de la calidad del suelo, del agua superficial y de las aguas subterráneas, así como la contaminación del aire, la reducción de la biodiversidad y la represión de la función de los ecosistemas (Socolow, 1999; Vance, 2001).

La contaminación ambiental como resultado de una mayor disponibilidad de nutrientes sintéticos puede ser directa o indirecta. Directamente, es mediante el uso indebido, excesivo o inadecuado manejo de los fertilizantes, ya que puede resultar que los fertilizantes se percolen, volaticen, acidifiquen y se desnitrifiquen. Indirectamente, es mediante la producción y transporte (combustión de combustible fósil) de fertilizantes resultado del CO₂ del aire y la contaminación con nitrógeno, los cuales son depositados dentro de los ecosistemas terrestres. Dentro del contexto de sustentabilidad es fundamental lograr el balance químico y biológico que permita mantener la capacidad productiva del suelo durante la producción agrícola. Sin embargo, existen múltiples factores que impactan la condición del suelo y pueden alterar dicho balance. Ejemplo de ello son las labores de cultivo, tales como la compactación del suelo y la aplicación de compuestos químicos (por ejemplo fertilizantes, pesticidas, etc.). Un componente esencial para mantener el equilibrio de los agroecosistemas son los microorganismos que habitan la rizósfera, ya que éstos soportan el desarrollo de las plantas por diferentes rutas. La pérdida de alguna de las funciones de los microorganismos rizosféricos puede derivar en un desequilibrio y por consecuencia en la pérdida de la sustentabilidad del sistema (Mena-Violante *et al.*, 2007).

El suelo como base de los recursos y de la producción se encuentra enmarcado en un ambiente complejo, heterogéneo y frágil, que evidencia una alta susceptibilidad a la erosión y una baja fertilidad natural, con efectos en la producción de los cultivos, en la productividad del trabajo y en la factibilidad del establecimiento de los sistemas productivos sustentables. La recuperación y el mantenimiento de la fertilidad de los suelos sobre una base sustentable, constituyen un factor de gran importancia en el desarrollo de la producción agropecuaria a

nivel mundial. De ahí la importancia de intensificar los estudios que permitan mejorar su estabilidad y productividad a largo plazo. En las dos últimas décadas, una de las áreas de estudio que actualmente están impactando en la agricultura, es la aplicación de biofertilizantes a través del empleo de microorganismos como bacterias y hongos que viven en intercambio simbiótico con las plantas, lo cual ha resultado muy positivo para fertilizar diversos cultivos (Rueda *et al.*, 2007).

Los biofertilizantes para uso agrícola son elaborados con diferentes microorganismos que presentan un efecto positivo sobre algunos procesos de descomposición y síntesis que se dan en el suelo; los microorganismos se propagan en medios de cultivo específicos (condiciones adecuadas) para luego adicionarlos a un soporte o sustrato que aporta el medio para la sobrevivencia y conservación de los microorganismos. Dichos productos pueden ser líquidos o sólidos, los cuales, una vez aplicados al suelo, a las semillas o a las plantas, encuentran las condiciones adecuadas para iniciar su actividad biológica (mayor velocidad de descomposición de sustratos y aporte de nutrientes, entre otros). Estos productos pueden contener uno o más microorganismos, de tal forma que se mantengan los principios básicos de los ecosistemas naturales, los cuales son sustentables por sus constituyentes, la calidad y cantidad de sus poblaciones. Otro aspecto importante es que los suelos presentan grandes variaciones con respecto al tipo y número de microorganismos. Generalmente los suelos más fértiles, menos degradados, con mayor contenido de materia orgánica y menos contaminada con productos químicos, permiten mantener poblaciones altas de microorganismos, con una mayor diversidad de especies. El éxito en la aplicación de los inoculantes dependerá del conocimiento de los requerimientos nutricionales del cultivo, así como de su interacción con otros microorganismos, incluyendo su habilidad para coexistir en cultivos mezclados, tanto antes como después de su aplicación al suelo (Lira-Saldívar *et al.*, 2007).

Tomando en cuenta lo expuesto, la utilización de los biofertilizantes en los sistemas productivos es una alternativa viable y sumamente importante para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sustentable, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad. En la actualidad, el uso de biofertilizantes, aplicados como inoculantes dentro de los sistemas de producción agrícola, está teniendo un gran auge,

especialmente para lograr una mayor disponibilidad de los nutrientes que permitan un rendimiento mayor de los cultivos, con la conservación del medio ambiente y una mayor tasa de retorno de la inversión (Rueda *et al.*, 2007).

Los nutrientes más limitantes para el desarrollo de los cultivos son el nitrógeno (N) y el fósforo (P) (Schachtman *et al.*, 1998). Si bien el suelo puede contener altas cantidades de cualquiera de los dos nutrientes, más no están fácilmente disponibles para el uso de las plantas. La mayoría del N está ligado a la materia orgánica del suelo. Regularmente después de la fertilización, las plantas compiten con los microorganismos del suelo para disponer fácilmente del N soluble. Los problemas con el P son diferentes. En suelos ácidos, cuando se agregan cantidades considerables de fertilizantes, el P precipita con hierro o aluminio, mientras que en suelos alcalinos el P precipita como fosfato de calcio (Hinsinger, 2001). Por consiguiente, la deficiencia de P puede ser un problema difícil de superar a través de la adición de fertilizantes fosfatados. La fertilización extensiva requerida supera los límites de N y P que pueden conducir a una fuente de escurrimiento, y los nutrientes solubles pueden lixiviarse fácilmente en los cuerpos de agua o en las aguas subterráneas. Por ejemplo, el fósforo lixiviado desde los sistemas agrícolas, al igual que el nitrógeno es lo primero en causar la eutrofización (acumulación de nitrógeno) y la hipoxia (falta de oxígeno) en lagos y estuarios a nivel mundial (Vance, 2001).

Asociaciones simbióticas entre microorganismos y plantas

Está demostrado el efecto beneficioso que tiene el uso de diferentes microorganismos del suelo como alternativa para la nutrición de las plantas, la defensa de los suelos contra la degradación y la protección fitosanitaria de los cultivos, formando parte inseparable de formas diferentes y métodos de agricultura sustentable. Estos microorganismos (que por naturaleza son organismos del suelo) se han logrado aislarlos y reproducirlos de manera vertiginosa, convirtiéndolos en grandes aliados del productor y de las personas que los emplean para diferentes fines y propósitos naturales y ecológicos. La simbiosis puede considerarse como una forma de parasitismo recíproco en el que uno o ambos socios se benefician de la asociación y ninguno sufre a causa de ella. Son posibles muchos y distintos niveles de asociación, desde una libre y casual agregación de especies diferentes hasta la relación

estrecha, precisa y permanente de nódulos radicales o líquenes. Todas las simbiosis poseen algo en común: permite a uno o ambos socios soportar los rigores del ambiente (Rivera, 2007).

Las asociaciones simbióticas pueden ser FACULTATIVAS, donde los socios pueden vivir ya sea solos o en asociación, u OBLIGADAS, en la que uno o ambos socios son incapaces de sobrevivir independientemente. Las EPIFITAS sólo crecen o se apoyan sobre su huésped; tal es el caso de los helechos y ciertas orquídeas tropicales que se apoyan sobre troncos de árboles para poder tener un apoyo físico y obtener del aire y el agua de lluvia los elementos indispensables para su crecimiento y desarrollo en esa asociación www.diccionariosdigitales.net/GLOSARIOS%20y%20VOCABULARIOS/Botanica-9-MICORRIZAS.

Función de las *micorrizas* en las plantas

Las plantas con *micorrizas* en general realizan cambios en el estatus nutricional de las plantas (incorporación de P, N, etc.), sin embargo, también se han reportado que promueven cambios fisiológicos. Así, las plantas que se asocian con hongos micorrízicos arbusculares (HMA), alteran los niveles de sustancias reguladoras de crecimiento, metabolitos secundarios, la fijación de nitrógeno por bacterias relacionadas a *Rhizobium* y tal vez una de las alteraciones más significativas son los cambios en el intercambio de gases (Rojas-Andrade *et al.*, 2003). Las plantas formadoras de MA incrementan la tasa fotosintética, y este incremento es el resultado de las modificaciones en las fases luminosa y oscura. Estos cambios están influenciados por el tipo de HMA, el material genético de la planta y de las condiciones ambientales. Reportes mas recientes, sugieren que la fotorespiración en las plantas de tomate se reduce y esta se puede mantener más tiempo fotosintéticamente activa (Mena-Violante *et al.*, 2007).

Beneficios de las *micorrizas*

De acuerdo con reportes recientes (Rivera, 2007) se mencionan los siguientes beneficios de las *micorrizas*:

- Incrementan el área fisiológicamente activa de las raíces.
- Incrementan la captación de agua en las plantas y los nutrientes como fósforo, nitrógeno, potasio y calcio del suelo.
- Incrementan la tolerancia de las plantas a las temperaturas del suelo y a la acidez extrema causadas por la presencia de aluminio, magnesio y azufre.
- Proveen protección contra ciertos hongos patógenos y nematodos.
- Inducen relaciones hormonales, provocando que las raíces alimentadoras permanezcan fisiológicamente activas por periodos mayores que las raíces no micorrizadas.

Diferencias entre tipos de *micorrizas*

Diferentes taxónomos expresan que existen varios tipos o grupos de *micorrizas*, aunque los de mayor importancia se distribuyen en tres grupos: *Endomicorrizas*, *Ectomicorrizas* y *Ectoendomicorrizas* (Mendoza y Ramírez, 2001).

Las *Endomicorrizas* o *Micorrizas Endotróficas*

Una gran cantidad de hifas fúngicas (hongos) existentes en el suelo invaden las partes jóvenes de las raíces y penetran a veces hasta las células del parénquima sub epidérmico. Esta acción no afecta a las células de los tejidos y se establece el intercambio a ese nivel celular. El micelio de los hongos penetra en el tejido cortical de la raíz de la planta y provoca una infección progresiva de las células de la corteza. Un ejemplo de este proceso, se puede ver en la Micorriza Vesículo-Arbuscular (MVA), que forma en las células de la corteza extremos de micelios ramificados, similares a un árbol (arbusculos), actuando en calidad de órganos nutritivos mediante los cuales tiene lugar el metabolismo simbiótico entre el hongo y la planta. Además, se forman versículos o nódulos como órganos de reserva (Reis *et al.*, 1999).

Los micelios fúngicos no solo penetran en la capa cortical de la raíz, sino que se alojan en el interior de sus células, y en parte son digeridas por la planta hospedante, que se benefician de sus albuminoides y nitrógeno orgánico. Se forman *endomicorrizas* en las plantas de las familias *Ericáceas*, *Liliáceas* y en las *Orquidíaceas*. En estas últimas han sido mejor estudiada que en las demás. Se encuentran *endomicorrizas* en muchas plantas herbáceas

(inclusive muchas plantas de cultivo, también en plantas leñosas, tales como palmeras, café, té, cacao y cítricos) (Boriel *et al.*, 2005).

- *Endomicorrizas* Ericoides: En este caso, las plantas participantes en la asociación simbiótica son de la familia *Ericáceas* y los hongos pueden ser ascomicetos o basidiomicetos. Su característica principal es su versatilidad en cuanto al uso de las fuentes de C, N y P, ya sean de origen orgánico o no.
- *Endomicorrizas* Orquidoides: Formadas entre plantas de la familia *Orquidaceae* y hongos basidiomicetos. En la fase heterótrofa del ciclo de vida de esta familia de plantas, reciben compuestos carbonados a partir del hongo. Como características morfológicas del hongo, cabe destacar que tras penetrar en las células de la raíz forma marañas dentro de la célula hospedera previa invaginación de la membrana plasmática, así como agregados poco organizados de hifas (pelotones) que liberan los nutrientes cuando degeneran.
- *Endomicorrizas* arbusculares: Los hongos implicados en la formación de estas, pertenecen al phylum *Glomeromycota*, y dicha asociación la realizan con la mayoría de las plantas terrestres. La principal característica morfológica de estos hongos es su ramificación dicotómica repetida una vez que han penetrado en las células del córtex de la raíz, para la formación de los arbusculos, estructura típica de la colonización de dichos hongos. Algunas especies de estos hongos forman otras estructuras en el interior de la raíz llamada vesículas, que contienen sustancias de reserva y por las que también se ha conocido a éstos con el nombre de vesículo-arbusculares.

En las *endomicorrizas* el micelio invade la raíz, inicialmente esta penetración es intercelular, pero luego penetra en el interior de las células radicales, desde la rizodermis hasta las células corticales. En la Figura 3 se ilustra el proceso antes señalado.

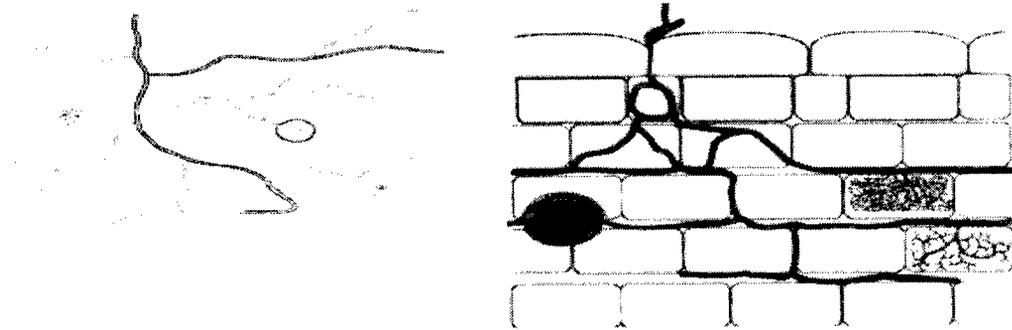


Figura 3. Esquemas que ilustran la invasión de la micorriza producida por *Glomus sp.* en la región de la endodermis del sistema radicular de las plantas, señalando que las hifas del hongo crecen principalmente en la región de las paredes celulares y luego invaden el citoplasma de las células. (Fuente: <http://www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza/>)

Las *micorrizas* provocan pocos cambios en la estructura de la raíz; generalmente no se observa un crecimiento denso de hifas en la superficie de la raíz, o sea no hay un manto o crecimiento micelial. Sin embargo si hay una red micelial interna. El micelio penetra en la raíz, donde inicialmente es intercelular, pero luego penetra en el interior de las células radicales, desde la rizodermis hasta las células corticales. Una vez dentro de las células, forma minúsculas arborescencias muy ramificadas que se llaman arbusculos. Estos arbusculos son los que aseguran una gran superficie de contacto entre ambos simbios. Los arbusculos tienen una vida efímera, de algunos días hasta algunas semanas, y siempre terminan por ser digeridos por la planta hospedera (<http://www.biologia.edu.ar/fungi/micorrizas.html>).

Las Ectomicorrizas o Micorrizas Ectotróficas

Las hifas fúngicas permanecen en la superficie epidérmica, alrededor de la cual forman una vellosidad que reemplaza a los pelos radicales. Rodean de una densa capa de micelios (Red de Harting), las partes más finas de las raíces, hasta envolverlas por completo, incluso en el ápice vegetativo de la misma. Las hifas de los hongos envuelven las raíces de las plantas, penetran intracelularmente en el parénquima de la corteza, sin infectar sus células. Los hongos que las forman son: Basidiomicetes y Ascomicetes principalmente. Se forman *Ectomicorrizas* principalmente sobre especies forestales y leñosas: avellanos, abedules, coníferas, etc. Sus filamentos micelares, aunque pueden insinuarse a través de los espacios intercelulares de la raíz, no penetran en sus células. Si las *Ectomicorrizas* no están en contacto

con una raíz su crecimiento es limitado y pueden morir rápidamente. Colonizan las raíces por un corto período de tiempo que puede estar entre los 5 y 12 días (Rivera, 2007).

En las *ectomicorrizas* el micelio invade la raíz sin entrar en el interior de las células, de aquí el nombre de *ectomicorrizas*. Se caracteriza por una modificación morfológica de la raíz que pierde sus pelos absorbentes y generalmente los extremos se ramifican profusamente y se acortan ensanchándose (Figura 4).



Figura 4. Ilustración que muestra las raíces modificadas en la ectomicorriza formada por un hongo desconocido sobre la planta llamada *Fagus sylvatica* (Fuente: <http://www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza/ecm.html>).

El extremo de una raíz ectomicorrizada típicamente está cubierta por un manto de hifas, como una vaina, que puede ser desde una capa floja hasta pseudo-parenquimática. Desde este manto se extiende una red de hifas entre las primeras capas de células de la corteza radical y rara vez llegan hasta la endodermis, pero sin entrar en el interior de las células, de aquí el nombre de *ectomicorrizas*. Esta red se llama "red de Hartig", donde las hifas también pueden tener formas muy variadas. Las *ectomicorrizas* están ampliamente dispersas en la naturaleza y se estima que el 10% de la flora mundial presenta este tipo de asociación. Principalmente las familias Pináceas, Betuláceas, Fagáceas, y también Ericáceas y algunas Myrtaceas, Juglyáceas y Salicáceas (Borie *et al.*, 2005). Los hongos que forman estas *micorrizas* son en general los conocidos hongos de sombrero, como "amanitas" y "boletos". Solo en Norteamérica son más de 2.000 especies, en su mayoría Basidiomycetes y algunos Ascomycetes ("trufas"). Muchos de estos hongos pueden ser cultivados en cultivo puro, aislados de su planta huésped, pero no pueden formar carpóforos en su ausencia (Reis *et al.*, 1999).

Las Ectoendomicorrizas o Micorrizas Ectoendotróficas

Constituyen una estructura intermedia: pequeño grupo de plantas y micelios. Es un grupo menos numeroso, sus funciones son similares al grupo de *Ectomicorrizas*, aunque también desarrollan funciones similares a algunas *Endomicorrizas*. Las *Ectoendomicorrizas* son frecuentísimas en las plantas leñosas, las coníferas, cupulíferas y betuláceas, que son los elementos mas importantes de la vegetación forestal de las regiones templadas. Hay otros grupos de *micorrizas*, pero que no tienen interés económico, ni ecológico. Algunas plantas acuáticas y pantanosas no forman *micorrizas* (Fogar *et al.*, 2002)

Cuadro 2. Diferentes tipos de *micorrizas* y sus características morfológicas (Granados *et al.*, 2001).

DENOMINACIÓN CLASICA	DENOMINACIÓN ACTUAL		CARACTERÍSTICAS	PLANTA HUESPED	HONGOS QUE LO FORMAN
ECTOMICORRIZAS	Formadoras de "manto"		Forman mantos que cubren a la raíz. Hifas solo intercelulares que forman la red de Harting. Hongo de micelio ceptado	<i>Betulaceae</i> <i>Fagaceae</i> <i>Pinaceae</i> <i>Eucaliptus</i>	<i>Agaricaceae</i> <i>Boletaceae</i> Otros
	Vesiculo-arbusculares		Desarrollo mayoritario del hongo dentro de la raíz. Hifas externas no formadas de manto. Micelio no ceptado, salvo en hifas viejas. Hifas inter e intracelulares.	Se han encontrado en la mayoría de las plantas que viven sobre la corteza terrestre.	Ficomicetos microscópicos pertenecientes a la familia <i>Endogonaceae</i>
ENDOMICORRIZAS	Ericáceas	Ericoides	Rudimento de manto. Hifas inter e intracelulares. No forman vesículas ni arbusculos.	<i>Ericaceae</i> <i>Epicradeceae</i> <i>Empetraceae</i>	<i>Ascomicetos</i>
		Arbutoides	Forman mantos. Hifas intra e intercelulares.	<i>Arbustus</i> <i>Arctostaphylos</i> <i>Pyrolaceae</i> <i>Monotropaceae</i>	<i>Boletus</i>
	Orquidáceas.		La planta huésped tiene un período de su ciclo de vida heterótrofo durante el cual, para sobrevivir, necesita ser infectado por un hongo micorrízico. La infección del huésped por el hongo puede evolucionar a micorriza o parasitismo.	<i>Orchidaceae</i>	<i>Basidomicetos</i>

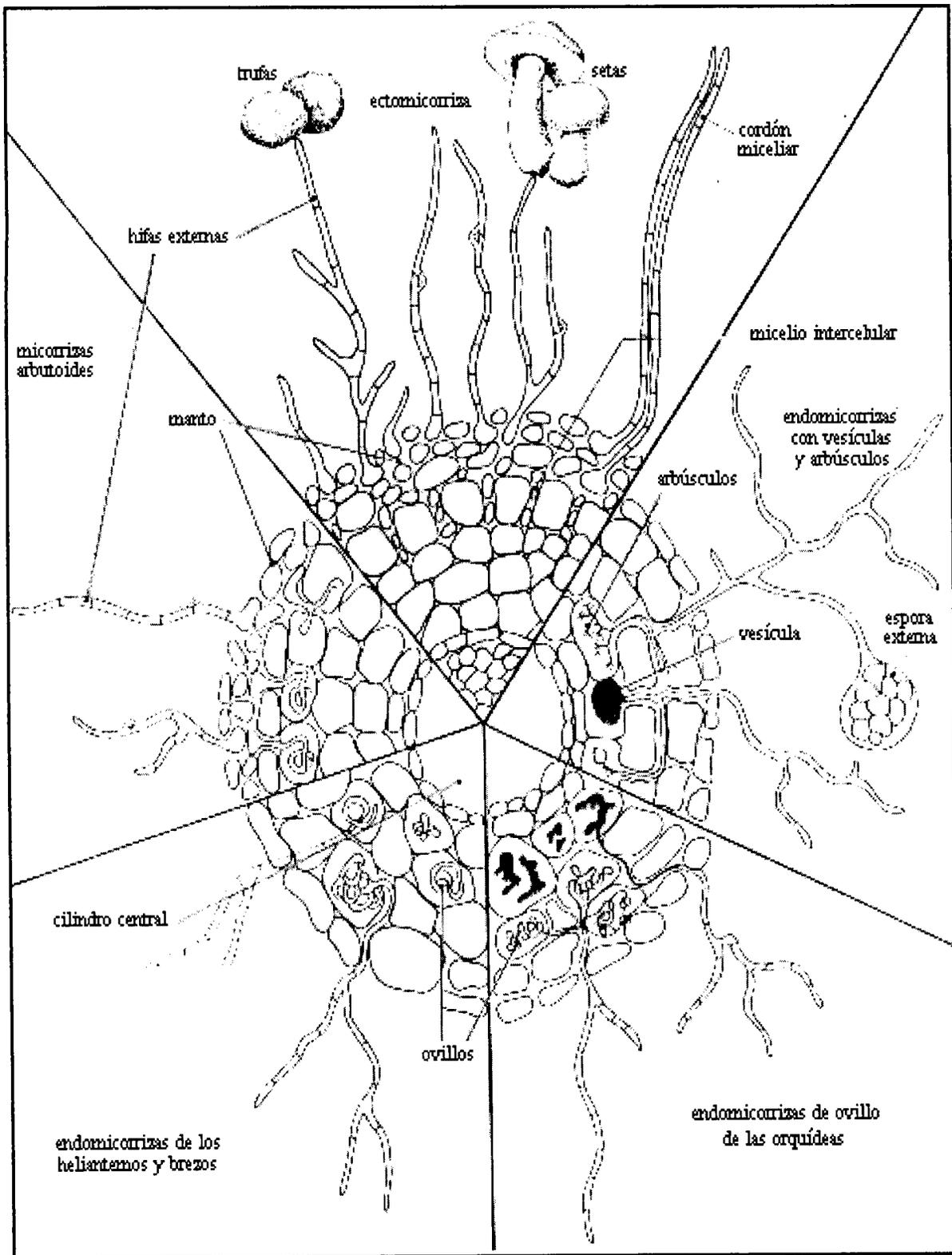


Figura 5. Simbiosis del hongo con la raíz de los diferentes tipos de micorrizas (Rivera, 2007).

Beneficios de las ecto y endomicorrizas en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Se puede afirmar que el principal beneficio que realizan las *micorrizas* está relacionado con la nutrición de las plantas. Este proceso de la nutrición por medio de las *micorrizas* está extremadamente difundido entre los vegetales, tiene notable importancia porque permite la vida de las plantas en determinadas condiciones y facilita la toma de los alimentos por parte de las plantas superiores, en competencia con la infinita y mucho más adaptable microflora del suelo. Son muchos los beneficios que nos brindan las *micorrizas* para la planta, que las convierten en fieles aliadas de los productores, empresarios, investigadores, científicos y población en general. A continuación tratamos de resumir los beneficios más importantes que pueden brindar las *micorrizas* (Rivera, 2007):

1. Una mejor asimilación de los nutrientes en las plantas, que facilita un aumento de la producción y una mayor calidad biológica de ésta.
2. Una mayor tolerancia de las plantas frente a muchos factores de estrés: sequía, desequilibrios en el pH, contenidos altos de sales, exceso de viento, entre otros. Esto se debe a que facilita una adecuada evapo-transpiración de la planta y un mejor funcionamiento fisiológico de éstas en sentido general.
3. Al estar mejor nutridas las plantas, promueve en éstas una mayor resistencia frente a microorganismos patógenos.
4. Es sumamente importante para el crecimiento de las plantas, en aquellas zonas o regiones, en las cuales los factores importantes para la producción agrícola, se encuentran por debajo del estado óptimo para el desarrollo de las plantas (dunas de arena, suelos pobres, superficies devastadas, etc.).
5. El empleo de las *micorrizas* significa un ahorro de insumos y una mejor protección del medio ambiente.
6. Un marcado incremento en los procesos de absorción y traslocación de nutrientes como: N, P, K, Ca, Mg, S, Zn, Cu, Mo, Fe, Mn, entre otros.
7. Un aspecto de gran interés en el empleo de las *micorrizas* es lo relacionado a la nutrición del fósforo (P). Éstas desempeñan un papel importante en la absorción del P presente en los suelos principalmente en las zonas tropicales donde las cantidades de P asimilables a las plantas son frecuentemente bajas:

- Generalmente bajo estas condiciones, en la zona de crecimiento radical ocurre un rápido agotamiento del P. Los mecanismos químicos involucrados en la absorción de este elemento por el hongo se desconocen, sin embargo se sabe que toma el P en forma de ión ortofosfato y lo transporta a través de las hifas en forma de polifosfato.
 - Se logra una mayor eficiencia en el uso de los fertilizantes fosfóricos aplicados en suelos deficientes y con elevada capacidad de fijación de los fosfatos, predominantes en las zonas tropicales.
 - Además del efecto directo sobre el crecimiento de las plantas, aumento en el crecimiento de las raíces y la fijación biológica del N en las plantas, el cual es deficiente en la mayoría de los suelos tropicales.
8. Una mayor resistencia de las plantas a las toxinas.
 9. Por su parte, en suelos afectados por los efectos negativos de los metales pesados, se ha comprobado que las plantas micorrizadas poseen mayor resistencia, gracias a la capacidad que obtiene para inmovilizar los metales en la raíz, impidiendo que éstos pasen a la parte aérea de la planta.

Benéficos que provocan las *micorrizas* en los suelos

Las *micorrizas* realizan varias funciones en el suelo que incrementan mucho su potencial agro productivo y sus posibilidades de sostén y mantenimiento de las diferentes especies vegetales. A modo de resumen mencionamos los siguientes efectos (Mendoza y Ramírez, 2001):

1. Las *micorrizas* prolongan el sistema radical de las plantas, y ello facilita una mayor retención física de las partículas del suelo, limitando los efectos dañinos de la erosión causada por el agua.
2. Son las *micorrizas* regeneradoras de suelos degradados, ya que al facilitar el mejoramiento de la estructura de éste, incrementa sus posibilidades de retención de humedad, aireación y descomposición de la materia orgánica.

3. La presencia de *micorrizas* en los suelos, moviliza una gran cantidad de nutrientes que antes no estaban a disposición de las plantas, por lo que incrementa la fertilidad de éstos.
4. Las *micorrizas* mejoran la capacidad productiva de suelos poco productivos, como los afectados por la desertificación, la salinización, la erosión hídrica y eólica.
5. Otro de los efectos mas interesantes de las *micorrizas* en el suelo, es su papel en relación con el ecosistema en el que se desarrollan; así interaccionan con diversos microorganismos del suelo, estableciendo cooperaciones provechosas con unos y compitiendo con otros generalmente de tipo patógeno, e incluso interactuando con la microfauna de la rizósfera (nematodos, áfidos, ácaros, entre otros).
6. En zonas áridas y semiáridas las *micorrizas*, pueden ayudar a las plantas simbiotes a captar agua para tolerar el estrés hídrico.
7. Las *micorrizas* generan sustancias aglomerantes (glomalina), que actúan como cemento o aglutinantes, promoviendo una mayor capacidad y estabilidad física, química y biológica de los suelos.

Proceso de infección de las *micorrizas*.

Hay una coincidencia casi general, la simbiosis para formar *micorrizas*, se produce en etapas o pasos (Tejeda *et al.*, 1997):

1. Se produce una “identificación” mutua planta-hongo / hongo-planta, en la rizósfera, o en regiones próximas a los pelos radicales. Este reconocimiento lo facilitan al parecer, sustancias exudadas o emitidas por la raíz, que provocan el crecimiento del micelio y un biotropismo positivo del mismo hacia la raíz.
2. El acercamiento y el “acoplamiento” progresivo y gradual del micelio y la raicilla origina el contacto intercelular, al formarse una estructura que amarra y ata ambas biomásas.
3. La “colonización” causa los cambios morfológicos y estructurales tanto en los tejidos colonizados por el hongo, como en la organización de la pared celular de la raíz.
4. Se produce la “integración fisiológica” de ambos simbiotes (hongo-raíz).

5. Por último se origina una “alteración” de las actividades enzimáticas, que se coordinan entre los simbioses para integrar sus procesos metabólicos.

Este proceso de asociación para formar *micorrizas* provoca alteraciones morfológicas y anatómicas en las plantas colonizadas tales como: cambios en la relación tallo-raíz, en la estructura de los tejidos radicales, en el número de cloroplastos, el aumento de la lignificación, la alteración de los balances hormonales, etc. Efectos que no son sólo explicables como una simple mejora nutritiva de la planta, debido al aumento de la eficacia en la absorción de los nutrientes por la raíz, gracias a la formación de la micorriza, sino que responde a cambios metabólicos más profundos y complejos debidos a la integración fisiológica de los simbioses. Si bien las asociaciones micorrízicas se consideran en general no específicas, es decir, que cualquier hongo simbiote puede colonizar cualquier planta receptiva, existen sin embargo «algunas preferencias» o una mejor afinidad compatibilidad entre determinadas parejas hongo / planta (Bidwell, 1993).

Infección de hongos micorrízicos arbusculares (HMA).

Bolan, (1991) cita que el hongo penetra en el interior de las células, el huésped, por reacción de defensa, sintetiza fibras de polisacáridos en la interfase del arbusculo y la membrana celular. El establecimiento de las HMA tiene tres fases.

1. Latencia; de 16 a 32 días
2. Logarítmica de 4 a 6 semanas
3. Estabilización de 1 a 2 meses

La modificación de las propiedades de absorción nutrimental de las raíces micorrizadas depende de (Mendoza y Ramírez, 2001):

- a) El desarrollo de las hifas extramatriciales en el suelo
- b) Absorción de P por las hifas
- c) Translocación de P a través de las hifas a distancias considerables
- d) La transferencia de P desde el hongo hacia las células radiales.

La colonización de las raíces por HMA se extiende por la epidermis y el parénquima cortical, sin penetrar el endodermo ni el tejido vascular y meristemático, estableciendo una marcada diferencia con las infecciones radiales de los hongos patógenos que sí penetran los haces conductores y los meristemos (Hernández, 1991).

La simbiosis comienza con la emisión del tubo germinativo de la espora en el suelo, al encontrar condiciones favorables, después el micelio del hongo crece a través del suelo hasta encontrar una raíz hospedera, donde forma una estructura similar a un apresorio y penetra entre las células epidérmicas o los pelos radicales. La penetración comienza con la colonización del tejido parenquimatoso de la raíz, y se forman los arbuscúlos. Por cada metro de raíz colonizada se producen entre 7 y 250 m de hifas externas de los hongos MA. La hifa ramificada se encuentra rodeada por una membrana plasmática de las células del parénquima cortical, siendo el espacio apoplástico producido entre la membrana plasmática y el hongo, la zona de intercambio de los nutrientes. La vida del arbuscúlo es muy corta, inferior a 15 días. Mediante microscopía electrónica, se determinó que el contenido celular de los arbuscúlos es el de una “célula” metabólicamente activa, con gran cantidad de mitocondrias, cuerpos protéicos, núcleos, pequeñas vacuolas y cuerpos polivesiculares. La pared celular de los arbuscúlos, se mantiene excepcionalmente delgada e inmadura a lo largo de las ramas de estas estructuras (Soroa *et al.*, 1999).

Las vesículas se forman generalmente en los extremos de las hifas del hongo y pueden producirse a lo largo de todo el parénquima cortical colonizado; suelen aparecer más tarde que los arbuscúlos y son considerados órganos de reserva, principalmente lípidos. La colonización del hongo puede extenderse por la superficie de la raíz y penetrar en ésta, el grado de infección de las raíces varía con la naturaleza de la planta hospedante, el estado nutricional del suelo y las condiciones climáticas donde la planta está creciendo. Cuando la infección interna está bien establecida, las hifas del hongo pueden crecer externamente desde la raíz de la planta hacia el suelo (micelio externo) y explorar un volumen de suelo inaccesible a las raíces (Bago *et al.*, 2001).

Los hongos formadores de *micorrizas* arbusculares producen normalmente esporas a partir del micelio externo, y también en algunos casos, las forman en el interior de la raíz a

partir del micelio interno (Bago *et al.*, 2001). Los arbusculos desarrollados se mantienen viables durante unas tres semanas, después esporulan en sus ramas, finalmente los arbusculos terminan convertidos en un grupo de esporas, las cuales pueden permanecer inalteradas en el suelo por mucho tiempo, mientras que las hifas del hongo se colapsan tras una permanencia en el suelo de 2 a 4 semanas si no encuentran una raíz hospedera. En la Figura 6 se describe el ciclo de vida de uno de los mas importantes hongo micorrízicos arbusculares que ya se está comercializando (*Glomus intraradices*).

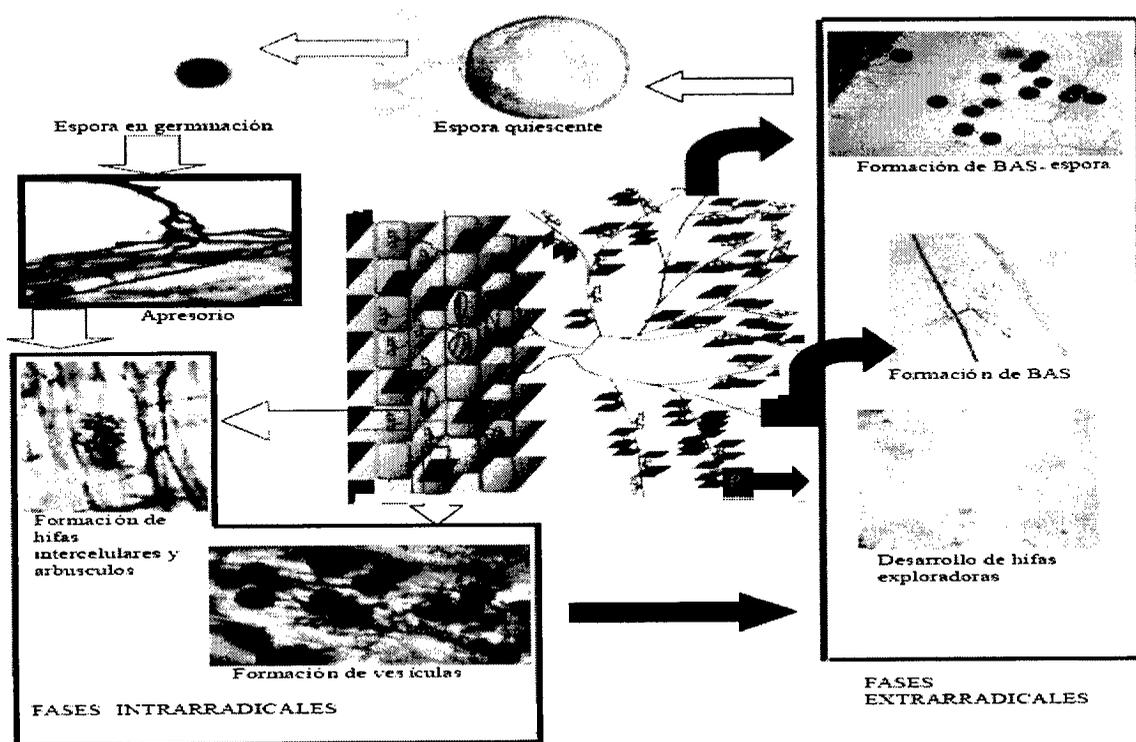


Figura 6. Descripción del ciclo de vida de *Glomus intraradices* (Fuente: <http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~21-3-2007/microrganismos-inoculantes%5B1%5D.pdf>)

Transferencia de nutrientes del suelo a la planta por medio de las micorrizas.

Los primeros trabajos mostraban como el manzano micorrizado presentaba un mayor contenido de Fe y Cu, cuando estos crecían en suelos deficientes de estos elementos. Por otra parte, se puso de manifiesto como los hongos formadores de micorrizas arbusculares mejoraban la absorción de fosfatos por parte de la planta, también que eran capaces de transferir N a la planta mediante la absorción de NH_4^+ o de la de NO_3^- del suelo. En la Figura 7 se muestra un esquema que ilustra cómo se realiza la transferencia de los nutrientes entre el

suelo y las células de las raíces inoculadas con hongos micorrízicos. Las causas de esta mejora nutricional pueden ser múltiples de acuerdo con diversos reportes (www.diccionariosdigitales.net/GLOSARIOS%20y%20VOCABULARIOS/Botanica-9-MICORRIZAS):

1. Las hifas del hongo son capaces de competir más eficientemente que las raíces con otros microorganismos del suelo por los nutrientes.
2. Dichas hifas, pueden absorber fuentes de nutrientes no disponibles para la planta.
3. Como consecuencia de su tamaño y distribución, el micelio extraradial es capaz de explorar un mayor volumen de suelo que las propias raíces, por lo que aumenta la capacidad de absorción de los nutrientes.
4. Se ha postulado con la idea de que los transportadores de los hongos micorrízicos presenten una mayor afinidad por el sustrato mineral que la planta.

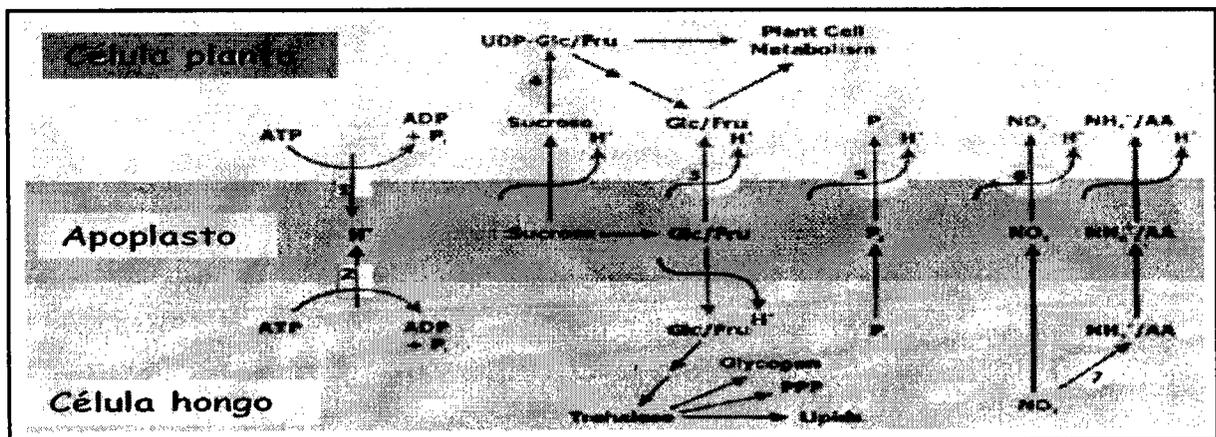


Figura 7. Transferencia de nutrientes en las células de las raíces con *micorrizas*.

Nutrición fosfatada en plantas micorrízicas, mecanismos de acción y supresión de la colonización

El fósforo es un nutriente mineral limitante para el crecimiento de las plantas debido a su baja solubilidad en muchos de sus estados naturales. Los hongos micorrízicos arbusculares transportan fósforo desde reservorios a distancia hasta la planta, lo que se ha podido mostrar usando compartimentos en el suelo con ³³P sólo accesibles a las hifas del hongo y no a las raíces de la planta. En este sistema incluso bajo condiciones no limitantes del aporte de fósforo, las raíces colonizadas reducen la actividad de su propio sistema de absorción del

fosfato. Otros estudios han puesto de manifiesto que la mayoría de las plantas aumentan la absorción del fósforo al establecer asociaciones micorrízicas, pudiendo llegar a ser responsables del 100% de la incorporación del fosfato en algunas especies vegetales. La absorción de fosfato es un mecanismo altamente eficiente, lo que se pone de manifiesto por la rápida incorporación de fósforo por las hifas del micelio extraradial, requiriéndose tan solo tres horas para alcanzar los niveles máximos de incorporación del polifosfato, velocidad comparable a la de los organismos hiperacumuladores de fosfato. Se han clonado los transportadores de fosfato involucrados en la absorción del fosfato desde el medio externo hasta las hifas fúngicas de *Glomus versiforme*, *G. intraradices* y *Gigaspora margarita*. Este transporte está asociado a un simporte de protones, que es creado con distintas enzimas H^+ -ATPasas. Para evitar la acumulación de iones fosfato, que dificultarían el funcionamiento normal del hongo mediante un aumento en la presión osmótica, dichos iones se polimerizan formando cadenas de polifosfato (alrededor de 17 unidades) y que se acumulan fundamentalmente en las vacuolas celulares. Son concretamente unas vacuolas tubulares que se encuentran asociadas a los microtubulos del citoesqueleto, quienes contienen esas cadenas de polifosfato. El fosfato así acumulado en el interior de las vacuolas, es transportado al micelio intraradial (Rivera, 2007).

Una vez que está en el micelio intraradial, el polifosfato es hidrolizado, liberándose el fosfato, mediante la actividad de ciertas fosfatasas alcalinas presentes en las vacuolas. De todos los procesos en relación a la transferencia del fosfato, la liberación de fósforo por el hongo es el menos conocido y más inusual en biología, ya que el fósforo es un nutriente escaso y los organismos generalmente no lo liberan al medio externo. Actualmente se considera que esta liberación puede estar inducida por la planta hospedera mediante mecanismos desconocidos y que ocurren a través de un canal iónico no identificado. Sin embargo, sí da un poco de luz a este proceso el hecho de que se hayan descrito transportadores de fosfato que se expresan específicamente en raíces micorrizadas de plantas como *Solanum tuberosum*, *Medicago truncatula* y *Oryza sativa*. La inmunolocalización del transportador de *M. truncatula* (MtPT4), sugiere que se localiza específicamente en la membrana periarbuscular, y que usa el gradiente de pH establecido a través de esta membrana, para tomar el fosfato previamente liberado desde los arbusculos fúngicos hasta el espacio periarbuscular, siendo por lo tanto la transferencia del fosfato un proceso activo que

ocurre preferencialmente a nivel de las células colonizadas por los arbusculos. Para poder ejemplificar esquemáticamente esta nutrición fosfórica se muestra la Figura 8 en la cual se detalla dicho proceso (Bago *et al.*, 2001).

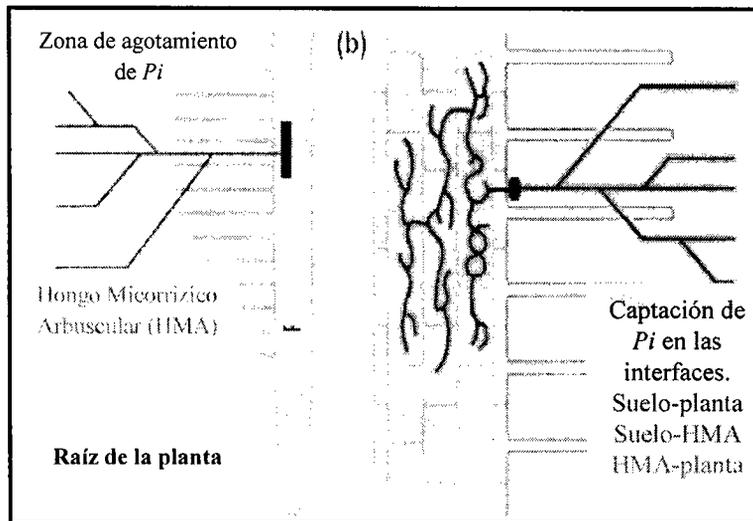


Figura 8. Transporte de fósforo (P) en plantas micorrizadas. (a) la raíz de la planta crea una zona de agotamiento de P causada por la asimilación de P y la baja tasa de difusión de P en el suelo. El micelio extrarradical del hongo micorrizico arbuscular (MA) crece hacia la zona de agotamiento, alcanzando un nuevo almacén de P soluble. (b) La interface implica la captación de P en la simbiosis MA. Las interfaces suelo-planta, suelo-hongo MA y hongo MA-Planta se muestran en el esquema. La traslocación transmembranal del P está medida por transportadores de P que residen en la membrana de las células de la interface correspondiente. (Bago *et al.*, 2001).

Nutrición nitrogenada con micorrizas

Los hongos micorrízicos son también capaces de transferir nitrógeno del suelo circundante a la planta mediante la absorción de NH_4^+ o de NO_3^- . Asimismo hay indicios de cierta capacidad de transporte de N orgánico, especialmente de aminoácidos. En apoyo a esta ultima forma del transporte de N, se ha aislado un gen que codifica una cadena de aminoácidos de *G. mosseae*. Sin embargo, los hongos micorrízicos prefieren como fuente de N al amonio en comparación al nitrato. La incorporación del amonio se lleva a cabo mediante transportadores específicos, de los que actualmente tan sólo se ha aislado uno en *G. intraradices*. El amonio así absorbido, se incorpora rápidamente al glutamato, para crear

glutamina, lo que podría ocurrir por distintos mecanismos, aunque el más probable parece ser el ciclo de la glutamina sintasa, ya que sus actividades han sido detectadas en los hongos micorrízicos. En la asimilación de nitrato, parece estar implicada la enzima nitrato reductasa, cuya actividad se ha detectado tanto en esporas, como en extractos de raíces micorrizadas; molecularmente, se ha aislado el gen codificante para una nitrato reductasa de *G. intraradices*, que se expresa fundamentalmente en el arbusculo. Esta actividad permitiría la reducción del nitrato para su posterior incorporación a la glutamina en forma de amonio (Mendoza y Ramírez, 2001).

La transferencia de N hasta su absorción por la planta, ocurre por un proceso asociado al ciclo de la urea y al transporte del polifosfato. El proceso comienza con la entrada del amonio o nitrato a las hifas extraradiales, donde el nitrato será transformado en amonio por la nitrato reductasa, y dicho amonio mediante la acción de la urea se convierte en arginina. Ya como arginina es translocado al micelio intraradial asociándose a la transferencia de polifosfato. Una vez en la fase intraradial del hongo, la arginina entra a formar parte del ciclo nuevo de la urea, liberándose ornitina y urea, que por acción de la ureasa y la ornitina aminotransferasa liberan el amonio que será así transferido a la planta. La posibilidad de una transferencia directa de la arginina desde el hongo a la planta, ha sido descartada debido a que no se detectan carbonos marcados en la parte aérea de la planta cuando se añade ^{13}C -acetato en el medio donde crece el hongo. El proceso antes señalado se resume en la Figura 9.

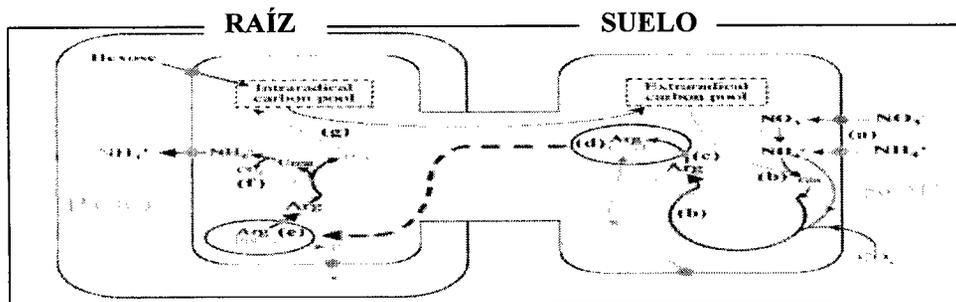


Figura 9. Mecanismo propuesto para el transporte de nitrógeno a la planta en *micorrizas* arbusculares. El nitrógeno absorbido se transforma en amonio o se adquiere como tal. Mediante el ciclo de la urea pasa a formar parte de la arginina. La transferencia al micelio intraradial se lleva a cabo en forma de arginina, asociada a los polifosfatos. Luego el micelio intraradial libera el amonio de nuevo mediante el ciclo de la urea (Bago *et al.*, 2001).

Costo energético de la planta en la simbiosis micorrízica

El huésped proporciona al hongo los glúcidos que no puede sintetizar, ya que está desprovisto de clorofila. En muchos tipos de *micorrizas*, los glúcidos transferidos de la planta al hongo, sobre todo los azúcares simples como la sacarosa, la glucosa y la fructuosa; en las *ectomicorrizas* son transformadas en glúcidos específicos (glucógeno y manitol) antes de ser empleados por los tejidos del hongo. Las sustancias glucídicas que son aprovechadas por las *micorrizas* probablemente se estima que corresponden del 20 al 40% de la totalidad de las sustancias fotosintetizadas en el caso de las *ectomicorrizas* (Bidwell, 1993).

Fijación bacteriana de N₂ como biofertilizante

Aproximadamente el 82% del aire que respiramos está compuesto de N₂ atmosférico. Si bien, el aire es abundante en N, es el nutriente más limitado en el crecimiento de la planta por que el N₂ atmosférico no está disponible para que la planta lo tome. Algunas bacterias son capaces de fijar N₂ a partir del N atmosférico. Estas bacterias forman varias asociaciones con las plantas:

1. Muchas son de vida libre, fijan N₂ en el suelo.
2. Algunas viven en simbiosis y tienen asociaciones endofíticas muy estrechas con las plantas.
3. Otras viven en asociación cerrada en la zona radical de la planta (rizósfera), sin llegar a formar simbiosis íntima endofítica.

La cantidad de N fijado por estos diferentes sistemas es considerable, si bien las variaciones han resultado desde las condiciones del medio ambiente o las enormes diferencias de las combinaciones de microbio-planta. La estrecha proximidad de estos microorganismos para sus plantas hospederas permite el uso eficiente del N en la planta, minimiza la volatilización, la lixiviación y la desnitrificación (Rai, 2006).

Bacterias que fijan N₂ simbióticamente

La mayoría de estas asociaciones ocurren al nivel de la rizósfera; Lynch (1990) define a la rizósfera como toda aquella porción de suelo que está fuertemente influenciada por las

raíces de las plantas, la cual a su vez se divide en tres partes: (1) Rizoplano (microorganismos pegados a la raíz), (2) endorrizósfera (microorganismos dentro de la raíz) y (3) ectorrizósfera (microorganismos que actúan de manera circundante a la raíz). Dicha asociación se inicia como respuesta al llamado “efecto rizosférico”, el cual sucede a través de un intercambio de señales que se disparan a partir de la interacción microbio-planta, con resultados claramente benéficos para los dos.

Cerca del 40% del carbono fijado en la fotosíntesis en la parte aérea de la planta, puede ser excretado a la rizósfera, lo que afecta positivamente a la mayoría de las bacterias que ahí habitan, las cuales se nutren de los exudados de las raíces que emiten las plantas, como azúcares, vitaminas, factores de crecimiento, ácidos orgánicos, glúcidos y mucigel. La mayoría de los microorganismos se encuentran interactuando en la rizósfera (región del suelo alrededor de la raíz de la planta influenciada por su metabolismo), donde el ambiente es distinto del resto de la zona edáfica. Uno de los fenómenos importantes que se produce en la rizósfera es la presencia de una gran variedad de sustancias orgánicas, como aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, derivados de ácidos nucleicos, factores de crecimiento y enzimas que, directa o indirectamente, tienen influencia positiva o negativa sobre los microorganismos que ahí habitan (Ferrera-Cerrato, 1995).

Rhizobia

Son las bacterias más conocidas y que más N_2 fijan simbióticamente, estas pertenecen a la familia Rhizobiaceae (*Rhizobia*) e incluye los siguientes géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium* (Graham y Vance, 2000). Este tipo de bacterias infectan leguminosas y tienen una distribución global que van desde latitudes norte en Europa y Norteamérica hasta el Ecuador, así como en los trópicos de Australia y Sudamérica. En áreas tropicales y ecuatoriales, las leguminosas son particularmente importantes; ya que son utilizadas en sistemas silvopastoriles y agroforestales (Dommergues y Subba Rao, 2000). La capacidad de fijar N_2 por rhizobia varía mucho (arriba de $450 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$) entre la especie de la planta hospedera y la cepa bacteriana (Unkovich y Pate, 2000). Por lo tanto, se debe seleccionar la mejor cepa de rhizobia compatible con el hospedero para la selección de biofertilizantes. Adicionalmente a estas características

importantes están las cepas esenciales de rhizobia que son consideradas para aplicaciones prácticas como biofertilizantes. Estas deben de tener una alta tasa de fijación de N_2 y capaces de competir con los rhizobium nativos para maximizar la infección del cultivo deseado (Stephens y Rask, 2000). Desde una perspectiva práctica, el inóculo debe ser fácilmente producido y tener un alto grado de supervivencia en aplicaciones a campo una vez que sean inoculadas las semillas deseadas (Date, 2000).

La inoculación de las leguminosas es una vieja práctica que llevó a un estancamiento de la técnica durante más de un siglo en los sistemas agrícolas de los Estados Unidos y en el Reino Unido (Catroux *et al.*, 2001). La inoculación es particularmente importante cuando los residentes locales y las poblaciones de rhizobia en el suelo están ausentes o son muy bajos (Catroux *et al.*, 2001). Por ejemplo, en suelos ácidos no los contienen o las densidades de las poblaciones son muy bajas, como en la simbiosis de alfalfa con rhizobia (*Sinorhizobium meliloti*), mientras que en suelos básicos contienen un bajo potencial de inóculo de *Bradyrhizobium* sp., un simbiote rhizobia de *Lupinus* spp. (Catroux *et al.*, 2001).

Antes de iniciar un programa a gran escala de inoculación con rhizobia, es necesario evaluar las necesidades del inóculo y realizar un análisis costo-beneficio. Si la densidad de población de rhizobia es alta en el suelo, es probable que la inoculación sea una inversión innecesaria y la practica de la inoculación salga sobrando. Catroux *et al.* (2001) sugieren que cuando la densidad de población de rhizobia es baja (menos de 100 rhizobias por gramo de suelo), es probable que la inoculación sea benéfica para la buena productividad del cultivo. En densidades bajas de población la inoculación resultaría rentable independientemente de la fijación eficiente de N_2 de las rhizobias nativas. Desgraciadamente, los métodos fáciles, simples y económicos de cuantificación de poblaciones de rhizobia no están muy disponibles. Los experimentos en campo consumen mucho tiempo y pueden tomar varios meses. Los ensayos microbiológicos son más convenientes y toman pocas semanas pero requieren una experiencia considerable (Brockwell y Bottomley, 1995).

El inóculo de rhizobia puede ser producido y aplicado en numerosas formas. El inóculo puede ser preparado en varias formulaciones como polvo, líquido y granular. Las formulaciones granulares son convenientes ya que permiten un control de la tasa de colocación y aplicación (Stephens y Rask, 2000). Una característica adicional de la

importancia de un inóculo es la selección del medio de transporte (ejemplo: turba, perlita, suelo mineral o carbón). Cualquier transporte que se elija, es necesario que se esterilice para asegurar la supervivencia del inóculo y la posterior tasa de infección (Catroux *et al.*, 2001). Es importante poder controlar la calidad del inóculo, desafortunadamente, la calidad del inóculo es a menudo cuestionable, en más de un 90% los inóculos disponibles no tienen efectos prácticos en la productividad de las leguminosas (Brockwell y Bottomley, 1995). Estas son razones suficientes para la falta de rendimiento en los cultivos inoculados que pueden excluir la inoculación exitosa. Tanto los gobiernos de los países como organismos internacionales han controlado y estandarizado las medidas necesarias para simplificar y clarificar las normas de calidad y de comercialización de la producción de inóculos. Por otro lado, instituciones académicas y agrícolas cuentan con estaciones experimentales que apoyan proporcionando la información que pueden ayudar a las necesidades del control de calidad. Actualmente, la compra de un inóculo en muchos casos es una inversión de un valor debatible (Stephens y Rask, 2000).

Frankia

Es un género de actinomicetos fijadores de N₂ capaces de infectar y nodular a un grupo de 8 familias principalmente de plantas leñosas (Wall, 2000). Estos organismos llamados plantas actinorhizales son usadas en la recuperación de suelos, para producción de madera, leña, se usan en plantaciones mixtas, para barreras rompe vientos y para sombras a lo largo de desiertos y costas (Schwencke y Carú, 2001). La actinorhizal *Hippophae rhamnoides* es cultivado por sus bayas. La fijación de N₂ por *Frankia* debe ser estimado de forma similar a una simbiosis rizobiana (Dommergues, 1995). A pesar del potencial importante de la simbiosis que ejerce *Frankia*, solo se dispone de información limitada para las prácticas de inoculación y sus usos. La inoculación con *Frankia* puede ser ventajosa en medios áridos, sitios perturbados y áreas donde las plantas actinorhizobiales nativas estén ausentes (Schwencke y Carú, 2001). Los principales factores para la selección de cepas es similar a lo descrito para *Rhizobium* sp. Además las propiedades simbióticas de las cepas, características tales como su edad de inoculación en el cultivo, concentración celular y métodos de preservación puede afectar el grado de infección. No existe una cepa universal adaptada a todos los medios y a genotipos hospederos diferentes, la mejor combinación de planta-

Frankia debe ser seleccionada y caracterizada para cada área y para cada especie deseada (Schwencke y Carú, 2001).

La inoculación y nodulación antes del trasplante en vivero mejora la sobrevivencia y rendimiento (Prat, 1992). Consecuentemente, la inoculación en vivero probablemente es más eficiente (Sprent y Parsons, 2000). El inóculo de *Frankia* puede ser liofilizada, congelada en glicerol o cultivada en un medio complejo. Las esporas de *Frankia* pueden ser usadas con éxito para la inoculación en *Casuarina cunninghamiana*, pueden ser utilizados de igual manera como la inoculación de rhizobia, en formulaciones y transportes diferentes. Esto agrega flexibilidad a la selección de los métodos más simples y aplicables para la inoculación de cada programa (Rai, 2006).

Cianobacterias.

Las cianobacterias son importantes ecológicamente. Por ejemplo, las cianobacterias, *Trichodesmium*, contribuyen aproximadamente con el 36% de la fijación global de N₂ (Gallon, 2001). La fijación de N₂ por las cianobacterias es esencial para el cultivo de arroz. Hasta a finales de los 70's la simbiosis de *Azolla-Anabaena* fue la mejor fuente de N para 6.5 millones de hectáreas de cultivo de arroz en China. Actualmente, la presión de población y el incremento en los costos laborales tiene en disminución la dependencia sobre la simbiosis de las cianobacterias en los cultivos de arroz chino (Graham y Vance, 2000). En Uruguay y gran parte de Asia, las cianobacterias (principalmente *Nostoc* y *Anabaena*) todavía tienen una importancia vital para la fertilización de los campos de arroz (Irisarri *et al.*, 2001). Las cianobacterias y la fijación de N₂ tienen una nueva aplicación en la remediación de suelos áridos. En los suelos áridos de Sahelian en Nigeria, la fijación de N₂ por cianobacterias se presenta en la corteza del suelo como una fuente disponible. Esas cianobacterias han mostrado un incremento en el contenido de N en el suelo (Rai, 2006), por lo tanto, se tiene un gran potencial de regeneración extrema de los suelos áridos.

A pesar de la importancia tradicional de la fijación de N₂ por las cianobacterias en los cultivos de arroz y sus usos en la posible regeneración de suelos áridos o los ecosistemas propensos a inundaciones, la producción y la aplicación de cianobacterias esta todavía en desarrollo. Sin embargo, las cianobacterias deben ser fuertemente consideradas como

biofertilizantes soportando las practicas agrícolas sustentables en diversos agroecosistemas (Rai, 2006).

Proceso de infección de la asociación leguminosa-*Rhizobium*

El proceso de nodulación es muy interesante y se ha estudiado mucho. El primer paso es la producción de una sustancia en la raíz que parece contener hormonas induciendo a los pelos radicales a encorvarse tomando una forma retorcida. Es muy posible que en la invaginación y destrucción de la pared celular del pelo radical tomen parte enzimas extracelulares producidas por las bacterias. Éstas invaden el pelo radical y se mueven en el interior de la corteza formando una estructura filamentosa que consiste de un material mucilaginoso en el que va embebida la bacteria. Esta sustancia comprende una mezcla de flavonoides modificados que provocan cambios en la actividad de las *Rhizobium*. Las células corticales se dividen estimuladas por el filamento infeccioso y de estas divisiones se forman células poliploides. Por lo general hay también algunas células tetraploides en la corteza de cualquier raíz diploide normal. Las estructuras del nódulo se forman por divisiones repetidas de las células diploides. Las bacterias que infectan a las células del nódulo aumentan mucho en tamaño, en diversidad y en forma y cesan de dividirse. Las bacterias son liberadas en el interior de las células corticales a través del extremo del hilo de infección. Al liberarse, quedan envueltas por la membrana plasmática de la célula de la planta y se depositan en forma compartimentada, dentro del citoplasma de las células corticales donde se transforman en formas denominadas bacteroides, los cuales casi alcanzan a llenar las células infectadas. El nódulo después crece por división de las células hospederas y llega a estar bien provisto de tejido vascular (Urzúa, 2005).

El *Rhizobium* es específico para el género de leguminosa y se conocen 6 grupos diferentes. Para que la nodulación tenga éxito se necesita una fuerte inoculación de la bacteria. La nodulación y la fijación de nitrógeno son afectados por el estatus de la planta respecto al elemento; es necesario que las plantas sean vigorosas, de ahí en adelante la cantidad de nitrógeno fijado es inversamente proporcional a la cantidad de nitrógeno fijado utilizable. Un nivel apropiado de carbohidratos, y por lo tanto la fotosíntesis, se necesita también para una fijación efectiva del nitrógeno, ya que la energía para hacerlo se deriva de la

respiración de los carbohidratos. El nitrógeno fijado en los nódulos se convierte en aminoácido rápidamente, proceso que requiere esqueletos de carbono que proporciona la actividad respiratoria. El nitrógeno orgánico se transfiere a la planta hospedera por el xilema, en principio en forma de asparagina en las leguminosas o de citrulina en el aliso (Bidwell, 1993). Desde hace mucho tiempo se encontró que los nódulos efectivos contenían un pigmento rojizo llamado leghemoglobina, que es similar a la hemoglobina de los mamíferos. Este pigmento parece funcionar como un transportador de oxígeno en el proceso de fijación del nitrógeno en los nódulos. Probablemente es importante en el metabolismo oxidativo que provee la energía necesaria para la fijación de nitrógeno, pero también podría funcionar protegiendo de los efectos del oxígeno atmosférico a la enzima fijadora de nitrógeno que es sensible al oxígeno. Parece ser un factor ventajoso más esencial para la actividad de los nódulos. El amoníaco, derivado de la fijación del nitrógeno o procedente de alguna otra fuente, entra al ciclo bioquímico reaccionando con el aminoácido glutamato, el cual es catalizado por la glutaminosintetasa para dar lugar a otro aminoácido (la glutamina). (Torres *et al.*, 2001). En la Figura 10 se describe como se da el proceso de infección en una leguminosa.

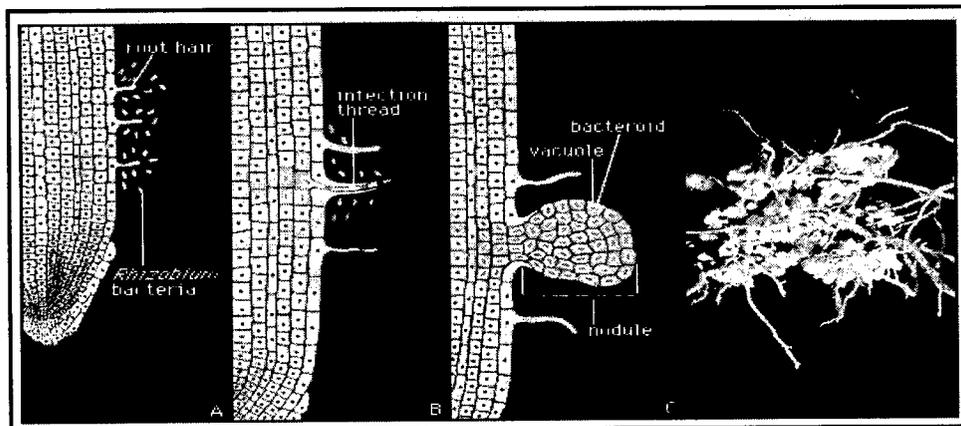


Figura 10. Raíces de la planta de chícharo (*Pisum sativum*) con nódulos fijadores de nitrógeno de la bacteria *Rhizobium* (Izquierda). Los nódulos de la raíz se desarrollan como resultado de la relación simbiótica entre la bacteria rizobial y los pelos radiculares de la planta. (A) La bacteria reconoce los pelos de la raíz y comienza a dividirse, (B) la bacteria mediante hilos o hifas infecciosas permiten la entrada a las células de las raíces, (C) las cuales se dividen hasta formar el nódulo. Imagen real que muestra los nódulos formados por la bacteria en las raíces (Derecha). <http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/416291/7/The-roots-of-an-Austrian-winter-pea-plant-with-nodules>.

La fijación biológica de nitrógeno por *Rhizobium*

El nitrógeno es un elemento esencial para los organismos vivos. Está presente en las proteínas y los aminoácidos. Aunque los cultivos también requieren fertilizarse con fósforo y potasio, en el suelo la escasez principal es de nitrógeno. La fertilización nitrogenada implica altos costos económicos para el agricultor, pero los efectos adversos más serios de la fertilización masiva en el mundo son ambientales: el deterioro de los suelos, la contaminación ambiental por la fabricación de fertilizantes, así como la contaminación con nitratos de mantos acuíferos superficiales y subterráneos. La abundancia de los compuestos nitrogenados en el agua produce el fenómeno denominado eutrofización, que es el crecimiento anormal de bacterias que utilizan estas ricas fuentes nutritivas. Con ello, agotan el oxígeno disuelto en el agua y producen la muerte masiva de peces y otros organismos. Asimismo, el consumo de agua con alto contenido de compuestos nitrogenados como nitratos y nitritos produce severos daños a la salud humana. Por otro lado, una fracción importante del nitrógeno agregado como fertilizante es convertido en óxido nitroso por bacterias desnitrificantes. Este compuesto es un gas con efecto invernadero 100 veces más potente que el dióxido de carbono y se constituye como un contaminante clave para el calentamiento global (Peralta-Díaz, 2007).

Hay un inmenso reservorio de nitrógeno en la atmósfera, el cual constituye el 82% del total gaseoso. Sin embargo, está en una forma química tan estable, que es imposible que los organismos como las plantas y los animales puedan asimilarlo. El nitrógeno presenta un ciclo natural por el que a través de las transformaciones químicas forma parte de la biosfera y, después de los ciclos vitales de los organismos, regresa a la atmósfera. Las leguminosas son una de las familias de angiospermas más extendidas en el planeta, con cerca de 11,000 especies, que incluye árboles, arbustos y plantas de gran importancia agrosilvícola; por ejemplo, alfalfa, trébol, frijol, soya, chícharo, haba, lenteja y cacahuate. En condiciones favorables, las leguminosas como haba y chícharo pueden obtener hasta el 90% de sus requerimientos de nitrógeno mediante la fijación simbiótica con *Rhizobium leguminosarum*, mientras que la soya asociada a *Bradyrhizobium japonicum* puede obtener del 40 al 60%. El frijol es uno de los cultivos con menor eficiencia de toma de nitrógeno (Lira-Saldívar *et al.*, 2007).

La bacteria *Rhizobium* es un bacilo corto, algunas veces pleiomórfico, da tinción negativa de Gram, aerobio estricto, no forma esporas, móvil por flagelos peritricos o un solo flagelo lateral. La familia *Rhizobiaceae* es un género heterótrofo, común en el suelo, su temperatura óptima de crecimiento en condiciones artificiales es de 25°C y su pH óptimo es de 5 a 8. La nomenclatura de las especies se dio originalmente por el tipo de leguminosa de las cuales se aisló y refleja un perfil de especificidad por la planta hospedera. Un ejemplo de esto se representa con la cepa CFN42 de *Rhizobium etli*, la cual fue aislada en Celaya, Gto., México, misma que fue caracterizada y nombrada con el náhuatl para frijol (*etl*) por la Dra. Esperanza Martínez (Peralta-Díaz, 2007). El establecimiento de la simbiosis entre *Rhizobium* y la leguminosa para fijar el nitrógeno es un proceso complejo, donde la formación de nódulos se da en etapas sucesivas de interacción entre los dos organismos (Peralta-Díaz, 2007).

Producción de *Rhizobium*

Es posible realizar una producción en el laboratorio del biofertilizante, para realizar ello se emplea medio de peptona (0.5%), levadura (0.3%) y cloruro de calcio (7 mM), con antibiótico (ácido nalidíxico a 20 microgramos por mL), con agitación de 200 rpm a 30°C de incubación. Se prepara un preinoculante que se crece por dos días y se inoculan matraces Fehrback de 2 litros para hacerlo crecer otros dos días. Las células se centrifugan y se lavan con solución salina (0.8%) para eliminar los restos del medio rico, ya que es inhibitorio de la actividad simbiótica de *Rhizobium*. Las células se agregan al sustrato, que puede ser vermiculita, perlita (agrolita) o turba (molida y neutra) o mezclas con diferentes proporciones de estos materiales.

La característica más importante que debe tener el sustrato es una alta capacidad de proveer poros para la sobrevivencia de la bacteria. Empacada en bolsa de polietileno puede permanecer viable por 4 meses a temperatura ambiente y por más de medio año en refrigeración. En líquido también es posible conservarla, a 4°C, por unas tres semanas. En una escala mayor, como en reactores, se propagan a 30°C, para inyectar oxígeno con agitación; el medio puede ser definido de sales. Comúnmente se emplea el siguiente medio de cultivo ácido succínico 10 mM, cloruro de amonio 10 mM, fosfato básico de potasio 1.2 mM, sulfato

de magnesio 0.8 mM, cloruro de calcio 1.5 mM, trazas de cloruro de hierro. En este caso, después de propagarlo por tres días no se requiere centrifugar y se puede envasar directamente. La concentración de bacterias debe ser del orden de 5×10^8 unidades formadoras de colonias por gramo para asegurar la cantidad suficiente de bacterias por semilla. Los lotes de biofertilizante deben ser evaluados con conteos bacterias viables, así como para asegurar una pureza razonable (Lira-Saldívar *et al.*, 2007).

Efecto del pH en la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*

En un estudio con *Rhizobium leguminosarum* biovar. *Viciae* el cual se produjo en el cultivo puro se utilizó el medio definido M & W ajustando el pH a 5, 6 y 7. A estos medios se le añadieron 50 y 100 mg L⁻¹ de imazetapir tanto en su formulación técnica como comercial; el crecimiento del microorganismo se determinó espectrofotométricamente a 680 nm. Con el objetivo de estudiar la influencia del pH del medio en el efecto inhibitorio de imazetapir (herbicida) en la biosíntesis de aminoácidos usados en el crecimiento de *R. leguminosarum*. El crecimiento de *R. leguminosarum* evaluado con imazetapir en su formulación técnica mostró un comportamiento diferente con los pH utilizados. Con pH's de 6 y 7 no se evidenció efecto inhibitorio alguno a las dosis de 50 y 100 mg L⁻¹, sin embargo a pH 5 se observaron inhibiciones del 45 y 70%, respectivamente, pudiendo así difundirse (bacteria) con mayor facilidad a través de las membranas celulares. A pH 5, la proporción de imazetapir en forma neutra fue mayor que a pH 6 ó 7. Esto explica el efecto mayor observado a pH 5, lo cual no se mostró a pH's de 6 y 7. Estudios similares realizados con este herbicida en plantas, han mostrado también un efecto inhibitorio mayor del herbicida cuando el pH del medio en que se encuentra el producto era ácido. El imazetapir es un herbicida que pertenece a la familia de las imidazolinonas, con un amplio espectro de control de malezas y que se utiliza tanto en preemergencia como en postemergencia de diversas leguminosas (Vitta *et al.*, 2005).

Otro factor importante en la penetración de los herbicidas en las células es la formulación del producto utilizado. Se realizó un experimento similar al antes descrito; para el producto técnico se empleó la formulación comercial del imazetapir, que además del ingrediente activo contiene adyuvantes y surfactantes. Con la formulación comercial, al igual que con el producto técnico, no se observó inhibición alguna en el crecimiento de *R.*

leguminosarum a pH 6 y 7. Sin embargo, cuando el pH utilizado fue 5 mostró un 90% de inhibición, por lo que se experimentó el crecimiento del microorganismo a 50 mg L⁻¹, no habiéndose apreciado crecimiento alguno cuando la dosis utilizada fue de 100 mg L⁻¹. Lo anterior sugiere que existe un efecto diferencial a pH 5 dependiendo de la formulación de imazetapir utilizada, observándose mayor inhibición del crecimiento de *R. leguminosarum* con la formulación comercial. Este comportamiento diferente podría explicarse por una mejor absorción del herbicida en el microorganismo cuando se utiliza la formulación comercial, o bien como un efecto tóxico de los coadyuvantes y surfactantes que forman parte de esta formulación (Urzúa, 2005).

Otros beneficios y perspectivas con *Rhizobium*

Con el biofertilizante de *Rhizobium etli* se han presentado beneficios adicionales en el frijol; por ejemplo, en general una mejor salud de la planta, mayor vigor, menos ataque de plagas como mosquita blanca, menor tasa de picado de semilla por gorgojo y un ciclo vital ligeramente más corto. Estos efectos necesitan reconfirmarse y determinar su magnitud. El biofertilizante se está utilizando también con frijol como cultivo de cobertura asociado a acacias nativas en ensayos de manejo integral sustentable, para obtener grano y leña, en Morelos, México. Adicionalmente, se ha experimentado con cultivos distintos al frijol y se han observado también varios de los beneficios mencionados. Hay reportes publicados de que *Rhizobium* puede beneficiar, no precisamente por fijación de nitrógeno, a cultivos de hortalizas como betabel y zanahoria, también se ha encontrado asociado a la rizósfera y espacios intercelulares de maíz en la milpa tradicional. Se requiere realizar más trabajo, no sólo en estos temas, sino también en la búsqueda de sustratos de bajo costo disponibles localmente, en producir biofertilizantes para otras leguminosas como alfalfa, soya, chícharo, haba y lenteja con aislados efectivos de las regiones de cultivo, probar combinaciones de organismos benéficos (*Rhizobium*-micorriza, *Azospirillum*-micorriza, *Azospirillum*-*Rhizobium* u otros como *Bacillus*-*Azospirillum*) y sus efectos, así como extender la vida útil de las presentaciones comerciales, etc. (Peralta-Díaz, 2007).

Debido a que las leguminosas en México forman parte fundamental de la dieta de sus habitantes, a pesar de que un alto porcentaje de los suelos mexicanos son pobres en nutrientes

esenciales como el nitrógeno, necesario para la síntesis de proteínas y clorofila, por ello se requiere aplicar fertilizante nitrogenado. Las plantas solo lo absorben y asimilan nitrógeno (N_2) como amonio y/o nitratos, de ahí la necesidad de usar los fertilizantes químicos, los que aplicados irracionalmente, tienen un elevado costo, una acción desgastadora del suelo y contaminan el ambiente. Lo anterior obliga a buscar alternativas de solución que reduzcan su uso, pero que mantengan el rendimiento del cultivo vegetal (Sánchez-Yáñez, 2008). Por lo tanto, se considera que la fijación biológica del nitrógeno (FBN) es una de las alternativas más viables para recuperar N en el ecosistema, se ha estimado que 175 millones de toneladas/año se fijan biológicamente, del cual el 70% va al suelo (Carrera *et al.*, 2004).

La FBN es una ventaja para las leguminosas ya que pueden tomar nitrógeno del aire a través de la simbiosis con *Rhizobium*. Esta es una manera de reducir la cantidad del N derivado de fertilizantes al incrementar la proporción de N_2 fijado vía *Rhizobium*. Por eso se asegura el máximo beneficio de la asociación mediante el establecimiento de una bacteria que reúna cualidades de competencia y efectividad para fijar N_2 en las raíces de la leguminosa (Peralta-Díaz, 2007). En los suelos agrícolas la asociación *Rhizobium*-leguminosa es la más importante fuente de N, pues se ha reportado que en las leguminosas noduladas, bajo determinadas condiciones ambientales (suelos pobres en este elemento) pueden fijar hasta los 100 kg N_2 /ha/año (FAO, 1995). Este mecanismo provee la demanda del N para satisfacer las necesidades nutricionales más importantes de la planta.

RHIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS (RPCP) Y ANTAGONISTAS DE FITOPATÓGENOS

La mayoría de las investigaciones realizadas en este ámbito se han enfocado a la precisión de los mecanismos involucrados en el control biológico y relativamente poco en el conocimiento relacionado con la promoción directa del crecimiento de las plantas. Esto ha dado pauta para realizar estudios que consideran principalmente la densidad del inóculo, fisiología de la cepa promotora, temperatura, propiedades del suelo, cultivo y genotipo de la planta; el objetivo ha sido entender de manera clara los mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas inducido por cepas de RPCP, con el propósito de aislar y

seleccionar nuevas cepas que representen una fuente exitosa de inoculantes biológicos en la agricultura, así como en la elaboración de productos comerciales (Delgadillo *et al.*, 2001).

En años recientes se ha caído en cierta controversia, ya que no se sabe hasta que punto se puede considerar una rizobacteria como RPCP, por lo que se han establecido cuatro características que definen este grupo:

- a) Que no requieran de la invasión de tejidos de las plantas, como ocurre en hongos micorrízicos con la formación de arbusculos o nódulos, que es el caso de *Rhizobium*.
- b) Que tengan una densidad poblacional elevada en la rizósfera después de su inoculación, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora nativa del suelo.
- c) Que presenten capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y, como consecuencia, puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta.
- d) Que no produzcan daño en el hombre ni a otros microorganismos.

Cabe mencionar que en la actualidad el uso de microorganismos benéficos representa sólo el 1.4% (380 millones de dólares) del mercado global para el control de plagas y enfermedades. La bacteria mas usada es *Bacillus thuringiensis*. Una de las causas de su éxito es su facilidad de formularse, a diferencia de los biofungicidas, donde el producto requiere del manejo del microorganismo vivo para obtener el efecto benéfico (Delgadillo *et al.*, 2001).

Mecanismos de acción de las RPCP

Los mecanismos de los promotores de crecimiento de la planta (PGP) pueden ser directos o indirectos. Los mecanismos directos de los PGP conllevan a la secreción de reguladores de crecimiento como fitohormonas que se obtienen de la activación de los metabolitos de la raíz o del abastecimiento de los nutrientes derivados de las raíces (Burdman *et al.*, 2000). Los mecanismos indirectos de los PGP ocurren cuando disminuyen los RPCP o evitan los efectos deletéreos de los fitopatógenos a través de la producción de compuestos antimicrobiales, compitiendo por fierro y nutrientes en los sitios de colonización, por mencionar algunos mecanismos (Whipps, 2001). Esto no quiere decir que una RPCP pertenezca exclusivamente al primer o segundo grupo. Pueden también ser dotadas de ambas

capacidades (Fuentes-Ramírez y Caballero-Mellado, 2005). Estos modos diferentes de acción pueden conducir a diferentes relaciones entre un inóculo y las comunidades microbiales en la raíz. Ahora es posible comprender estas influencias mutuas, debido a la disponibilidad de nuevos métodos analíticos y computacionales.

Según Dos Santos (2005), los mecanismos del efecto de estas bacterias promotoras del crecimiento no son bien comprendidos, sin embargo, se ha sugerido un amplio rango de posibilidades que incluyen mecanismos directos e indirectos.

- **Mecanismos directos:**

Un efecto directo y quizás el más importante es la producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas y etileno). Otros mecanismos que han sido bien documentados son: solubilización del fósforo, disminución de la concentración de etileno, secuestro de hierro por sideróforos y fijación de nitrógeno.

- **Mecanismos indirectos:**

Consiste en un aumento en la movilización de nutrientes solubles, seguido por el mejoramiento de la absorción de plantas, la producción de antibióticos para hongos, bacterias y virus. Los metabolitos pueden funcionar como determinantes antagónicos, que involucran aspectos de control biológico, suprimen o inhiben el crecimiento de los microorganismos perjudiciales, vía producción de sideróforos, antibióticos, acción de enzimas líticas (glucanasas, quitinasas) o inducción de mecanismos de resistencia.

Mecanismos Directos	Mecanismos Indirectos
Solubilización del fósforo	Producción de antibióticos
Fijación de nitrógeno	Agotamiento de hierro en la rizósfera
Producción de fitohormonas	Sistema de resistencia inducida
Disminución de la concentración de etileno	Síntesis de metabolitos antifúngicos
Secuestro de hierro por sideróforos	Producción de enzimas que lisan pared celular de los hongos
	Competencia por sitios de la raíz

Cuadro 3. Mecanismos de acción directos e indirectos de las RPCP (Dos Santos, 2005).

La conjunción de ambos mecanismos de acción, como se observa en el Cuadro 3, ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento en plantas; se ha observado un incremento en la germinación, la emergencia, el vigor y el peso de las plántulas, un desarrollo mayor de los sistemas radiculares y un incremento de hasta el 30% en el rendimiento de los cultivos de interés comercial tales como papa, rábano, tomate, trigo y soya. Para que un microorganismo antagónico se pueda utilizar en el desarrollo comercial de un biofungicida se debe cumplir con los siguientes criterios (Dos Santos, 2005):

- a) Eliminación efectiva del patógeno antes de que cause un daño económico importante.
- b) Consistencia de los resultados en condiciones de campo.
- c) Adaptación a un sistema de manejo integrado para el control de plagas y enfermedades.
- d) Precio competitivo con otras medidas de combate.
- e) Compatibilidad con otros tratamientos para el control con otras plagas o enfermedades.
- f) Adaptación al uso cotidiano de las prácticas agrícolas.
- g) Inocuidad a otras especies, al hombre y al ambiente.

En el Cuadro 4 se presenta la manera en que está distribuido el uso de las RPCP y para cuales cultivos se han estado empleando en algunos países de Latinoamérica (Castro-Sowinski *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Importancia social de las RPCP

País	Especies de cultivo y bacteria	Área inoculada (ha)	Comentarios
Argentina	Soya- <i>Glicine max</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	±10 millones	65% del cultivo de soya es inoculado, 15 millones de dosis inoculante (1 dosis inoculante= 50 kg semillas)
	Trigo- <i>Triticum aestivum</i> Maíz- <i>Zea mays</i> <i>Azospirillum brasilense</i>	140,000	±3% del área sembrada 200 000 dosis (1 dosis=140 kg de semilla) Con incremento importante
	Trigo <i>Pseudomonas</i>	±9000	
Brasil	Soya <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	±13 millones	El 75% de la soya es inoculado con 35 millones de dosis inoculante.
	Frijol- <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Rhizobium tropici</i>	500,000	11% del frijol (4.5 millones de ha) es inoculado
Bolivia	Soya <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	400 000	60% del cultivo de soya es inoculado
Uruguay	Soya <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	380 000	100% del cultivo de soya es inoculado
	Forrajes y hortalizas Diferentes especies de Rhizobia	600 000	15% con inoculante líquido Inoculado con peat a base de líquido
México	Maíz	60 000 a	2006 predicho para 2007
	<i>Azospirillum brasilense</i>	350 000	

Ejemplos de rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas

A continuación se mencionan algunas de las RPCP que mayor impacto han tenido en la promoción del crecimiento y que se han venido utilizando como biofertilizantes a nivel mundial: *Azospirillum brasilense*, *A. amazonense*, *A. chroococcum*, *Bacillus licheniformis*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. pumilis*, *B. macerans*, *B. subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *B. graminis*, *Enterobacter agglomerans*, *E. cloacea*, *Kluyvera ascorbata*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aerofaciens*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *Serratia marcescens* y *Streptomyces griseoviridis* (Glick, 1995). Dentro de este grupo el género *Bacillus* es de gran interés y ha sido objeto de muchos estudios relacionados con la promoción de crecimiento de plantas, debido a las ventajas que éstas ofrecen sobre otros géneros bacterianos.

Ensayos preliminares realizados con este género revelan que la aplicación de cepas de *Bacillus subtilis* a semillas de sorgo y frijol, tienen un efecto positivo y significativo sobre el crecimiento de estas plantas, principalmente en el desarrollo de la raíz. En cuanto a la variable longitud de raíz se observó que las plantas tratadas con estas cepas incrementaron el 30% más su longitud que las no tratadas; al igual que con el peso fresco de la planta, se observó un 411% más peso fresco en comparación con el testigo. Todo esto evidencia la capacidad de estas RPCP, de estimular de manera sustentable el desarrollo de las plantas lo cual repercute directamente en el rendimiento del cultivo, debido a un posible sinergismo entre el hospedante y los simbioses, lo que permitió una mejor absorción de los elementos esenciales como el N y el P (Chávez-Betancourt, 2005). El incremento del desarrollo de la raíz se ha adjudicado al papel de las sustancias reguladoras de crecimiento como las auxinas y la acción de la enzima ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) como fuente de nitrógeno, y que al disminuir el ACC de la raíz, no se produce suficiente etileno para detener el crecimiento de esta (Glick, 1995).

Influencia de las rizobacterias en el crecimiento de las plantas

La promoción del crecimiento en las plantas inoculadas con rizobacterias ocurre por varios factores; uno de ellos es por la síntesis de ciertas sustancias reguladoras del crecimiento, como giberelinas, citocininas y auxinas, las cuales estimulan la densidad y la

longitud de los pelos radicales, aumentando así la cantidad de raíces en las plantas, lo que incrementa a su vez la capacidad de absorción del agua y los nutrimentos y permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes en condiciones climáticas adversas, como las heladas o las sequías. Otro factor importante por el cual las rizobacterias ayudan a las plantas es que existen ciertas especies que las hacen nutrirse mejor; como por ejemplo, las *Pseudomonas* sp., las cuales, al solubilizar algunos nutrimentos poco móviles del suelo, como el fósforo, mejoran el ingreso de este macronutriente hacia la planta, lo que se traduce en una mayor cantidad de biomasa. Otras especies, como *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp., aumentan el aporte de nitrógeno, influyendo directamente en el crecimiento, desarrollo y rendimiento de la planta. Recientes investigaciones demuestran que existen algunos mecanismos indirectos que influyen en el crecimiento y el desarrollo de las plantas, como la producción de ciertos metabolitos que al funcionar como antagonistas de los microorganismos perjudiciales, hacen que las plantas se desarrollen en un ambiente idóneo libre de patógenos y tengan un mayor crecimiento y desarrollo (Lira-Saldívar *et al.*, 2007).

La evaluación del efecto promotor por acción de las cepas de RPCP, es medido por un incremento en la magnitud de diferentes parámetros biométricos, por ejemplo; peso seco del follaje, raíz y fruto, área foliar, número de hojas, altura de la planta entre otros, observando una germinación rápida de la semilla, mejor emergencia de la plántula, aceleración en su desarrollo e incremento en el rendimiento del cultivo (Cattelan *et al.*, 1998). El mecanismo que ha sido frecuentemente involucrado para explicar los efectos de las RPCP antes mencionadas, es la producción de fitohormonas.

La producción de auxinas por parte de las rizobacterias promueve la diferenciación del tejido vascular, la división y elongación celular, la elongación de tallos y la raíz e iniciación de raíces adventicias y laterales. En las plantas, la auxina más importante es el ácido indolacético (AIA), este se sintetiza a partir del triptofano en el meristemo apical y en las hojas jóvenes de donde se transporta a través del floema al resto de los tejidos vegetales. La concentración de auxina es crítica para la respuesta fisiológica, además de los factores que influyen en los niveles endógenos de las auxinas, como es la síntesis de novo, degradación, hidrólisis y formación de conjugados, las auxinas secretadas por las cepas RPCP pueden funcionar como fuente exógena para la planta. Es reconocido que cepas RPCP de los géneros

Azotobacter, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Azospirillum*, sintetizan AIA y su efecto en la planta mimetiza los efectos de AIA exógeno (Glick *et al.*, 1999).

Las cepas de RPCP unidas a la superficie de la semilla o la raíz de una planta en desarrollo y en respuesta al triptofano y otras moléculas pequeñas de los exudados de la semilla y/o raíz, las RPCP sintetizan y secretan AIA; determinada cantidad de AIA bacteriano puede ser tomado por la planta. Este AIA junto con el AIA endógeno de la planta pueden estimular la proliferación y la elongación celular, o inducir la actividad de la ACC sintasa para convertir SAM a ACC; este ACC puede ser exudado de la semilla o raíz de la planta y ser tomado por la bacteria y subsecuentemente ser hidrolizado por la enzima ACC deaminasa, a amonio y α -cetobutirato. La disponibilidad y el rompimiento del ACC por la bacteria promotora disminuyen la cantidad de ACC afuera de la planta, por lo que hay un incremento en la cantidad del ACC que es exudado por la planta para mantener el equilibrio entre los niveles de ACC interno y externo. Esto predice que la enzima ACC deaminasa disminuye la cantidad de ACC. Dos consecuencias que resultan de la disminución en los niveles de ACC en la planta son una reducción en la cantidad de etileno y la elongación de la raíz. Sugiriendo que la actividad de la ACC deaminasa es uno de los principales mecanismos que las RPCP usan para tener un efecto fitoestimulador (Lira-Saldívar *et al.*, 2007)

Se tiene evidencia de que algunas especies de *Pseudomonas* incrementan la absorción de nutrimentos, como N, P y K, además de servir para el biocontrol de los hongos fitopatógenos y producir fitohormonas en la rizósfera, lo cual promueve mayor crecimiento de las plantas. En general *P. fluorescens* puede promover el crecimiento de las plantas, vía producción de sideróforos extracelulares que secuestran óxidos férricos para convertirlos en formas disponibles para las raíces, además incrementa el volumen radical (Peter *et al.*, 1987). Dichas bacterias se concentran en el rizoplano y varían la proporción de acuerdo con los cultivos, por ejemplo, Vlassack *et al.* (1992), al inocular *P. fluorescens* en el rizoplano del plátano, encontraron el 10.8% más de población que en rizoplano de arroz (4.35%), en comparación con las plantas sin inocular, respectivamente. Los compuestos inorgánicos insolubles de fósforo [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] no están totalmente disponibles para las plantas, pero éstos pueden convertirse, por bacterias solubilizadoras de P, en fosfatos di y monobásicos, formas asimilables para las raíces de las plantas. Las principales especies activas en esta conversión

pertenecen a los géneros: *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* y *Flavobacterium* (Salih *et al.*, 1989).

Factores que afectan la función y estructura de las comunidades bacterianas del suelo

a) El estrés afecta la estructura de las comunidades microbianas del suelo.

Los efectos en la producción fácilmente se observan cuando se presenta una alteración prolongada del medio. Factores externos o intrínsecos aplicados a los suelos pueden ser severos, como cuando el suelo se vuelve a contaminar con metales pesados o con hidrocarburos aromáticos volátiles que disminuyen tanto la biomasa como la variedad de las comunidades bacterianas (Yao *et al.*, 2006). Tales presiones pueden impactar en la calidad y la productividad del suelo y disminuir la estabilidad cuando se hace frente a un medio ambiente fluctuante (Girvan *et al.*, 2005).

Otro estrés severo como la deshidratación, la salinidad y los cambios en la temperatura, afectan la estructura de la población microbiana. La exposición a cambios con condiciones severas durante una estación seca o cambios de clima extremos alternan la actividad microbiana en el suelo, desde una disminución en el área foliar de *Tamarix aphylla* en un desierto, hasta una cubierta foliar baja de roble en un ecosistema Mediterráneo (Shamir y Steinberger, 2007). Otro ejemplo de cambios drásticos es cuando se presenta un aumento del 70% en la concentración del CO₂ atmosférico, lo cual conduce a un cambio en la composición de la comunidad bacteriana de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*, que afecta la competitividad de la cepas en ecosistemas de pastos (Montealegre *et al.*, 2000). Estos ejemplos pueden ser vistos cuando el estrés ambiental es extremo. Aun que no se sabe aun si conduce a alteraciones transitorias o permanentes en la estructura de la comunidad (Smalla *et al.*, 2001).

b) Prácticas agrícolas y disturbios ecológicos.

Las prácticas agrícolas pueden no parecer severas, pero si conducen a graves alteraciones en los parámetros del suelo que afectan la rizósfera. Los cambios físicos en la estructura del suelo después de la labranza (Lupwayi *et al.*, 1998), la rotación de cultivos (Alvey *et al.*, 2003) y el riego con aguas residuales (Oved *et al.*, 2001) han mostrado un efecto

muy significativo sobre el suelo y la asociación raíz-bacteria, por lo tanto, la rotación de cultivo incrementa la diversidad bacteriana en la rizósfera. No obstante, pastizales perennes sostienen más diversidad de las bacterias del suelo que la rotación de los cereales y la papa (van Elsas *et al.*, 2002). La labranza reduce la diversidad bacteriana, pero esta reducción puede ser más alta en la mayor parte del suelo que en la rizósfera (Lupwayi *et al.*, 1998). Una respuesta similar es detectada cuando se aplican compostas al suelo (Inbar *et al.*, 2005). Algunos estudios han reportado que el tipo del suelo puede afectar la estructura asociativa de la comunidad microbiana con la raíz (Dalmastri *et al.*, 1999), esto fue señalado cuando se experimentó con tres especies de plantas, las que presentaron diferentes comunidades rizosféricas cuando se cultivaron en suelos con altos contenidos de arena y limo, pero estas diferencias se redujeron en dos de las tres especies cuando se cultivaron en un suelo arcilloso pesado (Marschner *et al.*, 2004). Tales efectos deberían por lo tanto ser considerados y no descuidarse cuando las RPCP son aplicadas al suelo.

c) Factores de la planta que afectan la asociación bacteria-raíz.

Entre los factores de la planta que tienen mayor influencia sobre las comunidades microbianas se incluyen: la edad fenológica de la misma (Herschkovitz *et al.*, 2005), la especie vegetal o el genotipo (Dalmastri *et al.*, 1999) y los exudados de las raíces (Castro-Sowinski *et al.*, 2002). Lo antes señalado se puede observar entre las poblaciones asociadas con la raíz, ya que algunas plantas pueden ser más sensibles al cambio de los exudados producidos durante el crecimiento de la planta (Herschkovitz *et al.*, 2005).

Los procesos biológicos en la rizósfera son fuertemente influenciados por los exudados de las raíces de las plantas, los cuales consisten básicamente de compuestos de carbón orgánico fácilmente degradables que atraen y simulan crecimiento microbiano (Lynch, 1990). Los aspectos más sobresalientes de los efectos en la rizósfera son los cuantitativos, como son el tamaño de la población microbiana y el incremento de las actividades cerca de la zona rizosférica (Curl y Truelove, 1986). Una observación detallada de los componentes del espacio en la raíz revelan que la distribución de las poblaciones microbianas pueden ser afectados por su localización en el sistema radicular (Marschner *et al.*, 2004). Sin embargo, es difícil distinguir quien produce o quien altera los exudados radiculares en la asociación

microorganismo-raíz. Por ejemplo, los flavonoides, tienen un papel destacado en las interacciones rizobia-leguminosa, ya que se ha descrito que pueden contribuir como formadores de la estructura de la comunidad microbiana en la rizósfera (Shaw *et al.*, 2006).

En la mayoría de los suelos el tamaño de las poblaciones son importantes, pero en la rizósfera la diversidad filogenética es más restringida (Berg *et al.*, 2005). Concentraciones altas de fuentes fácilmente asimilables (exudados) en la rizósfera mantienen poblaciones microbianas que son más activas, también son más densas pero menos diversas que las que están presentes en la mayoría de los suelos (Inbar *et al.*, 2005). La diversidad es más disminuida en el rizoplano que en la interface suelo-planta (Herschkovitz *et al.* 2005). Si bien, la diversidad está poco relacionada con los parámetros físicos del suelo (textura) eso también es considerado en la alteración causada por la exudación desde la raíz y puede adicionalmente ser empleada para seleccionar los rasgos competentes en la rizósfera (Walker *et al.*, 2003).

Es evidente que las interacciones suceden en forma reciproca entre el suelo, la planta y los microorganismos y que son muy complejas por lo que deben ser detalladamente consideradas (Costa *et al.*, 2006). Sin embargo, estas interacciones complejas pueden lograr efectos benéficos cuando se tienen datos disponibles sobre el efecto de las interacciones tripartitas en las comunidades de la rizósfera. Por ejemplo, en un estudio realizado por Berg *et al.*, (2005, 2006), se observó que las rizobacterias provienen de un acontecimiento natural y las comunidades fúngicas antagonistas como *Verticillium dahliae* se incrementan en ciertas especies de plantas y en determinados sitios de cultivo.

En resumen, datos actuales muestran que mientras la diversidad microbiana puede parecer frágil, las relaciones causa-efecto ligadas a la estructura de la comunidad y al medio ambiente, los parámetros biológicos y agrotécnicos están apenas emergiendo. Este conocimiento puede ser muy importante cuando sean aplicados los inoculantes microbianos en gran escala.

Efectos de la inoculación con RPCP en bacterias residentes o nativas

Una pregunta obvia es: ¿Que pasa con los microorganismos de la rizósfera cuando una RPCP es introducida en niveles o concentraciones altas en la rizósfera? No es de sorprenderse

que la respuesta sea que eso depende de varios factores. Esto se puede explicar por la base genética dentro y entre poblaciones nativas de RPCP. En relación al origen suelo-planta-medio ambiente de estos microorganismos, ciertos grupos pueden ser favorecidos, mientras que otros pueden ser inhibidos, o bien puede suceder que la introducción de RPCP pudiera no afectar la estructura de la población, pero se puede aseverar que las RPCP conducen a un aumento en el volumen de las raíces en el suelo, esto se observó en maíz inoculado con *Azospirillum brasilense* (Dobbelaere *et al.*, 2003).

Se ha señalado que *A. brasilense* produce un efecto que resulta de los mecanismos directos basados en la excreción de fitohormonas. Mediante este método, ninguna población bacteriana es dominante ni específica, lo cual se ha detectado por PCR y electroforesis avanzada (DGGE), la cual es una técnica digital basada en la detección de polimorfismo en un gen rotulador común en las poblaciones deseadas, teniendo un primer grupo general o específico respectivamente, siendo afectado por la inoculación de RPCP pero las plantas si revelan un sistema radicular denso (Lerner *et al.*, 2006). Las inoculaciones con RPCP pueden afectar el medio ambiente, esto puede suceder debido a una alta densidad microbiana y a una alta actividad metabólica (enzimática), así como a concentraciones altas de C, P y N en la rizósfera (Johansen y Binnerup, 2002). Por otro lado, se puede presentar un desarrollo mayor en el entorno del sistema radical, una alta cantidad de rizósfera en la masa del suelo y un suelo más activo, características que se consideran positivas (Winding, 2004).

Una hipótesis lógica es que indirectamente las RPCP actúan como un compuesto antibiótico secretado por la bacteria alterando las comunidades rizobacterianas. Sin embargo, la colonización de la rizósfera de varias plantas en un medio conteniendo el herbicida 2,4-diacetilforoglucinol, fenazina u otro antibiótico producido por *Pseudomonas fluorescense* solo han tenido efectos temporales transitorios y espacialmente limitados en las rizobacterias o poblaciones fúngicas (Bakker *et al.*, 2002). Aun cuando los suelos han sido sistemáticamente replantados en experimentos cíclicos, los efectos reportados han sido poco relevantes (Blouin-Bankhead *et al.*, 2004). Si bien grandes fracciones de rizobacterias aisladas pueden ser sensibles a la producción *in vitro* de antibióticos por las RPCP, estas poblaciones casi nunca son afectadas por la presencia de bacterias inoculadas *in vivo*, aun bajo condiciones genobióticas (Johansen y Binnerup, 2002). El traslape entre nichos que corresponden a un

inoculante y una bacteria residente parece estar limitada, aun con organismos residentes que están filogenéticamente emparentados con un inoculante. La separación espacial y la versatilidad de los nutrientes son ciertamente dimensiones importantes que contribuyen a esta restricción para el traslape (Castro-Sowinski *et al.*, 2007).

No obstante, algunos estudios indican que ocurren mayores efectos residuales de largo plazo por las RPCP productoras de antibióticos en bacterias residentes tal y como 2,4-diacetilforoglucinol producido por *Pseudomonas fluorescens* F113Rif, ya que este compuesto parece ser el causante de una reducción en la diversidad rizobial (Walsh *et al.*, 2003). Otros estudios apuntan fuertemente a un cambio en la estructura de la comunidad de algunos grupos específicos de bacterias. Por ejemplo, la producción de trifolitoxin por *Rhizobium etli* que ha causado reducciones fuertes en la proporción de trifolitoxin sensible a la bacteria de la *Alfaproteobacteria* (Robleto *et al.*, 1998).

Mientras que los resultados de muchos estudios sugieren otros factores, tales como los mencionados en las secciones previas, pueden ser más determinantes las estructuras exógenas de comunidades rizobacterianas; la introducción activa de RPCP en niveles altos, esta aseveración deberían ser considerada con algunas reservas como siguen: (1) muy pocos estudios han sido conducidos a largo plazo en los que las RPCP están sistemáticamente introducidas y medido sus efectos. (2) son escasos los resultados para explicar el mecanismo responsable de los efectos promotores del crecimiento de las plantas *in situ* debido a la introducción de microorganismos. (3) la definición de adjetivos como “transitorio” y “limitado” es correcta, así como la resolución aplicada en el estudio de las RPCP y que es aceptada por la sociedad científica. Además, tales efectos temporales o limitados en la estructura de la comunidad rizosférica pueden todavía tener efectos funcionales no bien conocidos (Castro-Sowinski *et al.*, 2007).

Las rizobacterias como control natural de agentes patógenos

Las rizobacterias como las del género *Pseudomonas sp.*, eliminan numerosos fitopatógenos del suelo, tales como bacterias, hongos, nematodos y virus, mismos que pueden llegar a reducir los rendimientos de los cultivos establecidos en tanto en invernadero como en campo. Las rutas de control que estos organismos ejercen son a través de diversos

mecanismos de defensa que involucran la producción de compuestos bacterianos, como sideróforos, ácido cianhídrico (HCN) y antibióticos. Incluso se ha comprobado que las rizobacterias inducen en algunos casos un sistema de resistencia en las plantas que hace que puedan tolerar el ataque de diversos patógenos del suelo al mismo tiempo. Algunos de los compuestos que inducen al biocontrol de las enfermedades como el hierro que es un elemento esencial para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos que habitan en el suelo debido a su función en la reacción enzimática de óxido-reducción que utilizan para su crecimiento y desarrollo, por lo que es importante para ellos contar siempre con fuentes constantes de este nutrimento. Algunas rizobacterias aplican cierta estrategia para tratar de asimilar este elemento cuando se encuentran en el suelo en pequeñas cantidades: producen una sustancia de bajo peso molecular afín al ión hierro, denominado sideróforo, mismo que se encarga de atraparlo, impidiendo que esté disponible para otros microorganismos que carezcan del sistema de asimilación, lo que asegura que sea el único capaz de utilizarlo, ejerciendo así el control biológico de enfermedades importantes, tales como *Fusarium sp.*, *Pythium sp.*, *Rhizoctonia sp.* y *Phytophthora sp.* (Chávez-Betancourt *et al.*, 2007).

Otro compuesto producido por estos microorganismos es el ácido cianhídrico (HCN), que tiene un papel muy importante en el control biológico de los agentes patógenos del suelo. Sin embargo, estas sustancias, producidas en grandes cantidades pueden alterar considerablemente la actividad fisiológica de la planta y llevarla a su muerte. En los últimos años se ha demostrado que la producción en pequeñas cantidades de HCN por las rizobacterias induce un sistema de resistencia en las plantas que las lleva a producir ciertos metabolitos que las ayudan a tolerar directamente el ataque de algunos patógenos del suelo y de las hojas; esto es lo que se ha denominado inducción de resistencia sistémica. Con relación a la producción de antibióticos, entre los casos más comunes de rizobacterias productoras de estas sustancias están las *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida*, las cuales tienen la capacidad de sintetizar algunos compuestos que causan la muerte de aquellos microorganismos (principalmente hongos) que entren en contacto con ellas (Montealegre, 2005).

Control biológico con microorganismos

El control biológico ha surgido en las últimas décadas como una alternativa para el manejo de fitopatógenos y principalmente ha sido orientado al control de patógenos

habitantes del suelo (rizósfera), ya que éste representa un hábitat heterogéneo, en donde la región del suelo en contacto con la raíz, es decir, la rizósfera, es un hábitat rico en nutrimentos, de tal manera que el 40% de los fotosintatos trasladados a la raíz son perdidos en el suelo en forma de mucílago, células muertas, material de la pared celular y solutos orgánicos, que incluyen azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos fenólicos (Lazarovits y Nowak, 1997). Todo esto implica procesos asociados con la competencia en la rizósfera, en donde los microorganismos que ahí residen interactúan entre si y con las raíces de las plantas por vías que afectan su crecimiento y desarrollo. Estos procesos pueden ser considerados como neutros, dañinos o benéficos para el crecimiento de las plantas (Fenchel *et al.*, 2000).

Debido a lo antes señalado la rizósfera ofrece la primera línea de defensa contra el ataque de los patógenos, por lo que se considera que los microorganismos que crecen allí son excelentes para usarse en programas de control biológico pues el amplio espectro de actividad antagónica de varios microorganismos contra los patógenos de las plantas hace que estas especies sean buenos candidatos (Podile y Prakash, 1996). El control biológico de las enfermedades de plantas constituye una práctica ampliamente difundida y sigue siendo objeto de investigación y desarrollo. Un concepto amplio de control biológico incluye nociones sobre las prácticas de cultivo y resistencia a las enfermedades. Desde esta perspectiva se acepta que el concepto de “control biológico” es el control de los patógenos por uno o más organismos, logrado de forma natural o a través de la manipulación del medio ambiente, huésped o antagonistas, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas. Por otra parte, se encuentra el concepto clásico que se restringe a que el “control biológico es el uso deliberado de un organismo para controlar a otro”. Sin embargo, y en relación a este último concepto, es necesario considerar que las interacciones de múltiples variables presentes en el medio ambiente pueden modificar las interacciones entre los microorganismos y su entorno, muchas de las cuáles pueden favorecer o impedir un control biológico efectivo (McSpadden-Gardener, 2002). El uso de microorganismos antagonistas de patógenos requiere de estudios previos que se inician con la selección de microorganismos potenciales controladores de fitopatógenos, para continuar con la identificación de los mecanismos que utilizan para ejercer el control biológico y posteriormente se pueda desarrollar una formulación para producirse a

gran escala. Los procedimientos de aplicación de los bioantagonistas también son fundamentales para lograr los efectos de control deseados.

En México son muy pocas las investigaciones que se han realizado sobre el control biológico de fitopatógenos mediante microorganismos antagonistas. La mayoría de estas investigaciones han sido efectuadas en el laboratorio o invernadero y muy pocas en campo. En la mayoría de los casos el modo de acción de los microorganismos con actividad de biocontrol ha sido la producción de metabolitos con actividad antibiótica, entre ellos, el género *Bacillus*, el cual es un promisorio candidato, ya que se caracteriza por sintetizar péptidos con actividad antibacteriana y antifúngica. Una de las alternativas es el uso de bacterias como agentes de control biológico dada la diversidad genética de *Bacillus*, tanto en el suelo como en la rizósfera, los cuales se consideran como colonizadores eficaces (Kim *et al.*, 1997). Uno de los usos de *B. subtilis* como agente de control biológico es mediante el tratamiento de semillas. Su efecto benéfico cuando se aplica junto a las semillas o en forma individual no se debe exclusivamente al antagonismo con los patógenos, sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas.

a) Ventajas y desventajas del control biológico

El empleo del control biológico ofrece ciertas ventajas en comparación con la aplicación de productos químicos. Los métodos de control biológico pueden ser empleados como parte de los programas de manejo integrado para reducir el uso de agroquímicos, así como lograr una disminución del daño ambiental, mejorar la calidad del agua y aumentar la seguridad de la salud pública. La aplicación coordinada de agentes de biocontrol con plaguicidas puede reducir las acciones deletéreas de microorganismos competitivos y puede además aumentar la producción de los cultivos, debido al posible efecto de los promotores de crecimiento de los biocontroladores. Estudios con *Brassica napus* tratadas con bacterias tolerantes a fungicidas combinadas con químicos tradicionales aumentaron la emergencia de plántulas en presencia de *Rhizoctonia solani*; esto puede ser debido al efecto de los aditivos promotores del crecimiento y al control de la enfermedad (Zablotowicz *et al.*, 1992).

Algunas medidas de control biológico pueden prevenir daños económicos a los cultivos, a diferencia de muchos plaguicidas, el biocontrol es específico para ciertas plagas. Con el uso de biocontroladores, otros organismos útiles, animales o personas no resultan afectados, logrando que éstos representen un menor peligro en relación con el impacto ambiental y la calidad del agua. Sin embargo, también se presentan ciertas limitantes en el uso del control biológico, ya que éste requiere de mayor investigación. La propiedad de especificidad del biocontrolador puede a su vez ser considerada como una desventaja, ya que puede ser de utilidad restringida (Lark, 1999).

b) Agentes de control biológico para los microorganismos fitopatógenos

Aunque los agentes microbiológicos incluyen virtualmente todas las clases de organismos (hongos, bacterias, nemátodos, protozoarios, virus, etc.) las bacterias y los hongos son los que han sido utilizados principalmente para el control biológico. Es importante destacar que diversos trabajos han demostrado su efecto par eliminar de la enfermedad con agentes antagónicos contra hongos fitopatógenos, sin embargo, son pocos los que logran ser exitosos al ser transferidos del laboratorio al campo o a ambientes de post-cosecha y por lo tanto, no pueden ser comercializados.

Un primer ejemplo de la comercialización de una bacteria antagónica fue a principios de la década de 1970 con *Agrobacterium radiobacter* K-84, la cual controla la agalla de la corona producida por *A. tumefaciens*; otro ejemplo es el de *Bacillus subtilis* A-13 la cual fue aislada del micelio de *Sclerotium rolfsii*, la que mostró una actividad inhibitoria en el crecimiento de algunos fitopatógenos y promovió el crecimiento de muchas especies de plantas; además, el uso de *Trichoderma harzianum* evidenció claramente el control de *Chondrostereum purpureum* en la década de 1980; posteriormente se introdujo al mercado *T. harzianum* (Trichodex 25 WP) utilizado preferentemente para el control de *Botrytis cinerea* (Montealegre, 2005).

Aproximadamente 20 géneros de bacterias han mostrado su potencial antagónico contra muchos fitopatógenos, sin embargo, son pocas las cepas que han mostrado consistencia bajo condiciones de campo; entre las cuales se destacan los siguientes microorganismo: *Agrobacterium radiobacter*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces*

griseoviridis, *Bacillus subtilis*, *Amelomyces quiqualis*, *Cyida oleophila*, *Coniothyxium minitans*, *Fusarium oxysporum*, *Gliocadium virens*, *Gliocadium catenulatum*, *Phtebia gigantea*, *Phythium oligyium* y *trichoderma harzianum* entre otros; estos ya se encuentran en el mercado en forma comercial para el biocontrol de patógenos de plantas (Fravel, 1999).

Cabe mencionar que esta lista es relativamente pequeña respecto a la cantidad de otros productos de origen químico, debido a que la capacidad antagónica *in vitro* no siempre resulta fácil de demostrar *in vivo* en el suelo, en donde las observaciones directas y el análisis químico se dificulta, dichas limitaciones deben considerarse cuando se extrapolen los resultados obtenidos en el laboratorio hacia en medio ambiente; es por esto que para considerar a un microorganismo como agente antagónico es vital que cumpla con los siguientes criterios: presentar estabilidad genética; actuar efectivamente a bajas concentraciones; no tener requerimientos nutricionales complejos; ser capaz de sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas; no producir daño al hombre y a los organismos; ser compatible con tratamientos físicos y químicos; no ser patógeno contra la planta; ser capaz de crecer en un medio barato como fermentadores y además, permitir crear una formulación que pueda ser efectiva bajo condiciones de almacenamiento (Baker, 1987).

c) ***Bacillus subtilis* como agente de control biológico.**

Una de las bacterias que más han sido estudiadas debido a su capacidad para la supresión de enfermedades en las plantas es el género *Bacillus*. Son considerados como menos competentes en la rizósfera comparados con especies del género *Pseudomonas* y quizá por esta razón muchas investigaciones proponen el desarrollo de agentes de control biológico por introducción en la rizósfera con especies de *Pseudomonas* (Kim *et al.*, 1997). Sin embargo, especies de *Bacillus*, como grupo, ofrece ciertas ventajas sobre cepas del género *Pseudomonas* y otras bacterias gram negativas para la protección contra hongos patógenos de raíz, debido a su capacidad de formar endosporas y a la actividad del amplio espectro de sus antibióticos, otra característica es que este grupo es capaz de utilizar una extensa cantidad de compuestos orgánicos simples además de ser anaeróbicos facultativos (Clements *et al.*, 2002).

Uno de los mejores ejemplos conocidos, es la aplicación de *B. subtilis* A13, el cual se aisló en Australia hace 25 años; fue seleccionada en base a su capacidad de inhibición *in vitro*

contra 9 patógenos y posteriormente mostró su efecto promotor de crecimiento en diferentes cultivos como maíz, cereales y zanahoria. Otro ejemplo es la cepa de *B. subtilis* GB103 conocida comercialmente como Kodiak, la cual controla la enfermedad conocida como ahogamiento de cultivo de papa, esta funciona a través de lo que se llama “nicho de ocupación”. *B. subtilis* coloniza la raíz al ocupar un espacio físico sobre esta, desplazando así a los patógenos. Este producto tiene la ventaja a diferencia de otros biofungicidas de perdurar toda la vida de la planta, ya que es un organismo vivo que convive con la raíz, alimentándose de los exudados de ésta.

Mecanismos de acción del control biológico

Los mecanismos de acción por los cuales opera el control biológico son importantes conocerlos, ya que podrían explicar su justificación para utilizarlo. Se proponen tres mecanismos: competencia, parasitismos y antibiosis (Viñas *et al.*, 2005).

• Competencia

La competencia entre los microorganismos por nutrientes esenciales, puede resultar en el desplazamiento del patógeno; un ejemplo de esto es la presencia de sideróforos.

Sideróforo

Del griego: transportador de hierro, es un compuesto quelante de hierro secretado por microorganismos. El ion hierro Fe^{3+} tiene muy poca solubilidad a pH neutro, por ende no puede ser utilizado por los organismos. Los sideróforos disuelven estos iones a complejos de Fe^{3+} que pueden ser asimilados por mecanismos de transporte activo. Muchos sideróforos son péptidos no ribosomales. Visto de otra forma: bajo condiciones anóxicas, el hierro está generalmente en el estado de oxidación +2 (ferroso) y soluble. Sin embargo, bajo condiciones óxicas, el hierro se encuentra generalmente en la valencia +3 (férico), formando varios minerales insolubles. Para obtener hierro de dichos minerales, las células producen sideróforos acoplables al hierro para la unión y transporte hacia dentro de la célula. Gran parte de los sideróforos consisten de derivados del ácido hidroxámico, el cual actúa muy fuerte como quelante férrico. Otras estrategias para aumentar la solubilidad del hierro y su

aceptación por parte de la célula son: la acidificación del entorno (usado por las raíces de las plantas) o la reducción extracelular del Fe^{3+} a iones de Fe^{2+} más solubles. Ejemplos de sideróforos producidos por bacterias y hongos son ferricromo (*Ustilago sphaerogena*), Pseudomonadaceae (*Pseudomona aeruginosa*), enterobactina (*Escherichia coli*), enterobactina y bacillibactina (*Bacillus subtilis*), ferrioxamina B (*Streptomyces pilosus*), fusarinina C (*Fusarium roseum*), yersiniabactina (*Yersinia pestis*), vibriobactina (*Vibrio cholerae*), azotobactina (*Azotobacter vinelyii*), pseudobactina (*Pseudomonas B 10*) y también la bacteria eritrobactina (*Saccharopolyspora erythraea*) (<http://es.wikipedia.org/wiki/Sider%C3%B3foro>).

Otro ejemplo de la competencia por nutrientes es la de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* los cuales son hongos de postcosecha típicamente dependientes de los nutrientes, como los hongos necrotróficos sus esporas requieren de estas sustancias para germinar y comenzar el crecimiento de las hifas antes de penetrar al sustrato. Estos nutrientes se encuentran en las heridas de las frutas, donde la competencia microbiana actúa inhibiendo el desarrollo de estos patógenos (Díaz de Villegas *et al.*, 2002).

- **Parasitismo.**

Un segundo modo de acción del control biológico lo constituye el parasitismo, el cual opera por la acción de las enzimas extracelulares degradativas tales como quitinasas y gluconasas. La actividad de la quitinasa, fue demostrada por la pérdida en la eficacia del biocontrol por mutantes de *Serratia marcescens*, en las cuales el gen *ChiA* había sido inactivado; así mismo, una recombinante de *Escherichia coli* expresó el gen *ChiA* de *S. marcescens*, la cual demostró ser efectiva al disminuir la incidencia de las enfermedades causadas por los hongos *S. rolfsii* y *R. solani* (Oppenheim y Chet, 1992).

- **Antibiosis.**

Este mecanismo de acción está involucrado con la eliminación de las enfermedades de las plantas. El papel que juegan los antibióticos es el de conferir una ventaja competitiva a los microorganismos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos. El ejemplo más

conocido sin duda ha sido la producción de penicilina por *Penicillium notatum* descubierta en 1929. Otro ejemplo es el de *Trichoderma* sp., un reconocido hongo antagonista del que se conocen más de 33 especies presentes en los más diversos hábitats. *Trichoderma*, actúa mediante diferentes mecanismos antagonizando contra muchos patógenos de plantas (Monte, 2001).

Uso de microorganismos antagonistas y promotores de crecimiento en la solarización de suelos.

El uso de la solarización de suelos con acolchado de polietileno transparente se ha venido utilizando en diversas regiones del mundo como parte de un sistema integral para los manejos sustentable de enfermedades en cultivos hortícolas. La efectividad a mediano y largo plazo de la solarización más microorganismos antagonistas y promotores del crecimiento de las plantas ha sido demostrado por algunos autores como Steven *et al.*, (2003), quienes utilizaron la solarización y *Trichoderma virens* como agente de control biológico para reducir el daño causado por el hongo *Sclerotium rolfsii* y el nematodo *Meloidogyne incognita* en el cultivo de tomate. Estos autores encontraron que la integración de solarización con *T. virens* redujeron significativamente las poblaciones de los organismos dañinos antes mencionados durante mas de dos años después de haber solarizado el suelo durante cuatro semanas.

Con la finalidad de encontrar agentes de biocontrol contra *Verticillium dahliae* en solanáceas Tjamos *et al.*, (2000), analizaron el efecto de bacterias antagonistas obtenidas de las partes apicales de las raíces de tomate que se sembraron en suelos previamente solarizados. Cincuenta y tres de las 435 cepas bacterianas aisladas tuvieron un efecto antagonista contra *V. dahliae* y otros patógenos del suelo. Una actividad significativa de biocontrol fue demostrada bajo condiciones de invernadero con 18 aislados de los microorganismos antagonistas identificados como *Bacillus* sp. También estos autores demostraron que en suelos sembrados con papa muy infestados con *Verticillium* las semillas de papa que se espolvorearon con una formulación en polvo de *Bacillus* mostraron una clara reducción en el desarrollo de los síntomas causados por este hongo y además se incrementó el rendimiento de papa en 25% en comparación con el testigo.

El efecto de la solarización de pre-siembra más la bacteria antagonista *Pseudomonas aureofaciens* (BG33) fue estudiado bajo condiciones de campo con la finalidad de controlar el nematodo de los duraznos por Nyczepirl *et al* (1998). Las bacterias antagonistas fueron aplicadas a las zonas de las raíces de los duraznos al momento de la plantación y después de que se habían solarizados las parcelas experimentales. Los autores reportan un efecto positivo sinérgico entre la solarización y el agente de biocontrol BG33, ya que se redujo significativamente la población de nematodos (*Criconebella xenoplax*).

La efectividad de la solarización y un producto bionemático conteniendo esporas liofilizadas de bacterias antagonistas (*Bacillus firmus*) fue evaluada en invernadero y campo contra los nematodos agalladores *Meloidogyne* spp. y *Pasteuria penetrans* por Giannakou *et al* (2007). El periodo de solarización aplicado fue de 15 a 30 días y la dosis del bionemático fue $0.9 \text{ g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de suelo, la cual fue aplicada justo antes de aplicar la película de polietileno o inmediatamente después de su remoción. Los resultados mostraron que la combinación de la solarización de suelos con el bionemático mejoró notablemente el control de las poblaciones de ambas especies de nematodos y produjeron resultados similares que los obtenidos con el tratamiento químico.

III. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

La agricultura sustentable propone regresar a los antiguos modelos de cultivo, mejorados con base científica, que durante mucho tiempo han demostrado ser menos perjudiciales al ambiente y requieren menores insumos sintéticos. Entre los organismos microbianos más empleados y mejor estudiados como biofertilizantes encontramos a *Rhizobium* (y sus géneros relacionados) y *Azospirillum*, entre las bacterias, y los hongos micorrícicos arbusculares como *Glomus*, entre otros. *Rhizobium* fija nitrógeno del aire y lo transfiere a las leguminosas, con lo cual puede suplir la mayor parte de la demanda de nitrógeno de las plantas. *Azospirillum*, un fijador de nitrógeno de vida libre, además produce fitohormonas que promueven el crecimiento y expansión de las raíces de un sinnúmero de plantas. Por otra parte, *Glomus*, una micorriza arbuscular, se asocia estrechamente con las raíces y solubiliza el fósforo, haciéndolo asimilable por las plantas. De esta manera, estos tres grupos de organismos forman un recurso biotecnológico importante con ventajas claras para los cultivos agrícolas basados en un enfoque sustentable (Peralta-Díaz, 2007).

Una de las razones por las que el mercado de los agroquímicos sintéticos usados como fertilizantes y plaguicidas que protegen los cultivos tradicionales haya quedado estático, es la adopción y aceptación creciente de productos modificados genéticamente (James, 2006). Investigadores convencidos de la alternativa del uso de los microorganismos han creado líneas de búsqueda del conocimiento para poder hacer aún más rentable y preciso el uso de éstos. Actualmente se está trabajando con modificaciones genéticas tanto en plantas (mayor producción de exudados) para poder mejorar la estructura de la población microbiana en la rizósfera como en los microorganismos con mayor producción de antibióticos y aumentar el crecimiento de las plantas, con el objetivo de que la simbiosis existente entre estos sea aun más exitosa (Castro-Sowinski *et al.*, 2007).

Actualmente los productos químicos naturales, sintéticos y semi-sintéticos han sido usados extensivamente, tanto para el control de plagas y enfermedades en la agricultura, como para el control de los vectores de enfermedades humanas, y sin duda seguirán siendo usados por más décadas. En el 2006, las ventas globales de los agentes de control de plagas usados para aplicarlos en cultivos fueron de \$35,575 millones de dólares, mientras que la venta total

de agroquímicos para la protección de los cultivos no parece crecer más de \$30,000 millones de dólares, el mercado para los químicos si seguirá creciendo. Los bioplaguicidas, principalmente los productos basados en *Bacillus thuringiensis*, representan un valor estimado de más de \$700 millones de dólares y también se espera que se siga incrementando, de aquí el interés de explorar esta área de la agricultura sustentable y de crear oportunidades que sean alternativas para un beneficio económico y ecológico (McDougall, 2007).

IV. ÁREAS DE OPORTUNIDAD

Un componente esencial para mantener el equilibrio de los agrosistemas son los microorganismos que habitan la rizósfera, tales como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) que establecen una simbiosis mutualista con la mayoría de las plantas. Se ha reportado que la inoculación con HMA a especies de interés agrícola, optimiza la nutrición y el crecimiento de las plantas y les permite superar situaciones de estrés biótico y abiótico. Los beneficios son mayores en suelos donde no existen poblaciones de HMA nativos, o han sido eliminadas por el empleo de prácticas agrícolas desfavorables. Los HMA son altamente compatibles con bacterias fijadoras de nitrógeno y con algunos fertilizantes químicos como el sulfato de amonio. Además, los síntomas de enfermedad por el ataque de patógenos se ven atenuados. Los HMA constituyen entonces, una valiosa herramienta biotecnológica para el desarrollo de la agricultura sustentable (Mena-Violante *et al.*, 2007).

La rizósfera de las plantas es un complejo habitable donde la acción del desarrollo radicular responde a medios combinados e interactuantes: principalmente a la residencia de los microorganismos que están íntimamente relacionados con factores bióticos y abióticos del suelo. La introducción de una gran cantidad de bacterias exógenas como inóculo afectan el potencial del microorganismo residente, al igual, un inóculo puede ser afectado por estos microorganismos. Tales interferencias pueden ser: incrementar o disminuir el efecto de las RPCP efectivas, de allí la necesidad de estudiar la ecología microbiana de la rizósfera siguiendo las aplicaciones de RPCP (Dos Santos, 2005).

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La utilización de los biofertilizantes en los sistemas productivos es una alternativa viable y sumamente importante para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sustentable, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad. En la actualidad, el uso de biofertilizantes, aplicados como inoculantes dentro de los sistemas de producción agrícola, está teniendo un gran auge, especialmente para lograr una mayor disponibilidad de los nutrientes que permitan un rendimiento mayor de los cultivos, con la conservación del medio ambiente y una mayor tasa de retorno de la inversión.

Las RPCP son esenciales para la agricultura sustentable, ya que poseen grandes virtudes, estimulan un mayor crecimiento radicular y de la planta, mayor absorción de los nutrientes y muchas de ellas tienen un efecto antagónico contra microorganismos no deseados en el suelo. Comprender las interacciones ecológicas es crucial para el verdadero uso de los inoculantes, más aun en el contexto de los microorganismos genéticamente modificados o de los cultivos transgénicos. El conocimiento deberá ser garantía de una sustentabilidad de la economía y el medio ambiente en donde deberán ser remplazados los contaminantes químicos por las RPCP y proveer efectos reproducibles en las parcelas año tras año. Afortunadamente, el uso de RPCP hoy es un suceso sin precedentes que finalmente ha emergido para coadyuvar en el fortalecimiento de una agricultura ecológica o sustentable y de menor impacto ambiental.

Es posible concluir que el uso de estos microorganismos antagonistas benéficos combinados con la solarización con plástico transparente y de bajo calibre tienen un gran potencial en la agricultura sustentable, ya que permiten un manejo agronómico de bajo impacto ambiental para los cultivos, lo que conlleva a una buena calidad del producto final y a un costo razonable para el agricultor. Lo antes señalado indica que la agroplasticultura también va encaminada a una agricultura ecológica y amigable con los ecosistemas.

Esta por demás mencionar que es necesario ser parte de la agricultura sustentable, ya que como se ha descrito en todo este documento, es sin duda alguna la alternativa para que los ecosistemas puedan subsistir en años futuros y poder hacer la vida humana más soportable, frente a diversos problemas como el calentamiento global y la crisis alimentaria que prevalece en todo el mundo.

Los biofertilizantes con base a microorganismos rizosféricos se revelan como una estrategia importante para lograr una agricultura ecológica y sustentable, ya que su empleo permite disminuir insumos químicos sintéticos y además reduce el impacto ambiental desfavorable de los últimos, permitiendo obtener ahorros económicos, incrementar rendimientos, mejorar la salud general de las plantas y regenerar paulatinamente las características físicas, químicas y biológicas de los suelos.

VI. REFERENCIAS

- Alvey, S., Yang, C.H., Buerkert A. y Drowley, D.E. 2003. Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in west African soils. *Biol Fertil Soils* **37**: 73–82.
- Bago, B. C., Azcon A. Y., Schar, H. y Pteffer, 2001. El micelio externo de la Micorriza arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno, 78-92.
- Bakker, P., Glandorf, D., Viebahn, M., Ouwens, T., Smit, E., Leeftang, P., Wernars, K., Thomashow, L., Thomas-Oates, J. y van Loon, L. 2002. Effects of *Pseudomonas putida* modified to produce phenazine-1-carboxylic acid and 2,4-diacetylphloroglucinol on the microflora of field grown wheat. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 617–624.
- Baker, K. F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* **25**:67-85.
- Berg, G., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R. y Smalla, K. 2005. Impact of plant species and site on rhizosphereassociated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4203–4213.
- Berg, G., Opelt, K., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R. y Smalla, K. 2006. The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiol Ecol* **56**:250–261.
- Bidwell, R. 1993. Fisiología Vegetal. Edición en español. Ontario, Canadá. Traducción Guadalupe Gerónimo Cano y Cano y Manuel Rojas Garcidueñas. México.
- Blouin-Bankhead, S., Landa, B., Lutton, E., Weller, D., Gardener, B., y McSpadden, B. 2004. Minimal changes in rhizobacterial population structure following root colonization by wild type and transgenic biocontrol strains. *FEMS Microbiol Ecol* **49**: 307–318.
- Bolan, N. S. 1991. A Critical Review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant soil* **134**: 189-207.
- Borie, R., Rubio, R., Morales, A. y Castillo, C. 2005. Relación entre densidad de hifas de

hongos micorrizógenos arbusculares
y producción de glomalina con las características físicas y químicas de suelos
bajo cero labranza. Universidad de la Frontera, casilla 54-d, Temuco, Chile.

- Brockwell, J. y Bottomley, P. 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 683-697.
- Burdman, S., Jurkevitch E. & Okon Y. 2000. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*, Vol. II. (Subba Rao NS & Dommergues YR, eds), pp. 229–250. *Science Publishers*, Enfield, NH.
- Carrera, M., Sánchez-Yáñez, J. y Peña-Cabriales, J. 2004. Nodulación natural en leguminosas silvestres del Estado de Nuevo León
- Castro-Sowinski, S., Herschkovitz, Y., Okon, Y. y Jurkevitch, E. 2007. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. Minireview. Federation of European Microbiological Societies Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved. *FEMS Microbiol Lett* 276: 1–11
- Catroux, G., Hartmann, A., y Revellin, C. 2001. Trends in rhizobia inoculant production and use. *Plant and Soil* 230: 21-30.
- Cattelan, A., Harlet, R., Fuhrmann, J. 1998. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63:1670-1680.
- Chavez- Betancourt, C. 2005. Uso de Rizobacterias para el Control de Hongos Fitopatógenos y Promoción de Desarrollo en Plantas. Tesis de Maestría. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coah. México.
- Chávez-Betancourt, C., Flores-Olivas, A. y Lira-Saldivar, R. 2007. Uso de Rizobacterias para el Control de Enfermedades y Promoción de Crecimiento en Plantas en: Agricultura Sustentable y Biofertilizantes. Edts. Lira-Saldivar y Medina-Torres. Serna Editores. Monterrey, Nuevo León, México.
- Clements, L., Miller, U. y Streips, L. 2002. Comparative growth analysis of the facultative anaerobes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, y *Escherichia coli*. *Syst.*

- Appl. Microbiol.* **25**:284-286.
- Costa, R., Götz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G. y Smalla, K. 2006. Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiol Ecol* **56**: 236–249.
- Curl, E. y Truelove, B. 1986. *The Rhizosphere*. Springer-Verlag, New York.
- Dalmastri, C., Chiarini, L., Cantale, C., Bevivino, A. y Tabacchioni, S. 1999. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. *Microbiol Ecol* **38**: 273–284.
- Date, R.. 2000. Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. *Field Crops Research* **65**: 123-136.
- Delgadillo-Jiménez, R., Gil-Virgen, C., Tabares-Franco, S. y Olalde P. 2001. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. Avance y Perspectiva **vol. 20**. CINVESTAV. Irapuato, Gto. México.
- Díaz de Villegas, M., Villa, P. y Frías, A. 2002. Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **44**:112-117.
- Dommergues, Y. R. 1995. Nitrogen fixation by trees in relation to soil nitrogen economy. *Fertilizer Research* **42**: 215-230.
- Dommergues, Y. y Subba-Rao, N. 2000. Introduction of N₂-fixing trees in non-N₂-fixing tropical plantations. In Subba-Rao N. y Dommergues, Y. (eds.), *Microbial interactions in agriculture y forestry*, **2**:131-154. Enfield, NH: Science Publishers, Inc.
- Dos Santos, M. E. 2005. Hidroponía y promoción del crecimiento de plántulas de tomate inoculadas con bacterias RPCP. Editorial UNQ SERIE DIGITAL *Ciencia y Tecnología*.
- Dobbelaere S, Vanderleyden J & Okon Y (2003) Plant growthpromoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *CRC Crit Rev Plant Sci* **22**: 107–149.
- FAO. 1995. Manual técnico de la fijación del nitrógeno. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. pp: 10-35.
- FAO. 2004. La eliminación de plaguicidas podría costar 500 millones de dólares.

- Fenchel, T., King, G. y Blackburn, T. 2000. Bacterial Biogeochemistry. *The Ecophysiology of mineral Cycling*. 2^{ed} Academic Press, San Diego. Pp 43-59, 117-161.
- Ferrera-Cerrato, R. 1995. Efecto de rizósfera. pp. 36-52. *In*: Ferrera-Cerrato, R. y Pérez M. J. (eds.). Agromicrobiología. Elemento útil en la agricultura. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Fogar, M., Iglesias, M. y Rosso, M. 2002. Estudio exploratorio de la infección por Micorrizas de la Caña de azúcar. Cracogna, Ministerio de Agricultura Industria y Comercio de la provincia de Santa Fe. Argentina.
- Fravel, D. R. 1999. Comercial biocontrol products for use against soilborne crop diseases. [Http://barc.usda.gov/psi/bpd/bioprod.htm](http://barc.usda.gov/psi/bpd/bioprod.htm).
- Fuentes-Ramirez, L. y Caballero-Mellado S. 2005. Bacterial biofertilizers. PGPR: Biological Control and Biofertilization (Sadiqui ZA, ed), pp. 143–172. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Gallon, J. R. 2001. N₂ fixation in phototrophs: Adaptation to a specialized way of life. *Plant y Soil* **230**: 39-48.
- Giannakou, I., Anastasiadis, I., Gowen, S. y Prophetou-Athanasiadou, D. 2007. Effects of a non-chemical nematicide combined with soil solarization for the control of root-knot nematodes. *Crop Protection*. **26**: 1644-1654.
- Girvan, M., Campbell, D., Kilham, K., Prosser, J. y Glover, L. 2005 Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ Microbiol* **7**: 301–313.
- Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**:109-117.
- Glick, B., Patten, C., Holguin, O. y Penrose, D. 1999. Biocontrol mechanism. Chapter 7. in: Biochemical y genetic mechanism used by plant growth romoting bacteria. Ontario Canada. *Imperial Collage Press*. pp. 215-248.
- Graham, P. y Vance, C. 2000. Nitrogen fixation in perspective: An overview of research y extension needs. *Field Crops Research* **65**: 93-106.
- Granados, S., López, R. y Gama F. 2001. Interacciones Ecológicas de las Plantas. UACH. México.

- Hernández, D. 1991. Las *micorrizas*. <http://www.cdeea.com/micorrizas.htm>.
- Herschkovitz, Y., Lerner, A., Davidov, Y., Rothballer, M., Hartmann, A., Okon, Y. y Jurkevitch, E. 2005. Inoculation with the plant growth promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Microbiol Ecol* **50**: 277–288.
- Hinsinger, P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: A review. *Plant y Soil* **237**: 173-195.
- Inbar, E., Green, S., Hadar, Y. y Minz, D. 2005. Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of Streptomycetes. *Microbiol Ecol* **50**: 73–81.
- Irisarri, P., Gonnet, S., y Monza, J. 2001. Cyanobacteria in Uruguayan rice fields: Diversity, nitrogen fixing ability y tolerance to herbicides y combined nitrogen. *Journal of Biotechnology* **91**: 95-103.
- Izaguirre-Mayoral, M., Labandera, C. y Sanjuan, S. (eds) 2007. Biofertilizantes en Iberoamerica: Una Vision Tecnica, Cientifica y Empresarial. Imprenta Denad Internacional S.A. Montevideo, Uruguay p. 98.
- James, C. 2006. Executive Summary of Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. ISAAA Briefs No. 35. ISAAA: Ithaca, NY. URL: <http://www.isaaa.org>.
- Johansen J. E. y Binnerup S. J. 2002. Contribution of Cytophagalike bacteria to the potential of turnover of carbon, nitrogen, and phosphorus by bacteria in the rhizosphere of barley (*Hordeum vulgare* L). *Microbiol Ecol* **43**: 298–306.
- Kim, H., Yoon, B., Lee, C., Suh, H., Oh, H., Katsuragi, T. y Tani, Y. 1997. Production y properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *J. Ferment. Bioeng.* **84**: 41-46.
- Kloepper, J. W. 1989. *TIBTECH* 7, 39. En: Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. Delgadillo-Jiménez, R., Gil-Virgen, C., Tabares-Franco, S. y Olalde, P. (Eds) Avance y Perspectiva vol. **20**. CINVESTAV. Irapuato, Gto. México
- Lark, R. P. 1999. Plant disease y biocontrol FAQ.

- Lazarovits, G. y Nowak, J. 1997. Rhizobacteria for improvement of plant growth y establishment. *Hort Science*. **32**:188-197.
- Lerner, A., Herschkovitz, Y., Baudoin, E., Nazaret, S., Moënné-Loccoz, Y., Okon, Y. y Jurkevitch, E. 2006. Effect of *Azospirillum brasilense* on rhizobacterial communities analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and automated intergenic spacer analysis. *Soil Biol Biochem* **38**: 1212–1218.
- Lira-Saldivar, H. y Medina-Torres, J. 2007. Agricultura Sustentable y Biofertilizantes. Serna Editores. Monterrey, Nuevo León, México.
- Lupwayi, N., Rice, W. y Clayton, G. 1998. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biol Biochem* **30**: 1733–1741.
- Lynch, J. M. 1990. The rhizosphere. John Wiley. New York.
- Marschner, P., Crowley, D. y Yang, C. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil* **261**: 199–208.
- McDougall, P. 2007. The global crop protection market – industry prospects. URL: http://www.cpda.com/TeamPublish/uploads/McDougall_Global.pdf (revisión: 19 July 2008).
- Mcspadden-Gardener, B. y Fravel, D. 2002. Biological control of plant pathogens: Research. Comercialization y application in the USA. Online. *Plant Health progress* Doi 10.1094/PHP-2002-0510-01-RV.
- Mena-Violante, H., León-Martínez, G., Jiménez-Delgadillo, R., Serrato-Flores, R., Valdés-Rodríguez, S. y Olalde-Portugal, V. 2007. Fundamentos Para Utilizar Hongos Micorrízicos Arbusculares Como Biofertilizantes. En: Agricultura Sustentable y Biofertilizantes. Edts. Lira-Saldivar y Medina-Torres. Serna Editores. Monterrey, Nuevo León, México.
- Mendoza y Ramírez, 2001. Influencia de los hongos micorrízicos arbusculares sobre la producción de materia seca y absorción de fósforo por plantas de maíz fertilizadas con roca fosfórica. XV Congreso Latinoamericano de la Ciencia del suelo. Cuba.

- Monte, E. 2001. Understying Trichoderma: between biotechnology y microbial ecology. *Int Microbiol.* **4**:1-4.
- Montealegre, C., Van Kessel, C., Blumenthal, J., Hur, H., Hartwig, U. y Sadowsky, M. 2000. Elevated atmospheric CO₂ alters microbial population structure in a pasture ecosystem. *Global Change Biol* **6**: 475–482.
- Montealegre, A. J. 2005. Perspectivas y situación del uso de biofunguicidas en Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile.
- Nyczepir, A., Kluepfel, D., Lawrence, J., y Zehr, E. 1998. Effect of prepalnt solarization on ring nematode in a pech tree short life site. USDA-ARS www.mbao.org/1998airc/Q04nyczepir.pdf
- Oppenheim, A. y Chet, I. 1992. Cloned chitinases in fungal plant pathogen control strategies. *Trends Biotechnol.* **10**:392-394.
- Oved, T., Shaviv, A., Goldrath, T., Mandelbaum, R. y Minz, D. 2001. Influence of effluent irrigation on community composition and function of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3426–3433.
- Peralta-Díaz, H. 2007. *Azospirillum, Micorrizas y Rhizobium*. Biofertilizantes Microbianos para una Agricultura Sustentable En: Agricultura Sustentable y Biofertilizantes. Edts. Lira-Saldivar y Medina-Torres. Editorial Serna. Monterrey, Nuevo León, México.
- Peter, A., Barker, A., Marugg, J., Weisbeek, P. y Schippers, B. 1987. Bioassay for studying the role of siderophores in potato growth stimulation by *Pseudomonas spp.* in short potato rotations. *Soil Biol. Biochem.* **19**: 443-449.
- Podile, A. y Prakash A. 1996. Lysis y biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF-1. *Can. J. Microbiol.* **42**:533-538.
- Prat, D. 1992. Effect of inoculation with *Frankia* on the growth of *Alnus* in the field. *Acta Oecologia* **13**: 463-467.
- Rai, M. K, 2006. Potential y Possible Uses of Bacterial y Fungal Biofertilizers. Handbook Of Microbial Biofertilizers. *Food Products Press*[®]. Nueva York, USA.

- Reis V., De Paula M. y Döbereiner J. 1999. Ocurrencia de *Micorrizas* arbusculares y la bacteria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* en caña de azúcar". Brasilia, V 34, N° 10 pag. 1933 – 1941. Brasil.
- Rivera, C. P. 2007. Respuesta a la Aplicación de *Endospor* en Tres Genotipos de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), Bajo Condiciones de Invernadero e Hidropónia. Tesis de Licenciatura UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Robleto, E., Borneman, J. y Triplett, E. 1998. Effects of bacterial antibiotic production on rhizosphere microbial communities from a culture-independent perspective. *Appl Environ Microbiol* 64: 5020–5022.
- Rodríguez, M.N. 1995. Microorganismos libres fijadores de nitrógeno. pp. 105-126. In: R. Ferrera-Cerrato y J. Pérez M. (eds.). Agromicrobiología. Elemento útil en la agricultura. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Rojas-Andrade, R., Cerda-García-Rojas, C., Frías-Hernández J., Dendooven, L., Olalde-Portugal, V. y Ramos-Valdivia A. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungus induced changes in the concentration of trigonelline in semi-arid leguminous plant (*Prosopis laevigata*) during the pre-symbiotic phase. *Mycorrhiza* 13:49-52.
- Rueda, E., Tarazón, M., Barrón, J., Corral, F., Murillo, B., García, J., Troyo, E., Holguín, R., Larrinaga, J., Bashan, Y., González, E., Puente, M. y Hernández, J. 2007. Bacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas: ¿Biofertilizantes en la Producción de Halófitas con Potencial Agroindustrial y Especies Forestales Nativas de Ambientes Arido-Salinos? En: Agricultura Sustentable y Biofertilizantes. Edts. Lira-Saldivar y Medina-Torres. Serna Editores. Monterrey, Nuevo León, México.
- Ruiz, L., Rivera, R., Carvajal, D. y Milián, O. 2001. Efectividad de las asociaciones micorrízicas en las raíces y tubérculos en suelos pardos con carbonatos y ferralíticos rojos. XV Congreso Latinoamericano de la Ciencia del suelo. Cuba.
- Salih, H., Yonka, A., Abdul-Rahem, A. y Munam, B. 1989. Availability of phosphorous in calcareous soil treated.

- Sánchez-Yáñez, J. M. 2008. Inoculación de leguminosas con Rhizobium. Instituto de Investigaciones Químico Biológica. Morelia, Michoacán, México. <http://www.monografias.com/trabajos16/rhizobium/rhizobium.shtml>
- Schachtman, D., Reid, R., y Ayling, S. 1998. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiology* **116**: 447-453.
- Schwencke, J. y Carú, M. 2001. Advances in actinorhizal symbiosis: Host plant-*Frankia* interactions, biology, and applications in arid land reclamation: A review. *Arid Land Research y Management* **15**: 285-327.
- Shamir, I. y Steinberger, Y. 2007. Vertical distribution and activity of soil microbial population in a sandy desert ecosystem. *Microbiol Ecol* **53**: 340-347.
- Shaw, K., Morris, P. y Hooker, J. 2006. Perception and modification of plant flavonoids signals by rhizosphere microorganisms. *Environ Microbiol* **8**: 1867-1880.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, A., Kaiser, J., Roskot, N., Heuer, H. y Berg, G. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4742-4751.
- Socolow, R. H. 1999. Nitrogen management and the future of food: Lessons from the management of energy and carbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**: 6001-6008.
- Soroa, M., Cortés, S. y Noval, B. 1999. Biofertilización con hongos formadores de micorrizas arbusculares en semilleros de Extraña Rosa (*Callistephus sinensis*). INCA. San José. La Habana. Cuba.
- Sprent, J. y Parsons, R. 2000. Nitrogen fixation in legume y non-legume trees. *Field Crops Research* **65**: 183-196.
- Stephens, J. y Rask, H. M. 2000. Inoculant production and formulation. *Field Crops Research* **65**: 249-258.
- Stevens, C., Khan, V., Rodriguez-Kabana, Ploper, L., Backman, A., Collins, D., Brown, J., Wilson, M. y Igwegbe, E. 2003. Integration of soil solarization with chemical, biological and cultural control for management of soilborne diseases of vegetables. *Planta and Soil*. **253**: 493-506.

- Tjamos, E., Tsitsigiannis, D., Tjamos, S., Antoniou, P. y Katinakis, P. 2004. Selection and Screening of Endorhizosphere Bacteria from Solarized Soil as Biocontrol Agents Against *Verticillium dahlia* of Solanaceous Hosts. *European Journal of Plant Pathology*. **110**: 1: 35-44.
- Tejeda, T., Soto, F. y Guerrero, G. 1997. Utilización de algunas variantes de infección micorrízicas en posturas de cafeto”. INCA. San José. La Habana. Cuba.
- Torres G., Soria, A., Eleia, M., Pérez N. y García I. 2001. Incrementos de la fijación biológica del nitrógeno mediante la inoculación combinada de bacterias fijadoras de N₂ atmosférico. Santa Clara, Cuba.
- Unkovich, M. y Pate, J. 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crops Research* **65**: 211-228.
- Urzúa, H. 2005. ENSAYO Beneficios de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno en Chile. Departamento de Ciencias Vegetales. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile Casilla 306-22, Santiago, Chile. <http://scriptusnaturae.8m.com/Articulos/fijn/simbiosis.html>.
- Vance, C. P. 2001. Symbiotic nitrogen fixation y phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable sources. *Plant Physiology* **127**: 390-397.
- van Elsas, J., Garbeva, P. y Salles, J. 2002 Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation* **13**: 29-40.
- Viñas, I., Teixidó, N., Abadías, M., Torres, R. y Usall, J. 2005. Situación actual del control biológico en la poscosecha de frutas.
- Vitta, J., Primolini, C., Escolá, F. y Iñigo, F. 2005. Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias N° 7 Fitotoxicidad de Imazetapir En El Cultivo de Lenteja. <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Investigacion/revista/rev7/5.htm>
- Vlassack, K., Holm, V., Duchateau, L., Vyerleyden, J. y Mot, R. 1992. Isolation y characterization of *Pseudomonas fluorescens* associated with the roots of rice, banana grown in Sri Lanka. *Plant Soil* **145**: 51-63.
- Wall, L. G. 2000. The actinorhizal symbiosis. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**:

167-182.

- Walker, T., Pal-Bais H., Grotewold, E. y Vivanco, J. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol* **132**: 44–51.
- Walsh, U., Moëgne-Loccoz, Y., Tichy, H., Gardner, A., Corkery, D., Lorkhe, S. y O’Gara, F. 2003. Residual impact of the biocontrol inoculant *Pseudomonas fluorescens* F113 on the resident population of rhizobia nodulating a red clover rotation crop. *Microbiol Ecol* **45**: 145–155.
- Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* **52**: 487–511.
- Winding, A. 2004. Indicators of soil bacterial diversity. Agricultural Impacts on Soil Erosion and Soil Biodiversity: Developing Indicators for Policy Analyses. Proceedings from an OECD Expert Meeting, Rome, Italy, 25–28 March 2003 (Francaviglia, R. ed), pp. 495–504. OECD, Paris.
- Yao, H., Liu, Y. y Huang, C. 2006. Effect of copper on phospholipids fatty acid composition of microbial communities in two red soils. *J Environ Sci* **18**: 503–509. FEMS.
- Zablotowicz, R., Press, C., Lyng, N., Brown, G., y Kloepper, J. 1992. Compatibility of plant growth promoting rhizobacterial strain with agrochemicals applied to seed. *Canadian J. Microbiol.* **38**:45-50.

Páginas web revisadas. (mayo-junio, 2008)

http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/1

<http://www.biologia.edu.ar/fungi/micorrizas.html>

<http://www.agroinformacion.com/leer-articulo.aspx?not=415>.

<http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~21-3-2007/microrganismos-inoculantes%5B1%5D.pdf>

<http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/416291/7/The-roots-of-an-Austrian-winter-pea-plant-with-nodules>.

<http://es.wikipedia.org/wiki/Sider%C3%B3foro>

www.diccionariosdigitales.net/GLOSARIOS%20y%20VOCABULARIOS/Botanica-9-MICORRIZAS.

www.biologia.edu.ar/fungi/micorrizas.html

<http://www.ewg.org/pob/home/reports/Baby-food/baby-tab 5html>