

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Doctorado en Ciencias en Ingeniería de Biosistemas

“Desarrollo de un soporte para inmovilizar un consorcio bacteriano con propiedades promotoras de crecimiento vegetal”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctora en Ciencias en Ingeniería de Biosistemas

Presenta:

M. en C. Betsie Martínez Cano

Dirigido por:

Dr. Genaro Martín Soto Zarazúa

Dr. Genaro Martín Soto Zarazúa
Presidente

Dr. Rufino Nava Mendoza
Secretario

Dr. Juan Fernando García Trejo
Vocal

Dr. Gonzalo Macías Bobadilla
Suplente

Dra. Ma. Sandra Hernández López
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Octubre, 2023.
México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Desarrollo de un soporte para inmovilizar un consorcio
bacteriano con propiedades promotoras de
crecimiento vegetal

por

Betsie Martínez Cano

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGDCC-215121

*“A mi esposo y a mi hija,
quienes han sido mi fuente
inagotable de apoyo, amor
y motivación a lo largo de
este camino. Gracias por ser
mi inspiración constante y
por compartir conmigo este
logro tan significativo en mi
vida”*

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que contribuyeron de manera significativa a la realización de esta tesis. Su apoyo, aliento y colaboración han sido invaluable a lo largo de este proceso, y estoy profundamente agradecida por todo.

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a mi director de tesis, Dr. Genaro Martín Soto Zarazúa, por su orientación, paciencia y apoyo incondicional. Sus conocimientos y comentarios críticos fueron fundamentales para dar forma a este trabajo y llevarlo a término. Agradezco sinceramente su apoyo en este proceso.

Agradezco a los miembros del comité, Dr. Rufino Nava, Dr. Juan Fernando García, Dr. Gonzalo Macías y Dra. Sandra Hernández, por su disposición a evaluar mi investigación y por sus sugerencias y aportes. Sus comentarios constructivos y su expertise en el área han sido fundamentales para mejorar la calidad de este trabajo.

No puedo dejar de mencionar a mi familia, quienes siempre han estado a mi lado, brindándome su amor, apoyo y comprensión incondicional. Su constante aliento y motivación me han dado la fuerza necesaria para superar los desafíos que encontré en este camino académico. Les agradezco de todo corazón.

También deseo expresar mi gratitud a mis amigos y compañeros de estudio, quienes me han acompañado en este viaje académico. Sus consejos, debates y discusiones han sido enriquecedores y han contribuido a mi crecimiento personal y profesional. Aprecio profundamente su amistad y su disposición a ayudarme.

Además, quiero agradecer a la UAQ y al CONAHCyT por el apoyo financiero brindado. Sin su respaldo, habría sido mucho más difícil llevar a cabo esta investigación.

A todos aquellos que, de una u otra manera, formaron parte de este proceso, les expreso mi más profundo agradecimiento. Agradezco su confianza en mí y en mi capacidad para llevar a cabo esta investigación.

¡Gracias!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
ÍNDICE	3
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. ANTECEDENTES.....	14
II.I Microorganismos promotores de crecimiento vegetal.	15
II.II Formulación de biofertilizantes.....	17
II.III Cualidades de los modelos de bioformulación.	21
II.IV Cualidades del soporte.	22
II.V Importancia de los soportes para bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	29
II.VI Descripción de especies bacterianas y materiales a utilizar en este trabajo.	32
III. HIPÓTESIS.....	38
IV. OBJETIVOS.....	38
Objetivo General.....	38
Objetivos Específicos	38
V. METODOLOGÍA	39
1. Desarrollo y caracterización de un soporte de sílice mesoporosa SBA-15.....	40
2. Desarrollo y caracterización de un soporte a base de alginato de sodio.....	43
3. Determinación de actividad promotora del crecimiento vegetal del consorcio bacteriano inmovilizado <i>in vitro</i>	47
4. Evaluación de la efectividad del consorcio inmovilizado en el soporte sobre el rendimiento y calidad de un cultivo de lechuga.	48
5. Análisis de costos de producción para cada soporte bacteriano.	49
6. Análisis estadístico de los datos.	49
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
1. Desarrollo y caracterización de un soporte de sílice mesoporosa SBA-15 y alginato de sodio.	50

2. Determinación de actividad promotora del crecimiento vegetal del consorcio bacteriano inmovilizado.....	60
3. Evaluación de la efectividad del consorcio inmovilizado en el soporte sobre el rendimiento y calidad de un cultivo de lechuga.	63
4. Análisis financiero para cada soporte bacteriano.	69
VII. CONCLUSIONES	73
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	74
IX. ANEXOS.....	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Vehículos y materiales utilizados como revestimiento y portadores de bioinóculos y fertilizantes.	23
Tabla 2. Cantidad utilizada para cada tratamiento.	49
Tabla 3. Diámetro medio obtenido de la medición de 10 cápsulas en fresco muestreadas al azar.	51
Tabla 4. Diámetro medio obtenido de la medición de 10 cápsulas en seco muestreadas al azar.	52
Tabla 5. Cinética de viabilidad bacteriana presentados por cada uno de los soportes propuestos. Las letras indican diferencia estadística significativa entre los datos. Se utilizó una prueba de Tukey con $p \leq 0.05$	56
Tabla 6. Tabla de proyección de inversión para la formulación de alginato de sodio con turba. Se consideró una inversión inicial de \$1,200.000.00, ventas anuales de \$360,000.00 y un crédito bancario por \$1,000,000.00 para la inversión inicial.....	70
Tabla 7. Tabla de proyección de inversión para la formulación de SBA-15. Se consideró una inversión inicial de \$632,663.42, ventas anuales de \$1,200,000.00 y un crédito bancario por \$600,000.00 para la inversión inicial.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de microorganismos utilizados como biofertilizantes, clasificados de acuerdo a su función y tipo de asociación a las plantas. Tomada y traducida de (Bhowmik y Das, 2018).....	18
Figura 2. Pasos por seguir para el desarrollo de un biofertilizante a nivel comercial.	19
Figura 3. Aspectos importantes que considerar cuando se hace el desarrollo de una formulación con inoculante microbiano.....	20
Figura 4. Metodología que contiene los principales pasos a seguir para la obtención de dos soportes y su evaluación.	39
Figura 5. Formulación obtenida con material de sílice mesoporosa SBA-15. a) Se observa el medio de cultivo y el SBA-15 por separado. b) Momento en el que el SBA-15 se pone en contacto con el medio de cultivo antes de la incubación. c) Se observa el material seco que ya contiene el consorcio bacteriano.....	50
Figura 6. Formulaciones desarrolladas con alginato de sodio como soporte. Se prepararon tres formulaciones a) alginato de sodio, b) carboximetilcelulosa como aditivo y c) turba como aditivo.	51
Figura 7. Viabilidad bacteriana presentada por cada una de las formulaciones propuestas almacenadas a 4 °C. La viabilidad bacteriana se midió cada mes durante un año. Se utilizó prueba de Tukey con $p \leq 0.05$. Las barras de error representan el intervalo de confianza individual.	53
Figura 8. Viabilidad bacteriana presentada por cada una de las formulaciones propuestas almacenadas a temperatura ambiente. La viabilidad bacteriana se midió cada mes durante un año. Se utilizó prueba de Tukey con $p \leq 0.05$. Las barras de error representan el intervalo de confianza individual.....	54
Figura 9. Cinética de liberación presentada por las formulaciones propuestas durante un mes.	57
Figura 10. Porcentaje de biodegradabilidad de los materiales propuestos como soportes de 7 a 30 días. Se utilizó una prueba de Tukey con $p \leq 0.05$. Las barras de error representan el intervalo de confianza individual.....	59
Figura 11. Porcentaje de germinación para cada formulación propuesta. Se utilizó una prueba de Tukey con $p \leq 0.05$. Las barras de error representan el	

intervalo de confianza individual, y las letras diferentes muestran diferencia estadística significativa entre los tratamientos.	61
Figura 12. Obtención de plántulas de lechuga para la evaluación in vivo de las formulaciones propuestas.	63
Figura 13. Lechugas obtenidas con el soporte de SBA-15, con el control de turba y con el control negativo.	64
Figura 14. Lechugas obtenidas con el soporte de alginato de sodio con turba, con el control de turba y con el control negativo.	64
Figura 15. Altura de las lechugas obtenidas con los diferentes tratamientos evaluados. Se utilizó una prueba de Tukey con $p \leq 0.05$. Las barras de error representan el intervalo de confianza individual y las letras diferentes muestran diferencia estadística significativa entre los tratamientos.	65
Figura 16. Longitud de raíz de las lechugas obtenidas con los diferentes tratamientos evaluados. Se utilizó una prueba de Tukey con $p \leq 0.05$. Las barras de error representan el intervalo de confianza individual y las letras diferentes muestran diferencia estadística significativa entre los tratamientos.	66
Figura 17. Peso de las lechugas obtenidas con los diferentes tratamientos evaluados. Se utilizó una prueba de Tukey con $p \leq 0.05$. Las barras de error representan el intervalo de confianza individual y las letras diferentes muestran diferencia estadística significativa entre los tratamientos.	68

ABREVIATURAS Y SIGLAS

PGPB	Bacteria promotora de crecimiento vegetal
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
N	Nitrógeno
P	Fósforo
K	Potasio
C	Carbono
Fe	Hierro
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
p/v	Peso / volumen
PVP	polivinilpirrolidona
PEG	polietilenglicol
M	Molar
P123	Pluronic
TEOS	Tetraetil ortosilicato
LB	Luria Bertani
OMS	Organización Mundial de la Salud
UFC	Unidades formadoras de colonias
μl	Microlitros
w/w	Peso / peso
w/v	Peso / volumen
v/v	Volumen / volumen
ppm	Partes por millón
ALG	Alginato
ALG+CMC	Alginato con carboximetilcelulosa
ALG+Turba	Alginato con turba
T amb	Temperatura ambiente
ANOVA	Análisis de varianza
TIR	Tasa interna de retorno
TREMA	Tasa de rendimiento mínima aceptable

RESUMEN

Actualmente, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura promueve prácticas agrícolas sostenibles, por lo que se buscan alternativas para mejorar los sistemas de producción que incrementen la productividad y calidad de los cultivos con un mínimo impacto ambiental. Una de estas alternativas es la agricultura sostenible, cuyo objetivo es aumentar la producción agrícola, disminuir el uso de agroquímicos y aprovechar el potencial de los recursos naturales, tales como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal. El uso directo o indirecto de dichas bacterias está ganando atención como una tecnología sostenible para sustituir o complementar los fertilizantes químicos. Sin embargo, hay muy pocos productos comerciales debido a su formulación inapropiada y a los retos tecnológicos para su producción a escala industrial. El desarrollo de formulaciones de inoculantes de alta calidad es un gran desafío para la consolidación de la tecnología de los biofertilizantes. El uso de una matriz como portador bacteriano puede traer ventajas como el aumento de la supervivencia bacteriana en almacenamiento y en el suelo; lo anterior, aumentaría la eficiencia de la inoculación, pero, es importante tener en cuenta aspectos como el costo, disponibilidad de materia prima, escalamiento y eficiencia bacteriana. Por lo anterior, en este trabajo se estudiaron algunas formulaciones elaboradas a base de alginato de sodio y nanoestructuras de sílice mesoporosa SBA-15 para contener un consorcio bacteriano. Se evaluó la viabilidad bacteriana a 1 año en almacenamiento, la cinética de liberación y biodegradabilidad del material, así como la efectividad bacteriana en el soporte sobre la germinación, altura, longitud de raíz y peso de un cultivo de lechuga. Se encontró que, el SBA-15 mantiene la supervivencia bacteriana después de un año en almacenamiento, tiene una liberación sostenida y controlada, además de ser biodegradable en el suelo. En plantas de lechuga aumenta la germinación de semillas, la longitud de la raíz y el peso fresco; además, el uso del soporte es un proyecto viable financieramente. Lo anterior hace que la formulación propuesta sea una alternativa atractiva para el desarrollo de biofertilizantes a gran escala.

Palabras clave: alginato de sodio, biofertilizante, PGPB, SBA-15

ABSTRACT

The Food and Agriculture Organization of the United Nations promotes sustainable agricultural practices. Therefore, they seek alternatives to improve production systems that increase the productivity and quality of crops with minimal environmental impact. One of these alternatives is sustainable agriculture, and its objective is to increase agricultural production, reduce the use of agrochemicals and take advantage of the potential of natural resources, such as plant growth-promoting bacteria. The direct or indirect use of such bacteria is gaining attention as a sustainable technology to replace or complement chemical fertilizers. However, there are very few commercial products due to their inappropriate formulation and technological challenges for their production on an industrial scale. Developing high-quality inoculant formulations is a high challenge for the consolidation of biofertilizer technology. Using a matrix as a bacterial carrier can bring advantages, such as increased bacterial survival in storage and the soil and would increase the efficiency of inoculation. However, it is relevant to consider aspects such as cost, availability of raw material, scaling, and bacterial efficiency. Therefore, this work studied some formulations made from sodium alginate and SBA-15 mesoporous silica nanostructures to contain a bacterial consortium. The bacterial viability at one year in storage, the release kinetics and biodegradability of the material, as well as the bacterial effectiveness in the support on germination, height, root length, and weight of a lettuce crop, were evaluated. We found that SBA-15 maintains bacterial survival after one year in storage, has a sustained and controlled release, and is biodegradable in the soil. In lettuce plants, it increases seed germination, root length, and fresh weight. In addition, the use of this support it is a financially viable project. This makes the proposed formulation an attractive alternative for the development of large-scale biofertilizers.

Key words: biofertilizer, PGPB, SBA-15, sodium alginate

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, a nivel global, ha aumentado la atención por mejorar los sistemas agrícolas; para ello se han buscado alternativas para incrementar la productividad y calidad de los cultivos con el mínimo impacto ambiental. Una de las alternativas propuestas es la agricultura sustentable, cuyo objetivo es aumentar la producción agrícola, disminuir el uso de agroquímicos y aprovechar el potencial biológico de plantas y microorganismos promotores de crecimiento vegetal (Creus, 2017).

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) pueden ser utilizadas para mejorar las características del suelo y aumentar la disponibilidad de nutrientes; de igual manera permiten aumentar el rendimiento y calidad de los cultivos de interés económico. Lo anterior, debido a la capacidad que tienen las bacterias para la fijación, solubilización, movilización y reciclaje de nutrientes (Kumar et al., 2018). No obstante, la aplicación de las PGPB en el suelo y en los cultivos debe ser cuidadosamente estudiado (Bashan et al., 2014).

El uso de bacterias en la agricultura surge como una alternativa para sustituir parcial o totalmente la fertilización química (Grobela et al., 2018); en este caso, las bacterias son suministradas en forma de inóculos, los cuales son una preparación de microorganismos benéficos sin un soporte o vehículo (Creus, 2017). Por otra parte, los biofertilizantes son formulaciones basadas en portadores que contienen microorganismos en cantidades suficientes para beneficiar el crecimiento y nutrición de las plantas; además, éstos contienen aditivos que permiten la protección y supervivencia celular (Viera et al., 2018).

El éxito de la tecnología del biofertilizante depende de la cepa microbiana y la formulación del inoculante; sin embargo, para fines prácticos, la formulación es la que define el éxito potencial de los biofertilizantes. La formulación del inoculante debe proporcionar estabilidad, viabilidad y protección a las células microbianas (Lopez-Perez et al., 2015). En un biofertilizante, el soporte es el vehículo de entrega empleado para transferir microorganismos vivos desde el fermentador hasta el suelo; éste debe tener la capacidad de entregar el número

correcto de células viables en el momento adecuado para la planta (Sahu y Brahmaaprakash, 2016).

La mayor parte de los biofertilizantes comerciales tienen una calidad deficiente, carecen de un soporte adecuado, y, en condiciones de campo, son almacenados en malas condiciones de temperatura, luz y humedad. Lo anterior minimiza la vida útil del producto, y si el microorganismo no es robusto o no está bien protegido es difícil que sobreviva; lo anterior afecta la efectividad del producto (Parnell et al., 2016). Por otro lado, no se tiene un régimen establecido para evaluar la calidad de los biofertilizantes; esto tiene como consecuencia que al ser utilizados en campo, no se obtengan los resultados que muestran las investigaciones científicas (Pathak y Kumar, 2016).

La formulación de las PGPB es un problema crucial, pero se han realizado pocas investigaciones sobre este tema (Lobo et al., 2019). Por lo tanto, es importante estudiar cómo afectan las propiedades físicas, químicas y biológicas del soporte a la viabilidad celular y a las características promotoras de crecimiento vegetal de las cepas bacterianas. Además de hacer una evaluación del crecimiento y el rendimiento del cultivo después de aplicar el producto, ya que el soporte como vehículo de transferencia del inóculo altera la efectividad del inoculante (Sahu y Brahmaaprakash, 2016).

En el área agrícola y de alimentos se han realizado estudios sobre distintos tipos de materiales utilizados como soportes bacterianos. Entre ellos se encuentran la turba, material más utilizado por los productores de biofertilizantes (Araújo et al., 2017), el carbón, el biochar (Hale et al., 2015), la sílica, el talco (Bejarano et al., 2017), la perlita, la vermiculita, la bentonita, la atapulgita (Albareda et al., 2008; Bejarano et al., 2017; Sangeetha y Stella, 2012), algunos polímeros sintéticos (Azeem et al., 2014; Tao et al., 2011), diversos compuestos orgánicos (Araújo et al., 2017; Arora et al., 2015b; Dhar et al., 2007; Li et al., 2017; W.O. Silva, Stamford, Silva, Santos, Dolores, et al., 2016), el alginato (Joe et al., 2012) y algunos nanomateriales (Safari et al., 2020). Sin embargo, los materiales mencionados anteriormente no han tenido el éxito necesario o pruebas suficientes como para minimizar el consumo de fertilizantes químicos; ya sea por

la poca efectividad del producto o por el desafío de su producción a nivel industrial (Parnell et al., 2016).

En este trabajo se desarrollaron varios soportes bacterianos con dos materiales principales, uno a base de alginato de sodio y otro de sílice mesoporosa SBA-15, para contener un consorcio de PGPB. Se evaluó el efecto que tiene cada material sobre la viabilidad y cinética bacteriana durante un año en almacenamiento. Se evaluó, además, la cinética de liberación bacteriana y la tasa de biodegradabilidad del material. In vitro, se obtuvo el porcentaje de germinación de semillas de lechuga. Y, finalmente, se evaluó la efectividad del consorcio inmovilizado en alginato de sodio y SBA-15 sobre la altura, longitud de raíz y peso fresco de un cultivo de lechuga; adicionalmente, se realizó un análisis de costos de producción para cada uno de los soportes. Con la metodología anterior, se obtuvo una evaluación de viabilidad bacteriana, efectividad in vivo y viabilidad económica para un producto elaborado a base de PGPB.

Los resultados de este trabajo sugieren que las nanoestructuras de sílice mesoporosa SBA-15 son el soporte más adecuado para contener un consorcio bacteriano; lo anterior se debe a que presenta una viabilidad bacteriana de 3.67×10^9 UFC/ml, y tras un año en almacenamiento a temperatura ambiente con aumento en la tasa de crecimiento celular. La cinética de liberación en el día 30 fue de 4×10^3 UFC/g y mantiene una liberación controlada y sostenida. La biodegradabilidad del material es de 42.2% después de 30 días en el suelo. Con respecto a los resultados en plantas de lechuga se encontró que el SBA-15 aumenta 30% la germinación de semillas, 26% la altura, 17.5% la longitud de la raíz, y 25.4% el peso fresco de plantas de lechuga después de la cosecha. Además, en la evaluación financiera del proyecto se obtuvo una TIR de 137% con una TREMA del 17%, y un período de recuperación de 2 años.

El SBA-15 es un soporte bacteriano adecuado, ya que conserva las células viables, mejora sus propiedades como PGPB y es económicamente viable. Lo que sugiere que el producto obtenido es de calidad, estable en almacenamiento y al ser aplicado, y, de fácil aplicación para que los productores agrícolas puedan adoptar esta nueva tecnología y disminuir el uso de agroquímicos.

II. ANTECEDENTES

En la actualidad, la agricultura y la seguridad alimentaria enfrentan grandes desafíos, tales como el aumento de la población y el incremento de ingresos en los países desarrollados; lo anterior acrecienta la demanda de productos agrícolas. Se estima que para satisfacer las necesidades alimentarias de la población en el 2050 será necesario que el rendimiento de producción agrícola anual sea 60% mayor que en el 2006 (FAO, 2016). Por lo que, ¿cómo alimentar de manera sostenible a una creciente población mundial?, es una pregunta que sigue sin respuesta.

De acuerdo con las proyecciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la población mundial alcanzará al menos 9,800 millones para el 2050; así que, para garantizar la seguridad alimentaria mundial, se requiere al menos duplicar la producción agrícola actual (FAO, 2017; FAO et al., 2018).

Aproximadamente el 39% de los ecosistemas terrestres se ven afectados por el uso intensivo de la tierra y la urbanización; esto causa una grave degradación del suelo y disminución de sus nutrientes naturales, minimizando así, el potencial de producción de los sistemas de cultivo (Ellis et al., 2011). Lo anterior lleva a los agricultores a intensificar la manera en la que llevan a cabo la agricultura, con el fin de producir más alimentos; para ello utilizan agroquímicos que impactan de manera negativa al medio ambiente (Shelton et al., 2012).

Hasta ahora, los fertilizantes químicos ayudan a alimentar al mundo al proporcionar tres nutrientes principales para las plantas: nitrógeno, fósforo y potasio (NPK). Aproximadamente 52.3 mil millones de toneladas de fertilizantes se aplican anualmente para mantener los niveles de P disponibles en los sistemas suelo-planta (FAO, 2017). Por otra parte, sólo alrededor del 0.2% es utilizado por las plantas, y el resto es precipitado por cationes metálicos en el suelo como Fe, Al, Mg, Ca, etc. Además, el uso extensivo de P puede conducir al agotamiento inevitable de las reservas mundiales de fosfato de roca (Soumare et al., 2020).

Desde la revolución verde, hace cincuenta años hasta ahora, los impactos han sido grandes; por lo que, para mantener ambientes saludables, se deben aplicar nuevas tecnologías, donde se incluye la inoculación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (García, 2012). El concepto de inoculación aún no se encuentra bien definido entre los productores agrícolas; sin embargo, puede definirse como la introducción de microorganismos vivos, muertos o atenuados en un organismo, para fines agrícolas, en la tierra de cultivo (Rueda-Puente et al., 2009).

Los microorganismos inoculados pueden reemplazar o minimizar el uso de agroquímicos y limpiar suelos afectados por la contaminación (Finley et al., 2010). Además, mejoran el crecimiento de las plantas al aumentar la disponibilidad de nutrientes en el suelo a través de sus diferentes funciones como bioestimulantes, biofertilizantes y biocontroladores; lo anterior puede llevar a una disminución de la dependencia a productos químicos. La disminución en el uso de agroquímicos permitirá llevar a cabo una producción agrícola sostenible, con cultivos de alta calidad y ambientes más saludables (Frische et al., 2018), garantizando la seguridad alimentaria en un clima cambiante (Timmusk et al., 2017).

II.I Microorganismos promotores de crecimiento vegetal.

En el suelo habitan una gran cantidad de microorganismos que tienen propiedades que benefician a los cultivos, al suelo y a la calidad ambiental, tales como los microorganismos promotores de crecimiento vegetal. Este tipo de microorganismos presentan mecanismos de acción como la fijación biológica del nitrógeno, producción de fitohormonas, solubilización de nutrientes, producción de sideróforos y biorremediación del suelo contaminado; todo ello permite mejorar la calidad y rendimiento de los cultivos (F. Ahmad et al., 2008).

Las bacterias son el grupo de microorganismos más abundante e importante que interviene en la productividad y crecimiento de las plantas (M. Ahmad, Zahir, Khalid, et al., 2013). Dichos organismos viven de manera libre en la rizosfera o en los espacios intra e intercelulares de los tejidos vegetales, en ocasiones

haciendo asociaciones simbióticas con las plantas. La simbiosis entre las plantas y algunas bacterias se da por la segregación de exudados a partir de las raíces de las plantas que sirven como alimento para las bacterias; las cuales, a su vez, liberan compuestos que influyen de manera importante en el desarrollo vegetal (H. Zhang et al., 2011).

Las PGPB regulan procesos importantes en el suelo, tales como la fijación biológica del nitrógeno, la síntesis de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, la actividad desaminasa; adicionalmente éstas regulan la solubilización de nutrientes, la actividad quitinasa, la actividad catalasa, o la producción de compuestos que ayudan al control de fitopatógenos (Cherchali et al., 2019).

Existe una gran cantidad de reservorios de nutrientes esenciales en el ambiente, pero no se encuentran disponibles para las plantas. La principal actividad de las bacterias en el suelo es hacer esos nutrientes disponibles para que puedan ser utilizadas por las plantas.

Dentro de los procesos de solubilización de nutrientes que realizan las PGPB se encuentra la solubilización de fosfato, actividad muy importante en el suelo y en la nutrición vegetal. La importancia de esta actividad radica en que la disponibilidad del fosfato, en ocasiones, depende totalmente de las bacterias solubilizadoras; estas últimas segregan ácidos orgánicos que solubilizan formas fijas de fósforo y liberan formas disponibles en el suelo (Ramakrishna et al., 2019).

El nitrógeno es un elemento que define la productividad de los cultivos, el cual se encuentra en la atmósfera; el nitrógeno es fijado por bacterias de la rizosfera, poniéndolo disponible para las plantas, siendo las bacterias esenciales en el ciclo de nutrientes (Rasche y Cadisch, 2013). La actividad microbiana libera los nutrientes que se encuentran unidos a la materia orgánica en los ecosistemas, y su participación es crucial para que se lleven a cabo los ciclos naturales y se obtenga un flujo de materia prima óptimo. Además, nutrientes como el fósforo, potasio, azufre, calcio, zinc y magnesio no pueden ser utilizados por las plantas, a menos que estén mineralizados y disponibles para su absorción. La

manipulación del ambiente físico y químico de la rizosfera, como la aplicación exógena de microorganismos, puede mejorar el rendimiento de la planta, aumentar la disponibilidad de nutrientes y beneficiar al medio ambiente. Además, dichos microorganismos pueden influir en la dinámica del agua y la actividad enzimática, lo que puede permitir una disminución del uso de agroquímicos (Ahemad y Kibret, 2014; Ahmadi et al., 2018).

Son diversos los mecanismos a través de los que actúan los microorganismos en el suelo; sin embargo, los principales y los que se buscan para la elaboración de biofertilizantes son la fijación biológica de nitrógeno, la producción de fitohormonas, solubilización de nutrientes, producción de sideróforos y, actualmente, la remediación de ambientes contaminados.

II.II Formulación de biofertilizantes.

De acuerdo con Malusá y Vassilev (2014), la definición científica, técnica y legal de biofertilizante es aquel “producto que contienen microorganismos vivos basados en vehículos (sólidos o líquidos) que son útiles en agricultura en términos de fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo o movilización de nutrientes, para aumentar la productividad del suelo y / o cultivo”.

Los biofertilizantes son preparaciones que contienen microorganismos vivos o latentes en una formulación que permite un fácil manejo, almacenamiento a largo plazo, y la efectividad de los microorganismos que contiene. La formulación se basa en soportes líquidos o sólidos que protegen y mantienen a los microorganismos en cantidades suficientes para beneficiar el crecimiento y nutrición de las plantas (Motsara *et al.*, 1995). Los biofertilizantes se pueden clasificar con base en los microorganismos que los componen, por su función o por la asociación que tienen con las plantas (Figura 1).

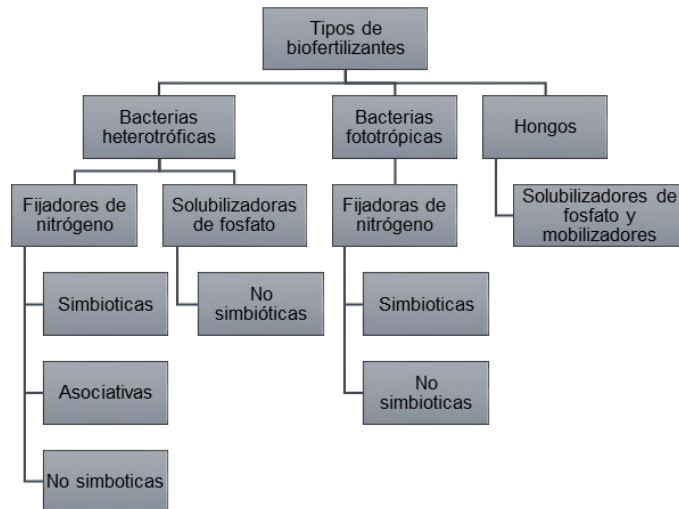


Figura 1. Tipos de microorganismos utilizados como biofertilizantes, clasificados de acuerdo a su función y tipo de asociación a las plantas. Tomada y traducida de (Bhowmik y Das, 2018).

Los biofertilizantes son de bajo costo y carecen de efectos dañinos para el suelo y el medio ambiente. La finalidad de estos productos es minimizar los requerimientos de N, P y K, componentes principales de los fertilizantes químicos, en los cultivos agrícolas.

Los productos biofertilizantes son los factores clave para lograr un sistema agrícola sustentable; éstos tienen la capacidad de mantener la salud del suelo y el medio ambiente, mediante un producto con pocos insumos, económico y que sea capaz de contener microorganismos vivos en una composición adecuada. Lo anterior para que dichos microorganismos logren interactuar con las plantas en su rizosfera, y facilitar a las plantas con diversos beneficios (Mazid y Khan, 2014)

En términos generales, al implementar fertilizantes químicos al suelo, solamente del 10 al 40% es absorbido por las plantas, mientras que el resto no es aprovechado (60% al 90%) (Bhardwaj et al., 2014). Por lo anterior, los inoculantes microbianos tienen una gran importancia en los sistemas de manejo de nutrientes, para mantener la productividad agrícola y promover un ambiente saludable (Adesemoye y Kloepper, 2009).

El desarrollo de biofertilizantes es un trabajo técnico y especializado, con una

serie de pasos a realizar antes de usarlo a nivel del suelo, como se describe en la Figura 2. Un paso importante es el estudio cuidadoso de las bacterias que serán utilizadas, para mejorar la calidad y crecimiento vegetal; ya que las cepas bacterianas son específicas para cada cultivar (Bhowmik y Das, 2018).

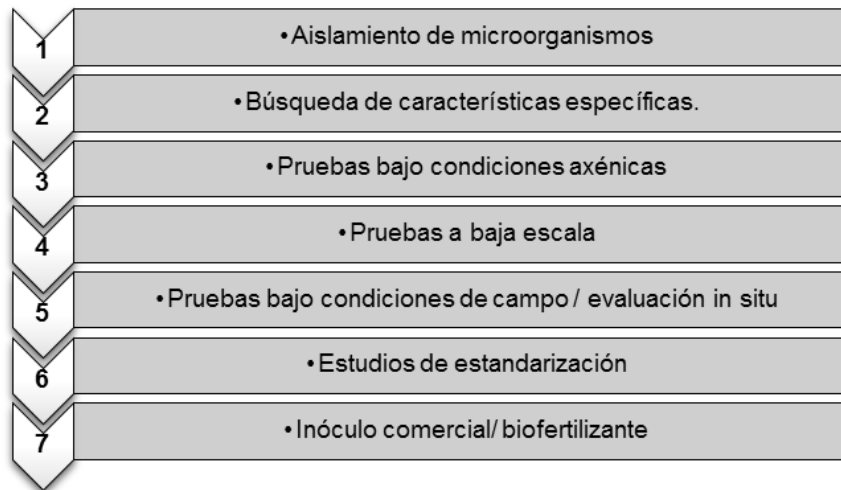


Figura 2. Pasos por seguir para el desarrollo de un biofertilizante a nivel comercial.

Los biofertilizantes están emergiendo como un remedio para las dificultades a las que se enfrenta la agricultura actualmente, siendo utilizados principalmente en la agricultura orgánica y sostenible. Mediante bases científicas, se ha buscado aumentar la cantidad de microorganismos benéficos en el suelo con la finalidad de lograr la sostenibilidad agrícola (Rueda-Puente et al., 2009). El éxito de esta tecnología depende de dos factores principalmente, la cepa microbiana y la formulación del inoculante; sin embargo, para fines prácticos la formulación es la que define el éxito potencial de los biofertilizantes (Fages, 1992).

Una formulación adecuada, con un soporte apropiado, evitará la pérdida de actividad de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Pacheco-Aguirre et al., 2017). No obstante, de acuerdo a Lobo et al. (2019) una parte importante a considerar en el aspecto tecnológico también es el costo (Figura 3).

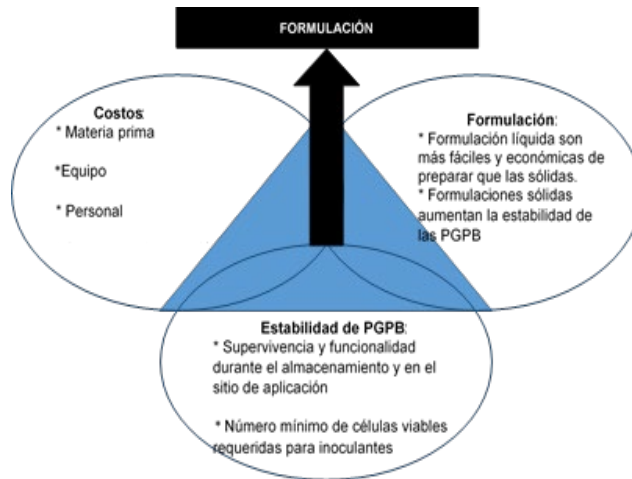


Figura 3. Aspectos importantes que considerar cuando se hace el desarrollo de una formulación con inoculante microbiano.

Las cepas microbianas utilizadas para la elaboración de un biofertilizante son llamadas bioinoculantes, los cuales deben ser colocados en un soporte o vehículo que puede ser sólido o líquido, junto con un agente osmoprotector y nutrientes. El producto final se llama bioformulación (Sahu y Brahmprakash, 2016).

Cada formulación es diferente de acuerdo con el uso del bioinoculante que lo compone, el tipo de suelo y tipo de planta al que va dirigido, la naturaleza de la aplicación, la disponibilidad de recursos del suelo y el ambiente en el que va a ser utilizado. Por lo cual, cada bioinoculante debe ser perfectamente estudiado en el medio ambiente donde se va a usar, ya que esto afecta la abundancia y el rendimiento del bioinóculo (Nandimath et al., 2017).

Lupwayi et al. (2000) demostró que la calidad de los inoculantes microbianos dependen principalmente del número de células viables presentes en el inóculo. Lo que comprueba que la formulación es crucial para desarrollar un biofertilizante exitoso, que conserve la cantidad de células y su efectividad en condiciones ambientales.

La investigación acerca del desarrollo de formulaciones para los bioinóculos está tomando un gran impulso en los últimos años; sin embargo, se centra en el desarrollo de productos y deja de lado la investigación básica. La literatura

científica exclusiva sobre el desarrollo de formulación es muy limitada y se encuentra fragmentada (Xavier et al., 2004). Algunas investigaciones se centran en estudios comparativos de diferentes soportes con un enfoque más agronómico que de bioingeniería (Sahu y Brahma Prakash, 2016). Otras van dirigidas al desarrollo de cepas mejoradas; sin embargo, las cepas obtenidas no se encuentran en el mercado actualmente. Esta división notable de la investigación es una posible razón de la inadecuada tecnología de formulación actual (Brahma Prakash y Sahu, 2012). Además, se incluyen las condiciones ambientales que cada día son más impredecibles, tales como las sequías, alta salinidad, la erosión del suelo y la falta de riego; todas las anteriores pueden reducir rápidamente las bacterias introducidas, siendo estos desafíos un área de oportunidad para la investigación dentro de la bioingeniería.

II.III Cualidades de los modelos de bioformulación.

Las cualidades que debe tener un biofertilizante son evaluadas en muchos trabajos de investigación. Xavier et al. (2004) mencionan que la formulación comprende células microbianas viables en un soporte adecuado, junto con aditivos que proporcionan estabilidad a las células, protección durante el almacenamiento y transporte. La formulación debe ser de fácil manejo, fácil de aplicar, que se entregue al objetivo de la manera más apropiada; también ésta debe proteger a los microorganismos a factores ambientales dañinos para mantener o mejorar la actividad de los microorganismos en campo.

La bioformulación debe admitir la mayor cantidad de células viables posibles, ya que se ha demostrado que existe una relación entre el número de células de la bioformulación y su efectividad (Lupwayi et al., 2000; Smith, 1992); por lo que tener una vida útil suficiente a temperatura ambiente, el inoculante debe ser fácilmente obtenido y mezclado por procesos industriales ya existentes, que permita la adición de nutrientes (Bashan, 1998). Además, la formulación debe ser comercialmente viable, no debe tener efectos adversos sobre el ambiente (Sivasakthivelan y Saranraj, 2013), debe ayudar a mejorar las propiedades del suelo (Pandya y Saraf, 2010), resistir los cambios de pH en almacenamiento y proporcionar protección contra agentes externos extremos (Bashan, 1998).

Una característica importante es que el inoculante debe competir con los microorganismos nativos del suelo por los nutrientes y nichos habitables; de igual manera, el inoculante debe sobrevivir y conservar sus cualidades para promover el crecimiento vegetal del cultivo (Bonkowski y Clarholm, 2012), la liberación del bioinoculante debe ser controlada en el tiempo (Bashan y Carrillo, 1996) y debe completar los estándares BIS para biofertilizantes (Yadav, 2009).

II.IV Cualidades del soporte.

El soporte adecuado es indispensable en un biofertilizante. Es el vehículo de entrega, sólido o líquido, empleado para transferir microorganismos vivos desde el fermentador industrial hasta la rizosfera. La característica más importante de un soporte es la capacidad de entregar el número correcto de células viables en condiciones fisiológicas en el momento adecuado para la planta (Sahu y Brahma Prakash, 2016).

El soporte o portador adecuado juega un factor clave en el novedoso sistema de administración para la colonización de raíces rápida y activa, facilidad de manejo y para mantener suficientes unidades formadoras de colonias viables; además, una vida útil prolongada eficiente para mantener las células frescas como para mantener la capacidad de los microorganismos, para así establecer una relación simbiótica con las plantas (Kamal y Ashish, 2020).

Las características principales de un soporte de calidad incluyen tener alta capacidad para retener agua, rentable en cuanto a disponibilidad y costos (Mishra y Dahich, 2010), no tóxico en la naturaleza (Bazilah *et al.*, 2011), fisicoquímicamente uniforme (Muresu *et al.*, 2003), estéril o fácil de esterilizar, de pH neutro o capacidad de amortiguación ajustable (Keyser *et al.*, 1993), que contenga un suplemento nutricional. Además, debe ser adecuado para contener la mayor cantidad de células microbianas posibles, y que asegure su crecimiento y supervivencia. De naturaleza manejable para realizar la mezcla, el curado y el envasado del producto final (Smith, 1992). Para obtener un sistema de administración eficiente se utilizan, preferiblemente, formulaciones económicas, inertes y sólidas secas para una buena estabilidad, manipulación, transporte,

idoneidad y almacenamiento a largo plazo (Kamal y Ashish, 2020)

La Tabla 1 muestra una relación de los principales soportes utilizados en la producción de bioformulaciones y fertilizantes.

Tabla 1. Vehículos y materiales utilizados como revestimiento y portadores de bioinóculos y fertilizantes.

Soportes y vehículos para fertilizantes	Aplicación	Propiedades físicas, químicas y biológicas del material. Ventajas y desventajas	Referencias
Carbón y biochar	Retención de nitrógeno	Carbono: 60-80% Nitrógeno: 0.2-2% C:N 45-350	(Ding et al., 2010)
	Material de soporte en formulaciones para liberación controlada	C oxidable: 80-750 mg/kg pH: 4.5-10.2 Conductividad eléctrica: 0.1-3 dS/m	(González et al., 2015)
	Fertilizantes para liberación sostenida	Área de superficie específicas: 0.02-200 m ² /g	(Cai et al., 2016)
	Abono con nitrógeno de liberación lenta	Capacidad de retención de agua: 20-300%	(Rose et al., 2016)
		Diámetro de apertura de poro: 2-25 µm	(Hale et al., 2015)
	Portador de inóculo de PGPB	Contienen nutrientes y características que afectan las propiedades del suelo y las poblaciones microbianas, pero es necesario aumentar cantidad de nutrientes para mejorar viabilidad celular.	
Perlita, vermiculita, bentonita y atapulgita	Fertilizantes de liberación controlada muy absorbentes	pH: 8-9 Conductividad eléctrica: 0.04 dS/m Capacidad de retención de agua: 140-150% Materiales más utilizados, fácil	(Wu y Liu, 2008)

Soportes y vehículos para fertilizantes	Aplicación	Propiedades físicas, químicas y biológicas del material. Ventajas y desventajas	Referencias
	Portador de inoculantes bacterianos	<p>manejo.</p> <p>Alto costo de extracción, falta de disponibilidad en algunas regiones, tiene problemas para mantener la viabilidad celular, difícil colonizar raíces o semillas, supervivencia deficiente. Requiere la implementación de nutrientes para mejorar la supervivencia celular.</p>	(Sangeetha y Stella, 2012) (Thompson, 1980) (Hale et al., 2015)
	Fertilizante de nitrógeno de liberación controlada	<p>Carbono: 40%</p> <p>Nitrógeno: 1.24%</p> <p>Relación C:N 33</p> <p>C oxidable: 1000 mg/kg</p> <p>pH: 4-5</p> <p>Conductividad eléctrica: 0.5 dS/m.</p>	(Araújo et al., 2017)
Turba	Acarreador de microorganismos en bioformulaciones	<p>Capacidad de retención de agua: 600%</p> <p>Material más utilizado y de fácil manejo, buena supervivencia al poco tiempo.</p> <p>Alto costo para extracción de materiales, falta de disponibilidad en algunas regiones, tiene problemas para mantener la viabilidad celular, difícil colonizar raíces o semillas, supervivencia deficiente</p>	(Albareda et al., 2008)
Perlas de alginato y gel de alginato de calcio	Fertilizante de liberación controlada de doble recubrimiento	<p>pH: 6-8.</p> <p>Flexibilidad y rigidez variable a conveniencia.</p> <p>Viscosidad variable.</p>	(Xinggang Wang et al., 2016) (Xia Wang et al., 2017)

Soportes y vehículos para fertilizantes	Aplicación	Propiedades físicas, químicas y biológicas del material. Ventajas y desventajas	Referencias
	Fertilizante bacteriano microencapsulado/enca-psulación de microorganismos en complejos de alginato-arcilla	Inocuo y seguro. Estable Proporciona estabilidad, viabilidad y protección a las células microbianas, entrega el número correcto de células.	(Campos et al., 2014) (Fravel, 1985)
	Revestimiento de fertilizantes de liberación controlada	Resistencia mecánica. Rigidez variable Propiedades mecánicas variables.	(Tao et al., 2011)
	Revestimiento de fertilizantes amigables con el medio ambiente (poliuretano, ácido poliacrílico)	Termoestables Mantiene estables los compuestos que contiene. Son contaminantes. Son caros.	(Donida y Rocha, 2002) (Ibrahim y Jibril, 2005) (Lan et al., 2011)
Polímeros	Revestimientos amigables con el medio ambiente, sintéticos (policaprolactona, etilcelulosa) y no modificado (almidón, agar).		(Azeem et al., 2014) (Mathews y Narine, 2010) (Niu y Li, 2012) (Y. Wang et al., 2005)
	Hidrogel de quitosano-almidón	Verde Bajo costo Pueden almacenarse a temperatura y humedad ambiente durante un período prolongado conservando la viabilidad de las bacterias.	(Perez et al., 2018)
Aserrín y cenizas de madera	Fertilizante a base de nitrógeno con polímero de base biológica derivado del aserrín de langosta licuado	Respetuosos con el medio ambiente. Liberación controlada. Proporciona estabilidad y protección al inóculo.	(L. Zhang et al., 2016) (S. Zhang et al., 2016)
	Acarreador de bioinóculos.	Poca disponibilidad.	(M. Arora et al., 2015)

Soportes y vehículos para fertilizantes	Aplicación	Propiedades físicas, químicas y biológicas del material. Ventajas y desventajas	Referencias
Quitosano y humus	Fertilizante a base de nitrógeno de liberación controlada	<p>pH: 6.8 Relación C:N 18.4% C: 14.35% N: 4.9% P: 2.7% K: 1.4%</p> <p>Tiene una humedad adecuada para asegurar supervivencia bacteriana Contiene nutrientes. Es económico. Contiene otros microorganismos que pueden competir con los del inóculo.</p>	(Araújo et al., 2017)
Sustancias húmicas modificadas	Liberación lenta de nitrógeno de sustancias húmicas modificadas Acarreador y bioprotector de microorganismos promotores de crecimiento vegetal	<p>pH: 6.8 Relación C:N 18.4% C: 14.35% N: 4.9% P: 2.7% K: 1.4%</p> <p>Humedad adecuada para asegurar supervivencia bacteriana Contiene nutrientes. Es económico. Contiene otros microorganismos que pueden competir con los del inóculo.</p>	(Kulikova et al., 2018) (Murphy et al., 2003) (W. O. Silva, Stamford, Silva, Santos, Freitas, et al., 2016)
Lignina, materiales celulósicos	Recubrimiento en fertilizantes de liberación controlada	<p>Biopolímero muy abundante Resistentes Termo resistentes Carbono: 1-4% Liberación controlada. Aseguran viabilidad celular por poco tiempo. Minimiza el efecto promotor de</p>	(Detroit, 1988) (Mulder et al., 2011) (Li et al., 2017)

Soportes y vehículos para fertilizantes	Aplicación	Propiedades físicas, químicas y biológicas del material. Ventajas y desventajas	Referencias
		crecimiento vegetal.	
Salvado de trigo, compost de hongos	Portador de biofertilizantes a base de algas verde azul	Compuesto de origen biológico No contamina Abundante Aseguran viabilidad celular por poco tiempo	(Bahl y Jauhri, 1987) (Jackson et al., 1991)
	Portador de bioinoculantes		(Dhar et al., 2007)

Los materiales utilizados como soporte sólido tienen más ventajas debido a que aumentan el suministro de fósforo a la planta, resistencia a patógenos y la degradación biológica de contaminantes orgánicos (Warren et al., 2009). Los soportes sólidos más utilizados son el suelo, materiales de desecho de plantas, harina de soya, aceite de soja, aceite de cacahuate, salvado de trigo y desechos agrícolas, materiales inertes y perlas de alginato. Sin embargo, también pueden utilizarse los cultivos microbianos liofilizados simples y microorganismos secados en aceite, los cuales pueden ser colocados dentro de un vehículo sólido o ser utilizados tal cual (Sahu y Brahmprakash, 2016).

El soporte sólido más utilizado por los productores de biofertilizantes es la turba; sin embargo, su disponibilidad es limitada. Por lo que los investigadores buscan nuevas alternativas viables y eficaces, capaces de contener la mayor cantidad de microorganismos.

Los nano-portadores son materiales que se están explorando como alternativa para la formulación de los biofertilizantes, ya que, al tener un tamaño de partícula más pequeño tienen un área de superficie mayor; lo anterior aumenta la resistencia de las bacterias a la desecación al aumentar la cobertura de las células bacterianas. Lo anterior sugiere que los nano-portadores pueden tener superioridad sobre otros soportes (Nakkeeran et al., 2006).

Algunos compuestos nanoestructurados han sido utilizados para contener células vivas, virus, proteínas y ácidos nucleicos; lo anterior con la finalidad de

protegerlos de condiciones ambientales adversas y permitir su liberación controlada, presentando buenos resultados a nivel laboratorio (Stojanov y Berlec, 2020).

Safari et al. (2020) encontraron que una formulación de nanoarcilla con alginato promueve la viabilidad y estabilidad para la solubilización de fósforo de *P. kilonensis*, incluso después de 6 meses en almacenamiento a 4 °C. Además, se ha sugerido que las nanopartículas mejoran la disponibilidad de nutrientes, aumentan la viabilidad celular y la tasa de crecimiento bacteriano al proteger los inoculantes en campo; además, ayudan a las plantas a soportar condiciones adversas al inducir la secreción de metabolitos secundarios y fijación de nutrientes por las PGPB (de Moraes, et al., 2021).

Algunas nanoestructuras evaluadas en interacción con PGPB son la nanozeolita con *Bacillus* spp. sobre *Zea mays* incrementa la cantidad de clorofila y carotenoides, azúcares totales, proteínas, germinación de semillas y la altura de raíz y tallo (Chaudhary et al., 2021). Nanotitania en sinergia con *Alcaligenes faecalis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus thuringiensis* aumenta la biomasa de *Triticum aestivum* L bajo condiciones de estrés salino y estrés patogénico causado por *Fusarium culmorum* (Timmusk et al., 2018). El dióxido de nanosilicio con *Pseudomonas taiwanensis*, *Pantoea agglomerans* aumenta la altura de plantas de maíz, número de hojas, contenido de clorofila, proteínas solubles, fenoles, flavonoides y carotenoides (Kukreti et al., 2020).

Las bioformulaciones, además del soporte, contienen algunos aditivos que mejoran la supervivencia de los microorganismos. En conjunto, el soporte y los aditivos tienen la finalidad de proteger al inóculo en almacenamiento y después de la exposición a condiciones ambientales extremas (Manikandan et al., 2010). La selección de aditivos se basa en su capacidad para proteger las células bacterianas almacenadas en condiciones extremas, tales como alta temperatura, desecación y sustancias tóxicas. Los polímeros que tienen alto peso molecular con buena solubilidad en agua, no tóxicos al medio y con naturaleza química compleja suelen ser buenos aditivos (Deaker et al., 2004).

Los polímeros más utilizados como aditivos son polivinilpirrolidona (PVP), metil celulosa, alcohol polivinílico, polietilenglicol, goma arábica, trehalosa, glicerol, Fe-EDTA, alginato de sodio y tapioca (Singleton et al., 2002). La naturaleza y concentración de los aditivos en la formulación afectan el rendimiento del inóculo; en este sentido, Dayamani (2010) encontró que *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp tienen una mejor funcionalidad con PVP K-15 a una concentración del 2%, *Acinetobacter* sp mejora su actividad cuando se inocula con polietilenglicol al 2%, mientras que *Azotobacter* sp en presencia de glicerol al 2% y *Azospirillum* sp. con PVP y PEG al 1% y 2% aumentan su población. Otro estudio sugiere que al complementar el medio de crecimiento bacteriano con un 3% de melaza y 0.1% (p/v) de cloruro de amonio mejora la calidad del inoculante; cuando se adiciona ácido ascórbico al 0.02% (p/v) mejora la efectividad de las sustancias protectoras (Patil et al., 2012).

II.V Importancia de los soportes para bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

En la actualidad, pocos microorganismos se han comercializado como biofertilizantes y la mayoría se encuentran en América del Norte, Europa y Asia (particularmente India). La baja financiación de investigación y desarrollo en esta área, la mala calidad de dichos productos, y el bajo nivel de adaptabilidad a las necesidades del agricultor podrían explicar su bajo uso; lo anterior a pesar de su reputación de ser fáciles de usar, no tóxicos, baratos, ecológicos y sostenibles (FAO, 2016). Esto ha provocado una falta de credibilidad en estos productos y dificulta su venta. Por lo tanto, los científicos y los fabricantes de biofertilizantes deben colaborar para superar los cuellos de botella en el proceso de bioformulación bacteriana (Soumare et al., 2020).

El primer criterio para determinar la calidad de los biofertilizantes es la densidad de células viables de los microorganismos deseados. De acuerdo a algunos estudios existe una fuerte correlación entre el número de células supervivientes en las semillas, la nodulación de la raíz y el efecto promotor de crecimiento (Velineni y Brahma Prakash, 2011). Por lo tanto, es necesario tener el mayor número de microorganismos por semilla o planta; así, una vez inoculados en el

suelo, sean capaces de competir con microorganismos nativos y compensar la muerte de algunas células por estrés biótico y abiótico (Navi, 2004).

Actualmente se implementa el uso de microorganismos como biofertilizantes; sin embargo, todavía existe una brecha significativa para la comprensión de su papel en la agricultura y ecología vegetal. Lo que sí se encuentra documentado es que la aplicación de algunos microorganismos tiene un impacto positivo en el crecimiento y productividad de las plantas; lo anterior mediante mecanismos como resistencia a factores bióticos y abióticos (Huang *et al.*, 2014), resistencia a plagas (Shen *et al.*, 2015), a metales pesados (Das *et al.*, 2017), altas concentraciones de sal (Shrivastava y Kumar, 2015), y pH extremo (Pourrut *et al.*, 2011).

Es necesario intensificar la búsqueda de microorganismos promotores de crecimiento vegetal de importancia local, así como los nutrientes adecuados para asegurar su supervivencia en las formulaciones. Se deben explorar medios para hacer un suministro adecuado de inóculos en la rizosfera, que sean convenientes para el nivel de mecanización de la agricultura (Manikandan *et al.*, 2010).

Hay microorganismos que promueven el crecimiento vegetal en diferentes sistemas de cultivo, pero la restricción puede estar en la bioformulación y la limitada búsqueda de un soporte adecuado que asegure la viabilidad y eficacia microbiana. Así mismo, la educación de los agricultores sobre el uso, almacenamiento y tratamiento adecuado de los diferentes biofertilizantes es crucial para su éxito en el campo. Los criterios de selección de la estrategia óptima para el desarrollo de un biofertilizante dependerán del equilibrio entre estabilidad, eficacia, viabilidad económica y facilidad de uso, así como la generación de una práctica agrícola sostenible y ecológica. El efecto de la encapsulación basada en polímeros sobre el rendimiento de PGPB se ha evaluado; sin embargo, no hay un análisis sistemático del rendimiento de estos microorganismos cuando se encapsulan en una matriz con polímeros (Aguirre *et al.*, 2017).

Los principales obstáculos por superar para que los biofertilizantes sean

comercialmente aceptados son (Soumare et al., 2020):

- **Soporte adecuado.** El punto débil de la comercialización suele ser el rendimiento del inóculo microbiano. Un microorganismo puede ser eficiente en condiciones de laboratorio y/o invernadero, pero formular ese organismo en un portador adecuado es un paso difícil. La elección del material portador es fundamental porque éste es el único vehículo de entrega de microorganismos vivos desde la unidad de producción a las plantas en el campo. Por lo tanto, la investigación debe centrarse en este paso para encontrar soportes que satisfagan las necesidades de un buen portador (Mishra y Arora, 2016).
- **Estándares de calidad.** Los estándares de calidad son la principal preocupación de la biotecnología microbiana. Las características que definen la calidad de un biofertilizante incluyen la presencia de la cepa recomendada en forma activa y el número requerido. Actualmente, el marco de control de calidad no está bien definido, los estándares de calidad actuales prescritos por las agencias reguladoras de un país no autentican la cepa utilizada para la producción comercial; como resultado, la mayoría de los inoculantes producidos en el mundo son de calidad relativamente baja (Thuita et al., 2018).
- **Procedimiento de control de calidad.** Para garantizar la seguridad, la eficacia y la conformidad del producto con las normas prescritas, el control de calidad y la regulación de los biofertilizantes son pasos importantes. El control de calidad del inóculo debe realizarse en diferentes etapas: selección y eficiencia a escala de laboratorio e invernadero por parte de los investigadores, formulación que incluye la elección del soporte, empaque y almacenamiento a escala industrial. Cada paso requiere experiencia y todo debe regirse por estándares (bajo regulación). Desafortunadamente, todas las unidades de producción de biofertilizantes no siguen este procedimiento debido a la falta de respaldo técnico (Soumare et al., 2020).

Por lo anteriormente expuesto, uno de los principales problemas a resolver en las próximas décadas es minimizar la dependencia de los fertilizantes químicos,

mejorando la formulación y calidad de los biofertilizantes. En primer lugar, pasar del laboratorio y el invernadero a las pruebas de campo requerirá una serie de enfoques novedosos; es decir, cómo cultivar, almacenar los microorganismos y más instalaciones adecuadas para enviar, formular y aplicarlos. En segundo lugar, sería esencial educar al público sobre el uso de productos a base de microorganismos en la agricultura a gran escala, ya que generalmente se piensa que los microorganismos son agentes causantes de enfermedades.

Es necesario encontrar estrategias alternativas que sean respetuosas con el medio ambiente; en este sentido, en el futuro, los biofertilizantes no sólo actuarán como alternativa potencial para alimentar a la población emergente, sino que también mejorarán la productividad y apoyarán el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés (Kour et al., 2020).

II.VI Descripción de especies bacterianas y materiales a utilizar en este trabajo.

Bacillus pumilus.

B. pumilus es una bacteria presente en el suelo y tiende a interactuar con las raíces de las plantas (Gutierrez-Mañero et al., 1996); morfológicamente es un bacilo aerobio Gram positivo formador de esporas (Priest, 1993). Se ha evidenciado que esta bacteria tiene actividad como promotora de crecimiento vegetal; su cultivo acumula una gran cantidad de giberelinas bioactivas utilizables fisiológicamente por las plantas hospederas, provocando elongación del tallo (Gutiérrez-Mañero et al., 2001).

Existen estudios que comprueban que cepas de *B. pumilus* puede ser utilizada como inoculante para la producción de biofertilizantes, con el fin de aumentar el rendimiento en los cultivos (Yasmin et al., 2013). Se ha probado su efectividad en plantas de arroz (A. Khan et al., 2016; Win et al., 2018), tomate (Sirajuddin et al., 2016), maíz (Breedt et al., 2017), amaranto (Pandey y Negi, 2018), *Glycyrrhiza uralensis* (Xie et al., 2019), banano (C. de F. B. da Silva et al., 2018) y trigo (Yasmin et al., 2013).

B. pumilus tiene la capacidad de conferir a las plantas tolerancia a las bajas temperaturas (Pandey y Negi, 2018), a la sequía (Xie et al., 2019), a altas concentraciones de sal y a patógenos (A. Sharma et al., 2019). Hay reportes que indican que puede ser utilizado como agente de biocontrol para *Rhizoctonia solani* (Rostami et al., 2017), larvas de gusano del maíz (Disi et al., 2018), gusano de raíz del maíz (Joseph Onwusemu Disi et al., 2019), y *Ralstonia solanacearum* (Shen et al., 2018). Además, dicha cepa es capaz de metabolizar de manera efectiva el herbicida isoproturon fenilurea por lo que puede ser utilizada como agente de biorremediación (Giri et al., 2017).

B. pumilus fue aislada de una composta de la Universidad Autónoma de Querétaro; al evaluarla se encontró que tiene actividad como solubilizadora de fosfato, inhibe el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, promueve la germinación de semillas de lechuga y jitomate. Además, dicha bacteria individualmente o combinación con *Stenotrophomonas rhizophila* aumenta la altura y grosor de tallo, área foliar y clorofila de plántulas de jitomate, chile jalapeño, lechuga y acelga (Martínez-Cano, 2019). Sin embargo, es necesario realizar más pruebas con la finalidad de evaluar sus cualidades para ser considerada en la elaboración de biofertilizantes.

Stenotrophomonas rhizophila.

S. rhizophila es un bacilo Gram negativo, puede encontrarse en la rizosfera o de manera endófito en las plantas, raíz, tallos y hojas (Alavi et al., 2013). Esta cepa bacteriana tiene un papel ecológico importante en los ciclos biogeoquímicos (Wolf et al., 2002); la cepa no es patógena, tiene alta resistencia a la salinidad y produce espermidina, enzima degradadora de la pared celular de las plantas. Además, tiene la capacidad de formar biopelículas, produce flagelos y diversos polisacáridos de superficie y adhesión (Alavi et al., 2014).

En la agricultura, la cepa *S. rhizophila* ha sido utilizada y estudiada como promotor de crecimiento vegetal y como control biológico de patógenos. Dicha bacteria ha sido utilizada para proteger a las plantas en condiciones de sequía y salinidad, debido a su liberación de glucosilglicerol que permite una alta retención

de agua en el suelo (Roder *et al.*, 2005). *S. rhizophila* tiene la capacidad de producir dodecanal que inhibe el crecimiento de una gran cantidad de hongos (Ryan *et al.*, 2009). Hay estudios que evalúan la actividad promotora de crecimiento de esta cepa bacteriana en plantas de pepino en suelos salinos (Egamberdieva *et al.*, 2011), plantas de tomate, algodón y pimiento dulce en suelos no estériles (Schmidt *et al.*, 2012); y, en sinergia con *B. japonicum* en soja bajo estrés salino mejora las raíces, brotes y peso de las plantas (Egamberdieva *et al.*, 2016).

Esta cepa bacteriana forma biopelículas osmoprotectoras que confieren a las plantas tolerancia a altas presiones osmóticas y protección ante patógenos (Alavi *et al.*, 2013). Está reportado que *S. rhizophila* tiene actividad fungistática contra *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Fusarium* sp. y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Blagova *et al.*, 2015).

En una composta de la Universidad Autónoma de Querétaro fueron obtenidos dos aislados de esta cepa bacteriana que presentan cualidades como promotores de crecimiento vegetal; éstas tienen la capacidad de solubilizar fosfatos in vitro. Cuando las cepas son inoculadas de manera individual o en consorcio con *Bacillus pumilus* tienen la capacidad de aumentar la altura y grosor de tallo, área foliar y clorofila en plantas de chile jalapeño, acelga, lechuga y jitomate (Martínez-Cano, 2019). No obstante, es necesario realizar más pruebas para evaluar sus cualidades para ser considerada para la elaboración de biofertilizantes.

Alginato de sodio.

El alginato es un polímero de origen natural compuesto por ácido D-manurónico y ácido L-glucurónico, el cual puede ser extraído de diferentes algas (Rahelivao *et al.*, 2013) y algunas bacterias (Hay *et al.*, 2010). Las ventajas que muestra este polímero en el proceso de encapsulado es su naturaleza no tóxica, es biodegradable, tiene la capacidad de liberar de manera lenta los compuestos encapsulados, es de fácil manejo, tiene alta disponibilidad y es de bajo costo (Bashan *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2011; Charles-Navarro *et al.*, 2010). Además,

la encapsulación con alginato no requiere cambios fisicoquímicos extremos durante el proceso (Reyes-Reyes *et al.*, 2018), aumentando la estabilidad, biodisponibilidad y vida útil del compuesto o microorganismo encapsulado (Avendaño-Romero *et al.*, 2013).

La tecnología de la encapsulación se lleva a cabo utilizando alginato en su forma de sal sódica del ácido algínico, y se observa la interacción con iones de calcio formando puentes iónicos entre el calcio y los grupos carboxilo del alginato. Del proceso anterior se forma un copolímero de bloques homopoliméricos de residuos de β -D-mannuronato y su 5-epímero α -L-guluronato enlazados en 1 \rightarrow 4. El intercambio de iones y la interacción con el copolímero permite la formación de cápsulas (Ortíz *et al.*, 2018).

En el proceso de encapsulación la concentración de alginato es de suma importancia, ya que de esto depende la consolidación y formación de las cápsulas. Las mejores proporciones reportadas para dicho proceso es una mezcla de alginato al 2% y cloruro de calcio 1 M (Lupo, González y Maestro, 2012).

La tecnología de la encapsulación con alginato se encuentra en expansión en la industria farmacéutica, alimentaria, de probióticos, entre otras (Avendaño-Romero *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2014; Pasin *et al.*, 2012). En la agroindustria se ha utilizado para encapsular microalgas para el tratamiento de aguas residuales (Bashan *et al.*, 2004; Charles-Navarro *et al.*, 2010). Por otro lado, Hernández *et al.* (2018) reportaron que al encapsular colonias de *Azospirillum brasilense* no hay liberación de la cepa al introducirse en agua durante 6 meses; sin embargo, al introducir las cápsulas en caldo de cultivo hay formación de colonias. Los resultados comprueban la viabilidad y conservación de la cepa dentro de la cápsula; por lo cual, al poner en contacto las cápsulas con semillas de maíz en germinación las células bacterianas colonizan los pelos radiculares de las plántulas.

El alginato es considerado el polímero experimental más común en la agricultura, y es uno de los materiales más utilizados para la encapsulación de bacterias. Lo

anterior debido a que tiene una excelente estabilidad en el medio ambiente. Sin embargo, el alto costo del alginato, además de su rápida difusión y liberación de compuestos, limita su aplicación a gran escala (Meftah Kadmiri et al., 2021). Para superar esta limitación, la adición de aditivos puede producir una matriz excelente para controlar la liberación de microorganismos biofertilizantes, reducir costos de producción, aumentar la materia seca de las cápsulas, la resistencia mecánica, aumentar la eficiencia de encapsulación y controlar la liberación; además, se mejora la viabilidad y estabilidad celular, así como el efecto del biofertilizante en las plantas (He et al., 2016; Safari et al., 2020).

Actualmente, se cuenta con estudios que demuestran que el alginato de sodio puede ser utilizado en la agricultura para la inmovilización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal; sin embargo, es necesario realizar más investigaciones que demuestren su efectividad.

Material de sílice mesoporosa SBA-15.

La nanotecnología incluye el uso de nanomateriales y representa uno de los enfoques más novedosos en la medicina y en la ciencia en general. Los nanomateriales tienen propiedades fisicoquímicas útiles, son biocompatibles y no tóxicos; además, pueden detectar y responder a estímulos ambientales (Shahriar et al., 2019). El campo de la nanotecnología proporciona varios ejemplos de la aplicación de nanopartículas para procesos de ingeniería ambiental donde se ven involucradas técnicas de inmovilización microbiana. Las nanopartículas representan una nueva generación de soportes flexibles y versátiles para células microbianas, que proporcionan grandes superficies específicas por volumen (Giese et al., 2020). Sin embargo, aún no se han explorado numerosas posibilidades en el desarrollo de células microbianas inmovilizadas sobre soportes de base nano destinados a la agricultura.

La síntesis de materiales funcionales con estructuras mesoporosas ha sido de gran importancia en los últimos años debido a sus diversas aplicaciones. Los materiales mesoporosos se han aplicado en óptica (Huo *et al.*, 1997), como catalizadores, soportes de enzimas y adsorbentes selectivos de proteínas (Yun

et al., 2002), así como adsorbentes de metales pesados y contaminantes orgánicos (Liu *et al.*, 2000; Newalkar *et al.*, 2003).

Los materiales SBA-15 consisten en estructuras de sílice mesoporosa hexagonal bien ordenadas con tamaño de poro uniformes, de hasta 300 angstroms. SBA-15 se sintetiza en medios ácidos para producir mesofases de co-polímero de bloques de sílice hexagonal bidimensional altamente ordenadas. SBA-15 está formado por estructuras porosas con espacios de 74.5 a 320 angstroms, fracciones de volumen de poros de hasta 0.85, y espesores de paredes de sílice de 31 a 64 angstroms.

Los materiales de sílice mesoporosa se preparan a temperaturas de 35 a 80 °C, y se utilizan co-polímeros tribloque de poli (óxido de alquileno) adicionados de moléculas orgánicas codisolventes, que pueden tener diferentes funciones. El material obtenido de esa reacción tiene una amplia gama de tamaños, con poros y espesores de pared uniformes (Zhao *et al.*, 1998).

SBA-15 es uno de los materiales mesoporosos más económicos, versátiles y estables térmica e hidrotérmicamente, lo que aumenta su potencial como soporte (Arellano *et al.*, 2008). Además, es un material considerado híbrido orgánico-inorgánico, lo que le confiere las ventajas de los polímeros orgánicos y los materiales inorgánicos. Sus principales aplicaciones incluyen la adsorción, separación, catálisis y sensores. La eficiencia del material mesoporoso puede mejorar al injertar un compuesto funcional como polímero, tiol y grupos amina (Thomas *et al.*, 2019).

III. HIPÓTESIS

La inmovilización de un consorcio bacteriano con propiedades promotoras de crecimiento vegetal en un soporte polimérico aumentará el crecimiento de plantas de lechuga, debido a la mayor viabilidad bacteriana derivada de la protección y estabilidad en almacenamiento y en el suelo, así como una liberación prolongada, en comparación con la turba.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar un soporte para inmovilizar un consorcio bacteriano con propiedades promotoras de crecimiento vegetal y evaluar su efecto sobre el rendimiento de un cultivo.

Objetivos Específicos

1. Desarrollar y evaluar un soporte para inmovilizar un consorcio formado por *Bacillus pumillus* y *Stenotrophomonas rhizophila* elaborado a base de material de Sílice Mesoporoso SBA-15.
2. Desarrollar y evaluar un soporte para inmovilizar un consorcio entre *Bacillus pumillus* y *Stenotrophomonas rhizophila* elaborado a base de alginato de sodio.
3. Determinar la actividad promotora del crecimiento vegetal del consorcio bacteriano inmovilizado in vitro.
4. Evaluar la efectividad del consorcio inmovilizado en ambos soportes sobre el rendimiento de un cultivo.

V. METODOLOGÍA

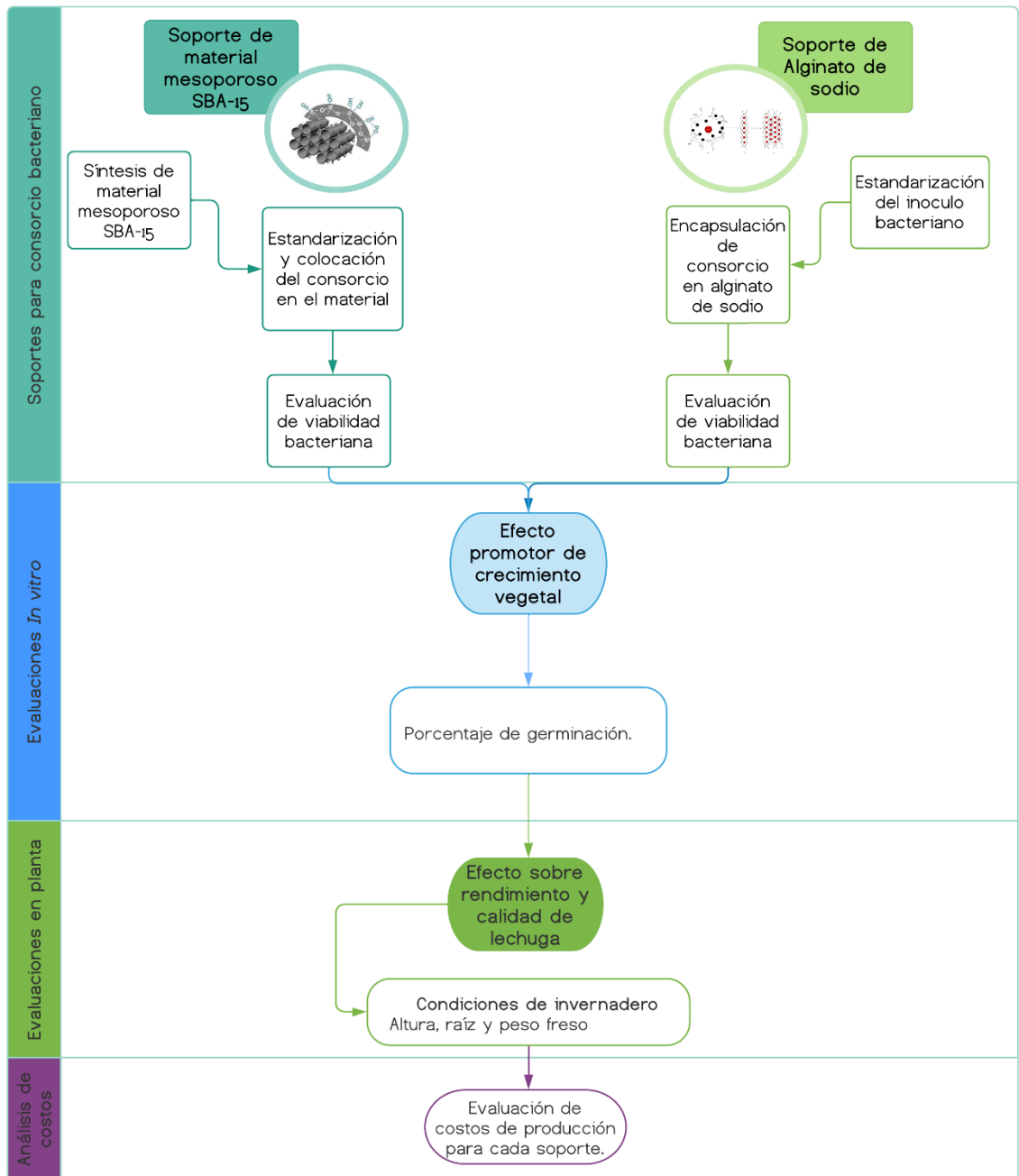


Figura 4. Metodología que contiene los principales pasos a seguir para la obtención de dos soportes y su evaluación.

1. Desarrollo y caracterización de un soporte de sílice mesoporosa SBA-15.

Síntesis de materia de sílice mesoporoso ordenado SBA-15.

El material de sílice mesoporoso SBA-15 se preparó mediante el proceso Sol-Gel de acuerdo con el procedimiento propuesto por Flodström y Alfredsson (2003); se utilizó el Pluronic (P123) como surfactante neutro, agente director de la mesoestructura.

El P123 se disolvió en una solución de 75 ml de ácido clorhídrico 4 M y 112.5 ml de agua desionizada con agitación constante a 35 °C en plato caliente con agitador magnético. Una vez disuelto el P123 se inició el proceso Sol-Gel; se adicionaron 11 ml de tetraetil ortosilicato (TEOS), precursor de la sílice, y la solución se dejó a 35 °C con agitación constante durante 24 horas.

Transcurridas las 24 horas se efectuó el proceso de madurado. El gel obtenido se colocó en un recipiente de polipropileno, se tapó y se colocó en la mufla durante 24 horas a una temperatura de 80 °C.

El recipiente con el gel madurado se dejó enfriar y el sólido se recuperó por filtración. El sólido se colocó en un crisol y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, el crisol se colocó en la mufla a 110 °C por 18 horas, a una rapidez de calentamiento de 2 °C/min. Sin sacar el sólido de la mufla, se calcinó a 550 °C por 4 horas a una rapidez de calentamiento de 1 °C/min. El proceso anterior dio como resultado el material de sílice mesoporoso ordenado SBA-15.

Colocación de un consorcio bacteriano estandarizado de *Bacillus pumillus* y *Stenotrophomonas rhizophila* en material de sílice mesoporoso SBA-15.

Para hacer la propagación bacteriana se preparó caldo de cultivo Luria Bertani (LB); de acuerdo con las indicaciones del proveedor, se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C y se dejó enfriar. Se prepararon tres matraces de caldo de cultivo, uno para cada cepa bacteriana: *Stenotrophomonas rhizophila*, *Bacillus pumilus* y *Stenotrophomonas rhizophila* 2.

Se inoculó la bacteria en el caldo de cultivo utilizando un asa bacteriológica, siguiendo las indicaciones de las buenas prácticas de laboratorio de la OMS (2012). Los matraces se colocaron en incubadora con agitación rotatoria a 150 rpm durante 48 horas a 28 ± 2 °C hasta la fase logarítmica de las cepas bacterianas (Kimberley et al., 2004).

Para preparar el consorcio bacteriano se inoculó un ml de cada cultivo en fase logarítmica de las cepas bacterianas en caldo nutritivo (previamente preparado y esterilizado); posteriormente, se incubó a 28 ± 2 °C durante 24 horas hasta obtener una concentración bacteriana de 10^9 unidades formadoras de colonia/ml.

Posteriormente se confirmó la cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC). Se hicieron diluciones seriadas, se tomó un ml de cada dilución y se sembró en caja Petri con agar nutritivo. Las cajas se incubaron durante 24 horas a 30 ± 2 °C. Se contaron las colonias presentes en las cajas y se registró la densidad celular (Camacho et al., 2009).

Finalmente se colocó el caldo de cultivo con el consorcio bacteriano estandarizado en el material de sílice mesoporoso SBA-15 utilizando el método de incubación por adsorción.

Las nanoestructuras preparadas se esterilizaron en autoclave antes de la inmovilización a 121 °C durante 15 minutos. Una vez esterilizadas, las nanoestructuras se incubaron con 100 ml de la suspensión bacteriana estandarizada a 10^9 UFC/ml, durante 12 horas durante la noche en condiciones estáticas. Después de la incubación, las nanoestructuras cargadas de bacterias inmovilizadas se secaron bajo condiciones ambientales (Jayani et al., 2020; Safari et al., 2020).

El material fue almacenado en frascos color ámbar libres de humedad a 4 °C y 25°C (Škrlec et al., 2019). Después de 14 horas se midió la viabilidad celular sobre el soporte de SBA-15 al final de la inmovilización.

Efecto del soporte a base de sílice mesoporoso SBA-15 sobre la viabilidad del consorcio bacteriano.

La viabilidad bacteriana se evaluó de acuerdo con lo descrito por Manikandan et al. (2010). Se preparó caldo de cultivo nutritivo y se esterilizó. Posteriormente, se agregó al caldo nutritivo una cantidad conocida de material de sílice mesoporoso que contenía el consorcio bacteriano, y se incubó a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 2 días.

Se preparó una dilución en serie del caldo de cultivo transfiriendo 1 ml del caldo a 9 ml de agua destilada estéril para obtener una dilución 10^{-1} ; se repite el paso hasta obtener una dilución 10^{-9} . Se tomaron 10 μl de cada dilución y se colocaron en placas Petri con agar nutritivo identificadas. Las placas se incubaron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 horas (Novinscak y Fillion, 2020). Las colonias individuales se contaron mediante el método de la placa de gota. Se hicieron tres repeticiones para cada dilución (Somasegaran y Hoben, 1994).

Se calcularon datos de cinética bacteriana de acuerdo con Pisabarro (2009) utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Tasa de crecimiento } (\mu) = \frac{\text{Ln}N - \text{Ln}N_0}{t} \quad (1)$$

$$\text{Tasa de muerte } (k) = \frac{\text{Ln}N - \text{Ln}N_0}{t} \quad (2)$$

$$\text{Número de generación } (g) = \frac{\mu \times t}{\text{Ln}(2)} \quad (3)$$

$$\text{Tiempo de generación } (T) = \frac{t}{g} \quad (4)$$

Donde:

N: número final de UFC

No: UFC inicial

t: tiempo

Este procedimiento se realizó cada mes durante 1 año, para evaluar la viabilidad

celular del producto en un año de almacenamiento y determinar la fase de declive.

Cinética de liberación bacteriana

La cinética de liberación se estudió según el método descrito por He et al. (2015). Se sumergió 1 mg de SBA-15 en 10 ml de solución salina estéril, y se mantuvo durante 30 días a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de 100 µl en diferentes tiempos, y se determinó el número de bacterias viables en solución por el método de conteo en placa en agar nutritivo. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en términos de Log UFC/g.

Prueba de biodegradabilidad del material de soporte

La biodegradabilidad del material SBA-15 fue evaluada por la pérdida de masa durante 30 días expuestos al suelo.

En diferentes bolsas de nylon de malla muy fina se colocaron 10 mg de nanopartículas de SBA-15 (W_i), y se enterraron a 5 cm del suelo. Para el experimento, el suelo se mantuvo a temperatura ambiente y se regó diariamente con agua destilada. El control de biodegradabilidad se realizó pesando las muestras enterradas a diferentes tiempos (W_b), y la tasa de biodegradación se calculó con la Ec. (5). Los experimentos se llevaron a cabo en cinco repeticiones (He et al., 2015).

$$\text{Biodegradabilidad} = \frac{W_i - W_b}{W_i} \times 100 \quad (5)$$

2. Desarrollo y caracterización de un soporte a base de alginato de sodio.

Preparación de las cápsulas de alginato de sodio.

Se preparó el inóculo de cada bacteria en caldo de cultivo Luria Bertani previamente esterilizado. Se inoculó una colonia pura en 100 ml de caldo de

cultivo y se incubó a 28 ± 2 °C en agitación rotatoria constante de 150 rpm durante 48 horas, hasta la fase de crecimiento exponencial media (Yu et al., 2012).

Se hizo una mezcla 1:1:1 del inóculo obtenido para cada bacteria. La estandarización del inóculo se realizó mediante diluciones con solución salina al 0.9% estéril, hasta obtener una densidad celular bacteriana de 10^9 UFC/ml. Posteriormente se realizaron diluciones en serie 10 veces. Se tomó 1 ml de cada dilución y se inoculó en placas de agar nutritivo. Después de 24 horas de incubación a 30 ± 2 °C, se registró el crecimiento celular para comprobar la densidad bacteriana (Kalam et al., 2017).

La encapsulación del consorcio bacteriano en alginato de sodio se hizo utilizando la metodología propuesta por Joe et al. (2012). Se utilizó alginato de sodio y cloruro de calcio de la marca Sigma-Aldrich. Se prepararon tres diferentes formulaciones adicionando como aditivos turba (1:3 w/w) y carboximetilcelulosa 5% (Meftah Kadmiri et al., 2021).

En 100 ml de suspensión bacteriana estandarizada se agregó 100 ml de alginato de sodio al 2% en agitación baja a 30 °C durante 1 hora en condiciones de asepsia, para las cápsulas control. Además, se prepararon una solución más de alginato de sodio con turba en una proporción 1:3 w/w y una solución de alginato con carboximetilcelulosa al 5%. Ambas soluciones se adicionaron a 100 ml de suspensión bacteriana.

La suspensión bacteriana con alginato de sodio se colocó en botellas de infusión de solución salina esterilizadas, y se montaron en un soporte. El contenido de las botellas de infusión se dejó caer en una solución de cloruro de calcio 0.1 M para formar las cápsulas de alginato por contacto. El flujo se ajustó para producir una gota uniforme de 200 a 250 mm. Las cápsulas de alginato se dejaron en la solución de CaCl_2 durante 30 minutos.

Las perlas se extrajeron de la solución de CaCl_2 , se enjuagaron en 500 ml de solución salina al 0.9% 4 veces en condiciones asépticas, y se transfirieron a

caldo nutritivo a 20 °C. Las bacterias se multiplicaron en esta mezcla durante 12 h adicionales a 30 ± 2 °C a 100 rpm. Luego, las perlas de alginato se separaron del medio de cultivo mediante filtración con papel, y se enjuagaron 3 veces con 500 ml de solución salina.

Las perlas de alginato se empaquetaron en una bolsa de polietileno de alta densidad a razón de 200 g por bolsa y se almacenaron a 4 °C y 25 °C.

Efecto del soporte a base de alginato de sodio sobre la viabilidad del consorcio bacteriano.

Se midió la viabilidad celular de las cápsulas de alginato recién preparadas, y a diferentes tiempos después de su empaquetado. Se tomaron 10 cápsulas muestreadas al azar, y se colocaron en 10 ml de tampón de fosfato de potasio (0.25, pH 6.8 ± 1) en un tubo de ensayo por 16 a 24 horas a 30 °C. Para facilitar la solubilidad las cápsulas se agitaron durante 5 minutos a la máxima velocidad en un Vórtex.

Se prepararon diluciones en serie de la solución donde se liberaron las bacterias; se transfirió 1 ml de la solución a 9 ml de agua destilada estéril para obtener una dilución 10⁻¹, y se repitió el proceso hasta obtener una solución 10⁻⁹. De las diluciones, se pipetearon 10 µl y se colocaron en placas Petri con agar nutritivo (Novinscak y Fillion, 2020). Las placas se incubaron a 25 ± 2 °C y las colonias individuales se contaron mediante el método de la placa de gota; se hicieron tres repeticiones para cada dilución (Somasegaran y Hoben, 1994). Además, se calcularon datos de cinética bacteriana, de acuerdo con Pisabarro (2009), como en el soporte de SBA-15.

Este procedimiento se realizó cada mes durante 1 año, para evaluar la viabilidad celular a lo largo de un año de almacenamiento.

Cinética de liberación bacteriana

La cinética de liberación se estudió según el método descrito por He et al. (2015). Se sumergió un gramo de las cápsulas de alginato en 10 ml de solución salina

estéril y se mantuvo durante 30 días a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de 100 μ l en diferentes tiempos, y se determinó el número de bacterias viables en solución por el método de conteo en placa en agar nutritivo. Los experimentos se realizaron por triplicado, y los resultados se expresaron en términos de Log CFU/g.

Prueba de biodegradabilidad del material de soporte

La biodegradabilidad de las cápsulas de alginato fue evaluada por la pérdida de masa durante 30 días expuestos al suelo.

En diferentes bolsas de nylon de malla fina se colocaron 100 mg de cápsulas (W_i) y se enterraron a 5 cm del suelo. Para el experimento, el suelo se mantuvo a temperatura ambiente y se regó diariamente con agua destilada. El control de biodegradabilidad se realizó pesando las muestras enterradas a diferentes tiempos (W_b), y la tasa de biodegradación se calculó con la ecuación (5). Los experimentos se llevaron a cabo en cinco repeticiones (He et al., 2015).

Control con turba.

La turba se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 1 hora, la esterilización se repitió por tres días. La turba se dejó secar en condiciones de asepsia. Una vez seca y estéril, la turba se colocó en una bolsa de plástico previamente desinfectada y se le agregaron aproximadamente 100 ml de inóculo a una concentración de 10^{-9} UFC/ml. La mezcla se homogenizó perfectamente, sin que se presentara saturación de humedad. La bolsa se selló y se almacenó a 4 °C y a temperatura ambiente (Quiroz-Sarmiento et al., 2019).

Para el control se evaluó la viabilidad del consorcio bacteriano, cinética de liberación bacteriana y prueba de biodegradabilidad.

3. Determinación de actividad promotora del crecimiento vegetal del consorcio bacteriano inmovilizado *in vitro*.

Pruebas de germinación

El experimento se realizó bajo condiciones de laboratorio con un diseño completamente al azar. Se hicieron 4 réplicas de 25 semillas de lechuga cada una. Como control se utilizó el inóculo dispuesto en turba y como control negativo el agua destilada estéril.

Las semillas se desinfectaron en etanol al 70% (v/v) durante 1 minuto, seguido de hipoclorito de sodio al 2.5% (w/v) durante 20 minutos. Se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se descartaron las semillas flotantes. Por otro lado, se esterilizó papel filtro previamente cuadrículado.

En campana de extracción se colocó el papel filtro cuadrículado en cada caja Petri, y se humedeció con 5 ml de agua destilada estéril. Con pinzas se colocaron las 25 semillas de lechuga desinfectadas.

Los tratamientos utilizados fueron los soportes propuestos: cápsulas de alginato, cápsulas de alginato + carboximetilcelulosa, cápsulas de alginato + turba, material de sílice mesoporoso SBA-15. Para las cápsulas de alginato se emplearon 5 cápsulas para cada caja Petri. Para el material de sílice mesoporoso se agregó en el agua destilada a una concentración de 100 ppm (Magaña-López et al., 2022).

Tras 21 días después de la siembra se determinó el porcentaje de germinación (Ecuación 8), según lo sugerido por Abdul-Baki y Anderson (1973).

$$\% \text{ de germinación} = \frac{\text{semillas germinadas}}{\text{total de semillas utilizadas}} \times 100 \quad (8)$$

4. Evaluación de la efectividad del consorcio inmovilizado en el soporte sobre el rendimiento y calidad de un cultivo de lechuga.

El experimento se realizó en invernadero en un diseño completamente al azar, y los tratamientos se asignaron lo más uniforme posible; lo anterior, para permitir que sólo las diferencias potenciales entre los tratamientos se perciban con facilidad.

Primeramente, se hizo la siembra de las semillas de lechuga en semilleros previamente desinfectados y como sustrato se utilizó peat moss.

Las semillas se desinfectaron en etanol al 70% (v/v) durante 1 minuto, seguido de hipoclorito de sodio al 2.5% (w/v) durante 20 minutos. Se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se descartaron las semillas flotantes. Las semillas fueron colocadas en los semilleros y se mantuvieron hasta la emergencia. Posteriormente se realizó el trasplante en macetas. Para ello se preparó la tierra de cultivo con turba, tierra negra y perlita.

Cápsulas de alginato + turba. La tierra de cultivo preparada se mezcló con las cápsulas de alginato a una razón de 10 g de cápsulas por cada 100 g de sustrato; se homogenizó y en condiciones de asepsia se colocó en las macetas haciendo el trasplante de la plántula de lechuga (Quiroz-Sarmiento et al., 2019; Panichikkal et al., 2021).

SBA-15. La tierra de cultivo preparada se colocó en la maceta y se realizó el trasplante de la plántula de lechuga. El SBA-15 se agregó por aspersión en una concentración de 100 ppm (Magaña-López et al., 2022).

Turba. La tierra de cultivo preparada se mezcló con 10 g de turba por cada 100 g de sustrato, se homogenizó y se hizo el trasplante de la plántula de lechuga (Quiroz-Sarmiento et al., 2019).

El diseño experimental fue completamente al azar. Se emplearon 10 plantas para cada tratamiento. El experimento se realizó por triplicado.

Tabla 2. Cantidad utilizada para cada tratamiento.

Tratamiento	Cantidad
Turba + inóculo	10 g/100 g de sustrato
Cápsulas de alginato + turba	50 cápsulas/plántula
SBA-15 (aspersión)	100 ppm
Control negativo	Agua destilada

Una vez realizado el trasplante se mantuvo bajo riego cortos y frecuentes para mantener la humedad en las capas más superficiales del suelo. El experimento finalizó cuando las plantas estuvieron listas para la cosecha. Se midió la altura de las plantas, la longitud de la raíz y el peso fresco (Kamal y Ashish, 2020).

5. Análisis de costos de producción para cada soporte bacteriano.

Se realizó una evaluación financiera de proyectos de inversión para cada soporte, y mediante el valor de la TIR y la TREMA se determinó si el proyecto es rentable o no en términos financieros.

Para obtener la TIR y la TREMA se utilizó el programa Excel, se calculó la totalidad de la inversión inicial, los egresos de operación, los intereses que deberán pagarse por la parte de la inversión financiada con capital ajeno, los impuestos y la rentabilidad (Meza, 2017).

6. Análisis estadístico de los datos.

Se llevó a cabo un análisis de varianza (Muller y Fetterman, 2003), pruebas de comparación de medias y pruebas Tukey, utilizando el programa de estadística Statgraphics.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Desarrollo y caracterización de un soporte de sílice mesoporosa SBA-15 y alginato de sodio.

Formulación con el material de sílice mesoporoso SBA-15.

Para el soporte con material de sílice mesoporosa SBA-15 se obtuvo un polvo blanco y fino que contenía en su estructura al consorcio bacteriano (Figura 5); éste una vez seco se utilizó a lo largo de la experimentación.

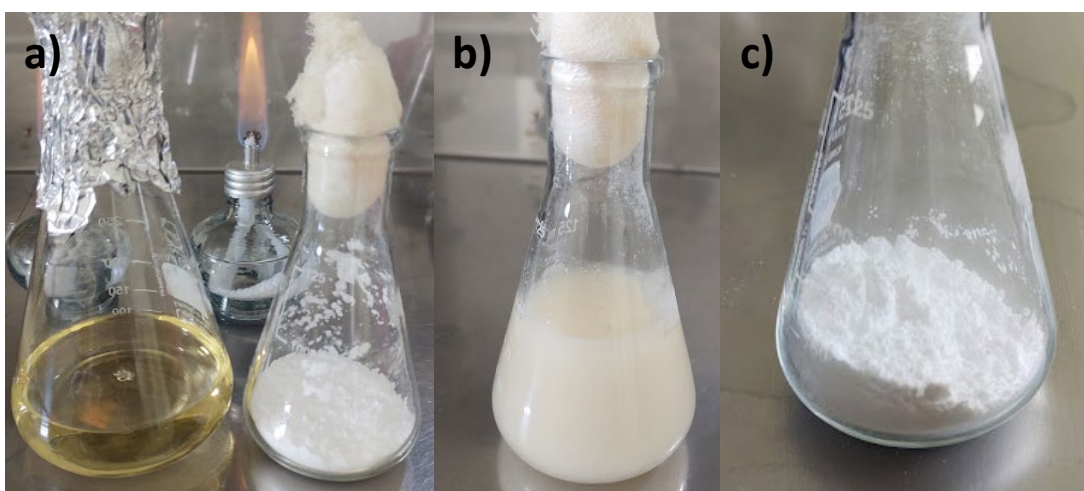


Figura 5. Formulación obtenida con material de sílice mesoporoso SBA-15. **a)** Se observa el medio de cultivo y el SBA-15 por separado. **b)** Momento en el que el SBA-15 se pone en contacto con el medio de cultivo antes de la incubación. **c)** Se observa el material seco que ya contiene el consorcio bacteriano.

Las características físicas del material de sílice mesoporoso SBA-15 no se modificaron cuando se puso en contacto con el medio de cultivo con el consorcio bacteriano.

El material SBA-15 presenta grandes cantidades de mesoporos en su estructura, que es donde se albergan las PGPB, lo que da origen a una fuerte asociación bacteria-material orgánico; esto es importante debido a que, si la unión es muy fuerte, la liberación de las PGPB al medio será mucho más complicada. En un estudio realizado por Velázquez-Herrera et al. (2022) encontraron que el uso de SBA-15 como soporte bacteriano complica la liberación bacteriana al medio; sin

embargo, al agregar LDH y preparar un nanocompuesto LDH/SBA se facilita notablemente la liberación.

Formulación con alginato de sodio.

Para las cápsulas de alginato de sodio se obtuvieron tres formulaciones distintas (Figura 6), las cuales contenían al consorcio bacteriano en su interior y una vez secas se utilizaron a lo largo de la experimentación:

- Alginato (ALG)
- Alginato con carboximetilcelulosa como aditivo (ALG+CMC)
- Alginato con turba como aditivo (ALG+Turba)

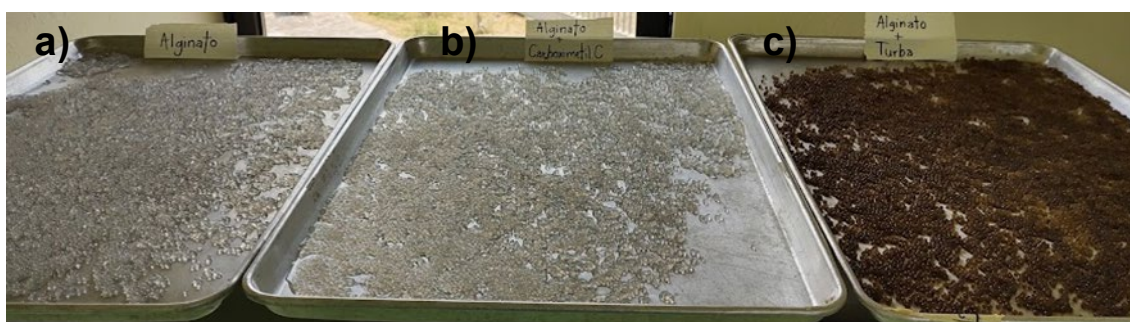


Figura 6. Formulaciones desarrolladas con alginato de sodio como soporte. Se prepararon tres formulaciones **a)** alginato de sodio, **b)** carboximetilcelulosa como aditivo y **c)** turba como aditivo.

Se tomó una muestra de 10 cápsulas de cada formulación y se midió el diámetro a cada una de ellas en fresco y en seco; los resultados se condensaron en la Tabla 3 para las cápsulas frescas, y en la Tabla 4 para las cápsulas secas.

Tabla 3. Diámetro medio obtenido de la medición de 10 cápsulas en fresco muestreadas al azar.

	ALG	ALG+CMC	ALG+Turba
Diámetro medio (mm)	3.86	3.23	3.5
Desviación estándar	0.23	0.12	0

Tabla 4. Diámetro medio obtenido de la medición de 10 cápsulas en seco muestreadas al azar.

	ALG	ALG+CMC	ALG+Turba
Diámetro medio (mm)	4.02	3.07	2.5
Desviación estándar	0.56	0.11	0.1

Las cápsulas de alginato de sodio con turba presentaron una forma regular y homogénea comparadas con las que se elaboraron sólo con alginato de sodio. Algunos estudios sugieren que el uso de polisacáridos con minerales arcillosos para proteger las células inmovilizadas asegura una liberación lenta al medio ambiente. He et al. (2017) encontraron que la adición de bentonita a la formulación a base de alginato aumenta el contenido de sólidos, y la porosidad del alginato utilizado como vehículo de *Raoultella planticola*. Por otro lado, Liffourrena y Lucchesi (2018) aplicaron perlita como relleno de microesferas de alginato, y aumentaron la estabilidad mecánica del gel. Finalmente, Meftah Kadmiri et al. (2021) encontraron que la adición de materiales arcillosos al alginato de sodio favorece la reacción de entrecruzamiento, mejorando así la forma y apariencia de la cápsula. Lo anterior se relaciona con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que, al agregar turba a la formulación, las cápsulas presentaron un diámetro más homogéneo.

Efecto de los soportes sobre la viabilidad del consorcio bacteriano.

La prueba de viabilidad bacteriana se realizó a dos temperaturas, 4 °C y temperatura ambiente, durante un año en almacenamiento.

Las formulaciones mantenidas a temperatura ambiente (Figura 8) presentaron una mayor viabilidad bacteriana que las que se mantuvieron a 4 °C (Figura 7). Siendo el SBA-15 y el alginato con turba los que presentaron una mayor viabilidad bacteriana a 12 meses en almacenamiento, 3.67×10^9 UFC/ml y 5.93×10^8 UFC/ml, respectivamente.

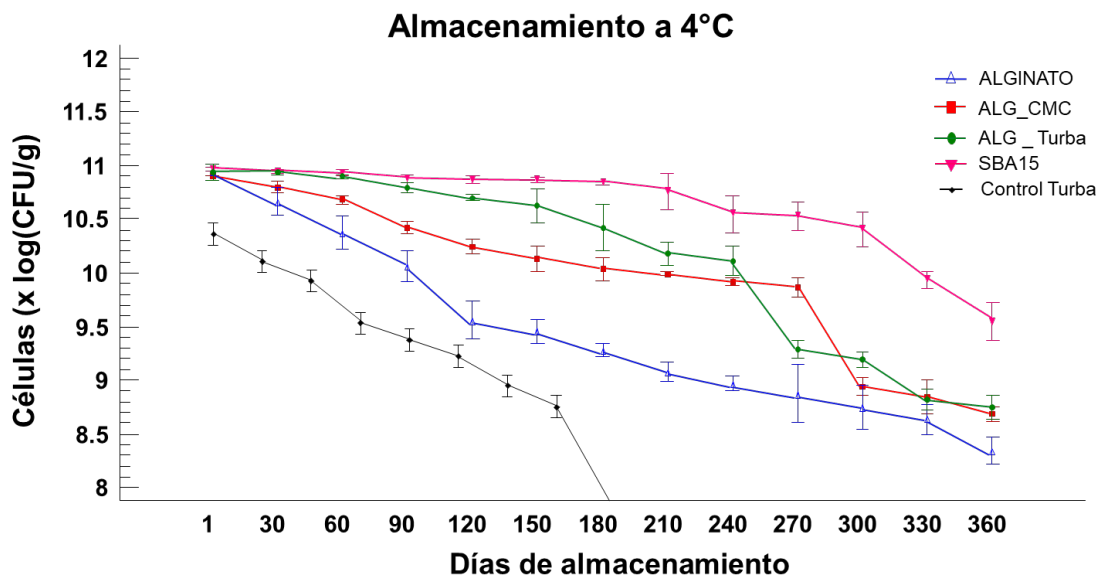


Figura 7. Viabilidad bacteriana presentada por cada una de las formulaciones propuestas almacenadas a 4 °C. La viabilidad bacteriana se midió cada mes durante un año. Se utilizó prueba de Tukey con $p \leq 0.05$. Las barras de error representan el intervalo de confianza individual.

A 4 °C, la viabilidad para cada formulación propuesta fue, para alginato 2.2×10^8 UFC/ml, alginato con carboximetilcelulosa de 4.83×10^8 UFC/ml, alginato con turba de 5.9×10^8 UFC/ml y SBA-15 de 3.67×10^9 UFC/ml. El SBA-15 fue el material que presentó una mayor cantidad de células viables después de 12 meses en almacenamiento a 4 °C. El control de turba presentó viabilidad bacteriana hasta el cuarto mes en almacenamiento; después de este mes ya no hubo crecimiento bacteriano, lo que indica que a 4 °C la turba mantiene vivas las células bacterianas durante 4 meses en almacenamiento.

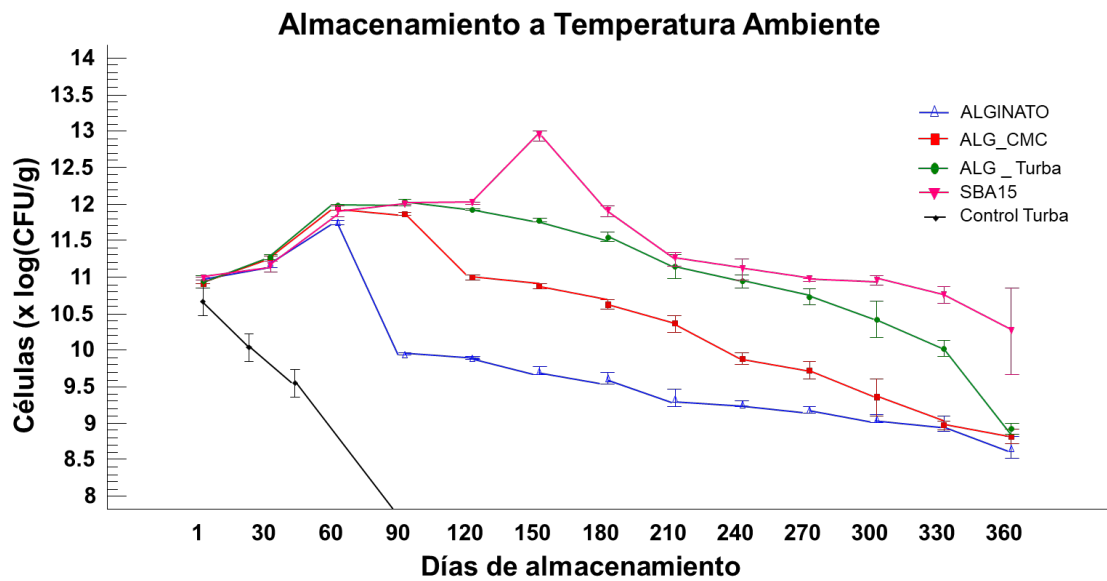


Figura 8. Viabilidad bacteriana presentada por cada una de las formulaciones propuestas almacenadas a temperatura ambiente. La viabilidad bacteriana se midió cada mes durante un año. Se utilizó prueba de Tukey con $p \leq 0.05$. Las barras de error representan el intervalo de confianza individual.

Por otro lado, a temperatura ambiente la viabilidad bacteriana de cada soporte fue para el alginato 4.67×10^8 UFC/ml, alginato con carboximetilcelulosa de 6.67×10^8 UFC, alginato con turba de 8.33×10^8 UFC/ml, y SBA-15 de 2.0×10^{10} UFC/ml. El SBA-15 fue el material que presentó una mayor cantidad de células viables después de 12 meses en almacenamiento a temperatura ambiente. El control de turba presentó viabilidad bacteriana de 5 meses en almacenamiento.

Los resultados obtenidos indican que la viabilidad bacteriana de las formulaciones varió dependiendo de la temperatura de almacenamiento. Las formulaciones mantenidas a temperatura ambiente presentaron una mayor viabilidad bacteriana en comparación con aquellas mantenidas a 4°C . Tanto el SBA-15 como el alginato con turba fueron los que mostraron una mayor viabilidad bacteriana después de 12 meses de almacenamiento, tanto a temperatura ambiente como a 4°C .

Lo anterior nos indica que la temperatura de almacenamiento es un factor crucial que puede afectar la viabilidad bacteriana a largo plazo. Se ha demostrado que las bajas temperaturas, como 4°C , pueden tener efectos negativos en la

supervivencia de las bacterias durante períodos prolongados de almacenamiento. Esto se debe a que las bajas temperaturas pueden provocar daño en las membranas celulares, y alterar las funciones metabólicas de las bacterias, lo que resulta en una disminución de la viabilidad (Yu et al., 2021).

En el caso del SBA-15, se observó que mantuvo una alta viabilidad bacteriana después de 12 meses tanto a temperatura ambiente como a 4 °C. El SBA-15 es un material mesoporoso con propiedades de liberación controlada, lo que puede ayudar a proteger las bacterias durante el almacenamiento y mejorar su supervivencia. Además, el SBA-15 puede proporcionar un entorno favorable para las bacterias al mantener una alta capacidad de retención de agua y nutrientes (Zhang et al., 2018).

En cuanto al alginato con turba, también se observó una alta viabilidad bacteriana después de 12 meses de almacenamiento. La turba puede proporcionar un ambiente propicio para las bacterias al retener la humedad y proporcionar nutrientes adicionales. Esto puede ayudar a mantener la viabilidad de las bacterias durante el almacenamiento a largo plazo (Kodama et al., 2019). Además, el uso de materiales aditivos desempeña un papel importante en la protección y conservación de las bacterias durante el almacenamiento (Liu et al., 2020).

Hay diversos estudios donde utilizan alginato como soporte para PGPB. Schoebitz et al. (2012) encontraron que las perlas secas de alginato que contenían *A. brasilense* presentaban 76% de células viables después de un año de almacenamiento. Por otro lado, Souza-Alonso et al. (2021) estudiaron la encapsulación de *P. libanensis* utilizando alginato, y observaron que la viabilidad celular se mantenía hasta 90 días en almacenamiento. Saberi-Riseh y Moradi-Pour (2020) informaron que la encapsulación en alginato mejoró significativamente la tasa de supervivencia de *B. subtilis* en comparación con la forma libre del microorganismo. Young et al. (2006), por su parte, demostraron que la encapsulación de bacterias en perlas de alginato enriquecidas con ácido húmico mantiene la viabilidad bacteriana después de 5 meses en almacenamiento, lo que promueve con éxito el crecimiento de la lechuga.

Los datos de cinética de viabilidad bacteriana se presentan en la Tabla 5. De acuerdo con los mismos, las formulaciones que presentan una mejor cinética de viabilidad bacteriana, estadísticamente, son las cápsulas de alginato con turba almacenadas a temperatura ambiente y el material de sílice mesoporosa SBA-15 almacenada a temperatura ambiente, sin diferencia estadística significativa entre ellas. Ambas formulaciones presentan datos positivos de tasa de crecimiento, número de generación y tiempo de generación, mientras que presentan datos negativos para tasa de muerte. Lo anterior indica que dichas formulaciones promueven el crecimiento de las bacterias contenidas aun en almacenamiento.

En un estudio realizado por Zago et al. (2019) encontraron que, al encapsular *A. brasilense* en perlas de alginato, el crecimiento bacteriano se mantuvo durante 90 días, lo que aseguró una mejor viabilidad celular.

Tabla 5. Cinética de viabilidad bacteriana presentados por cada uno de los soportes propuestos. Las letras indican diferencia estadística significativa entre los datos. Se utilizó una prueba de Tukey con $p \leq 0.05$

Formulación	Tasa de crecimiento (μ)	Tasa de muerte (k)	Número de generación (g)	de Tiempo de generación (T)
ALG 4 °C	-1.55E-03±3.33E-05 ^g	1.55E-03±3.33E-05 ^a	-2.69E-01±0.0058 ^g	-446.605±9.58 ^{ab}
ALG Tamb	-1.31E-03±4.33E-05 ^f	1.31E-03±4.33E-05 ^b	-2.27E-01±0.0075 ^f	-529.817±17.63 ^{ab}
ALG+CMC 4°C	-7.29E-04±5.68E-06 ^e	7.29E-04±5.68E-06 ^c	-1.26E-01±9.8E-04 ^e	-950.741±7.39 ^b
ALG+CMC Tamb	-4.21E-04±3.74E-05 ^d	4.21E-04±3.74E-05 ^d	-7.28E-02±0.006 ^d	-1656.2±149.7 ^b
Turba amb	-7.29E-04±5.68E-06 ^e	7.29E-04±5.68E-06 ^c	-1.26E-01±9.8E-04 ^e	-950.741±7.39 ^b
ALG+Turba 4 °C	-1.81E-04±1.02E-05 ^c	1.81E-04±1.02E-05 ^e	-3.14E-02±0.0018 ^c	-3829.91±219.7 ^c
ALG+Turba Tamb	7.24E-04±3.57E-06 ^a	-7.24E-04±3.57E-06 ^g	1.25E-01±6.18E-04 ^a	957.878±4.72 ^a
SBA-15 4 °C	-6.99E-05±1.10E-05 ^b	6.99E-05±1.10E-05 ^f	-1.21E-02±1.90E-03 ^b	-10073.4±1544.7 ^d
SBA-15 Tamb	7.47E-04±4.53E-06 ^a	-7.47E-04±4.53E-06 ^g	1.29E-01±7.85E-04 ^a	927.75±5.61 ^a
Turba 4 °C	-4.21E-04±3.74E-05 ^d	4.21E-04±3.74E-05 ^d	-7.28E-02±0.006 ^d	-1656.2±149.7 ^b

Cinética de liberación bacteriana de los materiales.

La cinética de liberación se evaluó durante un mes, siendo el SBA-15 el material que presenta una mayor liberación bacteriana a través del tiempo, con un valor

de 4×10^3 UFC/g en el día 30; además, a partir del día 5 la liberación bacteriana es controlada y sostenida. En la Figura 9 se aprecia la cinética de liberación para todos los materiales propuestos.

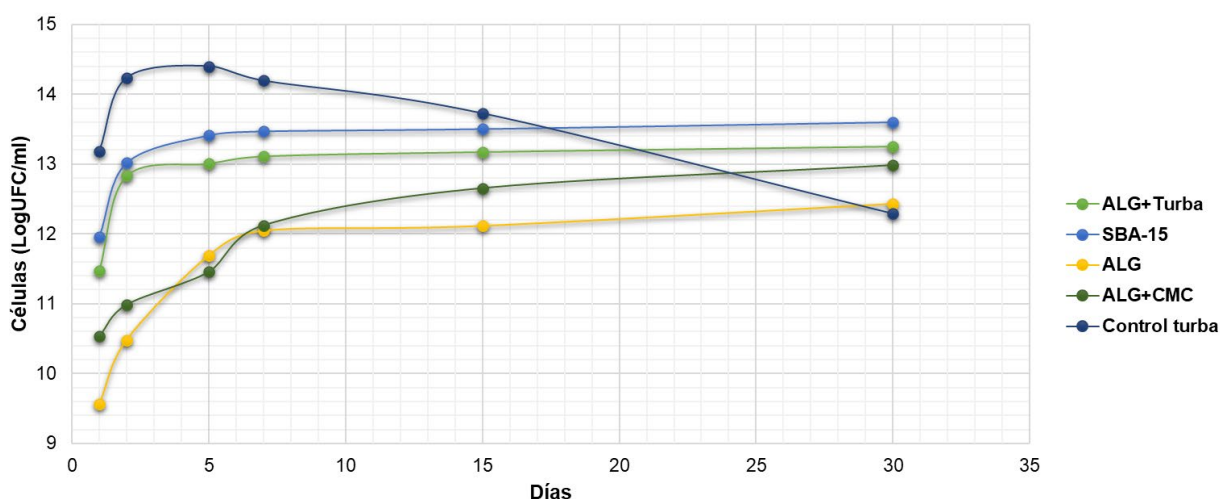


Figura 9. Cinética de liberación presentada por las formulaciones propuestas durante un mes.

Las curvas de liberación bacteriana en solución salina muestran dos fases típicas determinadas por He et al. (2016). La velocidad de liberación celular más rápida se observa el primer día en todas las formulaciones. Desde el día 5 hasta el día 30 se observó una liberación estable en ambos materiales; sin embargo, SBA-15 tuvo una mayor liberación de células que ALG. Estos resultados pueden deberse a la alta tasa de degradación que presentó el SBA-15. El comportamiento de liberación de las bacterias inmovilizadas depende del material utilizado, lo cual es relevante al elegir el material para la formulación de biofertilizantes (Meftah Kadmiri et al., 2021).

Los resultados anteriores confirmaron que las formulaciones preparadas tienen propiedades adecuadas para liberar bacterias; además, los materiales presentan ciertas propiedades absorbentes que controlan el comportamiento de liberación controlada de las PGPB. La tasa de liberación de las formulaciones fue rápida al inicio y prolongada, propiedades requeridas para que una matriz polimérica sea un buen sistema de suministro de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Perez et al., 2018).

El SBA-15 es conocido por su capacidad de liberación controlada de diversos compuestos, incluidos los microorganismos. Su estructura mesoporosa permite la carga y el almacenamiento de bacterias en su interior, y la posterior liberación gradual en el entorno circundante (López et al., 2019). Esta liberación controlada es deseable en aplicaciones donde se busca mantener una actividad bacteriana sostenida durante un período prolongado, como en la agricultura o la biorremediación.

La cinética de liberación observada en todas las formulaciones, con una liberación inicial acelerada seguida de una liberación sostenida durante un mes, es consistente con estudios previos que han utilizado materiales similares para la liberación controlada de microorganismos.

En un estudio realizado por Díez-Pascual et al. (2018), se empleó un material de sílice mesoporosa para la liberación de microorganismos. Los resultados mostraron una liberación inicial rápida seguida de una fase de liberación sostenida, lo que permitió una actividad bacteriana prolongada en el medio.

La liberación controlada de bacterias es un aspecto importante para la biofertilización y el biocontrol de enfermedades en los cultivos. La capacidad de los materiales como el SBA-15 para proporcionar una liberación sostenida y controlada de microorganismos puede mejorar la eficacia de estos productos y minimizar la pérdida de estos en el entorno. Por lo anterior, los resultados obtenidos en este experimento respaldan la utilidad de los materiales mesoporosos en aplicaciones que requieren una liberación controlada de microorganismos.

Porcentaje de degradabilidad de los materiales.

La biodegradabilidad de las cápsulas obtenidas en este trabajo fue confirmada por la mayor pérdida de masa en condiciones naturales del suelo durante un período de 30 días.

Los resultados del ensayo de biodegradabilidad muestran que, a 30 días en contacto con tierra húmeda, el SBA-15 es el material que presenta un mayor

porcentaje de biodegradabilidad, siendo de 42.4%; mientras que el alginato con turba tiene un porcentaje de degradabilidad de 39%, siendo ambos datos diferentes estadísticamente. En la Figura 10 se muestra el porcentaje de biodegradabilidad para todas las formulaciones.

El porcentaje de biodegradabilidad se evaluó para verificar que los materiales utilizados se degraden en el suelo en condiciones ambientales, y evitar la acumulación de materiales no biodegradables y los consiguientes problemas ambientales (Luckachan y Pillai, 2011; Sturm, 1973).

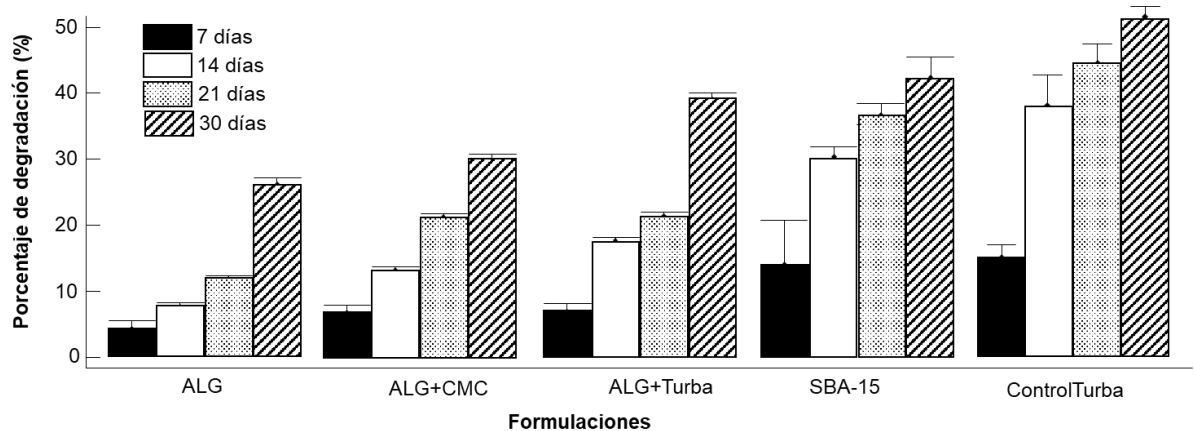


Figura 10. Porcentaje de biodegradabilidad de los materiales propuestos como soportes de 7 a 30 días. Se utilizó una prueba de Tukey con $p \leq 0.05$. Las barras de error representan el intervalo de confianza individual

Los resultados obtenidos indican que las cápsulas obtenidas en el estudio son biodegradables en condiciones naturales del suelo. Sin embargo, las diferencias en las tasas de degradación de los materiales pueden atribuirse a la capacidad metabólica de las bacterias para utilizar los materiales como fuente de alimento. Se ha demostrado anteriormente que cepas bacterianas como *B. sp.* o *Hydrogenopahaga sp.* cepa UMI-18 degradan el alginato y lo utilizan como única fuente de carbono (Narsico et al., 2020). Además, Souza-Alonso et al. (2021) encontraron que cápsulas de alginato que contenían *P. libanensis* utilizadas como biofertilizante para *Vigna unguiculata* se disuelven progresivamente en la rizosfera de la planta.

En este experimento, además del consorcio bacteriano, las bacterias del suelo

podieron haber afectado en la tasa de degradación, ya que no se realizó en condiciones estériles. Además, la biodegradación de un material polimérico está directamente relacionada con su composición, método de preparación y también con la actividad biológica de los microorganismos; lo anterior, da respuesta a la variación que tuvieron los porcentajes de degradación de las formulaciones, ya que todas son distintas (Mendoza-Labrador et al., 2021).

El SBA-15 es un material mesoporoso que se ha utilizado en diversas aplicaciones, debido a su capacidad para degradarse en condiciones ambientales. Varios estudios han demostrado la biodegradabilidad del SBA-15 y su uso en la liberación controlada de compuestos bioactivos (Vallet-Regí et al., 2007). Además, la estructura porosa del SBA-15 facilita la interacción con los microorganismos presentes en el suelo, lo que puede acelerar su degradación.

En cuanto al alginato con turba, también se observó una biodegradabilidad significativa. La turba es un material orgánico natural que se descompone en condiciones adecuadas. La turba está compuesta principalmente por materia orgánica parcialmente descompuesta, lo que la hace susceptible a la actividad de microorganismos y enzimas del suelo que promueven su degradación (Johansson et al., 2017).

La biodegradabilidad de los materiales utilizados en las cápsulas es un aspecto crucial, ya que garantiza que no haya acumulación de residuos indeseables en el medio ambiente. La capacidad de los materiales para descomponerse naturalmente es importante en aplicaciones agrícolas y ambientales, donde se busca minimizar el impacto ambiental de los productos utilizados. Estos hallazgos respaldan la viabilidad de utilizar estos materiales en aplicaciones que requieren degradación controlada y sostenible.

2. Determinación de actividad promotora del crecimiento vegetal del consorcio bacteriano inmovilizado.

Porcentaje de germinación in vitro.

El porcentaje de germinación para la formulación de alginato de sodio fue de

66%, para el alginato de sodio con carboximetilcelulosa como aditivo fue de 73%, para el alginato de sodio con turba como aditivo fue de 86% y el de SBA-15 fue de 89%; en contraparte, el control con agua destilada estéril fue de 58% y el control con turba fue de 76%. De acuerdo con la prueba de ANOVA hay diferencia estadística entre los tratamientos utilizados, siendo los mejores tratamientos la formulación de alginato con turba y el SBA-15; ambos tratamientos no tienen diferencia estadística significativa, los cuales aumentan la germinación alrededor de un 30% comparado con el control negativo.

La Figura 11 muestra el porcentaje de germinación de semillas de lechuga para cada formulación evaluada.

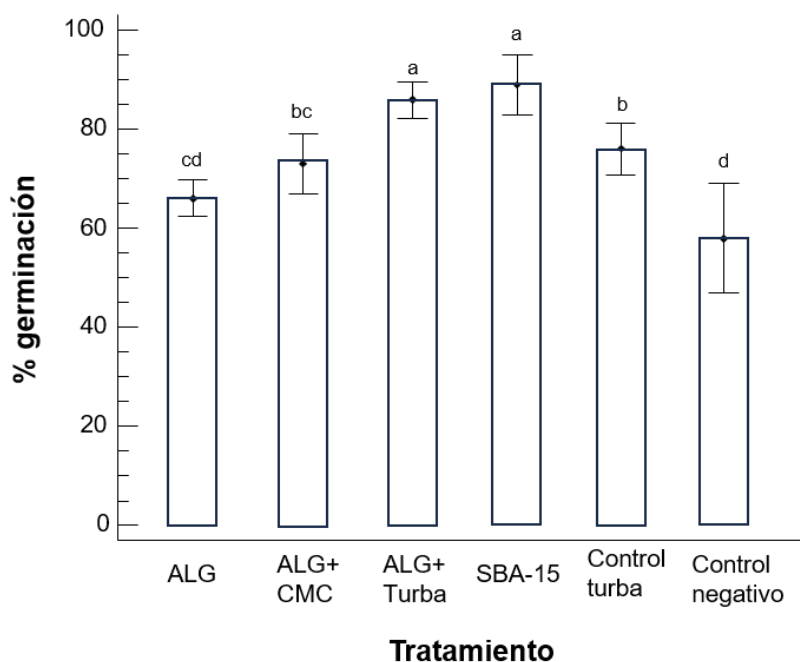


Figura 11. Porcentaje de germinación para cada formulación propuesta. Se utilizó una prueba de Tukey con $p \leq 0.05$. Las barras de error representan el intervalo de confianza individual, y las letras diferentes muestran diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

La adición de turba como aditivo al alginato de sodio mostró un porcentaje de germinación de 86%, lo que representa un aumento del 30% en comparación con el control. La turba es ampliamente reconocida por sus propiedades beneficiosas para el crecimiento de las plantas. La turba contiene una combinación de nutrientes esenciales, mejora la retención de agua y promueve

la aireación del suelo; esto puede favorecer el desarrollo de las plántulas y, en última instancia, la germinación exitosa (Chen et al., 2018). Young et al. (2006) encontraron que el crecimiento inicial de plantas inoculadas con PGPB encapsuladas en alginato fue lento, pero el crecimiento posterior fue vigoroso comparado con la inoculación de bacterias libres, lo que podría explicarse por la liberación lenta de las bacterias.

Por otro lado, el tratamiento con SBA-15 resultó en un porcentaje de germinación del 89%, también con un aumento significativo del 30% en comparación con el control. El SBA-15 es un material mesoporoso que se ha utilizado en diversas aplicaciones agrícolas debido a su capacidad para retener y liberar nutrientes de manera controlada, así como su efecto beneficioso en el crecimiento de las plantas (Lv et al., 2019). Velazquez-Herrera et al. (2022) reportan que el uso de un nanocompuesto de LDH/SBA-15 como vehículo de *Streptomyces* sp. acelera en un 700% el crecimiento de plántulas de lechuga de 14 días después de la siembra debido a la acción fertilizante de la formulación; sin embargo, no reportan la tasa de germinación de las semillas.

Estos resultados concuerdan con estudios previos que han demostrado el potencial de los aditivos como la turba para mejorar la germinación de semillas. La incorporación de materiales en la formulación del alginato de sodio puede proporcionar un entorno favorable para el desarrollo de las plántulas al proporcionar nutrientes adicionales, mejorar la estructura del suelo y regular la disponibilidad de nutrientes (Liu et al., 2020). Por otro lado, el SBA-15 mejora el crecimiento de plántulas de chile, aunque en la tasa de germinación no presentó ningún efecto; los investigadores sugieren que la dosis y las especies de plantas son importantes para la respuesta obtenida (Magaña-López et al., 2022).

En resumen, los resultados indican que los tratamientos de alginato de sodio con turba y el SBA-15 fueron los más efectivos para aumentar el porcentaje de germinación en comparación con el control. Estos hallazgos respaldan la idea de que la adición de aditivos específicos puede mejorar la eficiencia de la germinación de semillas y, por lo tanto, tener un impacto positivo en la producción de plantas.

3. Evaluación de la efectividad del consorcio inmovilizado en el soporte sobre el rendimiento y calidad de un cultivo de lechuga.

Se realizó la siembra de las semillas de lechuga (Figura 12) y se obtuvieron 120 plántulas, a las cuales, mediante un diseño completamente al azar se aplicaron las formulaciones propuestas.



Figura 12. Obtención de plántulas de lechuga para la evaluación in vivo de las formulaciones propuestas.

Se preparó la tierra y se hizo el trasplante; a cada plántula se le agregó el tratamiento correspondiente, y se mantuvieron en iguales condiciones para evaluar el efecto de cada tratamiento sobre el crecimiento de la lechuga. Cuarenta días después del trasplante, las lechugas se encontraron listas para la cosecha por lo que se realizaron las mediciones de altura, longitud de raíz y peso fresco. En las Figuras 13 y 14 se observa una comparativa visual de las lechugas obtenidas con cada tratamiento.



Figura 13. Lechugas obtenidas con el soporte de SBA-15, con el control de turba y con el control negativo.



Figura 14. Lechugas obtenidas con el soporte de alginato de sodio con turba, con el control de turba y con el control negativo.

Se midió la altura de las lechugas cosechadas, y se encontró que el tratamiento de ALG+Turba generó las lechugas más altas, de acuerdo con la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%, siendo la altura promedio de 20.28 ± 1.2 cm. Las lechugas sometidas al tratamiento de SBA-15 tuvieron una altura promedio de 18.45 ± 0.8 cm. Los dos tratamientos anteriores fueron comparados con un control negativo, altura de 16.08 ± 0.9 cm y un control con turba como soporte, altura de 17.95 ± 0.6 cm. De acuerdo con lo anterior, la formulación de ALG+Turba aumenta un 26% la altura de plantas de lechuga con respecto al control negativo, y un 13% con respecto al control de turba. En la Figura 15 se observa la distribución de la altura de las plantas con cada tratamiento.

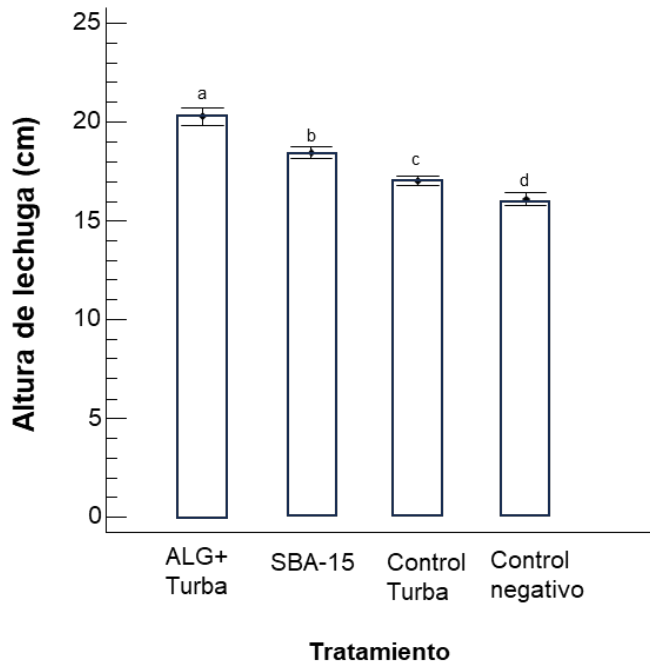


Figura 15. Altura de las lechugas obtenidas con los diferentes tratamientos evaluados. Se utilizó una prueba de Tukey con $p \leq 0.05$. Las barras de error representan el intervalo de confianza individual y las letras diferentes muestran diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

Los resultados obtenidos en la altura de las plantas de lechuga sugieren que la formulación de ALG+Turba tuvo un impacto positivo en el crecimiento de las plantas, en comparación con los otros tratamientos y los dos controles utilizados.

Hay diversos reportes que demuestran que el alginato es un vehículo efectivo para la encapsulación y liberación controlada de PGPB; además, en combinación con diferentes materiales y microorganismos puede influir en la eficacia de los biofertilizantes (Rana et al., 2021). Young et al. (2006) encontraron que al encapsular *B. subtilis* en alginato y un microambiente enriquecido con ácido húmico aumenta la altura del tallo de plántulas de lechuga de 21 días en un entorno estéril. Lo anterior se relaciona con los resultados obtenidos en este trabajo.

En este trabajo el efecto de la formulación sobre la altura de las plantas se puede atribuir a una protección bacteriana adecuada en el suelo y a una liberación controlada de las PGPB utilizadas, lo que permite una mayor colonización de las raíces de las plantas (Santos et al., 2019). La turba, por su parte, pudo haber

creado un microambiente adecuado para las bacterias dentro de la cápsula y una vez en el suelo contribuir a la mejora de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo; lo anterior resulta en un ambiente más favorable para el crecimiento de las plantas (Nesme et al., 2018).

La distribución de la longitud de raíz con cada tratamiento se observa en la Figura 16, con el análisis de varianza y la prueba de Tukey se encontró que el mejor tratamiento fue el de SBA-15, con una longitud de raíz promedio de 30.72 ± 0.7 cm. Mientras que la longitud de raíz obtenida con el tratamiento de ALG+Turba fue de 25.63 ± 0.9 cm, siendo las plantas con raíz más pequeña a pesar de tener la altura mayor. Por otro lado, el control de turba fue de 26.15 ± 0.6 cm y el control negativo fue de 27.7 ± 0.5 cm. Por lo tanto, el SBA-15 aumenta un 17.5 % la longitud de la raíz con respecto al control con turba, mientras que el aumento comparado con el control negativo es del 10.9%.

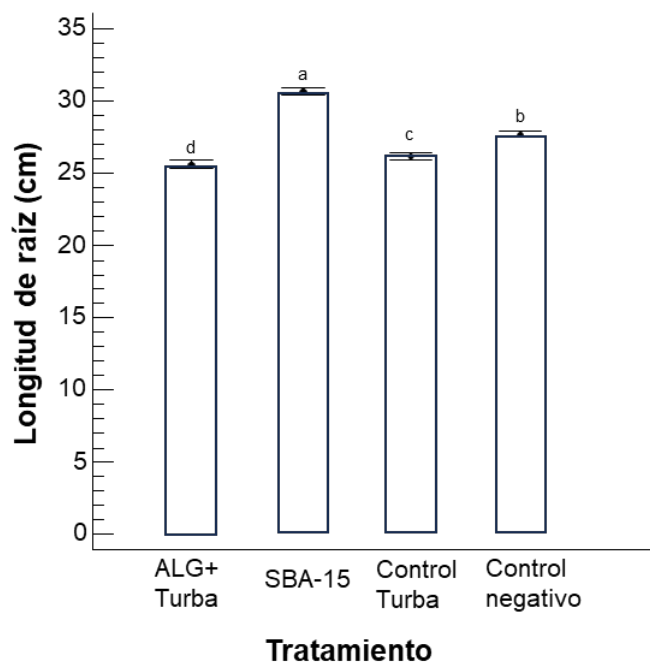


Figura 16. Longitud de raíz de las lechugas obtenidas con los diferentes tratamientos evaluados. Se utilizó una prueba de Tukey con $p \leq 0.05$. Las barras de error representan el intervalo de confianza individual y las letras diferentes muestran diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

La longitud de la raíz es un parámetro importante que puede influir en el crecimiento y desarrollo general de las plantas. En estudios previos, se ha

demostrado que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden afectar positivamente el sistema de raíces de las plantas, al estimular el crecimiento radicular y mejorar la absorción de nutrientes (Zhang et al., 2020; Kaur et al., 2019). Los resultados obtenidos en este trabajo pueden deberse a la sinergia entre la actividad promotora de crecimiento vegetal de las bacterias y un efecto bioestimulante del SBA-15.

La estructura porosa del SBA-15 puede actuar como un reservorio de nutrientes y agua, permitiendo una mayor disponibilidad para las raíces de las plantas y facilitando su crecimiento (Zhang et al., 2020). Además, se ha informado que las interacciones entre las bacterias promotoras del crecimiento vegetal y los materiales mesoporosos pueden promover la colonización y actividad de las bacterias en la rizosfera; lo anterior, a su vez, puede beneficiar el desarrollo radicular de las plantas (Li et al., 2019).

Finalmente, el peso fresco de las lechugas muestra que el tratamiento que produce las lechugas con mayor peso, de acuerdo con el análisis estadístico, es el soporte de SBA-15, con un peso promedio de 383.54 ± 9.0 g. Los resultados con los otros tratamientos fueron para ALG+Turba 351.67 ± 13.2 g, control con turba de 341.26 ± 12.25 g y control negativo de 305.77 ± 8.5 g. Es decir, el soporte de SBA-15 aumenta un 25.4% el peso fresco de lechugas en comparación con un control negativo, y un 12.4% en comparación con un control usando turba como soporte. Los resultados, de forma gráfica, se presentan en la Figura 17.

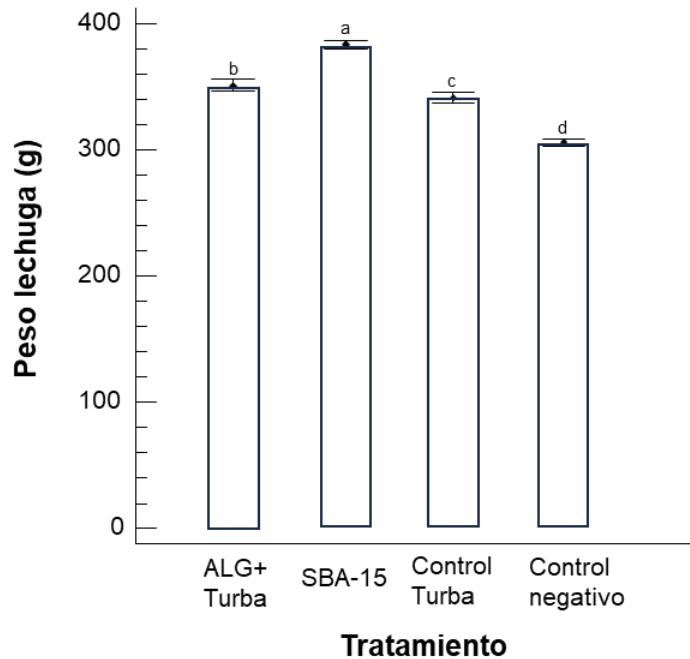


Figura 17. Peso de las lechugas obtenidas con los diferentes tratamientos evaluados. Se utilizó una prueba de Tukey con $p \leq 0.05$. Las barras de error representan el intervalo de confianza individual y las letras diferentes muestran diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

El peso fresco de las plantas es una variable que refleja el crecimiento y la producción de biomasa de las plantas. La capacidad de las PGPB para mejorar el peso fresco de diferentes plantas y hortalizas ha sido ampliamente documentada en la literatura científica (Glick, 2014; Saleem et al., 2018; Pérez-Montaña et al., 2014). Así como los diferentes mecanismos que tienen para promover el crecimiento de las raíces y la parte aérea de las plantas (Spaepen et al., 2007; Egamberdieva et al., 2017).

Panichikkal et al. (2021) encapsularon *Pseudomonas* sp. en perlas de alginato junto con nanopartículas de ácido salicílico y óxido de zinc; ellos reportaron que hay un aumento en las propiedades de biocontrol y promoción del crecimiento vegetal de plántulas de arroz en comparación con las bacterias de vida libre. Young et al. (2006), por su parte, demostraron que la aplicación de *B. subtilis* encapsuladas en alginato y ácidos húmicos promueve con éxito el crecimiento de plantas de lechuga; lo anterior debido a una alta viabilidad bacteriana después de 5 meses en almacenamiento.

De la misma forma que en los resultados de la longitud de raíz, se puede asumir que existe una interacción positiva entre el efecto que tienen las bacterias para promover el crecimiento vegetal y el posible efecto bioestimulante que tiene el SBA-15 (Magaña-López et al., 2022), así como las propiedades propias su estructura (Zhang et al., 2020).

La literatura científica respalda la idea de que la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, así como la combinación de diferentes materiales en las formulaciones biofertilizantes, pueden mejorar significativamente el crecimiento y el rendimiento de los cultivos (Zhang et al., 2021; Mishra et al., 2017). Estos estudios han destacado los beneficios potenciales de la aplicación de PGPB en términos de mejor absorción de nutrientes, aumento de la resistencia al estrés abiótico y biótico, y mejora de la calidad de los productos agrícolas.

Se debe considerar que las PGPB y los materiales de soporte influyen de manera importante en el crecimiento de las raíces y la absorción de nutrientes de las plantas (Huang et al., 2019; Yang et al., 2018); por lo que la elección de la formulación y el material de soporte adecuados puede ser crucial para obtener resultados óptimos en términos de desarrollo radicular y rendimiento de los cultivos.

Es importante destacar que los resultados del estudio realizado son específicos para las condiciones experimentales y la especie vegetal utilizada; diferentes cultivos pueden responder de manera diferente a las formulaciones biofertilizantes. Además, la interacción entre los microorganismos y las plantas puede depender de varios factores, como el tipo de suelo, el clima y las prácticas de manejo agrícola (Olanrewaju et al., 2020).

4. Análisis financiero para cada soporte bacteriano.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la viabilidad tecnológica del proyecto se eligieron las formulaciones de ALG-turba y SBA-15.

El análisis financiero se llevó a cabo mediante una proyección de inversión en el programa Excel.

Para el soporte de ALG-Turba se calculó la inversión de acuerdo a los activos fijos, costos fijos, sueldos y salarios y costos variables indispensables para llevar a cabo el producto a una capacidad de producción de 50 kg de producto por semana, el cual fue de \$1,200,000.00 aproximadamente. El costo de venta del producto se estableció en \$150.00, de acuerdo con los costos de producción y a los precios estándar de la industria de los biofertilizantes. Asumiendo que las ventas anuales son de \$360,000.00 y se solicita un crédito por \$1,000,000.00, el valor de la TIR es de -22% y el de la TREMA es de 17%. Para el cálculo de la TREMA se consideró el promedio del índice de inflación de los últimos 5 años (5.23%) y una prima de riesgo del 11%, valor actual de las TIIE.

Los resultados de la proyección de inversión con la formulación de ALG-turba se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. *Tabla de proyección de inversión para la formulación de alginato de sodio con turba. Se consideró una inversión inicial de \$1,200,000.00, ventas anuales de \$360,000.00 y un crédito bancario por \$1,000,000.00 para la inversión inicial.*

	BASE	1	2	3	4	5
Ingresos		\$360,000.00	\$360,000.00	\$360,000.00	\$360,000.00	\$360,000.00
MENOS						
Costos fijos anuales		\$264,940.86	\$264,940.86	264,940.86	264,940.86	264,940.86
Costos variables anuales	\$-	\$72,000.00	\$72,000.00	\$72,000.00	\$72,000.00	\$72,000.00
EBITDA (utilidad)		\$23,059.14	\$23,059.14	\$23,059.14	\$23,059.14	\$288,000.00
MENOS						
Depreciación	\$-	\$65,450.00	\$65,450.00	\$65,450.00	\$65,450.00	\$65,450.00
Gastos financieros (préstamo) intereses	\$-	\$130,710.09	\$108,531.46	\$83,040.64	\$53,742.96	\$20,069.91
Utilidad antes de impuestos	\$-	-\$173,100.94	-\$150,922.32	-\$125,431.49	-\$96,133.82	\$202,480.09
30% ISR	\$ -	\$-	-\$45,276.70	-\$37,629.45	-\$28,840.14	\$60,744.03
10% PTU		-\$17,310.09	-\$15,092.23	-\$12,543.15	-\$9,613.38	\$20,248.01
UTILIDAD después de impuestos	\$ -	-\$155,790.85	-\$90,553.39	-\$75,258.90	-\$57,680.29	\$121,488.05

MÁS						
Depreciación		\$65,450.00	\$65,450.00	\$65,450.00	\$65,450.00	\$65,450.00
Flujo Neto de Efectivo (FNE)		-\$90,340.85	-\$25,103.39	-\$9,808.90	\$7,769.71	\$186,938.05
PERÍODO	FNE	Factor VPN (Valor Presente Neto)	VPN	Sumatoria VPN	Retorno inversión	Pay Back
0	-\$500,000.00				-\$500,000.00	
1	-\$90,340.85	1.2859	-\$116,170.67	-\$116,170.67	-\$616,170.67	1
2	-\$25,103.39	1.6536	-\$41,510.41	-\$157,681.07	-\$773,851.74	1
3	-\$9,808.90	2.1264	-\$20,857.25	-\$178,538.32	-\$952,390.06	1
4	\$7,769.71	2.7343	\$21,244.87	-\$157,293.45	-\$1,109,683.52	1
5	\$186,938.05	3.5161	\$657,293.45	\$500,000.00	-\$609,683.52	1
TIR	-22%					
TREMA	17%					

Para el soporte de SBA-15 se calculó la inversión de acuerdo con los activos fijos, costos fijos, sueldos y salarios y costos variables indispensables para llevar a cabo el producto a una capacidad de producción de 10 kg de producto por semana, el cual fue de \$632,663.42 aproximadamente. El costo de venta del producto se estableció en \$2.50 por gramo de producto de acuerdo con los costos de producción y a los precios estándar de la industria de los biofertilizantes; se propone que la presentación del producto sea de 100 gramos con un costo de \$250.00. Asumiendo que las ventas anuales son de \$1,200,000.00 y se solicita un crédito por \$600,000.00, el valor de la TIR es de 137% y el de la TREMA es de 17% (Tabla 7).

Tabla 7. Tabla de proyección de inversión para la formulación de SBA-15. Se consideró una inversión inicial de \$632,663.42, ventas anuales de \$1,200,000.00 y un crédito bancario por \$600,000.00 para la inversión inicial.

	BASE	1	2	3	4	5
Ingresos		\$1,200,000.00	\$1,200,000.00	\$1,200,000.00	\$1,200,000.00	\$1,200,000.00
MENOS						
Costos fijos anuales		214,940.86	214,940.86	214,940.86	214,940.86	214,940.86
Costos variables anuales	\$ -	\$33,000.00	\$33,000.00	\$33,000.00	\$33,000.00	\$33,000.00
EBITDA (utilidad)		\$952,059.14	\$952,059.14	\$952,059.14	\$952,059.14	\$1,167,000.00
MENOS						
Depreciación	\$-	\$15,450.00	\$15,450.00	\$15,450.00	\$15,450.00	\$15,450.00

Gastos financieros (préstamo) intereses	\$-	\$71,890.55	\$59,692.30	\$45,672.35	\$29,558.63	\$11,038.45
Utilidad antes de impuestos	\$-	\$864,718.60	\$876,916.84	\$890,936.79	\$907,050.52	\$1,140,511.55
30% ISR	\$-	\$-	\$263,075.05	\$267,281.04	\$272,115.15	\$342,153.47
10% PTU		\$86,471.86	\$87,691.68	\$89,093.68	\$90,705.05	\$114,051.16
UTILIDAD después de impuestos	\$-	\$778,246.74	\$526,150.10	\$534,562.08	\$544,230.31	\$684,306.93
MÁS						
Depreciación		\$15,450.00	\$15,450.00	\$15,450.00	\$15,450.00	\$15,450.00
Flujo Neto de Efectivo (FNE)		\$793,696.74	\$541,600.10	\$550,012.08	\$559,680.31	\$699,756.93

PERÍODO	FNE	Factor VPN (Valor Presente Neto)	VPN	Sumatoria VPN	Retorno inversión	Pay Back
0	-\$500,000.00				-\$500,000.00	
1	\$793,696.74	0.4221	\$335,009.98	\$335,009.98	-\$164,990.02	1
2	\$541,600.10	0.1782	\$96,490.61	\$431,500.59	\$266,510.57	0.382363376
3	\$550,012.08	0.0752	\$41,360.11	\$472,860.69	\$739,371.26	0
4	\$559,680.31	0.0317	\$17,764.49	\$490,625.18	\$1,229,996.44	0
5	\$699,756.93	0.0134	\$9,374.82	\$500,000.00	\$1,729,996.44	0
TIR	137%					
TREMA	17%					

La TIR (Tasa Interna de Retorno) y la TREMA (Tasa de Rendimiento Mínimo Aceptable) son herramientas utilizadas en el análisis financiero para evaluar la viabilidad y rentabilidad de un proyecto de inversión. Ambas tasas proporcionan información valiosa para la toma de decisiones y el análisis de riesgos (Vidaurri, 2013).

La TIR es la tasa de descuento que hace que el valor actual neto de un proyecto de inversión sea igual a cero. En otras palabras, la TIR representa la rentabilidad que se espera obtener de una inversión. Si la TIR es mayor que la tasa de descuento utilizada para evaluar el proyecto, se considera que el proyecto es

rentable. De acuerdo con los resultados, una TIR de -22% y una TREMA del 17% sugiere que el proyecto de ALG-Turba no alcanza una rentabilidad aceptable, ya que está por debajo de la tasa de descuento utilizada.

En cuanto a SBA-15, se encontró una TIR del 137% y una TREMA del 17%. Estos valores indican que el proyecto es altamente rentable, ya que la TIR es mucho mayor que la TREMA.

Es importante tener en cuenta que el análisis financiero se basa en supuestos y estimaciones que pueden variar en la realidad. Los resultados de la TIR y la TREMA son sensibles a cambios en los flujos de efectivo, los costos y otros factores relevantes. Además, es recomendable utilizar múltiples herramientas y métodos de evaluación, como el VAN y el análisis de sensibilidad, para obtener una perspectiva más completa del proyecto (Colum, 2013; Vidaurri, 2013).

VII. CONCLUSIONES

Las nanoestructuras de sílice mesoporosa SBA-15 son un material prometedor para ser utilizado como soporte para inmovilizar bacterias promotoras del crecimiento vegetal; además de sus propiedades bioestimulantes, éstas mantienen la viabilidad bacteriana después de un año en almacenamiento, liberan las bacterias de manera controlada y sostenida durante un mes y son biodegradables en el suelo. Por lo anterior, aumenta la tasa de germinación, la longitud de raíz y el peso fresco en plantas de lechuga.

Es de suma importancia diseñar portadores de PGPB efectivos y accesibles que mejoren la viabilidad celular, para así reducir y/o reemplazar la utilización de agroquímicos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adesemoye, A. O., y Kloepper, J. W. (2009). Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2196-0>
- Ahemad, M., y Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ahmad, F., Ahmad, I., y Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>
- Ahmad, M., Zahir, Z. A., Asghar, H. N., y Asghar, M. (2011). Inducing salt tolerance in mung bean through coinoculation with rhizobia and plant-growthpromoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(7), 578–589. <https://doi.org/10.1139/w11-044>
- Ahmad, M., Zahir, Z. A., Khalid, M., Nazli, F., y Arshad, M. (2013). Efficacy of Rhizobium and Pseudomonas strains to improve physiology, ionic balance and quality of mung bean under salt-affected conditions on farmer's fields. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.11.024>
- Ahmad, M., Zahir, Z. A., Nazli, F., Akram, F., Arshad, M., y Khalid, M. (2013). Effectiveness of halo-tolerant, auxin producing Pseudomonas and Rhizobium strains to improve osmotic stress tolerance in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1341–1348. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000400045>
- Ahmadi, K., Razavi, B. S., Maharjan, M., Kuzyakov, Y., Kostka, S. J., Carminati, A., y Zarebanadkouki, M. (2018). Effects of rhizosphere wettability on microbial biomass, enzyme activities and localization to be published in: Rhizosphere. *Rhizosphere*, 7, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.06.010>
- Albareda, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Camacho, M., y Temprano, F. J. (2008). Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2771–2779. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.07.021>
- Araújo, B. R., Romão, L. P. C., Doumer, M. E., y Mangrich, A. S. (2017). Evaluation of the interactions between chitosan and humics in media for the controlled release of nitrogen fertilizer. *Journal of Environmental Management*, 190, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.059>
- Araujo, J., Díaz-Alcántara, C. A., Velázquez, E., Urbano, B., y González-Andrés, F. (2015). Bradyrhizobium yuanmingense related strains form nitrogen-fixing symbiosis with Cajanus cajan L. in Dominican Republic and are efficient biofertilizers to replace N fertilization. *Scientia Horticulturae*, 192, 421–428. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.009>
- Arora, M., Abdin, Z., y Varma, A. (2015a). *Plant growth promoting formulation of piriformospora indica and azotobacter chroococcum with talcum powder*. WO2015001575A1.
- Arora, M., Abdin, Z., y Varma, A. (2015b). *PLANT GROWTH PROMOTING FORMULATION OF PIRIFORMOSPOORA INDICA AND AZOTOBACTER CHROOCOCCUM WITH TALCUM POWDER*.
- Azeem, B., Kushaari, K., Man, Z. B., Basit, A., y Thanh, T. H. (2014). Review on materials y methods to produce controlled release coated urea fertilizer. *Journal of Controlled Release*, 181(1), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.02.020>
- Bahl, N., y Jauhri, K. S. (1987). Spent compost as a carrier for bacterial inoculant production. In *Developments in Crop Science* (Vol. 10). Elsevier B.V.

- <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-42747-2.50013-0>
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4), 729–770.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., y Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). *Plant and Soil*, 378(1–2), 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Bejarano, A., Sauer, U., Mitter, B., y Preininger, C. (2017). Parameters influencing adsorption of Paraburkholderia phytofirmans PsJN onto bentonite, silica and talc for microbial inoculants. *Applied Clay Science*, 141, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2017.02.022>
- Bekhit, M., Sánchez-González, L., Ben Messaoud, G., y Desobry, S. (2016). Encapsulation of Lactococcus lactis subsp. lactis on alginate/pectin composite microbeads: Effect of matrix composition on bacterial survival and nisin release. *Journal of Food Engineering*, 180, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.031>
- Bellenger, J. P., Xu, Y., Zhang, X., Morel, F. M. M., y Kraepiel, A. M. L. (2014). Possible contribution of alternative nitrogenases to nitrogen fixation by asymbiotic N₂-fixing bacteria in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 69, 413–420. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.11.015>
- Betancourt, D. A., Loveless, T. M., Brown, J. W., y Bishop, P. E. (2008). Characterization of diazotrophs containing Mo-independent nitrogenases, isolated from diverse natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), 3471–3480. <https://doi.org/10.1128/AEM.02694-07>
- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., y Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>
- Bhat, S. A., Singh, J., y Vig, A. P. (2018). Earthworms as Organic Waste Managers and Biofertilizer Producers. *Waste and Biomass Valorization*, 9(7), 1073–1086. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9899-8>
- Bhattacharjee, R. B., Singh, A., y Mukhopadhyay, S. N. (2008). Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: Prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(2), 199–209. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1567-2>
- Bhowmik, S. N., y Das, A. (2018). Biofertilizers: A Sustainable Approach for Pulse Production. In *Legumes for Soil Health and Sustainable Management*. Springer, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0253-4>
- Biswas, J. C., Ladha, J. K., y Dazzo, F. B. (2010). Rhizobia Inoculation Improves Nutrient Uptake and Growth of Lowland Rice. *Soil Science Society of America Journal*, 64(5), 1644. <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.6451644x>
- Bonkowski, M., y Clarholm, M. (2012). Stimulation of plant growth through interactions of bacteria and protozoa: Testing the auxiliary microbial loop hypothesis. *Acta Protozoologica*, 51(3), 237–247. <https://doi.org/10.4467/16890027AP.12.019.0765>
- Brahmaprakash, G. P., y Sahu, P. K. (2012). Biofertilizers for sustainability. *Journal of the Indian Institute of Science*, 92(1), 37–62.
- Breedt, G., Labuschagne, N., y Coutinho, T. A. (2017). Seed treatment with selected plant growth-promoting rhizobacteria increases maize yield in the field. *Annals of Applied Biology*, 171(2), 229–236. <https://doi.org/10.1111/aab.12366>
- Cai, Y., Qi, H., Liu, Y., y He, X. (2016). Sorption/Desorption Behavior and Mechanism of NH₄⁺ by Biochar as a Nitrogen Fertilizer Sustained-Release Material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(24), 4958–4964. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00109>

- Camerini, S., Senatore, B., Lonardo, E., Imperlini, E., Bianco, C., Moschetti, G., Rotino, G. L., Campion, B., y Defez, R. (2008). Introduction of a novel pathway for IAA biosynthesis to rhizobia alters vetch root nodule development. *Archives of Microbiology*, 190(1), 67–77. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0365-7>
- Campos, D. C., Acevedo, F., Morales, E., Aravena, J., Amiard, V., Jorquera, M. A., Inostroza, N. G., y Rubilar, M. (2014). Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(9), 2371–2378. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1662-8>
- Chaudhary, P., Khati, P., Chaudhary, A., Gangola, S., Kumar, R., y Sharma, A. (2021). Bioinoculation using indigenous *Bacillus* spp. improves growth and yield of *Zea mays* under the influence of nanozeolite. *3 Biotech*, 11, 1-12.
- Chen, C., Wei, L., Wu, M., Lv, G., Zhang, J., Li, X., y Pan, W. (2018). Effects of peat on the improvement of seed germination and seedling growth of *Cynodon dactylon*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(32), 32247-32257.
- Cherchali, A., Boukhelata, N., Kaci, Y., Abrous-Belbachir, O., y Djebbar, R. (2019). Isolation and identification of a phosphate-solubilizing *Paenibacillus polymyxa* strain GOL 0202 from durum wheat (*Triticum durum* Desf.) rhizosphere and its effect on some seedlings morphophysiological parameters. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19(March), 101087. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101087>
- Colum Gorgues, A. (2013). Evaluación de la rentabilidad de proyectos de inversión: aplicación a los sectores agrario y agroalimentario. Edicions de la Universitat de Lleida.
- Costa, F. M., Schiavo, J. A., Brasil, M. S., Leite, J., Xavier, G. R., y Fernandes, P. I. (2014). Phenotypic and molecular fingerprinting of fast growing rhizobia of field-grown pigeonpea from the eastern edge of the Brazilian Pantanal. *Genetics and Molecular Research*, 13(1), 469–482. <https://doi.org/10.4238/2014.January.21.16>
- Creus, C. M. (2017). Inoculantes microbianos: piezas de un rompecabezas que aún requiere ser ensamblado. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 207–209. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.07.001>
- da Silva, C. de F. B., Brito, T. L. de, Taniguchi, C. A. K., Lopes, L. A., Pinto, G. A. S., y Carvalho, A. C. P. P. de. (2018). Growth-promoting potential of bacterial biomass in the banana micropropagated plants. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 22(11), 782–787. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v22n11p782-787>
- de Moraes, A. C. P., Ribeiro, L. D. S., de Camargo, E. R., y Lacava, P. T. (2021). The potential of nanomaterials associated with plant growth-promoting bacteria in agriculture. *3 Biotech*, 11(7), 318.
- Deaker, R., Roughley, R. J., y Kennedy, I. R. (2004). Legume seed inoculation technology - A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1275–1288. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.04.009>
- Detroit, W. J. (1988). *CONTROLLED RELEASE FO* Jackson, A. M., Whipps, J. M., y Lynch, J. M. (1991). *Production, delivery systems, and survival in soil of four fungi with disease biocontrol potential*. *Enzyme and Microbial Technology*, 13(8), 636–642. <https://doi.org/10.1016/0141-02>
- Dhar, D. W., Prasanna, R., y Singh, B. V. (2007). Comparative performance of three carrier based blue green algal biofertilizers for sustainable rice cultivation. *Journal of Sustainable Agriculture*, 30(2), 41–50. https://doi.org/10.1300/J064v30n02_06
- Ding, Y., Liu, Y. X., Wu, W. X., Shi, D. Z., Yang, M., y Zhong, Z. K. (2010). Evaluation of biochar effects on nitrogen retention and leaching in multi-layered soil columns. *Water, Air, and Soil Pollution*, 213(1–4), 47–55. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0366-4>
- Díez-Pascual, A. M., Díez-Vicente, A. L., Simón, D., y Martínez, M. T. (2018). In situ

- encapsulation of bacteria into silica-based materials by sol-gel: toward biopersistent functional composites. *ACS Omega*, 3(1), 1027-1035.
- Disi, J. O., Kloepper, J. W., y Fadamiro, H. Y. (2018). Seed treatment of maize with *Bacillus pumilus* strain INR-7 affects host location and feeding by Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Journal of Pest Science*, 91(2), 515–522. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0927-z>
- Disi, J. O., Mohammad, H. K., Lawrence, K., Kloepper, J., y Fadamiro, H. (2019). A soil bacterium can shape belowground interactions between maize, herbivores and entomopathogenic nematodes. *Plant and Soil*, 83–92. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-03957-7>
- Donida, M. W., y Rocha, S. C. S. (2002). Coating of urea with an aqueous polymeric suspension in a two-dimensional spouted bed. *Drying Technology*, 20(3), 685–704. <https://doi.org/10.1081/DRT-120002824>
- Egamberdieva, D., Jabborova, D., y Berg, G. (2017). Synergistic interactions between *Bradyrhizobium japonicum* and the endophyte *Stenotrophomonas rhizophila* and their effects on growth, nodulation, and nutrition of soybean under salt stress. *Plant and Soil*, 405(1-2), 35-45.
- Ellis, T., Adie, T., y Baldwin, G. S. (2011). DNA assembly for synthetic biology: From parts to pathways and beyond. *Integrative Biology*, 3(2), 109–118. <https://doi.org/10.1039/c0ib00070a>
- Fages, J. (1992). An industrial view of *Azospirillum* inoculants: Formulation and application technology. *Symbiosis*, 13, 15–26.
- FAO. (2016). El estado mundial de la Agricultura y la Alimentación. In *Cambio Climático, Agricultura y Seguridad Alimentaria*.
- FAO. (2017). El estado mundial de la agricultura y alimentación. In *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura*. <https://doi.org/0251-1371>
- FAO, WFP, OPS, OMS, y UNICEF. (2018). *PANORAMA DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICIONAL EN AMERICA LATINA Y EL CARIBE 2018*.
- Finley, S. D., Broadbelt, L. J., y Hatzimanikatis, V. (2010). In silico feasibility of novel biodegradation pathways for 1, 2, 4-trichlorobenzene. *BMC Systems Biology*.
- Fravel, D. R. (1985). Encapsulation of Potential Biocontrol Agents in an Alginate-Clay Matrix. In *Phytopathology* (Vol. 75, Issue 7, p. 774). <https://doi.org/10.1094/phyto-75-774>
- Frische, T., Egerer, S., Matezki, S., Pickl, C., y Wogram, J. (2018). 5-Point programme for sustainable plant protection. *Environmental Sciences Europe*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0136-2>
- Gamalero, E., y Glick, B. R. (2011). Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. In D. Maheshwari (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management* (pp. 17–46). Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-21061-7>
- Giese, E. C., Silva, D. D. V., Costa, A. F. M., Almeida, S. G. C., y Dussán, K. J. (2020). Immobilized microbial nanoparticles for biosorption. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(5), 653–666. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1751583>
- Giri, K., Suyal, D. C., Mishra, G., Pandey, S., Kumar, R., Meena, D. K., y Rai, J. P. N. (2017). Biodegradation of Isoproturon by *Bacillus pumilus* K1 Isolated from Foothill Agroecosystem of North West Himalaya. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 87(3), 839–848. <https://doi.org/10.1007/s40011-015-0667-x>
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30-39.
- González, M. E., Cea, M., Medina, J., González, A., Diez, M. C., Cartes, P., Monreal, C., y Navia, R. (2015). Evaluation of biodegradable polymers as encapsulating agents for the development of a urea controlled-release fertilizer using biochar as support

- material. *Science of the Total Environment*, 505, 446–453. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.014>
- Grobelak, A., Kokot, P., Hutchison, D., Grosser, A., y Kacprzak, M. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria as an alternative to mineral fertilizers in assisted bioremediation - Sustainable land and waste management. *Journal of Environmental Management*, 227(August), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.075>
- Gutierrez-Mañero, F. J. G., Acero, N., Lucas, J. A., y Probanza, A. (1996). The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. *Plant and Soil*, 182(1), 67–74. <https://doi.org/10.1007/bf00010996>
- Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F. R., y Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111(2), 206–211. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x>
- Hale, L., Luth, M., y Crowley, D. (2015). Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite. *Soil Biology and Biochemistry*, 81, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.11.023>
- He, Y., Wu, Z., Ye, B., Wang, J., y Guan, X. (2016). Viability evaluation of alginate-encapsulated *Pseudomonas putida* Rs-198 under simulated salt-stress conditions and its effect on cotton growth. *European Journal of Soil Biology*, 75, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2016.05.002>
- He, Y., Wu, Z., Tu, L., y Shan, C. (2017). Effect of encapsulated *Pseudomonas putida* Rs-198 strain on alleviating salt stress of cotton. *Journal of plant nutrition*, 40(8), 1180-1189.
- Ibrahim, A. A., y Jibril, B. Y. (2005). Controlled release of paraffin wax/rosin-coated fertilisers. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44(7), 2288–2291. <https://doi.org/10.1021/ie048853d>
- Jackson, A. M., Whipps, J. M., y Lynch, J. M. (1991). Production, delivery systems, and survival in soil of four fungi with disease biocontrol potential. *Enzyme and Microbial Technology*, 13(8), 636–642. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90077-N](https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90077-N)
- Jayani, T., Sanjeev, B., Marimuthu, S., y Uthandi, S. (2020). Bacterial Cellulose Nano Fiber (BCNF) as carrier support for the immobilization of probiotic, *Lactobacillus acidophilus* 016. *Carbohydrate Polymers*, 250(August), 116965. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116965>
- Jennings, D. H. (1994). Translocation in Mycelia. In J. G. H. Wessels y F. Meingardt (Eds.), *The Mycota. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research* (Vol. 1, pp. 163–174). Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH.
- Joe, M. M., Karthikeyan, B., Chauhan, P. S., Shagol, C., Islam, M. R., Deiveekasundaram, M., y Sa, T. (2012). Survival of *Azospirillum brasilense* flocculated cells in alginate and its inoculation effect on growth and yield of maize under water deficit conditions. *European Journal of Soil Biology*, 50, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.03.002>
- Johansson, P., Nilsson, P., y Öberg, G. (2017). The natural organic matter in peat, humus, and soils: a review. *Soil Science*, 182(2), 63-79.
- Kader, M. A., Mian, M. H., y Hoque, M. S. (2002). Effects of *Azotobacter* Inoculant on the Yield and Nitrogen Uptake by Wheat. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 2(4), 259–261.
- Kamal, J., y Ashish, B. (2020). Development of Inorganic Carrier Based Bioformulation of *Sebacina Vermifera* and Its Evaluation on *Trigonella Foenumgraecum*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 11(2), 69–82. <https://doi.org/10.22376/ijpbs.2020.11.2.p69-82>

- Kaur, H., Sheoran, S., Kaur, R., Chaudhary, H., y Choudhary, O. P. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(3), 368-376.
- Khalid, A., Arshad, M., y Crowley, D. E. (2009). Biodegradation potential of pure and mixed bacterial cultures for removal of 4-nitroaniline from textile dye wastewater. *Water Research*, 43(4), 1110–1116. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.045>
- Khan, A., Sirajuddin, Zhao, X. Q., Javed, M. T., Khan, K. S., Bano, A., Shen, R. F., y Masood, S. (2016). *Bacillus pumilus* enhances tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) to combined stresses of NaCl and high boron due to limited uptake of Na⁺. *Environmental and Experimental Botany*, 124, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.12.011>
- Khan, M., Ahmad, E., Zaidi, A., y Oves, M. (2013). Functional Aspect of Phosphate-Solubilizing Bacteria: Importance in Crop Production. In D. K. Maheshwari, A. Aeron, y M. Saraf (Eds.), *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity* (pp. 237–263). Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4>
- Koch, M., Kruse, J., Eichler-Löbermann, B., Zimmer, D., Willbold, S., Leinweber, P., y Siebers, N. (2018). Phosphorus stocks and speciation in soil profiles of a long-term fertilizer experiment: Evidence from sequential fractionation, P K-edge XANES, and ³¹P NMR spectroscopy. *Geoderma*, 316(January 2017), 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.12.003>
- Kodama, Y., Yurimoto, H., y Watanabe, T. (2019). Recent advances in molecular techniques for stable isotope probing and functional metagenomics of active microorganisms in microbial communities. *Microbes and Environments*, 34(1), 1-11.
- Kour, D., Rana, K. L., Yadav, A. N., Yadav, N., Kumar, M., Kumar, V., Vyas, P., Dhaliwal, H. S., y Saxena, A. K. (2020). Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23(December 2019), 101487. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101487>
- Kukreti, B., Sharma, A., Chaudhary, P., Agri, U., y Maithani, D. (2020). Influence of nanosilicon dioxide along with bioinoculants on *Zea mays* and its rhizospheric soil. *3 Biotech*, 10, 1-11.
- Kulikova, N. A., Filippova, O. I., Volikov, A. B., y Perminova, I. V. (2018). Slow nitrogen release from humic substances modified with aminoorganosilanes. *Journal of Soils and Sediments*, 18(4), 1400–1408. <https://doi.org/10.1007/s11368-016-1507-1>
- Kumar, J., Banerjee, A., Rai, M., Naidu, R., Biswas, B., Vithanage, M., Chandra, M., Kumar, S., y Meers, E. (2018). *Geoderma Potential application of selected metal resistant phosphate solubilizing bacteria isolated from the gut of earthworm (Metaphire posthuma) in plant growth promotion*. 330(May), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.05.034>
- Lan, R., Liu, Y., Wang, G., Wang, T., Kan, C., y Jin, Y. (2011). Experimental modeling of polymer latex spray coating for producing controlled-release urea. *Particuology*, 9(5), 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2011.01.004>
- Li, X., Lei, Z., Qu, J., Li, Z., Zhou, X., y Zhang, Q. (2017). Synthesizing slow-release fertilizers via mechanochemical processing for potentially recycling the waste ferrous sulfate from titanium dioxide production. *Journal of Environmental Management*, 186, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.10.058>
- Li, Z., Xiao, C., Huang, W., Tian, X., Xiong, X., Yuan, P., ... y Xie, L. (2019). Beneficial rhizosphere colonization and growth promotion of wheat by endophytic actinobacteria are mediated by a phosphate transporter PhoP that plays a signaling role. *Microbiological Research*, 218, 10-19.
- Liffourrena, A. S., y Lucchesi, G. I. (2018). Alginate-perlite encapsulated *Pseudomonas*

- putida A (ATCC 12633) cells: Preparation, characterization and potential use as plant inoculants. *Journal of Biotechnology*, 278, 28-33.
- Liu, Y., Xu, L., Wang, Q., Zhu, X., Yu, Y., y Liu, X. (2020). Improved germination and growth performance of turfgrass using composite seed coating materials. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 206(2), 224-232.
- Lobo, C. B., Juárez Tomás, M. S., Viruel, E., Ferrero, M. A., y Lucca, M. E. (2019). Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. *Microbiological Research*, 219(November 2018), 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.012>
- Lopez-Perez, M., Rodriguez-Gomez, D., y Loera, O. (2015). Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: Current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(3), 334–341. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.857293>
- López, T., Guerrero-Martínez, A., y Pérez-Juste, J. (2019). Mesoporous silica nanoparticles for nanomedicine. *Nanomaterials*, 9(5), 677.
- Luckachan, G. E., y Pillai, C. K. S. (2011). Biodegradable polymers-a review on recent trends and emerging perspectives. *Journal of Polymers and the Environment*, 19, 637-676.
- Lupwayi, N. Z., Olsen, P. E., Sande, E. S., Keyser, H. H., Collins, M. M., Singleton, P. W., y Rice, W. A. (2000). Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Research*, 65(2–3), 259–270. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00091-X)
- Lv, G., Wei, L., Chen, C., Wu, M., Li, X., y Pan, W. (2019). Effects of SBA-15 on the promotion of seed germination and seedling growth of *Cynodon dactylon* under salt stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 68-76.
- Machuca, A., Pereira, G., Aguiar, A., y Milagres, A. M. F. (2007). Metal-chelating compounds produced by ectomycorrhizal fungi collected from pine plantations. *Letters in Applied Microbiology*, 44(1), 7–12. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02046.x>
- Magaña-López, E., Palos-Barba, V., Zuverza-Mena, N., Vázquez-Hernández, M. C., White, J. C., Nava-Mendoza, R., Feregrino-Pérez, A. A., Torres-Pacheco, I., y Guevara-González, R. G. (2022). Nanostructured mesoporous silica materials induce hormesis on chili pepper (*Capsicum annum* L.) under greenhouse conditions. *Heliyon*, 8(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09049>
- Malusá, E., y Vassilev, N. (2014). A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6599–6607. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>
- Manikandan, R., Saravanakumar, D., Rajendran, L., Raguchander, T., y Samiyappan, R. (2010). Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control*, 54(2), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.04.004>
- Mathews, A. S., y Narine, S. (2010). Poly[N-Isopropyl acrylamide]-co-Polyurethane copolymers for controlled release of urea. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 48(15), 3236–3243. <https://doi.org/10.1002/pola.24090>
- Mazid, M., y Khan, T. A. (2014). Future of Bio-fertilizers in Indian agriculture: An Overview. *International Journal of Agricultural and Food Research*, 3(3), 10–23. <https://doi.org/10.24102/ijaf.v3i3.132>
- Meftah Kadmiri, I., El Mernissi, N., Azaroual, S. E., Mekhzoum, M. E. M., Qaiss, A. E. K., y Bouhfid, R. (2021). Bioformulation of Microbial Fertilizer Based on Clay and Alginate Encapsulation. *Current Microbiology*, 78(1), 86–94. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02262-2>
- Mendoza-Labrador, J., Romero-Perdomo, F., Abril, J., Hernández, J. P., Uribe-Vélez, D., y Buitrago, R. B. (2021). *Bacillus* strains immobilized in alginate macrobeads enhance drought stress adaptation of guinea grass. *Rhizosphere*, 19, 100385.

- Meza Orozco, J. J. (2013). *Evaluación financiera de proyectos*. Ecoe Ediciones.
- Mishra, J., y Arora, N. K. (2016). Preface. In *Bioformulations for plant growth promotion and combating phytopathogens: a sustainable approach* (pp. 3–32). <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2779-3>
- Mishra, P. K., Mishra, S., Selvakumar, G., y Kundu, S. (2017). Enhanced Plant Growth Promotion by the Combination of the Phosphate-Solubilizing and Salt-Tolerant Rhizobacterium *Bacillus aryabhatai* with *Enterobacter* sp. LS1. *Clean Soil, Air, Water*, 45(6), 1700073.
- Mulder, W. J., Gosselink, R. J. A., Vingerhoeds, M. H., Harmsen, P. F. H., y Eastham, D. (2011). Lignin based controlled release coatings. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 915–920. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.02.011>
- Mumtaz, M. Z., Ahmad, M., Jamil, M., y Hussain, T. (2017). Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. *Microbiological Research*, 202(January), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.06.001>
- Murphy, J. F., Reddy, M. S., Ryu, C. M., Kloepper, J. W., y Li, R. (2003). Rhizobacteria-Mediated Growth Promotion of Tomato Leads to Protection Against Cucumber mosaic virus. *Phytopathology*, 93(10), 1301–1307. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2003.93.10.1301>
- Nakkeeran, S., Fernando, W. D., y Siddiqui, Z. A. (2006). Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. *PGPR: biocontrol and biofertilization*, 257-296.
- Nandimath, A. P., Karad, D. D., Gupta, S. G., y Kharat, A. S. (2017). Consortium inoculum of five thermo-tolerant phosphate solubilizing actinomycetes for multipurpose biofertilizer preparation. *Iranian Journal of Microbiology*, 9(5), 295–304.
- Narsico, J., Inoue, A., Oka, S., y Ojima, T. (2020). Production of a novel dimeric 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid by a PL-17 exolytic alginate lyase from *Hydrogenophaga* sp. UMI-18. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 525(4), 982-988.
- Nesme, T., Colombet, A., Vittecoq, M., y Hervo, M. (2018). Peat use in horticulture: Risks and opportunities—a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 38(1), 6.
- Niu, Y., y Li, H. (2012). Controlled release of urea encapsulated by starch-g-poly(vinyl acetate). *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 51(38), 12173–12177. <https://doi.org/10.1021/ie301684p>
- Novinscak, A., y Fillion, M. (2020). Long Term Comparison of Talc- and Peat-Based Phytobeneficial *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas synxantha* Bioformulations for Promoting Plant Growth. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(December), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.602911>
- Nutman, P. S. (1987). Centenary lecture. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 317(1184), 69–106. <https://doi.org/10.1098/rstb.1987.0049>
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., y Babalola, O. O. (2020). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(12), 1-15.
- Pacheco-Aguirre, J. A., Ruíz-Sánchez, E., Ballina-Gómez, H. S., y Alvarado-López, C. J. (2017). DOes polymer-based encapsulation enhance performance of plant growth promoting microorganisms? A meta-analysis view. *Agrociencia*, 51(2), 173–187.
- Pandey, C., y Negi, Y. K. (2018). *Potential of native cold tolerant plant growth promoting bacilli to enhance nutrient use efficiency and yield of Amaranthus hypochondriacus*. 307–320.
- Pandya, U., y Saraf, M. (2010). Application of fungi as a biocontrol agent and their biofertilizer potential in agriculture. *Research Journal of Biotechnology*, 5(3), 5–9.

- Panichikkal, J., Prathap, G., Nair, R. A., y Krishnankutty, R. E. (2021). Evaluation of plant probiotic performance of *Pseudomonas* sp. encapsulated in alginate supplemented with salicylic acid and zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.110>
- Parnell, J. J., Berka, R., Young, H. A., Sturino, J. M., Kang, Y., Barnhart, D. M., y Dileo, M. V. (2016). From the lab to the farm: An industrial perspective of plant beneficial microorganisms. *Frontiers in Plant Science*, 7(AUG2016), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01110>
- Pathak, D. V., y Kumar, M. (2016). Microbial Inoculants as Biofertilizers and Biopesticides. In *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives* (pp. 197–209). <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5>
- Patten, C. L., y Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3795–3801. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002>
- Perez, J. J., Francois, N. J., Maroniche, G. A., Borrajo, M. P., Pereyra, M. A., y Creus, C. M. (2018). A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 202, 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.084>
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., ... y Cubo, M. T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, 169(5-6), 325-336.
- Priest, F. G. (1993). Systematics and ecology of *Bacillus*. In *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology, and molecular genetics* (pp. 1–16).
- Quiroz-Sarmiento, V. F., Almaraz-Suarez, J. J., Sánchez-Viveros, G., Argumedo-Delira, R., y González-Mancilla, A. (2019). Biofertilizantes de rizobacterias en el crecimiento de plántulas de chile Poblano. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(8), 1733-1745.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., y Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*, 28(3), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>
- Ramakrishna, W., Yadav, R., y Li, K. (2019). Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. *Applied Soil Ecology*, 138(March), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.019>
- Ramesh, A., Sharma, S. K., Sharma, M. P., Yadav, N., y Joshi, O. P. (2014). Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus aryabhatai* strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in Vertisols of central India. *Applied Soil Ecology*, 73, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.08.009>
- Rana, A., Yadav, N., Kumar, V., Sharma, A., Sharma, S., y Thapa, N. (2021). Role of biofertilizers in sustainable agriculture: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 10(1), 3467-3478.
- Rasche, F., y Cadisch, G. (2013). The molecular microbial perspective of organic matter turnover and nutrient cycling in tropical agroecosystems - What do we know? *Biology and Fertility of Soils*, 49(3), 251–262. <https://doi.org/10.1007/s00374-013-0775-9>
- Rodrigues, E. P., Rodrigues, L. S., De Oliveira, A. L. M., Baldani, V. L. D., Teixeira, K. R. D. S., Urquiaga, S., y Reis, V. M. (2008). *Azospirillum amazonense* inoculation: Effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Soil*, 302(1–2), 249–261. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9476-1>
- Rose, M. T., Perkins, E. L., Saha, B. K., Tang, E. C. W., Cavagnaro, T. R., Jackson, W.

- R., Hapgood, K. P., Hoadley, A. F. A., y Patti, A. F. (2016). A slow release nitrogen fertiliser produced by simultaneous granulation and superheated steam drying of urea with brown coal. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0062-8>
- Rostami, A., Hinc, K., Goshadrou, F., Shali, A., Bayat, M., Hassanzadeh, M., Amanlou, M., Eslahi, N., y Ahmadian, G. (2017). Display of *B. pumilus* chitinase on the surface of *B. subtilis* spore as a potential biopesticide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 140, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.05.008>
- Rueda-Puente, E., Villegas-Espinoza, J., Gerlach-Barrera, L., Tarazón-Herrera, M., Murillo-Amador, B., García-Hernández, J., Preciado-Rangel, E., y Troyo-Diéguez, P. (2009). Effect of Inoculation of Plant Growth Promoting Bacteria on Germination of *Salicornia bigelovii*. *Terra Latinoamericana*, 27, 345–354.
- Saberi-Rise, R., y Moradi-Pour, M. (2020). The effect of *Bacillus subtilis* Vru1 encapsulated in alginate–bentonite coating enriched with titanium nanoparticles against *Rhizoctonia solani* on bean. *International journal of biological macromolecules*, 152, 1089–1097.
- Safari, M., Motamedi, E., Kari Dolatabad, H., y Modarres Sanavy, S. A. M. (2020). Nano-carriers effects on the viability and efficiency of *Pseudomonas* strains as phosphate solubilizing bacteria. *Heliyon*, 6(10), e05076. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05076>
- Sahu, P. K., y Brahma Prakash, G. P. (2016). Formulations of Biofertilizers – Approaches and Advances. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications*, 2, 179–198. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2644-4>
- Saleem, M., Law, A. D., y Moe, L. A. (2018). *Nicotiana* roots recruit rare rhizosphere taxa as major root-inhabiting microbes. *Microbiome*, 6(1), 1–18.
- Sangeetha, D., y Stella, D. (2012). Survival of plant growth promoting bacterial inoculants in different carrier materials. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*, 3(1), 170–178.
- Santos, J. M. M., Rodrigues, L. R., Rocha-Santos, T., Gomes, A. M., Freitas, A. C., y Duarte, A. C. (2019). Alginates: From food applications to nanotechnology practices. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 906–918.
- Saravanan, V. S., Madhaiyan, M., y Thangaraju, M. (2007). Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*, 66(9), 1794–1798. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.067>
- Schoebitz, M., Simonin, H., y Poncelet, D. (2012). Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads. *Journal of microencapsulation*, 29(6), 532–538.
- Shahriar, S. M. S., Mondal, J., Hasan, M. N., Revuri, V., Lee, D. Y., y Lee, Y. K. (2019). Electrospinning nanofibers for therapeutics delivery. *Nanomaterials*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/nano9040532>
- Sharma, A., Kashyap, P. L., Srivastava, A. K., Bansal, Y. K., y Kaushik, R. (2019). Isolation and characterization of halotolerant bacilli from chickpea (*Cicer arietinum* L.) rhizosphere for plant growth promotion and biocontrol traits. *European Journal of Plant Pathology*, 153(3), 787–800. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1592-7>
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., y Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(258), 3–14. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.12.3305-3307.1997>
- Shelton, J. F., Hertz-Picciotto, I., y Pessah, I. N. (2012). Tipping the balance of autism risk: Potential mechanisms linking pesticides and Autism. *Environmental Health Perspectives*, 120(7), 944–951. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104553>
- Shen, M., Xia, D., Yin, Z., Zhao, Q., y Kang, Y. (2018). *Bacillus pumilus* WP8 exhibits

- biocontrol efficacy against tomato bacterial wilt via attenuation of the virulence of the pathogenic bacterium. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 68(5), 379–387. <https://doi.org/10.1080/09064710.2017.1416663>
- Silva, W. O., Stamford, N. P., Silva, E. V. N., Santos, C. E. R. S., Dolores, A., Freitas, S., y Silva, M. V. (2016). The impact of biofertilizers with diazotrophic bacteria and fungi chitosan on melon characteristics and nutrient uptake as an alternative for conventional fertilizers. *Scientia Horticulturae*, 209, 236–240. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.027>
- Silva, W. O., Stamford, N. P., Silva, E. V. N., Santos, C. E. R. S., Freitas, A. D. S., y Silva, M. V. (2016). The impact of biofertilizers with diazotrophic bacteria and fungi chitosan on melon characteristics and nutrient uptake as an alternative for conventional fertilizers. *Scientia Horticulturae*, 209, 236–240. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.027>
- Singh, Mahendra., Dotaniya, M. L., Mishra, A., Dotaniya, C. K., Regar, K. L., y Lata, M. (2016). Role of biofertilizers in conservation agriculture. *Conservation Agriculture: An Approach to Combat Climate Change in Indian Himalaya*, 1–559. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2558-7>
- Singleton, P., Keyser, H., y Sande, E. (2002). Development and evaluation of liquid inoculants. *Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam*, 52–66.
- Sirajuddin, Khan, A., Ali, L., Chaudhary, H. J., Hussain Munis, M. F., Bano, A., y Masood, S. (2016). *Bacillus pumilus* alleviates boron toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) due to enhanced antioxidant enzymatic activity. *Scientia Horticulturae*, 200, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.024>
- Sivasakthivelan, P., y Saranraj, P. (2013). Azospirillum and its Formulations: A Review. *International Journal of Microbiological Research*, 4(3), 275–287. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2013.4.3.825>
- Škrlec, K., Zupančič, Š., Prpar Mihevc, S., Kocbek, P., Kristl, J., y Berlec, A. (2019). Development of electrospun nanofibers that enable high loading and long-term viability of probiotics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 136(January), 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.01.013>
- Smith, R. S. (1992). Legume inoculant formulation and application. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 485–492. <https://doi.org/10.1139/m92-080>
- Soumare, A., Boubekri, K., Lyamlouli, K., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., y Kouisni, L. (2020). From Isolation of Phosphate Solubilizing Microbes to Their Formulation and Use as Biofertilizers: Status and Needs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00425>
- Souza-Alonso, P., Rocha, M., Rocha, I., Ma, Y., Freitas, H., y Oliveira, R. S. (2021). Encapsulation of *Pseudomonas libanensis* in alginate beads to sustain bacterial viability and inoculation of *Vigna unguiculata* under drought stress. *3 Biotech*, 11(6), 293.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., y Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425–448.
- Stojanov, S., y Berlec, A. (2020). Electrospun Nanofibers as Carriers of Microorganisms, Stem Cells, Proteins, and Nucleic Acids in Therapeutic and Other Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00130>
- Sturm, R. N. (1973). Biodegradability of nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 50(5), 159–167.
- Tao, S., Liu, J., Jin, K., Xiaoyun, Q., Zhang, Y., Ren, X., y Hu, S. (2011). Preparation and Characterization of Triple Polymer-Coated Controlled-Release Urea With Water-Retention Property and Enhanced Durability. *Journal of Applied Polymer Science*, 120(4), 2103–2111. <https://doi.org/10.1002/app>

- Thompson, J. (1980). Production and quality control of legume inoculants. In F. J. Bergensen (Ed.), *Methods for evaluating biological nitrogen fixation* (Issue 17, pp. 489–533).
- Thuita, M., Vanlauwe, B., Mutegei, E., y Masso, C. (2018). Reducing spatial variability of soybean response to rhizobia inoculants in farms of variable soil fertility in Siaya County of western Kenya. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 261(December 2017), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.01.007>
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., y Aronsson, A.-C. (2017). Perspectives and Challenges of Microbial Application for Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049>
- Timmusk, S., Seisenbaeva, G., y Behers, L. (2018). Titania (TiO₂) nanoparticles enhance the performance of growth-promoting rhizobacteria. *Scientific Reports*, 8(1), 617.
- Vallet-Regí, M., Balas, F., y Arcos, D. (2007). Mesoporous materials for drug delivery. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(40), 7548-7558.
- Velázquez-Herrera, F. D., Lobo-Sánchez, M., y Fetter, G. (2022). LDH/SBA-15 nanocomposite containing nitrogen-fixing bacteria as an efficient biofertilizer. *Materials Today Communications*, 31, 103832.
- Vidaurri Aguirre, H. M. (2013). Ingeniería económica básica. Cengage Learning.
- Viera, W., Noboa, M., Bermeo, J., Báez, F., y Jackson, T. (2018). Parámetros de calidad de cuatro tipos de formulaciones a base de *Trichoderma asperellum* y *Purpuricillium lilacinum*. *Enfoque UTE*, 9(4), 145–153. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v9n4.348>
- Wang, X., Lü, S., Gao, C., Feng, C., Xu, X., Bai, X., Gao, N., Yang, J., Liu, M., y Wu, L. (2016). Recovery of Ammonium and Phosphate from Wastewater by Wheat Straw-based Amphoteric Adsorbent and Reusing as a Multifunctional Slow-Release Compound Fertilizer. In *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* (Vol. 4, Issue 4). <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01494>
- Wang, X., Xu, S., Wu, S., Feng, S., Bai, Z., Zhuang, G., y Zhuang, X. (2017). Effect of *Trichoderma viride* biofertilizer on ammonia volatilization from an alkaline soil in Northern China. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.016>
- Wang, Y., Li, J., y Chen, X. (2005). Biodegraded and polyurethane drape-formed urea fertilizer. *Journal Wuhan University of Technology, Materials Science Edition*, 20(2), 12–14. <https://doi.org/10.1007/bf02838477>
- Warren, G. P., Robinson, J. S., y Someus, E. (2009). Dissolution of phosphorus from animal bone char in 12 soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 84(2), 167–178. <https://doi.org/10.1007/s10705-008-9235-6>
- Win, K., Oo, A., Ohkama-Ohtsu, N., y Yokoyama, T. (2018). *Bacillus Pumilus* Strain TUAT-1 and Nitrogen Application in Nursery Phase Promote Growth of Rice Plants under Field Conditions. *Agronomy*, 8(10), 216. <https://doi.org/10.3390/agronomy8100216>
- Wu, L., y Liu, M. (2008). Preparation and characterization of cellulose acetate-coated compound fertilizer with controlled-release and water-retention. *Polymers for Advanced Technologies*, 19, 785–792. <https://doi.org/10.1002/pat>
- Xavier, I. J., Holloway, G., y Leggett, M. (2004). Development of Rhizobial Inoculant Formulations. *Crop Management*, 3(1), 1–6. <https://doi.org/10.1094/cm-2004-0301-06-rv>
- Xie, Z., Chu, Y., Zhang, W., Lang, D., y Zhang, X. (2019). *Bacillus pumilus* alleviates drought stress and increases metabolite accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Environmental and Experimental Botany*, 158(November 2018), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.021>
- Yasmin, S., Hafeez, F. Y., Schmid, M., y Hartmann, A. (2013). Plant-beneficial

- rhizobacteria for sustainable increased yield of cotton with reduced level of chemical fertilizers. *Pakistan Journal of Botany*, 45(2), 655–662.
- Young, C.C., Rekha, P.D., Lai, W.-A. and Arun, A.B. (2006), Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. *Biotechnol. Bioeng.*, 95: 76-83. <https://doi.org/10.1002/bit.20957>
- Yu, Z., Wang, J., Zhang, J., y Yin, Y. (2021). Effects of low temperature storage on the viability and physiological properties of *Lactobacillus acidophilus* during freeze-drying. *Cryobiology*, 101, 153-160.
- Zaeim, D., Sarabi-Jamab, M., Ghorani, B., Kadkhodae, R., y Tromp, R. H. (2017). Electro spray assisted fabrication of hydrogel microcapsules by single- and double-stage procedures for encapsulation of probiotics. *Food and Bioprocess Technology*, 102, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.01.004>
- Zago, S. L., Santos, M. F. D., Konrad, D., Fiorini, A., Rosado, F. R., Missio, R. F., y Vendruscolo, E. C. G. (2019). Shelf life of *Azospirillum brasilense* in alginate beads enriched with trehalose and humic acid. *Journal of Agricultural Science*, 11(6), 269.
- Zhang, F., Su, X., Chen, Y., Wan, Y., y Li, Y. (2021). Promotion effects of *Rhizobium meliloti* on alfalfa growth under salt stress. *Applied Soil Ecology*, 166, 104048.
- Zhang, H., Wu, X., Li, G., y Qin, P. (2011). Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing fungus (*Mortierella* sp.) and their effects on *Kosteletzkya virginica* growth and enzyme activities of rhizosphere and bulk soils at different salinities. *Biology and Fertility of Soils*, 47(5), 543–554. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0563-3>
- Zhang, J., Wang, J., Wang, G., Cui, X., y Zhou, L. (2018). Mesoporous silica nanoparticles as carriers for intracellular delivery of nucleic acids and subsequent therapeutic applications. *Molecules*, 23(3), 729.
- Zhang, L., Liu, Y., y Hao, L. (2016). Contributions of open crop straw burning emissions to PM2.5 concentrations in China. *Environmental Research Letters*, 11(1). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/11/1/014014>
- Zhang, S., Yang, Y., Gao, B., Wan, Y., Li, Y. C., y Zhao, C. (2016). Bio-based Interpenetrating Network Polymer Composites from Locust Sawdust as Coating Material for Environmentally Friendly Controlled-Release Urea Fertilizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(28), 5692–5700. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01688>
- Zhang, Y., Huang, Y., Wei, X., Jiang, H., Yuan, Q., y Feng, H. (2020). The effects of different mesoporous silicas on the promotion of growth and nutrient uptake of cucumber seedlings colonized by plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(1), 151-164.

IX. ANEXOS