

10

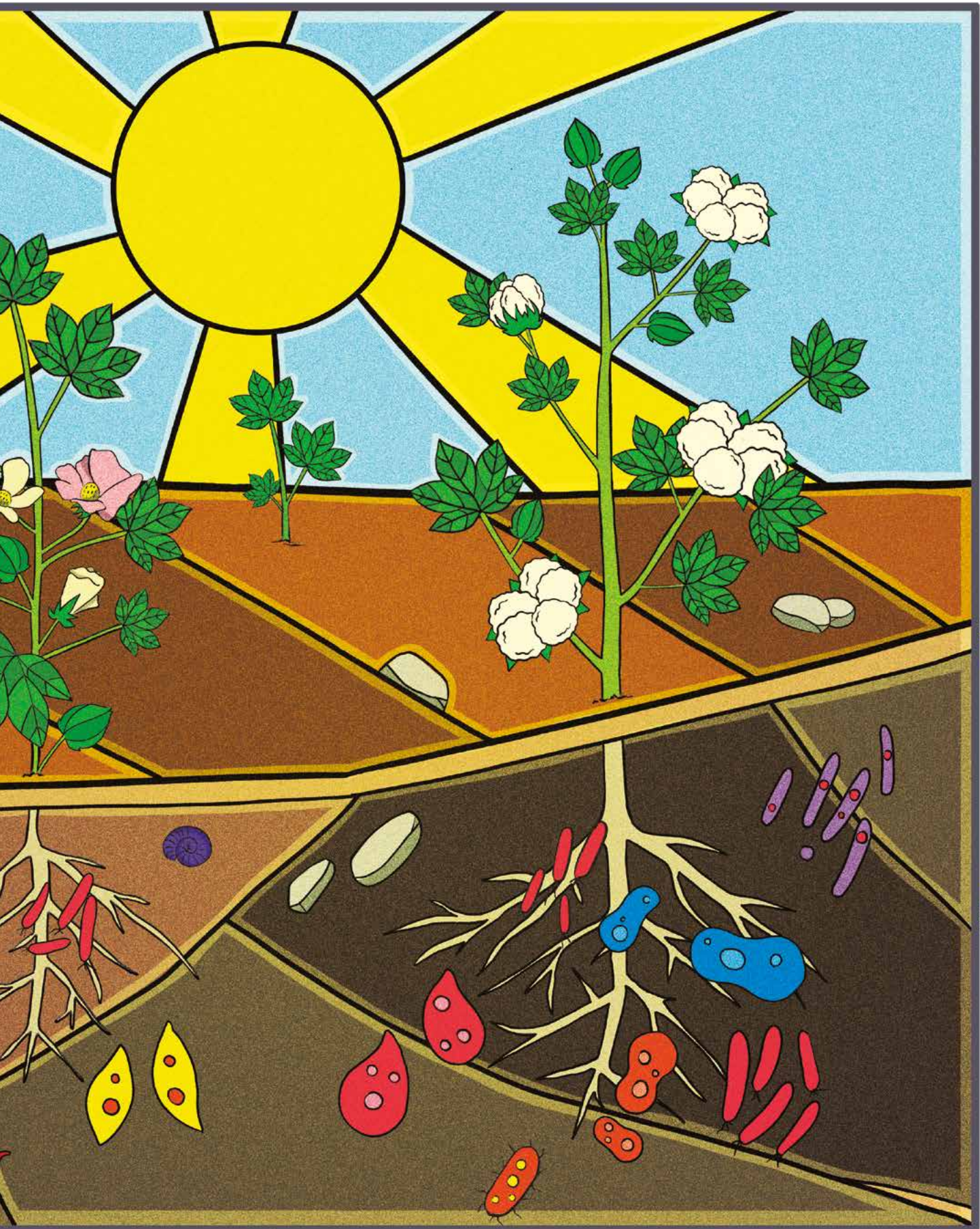
Experiencia AGROSAVIA en Algodón (*Gossypium hirsutum*)

Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el cultivo bajo condiciones de invernadero

Felipe Andrés Romero Perdomo¹
Ever Mauricio Barón Guaquetá¹
Ruth Rebeca Bonilla Buitrago¹

1. Sistemas Agropecuarios Sostenibles. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA. Centro de Investigación Tibaitatá. Cundinamarca. Colombia.







Introducción

El algodón es el producto agrícola no alimentario más importante del mundo. Es producido en un gran número de países —alrededor de 100—, pero los principales productores en el periodo 2019-2020 fueron India (23,1 % del mercado), China (22,1%), Estados Unidos (17,5%), Brasil (9,5%) y Paquistán (6,4%). Se cultiva principalmente por su fibra, que se utiliza universalmente como materia prima de productos textiles, la cual genera divisas del orden de USD 20-30 billones por su comercialización (Gallegos-Cedillo, 2019). Adicionalmente, sus semillas contienen un 24 % de proteína y un 15 % de aceite, que se emplea para fabricar margarinas, aceites comestibles, jabones, pinturas, entre otros productos, y su cáscara se emplea como fertilizante. Por otro lado, la pelusa que resta en las semillas después del desmote, las motas (semillas no desarrolladas) y los residuos fibrosos se emplean en la producción de fieltros, colchones

y tapicerías, o como materia prima en las industrias papeleras o para materiales explosivos (Westcott, 2010).

En América Latina y el Caribe, un 80 % de la producción de algodón la realizan agricultores familiares. Este cultivo se ha transformado en el sustento de millones de agricultores y sus familias, al generarles empleo e ingresos, además de que contribuye en gran medida a la seguridad alimentaria, especialmente en países en desarrollo. Respecto a Colombia, el cultivo del algodón siempre se ha destacado en los departamentos de Córdoba, Cesar y Tolima, y ha ocupado el segundo lugar en exportación después del café. En la última década, se han presentado disminuciones en las áreas cosechadas y en los rendimientos, con una producción total de fibra de algodón mayor a 23.000 toneladas a nivel nacional (Campuzano-Duque & Buenaventura-Baron, 2020).

Desarrollo de la investigación

En el Centro de Investigación (ci) Motilonia, que pertenecía al Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), se centró la investigación en el algodón, cuando Agustín Codazzi (Cesar) era la ciudad blanca de Colombia. Alrededor de este cultivo estaban especialistas a nivel de doctorado y maestría, en todas las áreas del conocimiento. Fue hacia 2002 cuando la Confederación Colombiana del Algodón (Conalgodón) manifestó que uno de los problemas sentidos por los productores algodoneros era el costo del rubro de fertilización, el cual hacía insostenible el cultivo, por lo que los investigadores iniciaron estudios junto con el doctor René Novo, investigador cubano experto en microbiología de suelos, específicamente en bacterias fijadoras de nitrógeno, a partir de aislamientos de bacterias promotoras del crecimiento vegetal que pudieran complementar parcialmente la fuente de nitrógeno de las plantas sin afectar su rendimiento.

Microorganismos y condiciones de medio de cultivo

Un total de 25 bacterias fijadoras de nitrógeno fueron aisladas de la rizósfera de suelos algodoneros del departamento del Cesar, Colombia. Con base en los resultados obtenidos de experimentos realizados en invernadero en varias de estas especies vegetales, se seleccionaron las cepas *Rhizobium* sp. AC1 y *Agrobacterium pusense* AC10 para ser estudiadas como candidatas a ser el principio activo de un posible biofertilizante. Se iniciaron estudios en el medio de cultivo Ashby, pero su costo y su producción convencional no eran factibles para un futuro escalamiento, por lo que se hizo necesario buscar alternativas para estandarizar un medio de cultivo y un proceso de fermentación específicos. Luego de varios estudios, se seleccionaron las condiciones que optimizaban el crecimiento de las cepas a nivel nutricional, con el medio de cultivo (Moreno et al., 2011), así como las condiciones fisicoquímicas para la producción en un biorreactor (Camelo-Rusique et al., 2017). Adicionalmente, se realizaron varias investigaciones para optimizar la conservación de la viabilidad celular: -80 °C en 50 % (v/v) de glicerol (Rojas-Tapias et al., 2013).

Caracterización *in vitro* de actividades metabólicas relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal de las cepas en estudio

Se llevó a cabo una caracterización bajo condiciones *in vitro* de los mecanismos metabólicos relacionados con la promoción del crecimiento vegetal de las cepas AC1 y AC10. Las actividades evaluadas fueron: fijación de nitrógeno (Eckert et al., 2001), solubilización de nutrientes como fósforo (De Bolle et al., 2013), producción de la enzima ACC-desaminasa (Honma & Shimomura, 1978), síntesis de compuestos indólicos (AIA) (Bradford, 1976; Glickmann & Dessaux, 1995), producción de sideróforos (Schwyn & Neilands, 1987) y síntesis de enzimas como proteasas, quitinasas pectinasas, celulasas, amilasas y ureasas (Cappuccino & Sherman, 2005). Cada ensayo se realizó por triplicado y fue repetido dos veces.

Los resultados revelaron que cada cepa exhibe más de un mecanismo de promoción del crecimiento vegetal. Se

observó que AC1 y AC10 son capaces de fijar nitrógeno mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA), la cual registró valores entre 1.033 y 1.408 nmol de etileno $\text{mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ (tabla 10.1). Con respecto a la solubilización de nutrientes, se evidenció que los microorganismos tienen la habilidad de solubilizar fósforo a partir de fosfato tricálcico a pH de 7,5 y fosfato de hierro a pH de 5,0. Este resultado mostró que las cepas AC1 y AC10 son más eficientes en la solubilización de fosfato tricálcico (Ca-P) que de fosfato de hierro (Fe-P). La solubilización de fosfato está asociada al aumento en la disponibilidad de fósforo en el suelo, posiblemente dado por la secreción bacteriana de ácidos orgánicos o agentes quelantes en el medio de crecimiento (Panhwar et al., 2014). Sin embargo, se observaron resultados negativos en la solubilización de potasio de moscovita y biotita.

■ Tabla 10.1. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de AC1 y AC10

Fuente: Elaboración propia

1	AC1	2	AC10
	Actividad nitrogenasa:		Actividad nitrogenasa:
	• Ensayo de reducción de acetileno (ara) (nmol de etileno $\text{mL}^{-1} \text{h}^{-1}$): 68,01		• Ensayo de reducción de acetileno (ara) (nmol de etileno $\text{mL}^{-1} \text{h}^{-1}$): 45,32
	Solubilización: P (mg de $\text{PO}_4^{3-} \text{mL}^{-1}$)		Solubilización: P (mg de $\text{PO}_4^{3-} \text{mL}^{-1}$)
	• Fosfato tricálcico (Ca-P): $1.408 \pm 95,57$		• Fosfato tricálcico (Ca-P): $1.033,83 \pm 47,75$
	• Fosfato de hierro (Fe-P): $76,33 \pm 12,14$		• Fosfato de hierro (Fe-P): $75,50 \pm 15,71$
	Fitoestimulación:		Fitoestimulación:
	• Compuestos indólicos (mg de indol mg proteína^{-1}): $0,16 \pm 0,01$		• Compuestos indólicos (mg de indol mg proteína^{-1}): $0,18 \pm 0,01$
	Producción:		Producción:
	• Sideróforos (+/-): -		• Sideróforos (+/-): -

Nota: Los datos se presentan como error estándar de la media. Las medias y los errores estándar son el resultado de al menos tres repeticiones por análisis bioquímico, y los resultados son representativos de dos experimentos independientes. (+/-) indica presencia/ausencia de la actividad.



Los resultados también demostraron que ninguna de las cepas fue capaz de producir complejos sideróforos de hierro en agar CAS. Los microorganismos fueron capaces de producir compuestos indólicos (AIA) en presencia de L-triptófano. El AIA es la auxina fisiológicamente más activa en plantas involucradas en el agrandamiento y división celular, la diferenciación de tejidos y las respuestas a la luz y la gravedad (Sukumar et al., 2013). Por último, se observó producción de enzimas hidrolíticas, como proteasas, ureasas y pectinasas (tabla 10.2). Estas características bacterianas confieren capacidad de inhibir fitopatógenos o competir contra el suelo y poblaciones microbianas, ya que sus paredes celulares se degradarán por enzimas extracelulares, y también contribuyen en el proceso de mineralización de nutrientes (Pereira & Castro, 2014).

■ **Tabla 10.2.** Síntesis de enzimas hidrolíticas
Fuente: Elaboración propia

1	AC1	Proteasas (+/-): +	Alfa-amilasas (+/-): -
		Celulasas (+/-): -	Quitinasas (+/-): -
		Pectinasas (+/-): -	Ureasas (+/-): +
2	AC10	Proteasas (+/-): +	Alfa-amilasas (+/-): +
		Celulasas (+/-): -	Quitinasas (+/-): -
		Pectinasas (+/-): +	Ureasas (+/-): +

Nota: (+/-) indica presencia/ausencia de la actividad.

Al saber las principales capacidades metabólicas de AC1 y AC10 que están relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal, se llevaron a cabo experimentos en Agustín Codazzi (Cesar), Aguachica (Cesar) y El Espinal (Tolima), durante varios años, para consolidar las condiciones de aplicación y el efecto de estas dos cepas (producto Monibac) sobre el desarrollo del algodón.

Antes de establecer los experimentos, se realizaron las pruebas de compatibilidad con los agroquímicos que usualmente se utilizan en este cultivo (tabla 10.3).

A continuación, se describe a manera de información uno de los últimos experimentos realizados a nivel de invernadero y de campo.

■ **Tabla 10.3.** Compatibilidad de Monibac con los agroquímicos utilizados en el cultivo del algodón

<p>1 Fungicida Producto: Vitavax Ingredientes activos: Carboxina y tiram Dosis de aplicación: 200 g 100 kg de semilla⁻¹ L de agua⁻¹ Compatibilidad con Monibac*: +</p>	<p>Producto: Carbovax Ingredientes activos: Carboxina y tiram Dosis de aplicación: 100 mL 100 kg de semilla⁻¹ L de agua⁻¹ Compatibilidad con Monibac*: +</p>
<p>2 Insecticida Producto: Gaucho Ingredientes activos: Imidacloprid Dosis de aplicación: 0,2 L 100 kg de semilla⁻¹ L de agua⁻¹ Compatibilidad con Monibac*: +</p>	<p>Producto: Cipermetrina Ingredientes activos: Cipermetrina Dosis de aplicación: 0,5 L 100 kg de semilla⁻¹ L de agua⁻¹ Compatibilidad con Monibac*: -</p>
<p>3 Herbicida Producto: Dual Ingredientes activos: Metolaclopro Dosis de aplicación: 1,5 L ha⁻¹ 200 L de agua⁻¹ Compatibilidad con Monibac*: + Producto: Cottonex Ingredientes activos: Fluometuron Dosis de aplicación: 2 L ha⁻¹ 200 L de agua⁻¹</p>	<p>Compatibilidad con Monibac*: + Producto: Roundup Ingredientes activos: Glifosato Dosis de aplicación: 4 L ha⁻¹ 400 L de agua⁻¹ Compatibilidad con Monibac*: +</p>

* Compatibilidad obtenida hasta las 24 horas de secado, a 30 °C, con una viabilidad celular mayor a 1×10^8 UFC mL⁻¹. Para los demás plaguicidas, no disminuyó la viabilidad celular en el periodo evaluado (48 horas), a excepción de la cipermetrina.

Fuente: Elaboración propia

Influencia bacteriana sobre el desarrollo del algodón

Se estableció un experimento en invernadero en el CI Motilonia de AGROSAVIA (Agustín Codazzi) para determinar si la inoculación con AC1 y AC10 podría permitir reducir la fertilización mineral en algodón.

El experimento fue llevado a cabo en un diseño completamente al azar con seis tratamientos. Cada experimento se realizó tres veces, con seis réplicas. Las dosis de los fertilizantes fueron del 100, 75 y 50 % (p/v) de urea (producto Ecofértil, Colombia) con respecto a la aplicación recomendada, cada una acompañada con un porcentaje de fosfato diamónico (DAP) (producto Nutrimon, Colombia) y con el 100 % de KCl (producto Diabonos, Colombia), como fuentes de N, P y K, respectivamente. El 100 % del fertilizante correspondió a 75 kg ha⁻¹ (~2,34 g por maceta) para urea, 50 kg ha⁻¹ (~1,56 g por maceta) para DAP y 50 kg ha⁻¹ (~1,56 g por maceta) para KCl. Los tratamientos biológicos fueron AC1, AC10 y AC1+AC10 (1:1), y sin inoculación bacteriana (caldo MBR estéril). En todos los casos, los tratamientos biológicos se aplicaron junto con un 50 % de urea, DAP y KCl. El suelo utilizado fue recolectado de cultivos de algodón del CI Motilonia. Las propiedades químicas y físicas del suelo fueron las siguientes: pH: 7,15; materia orgánica: 3,02 %; coeficiente de intercambio catiónico efectivo: 15,23 cmol kg⁻¹; P: 215,93 ppm; S: 15,08 ppm; Ca: 13,37 cmol kg⁻¹; Mg: 1,8 cmol kg⁻¹; K: 0,63 cmol kg⁻¹; Na: 0,05 cmol kg⁻¹; Fe: 38,5 ppm; Mn: 2,2 ppm; Cu: 1,7 ppm. Las semillas del algodón fueron inoculadas (~4 × 10⁸ UFC mL⁻¹ semilla⁻¹) mediante remojo con 10 mL de inóculo o MBR estéril, dependiendo del tratamiento, durante 30 minutos, y sembradas en materas con capacidad de 600 g de suelo. 5 mL de cada inóculo bacteriano se volvieron a aplicar en la rizósfera, por tratamiento, después de 20 y 40 días de establecimiento, acorde con el periodo de tiempo en que se realizaron las aplicaciones de urea. Las condiciones del invernadero fueron 25-35 °C, un régimen 16/8 día-noche y aplicación diaria de agua. Después de 90 días, en la etapa de floración, se midió la longitud de la raíz y de la parte aérea de las plantas. Las muestras se secaron a 50 °C durante 72 días, y posteriormente se midieron la biomasa seca de las cápsulas, la parte aérea y la raíz. Además, el contenido de nitrógeno se estimó sobre el tejido vegetal en el Laboratorio Integral de Servicios para el Sector Agroalimentario (Lissalab), de AGROSAVIA. El análisis estadístico se realizó con Anova ($\alpha=0,05$) y la prueba de Tukey. Las asociaciones entre variables fueron examinadas con un análisis de correlación simple. Estos análisis y los gráficos se realizaron con el *software* GraphPad Prism 7.

Los resultados mostraron que la inoculación con bacterias causó un aumento significativo ($p < 0,05$) en el crecimiento de las plantas en comparación con los controles (Figura 10.1). Por ejemplo, cuando la concentración del fertilizante químico fue del 50 % de la dosis recomendada, se observó que la inoculación con AC1, AC10 y AC1 + AC10 aumentó significativamente ($p < 0,05$) la longitud de la parte aérea de las plantas en 9, 7 y 38 %, y la longitud de la raíz en 6, 16 y 32 %, respectivamente. En cuanto a biomasa seca, la raíz, la parte aérea y la cápsula mejoraron significativamente ($p < 0,05$), al ~13, 20 y 25 %, respectivamente.

Respecto al contenido de N, la aplicación microbiana condujo a un ligero aumento en su contenido, y las mejoras significativas en el contenido de este elemento por las bacterias solo se exhibieron con la inoculación mixta, lo que indica que la inoculación bacteriana tiene una mayor influencia en la biomasa vegetal con respecto al contenido de N. Los hallazgos actuales sugieren que la interacción entre plantas y bacterias podría mejorar la eficiencia en el uso de los nutrientes del fertilizante o que la inoculación

bacteriana podría beneficiar directamente el crecimiento de las plantas. Es importante tener en cuenta que el efecto de AC1 fue mayor en la parte aérea que en las raíces, mientras que con AC10 la respuesta fue mejor en estas. Además, se observó una correlación positiva ($R = 0,65$) entre la longitud de la raíz y el contenido de N en el tejido de toda la planta, únicamente cuando estaba presente AC10. Esto nos permite deducir que un aumento en la longitud de la raíz podría contribuir a una mayor tasa de N en la planta.

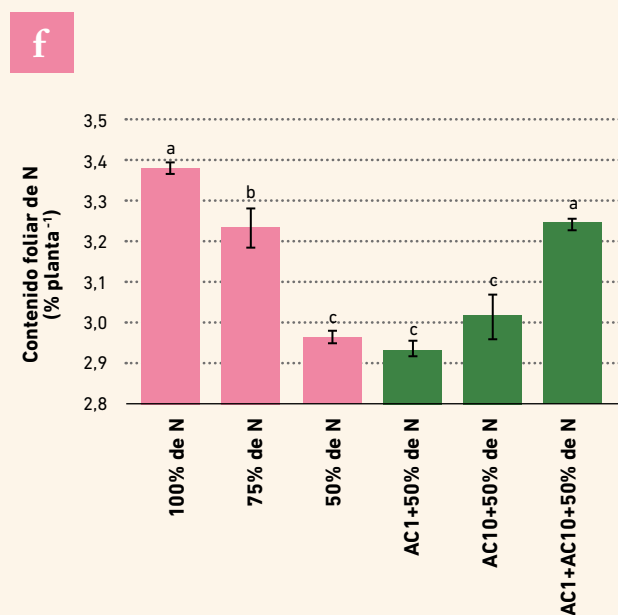
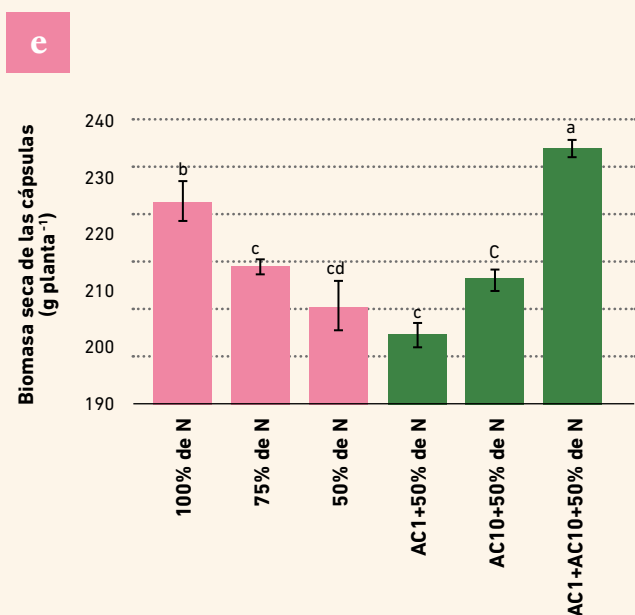
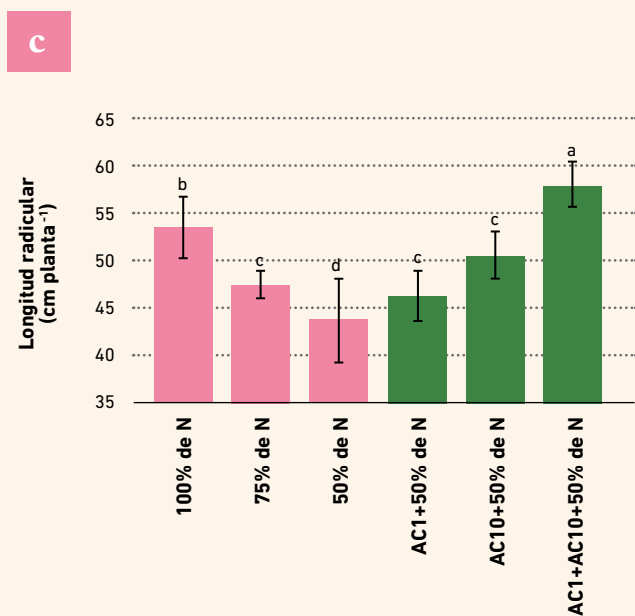
■ **Figura 10.1.** Influencia de la inoculación y la coinoculación de AC1 y AC10 con diferentes dosis de urea en el crecimiento del cultivo de algodón.

Fuente: Elaboración propia



En este experimento también se observó que la inoculación mixta con AC1 y AC10 aumentó el crecimiento de la planta con respecto a las inoculaciones simples (Figura 10.2). De hecho, se evidenció un aumento que oscila entre el 8 y el 53% en todos los parámetros de crecimiento de las plantas, lo que sugiere que la coinoculación microbiana tiene un mayor potencial para promover el crecimiento en estas (Figura 10.1). Este resultado podría explicarse por una contribución positiva y aditiva de cada microorganismo en comparación con las inoculaciones individuales. Cabe destacar que otros

investigadores han observado resultados similares cuando se utilizan coinoculaciones bacterianas para promover el crecimiento de las plantas. Sin embargo, Rojas-Tapias et al. (2014) informaron que la coinoculación no condujo a ningún efecto adicional en comparación con las inoculaciones individuales de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, al estudiar el crecimiento del maíz, aunque esta observación contrastante podría estar asociada a la relación intrínseca entre las diferentes especies de plantas y bacterias y las propiedades químicas y físicas del suelo.



Capítulo 10. Experiencia AGROSAVIA en Algodón (*Gossypium hirsutum*)

Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el cultivo bajo condiciones de invernadero

■ **Figura 10.2.** Experimento en invernadero.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Por último, se evidenció que la coinoculación más un 50 % de urea causó un efecto significativo en el crecimiento del algodón en comparación con el 75 y el 50 % de la fertilización mineral, respectivamente. Además, se observó que el 100 % de la fertilización y el 50 % de la fertilización + la coinoculación bacteriana produjeron resultados similares, sin estadísticas diferentes, en presencia de la coinoculación más la mitad de las dosis de urea; la promoción de la longitud, la biomasa seca de la parte aérea y la biomasa seca de la cápsula fue del 10, el 9 y el 5 % con respecto a la fertilización completa, respectivamente. Por el contrario, la longitud de la raíz y el contenido de N fueron mayores con tasas de urea completas, en un 0,6 y un 4 %, respectivamente. Esta observación sugiere que la coinoculación con AC1 y AC10 reemplaza parcialmente las dosis normales de fertilización nitrogenada, lo que significa que es posible una reducción de $1,17 \text{ g materia de urea}^{-1}$ o de $37,5 \text{ kg ha de urea}^{-1}$, debido a la fertilización biológica. Pereg y McMillan (2015) informaron hallazgos similares y describieron que los géneros bacterianos más utilizados para aumentar la eficiencia de los fertilizantes químicos son *Azospirillum* sp., *Methylobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y la combinación de *Azotobacter*

chroococcum con hongos micorrízicos arbusculares, con resultados comparables en el crecimiento, el rendimiento y la calidad de la fibra con respecto al programa completo de fertilización.

Como conclusión, la coinoculación de las cepas AC1 y AC10 permite reducir las dosis de fertilización nitrogenada hasta en un 50 % en el cultivo de algodón en condiciones de invernadero. Los análisis bioquímicos mostraron que ambas cepas poseen múltiples actividades metabólicas de promoción del crecimiento vegetal que indirectamente podrían explicar los resultados observados. Aunque nuestro trabajo no establece si los mecanismos bacterianos fueron responsables del efecto positivo de la coinoculación, sí proporciona un punto de partida para futuras investigaciones, en las cuales las herramientas moleculares en diferentes vías metabólicas permitirán discernir los mecanismos asociados a los resultados reportados aquí. Consideramos que una reducción en la cantidad de agroquímicos utilizados en el cultivo de algodón es primordial para reducir su impacto negativo en los aspectos ambiental, social y económico, por lo que es una verdadera contribución para mitigar el cambio climático



Caso de estudio de AGROSAVIA bajo condiciones de campo: inoculante microbiano para reducir la fertilización mineral nitrogenada en la producción de algodón

Los resultados evidenciados con la coinoculación de las cepas AC1 y AC10 sobre el crecimiento del algodón en invernadero mostraron un potencial biofertilizante de reducir hasta en un 50 % la fertilización nitrogenada, lo que permitió continuar con estudios en campo para corroborar dichos efectos positivos hasta la producción del cultivo.

Microorganismos y condiciones de cultivo

Las cepas AC1 y AC10 fueron suministradas por el Banco de Germoplasma de AGROSAVIA. Los microorganismos fueron reactivados en medio sólido LG (composición en g L⁻¹: 20 de sacarosa, 0,05 de fosfato dibásico de potasio, 0,15 de fosfato monobásico de potasio, 0,02 de cloruro de calcio, 0,2 de sulfato de magnesio heptahidratado, 0,002 de molibdato de sodio, 0,01 de cloruro férrico, 1 de carbonato de calcio, 5 mL de azul de bromotimol y a un pH de 7) y llevados a incubación a 30 ± 2 °C durante 48 horas. Posteriormente, se generó un preinóculo en medio MBR (Moreno et al., 2011) como cultivo *overnight* a 30 ± 2 °C y a 200 rpm por 24 horas. Los microorganismos fueron multiplicados mediante fermentaciones discontinuas por separado en medio MBR en un biorreactor de 5L, estableciendo condiciones de 500 rpm, 1 vvm y 30 ± 2 °C

durante 24 horas. Finalmente, el consorcio bacteriano se preparó mezclando volúmenes de ambas cepas ajustadas a una concentración aproximada de 10⁸ UFC mL⁻¹ en relación 1:1.

Ubicación y diseño experimental

El experimento se llevó a cabo en el departamento de Valle del Cauca (Colombia), en el CI Palmira de AGROSAVIA, en el municipio de Palmira, a una altura de 1.200 m s. n. m., a una temperatura media anual de 23 °C, una humedad relativa del 75 % y una precipitación de 2.000-2.100 mm totales anuales. Su objetivo fue evaluar la eficacia de una formulación líquida optimizada del inoculante a base de las cepas AC1 y AC10.

Los tratamientos se implementaron, y la información se tomó hasta la finalización del cultivo (140 días). Se empleó un arreglo factorial ampliado de 2 × 2, donde el primer factor fue la dosis de la fertilización en forma de urea (75 y 50 %), y el segundo factor fue la aplicación biológica en dos presentaciones: control comercial Monibac en turba y AC1+AC10 en consorcio líquido. Un tratamiento con fertilización completa (100 %) fue

el control positivo empleado, lo que dio en total cinco tratamientos evaluados. En todos los tratamientos fue aplicada la fertilización mineral base de los demás elementos recomendados por el análisis de suelos.

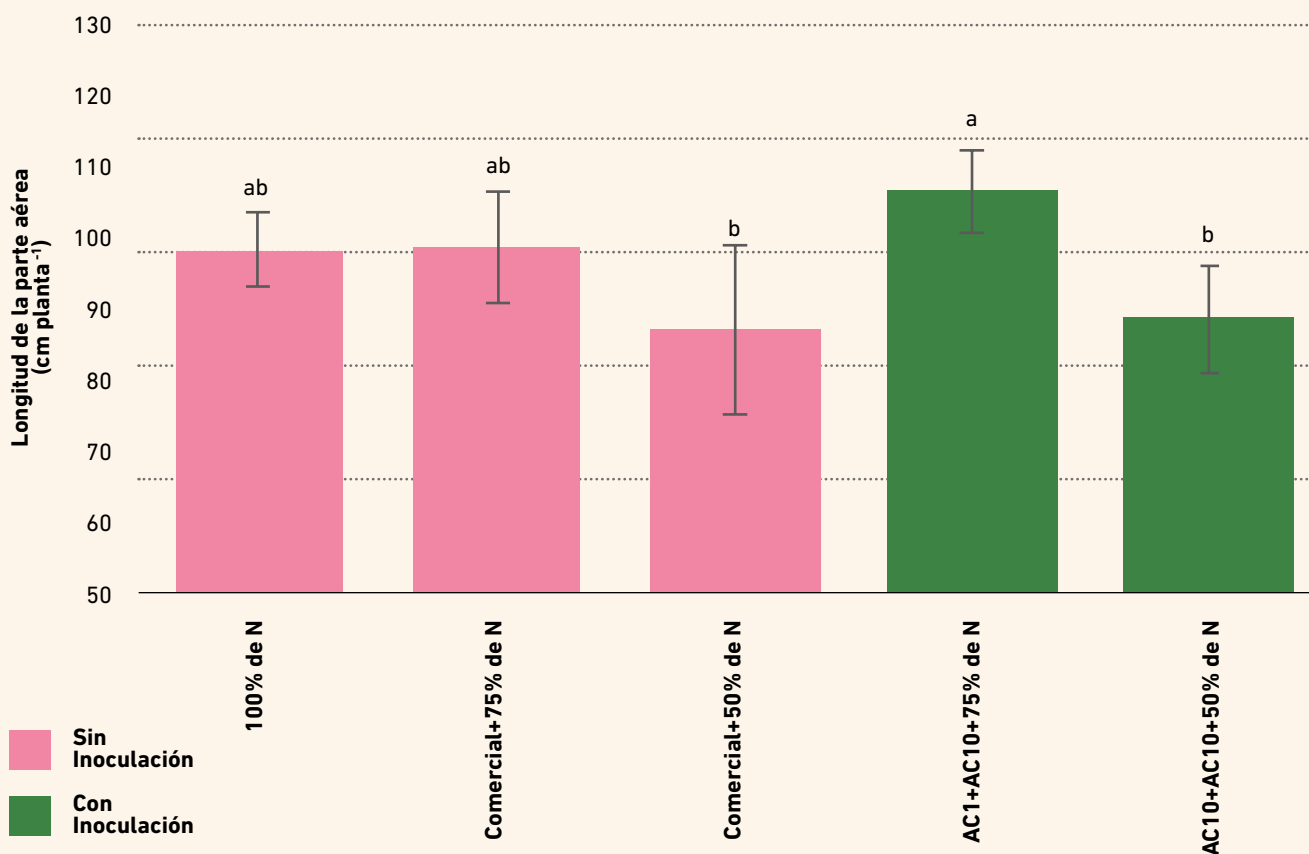
Las semillas de *Gossypium hirsutum* var. Sinuana M-137 fueron peletizadas con Monibac en turba, empleando CaCO_3 como adherente, de acuerdo con lo estipulado en la ficha técnica. El tratamiento de los inoculantes líquidos se basó en la aplicación a la semilla de 500 mL por cada 10 kg de semilla. Las reinoculaciones se realizaron a los 20 y 40 días de emergencia, junto con la fertilización nitrogenada en forma de urea, aplicando 1 L ha^{-1} . El experimento fue establecido en parcelas de 54 m^2 , divididas en seis surcos de 10 m de largo, con una separación de 0,9 m entre ellos y una distancia de 12,5 cm entre plantas, lo que dio como resultado una densidad de siembra de 8 plantas/ m^2 . Las parcelas fueron distribuidas en forma de bloques completamente al azar con tres repeticiones por bloque, donde los cuatro surcos centrales de cada repetición fueron cosechados para efectuar los análisis respectivos con base en una muestra de 50 motas tomadas al azar

por parcela. A partir de esta muestra, se realizó el cálculo correspondiente de los índices de cosecha: altura de la planta (cm), biomasa seca de la mota (g), biomasa seca de la fibra (g), biomasa seca de la semilla (g), número de cápsulas por metro lineal y rendimiento (kg ha^{-1}). El análisis certificado de la calidad de la fibra fue realizado por el Laboratorio de Fibras Diagonal, determinando las variables de micronaire, madurez, longitud, uniformidad, índice de fibras cortas (SFI, por sus siglas en inglés), humedad y resistencia. El análisis de los datos se realizó con Anova, donde se estableció un grado de significancia de 0,05 mediante el paquete estadístico SPSS Statistics de IBM (versión 22.0.0).

Los resultados mostraron diferencias significativas entre tratamientos en la altura vegetal, donde el consorcio bacteriano (AC1+AC10) más el 75% de N produjo la mayor influencia promotora del crecimiento sobre el algodónero (Figura 10.3), con un incremento del 4% frente a la fertilización completa (100% de N). Adicionalmente, el consorcio bacteriano promovió más la longitud vegetal en comparación con el control comercial (Monibac en turba).

■ **Figura 10.3.** Altura de la parte aérea de las plantas de algodón.

Fuente: Elaboración propia



En cuanto a biomasa seca de mota, semilla y fibra (Figura 10.4), no se encontraron diferencias significativas, pero se evidenció una tendencia de incremento asociada a la aplicación del consorcio bacteriano (AC1 + AC10) tanto con el 50 % como con el 75 % de N.

■ **Figura 10.4.** Biomasa seca de la mota, la semilla y la fibra del cultivo de algodón (correspondiente a 50 motas).
Fuente: Elaboración propia

■ Sin Inoculación
■ Con Inoculación

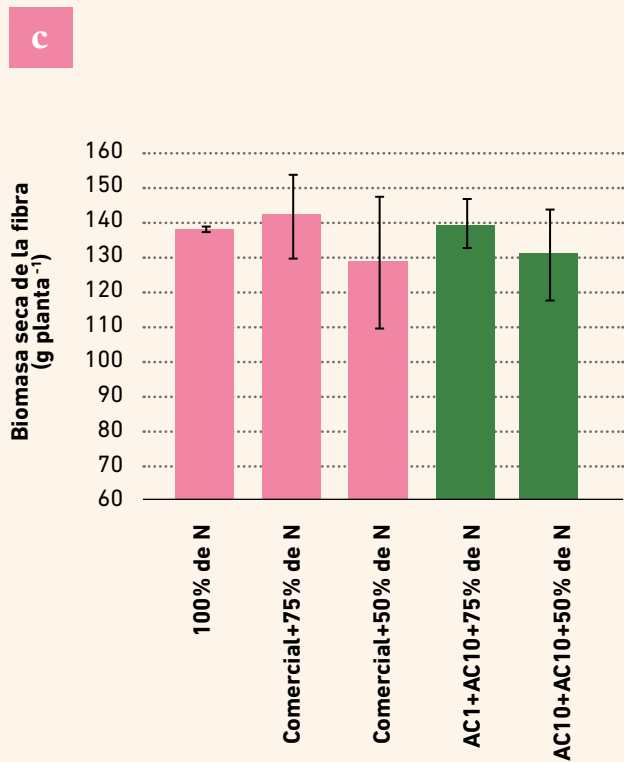
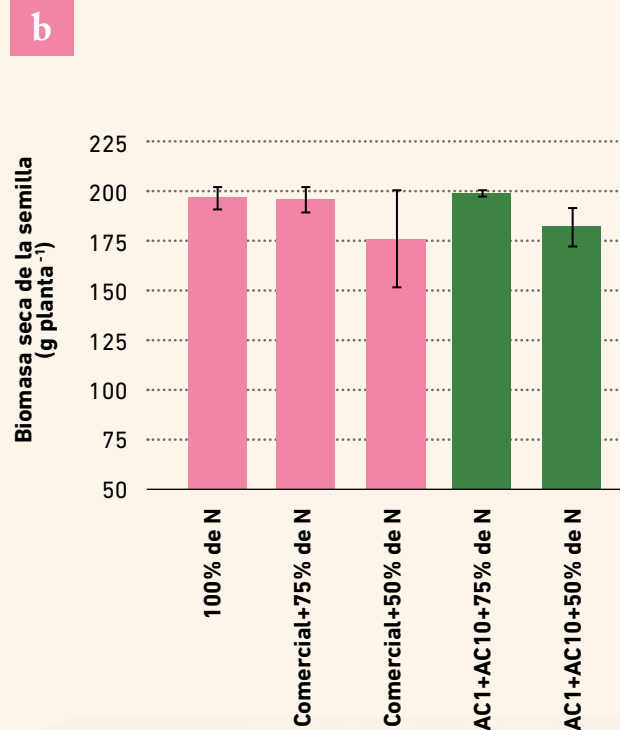
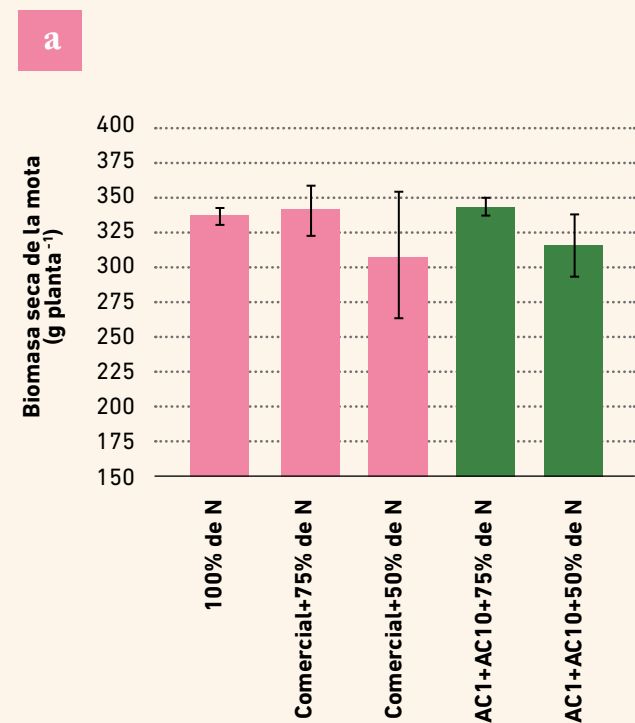


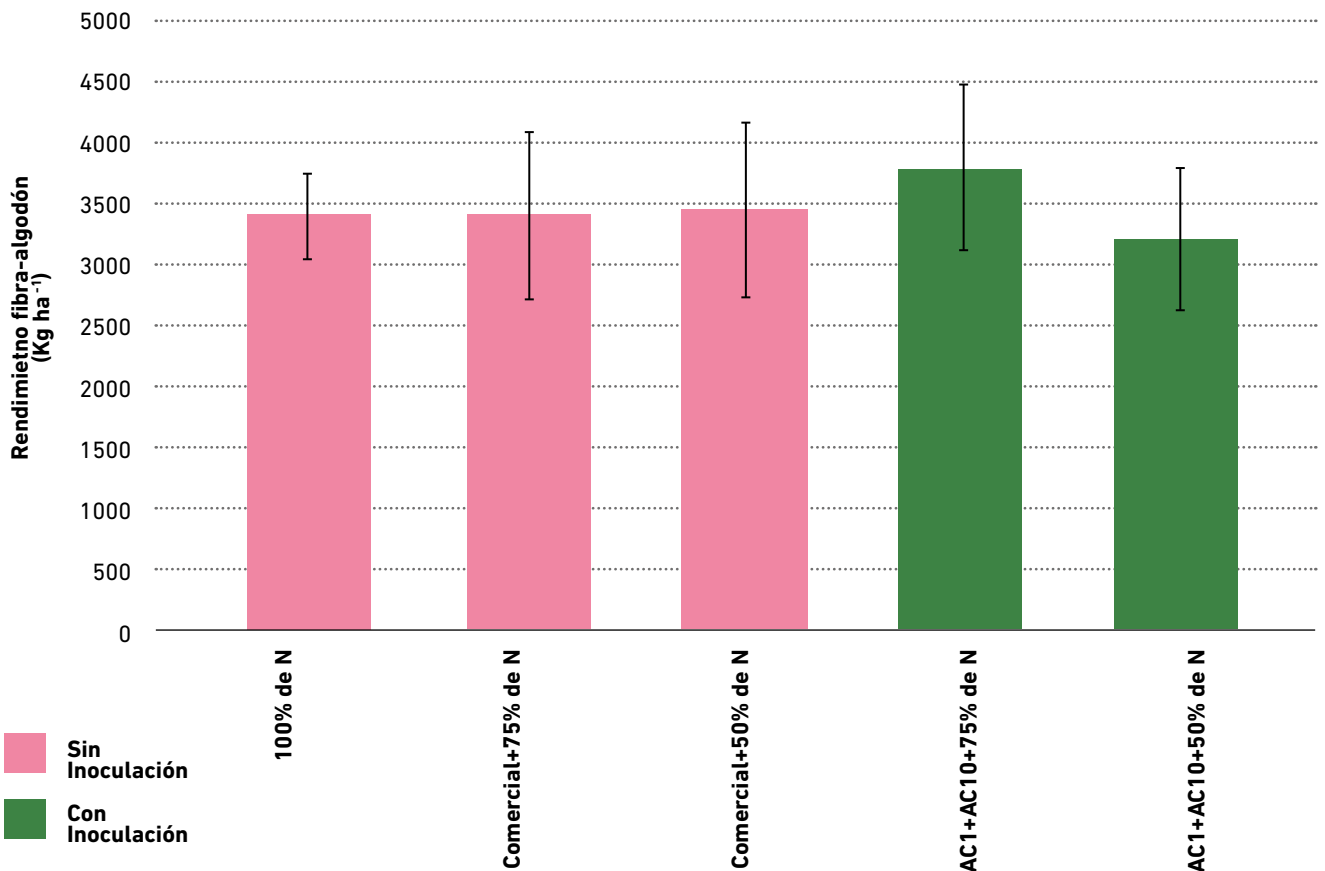


Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

Respecto al rendimiento (Figura 10.5), no se encontraron diferencias significativas, pero se evidenció una tendencia similar de los tratamientos a los resultados de biomasa seca de mota, semilla y fibra. Específicamente, se observó un incremento mayor al 10% del rendimiento cuando se aplicó el consorcio bacteriano (AC1 + AC10) más el 75% de N, y una disminución de aproximadamente el 5% cuando se usó el consorcio bacteriano (AC1 + AC10) más el 50% de N, con respecto a la fertilización mineral completa. Esto nos permite deducir que el efecto estimulador del crecimiento del consorcio con AC1 y AC10 podría reemplazar hasta un 50% la aplicación de urea. Estos resultados corroboran lo obtenido bajo condiciones de invernadero, donde se evidenció que el consorcio de AC1 y AC10 permite reducir las dosis de fertilización nitrogenada hasta un 50% para el crecimiento (longitud, biomasa y contenido foliar de N) del algodón en su etapa de floración en condiciones de invernadero. Esta obtención de un rendimiento similar del cultivo de algodón bajo condiciones reducidas de fertilización suplementadas con la aplicación de un consorcio de bacterias promotoras del crecimiento se ha podido observar también en otros cultivos, como el ajonjolí (*Sesamum indicum*), donde la aplicación de *A. chroococcum* TRA2 redujo la fertilización, en general, en un 50% (Maheshwari et al., 2012).

■ **Figura 10.5.** Rendimiento del cultivo de algodón (kg ha^{-1}).

Fuente: Elaboración propia



Respecto al algodón, se han reportado reducciones de 25 kg ha⁻¹ en la fertilización nitrogenada mediante la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal de géneros como *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* y *Bacillus* (Amjad et al., 2015; Wu et al., 2012).

En cuanto a la calidad de fibra, se observó que no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (tabla 10.4 y Figura 10.6), lo que demuestra que la biofertilización, que reduce las dosis de fertilización nitrogenada, no afecta la calidad de la fibra obtenida en comparación con la fertilización convencional nitrogenada (100% de urea) del cultivo.



Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles

■ **Tabla 10.4.** Resultados de calidad de fibra en el cultivo de algodón

Fuente: Elaboración propia

1	<p>Consorcio 50 % de N Micronaire: 3,77 ± 0,32 Madurez (porcentaje): 87 ± 0,1 Longitud (mm): 1,21 ± 0,02 Uniformidad (porcentaje): 84,95 ± 0,64 Índice de fibras cortas (IFC): 6,33 ± 0,32 Resistencia (g tex-1): 32,43 ± 0,52</p>
2	<p>Consorcio 75 % de N Micronaire: 3,81 ± 0,28 Madurez (porcentaje): 87 ± 0,1 Longitud (mm): 1,23 ± 0,03 Uniformidad (porcentaje): 84,63 ± 1,53 Índice de fibras cortas (IFC): 6,38 ± 0,59 Resistencia (g tex-1): 31,90 ± 1,21</p>
3	<p>Monibac 50 % de N Micronaire: 3,95 ± 0,17 Madurez (porcentaje): 87 ± 0,1 Longitud (mm): 1,24 ± 0,02 Uniformidad (porcentaje): 85,13 ± 0,92 Índice de fibras cortas (IFC): 6,23 ± 0,28 Resistencia (g tex-1): 31,93 ± 0,71</p>
4	<p>Monibac 75 % de N Micronaire: 4,04 ± 0,15 Madurez (porcentaje): 87 ± 0,1 Longitud (mm): 1,22 ± 0,01 Uniformidad (porcentaje): 84,93 ± 1,58 Índice de fibras cortas (IFC): 6,33 ± 0,35 Resistencia (g tex-1): 31,15 ± 1,24</p>
5	<p>100 % de N Micronaire: 3,86 ± 0,23 Madurez (porcentaje): 86 ± 0,1 Longitud (mm): 1,21 ± 0,02 Uniformidad (porcentaje): 85,00 ± 1,41 Índice de fibras cortas (IFC): 6,28 ± 0,10 Resistencia (g tex-1): 31,10 ± 1,02</p>

■ **Figura 10.6.** Experimento establecido en campo.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Una comparación de los valores considerados por la Corporación Distribuidora de Algodón Nacional (Diagonal) en la clasificación HVI de la fibra de algodón con los resultados de la investigación mostró que la fibra obtenida presentó las siguientes características promedio: micronaire de $3,89 \pm 0,23$, madurez del $87\% \pm 0,1\%$ (madura), longitud de la fibra media de $1,22 \pm 0,02$ mm, uniformidad del $84,93\% \pm 1,14\%$, IFC de

$6,31 \pm 0,33$ (bajo), resistencia de $31,70 \pm 1,02$ g tex⁻¹ (alta) y humedad del 7,04 % (intermedia).

Así, se puede concluir que el uso de las cepas AC1 y AC10 en presentación líquida permite reducir hasta un 50 % la dosis de urea en todo el proceso de producción del cultivo de algodón, sin afectar la calidad de mota.

Caso de estudio de AGROSAVIA bajo condiciones de invernadero: evaluación del potencial biofertilizante de bacterias solubilizadoras de fosfato sobre el algodón *Gossypium hirsutum*

Después de haber obtenido resultados prometedores en la reducción de la fertilización nitrogenada para el cultivo del algodón mediante el uso de biofertilizantes, se decidió realizar investigaciones en relación con la fertilización fosfatada, para aumentar el impacto positivo en el sector (Romero-Perdomo et al., 2021).

Cepas bacterianas y preparación de inóculos

Las cepas SP20, N8, N9, G56, G58 y B02 fueron proporcionadas por el Banco de Germoplasma de AGROSAVIA. Estos microorganismos fueron seleccionados para este estudio porque en investigaciones previas demostraron tener la capacidad de promover el alargamiento de la raíz de las plántulas de algodón bajo condiciones nutricionales limitadas en P (datos no mostrados). Para la preparación del inóculo, las cepas fueron crecidas en agar YMA (Vincent, 1970) en condiciones estándar: a 30 °C durante 24 horas de incubación. El inóculo bacteriano se produjo aeróbicamente, haciendo crecer cada cepa en condiciones estándar en un agitador rotativo (150 rpm) en medio líquido YM.

Material vegetal

Se utilizaron semillas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) de la variedad M-123. Estas semillas se esterilizaron en superficie (10 minutos de inmersión con hipoclorito de sodio al 5 %, y un minuto de inmersión en etanol al 70 %), se enjuagaron cinco veces en agua destilada esterilizada y se secaron al aire en una campana de flujo laminar.

Influencia de las cepas en el algodón en un suelo deficiente en fósforo

Para seleccionar dos de los seis microorganismos mencionados anteriormente, se realizaron ensayos en invernadero basados en su potencial de promoción del crecimiento de las plantas en el ci Nataima de AGROSAVIA, en El Espinal (Tolima). Para ello se utilizó un diseño experimental

completamente al azar con 8 tratamientos, 3 réplicas y 2 repeticiones. Los tratamientos fueron: (T1) fertilización completa sin inoculación bacteriana (urea, DAP y KCl); (T2) fertilización con urea, KCl y, en reemplazo del DAP, roca de fosfato del Huila (producto Olafos-S: 9 % de P_2O_5), sin inoculación bacteriana, y (T3-T8) fertilización con urea, roca fosfórica (RF) y KCl, con inoculación de cada cepa.

Después, materas de 1 kg de capacidad fueron llenadas con suelo no estéril con las siguientes características: pH: 6,12; materia orgánica: 1,69 %; P: 12,28 mg kg⁻¹; coeficiente de intercambio catiónico efectivo: 6,9 cmol kg⁻¹; Ca: 4,79 cmol kg⁻¹; Mg: 1,74 cmol kg⁻¹; K: 0,23 cmol kg⁻¹; Na: <0,14 cmol kg⁻¹. El suelo se secó al aire a 37 °C durante tres días y luego se tamizó con una malla de 2 mm (Romero-Perdomo et al., 2019). La inoculación y la fertilización se realizaron según los tratamientos después de 4 días de la siembra. Se usaron fertilizantes minerales solubles, en dosis convencionales en campo, como urea (75 kg ha⁻¹, producto Ecofétil, Colombia), DAP (50 kg ha⁻¹) y KCl (50 kg ha⁻¹). Se aplicó cada fertilizante (5 mL maceta⁻¹) en las siguientes concentraciones por litro de agua destilada estéril: 6,3 g de urea, 16 g de DAP y 5 g de KCl, y la cantidad de roca fosfórica aplicada fue de 0,152 g maceta⁻¹. Para inocular, se aplicaron manualmente 5 mL de cada inóculo o caldo YEM estéril a la rizósfera. Después de 30 días a 18-38 °C, a una humedad del ~55 % y con un régimen 16/8 día-noche, se realizó la medición del contenido relativo de clorofila (CRC) con el medidor de clorofila SPAD-502 (Konica Minolta, Japón) en el estadio principal 15 (quinta hoja desplegada) (Munger et al., 1998). Asimismo, se analizaron las mediciones de intercambio de gases: fotosíntesis neta (Pn) y tasa de transpiración (E), entre las 9 a.m. y las 11 a.m., con el analizador de gases infrarrojo LI-6400 XT (Licor, EE. UU.). Los parámetros de evaluación se establecieron en 400 μmol s⁻¹ para la velocidad de flujo, con una concentración de 400 μmol de CO₂ y una densidad de flujo fotónico de 1.200 μmol de fotones de luz por m⁻² s⁻¹. Los datos se tomaron una vez se alcanzó el estado estable de la Pn (Chastain et al., 2016). Luego de 30 días, se midió la longitud de la raíz y la parte aérea. El material vegetal se secó al horno por separado, a 60 °C, durante 48 horas, para medir su peso seco. Además, se estimó el contenido de fósforo en la parte aérea en el Lissalab de AGROSAVIA con el método Bray II.

Para los análisis estadísticos, se usó el *software* SPSS Statistics de IBM (versión 22.0.0), y los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (Anova). Las significaciones estadísticas de las comparaciones por pares se obtuvieron con la prueba de rango múltiple de Duncan ($p < 0,05$), y las asociaciones entre variables se examinaron mediante un análisis de correlación simple.

Los resultados mostraron que la inoculación de B02 y SP20 mejoró significativamente ($p < 0,05$) el crecimiento del algodón (Figura 10.7). Igualmente, se observaron incrementos del 36,21 y el 19% en biomasa seca de la parte aérea con DAP, B02 + RF y SP20 + RF respecto al control (no

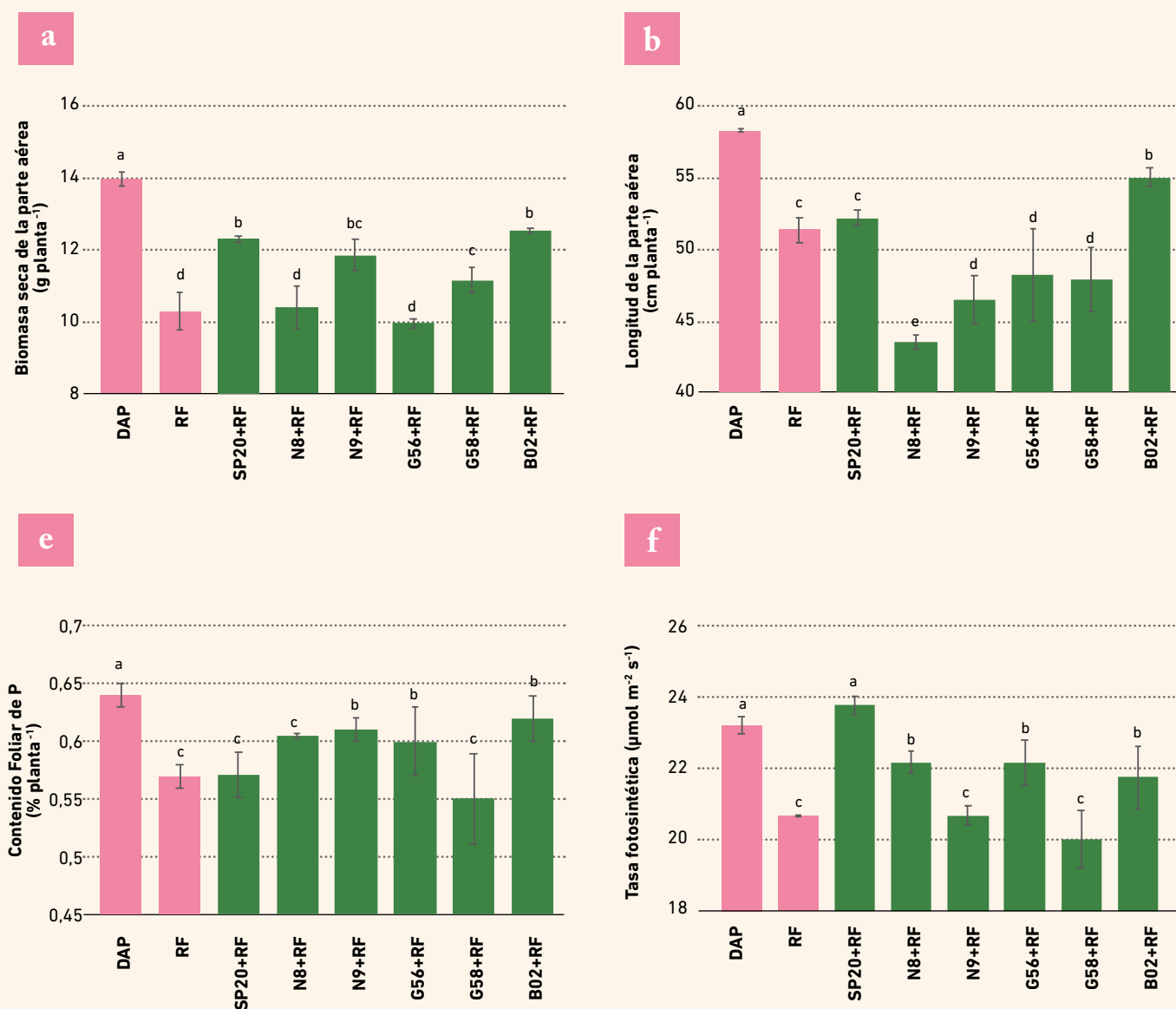




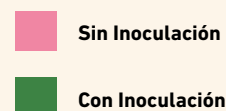
inoculado con aplicación de roca fosfórica). En cuanto a la longitud de la parte aérea, aumentos del 13 y el 7% fueron medidos cuando se aplicó DAP y B02+RF en comparación con el control. Por otro lado, las plantas del tratamiento control exhibieron una biomasa radicular de 1,86 g planta⁻¹. En contraste, el DAP, B02+RF y SP20+RF produjeron una biomasa radicular de 3,36, 3,25 y 3,14 g planta⁻¹, lo que representa incrementos del 81, el 75 y el 69%, respectivamente; además, interesantemente,

se encontró mayor influencia positiva bacteriana en la longitud radicular. La aplicación de B02+RF y SP20+RF promovió la longitud radicular en un 34 y un 26%, con valores de 24,73 y 23,31 cm planta⁻¹, respectivamente, mientras que la aplicación del DAP la promovió en un 24% (23,02 cm planta⁻¹) en relación con el control (18,44 cm planta⁻¹). Los otros tratamientos biológicos no difirieron significativamente del control no inoculado con roca fosfórica.

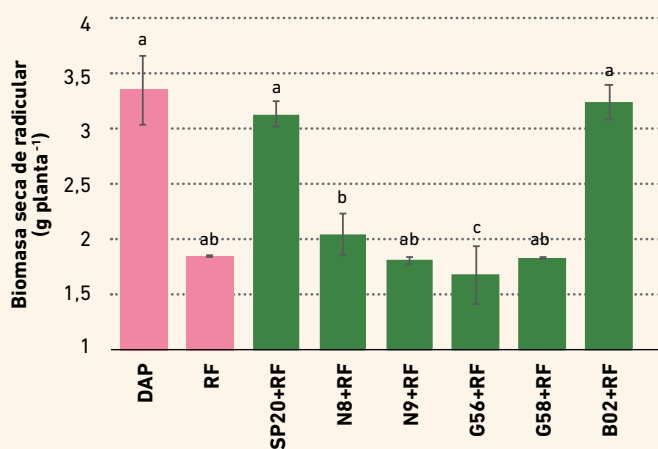
■ **Figura 10.7.** Influencia de la inoculación de las cepas SP20, N8, N9, G56, G58 y B02 con roca fosfórica en el crecimiento del algodón.



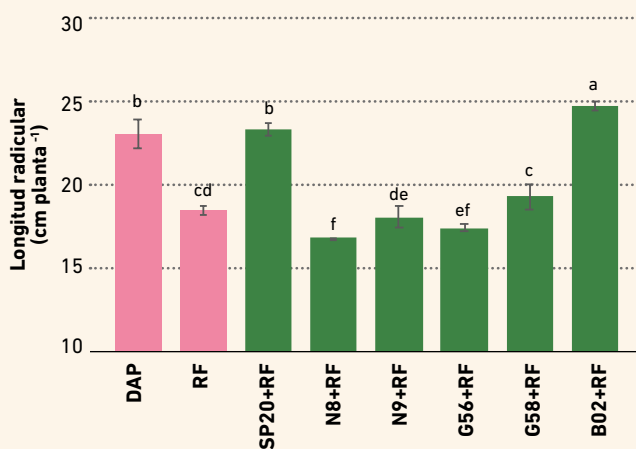
Nota: Las medias y los errores estándar son el resultado de tres réplicas por tratamiento, y los resultados son representativos de dos experimentos independientes. Las diferentes letras indican diferencias significativas basadas en la prueba de Duncan.



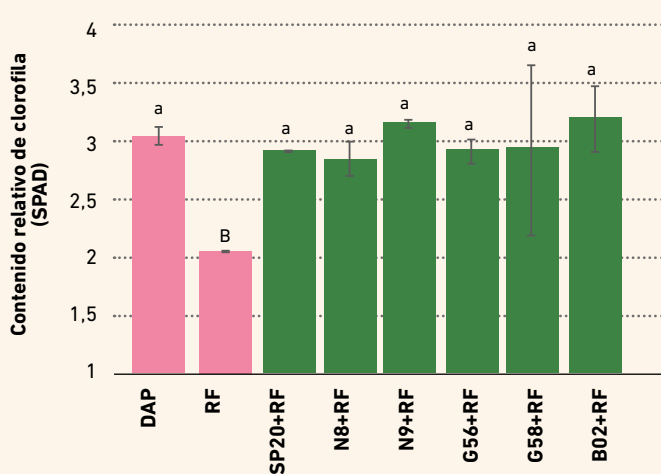
c



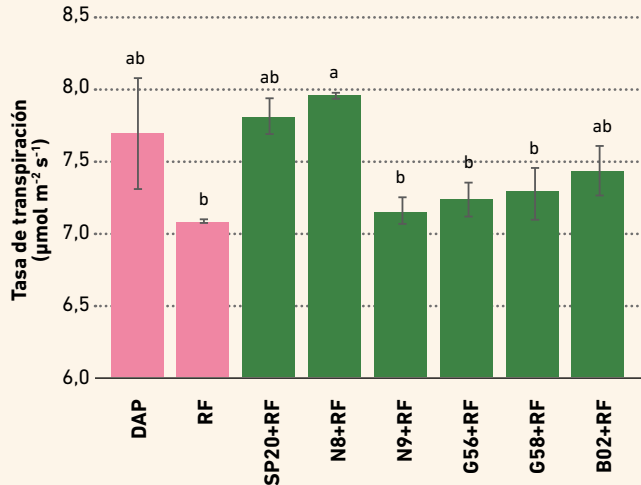
d



e



h



Respecto a las variables relacionadas con la nutrición del P, se observó un efecto benéfico cuando se aplicaron los inoculantes a base de las cepas B02, SP20 y N8 (Figura 10.8). Por ejemplo, respecto al control, el contenido de P aumentó en un 12 y un 7% con DAP y B02+RF. Asimismo, la tasa fotosintética incrementó en un 14 y un 12% en los tratamientos de SP20+RF y DAP. En cuanto a la clorofila, se observó en promedio un aumento del 8% con B02+RF, DAP

y SP20+RF. Por último, N8+RF, DAP y SP20+RF mejoraron la transpiración en un 12,8 y un 6%. Un análisis correlacional de todo el experimento mostró una relación positiva entre los parámetros de crecimiento ($0,76 \leq r \leq 0,93$) y también entre la tasa fotosintética y la tasa de transpiración ($r = 0,74$). Por lo tanto, nuestros datos indican que las cepas SP20 y B02 influyeron positivamente en el algodón, por lo que fueron seleccionadas para los siguientes ensayos.

■ **Figura 10.8.** Evaluación de bacterias solubilizadoras de fósforo en invernadero.
Foto: Sistemas Agropecuarios Sostenibles



Son frecuentes los reportes con informes microbiológicos sobre la inoculación de *Rhizobium* sp. como una estrategia exitosa para mejorar el crecimiento de legumbres como los frijoles comunes, las lentejas, los guisantes, los garbanzos y la soya (Wang, 2019); sin embargo, el número de publicaciones sobre la inoculación de *Rhizobium* sp. en algodón disminuye considerablemente. Por ejemplo, Hafez et al. (2004) evidenciaron que la inoculación rizobiana mejora la emergencia de las plántulas, la absorción de nutrientes (K^+ y Ca^{+2}) y el crecimiento del algodón, pero, hasta donde nosotros sabemos, no hay

investigaciones que reporten si únicamente el uso de *Rhizobium* sp. influye benéficamente sobre el crecimiento de las plantas, el contenido de P y los parámetros fisiológicos en algodón en suelos deficientes en P.

Al respecto, una condición determinante en nuestro trabajo fueron las condiciones del suelo, pues el suelo usado tenía un bajo contenido de P ($12,28 \text{ mg kg}^{-1}$). Según Ramírez y Kloepper (2010), esta condición es necesaria para observar que las plantas respondan al incremento de P soluble generado por la acción

microbiana. Otro parámetro del suelo que muchas veces es olvidado en los estudios de bacterias solubilizadoras de fosfato es el índice de sorción de P, el cual representa la capacidad de retención de P en los suelos. Es importante resaltar que en la investigación el suelo no fue esterilizado y procedía de suelos donde se cultiva algodón (Tolima, Colombia). El objetivo de utilizar estas condiciones fue observar el efecto de promoción del crecimiento de las plantas en condiciones idénticas a las aplicadas comercialmente, por lo que no podemos excluir la posibilidad de que las poblaciones microbianas del suelo nativo puedan influir en el efecto promotor del crecimiento vegetal.

Identificación molecular de cepas

Las dos cepas seleccionadas fueron identificadas molecularmente. Para esto, se realizó un análisis de secuencia del gen 16S rARN, como se describió previamente en Rojas-Tapias et al. (2012). Las secuencias parciales obtenidas se analizaron mediante el algoritmo de la herramienta de búsqueda de alineación local básica (Blast) y se compararon con las secuencias registradas en la base de datos GenBank, del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y luego se depositaron en esta misma base de datos.

Los resultados arrojaron que las cepas bacterianas SP20 y B02 mostraron un 99% de similitud con el género *Rhizobium*. Los números de acceso del GenBank de SP20 y B02 fueron MH160395 y MH160394, respectivamente.

Evaluación *in vitro* de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal

De manera similar, las dos cepas seleccionadas se caracterizaron bioquímicamente en condiciones *in vitro*, para determinar si exhibían características promotoras del crecimiento de las plantas. La evaluación de la capacidad de solubilización/mineralización de fosfato se llevó a cabo en dos ensayos: 1) cuantificación de P soluble con fosfato tricálcico y roca de fosfato (0,5%), en medio NBRIP líquido (Nautiyal, 1999), medido 5 y 12 días después de la inoculación con azul de molibdato, método colorimétrico (Fiske & Subbarow, 1925), y 2) detección cualitativa de la producción de fitasa en el medio de selección de fitasa (PSM) descrito por Kerovuo et al. (1998). También se probaron otras características que promueven el crecimiento de las plantas. La producción de compuestos indólicos se evaluó con y sin adición de triptófano, según Glickmann y Dessaux (1995). Además, la producción de ACC-desaminasa se determinó observando la capacidad de crecimiento bacteriana durante dos días en un medio de sal mínimo con ACC (3 mM) como única fuente de N, según el método de Habib. Finalmente, se detectó la síntesis de sideróforos en medio agar cromo azul S (Schwyn & Neilands, 1987). Cada ensayo se realizó con al menos dos repeticiones y tres réplicas.

Los resultados mostraron que las cepas SP20 y B02 realizan varias actividades promotoras del crecimiento vegetal (tabla 10.5). Estas cepas fueron activas en la solubilización de P como fosfato tricálcico y roca fosfórica del Huila (producto Olafos-S) de baja solubilidad (9% de P_2O_5). Con respecto a la mineralización de fósforo orgánico, ninguna cepa es capaz de producir fitasas. En AIA, ambas cepas exhiben esta actividad, y se observó que el triptófano mejora su producción. Finalmente, en relación con los sideróforos, las cepas SP20 y B02 mostraron resultados cualitativos positivos para su producción.

■ **Tabla 10.5.** Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal de las cepas SP20 y B02
Fuente: Elaboración propia

1

SP20**Solubilización:**

- **Fosfato tricálcico (Ca-P) (mg de PO_4^{3-} mL⁻¹):**
0,58 ± 0,05

Mineralización:

- **Fitasas (+/-):** -

Fitoestimulación:

- **Compuestos indólicos (µg de indol mL por OD₆₃₀⁻¹)**
- » **Sin triptófano:** 56,45 ± 4,74
- » **Con triptófano:** 155,28 ± 4,59

Producción:

- **Sideróforos (+/-):** +

2

B02**Solubilización:**

- **Fosfato tricálcico (Ca-P) (mg de PO_4^{3-} mL⁻¹):**
0,41 ± 0,02

Mineralización:

- **Fitasas (+/-):** -

Fitoestimulación:

- **Compuestos indólicos (µg de indol mL por OD₆₃₀⁻¹)**
- » **Sin triptófano:** 37,51 ± 4,16
- » **Con triptófano:** 136,36 ± 10,47

Producción:

- **Sideróforos (+/-):** +

Nuestra hipótesis es que la influencia directa de las cepas SP20 y B02 estimula el alargamiento y el aumento en el área de la raíz del algodón, lo que le permite una mayor exploración del suelo y una mayor absorción de nutrientes cuando el P es limitado; así, su concentración aumenta mediante su solubilización y la producción de sideróforos. La sinergia de estas dos actividades pudo haber sido la causante del incremento aproximado del 8 y el 7% en el contenido de P y de la longitud de la raíz de las plantas que fueron inoculadas con estas dos cepas, con respecto al tratamiento con DAP. De este modo, las actividades exhibidas por cada cepa bacteriana podrían estar asociadas con el efecto de promoción del crecimiento vegetal sobre el algodón (Romero-Perdomo et al., 2017; Santos-Torres et al., 2021). Sin embargo, para probar la importancia biológica de estas actividades metabólicas, se requerirá la creación de mutantes (Pardo-Díaz et al., 2021). La presente descripción de las habilidades de promoción del crecimiento vegetal de las cepas SP20 y B02 corrobora la idea de García-Fraile et al. (2012) de que las especies del género *Rhizobium* son reconocidas como microorganismos solubilizadores de fosfato, sintetizadores de AIA y productores de sideróforos.

Aunque los rizobios, entre muchas otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal, son los organismos más estudiados debido en gran medida a su capacidad para formar una simbiosis efectiva con plantas leguminosas para transformar el nitrógeno atmosférico (N_2) en N (amoníaco) utilizable, los resultados presentados aquí muestran su potencial biotecnológico con otros mecanismos metabólicos centrados en cultivos no leguminosos.

Conclusiones

Las cepas *Rhizobium* sp. SP20 y *Rhizobium* sp. B02 mostraron la mayor eficiencia ($p < 0,05$) sobre la biomasa, la longitud, el contenido de P y la tasa fotosintética del algodón, así como un potencial para reemplazar dosis de aplicación del fertilizante mineral con DAP. Además, estas cepas fueron capaces de solubilizar fosfato tricálcico y roca fosfórica, de sintetizar compuestos indólicos en presencia y ausencia de triptófano y de producir sideróforos, actividades metabólicas que podrían estar asociadas al crecimiento del algodón en suelos con bajo contenido de P. Sin embargo, es necesario realizar pruebas de campo para obtener información sobre la respuesta de las plantas de algodón en términos de rendimiento y calidad de la fibra con estas cepas, buscando reducir el uso de fertilizantes con DAP.

Nota: Los datos se presentan como media ± error estándar. Las medias y los errores estándar son el resultado de tres repeticiones por análisis bioquímico, y los resultados son representativos de dos experimentos independientes. (+/-) indica presencia/ausencia de la actividad.

Referencias

- Amjad, M., Akhtar, J., & Rashid, M. S. (2015). Evaluating the effectiveness of biofertilizer on salt tolerance of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Archives of Agronomy and Soil Science*, 61(8), 1.165-1.177. <https://doi.org/10.1080/03650340.2014.990006>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Campuzano-Duque, L. F., & Buenaventura-Baron, M. (2020). Desempeño productivo de algodón en surco ultra-estrechos en suelos ácidos en Colombia. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(1), 203-211. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i1.2062>
- Camelo-Rusique, M., Moreno-Galván, A., Romero-Perdomo, F., & Bonilla-Buitrago, R. (2017). Desarrollo de un sistema de fermentación líquida y de enquistamiento para una bacteria fijadora de nitrógeno con potencial como biofertilizante. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.06.005>
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2005). *Microbiology: A laboratory manual*. Benjamin Cummings.
- Chastain, D. R., Snider, J. L., Choinski, J. S., Collins, G. D., Perry, C. D., Whitaker, J., Grey, T. L., Sorensen, R. B., van Iersel, M., Byrd, S. A., & Porter, W. (2016). Leaf ontogeny strongly influences photosynthetic tolerance to drought and high temperature in *Gossypium hirsutum*. *Journal of Plant Physiology*, 199, 18-28. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.05.003>
- De Bolle, S., Gebremikael, M. T., Maervoet, V., & De Neve, S. (2013). Performance of phosphate-solubilizing bacteria in soil under high phosphorus conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 49(6), 705-714. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0759-1>
- Eckert, B., Weber, O. B., Kirchoff, G., Halbritter, A., Stoffels, M., & Hartmann, A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 17-26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-17>
- Fiske, C. H., & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66(2), 375-400. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)84756-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)84756-1)
- Gallegos-Cedillo, G. (2019, 26 de agosto). El mercado mundial y nacional del algodón. *El Economista*. <https://www.economista.com.mx/opinion/El-mercado-mundial-y-nacional-del-algodon-20190826-0063.html>
- García-Fraile, P., Carro, L., Robledo, M., Ramírez-Bahena, M.-H., Flores-Félix, J.-D., Fernández, M. T., Mateos, P. F., Rivas, R., Igual, J. M., Martínez-Molina, E., Peix, Á., & Velázquez, E. (2012). *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS ONE*, 7(5), artículo e38122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038122>
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 793-796. <http://aem.asm.org/content/61/2/793.abstract>
- Hafeez, F. Y., Safdar, M. E., Chaudhry, A. U., & Malik, K. A. (2004). Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44(6), 617-622. <https://doi.org/10.1071/EA03074>
- Honma, M., & Shimomura, T. (1978). Metabolism of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(10), 1.825-1.831. <https://doi.org/10.1080/00021369.1978.10863261>
- Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., & Apajalahti, J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2.079-2.085. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2079-2085.1998>
- Maheshwari, D. K., Dubey, R. C., Aeron, A., Kumar, B., Kumar, S., Tewari, S., & Arora, N. K. (2012). Integrated approach for disease management and growth enhancement of *Sesamum indicum* L. utilizing *Azotobacter chroococcum* TRA2 and chemical fertilizer. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(10), 3.015-3.024. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1112-4>
- Moreno, A. E., Rojas, D. F., & Bonilla, R. R. (2011). Aplicación de diseños estadísticos secuenciales en la identificación de fuentes nutricionales para *Azotobacter chroococcum* AC1. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 151-158. https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:226
- Munger, P., Bleiholder, H., Hack, H., Hess, M., Stauß, R., van den Boom, T., & Weber, E. (1998). Phenological growth stages of the cotton plant (*Gossypium hirsutum* L.): Codification and description according to the BBCH Scale1. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 180(3), 143-149. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.1998.tb00384.x>
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Panhwari, Q. A., Naher, U. A., Jusop, S., Othman, R., Latif, M. A., & Ismail, M. R. (2014). Biochemical and molecular characterization of potential phosphate-solubilizing bacteria in acid sulfate soils and their beneficial effects on rice growth. *PLoS ONE*, 9(10), artículo e97241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097241>
- Pardo-Díaz, S., Romero-Perdomo, F., Mendoza-Labrador, J., Delgadillo-Duran, D., Castro-Rincon, E., Silva, A. M., Rojas-Tapias, D., Cardoso, E. J. B. N., Estrada-Bonilla, G. A. (2021). Endophytic PGPB Improves Plant Growth and Quality, and Modulates the Bacterial Community of an Intercropping System. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5:715270. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.715270>

- Pereg, L., & McMillan, M. (2015). Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 80, 349-358. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.10.020>
- Pereira, S. I. A., & Castro, P. M. L. (2014). Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P-deficient soils. *Ecological Engineering*, 73, 526-535. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.060>
- Ramírez, C. A., & Kloepper, J. W. (2010). Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties. *Biology and Fertility of Soils*, 46(8), 835-844. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0488-2>
- Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D., & Bonilla, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology*, 61, 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.01.006>
- Rojas-Tapias, D. F., Bonilla, R., & Dussán, J. (2014). Effect of inoculation and co-inoculation of *Acinetobacter* sp. RG30 and *Pseudomonas putida* GN04 on growth, fitness, and copper accumulation of maize (*Zea mays*). *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(12), artículo 2232. <https://doi.org/10.1007/s11270-014-2232-2>
- Rojas-Tapias, D., Ortiz-Vera, M., Rivera, D., Kloepper, J., & Bonilla, R. (2013). Evaluation of three methods for preservation of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter vinelandii*. *Universitas Scientiarum*, 18(2), 129-139. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-2.etmp>
- Romero-Perdomo, F., Abril, J., Camelo, M., Moreno-Galván, A., Pastrana, I., Rojas-Tapias, D., & Bonilla, R. (2017). *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton (*Gossypium hirsutum*): Effect in reducing N fertilization. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(4), 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006>
- Romero-Perdomo, F., Ocampo-Gallego, J., Camelo-Rusique, M., & Bonilla, R. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bioinoculants on *Pennisetum clandestinum* (Poaceae). *Revista de Biología Tropical*, 67(4). <https://doi.org/10.15517/RBT.V67I4.34029>
- Romero-Perdomo, F., Beltrán, I., Mendoza-Labrador, J., Estrada-Bonilla, G., & Bonilla, R. (2021). Phosphorus nutrition and growth of cotton plants inoculated with growth-promoting bacteria under low phosphate availability. *Frontier in Sustainable Food System*, 4:618425. doi: 10.3389/fsufs.2020.618425
- Santos-Torres, M., Romero-Perdomo, F., Mendoza-Labrador, J., Gutiérrez, A. Y., Vargas, C., Castro-Rincon, E., Caro-Quintero, A., Uribe-Velez, D., Estrada-Bonilla, G. A. (2021). Genomic and phenotypic analysis of rock phosphate-solubilizing rhizobacteria. *Rhizosphere*, 17, 100290. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100290>
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Sukumar, P., Legué, V., Vayssières, A., Martin, F., Tuskan, G. A., & Kalluri, U. C. (2013). Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. *Plant, Cell & Environment*, 36(5), 909-919. <https://doi.org/10.1111/pce.12036>
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria* (IBP Handbook no. 15). Blackwell Scientific.
- Wang, E. T. (2019). Symbiosis between rhizobia and legumes. En E. T. Wang, C. F. Tian, W. F. Chen, J. P. W. Young, & W. X. Chen (eds.), *Ecology and evolution of rhizobia: Principles and applications* (pp. 3-19). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9555-1_1
- Westcott, P. (2010). *USDA agricultural projections to 2019*. USDA.
- Wu, Z., Yue, H., Lu, J., & Li, C. (2012). Characterization of rhizobacterial strain Rs-2 with Acc deaminase activity and its performance in promoting cotton growth under salinity stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 2.383-2.393. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1047-9>



