



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOFERTILIZANTE  
DE LA CIANOBACTERIA *Fischerella* sp.  
ENCAPSULADA EN ALGINATO-QUITOSANO  
SOBRE UN CULTIVO EXPERIMENTAL DE  
RÁBANO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

**PRESENTA:**

**ESMERALDA ALONSO SANTOS**

**LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DEL 2017**

## CARTA COMPROMISO DE CONFIDENCIALIDAD

La Paz, B.C.S. a 7 de diciembre del 2017

Por medio de la presente, los miembros del comité tutorial abajo firmantes nos comprometemos a guardar estricta confidencialidad respecto de la información, que hemos conocido con motivo de fungir como director o asesor de la tesis de Maestría titulada: **EFFECTO BIOFERTILIZANTE DE LA CIANOBACTERIA *Fischerella sp* ENCAPSULADA EN ALGINATO-QUITOSANO EN EL CRECIMIENTO DE RÁBANO**, presentada por **Esmeralda Alonso Santos**, alumna del CICIMAR-IPN. Con base en el artículo 14 de la Ley de la Propiedad Intelectual y lo dispuesto en el artículo 163 de la Ley Federal del Trabajo, tengo conocimiento de que la información que se me ha facilitado relativa a dicho proyecto estará clasificada como "INFORMACION CONFIDENCIAL", toda vez que el Instituto Politécnico Nacional es el único y legítimo titular de la misma.

Por lo anterior me comprometo a guardar escrupulosa confidencialidad y abstenerme de: usarla, revelarla, divulgarla, venderla, arrendarla, licenciarla, comercializarla y/o hacerla accesible al público en general, por cualquier forma o medio conocido o por conocerse, ya sea en parte o en su conjunto, debiendo observar lo anterior tanto en México como en el extranjero, ya que en la utilización por medio de recursos ilícitos o impropios causa un perjuicio al patrimonio intelectual de Instituto Politécnico Nacional y que son actos que constituyen delitos previstos en el artículo 223 de la Ley de la Propiedad Industrial; y que independientemente de las sanciones penales de los infractores, prevén a favor de su titular el pago de daños y perjuicios.

ATENTAMENTE



**Dr. Gustavo Hernández Carmona**  
Director



**Dra. Mauricio Muñoz Ochoa**  
Director



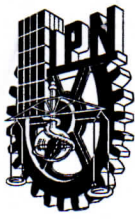
**Dr. Christina J. Band Schmidt**



**Dra. Claudia Judith Hernández Guerrero**



**M.C. Mauricio Contreras Olguín**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 27 del mes de Noviembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOFERTILIZANTE DE LA CIANOBACTERIA *Fischerella* sp. ENCAPSULADA EN ALGINATO-QUITOSANO SOBRE UN CULTIVO EXPERIMENTAL DE RÁBANO”**

Presentada por el alumno:

ALONSO	SANTOS	ESMERALDA
Apellido paterno	materno	nombre(s)
Con registro:		
A	1	6 0 8 2 8

Aspirante de:

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Directores de Tesis

**DR. GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA**  
Director de Tesis

**DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA**  
2º. Director de Tesis

**DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT**

**DRA. CLAUDIA JUDITH HERNÁNDEZ GUERRERO**

**M en C. MAURICIO CONTRERAS OLGUÍN**

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

**DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO**



**I.P.N.**  
**CICIMAR**  
**DIRECCIÓN**

## **Dedicatoria**

A mis padres **Clara Santos e Ignacio Alonso**,  
por su comprensión y apoyo en todo momento,  
por ser el mejor ejemplo, pero sobre todo por las  
grandes dosis de amor y confianza brindadas  
todos los días. Los amo!

Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado  
ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie

## **Agradecimientos**

A mis directores de tesis Dr. Gustavo Hernández Carmona y Dr. Mauricio Muñoz Ochoa por brindarme un espacio en su equipo de trabajo y por el apoyo para realizar este trabajo.

A los investigadores que conforman la comisión revisora al MC. Mauricio Contreras Olguín, Dra. Christine J. Band Schmidt y la Dra. Claudia J. Hernández Guerrero, por las observaciones para mejorar el trabajo.

Al MC. Mauricio Contreras por todos los consejos, el apoyo, la disposición, y todas las facilidades de material, espacio y tiempo para el desarrollo del experimento, y sobre todo por ayudarme a resolver cada una de mis dudas, así como al resto del equipo UPIMA (Taylor y Laura) por todo el apoyo.

A la Dra. Rosalba Mireya Hernández H. por su apoyo, por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar parte de los análisis, pero sobre todo por el excelente trato, así como al equipo de trabajo (Ale, Karla, Clara, Pame, Maura, Abner y Mario) del laboratorio de biotecnología del CUCBA-UDG, por el apoyo, las enseñanzas, pero sobre todo por hacer mi estancia más amena.

A mis compañeros y equipo del LQAM (Dora, Liz, Ana) por todo lo compartido.

A mis amigas Ana y Aracely por hacer de estos dos años una bonita experiencia, por todos los consejos, la atención, la enseñanza, el apoyo, pero sobre todo por estar siempre al pendiente de la Oaxaqueña.

A mis contados amigos de generación (Karely, Luis y Taylor) por el apoyo, la compañía y sobre todo por su esencia como personas.

A mis padres (Clara e Ignacio) y a mis hermanas (Yeni y Benyhi) por todo el apoyo en todos los sentidos.

A Octavio por su cariño, consejos y apoyo en todo momento aún en la distancia.

A CONACyT por la beca de estudios de posgrado y al CICIMAR-IPN por todos los apoyos económicos brindados.

Y a todas las personas que contribuyeron de manera directa e indirecta para la realización de este trabajo.

A todos ustedes... ¡Muchas Gracias!

## Índice general

Dedicatoria .....	II
Agradecimientos.....	III
Índice general.....	IV
Índice de figuras .....	VIII
Índice de tablas .....	XI
Glosario .....	XII
Resumen.....	XIII
Abstract .....	XIV
1. Introducción .....	13
1.1. Biofertilizantes.....	14
1.2. Cianobacterias fijadoras de nitrógeno.....	14
1.2.2. <i>Fischerella</i> sp.....	15
1.3. Inmovilización celular .....	16
1.3.1. Alginato.....	16
1.3.2. Quitosano .....	17
1.4. Cultivo de rábano ( <i>Raphanus sativus</i> ) .....	17
2. Antecedentes.....	18
3. Justificación .....	21
4. Hipótesis .....	22
5. Objetivos.....	22
5.2. Específicos.....	22
6. Materiales y métodos.....	22

6.1.	Reactivación y crecimiento de <i>Fischerella</i> sp.....	23
6.2.	Inmovilización celular .....	24
6.2.1.	Encapsulado de Ca-alginato.....	24
6.2.2.	Encapsulado de Ca-alginato-quitosano .....	24
6.3.	Primera evaluación experimental en el cultivo de rábano ( <i>R. sativus</i> ) .....	24
6.3.1.	Acondicionamiento de charolas de cultivo .....	24
6.3.2.	Evaluación de la sustitución parcial de fertilizante sobre el cultivo de <i>R. sativus</i> .....	27
6.3.3.	Toma de muestras.....	28
6.3.4.	Análisis químico proximal .....	28
6.3.5.	Caracterización fisicoquímica del sustrato.....	29
6.3.6.	Análisis estadísticos .....	29
7.	Resultados.....	29
7.1.	Primer experimento: Efecto de los bioencapsulados en la fertilización de un cultivo de rábano ( <i>R. sativus</i> ).....	29
7.1.1.	Longitud de las hojas (LH).....	30
7.1.2.	Diámetro polar (DP) y ecuatorial del bulbo (DE).....	31
7.1.3.	Longitud de la raíz (LR) .....	31
7.1.4.	Peso fresco (PFH) y peso seco de las hojas (PSH) .....	32
7.1.5.	Peso fresco (PFB) y peso seco del bulbo (PSB) .....	33
7.1.6.	Número de hojas (NH).....	34
7.1.7.	Contenido de clorofila “a” .....	35
7.1.8.	Análisis químico proximal .....	35

7.1.9.	Caracterización fisicoquímica del sustrato.....	37
7.2.	Segundo experimento: Evaluación de la mezcla fertilizante químico y biofertilizante natural en el cultivo de <i>R. sativus</i> .....	38
7.2.1.	Longitud de las hojas (LH).....	38
7.2.2.	Diámetro polar (DP) y ecuatorial (DE) del bulbo de rábano.....	39
7.2.3.	Longitud de la raíz (LR) .....	40
7.2.4.	Peso fresco (PFH) y peso seco de las hojas (PSH) .....	41
7.2.5.	Peso fresco (PFB) y peso seco del bulbo (PSB) .....	42
7.2.6.	Número de hojas (NH).....	43
7.2.7.	Contenido de clorofila “a”.....	44
7.2.8.	Análisis químico proximal .....	45
7.2.9.	Caracterización fisicoquímica del sustrato.....	47
8.	Discusión .....	48
8.1.	Evaluación de los bioencapsulados en el cultivo de rábano .....	48
8.2.	Evaluación de la mezcla de fertilizante químico y biofertilizante en el cultivo de <i>R. sativus</i> . .....	53
9.	Conclusiones .....	58
10.	Recomendaciones.....	59
11.	Bibliografía.....	60
Anexos	.....	68
Anexo 1.	Formulación para la preparación de medios de cultivo BG11 .....	68
Anexo 2.	Resultados de las evaluaciones biométricas de las plantas de <i>R. sativus</i> en la primera evaluación del encapsulado. ....	69



Anexo 3. Resultados de las evaluaciones biométricas de las plantas de *R. sativus* fertilizadas con las distintas combinaciones de bioencapsulado y fertilizante químico. .... 70

Anexo 4. Elaboración y evaluación del biofertilizante de *Fischerella sp.* de experimentación para la evaluación del biofertilizante. .... 71

## Índice de figuras

Fig. 1. <i>Fischerella</i> sp. A: Heterocisto, B: Células vegetativas (Tomada de Alonso-Santos, 2013).....	15
Fig. 2. Diseño experimental para la preparación de los a) tratamientos, b) controles y su aplicación a un cultivo de <i>Raphanus sativus</i> . ....	25
Fig. 3. Longitud de hojas (cm) de <i>R. sativus</i> en los diferentes tratamientos, ● Encapsulado de Ca-alginato/ <i>Fischerella</i> sp. (EAF), ■ Encapsulado de Ca-alginato/Quitosano/ <i>Fischerella</i> sp. (EAQF), ▲ Triple 17 (T17). ....	30
Fig. 4. a) Diámetro polar, b) Diámetro ecuatorial del bulbo (cm) de <i>R. sativus</i> en los diferentes tratamientos, ● EAF, ■ EAQF, ▲ T17. ....	31
Fig. 5. Longitud de raíz (cm) de <i>Raphanus sativus</i> en los diferentes tratamientos, ● EAF, ■ AQFE, ▲ T17.....	32
Fig. 6. a) Peso fresco y b) peso seco de las hojas (g) de <i>R. sativus</i> en los diferentes tratamientos, ● EAF, ■ EAQF, ▲ T17.....	33
Fig. 7. a) Peso fresco, b) Peso seco del bulbo (g) de <i>R. sativus</i> en los diferentes tratamientos, ● EAF, ■ EAQF, ▲ T17.....	33
Fig. 8. Número de hojas de las plantas de <i>R. sativus</i> en los diferentes tratamientos, ● EAF, ■ EAQF, ▲ T17.....	34
Fig. 9. Contenido de clorofila “a” (mg. g <sup>-1</sup> ) de las plantas de <i>R. sativus</i> en los diferentes tratamientos, ● EAF, ■ EAQF, ▲ T17.....	35
Fig. 10. Longitud de hojas (cm) de las plantas de <i>R. sativus</i> en los diferentes tratamientos, ● 20EAF:80T17, ■ 40EAF: 60T17, ▲ 50EAF: 50T17, □ 60EAF: 40T17, ○ 80EAF: 20T17, ◆ 100EAF, ◆ 100T17.....	39
Fig. 11. a) Diámetro polar b) Diámetro ecuatorial del bulbo de <i>R. sativus</i> (cm) en los diferentes tratamientos, ● 20EAF:80T17, ■ 40EAF: 60T17, ▲ 50EAF: 50T17, □ 60EAF: 40T17, ○ 80EAF: 20T17, ◆ 100EAF, ◆ 100T17. ....	40

Fig. 12. Longitud de la raíz (cm) de <i>R. sativus</i> en los diferentes tratamientos, ● 20EAF:80T17, ■ 40EAF: 60T17, ▲ 50EAF: 50T17, □ 60EAF: 40T17, ○ 80EAF: 20T17, ◆ 100EAF, ◆ 100T17. ....	41
Fig. 13. a) Peso fresco b) Peso seco de las hojas (g) de <i>R. sativus</i> en los diferentes tratamientos, ● 20EAF: 80T17, ■ 40EAF: 60T17, ▲ 50EAF: 50T17, □ 60EAF: 40T17, ○ 80EAF: 20T17, ◆ 100EAF, ◆ 100T17.....	42
Fig. 14.. a) Peso fresco b) Peso seco del bulbo (g) de <i>R. sativus</i> en los diferentes tratamientos, ● 20EAF:80T17, ■ 40EAF: 60T17, ▲ 50EAF: 50T17, □ 60EAF: 40T17, ○ 80EAF: 20T17, ◆ 100EAF, ◆ 100T17.....	43
Fig. 15. Número de hojas de las plantas de <i>R. sativus</i> en los diferentes tratamientos, ● 20EAF: 80T17, ■ 40EAF: 60T17, ▲ 50EAF: 50T17, □ 60EAF: 40T17, ○ 80EAF: 20T17, ◆ 100EAF, ◆ 100T17.....	44
Fig. 16. Contenido de Clorofila “a” (mg. g <sup>-1</sup> ) de las plantas de <i>R. sativus</i> en los diferentes tratamientos, ● 20EAF: 80T17, ■ 40EAF: 60T17, ▲ 50EAF: 50T17, □ 60EAF: 40T17, ○ 80EAF: 20T17, ◆ 100EAF, ◆ 100T17.....	45
Fig. 17 a) Cultivo de <i>Fischerella</i> sp. en medio de BG11, b) cosecha de la biomasa de <i>Fischerella</i> sp. para la elaboración de los encapsulados poliméricos. ....	71
Fig. 18 a) Elaboración de los bioencapsulados poliméricos (EAF), b) adición de la biopelícula de quitosano (EAQF), c) recuperación de las capsulas elaboradas.....	72
Fig. 19 Establecimientos de los dos tipos de bioencapsulados en medio de cultivo BG11 a) encapsulado de <i>Fischerella</i> en Ca-Alginato (EAF), b) encapsulado de <i>Fischerella</i> en Ca-Alginato-Quitosano (EAQF).....	72
Fig. 20 Establecimiento del cultivo de <i>Raphanus sativus</i> .....	73
Fig. 21 a) Fertilización del cultivo de rábano con el bioencapsulado de <i>Fischerella</i> sp., b) crecimiento de las plantas en cultivo, c) toma de muestra para evaluación de las variables biométricas.....	73

Fig. 22 a) Planta sin fertilizar, b) planta fertilizada con los capsulas de Ca-alginato quitosano (CAQ), c) planta fertilizada con encapsulado de Ca-alginato-Fischerella (EAF), d) planta fertilizada con la combinación 40EAF:60 T17. .... 74

Fig. 23 a) Cultivo de rábano con la presencia de plaga (áfidos), b) y c) hojas de las plantas de rábano infestadas de áfidos a la quinta semana de cultivo..... 74

## Índice de tablas

Tabla I. Tratamientos aplicados y cantidades utilizadas en la primera evaluación....	26
Tabla II. Proporciones de bioencapsulado de Ca-Alginato-Fischerella (EAF) y fertilizante (T17) aplicados a cada unidad experimental en el segundo experimento sobre el cultivo de rábano <i>Raphanus sativus</i> .....	27
Tabla III. Composición química proximal de las plantas de <i>R. sativus</i> en los diferentes tratamientos empleados para evaluar su crecimiento. ....	37
Tabla IV. Caracterización fisicoquímica del sustrato antes y después de la aplicación de los tratamientos ( $p>0.05$ ). CRA= capacidad de retención de agua. ....	38
Tabla V. Composición química proximal de las plantas de <i>R. sativus</i> en los diferentes tratamientos empleados para su fertilización. ....	46
Tabla VI. Caracterización fisicoquímica del sustrato antes y después de la aplicación de los tratamientos ( $p>0.05$ ).....	48
Tabla VII. Reactivos utilizados para la preparación del medio de cultivo .....	68
Tabla VIII. Variables biométricas en respuesta a los diferentes tratamientos en la primera evaluación del cultivo de <i>R. sativus</i> .....	69
Tabla IX. Variables biométricas en respuesta a las diferentes combinaciones de encapsulado y fertilizante químico en la evaluación del cultivo de <i>R. Sativus</i> . ....	70

## Glosario

**Alginato:** Polisacárido estructural de las algas pardas, compuesto por los monómeros: ácido  $\beta$ -D-manurónico y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico.

**Autótrofo:** es la capacidad de ciertos organismos de sintetizar todas las sustancias esenciales para su metabolismo a partir de sustancias orgánicas de manera que no necesitan de otros seres vivos para su nutrición.

**Auxinas:** fitohormonas reguladoras del crecimiento vegetal cuya principal actividad es elongar las células.

**Citocininas:** fitohormonas reguladoras del crecimiento vegetal cuya actividad es promover la división celular e inhibir la senescencia en las plantas.

**Biofertilizantes:** también conocidos como bioinoculantes o inoculantes microbianos, son productos agrobiotecnológicos que contienen microorganismos vivos o latentes (bacterias u hongos, solos o combinados) que son agregados a los cultivos para estimular su crecimiento y productividad.

**Fitohormonas:** también conocidas como hormonas vegetales, son sustancias producidas por algunas células vegetales en sitios estratégicos de la planta, que son capaces de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas.

**Monómeros:** molécula simple relativamente pequeña que puede ligarse a otras para formar un polímero.

**Nitrogenasa:** complejo catalítico de enzimas utilizadas por las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico para romper el nitrógeno molecular ( $N_2$ ) presente en la atmosfera y combinarlo con hidrogeno, con el objetivo de formar ( $NH_4^+$ ), del cual a su vez se deriva la síntesis de aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas.

**Polisacáridos:** biomoléculas formadas por la unión de una gran cantidad de monosacáridos. Se encuentran entre los glúcidos y cumplen funciones diversas, sobre todo de reservas energéticas y estructurales.

## Resumen

La pérdida de fertilidad de los suelos agrícolas es un problema de gran importancia en la actualidad. Una alternativa para subsanarlo es el uso de biofertilizantes novedosos que no sean de origen sintético. El objetivo de esta investigación fue producir y evaluar el efecto biofertilizante de una cianobacteria del género *Fischerella*, encapsulada en alginato y/o quitosano. Para ello, se reactivó la cianobacteria y se incrementó su biomasa en condiciones ambientales, hasta un volumen de cultivo de 20 L, usados para la elaboración de los bioencapsulados (2500 perlas/L). Posteriormente se estableció un cultivo de rábano (modelo), para aplicar cuatro tipos de encapsulado (E): perlas de Ca-alginato (A) y perlas de Ca-alginato/quitosano (AQ), ambos sin (CA y CAQ) y con (EAF y EAQF) cianobacterias. Como controles se utilizó fertilizante Triple 17 (NPK), alginato en polvo (AP), quitosano en polvo (QP), *Fischerella* (FF) y testigo = Agua (T). Semanalmente se midieron las variables: peso, longitud, diámetros del bulbo y concentración de clorofila, en un cultivo con 40 plantas por tratamiento, cada uno con tres replicas. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Los bioencapsulados EAF, EAQF y el fertilizante T17 promovieron el crecimiento y desarrollo de las plantas de rábano. De los tratamientos experimentales se eligió el encapsulado de *Fischerella* en Ca-alginato (EAF) para realizar un segundo experimento, esta vez combinado con diferentes proporciones de fertilizante (T17). Las variables evaluadas fueron las mismas. Los resultados mostraron que la combinación de 40 % de bioencapsulado y 60 % fertilizante, produjo un crecimiento y desarrollo significativamente mayor en los siguientes parámetros: longitud de las hojas (21 cm), diámetro polar (3.2 cm), diámetro ecuatorial del bulbo (1.8 cm), peso fresco de las hojas (9.5 g), peso fresco del bulbo (5.6 g) y contenido de clorofila "a" (0.9 mg. g<sup>-1</sup>). El análisis químico proximal no mostró diferencias significativas en el contenido de cenizas, grasa, fibra y proteína entre las plantas de rábano. La evaluación fisicoquímica del sustrato tampoco mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, se incrementó el contenido de nitrógeno (0.1 %), fósforo (70 %) y la capacidad de retención de agua (10 %), comparados con las condiciones iniciales. Se concluye que el encapsulado de Ca-alginato-*Fischerella* es una alternativa de fertilización biológica eficiente que aporta el nitrógeno requerido por la planta y permite reducir la dosis de fertilizante químico hasta en un 40 %.

**Palabras clave:** alginato, bioencapsulado, biofertilizante, cianobacteria, *Fischerella* sp., *Raphanus sativus*, quitosano.

## Abstract

The loss of fertility in agricultural soils is an important problem. An alternative remedy to using synthetic fertilizers is the use of natural biofertilizers. The objective of this research was to produce and evaluate the biofertilizer effect of the cyanobacterium *Fischerella* sp., encapsulated in alginate and/or chitosan. The cyanobacterium was reactivated and cultured under environmental conditions up to a volume of 20 L (2500 capsules / L). Four types of encapsulation (E) were then tested on cultured radishes (model): Ca-alginate capsules and Ca-alginate (A) / chitosan capsules (AQ), both without (CA and CAQ) and with (EAF and EAQF) cyanobacterium. Triple 17 (NPK), powder alginate (AP), chitosan powder (QP), *Fischerella* (FF) and Water (T) were used as controls. Weight, length, bulb diameters and chlorophyll *a* concentration in the radishes were measured weekly in a culture with 40 plants per treatment (three replicates). The bioencapsulated EAF, EAQF and T17 promoted statistically significant increases in the growth and development of radish plants. Based on these experimental treatments *Fischerella* encapsulated in Ca-alginate (EAF) was chosen to perform another experiment, combining bioencapsulation with different proportions of fertilizer (T17). The variables evaluated were the same as in the first experiment. The results showed that the combination of 40 % bioencapsulation and 60 % fertilizer produced significantly higher growth and longer leaves (21 cm), polar diameter (3.2 cm), equatorial bulb (1.8 cm), higher fresh weight of leaves (9.5 g), fresh bulb weight (5.6 g) and chlorophyll "a" content (0.9 mg g<sup>-1</sup>). The proximal chemical analysis showed no significant differences in the ash content, fat, fiber, and protein among radish plant treatments. There were significant differences in the physicochemical composition of the substrate among treatments. However, the content of nitrogen (0.1 %), phosphorus (70 %) and water retention capacity (10 %) increased compared to the initial conditions. These results show that the Ca-alginate encapsulated *Fischerella* is an efficient biological fertilization alternative that contributes to the nitrogen required by the plant and allows up to a 40 % reduction in the amount of synthetic chemical fertilizer.

**Key words:** alginate, bioencapsulated, biofertilizer, chitosan, cyanobacteria, *Fischerella* sp., *Raphanus sativus*.



## 1. Introducción

Los fertilizantes producidos por síntesis química tienen un impacto positivo en el aumento de la productividad por unidad de superficie y presentan como ventaja su fácil almacenamiento y aplicación. Sin embargo, el uso excesivo de estos materiales provoca daños al ambiente, por ejemplo, la contaminación de mantos acuíferos por nitratos, daño a los suelos por la pérdida de nutrientes, acidificación, salinización, erosión y en los casos más críticos, suelos estériles. También ocurre un desequilibrio biológico, por eliminación de microorganismos benéficos, eutrofización y surgimiento de patógenos y plagas (Aguado-Santacruz, 2012).

Debido a la problemática actual por el uso excesivo de fertilizantes de síntesis química y con la intención de eliminar estos problemas. Se han realizado estudios en la búsqueda de métodos alternativos de fertilización como la inmovilización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal en biopolímeros (alginato, quitosano, etc.) que no pongan en riesgo la integridad y el potencial de producción de los suelos agrícolas.

En el suelo las cianobacterias fijadoras de nitrógeno son la base de la cadena trófica microbiana. Estas forman parte de un reducido grupo de microorganismos, que captan el nitrógeno atmosférico y lo dejan disponible en forma de amonio, para ser usado por otros microorganismos y plantas. También producen fitohormonas y vitaminas que actúan como promotores de crecimiento. Al ser microorganismos fotoautótrofos, son productores de polisacáridos, los cuales se liberan al exterior para ser utilizados por los microorganismos como fuentes de carbono. Las características químicas de estos polímeros permiten mantener la unión de las partículas y la humedad del suelo (Valerio *et al.* 2009).

La combinación de ambos componentes (*Fischerella* sp. y biopolímeros) pueden proporcionar nuevas alternativas de uso y aplicación de la cianobacteria. Por lo anterior, en el presente trabajo se propone el uso de la cianobacteria encapsulada como una alternativa de fertilización y contribución a disminuir la contaminación de los suelos agrícolas, sustituyendo parcialmente el uso de fertilizantes de síntesis química.

## 1.1. Biofertilizantes

Los fertilizantes biológicos o biofertilizantes son preparados a base de microorganismos no patógenos, propios del suelo o de las plantas. Estos cultivos son reproducidos y multiplicados a nivel de laboratorio para obtener una tasa de crecimiento de la población en cultivo, mayor a las que normalmente existen en la naturaleza y poder ser utilizados como promotores de crecimiento para las plantas (Cruz, 2009). En la actualidad se conocen tres tipos de microorganismos para la elaboración de los fertilizantes biológicos que son: a) los hongos micorrícicos, que ayudan a incrementar la capacidad de absorción y aprovechamiento de nutrientes, b) las bacterias fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de minerales y c) las cianobacterias, que poseen la capacidad de fijar nitrógeno y contribuyen al mantenimiento de la fertilidad de los suelos y nutrición de los cultivos (Alarcón y Ferrera, 1999; Martínez, 2001; Pankratova, 2006).

## 1.2. Cianobacterias fijadoras de nitrógeno

Las cianobacterias son microorganismos procariotas fotoautótrofos, que pertenecen al Phylum Cyanobacteria (Garbisu *et al.*, 1999; Franco, 2004). Debido a la coloración que presentan, son conocidas como algas verde-azules, las cuales se identifican por su capacidad de realizar la fotosíntesis con producción de oxígeno. Al igual que las microalgas y las plantas superiores, las cianobacterias utilizan luz, CO<sub>2</sub>, agua y otros nutrimentos para obtener la energía necesaria para crecer (Franco, 2004).

Las cianobacterias son microorganismos que pueden encontrarse en cualquier ambiente, tanto en el agua como en el suelo, ayudan a la acumulación de humus mediante cuatro rutas principales (Lee, 1999):

1. Mantienen la unión de las partículas del suelo, evitando la erosión del mismo. Esto lo logran mediante una envoltura gelatinosa (mucilago) y por su patrón de crecimiento, que produce una estrecha red que envuelve dichas partículas.
2. Ayudan a que el suelo se mantenga húmedo.
3. Forman parte del reducido grupo de Microorganismos Fijadores de Nitrógeno (MFN) en el suelo.

4. Suministran a las plantas de sustancias que actúan como promotores del crecimiento o fitohormonas como las citoquininas.

#### 1.2.2. *Fischerella* sp.

El género *Fischerella*, pertenece a la Clase Cyanophyceae, Orden Stigonematales, Familia Fischerellaceae, hasta el momento se han reportado dos especies (*F. muscicola* y *F. thermalis*) y cuatro más identificadas únicamente a nivel de género. Son microorganismos filamentosos uni o multiseriados individuales o agrupados, que presentan ramificaciones verdaderas, con tricomas basales, generalmente cilíndricas, presenta células a menudo alargadas y recubrimientos delgados, principalmente incoloros. Presenta heterocistos intercalares, y acinetos que se desarrollan ocasionalmente en tricomas basales, poseen un par de vainas constituidas de lipopolisacáridos, los cuales son estructuras que cubren a las células lateralmente (Fig. 1) (Komárek, 1992).

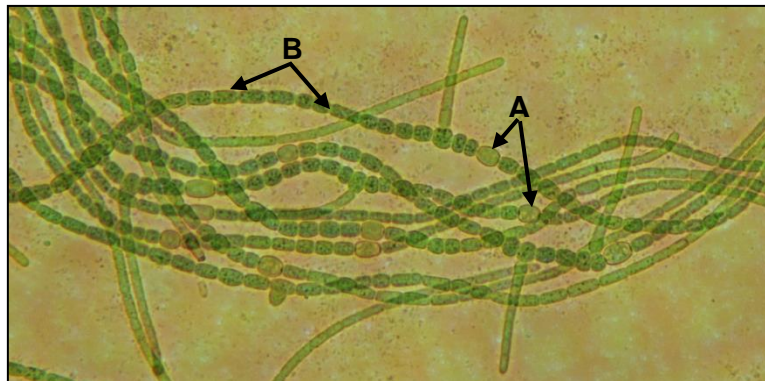


Fig. 1. *Fischerella* sp. A: Heterocisto, B: Células vegetativas (Tomada de Alonso-Santos, 2013).

*Fischerella* sp., como la mayoría de las cianobacterias, tienen la capacidad de tomar  $N_2$  atmosférico y reducirlo a  $NH_4^+$  por medio del complejo enzimático nitrogenasa. Sin embargo, debido a la sensibilidad al oxígeno de este complejo, al igual que otras cianobacterias filamentosas, ha desarrollado un mecanismo para proteger a la enzima nitrogenasa de la inactivación por el oxígeno. Entre ellos, la producción de células especializadas llamadas heterocistos, los cuales se encuentran distribuidos a lo largo o al final del filamento (Fig. 3). Los heterocistos no realizan fotosíntesis y están

rodeados de una pared glucolípídica gruesa que reduce la difusión del oxígeno hacia las células (Hanselkorn, 1978; Kangatharalingam *et al.*, 1992).

La fijación biológica del nitrógeno (FBN) es el principal mecanismo de aporte de nitrógeno en los ecosistemas naturales y es muy importante en la agricultura, ya que es la manera más afectiva, menos costosa y no contaminante, para mejorar la fertilidad del suelo comparada con otras vías (como la fertilización química y la orgánica), las cuales contribuyen con elevados niveles de contaminación con metales pesados, sales nitrogenadas y microorganismos patógenos para el ser humano, por lo cual la aplicación de fertilizantes no es una opción sostenida a largo plazo para mejorar la fertilidad de los suelos (Baca *et al.*, 2000).

### 1.3. Inmovilización celular

La inmovilización celular puede ser definida como la ubicación física de células en un espacio o región específica de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener su actividad catalítica deseada (Karel *et al.*, 1985). Esta metodología consiste en atrapar células vivas y garantizar su viabilidad, así como mejorar el aprovechamiento de los metabolitos producidos por los microorganismos mediante la lenta liberación para diversas aplicaciones.

#### 1.3.1. Alginato

El alginato es un componente de la pared celular de las algas cafés, formado por dos tipos de unidades monoméricas: el ácido  $\beta$ -D manurónico (M) y el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) (Espín *et al.*, 2000; Sabra *et al.*, 2000; Hernández-Carmona *et al.*, 2012). Cuando una solución de alginato se encuentra expuesta a la presencia de diferentes iones alcalinotérreos (principalmente calcio), forman redes por entrecruzamiento con los monómeros del ácido gulurónico, lo cual permite la formación de geles, no reversibles y de gran tensión superficial (Flores-Castaños, 2010; Draget *et al.*, 2005).

La capacidad de gelificación de los alginatos ha sido aprovechada para la inmovilización de diferentes compuestos bio-activos, por ejemplo, enzimas y diversos metabolitos secundarios, (terpenoides, compuestos fenólicos, etc.), así como variados tipos celulares (bacterias, algas, hongos, células de plantas y células de animales), ya

sea de manera única o combinada. La inmovilización de este tipo de células puede ser utilizada en varios procesos, como en la remoción de nutrientes de aguas residuales (Bashan *et al.*, 2002) o para la promoción del crecimiento de plantas mediante inoculantes (Bashan, 1986, 1998; Bashan *et al.*, 2002; Yabur *et al.* 2007).

### 1.3.2. Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada), el cual es extraído de la quitina mediante un proceso de desacetilación (Kean *et al.*, 2005).

La quitina forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como los artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos. Se trata además de un subproducto importante de varias industrias como la pesquera y la cervecera. La quitina y el quitosano son biopolímeros que en los últimos años se les han encontrado gran cantidad de aplicaciones, especialmente en la industria alimentaria y biotecnológica (Okuyama *et al.*, 2000).

Algunas de las propiedades funcionales del quitosano son su biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, efecto antimicrobiano, anticolesterolemia y antioxidante (Aranaz, *et al.*, 2009). Estas propiedades funcionales han promovido su utilización en campos industriales como la agricultura y medicina. En la agricultura, el quitosano se ha descrito como un agente para el control de enfermedades virales en plantas y como aditivo en fertilizantes (Agulló, *et al.*, 2004).

### 1.4. Cultivo de rábano (*Raphanus sativus*)

El rábano pertenece a la familia de las Crucíferas. En esta se engloban 380 géneros y unas 3,000 especies propias de regiones templadas o frías.

*R. sativus* es una variedad de ciclo corto que se puede cosechar cuatro semanas después de la siembra. Se puede sembrar durante todo el año siempre que no haya riesgo de heladas intensas. El tubérculo es pequeño y redondeado (Valles, 2010).

El rábano puede ser cultivado en la mayoría de las zonas durante todo el año. El ciclo de cultivo puede variar de 20 días a más de 45, dependiendo de las condiciones climáticas bajo las cuales se encuentre. Su desarrollo vegetativo se lleva a cabo entre 6 y 30 °C, siendo el intervalo óptimo entre los 18 y 22 °C. Presenta exigencias mínimas en cuanto al tipo de suelo, pero se ha demostrado una preferencia por suelos francos y presenta poca tolerancia a la salinidad (Viven, 2010).

El tiempo de germinación es de cinco a diez días y la siembra se realiza directamente a una profundidad de un centímetro en el sitio definitivo (Seymour, 2002; Trentini, 2003). En general los requerimientos nutricionales del cultivo de rábano por hectárea son: 80 kg de nitrógeno, 120 kg de fósforo y 80 kg de potasio. Debido a que el ciclo de cultivo es bastante corto, estos cultivos requieren de elementos nutritivos que sean fácilmente asimilables desde la siembra. (Ruano, 2002).

Debido a las características que presenta el cultivo de rábano como: ciclo corto, bajas exigencias respecto al clima, temperatura, suelo y temporada de siembra, se ha elegido como cultivo modelo para la evaluación de la efectividad del biofertilizante propuesto a base de *Fischerella*. La principal ventaja del cultivo de rábano es que brinda información importante en cuanto al aprovechamiento de los nutrientes diferenciando el crecimiento en las distintas partes de la planta, (foliar o aérea y la subterránea (raíz y bulbo), lo cual puede utilizarse como un modelo para la aplicación del biofertilizante en distintos tipos de cultivos.

## **2. Antecedentes**

La capacidad de las cianobacterias de fijar el nitrógeno y producir sustancias promotoras del desarrollo para las plantas ha generado mucho interés en los investigadores de diferentes partes del mundo desde las últimas décadas del siglo pasado, por lo que han sido objeto de constante estudio. Un análisis de las sustancias celulares y extracelulares excretadas por las cianobacterias mostró que las células presentaban altas concentraciones de diversos aminoácidos, además de polisacáridos intra y extra celulares. Adicionalmente se detectó la presencia de auxinas las cuales son estimulantes para el crecimiento de plantas (Roger *et al.*, 1986).

La fijación biológica del nitrógeno ( $N_2$ ) por cianobacterias evaluada mediante el método de reducción de acetileno, ha registrado una fijación entre 70 y 80 kg N ha<sup>-1</sup>. (Roger y Lada, 1992)

Se ha reportado el desarrollo de un biofertilizante a base de cianobacterias colectadas de un campo de cultivo de arroz en Chile, con base en nueve especies de cianobacterias fijadoras de nitrógeno. Estas fueron utilizadas como biofertilizante, aplicado a campos de cultivo de arroz y se evaluó su eficiencia comparándolos con campos fertilizados químicamente y otros fertilizados de manera combinada con cianobacterias. La cosecha fue similar para ambos casos, con la ventaja de que, en el cultivo con fertilización combinada, el uso de fertilizante químico se redujo hasta en 50 % (Pereira *et al.*, 2009).

Muestras de un campo de arroz en el estado de Morelos fueron inoculadas en medio BG11<sup>o</sup> en un cultivo de 24 L. Posteriormente analizaron la producción de  $NH_4^+$  y en dos de cuatro cultivos y observaron un mejor desarrollo, posteriormente constataron la presencia de las cianobacterias *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Fischerella* sp. y *Calothrix* sp. (Reyna *et al.*, 2007).

En un experimento se utilizó un consorcio de cianobacterias como biofertilizante y 7.2 kg de fertilizante inorgánico por hectárea (que representa el 65 % de la dosis recomendada), para cultivar maíz en parcelas demostrativas ubicadas en Puerto Escondido Oaxaca. Se obtuvo un rendimiento de 2.8 toneladas de maíz por hectárea y un ahorro en los costos de producción de 37.4 %, en comparación con otras parcelas en las que se invirtió mayor cantidad fertilizante a base de nitrógeno e incluso hasta el 100 % de la dosis recomendada (Trujillo y Ramírez, 2010).

Para el caso de la inmovilización, esta ha sido una técnica que se ha utilizado desde los años 80's para evaluar el crecimiento de diversos tipos de microorganismos y sus implicaciones en aplicaciones biotecnológicas (Pérez-García, 2009).

El inmovilizado de microorganismos ha sido empleado con fines agrícolas y ambientales (Bashan, 1986; Trevors *et al.*, 1993; Cassidy *et al.*, 1996; Bashan, 1998). Algunos han estudiado la remediación de aguas residuales, utilizando técnicas de

inmovilización celular (Chevalier y de la Noüe, 1985; Lau *et al.*, 1997; Tam y Wang, 2000; de Bashan *et al.*, 2002).

La remoción de amonio y fósforo en el tratamiento secundario de aguas residuales se ha realizado principalmente con microalgas del género *Chlorella*, inmovilizada en geles de alginato de *Macrocystis pyrifera* (Bashan, 1986). Determinando que la incorporación de microorganismos al medio residual mediante la inmovilización, permiten una mejor y fácil remoción de amonio y fósforo, al mismo tiempo que se eliminan otros componentes indeseables como metales pesados. (Valderrama *et al.*, 2002; de Bashan *et al.*, 2002, 2004).

También ha resultado muy exitosa la remoción de amonio y fosfatos ( $PO_4^{3-}$ ) en el tratamiento secundario y terciario de aguas residuales por *Chlorella vulgaris*, cuando se encuentra co-inmovilizada con bacterias promotoras de crecimiento de plantas como *Azospirillum brasilense* (González y Bashan, 2000; Lebsky *et al.*, 2001; de Bashan *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2013). Otro experimento exitoso se llevó a cabo con *Azospirillum brasilense* inmovilizado con alginato de *M. pyrifera*, por si solo mostró un efecto positivo en el crecimiento de plantas (Bashan *et al.*, 2002).

A pesar de los trabajos realizados para la inmovilización de microorganismos con perlas elaboradas a base de alginato, son muy pocos los realizados con cianobacterias. Se han encapsulado cianobacterias del género *Nostoc* aisladas de cultivos de arroz (*Oryza sativa*), con alginato de sodio al 1.5 % en medio BG11<sup>o</sup>. Sin embargo, la inmovilización redujo el crecimiento de *Nostoc*, al menos en un 80 %, comparado con su crecimiento en vida libre, a pesar de esto, la actividad de la nitrogenasa incrementó, debido a que la cantidad de células heterocíticas se duplicó, respecto a los obtenidos en el cultivo de vida libre. (Mayasree, 2005).

Por otra parte, se ha propuesto un biofertilizante a base de *Anabaena azollae* inmovilizadas en poliuretano (PU), para el cultivo de arroz, encontrando que la inmovilización incrementa la producción y excreción de amonio al medio, lo cual se reflejó en un mayor crecimiento en la raíz, en los brotes, así como en la producción de biomasa de las plántulas de arroz, en comparación con los controles inoculados sin inmovilizar (Kannaiyan *et al.*, 1997).



Se evaluaron las características estructurales de *Anabaena* ATCC 27893, en la producción de amonio, la cianobacteria inmovilizada con alginato de calcio mostró un incremento en la frecuencia de los heterocistos de 7.1 – 8.1 %; lo cual a su vez se redujo en un incremento de la actividad de la nitrogenasa y con ello la producción de amonio (Musgrave *et al.*, 1983).

En cuanto a *Fischerella* sp., el único estudio realizado para la evaluación del crecimiento y metabolismo de la cianobacteria inmovilizada en Ca-alginato, fue realizado por Alonso-Santos (2015), en el cual se comparó el crecimiento con la cepa en vida libre, obteniendo mayor crecimiento en el medio de cultivo BG11 en vida libre. Sin embargo, la producción de amonio fue mayor en el encapsulado ( $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), incrementándose 2.6 veces ( $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). La producción de carbohidratos fue ligeramente mayor ( $126 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en la cepa encapsulada, comparada con la cultivada en vida libre ( $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), los cuales son dos aspectos importantes para aprovecharlos como promotores del crecimiento vegetal, ya que brindan una mayor estabilidad y permanencia de la cianobacteria en el suelo y un mejor aprovechamiento y asimilación de los metabolitos producidos y sobre todo un incremento en la fijación de nitrógeno como producto principal.

### **3. Justificación**

En las últimas décadas, la demanda de alimento ha crecido a causa del incesante aumento de la población. En los campos de cultivo la siembra se ha intensificado para obtener mayor rendimiento de las cosechas y los agricultores, ante la falta de alternativas y por desconocimiento, incrementan la cantidad de fertilizantes que aplican. Estos excesos sobre los campos de cultivo traen como consecuencias la pérdida de nutrientes y la concentración de sales, que los convierte en suelos salinos, erosionables y a largo plazo en suelos estériles. Ofrecer a los agricultores una alternativa de fertilización de bajo costo, eficiente y útil para mantener la fertilidad de los suelos y que no dañe al ambiente, se ha convertido en una necesidad.

El presente trabajo propone el uso de la cianobacteria fijadora de nitrógeno *Fischerella* sp. inmovilizada en capsulas biodegradables de alginato y/o quitosano como una

alternativa de biofertilización para proporcionar a los cultivos de plantas el nitrógeno necesario para su adecuado desarrollo, además de disminuir el impacto al ambiente.

#### **4. Hipótesis**

El uso de la cianobacteria *Fischerella* sp. encapsulada en alginato y/o quitosano favorecerán el crecimiento del rábano *Raphanus sativus*, lo cual permitirá reducir la dosis de fertilizante comercial recomendado para su cultivo.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1. General**

Evaluar el efecto biofertilizante del encapsulado de alginato y/o quitosano con *Fischerella* sp., sobre el cultivo de rábano (*R. sativus*).

##### **5.2. Específicos**

- Establecer el mejor método de inmovilización celular para la cianobacteria *Fischerella* sp. para su uso como biofertilizante en el cultivo de rábano.
- Evaluar el efecto del uso de encapsulados poliméricos y sus combinaciones (Ca-alginato y Ca-alginato-quitosano) de *Fischerella* sp. en el crecimiento y desarrollo de plantas de rábano.
- Estimar la composición química de las plantas de *R. sativus* mediante un análisis químico proximal al término de los bioensayos.
- Evaluar los cambios fisicoquímicos (nitrógeno total, fósforo extraíble, humedad, pH, y capacidad de retención de agua) del suelo al inicio y al término de los bioensayos.
- Evaluar el uso de mezclas en diferentes proporciones de fertilizante químico y el biofertilizante en el cultivo de *R. sativus*.

#### **6. Materiales y métodos**

La presente investigación se llevó a cabo en cuatro etapas, la primera consistió en el cultivo de la cianobacteria para su activación e incremento en biomasa, obtenida de la colección de cianobacterias del laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Mar.

La segunda comprendió la inmovilización y el bioencapsulado de la biomasa de *Fischerella* sp. en matrices de alginato de calcio (Ca-alginato) y alginato-quitosano (Ca-alginato-quitosano). La tercera incluyó la aplicación y evaluación del bioencapsulado en un cultivo de rábano. Esta última se dividió en dos sub-etapas, la primera consistió en probar diferentes tipos de aplicaciones del encapsulado (detallados más adelante), para determinar el mejor tratamiento para el cultivo de rábano. Una vez seleccionado el mejor tratamiento, se aplicó en el cultivo de rábano en combinación con diferentes proporciones de fertilizante agroquímico. Por último, se realizó el análisis químico proximal de las plantas (grasa, fibra, humedad, proteína, ceniza y extracto libre de nitrógeno), así como la caracterización edafológica inicial y final del sustrato empleado para los dos bioensayos, al término de los mismos.

#### 6.1. Reactivación y crecimiento de *Fischerella* sp.

La reactivación de la cianobacteria se llevó a cabo en medio de cultivo BG11 (Rippka *et al.*, 1979) (Anexo 1), la cual consistió en agregar 0.5 g de *Fischerella* sp. liofilizada en 250 mL de medio de cultivo. Se mantuvo a una irradiación constante de  $13.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con un fotoperiodo de 12:12 (luz: oscuridad) y aireación constante, a una temperatura de 25 °C. Una vez que se reactivó la cepa, se procedió a realizar los escalamientos necesarios para incrementar la biomasa, los cuales se realizaron primero en recipientes de 500 mL, posteriormente a 2 L y finalmente en recipientes de 20 L. En cada uno de los escalamientos se utilizó un inóculo del 2 % del volumen total (p/v). Los garrafones de 20 L se mantuvieron bajo una malla de un 70 % de cobertura en condiciones ambientales a la intemperie y luz natural con un máximo de  $33.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de 25 - 36 °C y fotoperiodo de 13: 11 (horas luz: horas oscuridad).

El volumen total obtenido fue de 100 L de cultivo de la *Fischerella* sp. Una vez obtenido el volumen de cultivo se realizó la separación de la biomasa por filtración al vacío, con filtros de 13 cm de diámetro con una abertura de poro de 5-8  $\mu\text{m}$ , para proceder a la inmovilización de las mismas, como se describe a continuación, inmediatamente después de la obtención de biomasa.

## 6.2. Inmovilización celular

### 6.2.1. Encapsulado de Ca-alginato

Para la inmovilización celular en Ca-alginato, se preparó una solución de alginato de sodio al 2.5 % en agua destilada (viscosidad: 1,680 mPa.s, fuerza de gel: 4,360 g.cm<sup>-2</sup>). Se prepararon 4 L con 100 g de alginato, una vez disuelto el alginato, se agregaron 20 g de cianobacterias (peso fresco) para obtener una solución Na-alginato-cianobacterias al 0.5 % (p/v). Posteriormente, la suspensión de cianobacterias/Na-alginato se añadió por goteo con una bomba peristáltica, a una solución de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) al 10 %, en la cual, mediante un intercambio iónico, se formaron las perlas gelificadas de Ca-alginato/cianobacterias de un tamaño promedio de 3 a 4 mm de diámetro. Se retiraron las perlas de la solución de CaCl<sub>2</sub> y se lavaron cuatro veces con abundante agua destilada para eliminar el exceso de calcio y se colocaron en un garrafón de vidrio de 20 L adicionado previamente con medio de cultivo BG11 (Anexo 1).

### 6.2.2. Encapsulado de Ca-alginato-quitosano

Para la inmovilización celular en Ca-alginato-quitosano se realizó el mismo proceso mencionado en el apartado anterior, con las mismas concentraciones en las soluciones y siguiendo el mismo procedimiento hasta recuperar las perlas de la solución de CaCl<sub>2</sub>. Posteriormente, las perlas se colocaron en una solución de quitosano al 2% con agitación constante durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se recuperaron y se lavaron cuatro veces con abundante agua para eliminar el exceso de quitosano. En este caso se obtuvo un encapsulado bicapa. Posteriormente fueron colocadas en un garrafón de vidrio con 15 L de medio de cultivo BG11<sup>o</sup>.

Para los tratamientos sin cianobacterias se realizaron los procedimientos descritos en los apartados 6.2.1 y 6.2.2 omitiendo el agregado de la biomasa en fresco de *Fischerella* sp.

## 6.3. Primera evaluación experimental en el cultivo de rábano (*R. sativus*)

### 6.3.1. Acondicionamiento de charolas de cultivo

Las unidades experimentales consistieron en 9 tratamientos por triplicado, dando un total de 27 unidades experimentales. Las charolas se etiquetaron para identificar el tratamiento al que correspondían, se llenaron con sustrato Pet moss® (comercial) y se regaron abundantemente un día antes de la siembra.

El diseño experimental (Fig. 2) se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente esquema de aplicación de biofertilizante: a) encapsulado en Ca-alginato (A), b) encapsulado en Ca-alginato-quitosano (AQ), cada uno con dos factores: con cianobacterias (EAF, EAQF) y sin cianobacterias (CA, CAQ). Dando un total de cuatro tratamientos, más cinco controles que consistieron en aplicar a las plantas: 1) fertilizante triple 17 (T17, NPK), 2) quitosano (QP) en polvo, 3) alginato en polvo (AP), 4) cianobacterias en fresco (FF) y 5) el testigo (T) que consistió en agua únicamente.

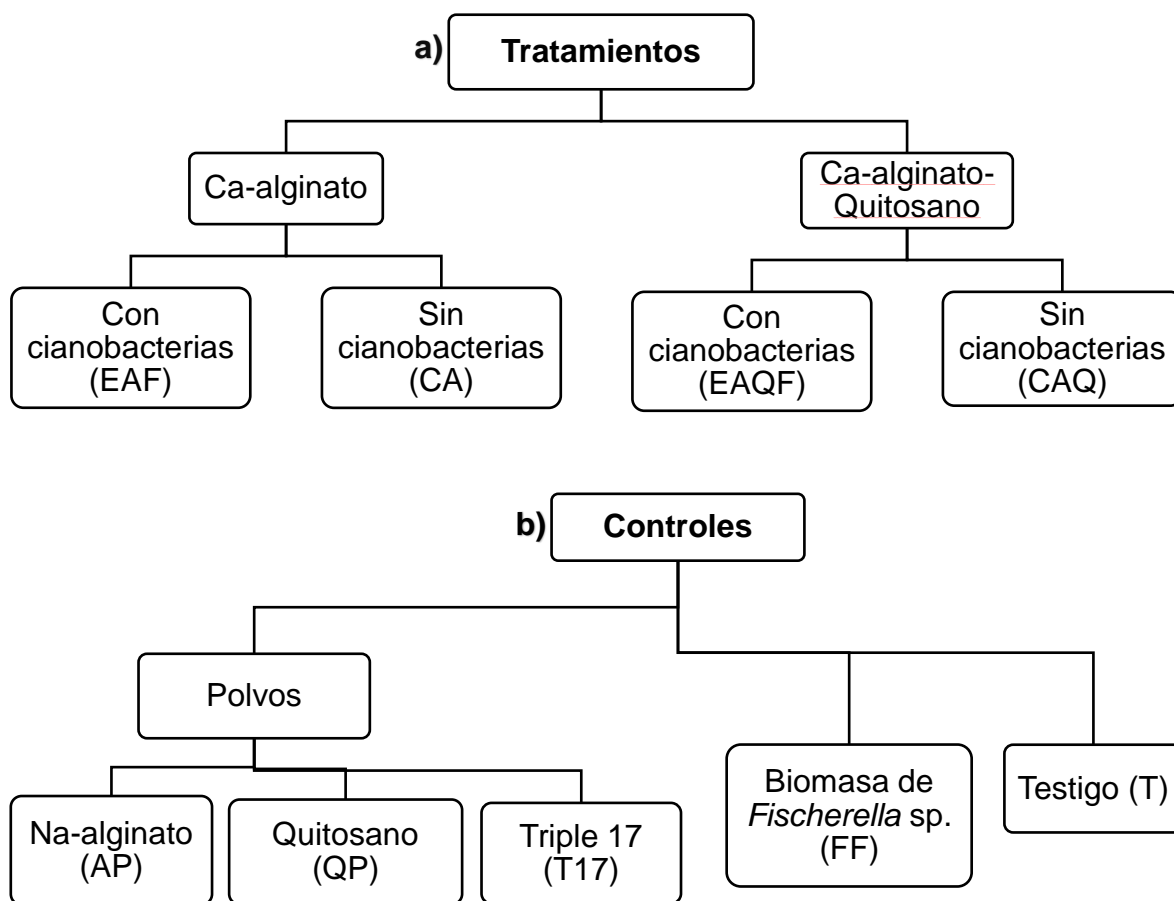


Fig. 2. Diseño experimental para la preparación de los a) tratamientos, b) controles y su aplicación a un cultivo de *Raphanus sativus*.

Se sembraron 40 semillas en cada charola colocándolas a 1 cm de profundidad, dejando un espacio de aproximadamente 5 cm entre cada una de ellas. Se regaron inmediatamente después de realizar la siembra y la germinación ocurrió una semana después. Se dejaron crecer los germinados con la aplicación de agua durante una semana, la aplicación se realizó con regadera manual para evitar el escarbe en el sustrato. Se aplicó la cantidad suficiente de agua para conservar la humedad del suelo, siendo la misma cantidad para cada una de las unidades experimentales y posteriormente se les aplicó el tratamiento correspondiente como se muestra en la tabla I.

Tabla I. Tratamientos aplicados y cantidades utilizadas en la primera evaluación.

<b>Tratamientos</b>	<b>Abreviaturas</b>	<b>Cantidad utilizada (g)</b>
Encapsulado de Alginato- <i>Fischerella</i>	EAF	300
Encapsulado de Alginato- Quitosano- <i>Fischerella</i>	EAQF	300
Cápsulas de alginato	CA	300
Cápsulas de alginato- quitosano	CAQ	300
Alginato en polvo	AP	33.3
Quitosano en polvo	QP	3
<i>Fischerella</i> sp. fresca	FF	13.3
Fertilizante Triple 17	T17	9.4
Agua	T	—

Las cantidades utilizadas en cada tratamiento se determinaron de acuerdo con la aproximación de fijación de nitrógeno aportada por cantidad de biomasa de las cianobacterias reportada en la literatura por Roger y Lada, (1992); Alonso-Santos, (2015).

En este primer experimento se determinó el mejor tratamiento, que propició el mayor crecimiento y desarrollo de las plantas de *R. sativus*. Este tratamiento fue utilizado en

el segundo experimento para evaluar su efecto con diferentes proporciones de Alginato-*Fischerella*: Fertilizante químico Triple 17.

### 6.3.2. Evaluación de la sustitución parcial de fertilizante sobre el cultivo de *R. sativus*

Las unidades experimentales consistieron en 7 tratamientos por triplicado, dando un total de 21 unidades. Las charolas se etiquetaron para identificar el tratamiento correspondiente, se llenaron con sustrato Peat moss® (comercial) y se regaron abundantemente un día antes de la siembra.

El diseño experimental consistió en una combinación del mejor tratamiento encontrado en el primer experimento, que fue el encapsulado de Ca-alginato-*Fischerella* combinado con el fertilizante químico Triple 17 en diferentes proporciones (Tabla II).

Tabla II. Proporciones de bioencapsulado de Ca-Alginato-*Fischerella* (EAF) y fertilizante (T17) aplicados a cada unidad experimental en el segundo experimento sobre el cultivo de rábano *Raphanus sativus*.

Tratamiento	Porcentajes (%)		Cantidad (g)	
	EAF	T17	EAF	T17
20EAF: 80T17	20	80	60	7.52
40EAF: 60T17	40	60	120	5.64
50EAF: 50T17	50	50	150	4.70
60EAF: 40T17	60	40	180	3.76
80EAF: 20T17	80	20	240	1.88
100EAF	100	0	300	0.00
100T17	0	100	0	9.4

De la misma manera como se realizó en el primer experimento, se sembraron 40 semillas en cada charola, colocándolas a 1 cm de profundidad, dejando un espacio de aproximadamente 5 cm entre cada una de ellas. Las cajas se regaron inmediatamente después de realizar la siembra, la germinación ocurrió una semana después.

Posteriormente, se dejaron crecer las plantas, manteniendo la aplicación de agua durante una semana y posteriormente se les aplicó el tratamiento correspondiente como se muestra en la tabla II, la cantidad de triple 17 utilizada corresponde a la dosis recomendada para el cultivo convencional y a partir de esa cantidad se redujeron las concentraciones en el porcentaje correspondiente, elegidas para este trabajo. Las plantas se regaron inmediatamente después de agregarles el respectivo tratamiento. Cada una de las charolas fue rotulada para su identificación.

#### 6.3.3. Toma de muestras

A partir del momento en que se aplicaron cada uno de los tratamientos se obtuvo la primera muestra, tomando azarosamente cinco plantas de cada uno de los tratamientos y sus réplicas como muestra semanal. A cada planta se le midieron los siguientes parámetros de respuesta: longitud (raíz y planta) con una regla, así como el diámetro ecuatorial y polar del bulbo, el cual fue medido con un vernier. Se obtuvo el peso fresco y posteriormente se secaron en estufa a 60 °C durante 72 horas para obtener el peso seco del bulbo y las hojas.

Para la evaluación de la concentración de clorofila se utilizaron las plantas en fresco aplicando el método de Mackinney (1941).

#### 6.3.4. Análisis químico proximal

El análisis químico proximal de las plantas secas y molidas se realizó al final de cada uno de los bioensayos, la determinación del contenido de humedad se realizó con el método por secado en estufa (Nielsen, 2003). El contenido de cenizas totales se llevó a cabo por el método de calcinación (Kirk *et al.* 1996), la determinación de grasa por el método de Soxhlet (James, 1999). La determinación del contenido de fibra cruda se realizó por el método oficial de la AOAC 991.43 (2000). La determinación del contenido de proteína cruda se realizó mediante el método Kjeldahl (AOAC Official Method 2001.11) y por último la determinación del extracto libre de nitrógeno (ELN) se obtuvo como la resultante de restar a 100 los porcentajes calculados para cada uno de los nutrientes mencionados anteriormente. Dentro de este concepto se agrupan todos los elementos no evaluados con los métodos señalados anteriormente dentro del análisis



proximal, constituido principalmente por carbohidratos no digeribles, vitaminas y demás compuestos orgánicos no solubles y no nitrogenados.

#### 6.3.5. Caracterización fisicoquímica del sustrato

El acondicionamiento del suelo, previo a los análisis, consistió en secarlo al sol, posteriormente se tamizó para obtener partículas menores a 0.5 mm y finalmente se procedió a la caracterización de pH por el método electrométrico (NOM-021-RECNAT-2000), humedad por el método gravimétrico (NOM-021-RECNAT-2000), capacidad de retención de agua (CRA) (Forster, 1995), Nitrógeno total (Kjeldahl, 1883) y Fósforo extraíble (NOM-021-RECNAT-2000).

#### 6.3.6. Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos de las variables evaluadas cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad y se analizaron con el software *Statistica 7.0*. Se aplicó un ANOVA Factorial de dos vías para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos, posteriormente se aplicó una prueba *a posteriori* de Mínima Diferencia Significativa (LSD) para determinar diferencias entre los tratamientos.

### 7. Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en tres secciones 1) Primer experimento del crecimiento de las plantas y análisis químico proximal de los bioencapsulados sobre el cultivo de rábano, 2) Segundo experimento del crecimiento de las plantas y análisis químico proximal de las combinaciones bioencapsulado (EAF) y Fertilizante triple 17 (T17) en el cultivo de rábano, y 3) Caracterización fisicoquímica del sustrato utilizado en los dos bioensayos.

#### 7.1. Primer experimento: Efecto de los bioencapsulados en la fertilización de un cultivo de rábano (*R. sativus*)

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en cada una de las variables biométricas evaluadas en las plantas de rábano fertilizadas con los tratamientos Alginato-Fischerella (EAF), Alginato-Quitosano- Fischerella EAQF y el fertilizante T17.

El resto de los tratamientos utilizados como controles (CA, CAQ, AP, QP, FF y T) no mostraron diferencias significativas entre ellos y en todas las variables evaluadas se obtuvo el mismo comportamiento, sin tener una influencia positiva significativa en el crecimiento y desarrollo de las plantas de *R. sativus*, por lo que estos resultados se muestran solo en el Anexo.2.

### 7.1.1. Longitud de las hojas (LH)

Los resultados mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{\text{calc}}=165.05$ ,  $F_{0.05}=1.41$ ,  $\rho<0.05$ ). El crecimiento con el tratamiento T17 (21.63 cm) fue significativamente mayor que el resto de los tratamientos desde la tercera hasta la sexta semana ( $\rho<0.05$ ). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos EAF (16.85 cm) y EAQF (15.68 cm) ( $\rho=0.65$ ).

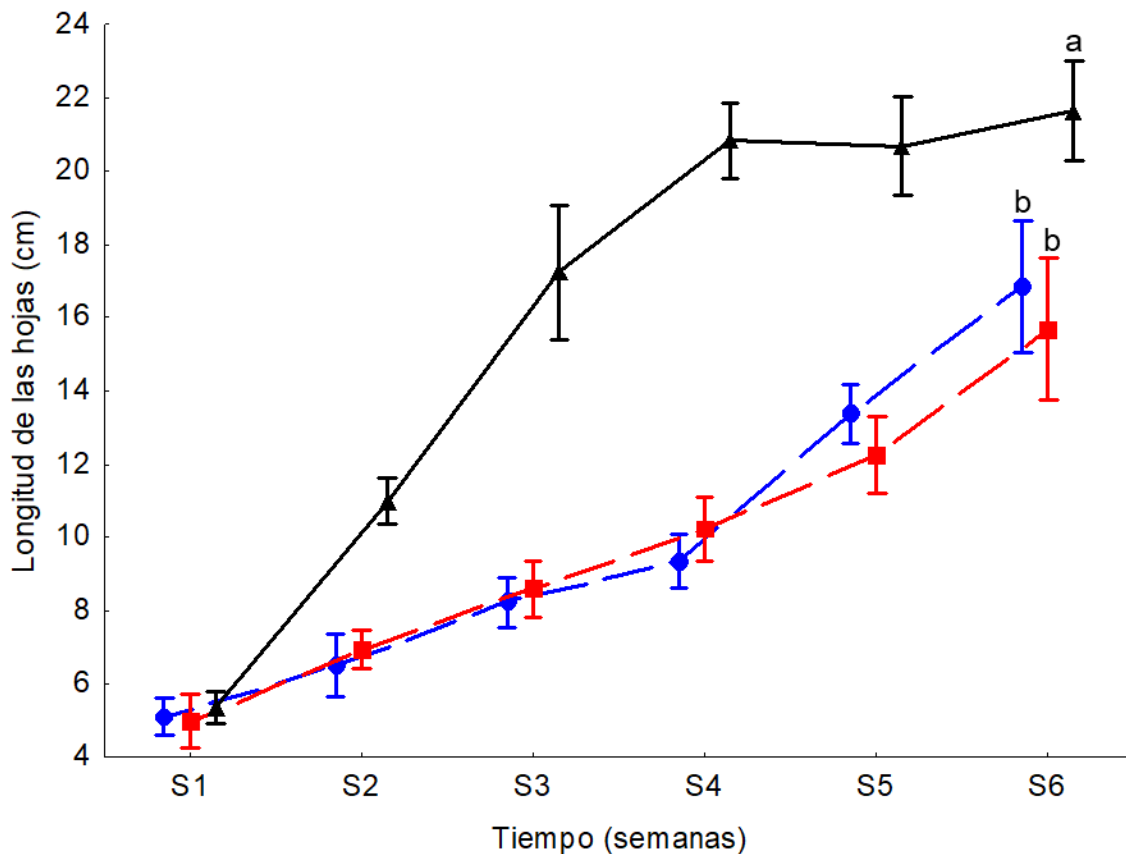


Fig. 3. Longitud de hojas (cm) de *R. sativus* en los diferentes tratamientos, ● Encapsulado de Ca-alginato/Fischerella sp. (EAF), ■ Encapsulado de Ca-alginato/Quitosano/Fischerella sp. (EAQF), ▲ Triple 17 (T17).

### 7.1.2. Diámetro polar (DP) y ecuatorial del bulbo (DE)

El incremento en el diámetro (cm) polar del bulbo al tiempo de cosecha en los tratamientos EAF (3.05), EAQF (3.04) y T17 (2.71) fueron significativamente mayores que en los tratamientos control ( $\rho < 0.05$ ). En los tratamientos donde se les aplicó el encapsulado sin cianobacterias (CA, CAQ) fue significativamente menor (1.5), comparado con los tratamientos que contenían a la cianobacteria encapsulada (Fig. 4a).

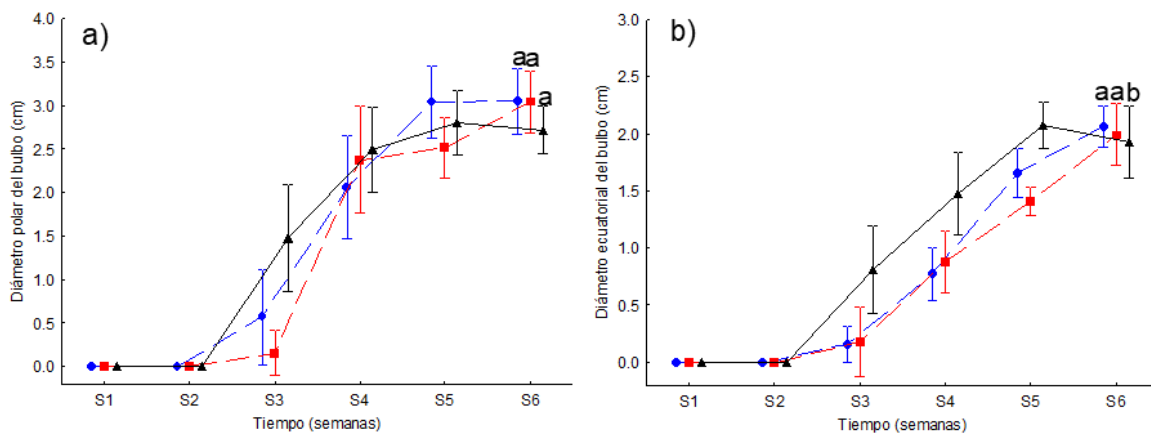


Fig. 4. a) Diámetro polar, b) Diámetro ecuatorial del bulbo (cm) de *R. sativus* en los diferentes tratamientos, ● EAF, ■ EAQF, ▲ T17.

El diámetro ecuatorial promedio (cm) del bulbo (Fig. 4b) de *R. sativus* fue significativamente ( $\rho > 0.05$ ) mayor en los tratamientos EAF (2.06), EAQF (1.99). En las plantas fertilizadas con T17 se obtuvieron los bulbos más pequeños (1.92) en la sexta semana de muestreo ( $F_{\text{calc}} = 6.6$ ,  $F_{0.50} = 1.95$ ,  $\rho < 0.05$ ), pero no fueron significativamente diferentes entre ellos. Los bulbos más grandes se obtuvieron con la aplicación de los dos tipos de bioencapsulado.

### 7.1.3. Longitud de la raíz (LR)

La tendencia fue a desarrollar una mayor longitud con el tratamiento EAF (6.93 cm), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la longitud de la raíz entre

los diferentes tratamientos ( $F_{\text{calc}}= 1.69$ ,  $F_{0.50}= 1.95$ ,  $\rho>0.05$ ). El valor más bajo se obtuvo en el tratamiento EAQF en la cuarta (5.88 cm) en la quinta semana (6.18 cm).

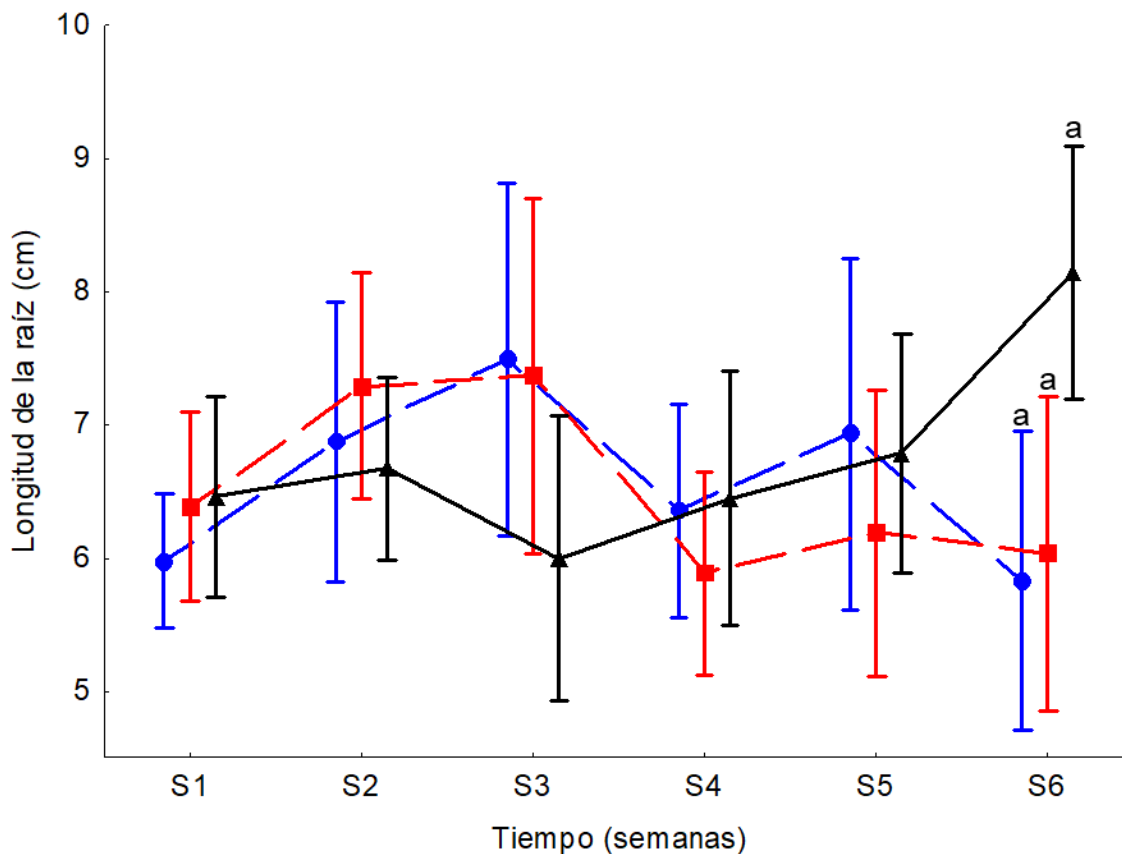


Fig. 5. Longitud de raíz (cm) de *Raphanus sativus* en los diferentes tratamientos, ● EAF, ■ AQFE, ▲ T17.

#### 7.1.4. Peso fresco (PFH) y peso seco de las hojas (PSH)

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados al cultivo, ( $F_{\text{calc}}= 128.02$ ,  $F_{0.50}= 1.95$ ,  $\rho<0.05$ ). El tratamiento con fertilización química T17 fue significativamente mayor (8.69 g) al resto de los tratamientos hasta la sexta semana, cuando se realizó la cosecha ( $\rho<0.05$ ), (Fig. 6a) seguido por los tratamientos EAF (5.36 g) y EAQF (4.79 g).

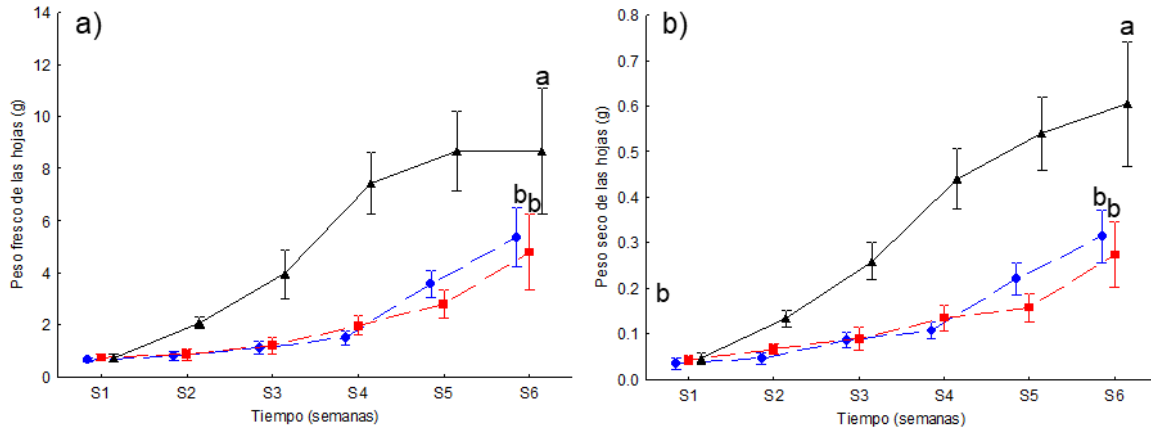


Fig. 6. a) Peso fresco y b) peso seco de las hojas (g) de *R. sativus* en los diferentes tratamientos, ● EAF, ■ EAQF, ▲ T17.

El peso seco de las plantas de rábano (Fig. 6b), presentó el mismo comportamiento que el peso fresco. Las plantas fertilizadas con triple 17 (T17) presentaron un peso seco de las plantas (0.60 g) significativamente mayor ( $F_{\text{calc}}= 143.38$ ,  $F_{0.50}= 1.95$ ,  $\rho < 0.05$ ).

#### 7.1.5. Peso fresco (PFB) y peso seco del bulbo (PSB)

El incremento del peso fresco del bulbo (Fig. 7a) fue más notorio a partir de la tercera semana. Al término del experimento (sexta semana) las plantas fertilizadas con Triple 17 (T17) tuvieron un peso fresco del bulbo (5.59 g) fue significativamente diferente a los tratamientos EAF (5.22 g) y EAQF (5.03 g) ( $\rho < 0.05$ ).

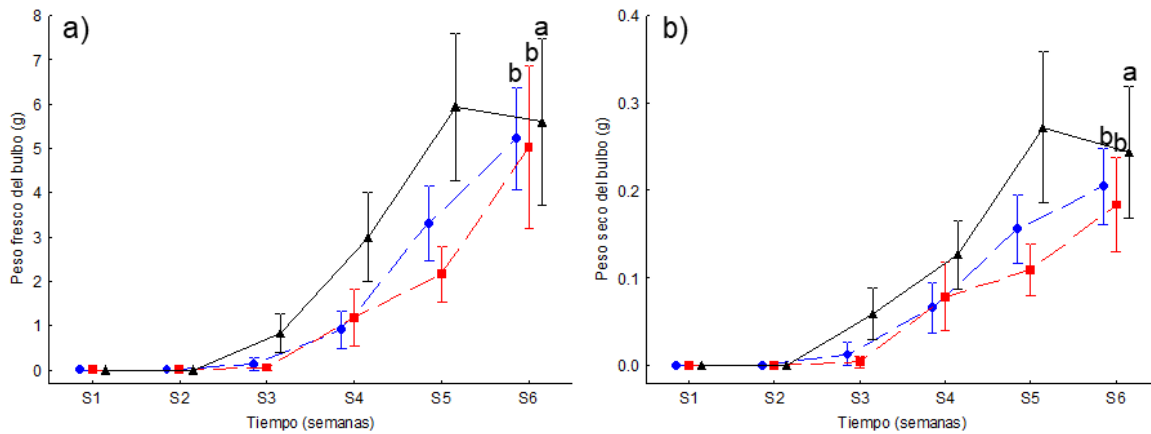


Fig. 7. a) Peso fresco, b) Peso seco del bulbo (g) de *R. sativus* en los diferentes tratamientos, ● EAF, ■ EAQF, ▲ T17.

La tendencia del peso seco del bulbo (Fig.7b) de las plantas fue similar al obtenido en el análisis del peso fresco. El peso promedio fue significativamente mayor ( $F_{\text{calc}}= 21.85$ ,  $F_{0.50}= 1.95$ ,  $p<0.05$ ) en las plantas fertilizadas con el tratamiento con triple 17 (T17), con un promedio de 0.24 g, seguido por el tratamiento EAF con un peso de 0.20 g, seguido por las plantas fertilizadas con EAQF con un peso de 0.18 g.

#### 7.1.6. Número de hojas (NH)

Las hojas cotiledonales emergieron simultáneamente en todos los tratamientos a los cinco días después de la siembra. La emisión de las hojas verdaderas se presentó tres días después. Un número significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) de hojas por planta (Fig. 8) se obtuvo en los tratamientos EAF (6.26) y EAQF (5.93).

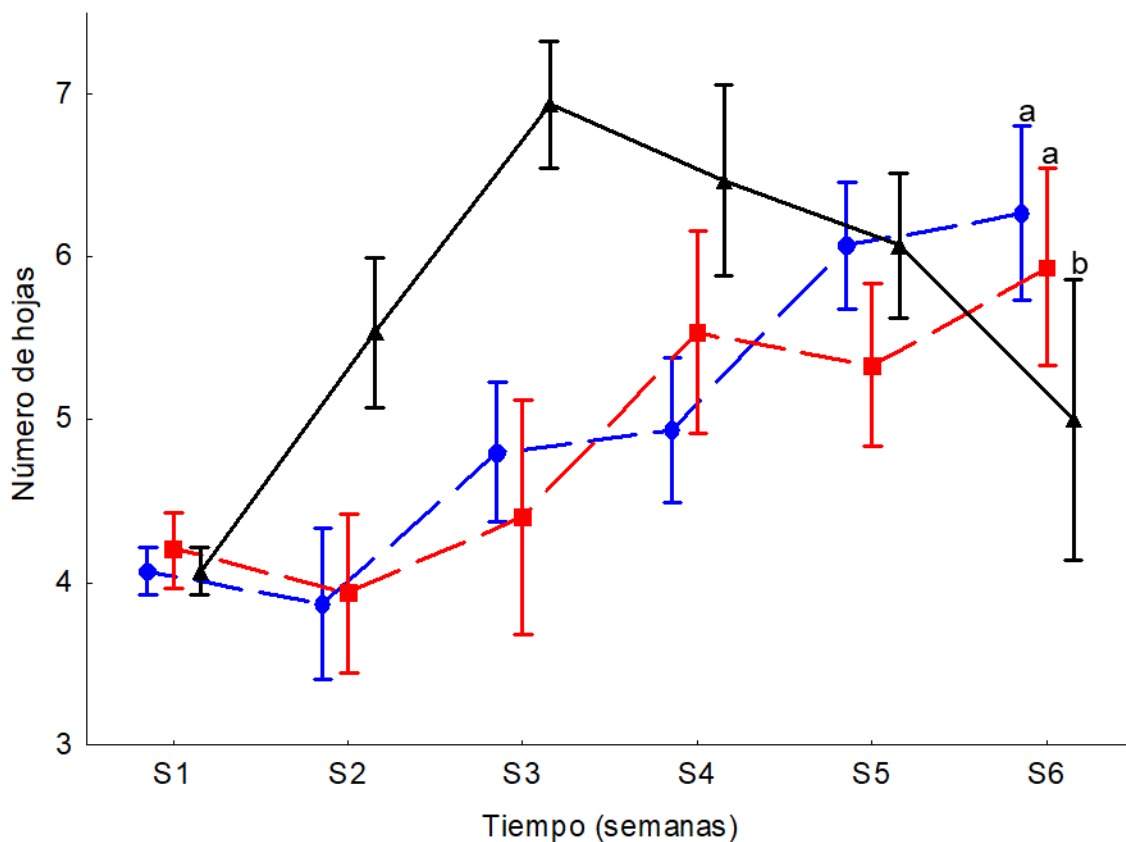


Fig. 8. Número de hojas de las plantas de *R. sativus* en los diferentes tratamientos, ● EAF, ■ EAQF, ▲ T17.

El número de hojas obtenidas en T17 fue significativamente menor (5.00), comparado con los tratamientos mencionados con anterioridad al término del experimento.

#### 7.1.7. Contenido de clorofila "a"

La concentración de clorofila "a" (Fig. 9), de las plantas cultivadas con el tratamiento T17 mostraron una concentración significativamente mayor ( $0.79 \text{ mg.g}^{-1}$ ), a la concentración obtenida en las plantas fertilizadas con EAF ( $0.50 \text{ mg.g}^{-1}$ ) y EAQF ( $0.49 \text{ mg.g}^{-1}$ ) ( $p < 0.05$ ).

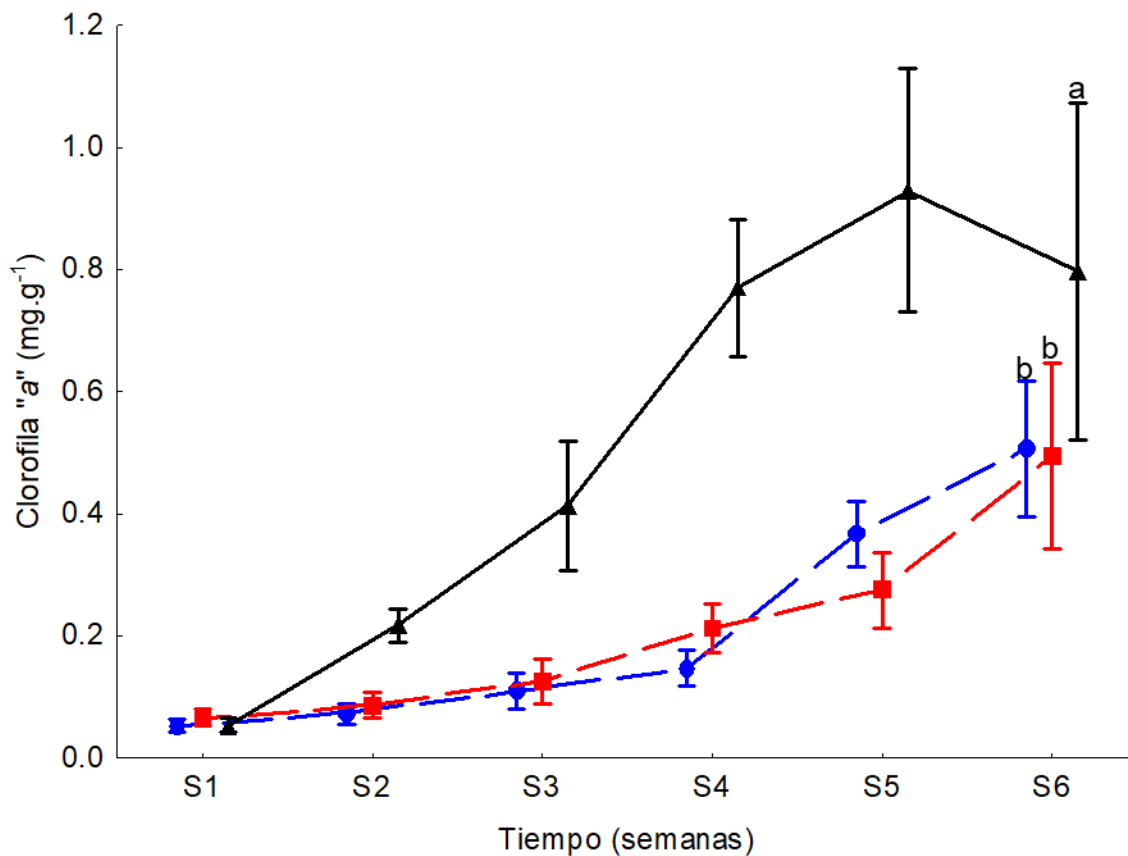


Fig. 9. Contenido de clorofila "a" ( $\text{mg. g}^{-1}$ ) de las plantas de *R. sativus* en los diferentes tratamientos, ● EAF, ■ EAQF, ▲ T17.

#### 7.1.8. Análisis químico proximal

La composición química proximal de las plantas de *R. sativus* en los diferentes tratamientos empleados para su fertilización se muestra en la tabla III.

El contenido de humedad de las plantas de rábano no mostró diferencias significativas en los diferentes tratamientos utilizados en la semana de cosecha ( $F_{\text{calc}}= 0.63$ ,  $F_{0.50}= 3.22$ ,  $\rho>0.05$ ).

El mayor contenido de cenizas se encontró en las plantas fertilizadas con EAQF (29 %) seguido por el tratamiento EAF (28 %) y el T17 con 27%. El porcentaje más bajo se encontró en el tratamiento testigo de agua (T) (19%). El tratamiento CA fue significativamente diferente a los tratamientos CAQ, AP, FF y T ( $\rho<0.05$ ). El tratamiento EAQF fue significativamente diferente a los tratamientos CAQ, AP, FF y T ( $\rho<0.05$ ).

El contenido de grasa fue significativamente mayor en las plantas fertilizadas con quitosano en polvo (8%), seguido por el tratamiento FF (7 %). Los valores más bajos fueron en los tratamientos EAF, EAQF, CAQ y AP (promedio 1.7 %).

El contenido de fibra mostró diferencias significativas en los diferentes tratamientos ( $F_{\text{calc}}= 1.42$ ,  $F_{0.50}= 3.22$ ,  $\rho<0.05$ ).

El mayor contenido de proteína se encontró en las plantas fertilizadas con CA el cual fue significativamente diferente al resto de los tratamientos ( $\rho<0.05$ ) excepto al T17 ( $\rho = 0.06$ ).

El menor contenido de ELN se encontró en las plantas fertilizadas con CA, el cual fue significativamente diferente al resto de los tratamientos ( $F_{\text{calc}}= 2.86$ ,  $F_{0.50}= 3.22$ ,  $\rho<0.05$ ).



Tabla III. Composición química proximal de las plantas de *R. sativus* en los diferentes tratamientos empleados para evaluar su crecimiento.

Tratamiento	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Fibra (%)	Proteína (%)	ELN (%)
EAF	1.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	28.2 ± 1.0 <sup>b</sup>	2.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	15.7 ± 1.1 <sup>ab</sup>	14.8 ± 0.4 <sup>abc</sup>	37.0 ± 3.4 <sup>ab</sup>
EAQF	2.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	29.1 ± 2.7 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	16.4 ± 1.3 <sup>ab</sup>	14.4 ± 1.3 <sup>ab</sup>	35.9 ± 3.4 <sup>ab</sup>
CA	2.6 ± 2.3 <sup>a</sup>	25.5 ± 0.1 <sup>abd</sup>	4.9 ± 1.4 <sup>ab</sup>	15.7 ± 0.5 <sup>ab</sup>	31.7 ± 2.4 <sup>d</sup>	19.2 ± 4.0 <sup>c</sup>
CAQ	2.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	21.6 ± 0.1 <sup>ac</sup>	1.3 ± 1.0 <sup>a</sup>	16.8 ± 0.4 <sup>ab</sup>	17.9 ± 0.4 <sup>abc</sup>	40.1 ± 0.3 <sup>a</sup>
AP	3.9 ± 2.9 <sup>a</sup>	22.4 ± 2.8 <sup>acd</sup>	1.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	17.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	9.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	44.5 ± 6.5 <sup>a</sup>
QP	0.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	25.7 ± 2.2 <sup>abd</sup>	8.5 ± 0.5 <sup>b</sup>	17.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	12.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	35.4 ± 2.3 <sup>ab</sup>
FF	1.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	21.8 ± 1.5 <sup>ac</sup>	7.8 ± 0.6 <sup>b</sup>	16.4 ± 1.2 <sup>ab</sup>	12.6 ± 2.6 <sup>a</sup>	39.7 ± 6.4 <sup>ab</sup>
T	3.3 ± 1.2 <sup>a</sup>	19.0 ± 1.8 <sup>c</sup>	5.0 ± 3.0 <sup>ab</sup>	14.1 ± 1.1 <sup>b</sup>	22.5 ± 1.5 <sup>bc</sup>	35.8 ± 0.4 <sup>ab</sup>
T17	1.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	27.8 ± 1.8 <sup>bd</sup>	5.3 ± 2.2 <sup>ab</sup>	16.9 ± 0.3 <sup>ab</sup>	23.6 ± 7.0 <sup>cd</sup>	25.1 ± 7.9 <sup>bc</sup>

#### 7.1.9. Caracterización fisicoquímica del sustrato

La caracterización fisicoquímica del sustrato se realizó con la finalidad de observar los cambios ocurridos en el mismo, después de aplicar los tratamientos, a la quinta semana antes de finalizar el cultivo. La Tabla IV muestra que no hubo diferencias estadísticamente significativas en las características fisicoquímicas del sustrato (nitrógeno, pH y CRA) al agregar el biofertilizante a las plantas de rábano. Sin embargo, se obtuvo un incremento significativo en el porcentaje de nitrógeno, respecto al contenido inicial (0.45 %) y el tratamiento EAF (0.54 %). El pH disminuyó en todos los tratamientos, con un promedio de 4. El porcentaje de humedad se incrementó significativamente en el tratamiento fertilizado con FF (12.97 %), respecto a las condiciones iniciales (5.43 %) y al resto de los tratamientos ( $\rho < 0.05$ ).

La capacidad de retención de agua (CRA) se incrementó en un 2 % aproximadamente, respecto a la condición inicial del sustrato.

El fósforo extraíble mostró diferencias significativas ( $\rho < 0.05$ ) entre tratamientos y fue mayor en el suelo tratado con el fertilizante T17 (244.2 g). En el resto de los

tratamientos también hubo un incremento respecto a la condición inicial, como se observa en la tabla IV.

Tabla IV. Caracterización fisicoquímica del sustrato antes y después de la aplicación de los tratamientos ( $p > 0.05$ ). CRA= capacidad de retención de agua.

	Tratamiento	Nitrógeno total (%)	Fósforo extraíble (mgKg <sup>-1</sup> )	Humedad (%)	pH	CRA (%)
Semana 5	Inicio Peat moss ®	0.45 ± 0.01 <sup>b</sup>	14.9 ± 0.6	5.4 ± 0.0 <sup>ab</sup>	5.4 ± 0.1 <sup>e</sup>	19.0 ± 0.8 <sup>a</sup>
	EAF	0.54 ± 0.01 <sup>a</sup>	60.8 ± 4.2	4.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.07 <sup>c</sup>	21.5 ± 1.2 <sup>ab</sup>
	EAQF	0.50 ± 0.02 <sup>ab</sup>	102.1 ± 0.5	4.4 ± 0.5 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.04 <sup>a</sup>	21.2 ± 0.6 <sup>ab</sup>
	CA	0.53 ± 0.00 <sup>a</sup>	47.0 ± 4.2	5.0 ± 0.4 <sup>ab</sup>	4.3 ± 0.01 <sup>bc</sup>	21.8 ± 0.7 <sup>ab</sup>
	CAQ	0.52 ± 0.04 <sup>a</sup>	46.3 ± 2.4	5.0 ± 0.0 <sup>ab</sup>	4.4 ± 0.02 <sup>a</sup>	20.9 ± 0.9 <sup>ab</sup>
	AP	0.54 ± 0.02 <sup>a</sup>	36.9 ± 2.0	3.8 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.06 <sup>a</sup>	21.4 ± 1.1 <sup>b</sup>
	AQP	0.49 ± 0.02 <sup>ab</sup>	53.9 ± 3.9	4.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.03 <sup>ab</sup>	23.2 ± 1.0 <sup>ab</sup>
	FF	0.49 ± 0.01 <sup>ab</sup>	60.2 ± 5.3	12.9 ± 8.6 <sup>b</sup>	4.4 ± 0.08 <sup>ab</sup>	22.1 ± 0.4 <sup>ab</sup>
	T	0.51 ± 0.00 <sup>ab</sup>	30.6 ± 6.4	4.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	4.7 ± 0.03 <sup>d</sup>	20.6 ± 0.4 <sup>ab</sup>
	T17	0.52 ± 0.00 <sup>a</sup>	244.2 ± 93.7	5.0 ± 0.7 <sup>ab</sup>	4.8 ± 0.00 <sup>d</sup>	21.9 ± 1.7

## 7.2. Segundo experimento: Evaluación de la mezcla fertilizante químico y biofertilizante natural en el cultivo de *R. sativus*

### 7.2.1. Longitud de las hojas (LH)

Al aplicar una mezcla de fertilizante químico y biofertilizante en diferentes proporciones, se obtuvo que la longitud de las hojas fue significativamente diferente en algunos tratamientos ( $F_{\text{calc}}=13.29$ ,  $F_{0.05}=1.5$ ,  $p < 0.05$ , Fig.10). El crecimiento fue significativamente mayor con la combinación de 40EAF: 60T17 con respecto a 60EAF:40T17, 80EAF:20T17 y 100EAF. La longitud de las plantas fertilizadas con la proporción de 100EAF fue significativamente menor con respecto al resto de los tratamientos ( $p < 0.05$ ).

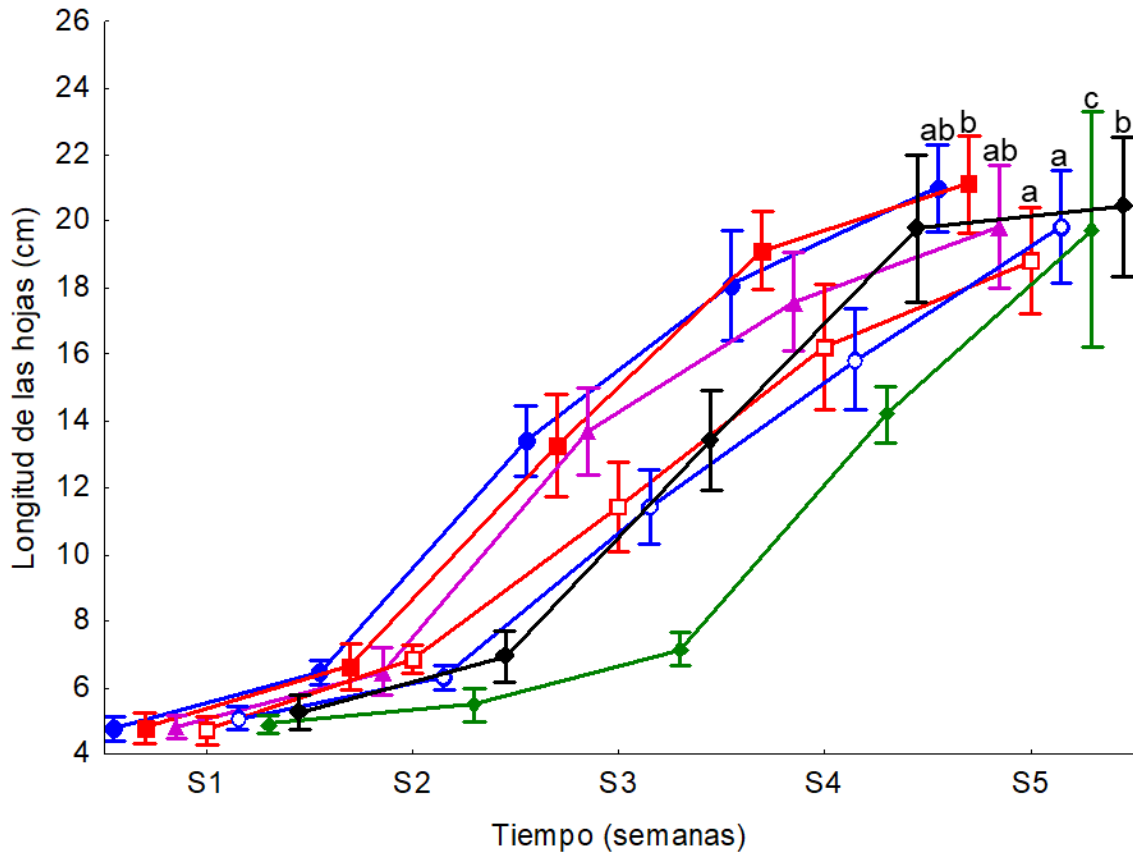


Fig. 10. Longitud de hojas (cm) de las plantas de *R. sativus* en los diferentes tratamientos, ● 20EAF:80T17, ■ 40EAF: 60T17, ▲ 50EAF: 50T17, ◻ 60EAF: 40T17, ○ 80EAF: 20T17, ◆ 100EAF, ◈ 100T17.

### 7.2.2. Diámetro polar (DP) y ecuatorial (DE) del bulbo de rábano

El diámetro polar del bulbo (3.22 cm) fue significativamente mayor al tiempo de cosecha (quinta semana) en el tratamiento de 40EAF:60T17 ( $F_{\text{calc}}=2.23$ ,  $F_{0.05}=2.11$ ,  $\rho<0.05$ ), seguido por 100EAF con un diámetro de 2.81 cm. Las plantas tratadas con 100T17 alcanzaron el menor crecimiento con un diámetro polar de 2.04 cm (Fig. 11a).

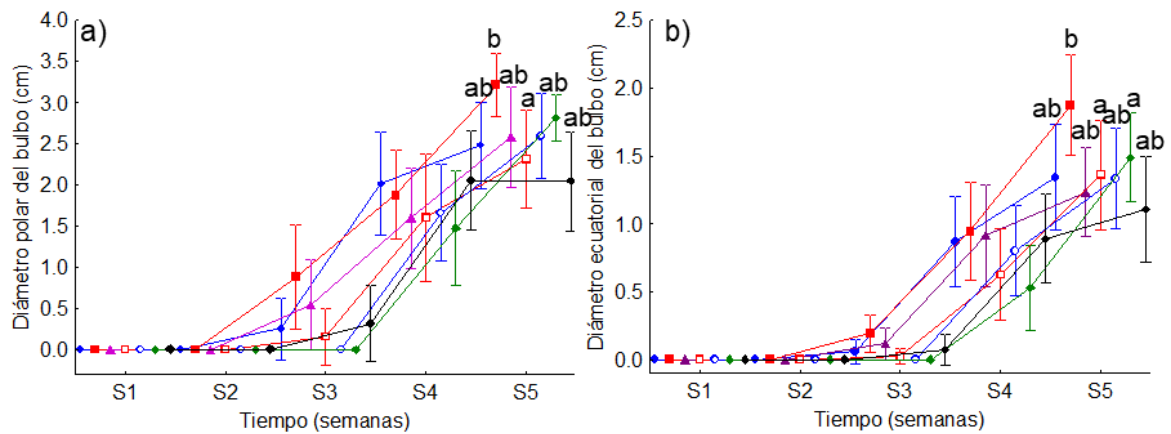


Fig. 11. a) Diámetro polar b) Diámetro ecuatorial del bulbo de *R. sativus* (cm) en los diferentes tratamientos, ● 20EAF:80T17, ■ 40EAF: 60T17, ▲ 50EAF: 50T17, □ 60EAF: 40T17, ○ 80EAF: 20T17, ◆ 100EAF, ◆ 100T17.

El diámetro ecuatorial del bulbo (Fig. 11b) se presentó el mismo comportamiento que el diámetro polar. La mejor combinación, significativamente mayor ( $p < 0.05$ ), fue para el tratamiento 40EAF:60T17, llegando a un diámetro de 1.87 cm al término de la quinta semana, seguido por el tratamiento de 100% encapsulado (100EAF) con 1.48 cm. En las plantas fertilizadas con el 100% de T17 se obtuvo el menor crecimiento con un diámetro de 1.10 cm.

### 7.2.3. Longitud de la raíz (LR)

La longitud de raíz (Fig. 12) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{\text{calc}}=0.34$ ,  $F_{0.05}=2.11$ ,  $p > 0.05$ ). La tendencia fue de alcanzar su máxima longitud en la tercera semana y disminuir a partir de ésta, hasta la quinta semana.

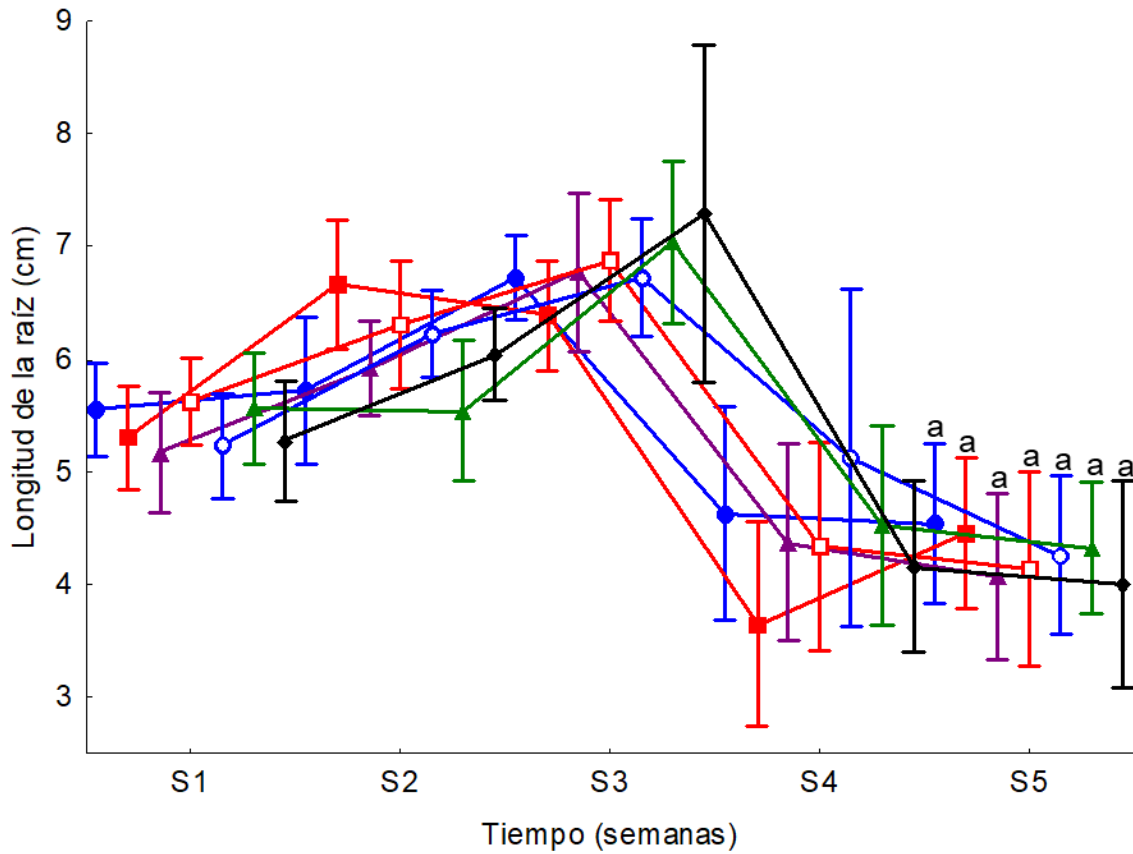


Fig. 12. Longitud de la raíz (cm) de *R. sativus* en los diferentes tratamientos, ● 20EAF:80TT17, ■ 40EAF: 60T17, ▲ 50EAF: 50T17, □ 60EAF: 40T17, ○ 80EAF: 20T17, ◆ 100EAF, ◆ 100T17.

#### 7.2.4. Peso fresco (PFH) y peso seco de las hojas (PSH)

El incremento en peso de la biomasa fresca de las hojas (Fig. 13a) fue constante a lo largo de las cinco semanas de experimentación. En la quinta semana, el tratamiento 40EAF:60T17 mostró valores significativamente mayores ( $F_{\text{calc}}=4.87$ ,  $F_{0.05}=2.11$ ,  $\rho<0.05$ ), con 9.54 g, seguido por el tratamiento de 100% EAF y 20EAF:80T17, con un promedio de 9.02 y 8.87 g, respectivamente. En los tratamientos 20EAF:80T17, 40EAF:60T17, 50EAF:50T17 y 100T17 no se encontraron diferencias significativas ( $\rho>0.05$ ), pero si se presentaron diferencias significativas ( $\rho<0.05$ ) con los tratamientos 60EAF:40T17, 80EAF:20T17 y 100EAF, que fueron los de menor incremento en biomasa.

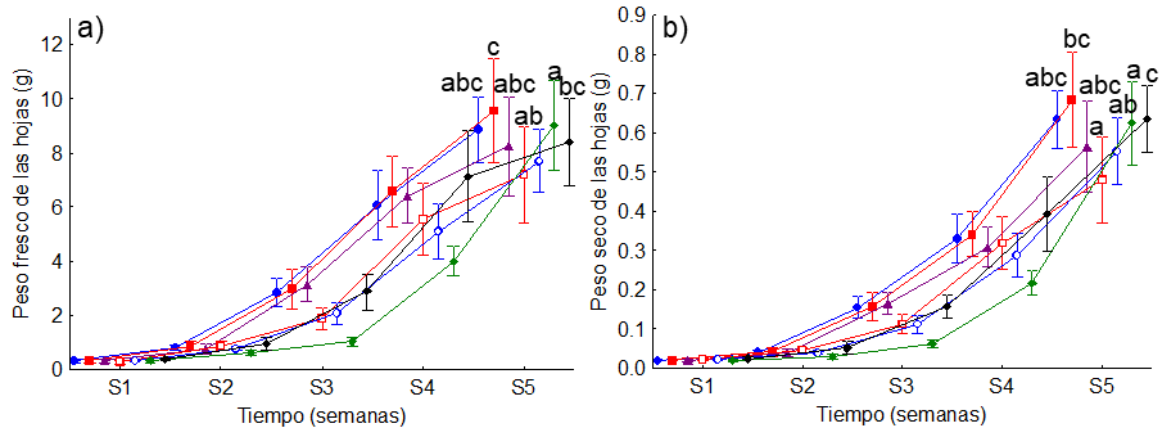


Fig. 13. a) Peso fresco b) Peso seco de las hojas (g) de *R. sativus* en los diferentes tratamientos, ● 20EAF: 80T17, ■ 40EAF: 60T17, ▲ 50EAF: 50T17, □ 60EAF: 40T17, ○ 80EAF: 20T17, ◆ 100EAF, ◇ 100T17.

El peso seco de las plantas (Fig. 13b), presentó el mismo comportamiento que en el peso fresco. Se obtuvo un incremento significativamente mayor en las plantas fertilizadas con la combinación 40EAF:60T17 (0.68 g), seguido por el tratamiento de 20EAF:80T17 y 100T17 (0.63 g).

#### 7.2.5. Peso fresco (PFB) y peso seco del bulbo (PSB)

El peso fresco (Fig. 14a) se incrementó significativamente a partir de la tercera semana. Al término del experimento (quinta semana), las plantas fertilizadas con 40EAF:60T17 tuvieron un peso (5.6 g) significativamente mayor que los demás tratamientos ( $F_{\text{calc}}=2.22$ ,  $F_{0.05}=2.11$ ,  $p<0.05$ ), seguido por el tratamiento 100EAF (3.7 g). Los bulbos con menor peso (2.22 g) se presentaron en las plantas fertilizadas con el 100% T17.

El peso seco del bulbo (Fig. 14b) presentó el mismo comportamiento que en el análisis del peso fresco. Los bulbos tuvieron un peso significativamente mayor en las plantas fertilizadas con la combinación 40EAF:60T17 (0.24 g,  $F_{\text{calc}}=2.15$ ,  $F_{0.05}=2.11$ ,  $p<0.05$ ), seguido por el tratamiento 100EAF (0.17 g). Inesperadamente, las plantas fertilizadas con el 100% T17 mostraron los valores más bajos en peso seco del bulbo con un promedio de 0.10 g.

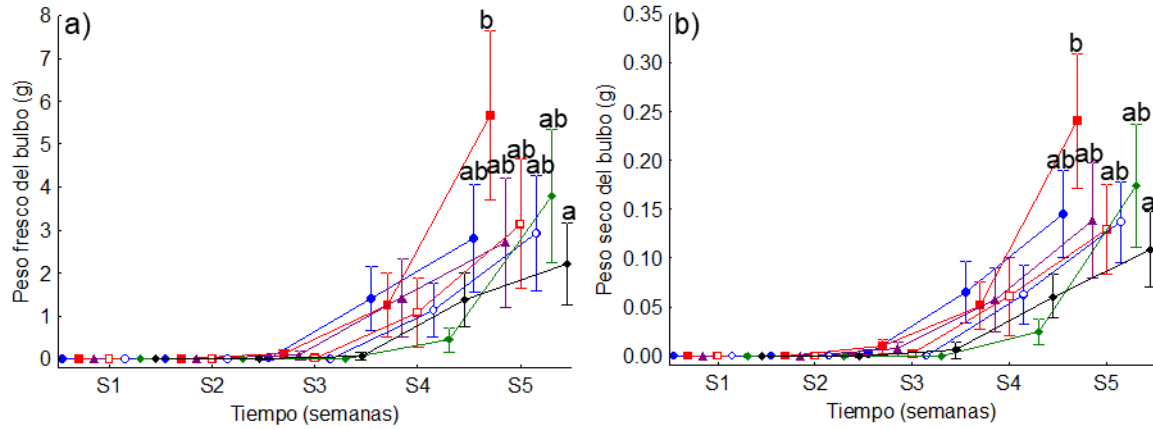


Fig. 14.. a) Peso fresco b) Peso seco del bulbo (g) de *R. sativus* en los diferentes tratamientos, ● 20EAF:80T17, ■ 40EAF: 60T17, ▲ 50EAF: 50T17, □ 60EAF: 40T17, ○ 80EAF: 20T17, ◆ 100EAF, ♦ 100T17.

#### 7.2.6. Número de hojas (NH)

De igual manera que en el primer experimento, las hojas cotiledonales emergieron simultáneamente en todos los tratamientos cinco días después de la siembra y las hojas verdaderas tres días después. Un número significativamente mayor de hojas (Fig. 15), se obtuvo en el tratamiento de 100EAF (6.8 hojas) ( $F_{\text{calc}}=2.40$ ,  $F_{0.05}=2.11$ ,  $\rho<0.05$ ), seguido por el tratamiento de 100T17 (6.6 hojas). En las plantas fertilizadas con el 50% EAF y 50% T17 se observó el menor número de hojas (5.5).

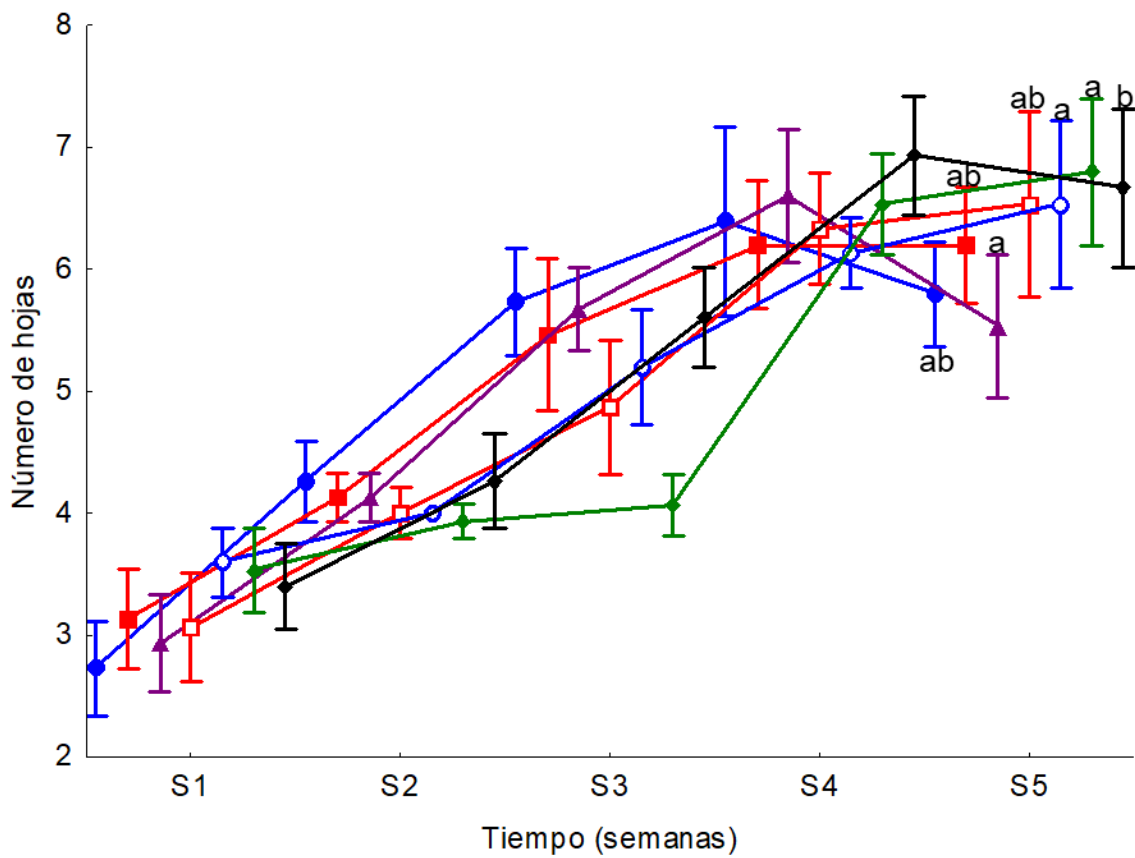


Fig. 15. Número de hojas de las plantas de *R. sativus* en los diferentes tratamientos, ● 20EAF: 80T17, ■ 40EAF: 60T17, ▲ 50EAF: 50T17, □ 60EAF: 40T17, ○ 80EAF: 20T17, ◆ 100EAF, ◆ 100T17.

### 7.2.7. Contenido de clorofila "a"

La concentración de clorofila "a" (Fig. 16) fue significativamente mayor en el tratamiento fertilizado con la combinación de 40% EAF y 60% T17 ( $F_{\text{calc}}= 7.42$ ,  $F_{0.05}=2.11$ ,  $\rho<0.05$ ) con un promedio de  $0.98 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , seguido por los tratamientos 100 EAF ( $0.87 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) y 20EAF:80T17 ( $0.83 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ).



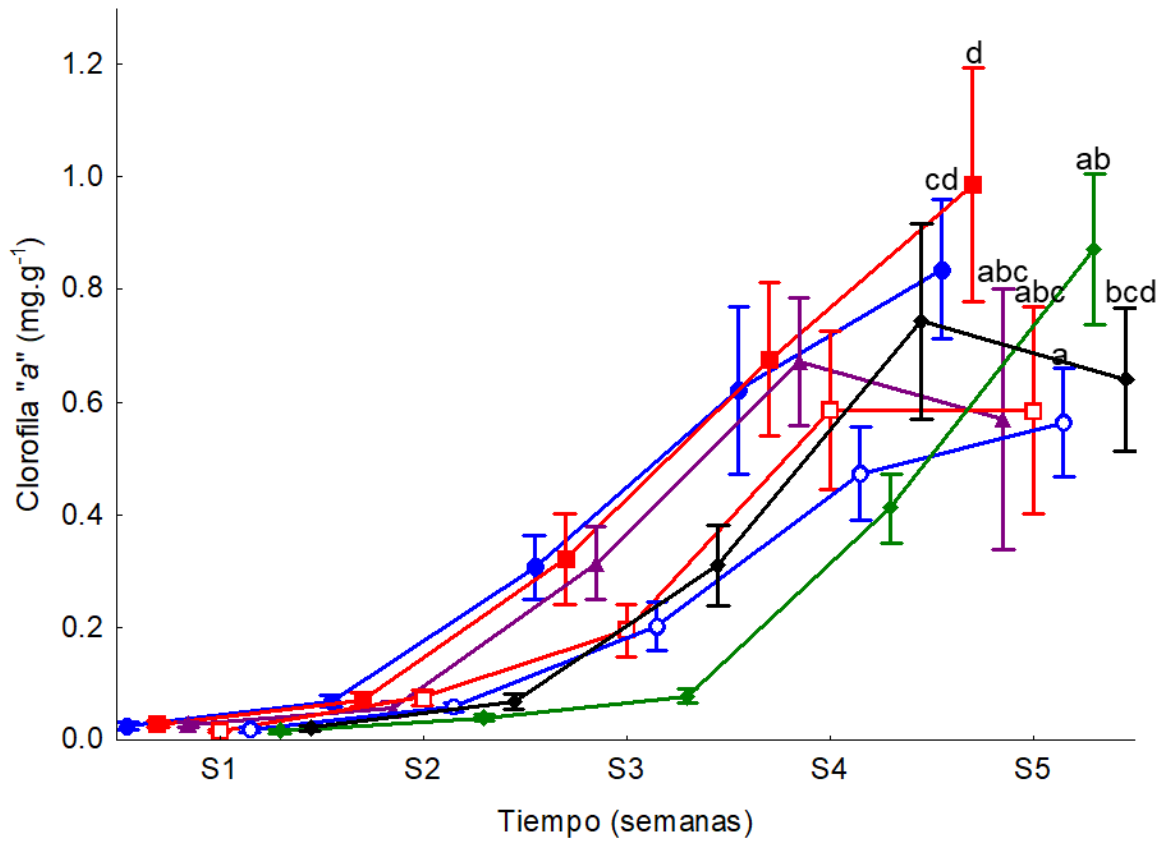


Fig. 16. Contenido de Clorofila "a" ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) de las plantas de *R. sativus* en los diferentes tratamientos, ● 20EAF: 80T17, ■ 40EAF: 60T17, ▲ 50EAF: 50T17, □ 60EAF: 40T17, ○ 80EAF: 20T17, ◆ 100EAF, ◇ 100T17.

#### 7.2.8. Análisis químico proximal

La composición química proximal de las plantas de *R. sativus* en las diferentes combinaciones empleadas para su fertilización se muestra en la tabla V.

No se encontraron diferencias significativas en el contenido de humedad de las plantas de rábano en las diferentes combinaciones de fertilizante empleadas como tratamientos ( $F_{\text{calc}}=3.05$ ,  $F_{0.05}= 3.86$ ,  $p>0.05$ ).

El contenido de cenizas varió de 24 a 31% en los diferentes tratamientos de fertilización, sin embargo, no fue significativamente diferente entre estos ( $F_{\text{calc}}=3.63$ ,  $F_{0.05}= 3.86$ ,  $p>0.05$ ) a excepción del tratamiento de 100EAF el cual fue significativamente menor al resto de los tratamientos.

Por el contrario, el contenido de grasa fue mayor en las plantas fertilizadas con el 100% T17 (5.18 %), seguido por el tratamiento 80EAF:20T17 (4.27 %), 20EAF:80T17 (3.5 %). El tratamiento 60EAF:40T17 presentó el menor porcentaje de grasa en las plantas fertilizadas (1.99 %).

El contenido de fibra varió de un máximo de 24.9 % en las plantas fertilizadas con la combinación de 20% EAF y 80% T17, a un mínimo de 19.6 % con el tratamiento 50EAF:50T17, Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{\text{calc}}= 1.05$ ,  $F_{0.05}= 3.86$ ,  $p>0.05$ ).

El contenido de proteína varió de 17.2 y 22.9 % entre los tratamientos, pero no se encontraron diferencias significativas en las diferentes combinaciones de fertilización ( $F_{\text{calc}}= 0.24$ ,  $F_{0.05}= 3.86$ ,  $p>0.05$ ).

El extracto libre de nitrógeno varió de 15.2 a 28.8 %, el cual mostró diferencias significativas. El mayor contenido se obtuvo en las plantas tratadas con el 50% EAF y 50% T17, ( $F_{\text{calc}}= 7.17$ ,  $F_{0.05}= 3.86$ ,  $p<0.05$ ), con un contenido promedio de 28.8 %, seguido por la combinación de 60% EAF y 40% T17 con 28.3 %. El tratamiento fertilizado con el 100% T17 se presentaron las plantas con menor contenido de ELN (15.27 %).

Tabla V. Composición química proximal de las plantas de *R. sativus* en los diferentes tratamientos empleados para su fertilización.

Tratamiento	Humedad (%)	Cenizas (%)	Grasa (%)	Fibra (%)	Proteína (%)	ELN (%)
20EAF: 80T17	0.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	29.4 ± 1.2 <sup>ab</sup>	3.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	24.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	21.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	19.7 ± 0.3 <sup>ab</sup>
40EAF: 60T17	1.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	28.1 ± 1.7 <sup>ab</sup>	3.4 ± 0.9 <sup>a</sup>	24.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	19.6 ± 3.9 <sup>a</sup>	22.6 ± 2.0 <sup>ab</sup>
50EAF: 50T17	1.0 ± 0.01 <sup>a</sup>	28.4 ± 0.9 <sup>ab</sup>	2.9 ± 0.5 <sup>a</sup>	19.6 ± 2.7 <sup>a</sup>	19.0 ± 5.0 <sup>a</sup>	28.8 ± 0.7 <sup>a</sup>
60EAF: 40T17	0.9 ± 0.09 <sup>a</sup>	27.0 ± 0.5 <sup>ab</sup>	1.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	24.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	17.2 ± 3.2 <sup>a</sup>	28.3 ± 2.8 <sup>a</sup>
80EAF: 20T17	1.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	27.6 ± 1.3 <sup>ab</sup>	4.2 ± 1.3 <sup>a</sup>	19.8 ± 2.6 <sup>a</sup>	19.6 ± 5.2 <sup>a</sup>	27.4 ± 0.4 <sup>a</sup>
100EAF	1.4 ± 0.01 <sup>a</sup>	24.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	21.0 ± 2.9 <sup>a</sup>	22.0 ± 5.9 <sup>a</sup>	27.4 ± 2.3 <sup>a</sup>
100T17	0.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	31.2 ± 0.06 <sup>b</sup>	5.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	24.4 ± 1.0 <sup>a</sup>	22.9 ± 0.6 <sup>a</sup>	15.2 ± 2.7 <sup>b</sup>

### 7.2.9. Caracterización fisicoquímica del sustrato.

En la caracterización fisicoquímica del sustrato empleado en el segundo experimento se observó que no existen diferencias significativas en las características del sustrato a excepción del contenido de fósforo, por lo que se concluye que los tratamientos no lo modificaron ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, se observó que el contenido de nitrógeno total se incrementó aproximadamente en 0.1% en todos los tratamientos. En el caso de la humedad, esta se incrementó más del doble en los tratamientos fertilizados con 50% EAF y 50% T17, 20EAF:80T17 respecto al contenido inicial. El pH se mantuvo cercano a 5, con una ligera disminución de 0.3 en promedio en la mayoría de los tratamientos. La capacidad de retención de agua (CRA) del sustrato varió de 19 a 28 % respecto a la capacidad inicial. El tratamiento con mayor capacidad de retención de agua (CRA) fue el fertilizado con el 80% EAF y 20% T17 con un promedio de 28.2%.

Para el caso del fósforo extraíble presente en el suelo, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). El contenido fue significativamente mayor en el suelo fertilizado con 60EAF: 40T17 (86.5 mg.Kg<sup>-1</sup>) y 100% T17 (117.2 mg.Kg<sup>-1</sup>) respecto al resto de los tratamientos. En los demás tratamientos hubo un incremento significativo respecto a la condición inicial la cual fue aproximadamente el cuádruple de la condición inicial como se observa en la Tabla VI.

Tabla VI. Caracterización fisicoquímica del sustrato antes y después de la aplicación de los tratamientos ( $p>0.05$ ).

	Tratamiento	Nitrógeno total (%)	Fósforo extraíble (mg.Kg <sup>-1</sup> )	Humedad (%)	pH (%)	CRA (%)
<b>Inicio</b>	Peat moss ®	0.45 ± 0.01 <sup>a</sup>	14.9 ± 0.6 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	19.08 ± 0.8 <sup>b</sup>
	20EAF:80T17	0.56 ± 0.02 <sup>a</sup>	59.7 ± 0.71 <sup>ac</sup>	9.8 ± 0.4 <sup>abc</sup>	4.9 ± 0.02 <sup>a</sup>	26.34 ± 0.7 <sup>a</sup>
	40EAF:60T17	0.53 ± 0.00 <sup>a</sup>	54.4 ± 2.4 <sup>a</sup>	6.7 ± 2.4 <sup>ab</sup>	5.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	25.6 ± 2.6 <sup>a</sup>
	50EAF:50T17	0.56 ± 0.02 <sup>a</sup>	44.7 ± 2.6 <sup>ab</sup>	12.8 ± 2.1 <sup>c</sup>	5.2 ± 0.07 <sup>a</sup>	27.9 ± 0.5 <sup>a</sup>
<b>Semana 5</b>	60EAF:40T17	0.50 ± 0.02 <sup>a</sup>	86.5 ± 1.4 <sup>c</sup>	10.0 ± 1.2 <sup>abc</sup>	5.0 ± 0.04 <sup>a</sup>	27.2 ± 1.0 <sup>a</sup>
	80EAF:20T17	0.52 ± 0.00 <sup>a</sup>	40.8 ± 4.5 <sup>ab</sup>	9.4 ± 2.1 <sup>abc</sup>	5.1 ± 0.07 <sup>a</sup>	28.2 ± 0.7 <sup>a</sup>
	100EAF	0.52 ± 0.04 <sup>a</sup>	58.7 ± 7.11 <sup>d</sup>	10.5 ± 1.8 <sup>bc</sup>	4.9 ± 0.05 <sup>a</sup>	26.1 ± 03 <sup>a</sup>
	100T17	0.51 ± 0.01 <sup>a</sup>	117.2 ± 14.7 <sup>ac</sup>	9.4 ± 1.2 <sup>abc</sup>	5.0 ± 0.04 <sup>a</sup>	27.2 ± 0.7 <sup>a</sup>

## 8. Discusión

### 8.1. Evaluación de los bioencapsulados en el cultivo de rábano

#### Variables Biométricas

En el primer experimento se evaluó el efecto del bioencapsulado de la cianobacteria *Fischerella* sp. en dos tipos de matrices poliméricas, una de Ca-alginato (EAF) y otra de Ca-alginato/quitosano (EAQF), para evaluar su efectividad como biofertilizantes. Los resultados mostraron un efecto significativamente positivo. El mayor incremento de las variables biométricas se obtuvo en los tratamientos con los bioencapsulados, en comparación con los grupos control (encapsulados sin cianobacterias (CA, CAQ), alginato en polvo (AP), quitosano en polvo (QP) y el testigo (T).

Los resultados obtenidos muestran un incremento constante en la longitud de las hojas en los tres tratamientos de interés EAF, EAQF y T17, hasta el tiempo de cosecha (sexta semana). Como se esperaba el mayor incremento promedio se obtuvo en el tratamiento con fertilización química (T17). Esto es debido a que los fertilizantes químicos aumentan la disponibilidad inmediata de los macronutrientes necesarios para

el crecimiento de las plantas, siendo significativamente mayor al resto de los tratamientos, pero con el consecuente aporte de sales como el fósforo (Tablas IV y VI), que en sentido estricto es interpretado como uno de los graves problemas de la contaminación de los suelos, por acumulación sucesiva de sales minerales.

Investigaciones sobre crecimiento de rábano han mostrado alturas promedio (hojas) de 2.5 a 15 cm en condiciones experimentales con aporte de nutrientes por el uso de abonos orgánicos (Ramírez y Pérez, 2006), hasta 17 a 27 cm (Srinivasan y Mathivanan, 2009), en cultivos convencionales. En cultivos inoculados con bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Bacillus* se reportan longitudes de 11 a 25 cm (Sotelo *et al.*, 2012) a lo largo de siete semanas de cultivo. En el presente estudio se encontraron alturas de 11 a 21 cm en seis semanas de cultivo, lo que indica que los rábanos cultivados en este experimento se encuentran dentro de la normalidad.

Entre los tratamientos utilizados como control FF, CA, CAQ, AP, QP y T no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), sin embargo, se observó que la presencia de los biopolímeros en polvo tuvo un efecto en el incremento de la longitud de las plantas de rábano en comparación con las que fueron inoculadas con la cianobacteria en vida libre y las cápsulas de alginato (CA) y alginato-quitosano (CAQ), es decir, que no tenían la presencia de la cianobacteria. En diversos estudios se ha mencionado que los polisacáridos de algas tienen efectos como estimulantes del crecimiento en plantas, los cuales están relacionados directamente con la flexibilidad, y adaptación a fenómenos de estrés, así como ejercen un papel importante en la defensa frente a enfermedades y aunado a ello, están relacionados con la estimulación de la síntesis de sustancias de respuesta en su metabolismo (García, 2017).

Respecto a los diámetros polar y ecuatorial del bulbo de rábano, no se encontraron diferencias significativas en las plantas fertilizadas con los bioencapsulados respecto a las fertilizadas con T17 (Fig. 4). Se obtuvo un diámetro de 2.4 a 3.0 cm y en el diámetro polar del bulbo se observó el mismo comportamiento. Sin embargo, en este caso se obtuvo un diámetro de 2 cm aproximadamente en los tres tratamientos, por lo tanto, comparado con el efecto sobre la longitud de las plantas, podemos decir que los nutrientes que aporta el fertilizante químico (Triple 17) respecto a lo que aporta el

bioencapsulado, es aprovechado de manera similar para el proceso de crecimiento del bulbo. El diámetro obtenido fue similar a los reportados por otros autores (Pérez-Gómez, 2011); y Gómez *et al.*, 2008), quienes reportan que, en otra variedad de rábano, los fertilizantes orgánicos y lombricomposta favorecen al crecimiento del bulbo.

Las plantas que fueron inoculadas con la cianobacteria sin encapsular (FF), tuvieron un incremento menor que los tratamientos con encapsulado (EAF, EAQF) y T17. Este crecimiento también fue mayor que en el resto de los tratamientos (CA, CAQ, AP, QP y T), con un diámetro ecuatorial promedio de 1.62 cm. Esto sugiere que el encapsulado en una matriz polimérica actúa como una barrera protectora ante los cambios drásticos de humedad al pasar de un ambiente acuoso a semisólido, potencializando su efecto y manteniendo disponibles por mayor tiempo los nutrientes, lo cual puede ser traducido en un mayor aprovechamiento, reflejado en el crecimiento de las plantas de rábano.

La longitud de la raíz es un parámetro biométrico que se utiliza principalmente como indicador de la promoción de crecimiento vegetal, ya que su incremento es indicativo de un mejor aprovechamiento y absorción de nutrientes. Sin embargo, en este caso no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (4 a 8 cm), pero sin un patrón definido. Esto sugiere que la raíz no refleja directamente el efecto de los nutrientes (Fig. 5). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que exista un error metodológico durante la manipulación al momento de extraerlas, ya que la parte más profunda es muy frágil y podría haberse roto y quedado en el sustrato.

El peso fresco de las plantas (Fig. 6) representa principalmente la cantidad de agua almacenada (entre el 80 y 90 %) y el peso de los tejidos. En este experimento, el peso fresco de las plantas de rábano tendió a aumentar significativamente a partir de la tercera semana, sin embargo, el tratamiento T17 fue significativamente mayor respecto al resto de los tratamientos. Este incremento sugiere que hay un aumento en las células vegetales, crecimiento y desarrollo en las plantas, lo que indica un desarrollo normal, favorecido por un adecuado suministro de nitrógeno y demás nutrientes necesarios (Bäzinger *et al.*, 1997).

El peso seco se compone de la materia orgánica y los nutrientes minerales acumulados por las plantas, la biomasa orgánica formada principalmente por elementos como carbono, hidrógeno y oxígeno, que representa entre el 90% y el 95 % del peso seco. El porcentaje restante, corresponde a los nutrientes minerales, que son esenciales para el adecuado crecimiento de las plantas; entre ellos los macronutrientes, como nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, azufre y micronutrientes como hierro, cobre, zinc, cloro, entre otros. Por lo tanto, el incremento constante del peso fresco y seco son evidencias de que la planta contó con los nutrientes necesarios en los tratamientos T17, EAF y EAQF.

En el peso fresco del bulbo de las plantas de rábano, presentó un incremento constante a partir de la tercera semana, como se mostró en la fenología de la planta. Los pesos significativamente mayores se registraron en las plantas tratadas con triple 17 (T17) y con los bioencapsulados en Ca-alginato-*Fischerella* (EAF) y Ca-alginato/quitosano-*Fischerella* (EAQF) (5.59, 5.22 y 5.03 g respectivamente). En cuanto al peso seco del bulbo el comportamiento fue el mismo, resaltando los tres tratamientos mencionados anteriormente. Sin embargo, a pesar de que la fertilización química proporciona los nutrientes, se obtuvo la misma eficiencia productiva en peso seco y en biomasa del bulbo. En otros casos se ha observado que las plantas inoculadas con *Bacillus* presentan rendimientos menores a los obtenidos con el fertilizante químico, (Sotelo *et al.*, 2012).

El brote de las hojas cotiledonales se observó paralelamente en todos los tratamientos a los cinco días después de la siembra y a los ocho días se observó la emisión de las hojas verdaderas. El mayor número de hojas se registró en los tratamientos EAF, T17 y EAQF, con un promedio de 6 hojas sin que existieran diferencias significativas entre ellos. En este estudio se obtuvo un menor número de hojas que las reportadas por Mantilla *et al.*, (2011), quien obtuvo ocho hojas en plantas inoculadas con *Azotobacter*, sin embargo, Sotelo *et al.*, (2012) reporta un total de seis hojas en el tratamiento en el que no se utilizó ningún tipo de fertilizante, pero que fueron inoculados con *Bacillus*. Algunos autores afirman que un rápido crecimiento y una mayor expansión de hojas y

raíces se presenta cuando no hay otras plantas competidoras en la cercanía (Criollo y García, 2009).

#### Contenido de clorofila

La concentración de clorofila *a* fue significativamente mayor en las plantas fertilizadas con T17, llegando a una concentración de 0.92 mg.g<sup>-1</sup> en la quinta semana, seguida por las plantas fertilizadas con los bioencapsulados con una concentración promedio de 0.5 mg.g<sup>-1</sup>. En los mejores tratamientos (T17, EAF y EAQF), la concentración de clorofila se incrementó conforme aumentó el tamaño de la planta, sin embargo, en los tratamientos donde se aplicaron las capsulas sin la cianobacteria y la cianobacteria en fresco (FF, CA, CAQ, AP, AQP y T), y en los cuales se registró un menor crecimiento, se observó un decremento en la concentración de clorofila en las plantas, el cual es muy evidente a partir de la tercera y cuarta semana.

El contenido de clorofila es uno de los principales indicadores de la deficiencia de nutrientes y sobre todo de la deficiencia de nitrógeno. El hecho de que las plantas fertilizadas con los bioencapsulados hayan tenido valores cercanos a las fertilizadas con triple 17, indica que los bioencapsulados de *Fischerella* contribuyeron con las necesidades de nitrógeno de las plantas, y mantuvieron estables los pigmentos fotosintéticos, evitando la aparición de clorosis (Uhart y Echeverría, 1996; Lichtenthaler, 2003; Trejo *et al.* 2005).

#### Análisis químico proximal

De acuerdo con los datos obtenidos por la FAO, el rábano está compuesto por más del 90% de agua, por lo que aporta pocas calorías, sin embargo, presenta un contenido significativo de fibra. La tabla III muestra que las muestras presentaron un porcentaje de fibra entre 14 y 18%, en los diferentes tratamientos, pero no se encontraron diferencias significativas. El contenido de proteína, que se reporta en la bibliografía es de 12%, sin embargo, en el presente estudio se obtuvieron valores de 31% (CA). El contenido de extracto libre de nitrógeno (ELN) es muy importante y es normal que se hayan obtenido los valores más altos que en el resto de los contenidos evaluados,



puesto que el rábano en particular tiene un elevado contenido de vitaminas, las cuales se encuentran dentro de esta definición.

En el primer experimento de la aplicación de los bioencapsulados en el cultivo de *R. sativus*, se observó que en general no hubo cambios estadísticamente significativos en las diferentes características evaluadas en el sustrato en los distintos tratamientos, sin embargo, se obtuvo un incremento positivo en el contenido de nitrógeno en todos los tratamientos, respecto al valor inicial del sustrato. El nitrógeno fue significativamente mayor en los tratamientos con presencia de alginato y de igual manera se observó un incremento en la capacidad de retención de agua (CRA) en la mayoría de los tratamientos a excepción del sustrato fertilizado con EAQF y T en los cuales el incremento fue menor que en el resto, por lo tanto, como se menciona en la literatura, el encapsulado contribuye a incrementar la retención de agua y de igual manera los exopolisacáridos de las cianobacterias brindan este beneficio a los suelos donde han sido inoculadas, lo cual explica el incremento de esta característica en el sustrato del cultivo respecto al valor inicial.

#### 8.2. Evaluación de la mezcla de fertilizante químico y biofertilizante en el cultivo de *R. sativus*.

En la primera evaluación de los bioencapsulados de *Fischerella* sp. sobre el cultivo de rábano, se observaron resultados positivos en los dos tratamientos de interés, en el encapsulado Ca-Alginato-*Fischerella* (EAF) y en el de Ca-Alginato/Quitano-*Fischerella* (EAQF). Estos tratamientos no fueron significativamente diferentes entre ellos, en ninguna de las variables evaluadas durante el crecimiento y desarrollo de las plantas de *R. sativus*. Se eligió el encapsulado de *Fischerella* en Ca-Alginato (EAF) para realizar la segunda evaluación utilizándolo en combinación con diferentes proporciones del fertilizante (T17), debido que los efectos mostrados fueron estadísticamente iguales, y se tomó en cuenta que en un bioencapsulado bicapa como EAQF se requiere la adición de más reactivos en su elaboración, lo cual aumentaría costos de producción.

El segundo experimento se llevó a cabo hasta la quinta semana, ya que las plantas en la sexta semana mostraron un ataque de plaga de pulgón, lo cual impidió realizar el

registro de las variables por lo que los resultados se discutirán con base a cinco semanas de cultivo.

Se encontró que, para la longitud de las hojas, el mejor tratamiento fue la combinación de 40% EAF y 60% T17, con la cual se obtuvo un crecimiento en longitud significativamente mayor (21 cm) que en el resto de los tratamientos. En las mediciones de la longitud de las hojas también se observó un mejor efecto con la combinación (40EAF: 60T17) comparado con el control (100% T17), el cual produjo un incremento en el crecimiento durante las primeras semanas y a partir de la cuarta semana un crecimiento menor que otros. En las plantas fertilizadas con el 100% EAF se observó un comportamiento contrario, es decir, un incremento menor que el resto durante las primeras semanas y un crecimiento lineal a partir de la tercera semana. Esto coincide con lo mencionado por Sotelo *et al.* (2012), quienes recomiendan el uso de inoculantes microbianos en las primeras semanas de cultivo con el fin de disminuir el uso de fertilizantes químicos. A pesar de que el cultivo en esta etapa únicamente se le dio seguimiento hasta la quinta semana, la longitud de las plantas alcanzó el mismo valor al obtenido durante la primera evaluación con el 100% T17, lo cual sugiere que el encapsulado puede ayudar al mejor aprovechamiento de los nutrientes disponibles en el medio.

El mayor diámetro polar del bulbo de *Raphanus sativus*, al igual que en la longitud de las plantas, se obtuvieron con el tratamiento 40EAF:60T17 (3.2 cm). El cual fue significativamente mayor que el resto de los tratamientos, en la primera evaluación con el bioencapsulado y el fertilizante químico. Esto mismo ocurrió a la sexta semana de cultivo, para el caso del diámetro ecuatorial (1.87 cm), superando los valores obtenidos en el experimento anterior con el tratamiento EAF y T17, con un promedio de 1.5 cm de diámetro polar. Esto sugiere que la combinación de fertilizante químico con el bioencapsulado favorece el crecimiento del tamaño del bulbo debido a una mayor disponibilidad de nutrientes.

Para los cultivos de rábano de la variedad *champion* se reportan medidas estándar para el diámetro ecuatorial de 3 cm en promedio, lo cual nos indica que los rábanos obtenidos en este experimento se encuentran dentro de los estándares de cosecha.

Sin embargo, fue menor a lo reportado por Pérez-Gómez (2012), quien indica que el diámetro promedio fue de 3.5 cm en plantas tratadas con bocashi y humus de lombriz, el cual fue incluso mayor que el obtenido con fertilizante (NPK). Uno de los factores que influye directamente sobre el crecimiento de los bulbos de rábano, adicionalmente a los nutrientes, es la densidad de la siembra, ya que afecta la tasa de crecimiento del cultivo por competencia de espacio, así como de nutrientes, Gardner *et al.*, (1985). Sin embargo, en el caso del presente experimento, los resultados no pudieron ser afectados por la densidad, debido a que se siguieron las indicaciones del manual de cultivo y se proporcionó suficiente espacio entre cada una de ellas para su desarrollo adecuado.

La longitud y superficie de la raíz son indicadores importantes para la captación de agua y nutrientes. En este caso, el incremento en la longitud de la raíz se observó desde la primera semana y en la tercera semana alcanzó su máxima longitud, disminuyendo constantemente hasta la quinta semana cuando se cosecharon las plantas. Este comportamiento se observó en todos los tratamientos y la semana en la que tiende a disminuir la longitud coincide con un mayor crecimiento del bulbo. Por lo tanto, la disminución podría ser causada debido a que los nutrientes y en general la energía están siendo canalizados al crecimiento de esta parte de la planta. Hasta el momento, no se ha reportado este comportamiento en otros experimentos de cultivo.

El peso fresco de las plantas representa la cantidad de agua almacenada y el peso de los tejidos. En el segundo experimento, el incremento fue constante a lo largo de las cinco semanas de cultivo. Las plantas con mayor peso fueron las fertilizadas con el tratamiento 40EAF:60T17 con un peso promedio de 9.5 g. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos 60EAF:40T17, 80EAF:20T17, y 100EAF ( $p < 0.05$ ). Esto sugiere que para el incremento en peso foliar, las tres combinaciones satisfacen las necesidades nutricionales de las plantas, lo cual se verificó con el incremento constante en el crecimiento y desarrollo de las mismas. Mazhar y Hasnain (2011) reportan que la capacidad de absorción de agua en las plantas es favorecida por la aplicación de cianobacterias, lo cual se ve reflejado en los tratamientos encapsulados respecto al fertilizante químico.

Por otra parte, el peso seco mostró el mismo comportamiento que el peso seco. El mayor peso se obtuvo en el tratamiento 40EAF: 60T17, con un peso promedio de 0.68 g. Con diferencias significativamente mayores respecto a los demás tratamientos ( $p < 0.05$ ). Este es un comportamiento normal, logrando una ganancia progresiva de peso, como lo es en las plantas que cuentan con los nutrientes necesarios para su adecuado desarrollo (Bäzinger *et al.* 1997; Hernández, 2002).

Tanto el peso fresco como el peso seco de las plantas de los tratamientos fertilizados con el 40% de EAF y 60% de T17, fueron superiores a los pesos obtenidos por las plantas de los tratamientos fertilizados con el 100% T17. Esto se ha descrito de manera similar trabajando con diferentes dosis de aplicación de fertilizante (Fallah & Tadayyon, 2010; García y Espinosa, 2008). Estos autores sugieren que un mayor aporte de nitrógeno no mejora la eficiencia de uso de nitrógeno en comparación a los tratamientos con dosis de fertilizantes menores.

El aumento en peso fresco y peso seco ha sido documentado en otros experimentos de biofertilización (Cruz, 2009; Mazhar y Hasnain, 2011) y se ha propuesto que esto es debido al efecto de las hormonas promotoras de crecimiento, como auxinas y citoquininas producidas por las cianobacterias (Misra y Kaushik, 1989; Prasanna, 2009).

El peso fresco y seco del bulbo presentó el mismo comportamiento, siendo el tratamiento 40EAF:60T17 con el que se obtuvieron los valores significativamente más altos en el incremento en biomasa fresca (5.6 g) y seca (0.24 g). Se comprobó que la combinación del bioencapsulado (EAF) con el fertilizante químico (T17) incrementó el aprovechamiento de los nutrientes por las plantas de rábano, ya que todos los tratamientos tuvieron un promedio mayor en peso seco a lo obtenido en las plantas tratadas exclusivamente con T17. Se ha descrito que los efectos positivos en las plantas con la aplicación de cianobacterias en suelo se deben a la secreción de reguladores de crecimiento de plantas, tales como, auxinas, giberelinas y citoquininas las cuales estimulan las actividades metabólicas de las raíces (Cocking, 2003).

El brote de las hojas ocurrió simultáneamente en todos los tratamientos, antes de la fertilización. El mayor número de hojas se registró en el tratamiento con 100 %

encapsulados en alginato (100EAF) con un promedio de siete hojas, seguido por las plantas tratadas solamente con fertilizante (100T17), en el cual se registró un promedio de 6.6 hojas, con diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ( $p < 0.05$ ). Algunos autores sugieren que la manifestación de un rápido crecimiento y una mayor expansión en hojas y raíces cuando no hay otras plantas competidoras en la cercanía (Criollo, 2009). El número de hojas es un parámetro de suma importancia en el crecimiento de las plantas, el cual está directamente relacionado con la cantidad de luz que absorben las plantas, ya que es esencial para su crecimiento (Lee, 2005).

#### Contenido de clorofila

En los tratamientos fertilizados con el 40% de EAF y 60% de T17, se obtuvieron concentraciones significativamente mayores de clorofila "a" que al resto de los tratamientos. Sin embargo, aunque el contenido de clorofila fue menor en el resto de los tratamientos, no se presentaron problemas de clorosis en ningún tratamiento, como se ha comprobado que ocurre en plantas con bajo estrés nutricional de nitrógeno (Khamis *et al.*, 1990). Esto sugiere que las plantas no sufrieron deficiencia de nitrógeno en ninguno de los tratamientos.

El contenido de clorofila es uno de los principales indicadores de deficiencia de nutrientes y sobre todo de nitrógeno en las plantas. El hecho de que las plantas fertilizadas con los bioencapsulados presentaran valores similares a las fertilizadas con el 100% de T17, sugiere que los bioencapsulados de *Fischerella* en Ca-alginato satisficieron las necesidades de nitrógeno de las plantas (Trejo *et al.*, 2005).

#### Análisis químico proximal

En la tabla V se muestran los resultados obtenidos en el análisis químico proximal de las plantas de rábano al término del experimento (quinta semana). No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos en ninguna de las variables evaluadas, esto sugiere que el contenido de cenizas, grasa, fibra, proteína, y ELN, en las plantas fertilizadas con triple 17 en todas las combinaciones satisficieron las condiciones nutricionales de las plantas, puesto que la dosis de triple 17 utilizada para el cultivo es la recomendada por manuales de cultivo de *R. sativus*.

En cuanto a la evaluación de los cambios fisicoquímicos del sustrato, se observó que no hubo diferencias significativas en los diferentes tratamientos ( $p > 0.05$ ), sin embargo, el contenido de nitrógeno en el suelo se incrementó en aproximadamente 0.1%. Esto se debe a que es un cultivo de ciclo corto, por lo que, en cultivos de ciclo más largo, el contenido de nitrógeno podría ser mayor. El pH se mantuvo cercano a 5, por lo tanto, se puede decir que no hubo una modificación o acidificación del sustrato por ninguno de los tratamientos. Sin embargo, la capacidad de retención de agua (CRA) tuvo un incremento significativo de aproximadamente el 10% de acuerdo con las condiciones iniciales. Esto coincide con lo mencionado por Mishra y Pabbi (2004) quienes afirman que las cianobacterias excretan un compuesto extracelular que pega las partículas del suelo en forma de microagregados y de esta manera facilita la disponibilidad de nutrientes y mejora las capacidades de retención de agua del mismo.

Por otra parte, se coincide con lo mencionado por Kleiner y Harper (1977), quienes mencionan que las cianobacterias tienen la capacidad de movilizar formas insolubles de fosfatos inorgánicos, lo cual se corroboró con la presencia de más fosfatos extraíbles en el sustrato con la presencia de las cianobacterias.

## 9. Conclusiones

El Ca-alginato es la mejor opción para encapsular a *Fischerella* sp. y emplearlo en el cultivo de rábano.

La mejor combinación para promover el crecimiento de las plantas es de 40 % de encapsulados de Ca-Alginato-Fischerella (EAF) y 60 % de Fertilizante (Triple 17: NPK).

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del sustrato sugieren que el uso de los bioencapsulados de cianobacterias (*Fischerella* sp.) no genera riesgos de lixiviación de nitratos, lo que reduce la pérdida y contaminación de los suelos.

Los polisacáridos de alginato de sodio extraídos del alga *Macrocystis pyrifera*, conforman la matriz que encapsula mejor a la cianobacteria *Fischerella* sp., y contribuye a su mejor desarrollo y potencialización, lo cual favorece el crecimiento y desarrollo de las plantas de *Raphanus sativus*.

El uso del bioencapsulado permite reducir en 40 % la dosis de fertilizante comercial, recomendada para el cultivo de *R. sativus* en particular con lo cual se acepta la hipótesis propuesta.

### **10.Recomendaciones**

Evaluar el efecto del bioencapsulado de Ca-Alginato sobre otras especies de vegetales para determinar su comportamiento y la dosis en función del cultivo.

Realizar experimentos combinando el bioencapsulado de Ca-Alginato con algún fertilizante orgánico, para determinar el comportamiento de los mismos.

Realizar combinaciones con aplicación de cianobacterias como fertilizante foliar para determinar los efectos.

Realizar un análisis del contenido químico de la cianobacterias del género *Fischerella* sp.

## 11. Bibliografía

- Agulló, E., R. Mato, C. Peniche, C. Tapia, A. Heras, J. San Román, W. Arquelles, F. Goycoolea, A. Mayorga, J. Nakamatsu, & A. P. de Abram. 2004. Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.
- Alarcón, A. & C. Ferrera. 1999. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Latinoamericana* 17: 179-191.
- Alonso-Santos, E. 2015. Crecimiento y metabolismo de *Fischerella* sp. (Stigonematales: Cyanobacteria) encapsulada con alginato de *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh 1820. Tesis Universidad del Mar Campus Puerto Ángel, Oaxaca. 96.
- Baca, B. E., U. L. Soto & Pardo R. P. 2000. Fijación biológica del nitrógeno. *Elementos* 38: 43-49.
- Bashan, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that plant growth. *Applied Environmental Microbiology*, 51: 1089-1098.
- Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances*, 16 (4): 729-770.
- Bashan, Y., J-P Hernández, L. A. Leyva & M. Bacilio. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 35: 359-368.
- Bashan, Y., G. Holguin & de-Bashan, L.E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997 - 2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 521 – 577.
- Bäzinger M., G. O. Edmeades, & J. Bolaños. 1997. Relación entre el peso fresco y el peso seco del rastrojo de maíz en diferentes estados fenológicos del cultivo. *Agronomía mesoamericana*, 8: 20-25 pp.



- Cassidy M. B., H. Lee & J. T. Trevors. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 16: 79-101.
- Chevalier P. & De la Noüe J. 1985. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme and Microbiology Technology*, 7: 621-624.
- Cocking, E. C. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and soil*, 252: 169-175.
- Criollo, H. & J. García. 2009. Efecto de la densidad de la siembra sobre el crecimiento de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.) bajo invernadero. *Revista colombiana de ciencias hortícolas*, 1: 27.37.
- Cruz S. M. 2009. Uso de un biofertilizante de dos cultivos de cianobacterias, uno axénico y otro en consorcio, a nivel invernadero para producción parcialmente orgánica de fréjol. Tesis de licenciatura. Departamento de ciencias de la vida. Salgolquí Ecuador. 80.
- Cruz, I., Y. Bashan, G. Hernández-Carmona, & LE. de-Bashan. 2013. Biological deterioration of alginate beads containing immobilized microalgae and bacteria during tertiary wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 9847-9858.
- de-Bashan L. E., M. Moreno, J. P. Hernández & Y. Bashan. 2002. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coinmmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*, 36: 2941-2948.
- Draget K. L., O. Smidsrod & G. Skjak-Braek. 2005. Alginates from algae. In: A Ateinbuchel and SK Rhee (eds). Polysaccharides and Polyamides in the food industry: Properties. *Production and patents I*. Wiley – VCH.
- Espín G., M. Castañeda, J. Guzmán & S. Moreno. 2000. GacS sensor kinase regulates alginate and poly-b-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 182:2624-2628.

- Fallah, S. & A. Tadayyon. 2010. Uptake nitrogen efficiency in forage maize: effects of nitrogen and plant density. *Agrociencia*, 44: 549-560.
- Flores-Castaños O. 2010. Determinación de iones Ca<sup>++</sup> mediante el método de espectroscopía de absorción atómica (EAA) en capsulas de alginato. Tesis. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas. Orizaba, Veracruz. 61.
- Franco. 2004. *Azolla-Anabaena* como abono alternativo en la producción de arroz en el litoral ecuatoriano. Escuela Politécnica de Litoral. Guayaquil-Ecuador. 21.
- Garbisu C., A. Blanco, I. Alkorta, M.J. Llama & J. L. Serra. 1999. Biotecnología con cianobacterias. *Investigación y ciencia*, 272: 64-71.
- Gardner, F., R. Pearce & R. Mitchell. 1985. Physiology of crop plants. Iowa State University Press, Ames, IA.
- García J. P. & J. Espinosa. 2008. Relación del índice de verdor con la aplicación de nitrógeno en diez híbridos de maíz. *Informaciones agronómicas*, 71: 9-14.
- Gómez, G. P., & S. J. Pérez. 2008. Efectos sobre el cultivo de rábano rojo (*Raphanus sativus*, L.) de tres fertilizantes orgánicos. VIII congreso SEAE Murcia. 13.
- González L. E. & Y. Bashan. 2000. Increased growth promotion of the microalga *Chlorella vulgaris* when coinmmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 1527-1531.
- Haselkorn, R. 1978. Heterocysts. Annual. *Physiology*, 29: 319 – 344.
- Hernández-Carmona G., Y. E. Rodríguez-Montesinos, D. I. Arvizu-Higuera, R. Reyes-Tisnao, L. L. Murillo-Álvarez & M. Muñoz-Ochoa. 2012. Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México. *Ingeniería Investigación y tecnología*, 2: 155-168.
- Hernández G.R. 2002. Nutrición mineral. Libro de botánica online. Última actualización: 2002.<http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/nutricionmineral/>

- Karel, S. F., S. B Libicki & C. R. Robertson. 1985. The immobilization of whole cells: engineering principles. *Chemical engineering Science*, 40 (8), 13321- 1354 pp.
- Kangatharalingam, N., J. C. Priscu & H. W. Pearl. 1992. Heterocyst envelope thickness, heterocyst frequency and nitrogenase activity in: *Anabaena flos-aquae*: Influence of oxygen tension. *Journal General Microbiology*, 138: 2673 – 2678.
- Kannaiyan, S. J., S. Aruna, P. K Merina & D. O. Hall. 1997. Immobilized cyanobacteria as a biofertilizer for rice crops. *Journal of Applied Phycology* 9: 167 – 174.
- Kean T., Roth S., & M. Thanou. 2005. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency. *Journal of Control Release*, 3: 643-653.
- Khamis S., T. Lamaze, Y. Lemoine & C. Foyer. 1990. Adaptation of the photosynthetic apparatus in maize leaves as a result of nitrogen limitation. *Plant Physiology*, 94: 1436-1443.
- Kleiner, K. T.& K. T. Harper. 1977. Soil properties in relation to cryptogamic ground cover in canyon-lands National park. *Range Management*, 30: 202-205.
- Lau P., N. F. Tam & Y. S. Wong. 1997. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environmental Technology*, 18: 893- 899.
- Lebsky V. K., L. E. Gonzalez-Bashan & Y. Bashan. 2001. Ultrastucture of coinmmobilization of the microalga *Chlorella vulgaris* with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* and with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* in alginate beads. *Journal Microbiology*, 47: 1-8.
- Lee, R. E. 1999. Phycology. 3rd Edition. Cambridge University Press. United Kingdom. 67-110.

- Lichtenthaler, H. K. 2003. El estrés y la medida del estrés en plantas. *In* La ecofisiología vegetal una ciencia de síntesis. (comps.) Reigosa J. M., Pedrol N., Sánchez A. España. 2003. (Ed.) Thomson 59-107.
- Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *Journal of Biological Chemistry*, 140: 315-332.
- Mantilla, L. C., T. L. García & L. O. Zumaque. 2011. Efecto biofertilizante del preparado: residuos vegetales-bacteria nativa diazótropa, sobre las variables biométricas en plántulas de *Rhapanus sativus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13: 156-162.
- Martínez, R. E. 2001. Poblaciones de *Rhizobia* Nativas de México. *Acta Zoológica Mexicana*, 1: 29-38.
- Mayashree, B. S. 2005. Entrapped cyanobacteria: Implications for biotechnology. *Indian Journal of Biotechnology*, 4: 209 - 215.
- Mazhar S. & S. Hasnain. 2011. Screening of native plant growth promoting cyanobacteria and their impact on *Triticum aestivum* var. Uqab. 2000. *Growth African journal of agricultural research*, 6: 3988-3993.
- Misra S. & B. D. Kaushik. 1989. Growth promoting substances of cyanobacteria II. Detection of amino acids sugars and auxins. Proceedings of the Indian. *National Science Academy*, 6: 499-504.
- Musgrave, S. C., N. W. Kerby, G. A. Codd, & W. D. P. Stewart. 1983. Structural features of calcium alginate entrapped cyanobacteria modified for ammonia production. *Journal applied Microbiology Biotechnology*, 17: 133 - 136.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.
- Okuyama, K., K. Noguchi, M. Kanenari, T. Egawa, K. Osawa, & K. Ogawa. 2000. Structural diversities of chitosan and its complexes. *Carbohydrate Polymers*. 41 (3) 237-247.

- Pereira, I., R. Ortega, L. Barrientos, M. Moya, G. Reyes & V. Kramm. 2009. Development of a biofertilizer based on filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria for rice crops in Chile. *Journal of Applied Physiology* 21: 135-144.
- Pérez-García R. O. 2009. Eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de agua residual usando un sistema inmovilizado microalga-bacteria en crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. Programa de estudios de posgrado. La Paz, Baja California Sur. 152.
- Pérez-Gómez L. 2011. Evaluación del cultivo de rábano (*Raphanus sativus* L.) bajo diferentes condiciones de fertilización orgánica e inorgánica. Tesis, Universidad autónoma agraria Antonio Narro división de agronomía. México. 65.
- Prasanna R., P. Jaiswal & B. D. Kaushik. 2008. Cyanobacteria as potential options for environmental sustainability promises and challenges. *Indian journal microbiology*, 48:89-94.
- Prankatova, E. M. 2006. Functioning of Cyanobacteria in soil ecosystems. *Eurasian soil science*, 39: 118-127.
- Ramírez, R. & M. Pérez. 2006. Evaluación del potencial de los biosólidos procedentes del tratamiento de aguas residuales para uso agrícola y su efecto sobre el cultivo de rábano rojo (*Raphanus sativus* L.). *Revista facultad nacional agronomía Medellín*, 59: 2: 3543-3556.
- Reyna, V. R., V. M. Hernández, M.D. Hernández, G. F. Esparza & C. O. Villanueva. 2007. Establecimiento de un consorcio microbiano fijador de nitrógeno con uso potencial como biofertilizante. En: XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería de México.
- Rippka, R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman & R. Y. Stanier. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of cultures of cyanobacteria. *Journal General Microbiology*, 111: 1 – 61.

- Roger, P. A. & J. K. Ladha. 1992. Biological N<sub>2</sub>-fixation in wetland rice fields: Estimation and contribution to nitrogen balance. *Plant and soil*, 141:41-55.
- Roger, P. A., A. Tirol, S. Santiago-Ardales & I. Watanabe. 1986. Chemical composition of cultures and natural samples of N<sub>2</sub>-fixation in wetland rice, potentialities, current usage, and limiting factors. *Fertilizer Research*, 9: 39-77.
- Ruano, B. S. 2002. Enciclopedia práctica de la agricultura y la ganadería. Hortalizas aprovechadas por sus raíces y tubérculos; rábano. 552-562.
- Sabra W., A. Zeng, H. Lunsdorf & W. Deckwer. 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *American Society for Microbiology*, 9:4037-4044.
- Seymour, J. 2002. Biblioteca del campo; manual agropecuario, tecnologías orgánicas de las granjas integrales autosuficientes. *Editorial Limerin*, 722-723.
- Sotelo, D. L., J. A. Jiménez, A. T. de Zan, & M. C. Cueto. 2012. Efecto de inoculación de microorganismos en crecimiento de rábano (*Raphanus sativus*). *Bioteología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 10: 21-31.
- Srinivasan, K. & N. Mathivanan. 2009. Biological control of sunflower necrosis virus disease with powder and liquid formulations of plant growth promoting microbial consortia under field conditions. *Biological Control*, 51: 395-402.
- Tam, N. F. Y. & Y. S. Wang. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentration on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*, 107: 145-151.
- Treniti, V. & M. Silva. 2003. Producción orgánica de hortalizas en huertos familiares COSV-CEBYCAM, Municipio de Chunchi, Municipio de Penipe. 15-16.
- Trejo, T., I. Libia, M. F. Gómez, M. M. Rodríguez & G. G. Alcántara. 2005. Fertilización foliar con urea en la partición de Nitrógeno en espinaca. *Terra Latinoamericana* 23: 495-503.

- Trevors, J. T., J. D. Van-Elsas, H. Lee & A. C. Wolters. 1993. Survival of alginate-encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells in soil. *Applied Microbial Biotechnology*, 39: 637-643.
- Trujillo, T. Ma. N. & F. E. Ramírez. 2010. Producción de maíz en temporal con el uso de algas verde-azules en la Costa de Oaxaca. *AGROproduce*, 27:21-25.
- Uhart, S. & H. Echeverría. 1996. El rol del nitrógeno y del fósforo en la producción de maíz. Semillas híbridas Morgan. [http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh\\_0032/0901b8038003272b.pdf?f](http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh_0032/0901b8038003272b.pdf?f)
- Valderrama, L.T., C. M. del Campo, C. M. Rodríguez, L. E. de-Bashan & Y. Bashan. 2002. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research*, 36:4185-4192.
- Valerio, E., L. Chambel, S. Paulino, N. Faria, P. Pereira & R. Tenreiro. 2009. Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs. *Microbiology*, 155: 642-656.
- Valles, A. P. 2016. Cultivo de rábano. Consultado 01 de junio 2016. Disponible en: [http://plantas.facilissimo.com/reportajes/huertos/el-cultivo-del-rabano\\_184364.html](http://plantas.facilissimo.com/reportajes/huertos/el-cultivo-del-rabano_184364.html)
- Viven, C. 2010. El rábano. Consultado en 01 de enero 2016. Disponible en: [http://blog.clementeviven.com/?page\\_id=165](http://blog.clementeviven.com/?page_id=165)
- Yabur, P. R., Y. Bashan & G. Hernández-Carmona. 2007. Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *Journal of Applied Phycology*, 19: 43 – 53.

## Anexos

Anexo 1. Formulación para la preparación de medios de cultivo BG11

Tabla VII. Reactivos utilizados para la preparación del medio de cultivo.

<b>MEDIO Reactivo</b>	<b>BG11 g.L<sup>-1</sup></b>
NaCl	0.23
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.075
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.036
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> (ácido cítrico)	0.006
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> (EDTA)	0.001
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0.04
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> (Citrato férrico)	0.006
NaNO <sub>3</sub>	0.015
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02
<b>*Solución de oligoelementos</b>	<b>1 mL.L<sup>-1</sup></b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.286
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.181
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.022
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.039
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0079
CoCl <sub>2</sub>	0.00494
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.05



Anexo 2. Resultados de las evaluaciones biométricas de las plantas de *R. sativus* en la primera evaluación del encapsulado.

Tabla VIII. Variables biométricas en respuesta a los diferentes tratamientos en la primera evaluación del cultivo de *R. sativus*.

Variables	Tratamientos									ρ-level
	EAF	EAQF	CA	CAQ	AP	QP	FF	T	T17	
LH (cm)	16.8 ± 0.8 <sup>d</sup>	15.6 ± 0.9 <sup>cd</sup>	7.3 ± 1.0 <sup>a</sup>	6.98 ± 1.1 <sup>a</sup>	8.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	9.7 ± 1.3 <sup>b</sup>	11.4 ± 0.4 <sup>bc</sup>	6.0 ± 1.1 <sup>a</sup>	21.6 ± 0.6 <sup>e</sup>	ρ < 0.05
DP (cm)	3.0 ± 0.1 <sup>bc</sup>	3.0 ± 0.1 <sup>abc</sup>	1.5 ± 0.3 <sup>ad</sup>	1.58 ± 0.3 <sup>ab</sup>	2.2 ± 0.2 <sup>ab</sup>	2.3 ± 0.3 <sup>abc</sup>	2.4 ± 0.2 <sup>abc</sup>	1.5 ± 0.3 <sup>d</sup>	2.7 ± 0.1 <sup>c</sup>	ρ < 0.05
DE (cm)	2.0 ± 0.0 <sup>c</sup>	1.9 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>ab</sup>	0.88 ± 0.1 <sup>ab</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.1 <sup>ad</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>cd</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.9 ± 0.1 <sup>e</sup>	ρ < 0.05
LR (cm)	5.8 ± 0.5 <sup>a</sup>	6.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.9 <sup>a</sup>	5.46 ± 1.1 <sup>a</sup>	5.8 ± 0.6 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.8 <sup>a</sup>	6.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	8.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	ρ > 0.05
PFH (g)	5.3 ± 0.5 <sup>b</sup>	4.7 ± 0.6 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>ac</sup>	1.23 ± 0.3 <sup>ac</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.6 ± 0.2 <sup>bc</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	8.6 ± 1.1 <sup>d</sup>	ρ < 0.05
PSH (g)	0.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>ac</sup>	0.09 ± 0.0 <sup>ac</sup>	0.09 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>bc</sup>	0.07 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>d</sup>	ρ < 0.05
PFB (g)	5.2 ± 0.5 <sup>d</sup>	5.0 ± 0.8 <sup>cd</sup>	0.4 ± 0.2 <sup>ab</sup>	1.12 ± 0.2 <sup>ab</sup>	1.6 ± 0.3 <sup>ab</sup>	1.9 ± 0.4 <sup>bc</sup>	3.7 ± 0.4 <sup>cd</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.8 <sup>e</sup>	ρ < 0.05
PSB (g)	0.2 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>bc</sup>	0.01 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.09 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.01 ± 0.0 <sup>bc</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>d</sup>	ρ < 0.05
NH	6.2 ± 0.2 <sup>c</sup>	5.9 ± 0.2 <sup>c</sup>	3.1 ± 0.5 <sup>ab</sup>	3.01 ± 0.5 <sup>ab</sup>	3.4 ± 0.3 <sup>ab</sup>	3.9 ± 0.5 <sup>ac</sup>	4.5 ± 0.2 <sup>ac</sup>	2.8 ± 0.5 <sup>b</sup>	5.0 ± 0.4 <sup>d</sup>	ρ < 0.05
Cl "a" (mg.g <sup>-1</sup> )	0.5 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.4 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.07 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.09 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.09 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>cd</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>bd</sup>	0.08 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.0 <sup>e</sup>	ρ < 0.05

Anexo 3. Resultados de las evaluaciones biométricas de las plantas de *R. sativus* fertilizadas con las distintas combinaciones de bioencapsulado y fertilizante químico.

Tabla IX. Variables biométricas en respuesta a las diferentes combinaciones de encapsulado y fertilizante químico en la evaluación del cultivo de *R. Sativus*.

Variables	Tratamientos							p-level
	20EAF:80T17	40EAF:60T17	50EAF:50T17	60EAF:40T17	80EAF:20T17	100EAF	100T17	
LH (cm)	21.0 ± 0.6 <sup>ab</sup>	21.1 ± 0.6 <sup>b</sup>	19.8 ± 0.8 <sup>ab</sup>	18.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	19.8 ± 0.7 <sup>a</sup>	19.7 ± 1.6 <sup>c</sup>	20.4 ± 0.9 <sup>b</sup>	$\rho < 0.05$
DP (cm)	2.4 ± 0.2 <sup>ab</sup>	3.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.2 <sup>ab</sup>	2.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.2 <sup>ab</sup>	2.8 ± 0.2 <sup>ab</sup>	2.0 ± 0.2 <sup>ab</sup>	$\rho < 0.05$
DE (cm)	1.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>	1.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>ab</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>ab</sup>	$\rho < 0.05$
LR (cm)	4.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	$\rho > 0.05$
PFH (g)	8.8 ± 0.5 <sup>abc</sup>	9.5 ± 0.8 <sup>c</sup>	8.2 ± 0.8 <sup>abc</sup>	7.1 ± 0.8 <sup>ab</sup>	7.7 ± 0.5 <sup>ab</sup>	9.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	8.4 ± 0.7 <sup>bc</sup>	$\rho < 0.05$
PSH (g)	0.6 ± 0.0 <sup>abc</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>bc</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>abc</sup>	0.4 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>c</sup>	$\rho < 0.05$
PFB (g)	2.8 ± 0.5 <sup>ab</sup>	5.6 ± 0.9 <sup>b</sup>	2.7 ± 0.7 <sup>ab</sup>	3.1 ± 0.6 <sup>ab</sup>	2.9 ± 0.6 <sup>ab</sup>	3.7 ± 0.7 <sup>ab</sup>	2.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	$\rho < 0.05$
PSB (g)	0.1 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.1 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.1 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	$\rho < 0.05$
NH	5.8 ± 0.2 <sup>ab</sup>	6.2 ± 0.2 <sup>ab</sup>	5.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	6.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	6.5 ± 0.3 <sup>ab</sup>	6.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	6.6 ± 0.3 <sup>b</sup>	$\rho < 0.05$
Cl "a" (mg.g <sup>-1</sup> )	0.8 ± 0.0 <sup>cd</sup>	0.9 ± 0.0 <sup>d</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>abc</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>abc</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>bcd</sup>	$\rho < 0.05$

Anexo 4. Elaboración y evaluación del biofertilizante de *Fischerella* sp. de experimentación para la evaluación del biofertilizante.

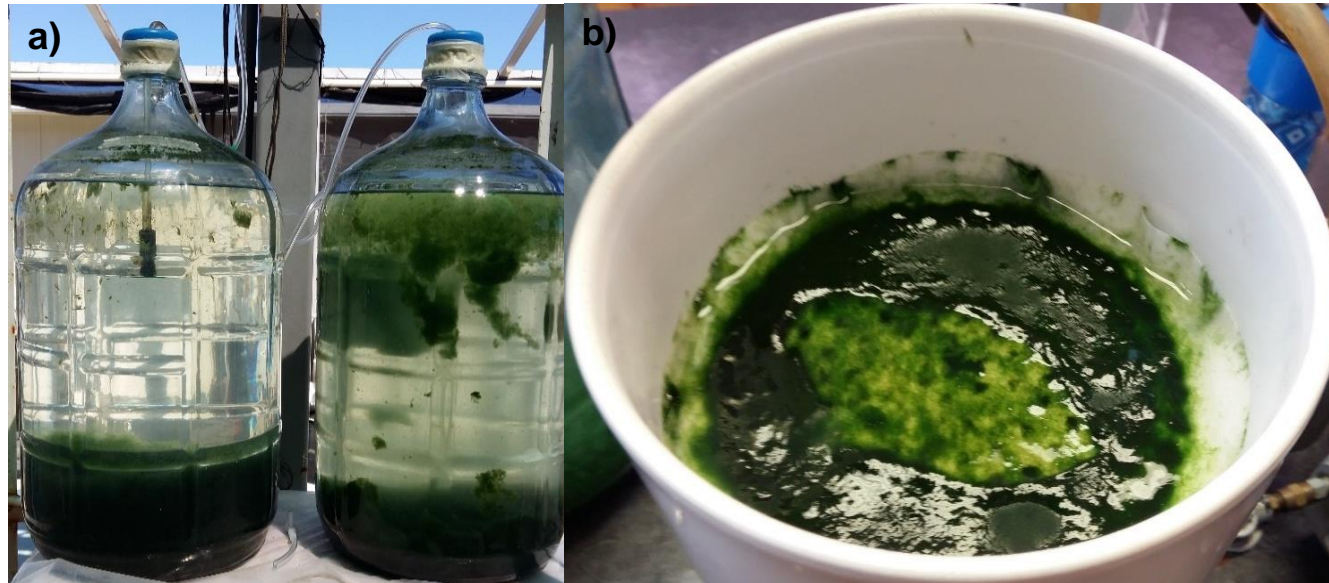


Fig. 17 a) Cultivo de *Fischerella* sp. en medio de BG11, b) Cosecha de la biomasa de *Fischerella* sp. para la elaboración de los encapsulados poliméricos.

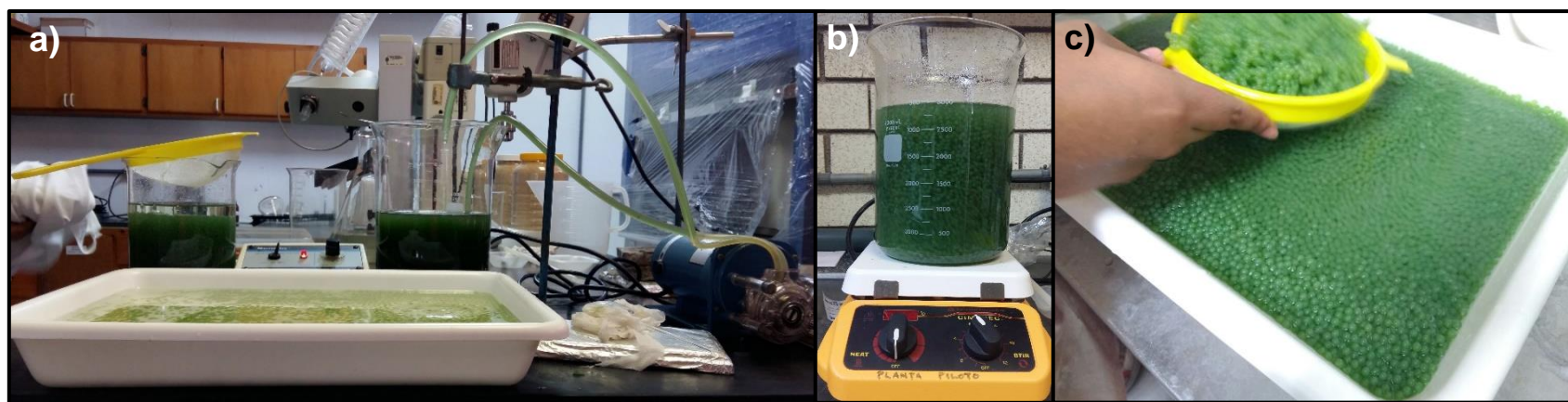


Fig. 18 a) Elaboración de los bioencapsulados poliméricos (EAF), b) adición de la biopelícula de quitosano (EAQF), c) recuperación de las capsulas elaboradas.



Fig. 19 Establecimientos de los dos tipos de bioencapsulados en medio de cultivo BG11 a) encapsulado de Fischerella en Ca-Alginato (EAF), b) encapsulado de Fischerella en Ca-Alginato-Chitosano (EAQF).





Fig. 20 Establecimiento del cultivo de *Raphanus sativus*.



Fig. 21 a) Fertilización del cultivo de rábano con el bioencapsulado de *Fischerella* sp., b) Crecimiento de las plantas en cultivo, c) Toma de muestra para evaluación de las variables biométricas.

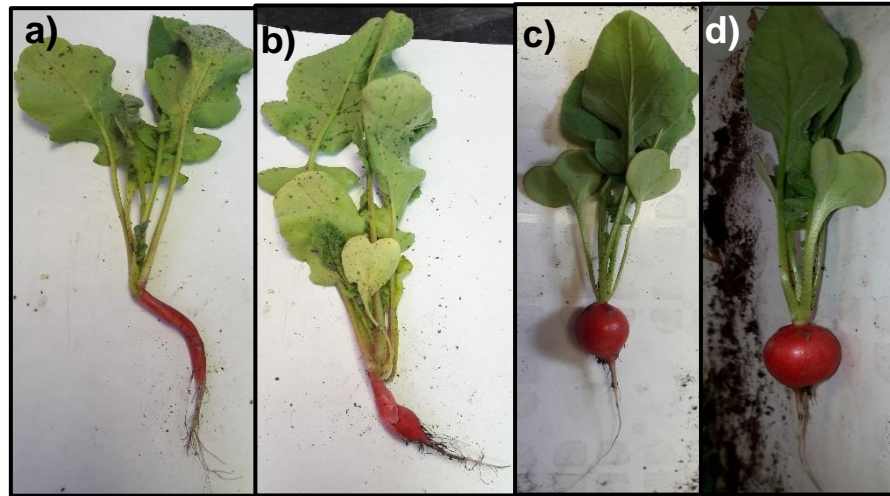


Fig. 22 a) Planta sin fertilizar, b) planta fertilizada con los capsulas de Ca-alginato quitosano (CAQ), c) planta fertilizada con encapsulado de Ca-alginato-Fischerella (EAF), d) planta fertilizada con la combinación 40EAF:60 T17.

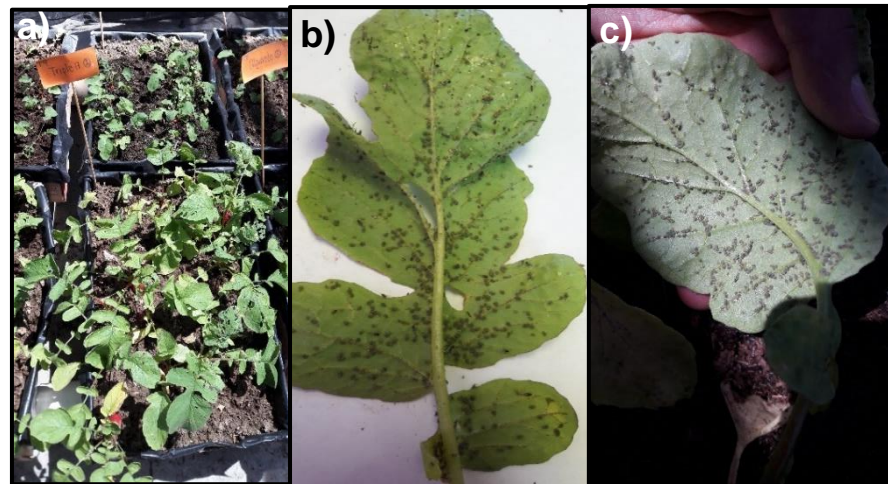


Fig. 23 a) cultivo de rábano con la presencia de plaga (áfidos), b) y c) hojas de las plantas de rábano infestadas de áfidos a la quinta semana de cultivo.