



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“Evaluación del uso de biochar como portador microbiano en la
formulación de un bioinoculante sólido a base de *Enterobacter cloacae*
G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07”**

Tesis que presenta:
LBT. Blanca Ivette Pérez Pérez

Para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Director de tesis:
D.C. Josué Altamirano Hernández

Co-director de tesis:
D.C. Carlos Rubén Sosa Aguirre

Comité sinodal:

**D.C. Alfonso Luna Cruz
D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco
D.C. Jesús Campos García**

**Morelia, Michoacán;
agosto de 2025**





El presente trabajo de investigación se realizó bajo la asesoría del D.C. Josué Altamirano Hernández y la coasesoría del D.C. Carlos Rubén Sosa Aguirre, en el Laboratorio de Nutrición Vegetal del IIQB-UMSNH, en colaboración con el CIDAM A.C.; los estudios de maestría que lo sustentan fueron financiados por la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) mediante la beca 1237942.



Ciencia y Tecnología
Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres María Rosio Pérez Flores y Gustavo Pérez Pérez; a mis hermanos Daysi Arely y Gustavo Ángel; y a mis tíos Miguel Ángel y Guillermina Pérez Flores, por todo el apoyo recibido a lo largo de estos años de estudio, por su amor incondicional y por creer siempre en mí.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la vida, la fortaleza y la claridad para poder concluir este trabajo.

A mi esposo, M.C. David Vargas Tejeda, por su apoyo incondicional, paciencia y entrega; sin él, esta tesis no habría sido posible.

A mis asesores, D.C. Josué Altamirano Hernández y D.C. Carlos Rubén Sosa Aguirre, por su orientación, rigor científico y por la confianza depositada en mí.

A mis sinodales D.C. Alfonso Luna Cruz y D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco, por sus valiosas observaciones y recomendaciones a lo largo de este trabajo.

Al Laboratorio de Nutrición Vegetal del IIQB-UMSNH y al CIDAM A.C., por las facilidades brindadas.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada (1237942) para la realización de esta maestría.

A mis compañeras de maestría, Katia López Torres y Yuritzi Verduzco Cortés, por su orientación, apoyo y compañía a lo largo del posgrado.

A mis compañeros de laboratorio, Eréndira, Brislet, Paty, Daniel, David, Fer, Viviana y Javier por sus consejos y por hacer más ameno el tiempo compartido en el laboratorio.

"There are no such things as pure and applied science; there are only science and the application of science."

-Louis Pasteur

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)	14
2.2 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal	15
2.2.1 Fijación biológica de nitrógeno	17
2.2.2 Solubilización de fósforo	18
2.2.3 Solubilización de calcio	20
2.2.4 Producción de fitohormonas	22
2.3 Uso de PGPR en la formulación de bioinoculantes	24
2.3. <i>Enterobacter cloacae</i> y <i>Paenibacillus polymyxa</i> como PGPR	27
2.3.1. <i>Enterobacter cloacae</i>	27
2.3.2. <i>Paenibacillus polymyxa</i>	28
2.4 Tipos de formulaciones de bioinoculantes	30
2.4.1 Bioinoculantes líquidos	32
2.4.2 Bioinoculantes poliméricos	32
2.4.3 Bioinoculantes sólidos	33
2.6 Biochar como portador microbiano en bioinoculantes sólidos	34
2.6.1 Uso de bagazo de agave en la producción de biochar	38
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	42
5.1 Objetivo general	42
5.2 Objetivos específicos	42
6. MATERIALES Y MÉTODOS	43
6.1 Material biológico	43
6.1.1 <i>Enterobacter cloacae</i> G50-78 y <i>Paenibacillus polymyxa</i> LAD-07	43
6.2 Maíz blanco híbrido H-318	43
6.2 Ensayos de virulencia	45
6.2.1 Crecimiento y mantenimiento de <i>Caenorhabditis elegans</i> WT2	45
6.2.2 Ensayo de virulencia en <i>C. elegans</i> WT2	45
6.2.3 Prueba de hemólisis en agar sangre	47
6.3 Cinéticas de crecimiento bacteriano	48

6.4 Producción y caracterización de biochar a partir de bagazo de agave	49
6.4.1 Producción de biochar	49
.....	50
6.4.2 Acondicionamiento del biochar para su aplicación como portador microbiano	50
6.4.3 Caracterización físicoquímica del biochar.....	51
6.4.4 Caracterización microscópica de biochar	52
6.4.4.1 Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido	52
6.5 Formulación del bioinoculante sólido	54
6.5.1 Preparación de los cultivos bacterianos	54
6.5.2 Adición de biochar como portador microbiano	54
6.5.3 Incorporación de excipientes para formulación sólida	56
6.5.4 Secado y obtención del bioinoculante en polvo	57
6.5.5 Envasado y almacenamiento	57
6.5.6 Evaluación de la viabilidad bacteriana.....	58
6.6 Caracterización físicoquímica del bioinoculante sólido	59
6.7 Caracterización microscópica del bioinoculante	60
6.8 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal <i>in vitro</i>	61
6.8.1 Determinación de la capacidad fijadora de nitrógeno	61
6.8.2 Determinación de la capacidad de solubilización de fósforo en medio NBRIP.....	62
6.8.3 Determinación de la solubilización de calcio en medio Pikovskaya.....	63
6.8.4 Determinación de la producción de auxinas	64
6.9 Ensayos de germinación	65
6.9.1 Selección de semillas	65
6.9.2 Pretratamiento.....	65
6.9.3 Desinfección.....	65
6.10 Recubrimiento de semillas con bioinoculante sólido.....	66
6.11 Siembra de las semillas en charolas.....	67
6.12 Parámetros del desarrollo vegetal de plántas de maíz en condiciones de vivero.....	69
6.13 Evaluación de la estabilidad y vida de anaquel del bioinoculante	70
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
7.1 Ensayos de virulencia.....	72
7.1.1 Ensayo de virulencia en <i>C. elegans</i> WT2.....	72

7.1.2 Prueba de hemólisis en agar sangre.....	74
7.2 Cinéticas de crecimiento	77
7.2 Producción y caracterización del biochar.....	79
7.2.1 Producción y acondicionamiento del biochar.....	79
7.3 Caracterización físicoquímica del biochar.....	81
7.4 Caracterización microscópica del biochar de bagazo de agave.....	85
7.5 Análisis físicoquímico de las formulaciones de bioinoculante sólido	88
7.5.1 Descripción física	88
7.5.2 Descripción del bioinoculante control (0 % biochar)	91
7.5.3 Comparación de las formulaciones (0 %, 4 % y 6 % de biochar).....	96
7.6.1 Micrografías electrónicas del bioinoculante control (0 % biochar)	100
7.6.2 Micrografías electrónicas de las cepas <i>Enterobacter cloacae</i> G50-78 y <i>Paenibacillus polymyxa</i> LAD-07.....	102
7.6.3 Micrografías electrónicas del bioinoculante con 4 % de biochar	104
7.6.4 Micrografías electrónicas del bioinoculante con 6 % de biochar	106
7.7 Propiedades de promoción del crecimiento vegetal <i>in vitro</i> de <i>E. cloacae</i> G50-78 y <i>P. polymyxa</i> LAD-07 en formulación sólida.....	108
7.7.1 Fijación biológica de nitrógeno	108
7.5.2 Solubilización de fósforo	110
7.5.3 Solubilización de calcio	112
7.5.4 Producción de AIA.....	113
7.6 Evaluar el efecto de las formulaciones sobre la germinación y vigor de plántulas de maíz híbrido h-318 en condiciones de vivero.....	115
7.6.1 Ensayo de germinación	115
7.6.2 Índices de vigor I Y II	117
7.7.1 Longitud de las plantas en etapa (V3) <i>E. cloacae</i> G50-78	120
7.7.2 Longitud de las plantas en etapa (V3) <i>P. polymyxa</i> LAD-07.....	122
7.7.3 Peso fresco de las plantas en etapa (V3) <i>E. Cloacae</i> G50-78	123
7.7.4 Peso fresco de las plantas en etapa (V3) <i>P. polymyxa</i> LAD-07	124
7.7.7 Longitud de plantas en etapa (V4) <i>E. Cloacae</i> G50-78	127
7.7.8 Longitud de plantas en etapa (V4) <i>P. polymyxa</i> LAD-07	128
7.7.9 Peso fresco de las plantas en etapa (V4) <i>E. Cloacae</i> G50-78	129
7.7.10 Peso fresco de las plantas en etapa (V4) <i>P. polymyxa</i> LAD-07.....	130
7.7.11 Peso seco de las plantas en etapa (V4) <i>E. Cloacae</i> G50-78.....	131

7.7.13 Comparación entre las diferentes formulaciones sobre parámetros del crecimiento vegetal en etapa (V4)	133
7.8 Evaluación de la viabilidad y estabilidad del bioinoculante sólido.....	136
8. CONCLUSIÓN	139
9. REFERENCIAS	140

RESUMEN

La intensificación agrícola basada en fertilizantes químicos ha generado efectos adversos en la fertilidad del suelo y en el ambiente, lo que impulsa la búsqueda de alternativas sostenibles. En este contexto, los bioinoculantes microbianos representan una estrategia eficaz para promover el crecimiento vegetal y reducir la dependencia de insumos químicos. No obstante, su efectividad depende en gran medida del tipo de formulación y de la estabilidad de las cepas durante su almacenamiento y aplicación. El presente trabajo evaluó la formulación de un bioinoculante sólido utilizando biochar de bagazo de agave como portador de *Enterobacter cloacae* G50-78 (Gram negativa) y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 (Gram positiva). Se caracterizaron los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal (fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fósforo y calcio, y producción de AIA), así como el efecto de las formulaciones con diferentes concentraciones de biochar (0-8 %) en el desarrollo de plántulas de maíz híbrido H-318 en vivero. Los resultados muestran que el biochar no solo favorece la viabilidad y estabilidad microbiana, sino que también mejora parámetros fisiológicos y de crecimiento en maíz, especialmente en formulaciones con 4 % y 6 % de biochar. Estos hallazgos evidencian que el bagazo de agave, un residuo agroindustrial abundante en Michoacán, puede valorizarse como portador microbiano, contribuyendo al desarrollo de bioinoculantes más eficientes y sostenibles para la agricultura.

Palabras clave: Bioinoculantes sólidos; biochar de bagazo de agave; *Enterobacter cloacae*; *Paenibacillus polymyxa*; maíz híbrido H-318.

ABSTRACT

The intensive use of chemical fertilizers in agriculture has generated adverse effects on soil fertility and the environment, fostering the search for sustainable alternatives. In this context, microbial bioinoculants represent an effective strategy to promote plant growth and reduce dependence on chemical inputs. However, their effectiveness largely depends on the formulation type and the stability of the strains during storage and application. This study evaluated the formulation of a solid bioinoculant using agave bagasse biochar as a carrier for *Enterobacter cloacae* G50-78 (Gram-negative) and *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 (Gram-positive). The mechanisms of plant growth promotion (biological nitrogen fixation, phosphorus and calcium solubilization, and IAA production) were characterized, as well as the effect of formulations with different biochar concentrations (0-8%) on the development of maize hybrid H-318 seedlings in nursery conditions. Results showed that biochar not only enhanced microbial viability and stability but also improved physiological and growth parameters in maize, particularly in formulations with 4% and 6% biochar. These findings highlight that agave bagasse, a widely available agro-industrial residue in Michoacán, can be valorized as a microbial carrier, contributing to the development of more efficient and sustainable bioinoculants for agriculture.

Keywords: Solid bioinoculants; agave bagasse biochar; *Enterobacter cloacae*; *Paenibacillus polymyxa*; maize hybrid H-318.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el crecimiento exponencial de la población humana ha ejercido una presión sin precedentes sobre los sistemas agrícolas. Se estima que para el año 2050 la población mundial superará los 9.7 mil millones de personas, lo que implicará un aumento considerable en la demanda global de alimentos **(FAO, 2023; ONU, 2022)**. Para hacer frente a este desafío, la agricultura convencional ha intensificado el uso de agroquímicos, especialmente fertilizantes nitrogenados y fosfatados, logrando incrementar significativamente los rendimientos agrícolas **(Zhang et al., 2021)**.

Sin embargo, esta intensificación ha tenido consecuencias ambientales y sociales preocupantes. El uso excesivo de fertilizantes sintéticos ha contribuido a la degradación de suelos, contaminación de cuerpos de agua por eutrofización, y emisiones de gases de efecto invernadero como el óxido nitroso (N_2O), uno de los principales causantes del calentamiento global **(Choudhury et al., 2022; Liu et al., 2023)**. Además, la acumulación de nitratos y fosfatos en el ambiente ha sido relacionada con impactos negativos sobre la salud humana, como enfermedades respiratorias y alteraciones en la calidad del agua potable **(Lu et al., 2020)**.

Frente a esta problemática, surge la necesidad de promover prácticas agrícolas más sostenibles que aseguren la productividad sin comprometer la integridad ambiental. En este contexto, los bioinoculantes microbianos se perfilan como una alternativa prometedora. Estos productos, formulados a partir de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), tienen la capacidad de mejorar la disponibilidad de nutrientes, estimular el desarrollo radicular, inducir resistencia sistémica y aumentar la tolerancia a condiciones de estrés biótico y abiótico **(Backer et al., 2018; Malusá & Vassilev, 2021)**. Su aplicación puede disminuir la dependencia de fertilizantes químicos hasta en un 50% **(Torres-Solorzano et al., 2025)** lo que beneficia tanto al medio ambiente como a los productores.

El éxito de los bioinoculantes en campo depende en gran medida de su formulación. Las formulaciones sólidas, en particular, ofrecen ventajas importantes como una mayor estabilidad durante el almacenamiento, mejor manejo y protección frente a condiciones ambientales adversas. No obstante, uno de los principales retos sigue siendo mantener la viabilidad de las bacterias durante largos periodos y asegurar su liberación eficiente en la rizósfera **(Herrmann & Lesueur, 2023)**.

En este sentido, el uso de biochar como portador microbiano ha recibido creciente atención. El biochar, un material carbonoso obtenido por pirólisis de residuos orgánicos, que posee propiedades fisicoquímicas favorables como alta porosidad, superficie específica elevada, y capacidad de retención de agua y nutrientes **(Lehmann & Joseph, 2015)**. Estas características lo convierten en un portador ideal para el transporte y protección de microorganismos benéficos, al tiempo que mejora la calidad del suelo y actúa como sumidero de carbono. Cuando se obtiene a partir de residuos agroindustriales como el bagazo de agave, además, se promueve la economía circular y se reduce la huella ambiental del sistema productivo **(Ding et al., 2023; Tan et al., 2022)**.

En esta investigación, se evaluó el potencial de formulaciones sólidas elaboradas con biochar de bagazo de agave como portador microbiano, utilizando dos cepas PGPR con características fisiológicas contrastantes: *Enterobacter cloacae* G50-78, bacteria Gram negativa no esporulada, y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07, bacteria Gram positiva formadora de esporas. Ambas cepas fueron formuladas por separado con distintas concentraciones de biochar y evaluadas en términos de viabilidad, estabilidad y capacidad promotora del crecimiento vegetal.

Finalmente, con el objetivo de evaluar la funcionalidad agronómica de estas formulaciones, se realizaron ensayos en condiciones de vivero utilizando plantas de maíz blanco híbrido H-318, una variedad ampliamente cultivada en México. Esta aproximación experimental permite comprender mejor la interacción entre formulación, microorganismo y planta hospedera, y contribuye al desarrollo de estrategias biotecnológicas para una agricultura más eficiente y sostenible.

2. ANTECEDENTES

2.1 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR)

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, conocidas como PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), constituyen un grupo funcional de bacterias benéficas que habitan en la rizósfera, sobre la superficie radicular o incluso en el interior de las plantas (endófitas), y que contribuyen al desarrollo vegetal a través de múltiples interacciones ecológicas y fisiológicas. Estas bacterias no sólo mejoran el rendimiento de los cultivos, sino que también favorecen la sostenibilidad de los agroecosistemas al reducir la dependencia de fertilizantes y agroquímicos sintéticos.

El concepto de PGPR fue introducido por Kloepper y Schroth en la década de 1970, al describir cepas bacterianas con la capacidad de colonizar raíces y promover el crecimiento vegetal de manera consistente **(Kloepper et al., 1980)**. Desde entonces, se ha ampliado para incluir una amplia diversidad de géneros bacterianos, tanto Gram negativos como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Enterobacter* y *Rhizobium*, como Gram positivos, especialmente del género *Bacillus* y *Paenibacillus* **(Lugtenberg & Kamilova, 2009; Dutta & Podile, 2010)**.

La relevancia de las PGPR en la agricultura moderna radica en su capacidad para interactuar eficazmente con diversas especies vegetales bajo distintas condiciones ambientales, siendo compatibles con prácticas de manejo integrado y agroecológico. Además, su uso como base de bioinoculantes microbianos se considera una herramienta clave en la transición hacia una agricultura más resiliente y eficiente en el uso de recursos **(Malusá & Vassilev, 2014)**.

2.2 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal

Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal son los procesos biológicos, químicos y moleculares mediante los cuales ciertos microorganismos, especialmente PGPR, estimulan directamente o indirectamente el desarrollo de las plantas (Figura 1) **(Vejan et al., 2016)**.

Los mecanismos directos tienen un impacto positivo inmediato sobre el desarrollo vegetal, al intervenir directamente en procesos fisiológicos y nutricionales de la planta, mientras que los mecanismos indirectos se relacionan con la mejora del estado de salud de la planta y su capacidad para enfrentar condiciones adversas, principalmente mediante la supresión de patógenos o la inducción de respuestas defensivas **(Bhattacharyya & Jha, 2012)**.

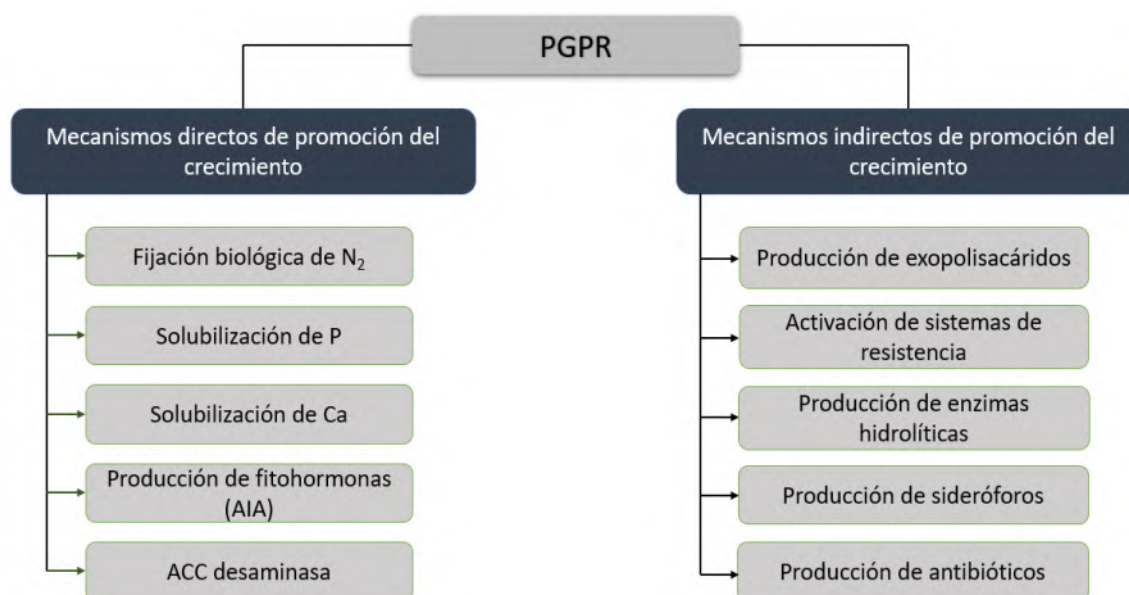


Figura1. Mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal

Las principales estrategias funcionales mediante las cuales las PGPR benefician directamente el crecimiento vegetal y la productividad de los cultivos (Figura 2). Su importancia radica en que actúan sobre procesos fisiológicos fundamentales para el desarrollo de la planta, especialmente bajo condiciones de estrés ambiental o limitación nutricional.

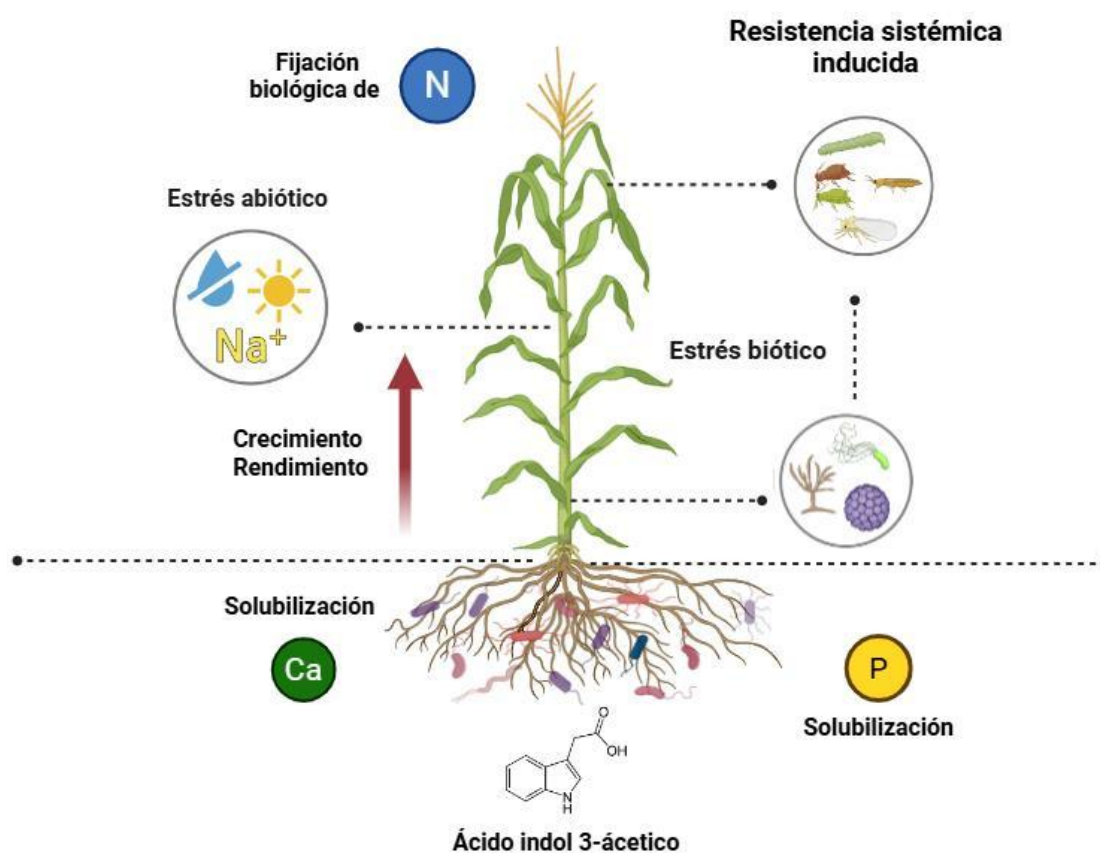


Figura 2. Principales mecanismos ejercidos por las PGPR, incluyendo: fijación biológica de nitrógeno (N_2) atmosférico, solubilización de nutrientes como fósforo (P) y calcio (Ca), producción de fitohormonas como el ácido indolacético (AIA), y la mejora del crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés biótico y abiótico.

2.2.1 Fijación biológica de nitrógeno

La FBN es un proceso clave en la ecología del suelo, mediante el cual ciertos microorganismos, denominados diazótrofos, convierten el nitrógeno atmosférico (N_2), (una forma químicamente inerte), en amonio (NH_4^+), que si puede ser asimilado por las plantas. Este proceso es catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa, el cual requiere condiciones microaerófilas y un elevado consumo energético para su funcionamiento (Figura 3) **(Dos Santos et al., 2012)**.

La FBN constituye la principal vía natural de incorporación de nitrógeno a los ecosistemas terrestres, proporcionando entre el 60 y el 90 % del nitrógeno utilizado por las plantas **(Mus et al., 2021)**. Se distinguen dos tipos principales de bacterias fijadoras de nitrógeno: las simbióticas, como *Rhizobium* spp., que forman nódulos en las raíces de leguminosas; y las de vida libre o asociativas, que colonizan la rizosfera o los tejidos internos de diversas especies vegetales sin formar estructuras especializadas **(Baldani et al., 2014)**.

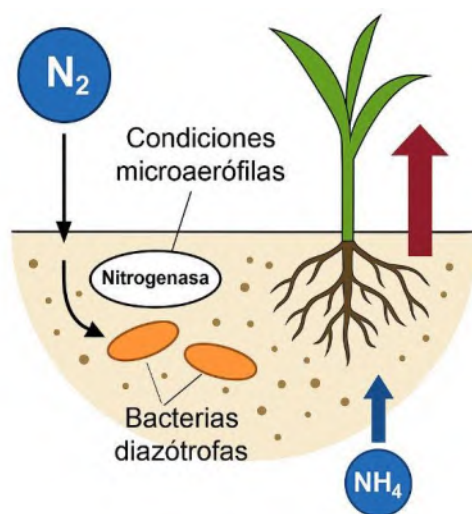


Figura 3. FBN por bacterias diazótroficas en la rizosfera. Estas bacterias convierten el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_4^+) mediante la enzima nitrogenasa, bajo condiciones microaerófilas. El amonio producido es absorbido por la planta, contribuyendo a su nutrición y desarrollo.

Entre las bacterias asociativas más estudiadas se encuentran *Bacillus subtilis*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae* y *Paenibacillus polymyxa*, las cuales han demostrado eficiencia en la fijación de nitrógeno en asociación con cultivos como maíz, arroz y tomate, sin necesidad de establecer simbiosis nodular **(Gaby & Buckley, 2017)**. Estas PGPR representan una alternativa biotecnológica para mejorar la nutrición nitrogenada de los cultivos, especialmente en suelos pobres o degradados, contribuyendo a reducir significativamente la aplicación de fertilizantes nitrogenados sintéticos, cuya producción es intensiva en energía y cuya aplicación excesiva genera contaminación de suelos y cuerpos de agua, así como emisiones de gases de efecto invernadero **(Liu et al., 2023)**.

2.2.2 Solubilización de fósforo

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para las plantas, involucrado en procesos clave como la fotosíntesis, la transferencia de energía (ATP), la división celular y el desarrollo del sistema radicular. Sin embargo, a pesar de su abundancia total en el suelo, el fósforo se encuentra mayoritariamente en formas insolubles o poco disponibles para las plantas, tales como fosfatos de calcio, hierro o aluminio, especialmente en suelos ácidos o alcalinos **(Rodríguez & Fraga, 1999; Sharma et al., 2013)**.

Las bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP), tienen la capacidad de transformar estos compuestos insolubles en formas disponibles, (Figura 4) mediante diversos mecanismos bioquímicos. El principal mecanismo de solubilización es la producción de ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico, oxálico, málico, láctico y gluconato, los cuales acidifican la rizosfera y liberan el fósforo atrapado al quelar cationes como Ca^{2+} , Fe^{3+} y Al^{3+} (Chen et al., 2006).

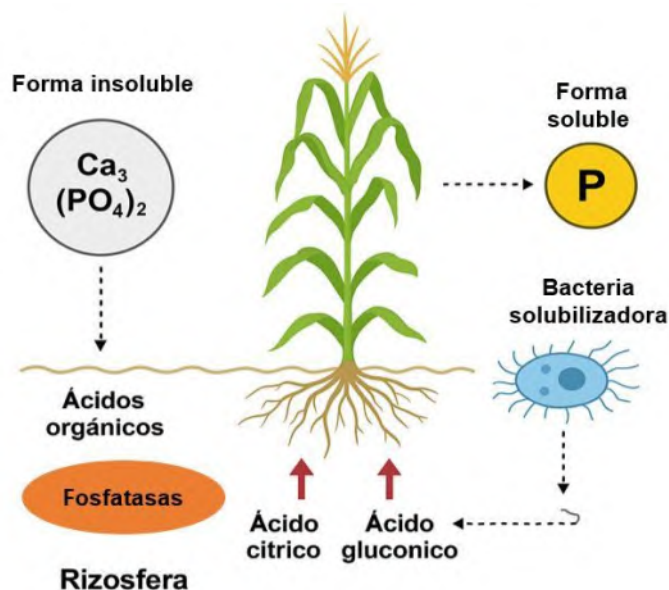


Figura 4. Proceso mediante el cual BSP, generan fósforo disponible para las plantas al transformar compuestos insolubles, como el fosfato tricálcico, a través de la producción de ácidos orgánicos y enzimas en la rizosfera.

Otro mecanismo complementario es la producción de enzimas fosfatasas y fitasas, que hidrolizan compuestos orgánicos de fósforo presentes en la materia orgánica liberando así el fósforo insoluble. La actividad de estas enzimas es especialmente relevante en suelos ricos en residuos vegetales o en sistemas de agricultura orgánica (Bünemann, 2015).

Entre los géneros bacterianos con alta capacidad solubilizadora se encuentran *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* y *Rhizobium*. Por ejemplo, cepas de *Enterobacter cloacae* y *Paenibacillus polymyxa* han mostrado capacidad para solubilizar fosfato tricálcico y apatitas, incrementando el contenido de fósforo disponible en el suelo y favoreciendo el desarrollo radicular y la absorción de nutrientes **(Park et al., 2009; Verma et al., 2021)**.

La utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo puede contribuir a reducir la dependencia de fertilizantes fosfatados, cuya eficiencia en el suelo es baja (generalmente menor al 20 %) debido a su rápida fijación.

Además, el uso intensivo de estos fertilizantes genera problemas ambientales como la eutrofización de cuerpos de agua y la degradación de la estructura del suelo **(Sharma et al., 2013)**.

2.2.3 Solubilización de calcio

La solubilización de calcio por medio de PGPR es un proceso crucial que influye en la disponibilidad de calcio para las plantas, impactando directamente en su crecimiento y desarrollo (Figura 5). Aunque menos estudiada que la solubilización de fósforo, la capacidad de las PGPR para solubilizar calcio es importante debido al papel fundamental que este nutriente desempeña en la estructura del suelo y en diversos procesos fisiológicos de las plantas **(Li et al., 2020)**. Las PGPR emplean varios mecanismos para solubilizar calcio en el suelo, uno de los principales mecanismos implica la producción de ácidos orgánicos, que tienen la capacidad de disolver los minerales de calcio insolubles. Estos ácidos actúan sobre los carbonatos de calcio y otras formas inorgánicas, liberando iones de calcio que pueden ser absorbidos por las raíces de las plantas. Además de la producción de ácidos orgánicos, algunas PGPR también secretan enzimas como fitasas y glucanasas, que pueden facilitar la liberación de calcio de compuestos orgánicos e inorgánicos complejos en el suelo, aumentando así la disponibilidad de este nutriente para las plantas **(Silva et al., 2022)**.

El efecto de la solubilización de calcio por PGPR en la promoción del crecimiento vegetal se relaciona directamente con una mejor absorción de calcio por parte de las plantas. El calcio es esencial para la estructura de las paredes celulares, la regulación de la permeabilidad de las membranas y la activación de enzimas, entre otros roles fisiológicos clave.

Por lo tanto, una mayor disponibilidad de calcio puede resultar en un crecimiento vegetal más vigoroso, mejorando la resistencia a enfermedades, la tolerancia al estrés y la calidad de los cultivos (Singh et al., 2023).

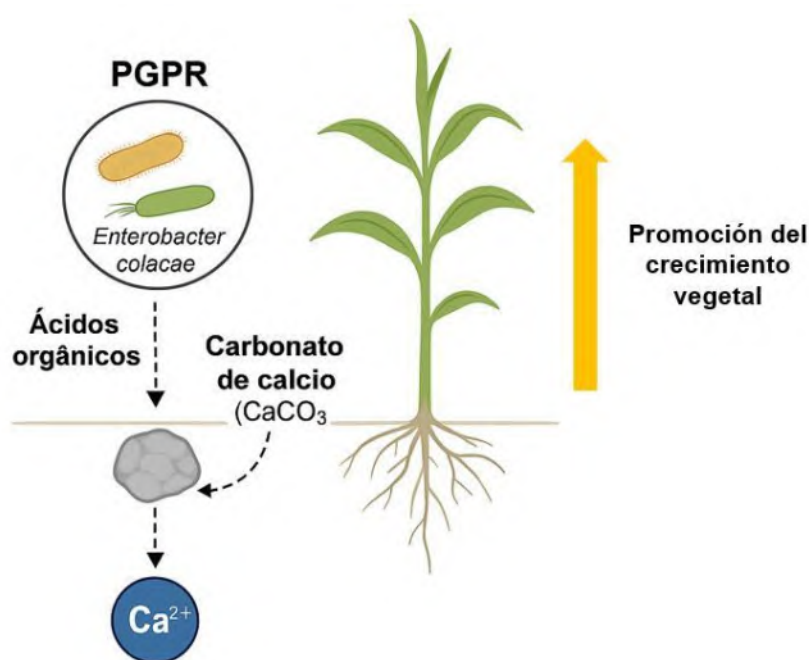


Figura 5. Mecanismo mediante el cual las PGPR, como *Enterobacter cloacae*, secretan ácidos orgánicos que disuelven compuestos insolubles de calcio, como el carbonato de calcio (CaCO₃), liberando iones Ca²⁺ disponibles para las plantas.

2.2.4 Producción de fitohormonas

Las PGPR pueden estimular directamente el desarrollo de las plantas mediante la síntesis y liberación de fitohormonas, entre las que destaca el ácido indol-3-acético (AIA), principal auxina natural **(Spaepen & Vanderleyden, 2011)**. Esta fitohormona regula numerosos procesos fisiológicos en las plantas, incluyendo la división y elongación celular, la formación de raíces laterales y pelos radicales, y la diferenciación de tejidos **(Patten et al., 2013)**. La capacidad de ciertas bacterias para producir AIA es uno de los mecanismos más relevantes por los que se influye positivamente en el crecimiento y la arquitectura radicular de los cultivos **(Duca et al., 2014)**.

La biosíntesis bacteriana de AIA generalmente depende de la disponibilidad de triptófano (Trp) en la rizosfera, que actúa como precursor natural **(Spaepen & Vanderleyden, 2011)**. Existen diferentes rutas metabólicas descritas, entre ellas la vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA), que es la más frecuente en bacterias asociadas a plantas (Figura 6) **(Patten et al., 2013)**. A través de estas rutas, las bacterias transforman el triptófano liberado por las raíces en compuestos intermediarios que posteriormente se convierten en AIA libre, el cual puede ser secretado en la rizosfera, afectando tanto a la planta hospedera como a la microbiota circundante **(Kudoyarova et al., 2019)**.

La producción bacteriana de AIA tiene efectos importantes para la planta: favorece la ramificación y el crecimiento del sistema radical, incrementa la absorción de agua y nutrientes, y mejora la tolerancia frente a condiciones de estrés **(Spaepen & Vanderleyden, 2011)**.

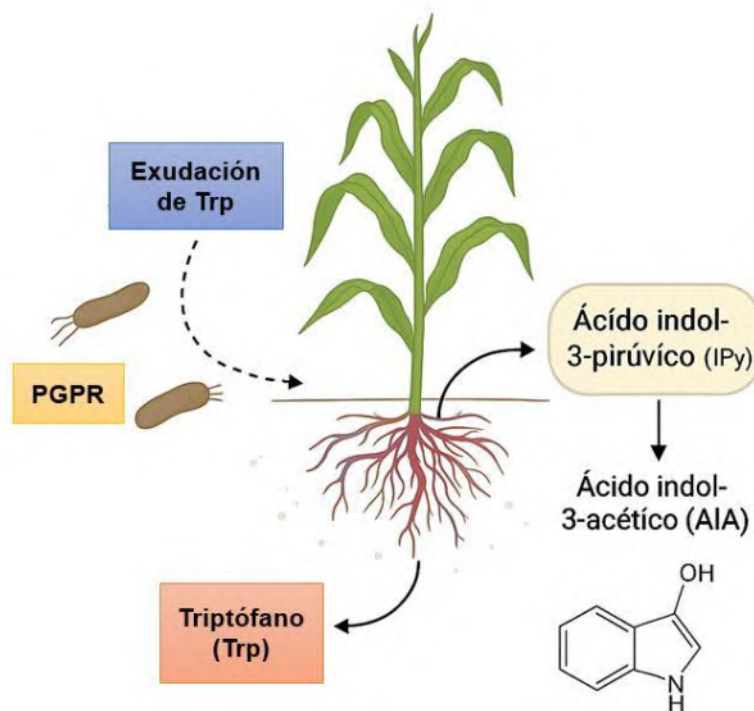


Figura 6. Proceso mediante el cual las PGPR transforman el triptófano exudado por las raíces en ácido indol-3-acético (AIA), a través de la vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA). Este fitorregulador promueve el crecimiento vegetal al estimular la formación de raíces y la absorción de nutrientes.

Sin embargo, la concentración de AIA es determinante, pues niveles excesivos pueden inhibir el crecimiento radicular (**Duca et al., 2014**). Por ello, el equilibrio entre la producción bacteriana de auxinas y la respuesta hormonal de la planta es clave para el éxito en la formulación de bioinoculantes microbianos (**Kudoyarova et al., 2019**).

2.3 Uso de PGPR en la formulación de bioinoculantes

El uso de PGPR como base de formulaciones de bioinoculantes representa una de las estrategias más prometedoras para la transición hacia una agricultura sostenible. Los bioinoculantes microbianos son productos que contienen microorganismos benéficos viables, capaces de colonizar la rizosfera o el interior de las plantas y mejorar su crecimiento mediante diversos mecanismos fisiológicos y bioquímicos **(Malusá & Vassilev, 2014)**.

Según su función, pueden clasificarse como biofertilizantes, bioestimulantes o agentes de biocontrol. Se han utilizado con éxito en cultivos como maíz, trigo, arroz, tomate y fresa, entre otros, mejorando la absorción de nutrientes y la tolerancia al estrés.

Sin embargo, la efectividad de estos productos depende de factores como la compatibilidad de la cepa con el cultivo, las condiciones ambientales, el tipo de formulación y la viabilidad microbiana durante el almacenamiento. Para lo cual se ha implementado el uso de diversas especies como *Bacillus subtilis*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium* y *Paenibacillus polymyxa*, las cuales han sido ampliamente evaluadas como bioinoculantes en cultivos agrícolas de importancia como maíz, trigo, arroz, tomate, frijol, soya y hortalizas. Los resultados han mostrado incrementos significativos en biomasa, longitud de raíces, absorción de nutrientes y rendimiento (Tabla 1) probando que la diversidad es buena para la selección de cepas bacterianas **(Backer et al., 2018; Vejan et al., 2016)**.

Tabla 1. Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal por PGPR y cultivos donde han sido aplicadas

Mecanismo de promoción	Descripción	Microorganismos PGPR reportados	Cultivos aplicados	Referencia
Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	Conversión de N ₂ atmosférico en amonio (NH ₄ ⁺) mediante la enzima nitrogenasa.	<i>Paenibacillus polymyxa</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	Maíz, arroz, trigo, soya	Gaby & Buckley, 2017; Liu et al., 2023
Solubilización de fósforo	Liberación de fósforo inorgánico insoluble a formas asimilables mediante ácidos orgánicos y enzimas fosfatasas.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>E. cloacae</i>	Tomate, maíz, lechuga, frijol	Rodríguez & Fraga, 1999; Sharma et al., 2013
Solubilización de calcio	Disolución de carbonatos y minerales de calcio mediante la producción de ácidos orgánicos.	<i>Paenibacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Sorgo, arroz, papa	Li et al., 2020; Silva et al., 2022
Producción de AIA (auxinas)	Biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA), estimulando el desarrollo de raíces y la elongación celular.	<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>P. polymyxa</i>	Maíz, trigo, chile, plántulas de fresa	Spaepen & Vanderleyden, 2011; Duca et al., 2014
Resistencia sistémica inducida (ISR)	Activación de mecanismos de defensa en la planta frente a patógenos, insectos o estrés abiótico.	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Serratia marcescens</i>	Pepino, jitomate, girasol	Pieterse et al., 2014
Tolerancia al estrés abiótico	Mejora de la tolerancia a sequía y salinidad.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Paenibacillus spp.</i>	Tomate, trigo, arroz	Vurukonda et al., 2016

Por otro lado, la formulación de bioinoculantes representa un componente clave para el éxito de la aplicación de PGPR, en sistemas agrícolas. Una formulación adecuada debe cumplir con múltiples funciones: preservar la viabilidad microbiana durante el almacenamiento, proteger a las cepas frente a condiciones ambientales adversas y permitir una liberación efectiva de los microorganismos en la rizósfera o sobre la superficie vegetal. El diseño tecnológico de estas formulaciones ha evolucionado para adaptarse a las necesidades del manejo agrícola moderno y a las limitaciones propias de cada entorno edafoclimático.

Además, muchos casos, la inoculación con PGPR ha permitido reducir el uso de fertilizantes químicos hasta en un 30-50 % sin comprometer la productividad, e incluso mejorando la salud vegetal frente a enfermedades del suelo o estrés abiótico **(Kumawat et al., 2023)**.

2.3. *Enterobacter cloacae* y *Paenibacillus polymyxa* como PGPR

Tanto *Enterobacter cloacae* como *Paenibacillus polymyxa* son bacterias con alto potencial como promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), ampliamente estudiadas por sus capacidades multifuncionales en la rizosfera. Ambas especies han sido aisladas de diversos ecosistemas agrícolas y demostraron efectos beneficiosos sobre cultivos hortícolas, cereales y frutales, mediante mecanismos directos e indirectos de promoción vegetal.

2.3.1. *Enterobacter cloacae*

Enterobacter cloacae es una bacteria Gram negativa, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, comúnmente encontrada en suelos, agua y ambientes asociados a plantas. Se ha reportado su capacidad para fijar nitrógeno de forma no simbiótica, solubilizar fósforo inorgánico y producir ácido indolacético (AIA), una fitohormona clave para el desarrollo radicular **(Kumar et al., 2017; Verma et al., 2021)**.

Además, cepas de *E. cloacae* han demostrado habilidades en la producción de sideróforos y enzimas como celulasas y proteasas, lo que les permite competir eficazmente en la rizosfera e inhibir patógenos del suelo **(Bhuiyan et al., 2021)**. Su capacidad de adaptarse a distintos portadores y ambientes hace de esta especie una candidata promisoría para su inclusión en formulaciones microbianas sólidas o líquidas.

2.3.2. *Paenibacillus polymyxa*

Paenibacillus polymyxa es una bacteria Gram positiva, formadora de esporas, perteneciente a la familia *Paenibacillaceae*. Es ampliamente reconocida por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fósforo y potasio, así como por su producción de fitohormonas como AIA y giberelinas (**Grady et al., 2016**).

Su habilidad para formar esporas le confiere una ventaja en términos de viabilidad y estabilidad en la formulación de bioinoculantes, incluso bajo condiciones ambientales adversas.

Una característica destacada de *P. polymyxa* es su efecto biocontrolador, atribuido a la producción de compuestos antimicrobianos (como polimixinas y fusaricidinas), enzimas líticas (quitinasas, glucanasas) y la capacidad de inducir resistencia sistémica en las plantas (**Jeong et al., 2019**). Esto la convierte en una herramienta valiosa no solo para promover el crecimiento vegetal, sino también para reducir la incidencia de enfermedades fúngicas y bacterianas.

Tabla 2. Comparación entre *Enterobacter cloacae* y *Paenibacillus polymyxa* como PGPR

Característica / Función	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
Tipo de bacteria	Gram negativa	Gram positiva, esporulada
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Paenibacillaceae</i>
Fijación biológica de nitrógeno	✓ (asimilación de N ₂ no simbiótica)	✓ (N ₂ fijador activo)
Solubilización de fósforo	✓ (ácidos orgánicos como gluconato)	✓ (alta eficiencia, incluso en suelos alcalinos)
Producción de AIA	✓ (vía triptófano-dependiente)	✓ (AIA, giberelinas y citoquininas)
Producción de sideróforos	✓	✓
Control biológico	✓ (enzimas líticas y competencia)	✓ (producción de antibióticos: polimixinas)
Formación de esporas	×	✓ (alta resistencia y viabilidad)
Tolerancia a condiciones adversas	Moderada (sensible a desecación)	Alta (por esporulación)
Compatibilidad con portadores sólidos	✓ (vermiculita, turba, biochar,)	✓ (ideal para formulaciones sólidas)
Efecto sobre el crecimiento vegetal	Incremento en biomasa, raíces y absorción N/P	Mayor biomasa, tolerancia a estrés y sanidad
Estudios previos como PGPR en bioinoculantes	Usada en arroz, maíz, tomate, trigo (Kumar et al., 2017; Verma et al., 2021)	Amplio uso en trigo, maíz, papa, arroz, fresa (Grady et al., 2016; Jeong et al., 2019)

2.4 Tipos de formulaciones de bioinoculantes

La formulación de bioinoculantes consiste en la incorporación de microorganismos benéficos en una matriz física (portador), acompañados o no de sustancias protectoras o nutrientes, con el objetivo de mantener su viabilidad, funcionalidad y facilidad de aplicación. Una formulación adecuada debe garantizar la estabilidad del inoculante durante el almacenamiento, su compatibilidad con el ambiente agrícola y su eficacia en la promoción del crecimiento vegetal **(Malusá et al., 2012)**.

Las formulaciones varían en su composición, método de aplicación y tiempo de vida útil, dependiendo del tipo de microorganismo y del sistema de cultivo al que se dirigen. Se describen tres tipos principales de formulación de bioinoculantes: líquidas, poliméricas y sólidas (Tabla 2). Cada una presenta características específicas que influyen en aspectos clave como la viabilidad celular, la facilidad de aplicación, la vida útil del producto y su eficacia en campo. En respuesta a estos requerimientos, se han desarrollado diversos portadores, aditivos estabilizantes y tecnologías de encapsulación para mejorar el desempeño de los bioinoculantes, prolongar su viabilidad y optimizar su eficacia agronómica **(Malusá & Vassilev, 2014; Bashan et al., 2014)**.

En este contexto, la elección de la formulación incide directamente en la efectividad del bioinoculante. Por esta razón, se han desarrollado tecnologías de encapsulación orientadas a mejorar el desempeño del producto final. Estos avances permiten formular productos con mayor vida útil, mejor adherencia a la rizósfera, liberación controlada de los microorganismos y tolerancia a condiciones de estrés abiótico. Así, las formulaciones líquidas, poliméricas y sólidas representan no solo diferentes estrategias tecnológicas, sino también distintas aproximaciones para lograr un uso más eficiente y sostenible de los recursos microbianos en la agricultura **(Bashan et al., 2014; Malusá & Vassilev, 2014)**.

Tabla 3. Comparación entre los distintos tipos de formulaciones de bioinoculantes

Característica	Bioinoculantes líquidos	Bioinoculantes poliméricos	Bioinoculantes sólidos
Tipo de portador	Soluciones acuosas u oleosas con aditivos	Matrices de biopolímeros naturales o sintéticos	Portadores sólidos (turba, compost, vermiculita, biochar)
Concentración microbiana	Alta (hasta 10^9 UFC/mL)	Moderada a alta	Variable (10^7 – 10^9 UFC/g)
Vida útil	3–6 meses (dependiente del almacenamiento)	6–18 meses	12–24 meses
Protección microbiana	Baja, sin soporte físico	Alta, gracias a la encapsulación	Moderada, depende del portador
Liberación del microorganismo	Inmediata	Controlada y prolongada	Gradual, por contacto con humedad del suelo
Modo de aplicación	Riego, fertirriego, aspersión foliar	Suelo, semilla o formulaciones especializadas	Suelo, semilla o como polvo humectable
Ventajas principales	Fácil de aplicar, buena homogeneidad	Protección ambiental, liberación sostenida	Mayor estabilidad, bajo costo, fácil transporte
Desventajas principales	Baja tolerancia ambiental, requiere refrigeración	Costo elevado, producción compleja	Riesgo de contaminación, variabilidad del portador
Compatibilidad con otros insumos	Alta (en mezclas si hay compatibilidad química)	Media (pueden incluir insumos funcionales)	Baja (combinación limitada con agroquímicos)
Ejemplos de portadores	Glicerina, PEG, sales, extractos vegetales	Alginato, goma arábica, celulosa, quitina	Turba, compost, vermiculita, perlita, biochar

2.4.1 Bioinoculantes líquidos

Son formulaciones que consisten en suspensiones acuosas de alta concentración celular (10^8 - 10^9 UFC/mL), a las que se incorporan agentes protectores como glicerol, PEG o trehalosa, con el objetivo de mantener la viabilidad microbiana durante el almacenamiento. Su uso se ha incrementado por su practicidad en sistemas de fertirriego o aplicación foliar **(Herrmann & Lesueur, 2013)**.

Las formulaciones líquidas son preferidas por su homogeneidad, facilidad de manejo y compatibilidad con prácticas agrícolas mecanizadas. Sin embargo, presentan una vida útil limitada (3-6 meses) y requieren condiciones estrictas de almacenamiento para evitar la pérdida de viabilidad microbiana **(Morales-García et al., 2020)**. Además, carecen de protección física frente a condiciones adversas en campo, lo que puede reducir su eficacia postaplicación **(Rai et al., 2021)**.

2.4.2 Bioinoculantes poliméricos

Los bioinoculantes poliméricos emplean biopolímeros naturales como el alginato, quitina o celulosa para encapsular a los microorganismos. Esta tecnología permite inmovilizar células viables en matrices que las protegen frente a la desecación, radiación UV, estrés osmótico y competencia microbiana, liberándolas de forma controlada en la rizosfera **(Saad et al., 2020)**.

La encapsulación proporciona una liberación sostenida de microorganismos y mejora su adherencia al sistema radical. Estas formulaciones han mostrado una mayor eficacia en condiciones de estrés y prolongan la viabilidad hasta por 12 meses o más **(Rai et al., 2021)**. Sin embargo, los altos costos de producción, la necesidad de procesos industriales especializados y la variabilidad en el tamaño y degradación de las cápsulas limitan su uso comercial masivo **(Bashan et al., 2014; Morales-García et al., 2020)**.

2.4.3 Bioinoculantes sólidos

Los bioinoculantes sólidos constituyen la forma más antigua y la más utilizada. Se componen de un portador sólido inerte (turba, vermiculita, perlita, entre otros) que actúa como matriz de soporte para las bacterias, permitiendo su almacenamiento, transporte y liberación progresiva en el suelo **(Malusá et al., 2012)**.

La turba ha sido el portador clásico, pero su uso está limitado por consideraciones ambientales, dado que es un recurso no renovable. Por su parte, la vermiculita y perlita presentan buena porosidad y baja contaminación, aunque no aportan nutrientes ni retienen suficiente humedad **(Bashan et al., 2014)**.

Sin embargo, en los últimos años han cobrado de nuevo gran relevancia debido al uso de nuevos portadores como la tierra de diatomeas. Estos portadores resaltan debido a su capacidad para mantener la viabilidad de las bacterias durante periodos prolongados de almacenamiento.

A diferencia de los inoculantes líquidos, las formulaciones sólidas proporcionan una matriz física que protege a las células bacterianas frente a condiciones ambientales adversas como la desecación, radiación UV y cambios de temperatura **(Malusá et al., 2012; Bashan et al., 2014)**.

Además, la estabilidad prolongada de los bioinoculantes sólidos permite su almacenamiento y transporte a larga distancia sin requerir condiciones especiales de refrigeración. Esto representa una ventaja logística y económica para su aplicación en zonas rurales o de difícil acceso **(Herrmann & Lesueur, 2013)**.

Por tanto, garantizar la viabilidad microbiana durante el almacenamiento y aplicación en campo es un desafío prioritario en el diseño de bioinoculantes, siendo los sistemas sólidos una herramienta fundamental para lograrlo. Por lo que se ha buscado el uso de otros portadores que permitan conservar y mejorar estas características; uno de los más novedosos es el biochar derivado de residuos lignocelulósicos obtenido mediante pirólisis **(Ding et al., 2023; Morales-García et al., 2020)**.

2.6 Biochar como portador microbiano en bioinoculantes sólidos

El biochar (Figura 7) es un material poroso rico en carbono, obtenido mediante la descomposición termoquímica de biomasa en condiciones de ausencia o limitación de oxígeno (proceso denominado pirólisis). Gracias a su elevada porosidad, gran superficie específica, estabilidad química y capacidad de retención de agua y nutrientes, este material ha emergido como uno de los portadores sólidos más prometedores para la formulación de bioinoculantes microbianos, ya que proporciona un microambiente protector que favorece la supervivencia, viabilidad y liberación gradual de los microorganismos beneficiosos en la rizósfera (**Lehmann & Joseph, 2015**). Además, mejora directamente la estructura del suelo, aumenta la capacidad de intercambio catiónico (CIC), y puede inmovilizar contaminantes, contribuyendo a una agricultura regenerativa (**Rajkovich et al., 2012**).



Figura 7. Muestra de biochar en forma de polvo fino y de color negro intenso, obtenido por pirólisis de biomasa. Se caracteriza por su textura porosa y su aspecto granulado, lo cual refleja su elevada superficie específica y estructura carbonosa estable, propiedades que lo convierten en un portador adecuado para microorganismos en bioinoculantes sólidos.

A nivel físico, el biochar presenta una matriz porosa con microporos, mesoporos y macroporos (Figura 8) que actúan como refugios naturales para las células bacterianas, reduciendo la exposición a fluctuaciones de humedad y temperatura, y favoreciendo la retención de biomasa microbiana viable (**Joseph et al., 2015**). Además, la alta superficie específica facilita la adsorción de nutrientes y metabolitos, lo cual contribuye al establecimiento de una microecología favorable dentro del portador (**Lehmann & Joseph, 2015**).

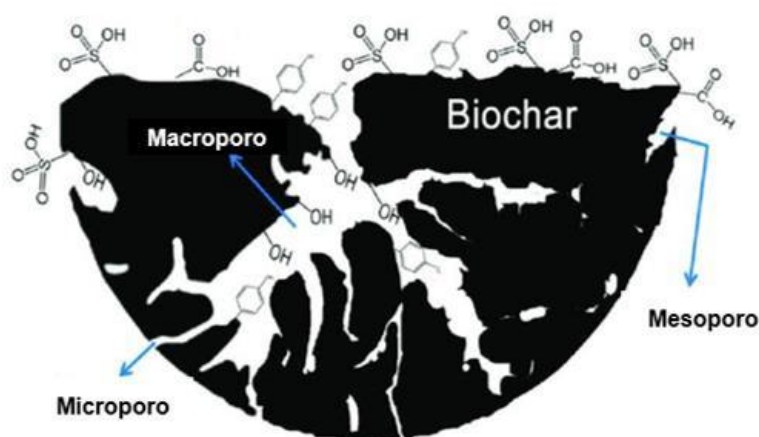


Figura 8. Estructura física del biochar. Microporos ($<2\ \mu\text{m}$): ofrecen una gran superficie para retener agua, nutrientes y metabolitos, creando microclimas y aumentando la viabilidad bacteriana (**Bolan et al., 2023**). Mesoporos ($2\text{--}50\ \mu\text{m}$): permiten la difusión de nutrientes y moléculas, favoreciendo el rendimiento metabólico bacteriano (**Zou et al., 2024**). Macroporos ($>50\ \mu\text{m}$): facilitan la colonización física, aireación y refugio microambiental, fundamentales en condiciones de estrés (**Bolan et al., 2023**).

Desde el punto de vista químico, el biochar posee un pH generalmente neutro a alcalino y una considerable capacidad de intercambio catiónico (CIC), lo que promueve la disponibilidad de nutrientes esenciales como N, P, K, Ca y Mg en el microambiente de las bacterias inoculadas (**Rogovska et al., 2016**).

De igual manera, la presencia de grupos funcionales oxigenados en su superficie incrementa la capacidad de retención de agua y nutrientes, reduciendo la lixiviación y mejorando la eficiencia en la liberación gradual de iones hacia las raíces de las plantas **(Schmidt et al., 2021)**.

En términos de funcionalidad, diversos estudios han reportado que bioinoculantes sólidos formulados con biochar como portador muestran mayor estabilidad y viabilidad microbiana durante periodos prolongados de almacenamiento, en comparación con portadores convencionales como turba, vermiculita o composta **(Riaz et al., 2020; Singh et al., 2021)**

Además, la incorporación de biochar puede potenciar la capacidad de colonización rizosférica de las PGPR aumentando la solubilización de fósforo, la fijación biológica de nitrógeno y la producción de fitohormonas, lo que se traduce en un efecto positivo en la germinación, crecimiento y tolerancia al estrés de cultivos agrícolas **(Głodowska et al., 2017; Xu et al., 2020)**.

En este sentido, diversos autores coinciden en que el biochar debe considerarse como un portador de nueva generación en la formulación de bioinoculantes sólidos (Tabla 3), ya que integra funciones de soporte microbiano, mejora edáfica y mitigación de la contaminación ambiental. La evidencia científica muestra que este material, cuando se utiliza como portador microbiano, permite el desarrollo de formulaciones más eficientes, estables y sostenibles en comparación con las formulaciones tradicionales **(Joseph et al., 2015; Riaz et al., 2020; Singh et al., 2021)**.

Tabla 4. Propiedades del biochar como portador microbiano en bioinoculantes sólidos

Propiedad	Descripción	Referencia
Porosidad (micro, meso y macroporos)	Proporciona refugios naturales para las bacterias, reduciendo la desecación y las fluctuaciones ambientales.	Joseph et al., 2015
Superficie específica elevada	Facilita la adsorción de nutrientes, metabolitos y exopolisacáridos bacterianos, favoreciendo la colonización microbiana.	Lehmann & Joseph, 2015
Estabilidad química	Alta recalcitrancia y resistencia a la degradación, lo que asegura un soporte a largo plazo.	Ahmad et al., 2014; Tripathi et al., 2016
pH neutro a alcalino	Crea un microambiente favorable para la supervivencia bacteriana.	Rogovska et al., 2016
Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	Favorece la retención y disponibilidad de nutrientes esenciales (N, P, K, Ca, Mg).	Schmidt et al., 2021
Retención de agua y nutrientes	Reduce la lixiviación, mejora la humedad y la eficiencia en la liberación de nutrientes.	Schmidt et al., 2021
Compatibilidad microbiana	Promueve la adhesión y viabilidad prolongada de PGPR.	Riaz et al., 2020; Singh et al., 2021
Protección durante almacenamiento	Mantiene la viabilidad microbiana en comparación con portadores tradicionales como turba o composta.	Riaz et al., 2020
Mejora de la fertilidad del suelo	Incrementa la CIC, inmoviliza contaminantes y contribuye a la regeneración del suelo.	Rajkovich et al., 2012; Ding et al., 2023

2.6.1 Uso de bagazo de agave en la producción de biochar

Una de las grandes ventajas del uso de biochar como portador microbiano es su obtención a partir de residuos agroindustriales, como el bagazo de agave, cáscara de arroz, bagazo de caña, rastrojo, entre otros. Esta estrategia no solo valoriza subproductos agrícolas, sino que también promueve la economía circular, reduce la huella de carbono del agro, y evita la acumulación de residuos orgánicos **(Lehmann & Joseph, 2015; Ding et al., 2023)**.

El bagazo de agave es el residuo fibroso resultante de la extracción de azúcares fermentables de las piñas de *Agave tequilana* y otras especies empleadas en la producción de tequila, mezcal y destilados tradicionales. Este subproducto está constituido principalmente por compuestos lignocelulósicos, incluyendo celulosa, hemicelulosa y lignina, además de restos de azúcares y compuestos fenólicos **(Cedeño-Cruz, 1995; Vargas-Luna et al., 2021)**. En México, particularmente en estados productores como Jalisco, Oaxaca y Michoacán, la generación de bagazo alcanza cifras significativas: por cada litro de tequila se producen entre 2 y 5 kg de bagazo fresco, mientras que en la industria mezcalera los volúmenes suelen ser aún mayores **(Consejo Regulador del Tequila, 2019)**.

El manejo inadecuado de este residuo representa un problema ambiental importante, ya que su acumulación en tiraderos a cielo abierto genera lixiviados contaminantes, proliferación de plagas, emisiones de gases de efecto invernadero y malos olores **(González-García et al., 2020)**. Ante este panorama, el aprovechamiento del bagazo de agave como materia prima para la producción de biochar surge como una estrategia sostenible que promueve la economía circular y contribuye a reducir la huella ecológica de la agroindustria **(Lehmann & Joseph, 2015)**.

El biochar derivado del bagazo de agave se obtiene principalmente mediante procesos de pirólisis lenta, en un rango de temperaturas de 350 a 550 °C, que permiten generar un material carbonoso con propiedades texturales y químicas favorables. Entre estas destacan: (i) alta porosidad y superficie específica, que proporcionan espacios para la colonización de microorganismos y la retención de agua; (ii) estructura carbonosa recalcitrante, que asegura estabilidad química a largo plazo; (iii) pH neutro a alcalino, útil en la corrección de suelos ácidos; y (iv) aporte mineral moderado de elementos como K, Ca y Mg (**Vargas-Luna et al., 2021; Schmidt et al., 2021**).

Diversos estudios han demostrado que el biochar de bagazo de agave no solo actúa como un portador eficiente para PGPR, sino que también mejora la calidad de los suelos. **Contreras-Ramos et al. (2023)** reportaron que su aplicación incrementa el contenido de materia orgánica, la retención de humedad y la diversidad microbiana edáfica.

En el caso de Michoacán, donde la producción de mezcal constituye una actividad agroindustrial y cultural de gran relevancia, la valorización del bagazo de agave mediante su transformación en biochar ofrece una solución integral: mitiga la problemática ambiental asociada a su acumulación y genera insumos biotecnológicos de alto valor agregado. De esta manera, el biochar de bagazo de agave representa una estrategia promisorio en el desarrollo de bioinoculantes sólidos de nueva generación, alineada con los principios de agricultura sostenible y economía circular.

3. JUSTIFICACIÓN

Los bioinoculantes microbianos constituyen una estrategia sostenible para disminuir el uso de fertilizantes químicos sin comprometer el rendimiento agrícola; sin embargo, su efectividad, depende en gran medida del tipo de formulación y de la capacidad de esta para mantener la viabilidad y funcionalidad de las cepas durante, el almacenamiento, transporte y tras su incorporación al suelo. En este sentido el biochar, producido a partir de bagazo de agave, ofrece un soporte poroso que protege a los microorganismos, facilita su liberación controlada en la rizosfera y mejora las propiedades fisicoquímicas del suelo, además de valorizar un residuo agroindustrial y fomentar la economía circular en Michoacán. En particular, las cepas *Enterobacter cloacae* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 presentan potencial para promover el crecimiento vegetal y aumentar la tolerancia a estrés abiótico. A la vez que permiten evaluar la estabilidad de la formulación en condiciones controladas. En este contexto, la presente investigación busca desarrollar bioinoculantes sólidos más eficientes y sostenibles, orientados a disminuir la dependencia de insumos químicos y mitigar el impacto ambiental de la agricultura moderna.

4. HIPÓTESIS

El biochar producido a partir de bagazo de agave funciona como un portador microbiano eficaz que mantiene la viabilidad y favorece la conservación de las propiedades promotoras del crecimiento vegetal de *Enterobacter cloacae* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 en formulación sólida.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el uso de biochar como portador microbiano en la formulación de un bioinoculante sólido a base de *Enterobacter* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07.

5.2 Objetivos específicos

1. Producir y caracterizar biochar a partir de bagazo de agave.
2. Evaluar las propiedades de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* de *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07 en formulación sólida.
3. Evaluar el efecto de las formulaciones sólidas de *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07 sobre la germinación y vigor de plántulas de maíz híbrido H-318, en condiciones de vivero.
4. Evaluar el efecto de las formulaciones sólidas de *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07 sobre parámetros del desarrollo vegetal de plantas de maíz híbrido H-318, en condiciones de vivero.
5. Evaluar la estabilidad y viabilidad de las formulaciones sólidas de *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07 en condiciones controladas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

6.1.1 *Enterobacter cloacae* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07

Las cepas *Enterobacter cloacae* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07, pertenecen a la colección de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal del Laboratorio de Nutrición Vegetal (LNV), las cuales fueron previamente aisladas de suelo rizosférico de guayaba y agave respectivamente (cultivos de interés comercial del estado de Michoacán), y seleccionadas por su capacidad para producir auxinas, fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos y calcio. Las cepas fueron conservadas en una solución de glicerol al 30% (v/v) a -20°C. Posteriormente fueron reactivadas en caldo nutritivo (CN) a 28 ± 2 °C, con agitación constante a 100 rpm durante 48 horas, y se almacenaron para su uso rutinario en el laboratorio a 4°C.

6.2 Maíz blanco híbrido H-318

Se utilizaron semillas de maíz blanco híbrido variedad H-318 desarrollado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Figura 9), el cual es un híbrido de cruza tripe, de grano semi cristalino, con un ciclo de vida corto de 140 días, lo cual lo convierte en una variedad altamente eficiente. Esta planta alcanza alturas entre 280 y 290 cm, con mazorcas que se sitúan a 130-140 cm del suelo, lo que facilita su manejo agronómico y su aprovechamiento en diferentes condiciones de cultivo. Su densidad de población recomendada es de 75,000 plantas por hectárea, alcanzando rendimientos promedio de 7-8 t/ha en condiciones de temporal y hasta 10-11 t/ha bajo riego. En cuanto al desarrollo vegetativo las etapas iniciales de germinación y emergencia son críticas para asegurar una buena implantación y uniformidad del maíz en campo.

Maíz blanco híbrido variedad H-318 (INIFAP)

Densidad de población (plantas/ha) : 75,000

Tipo Híbrido: **Cruza Triple**

Grano: **Blanco semicristalino**

Ciclo de vida corto: **140 días**

Altura de la planta: **280 a 290 cm**

Altura de mazorca: **130 a 140 cm**

Rendimiento promedio:

7-8 ton/ha temporal

10-11 ton/ha riego

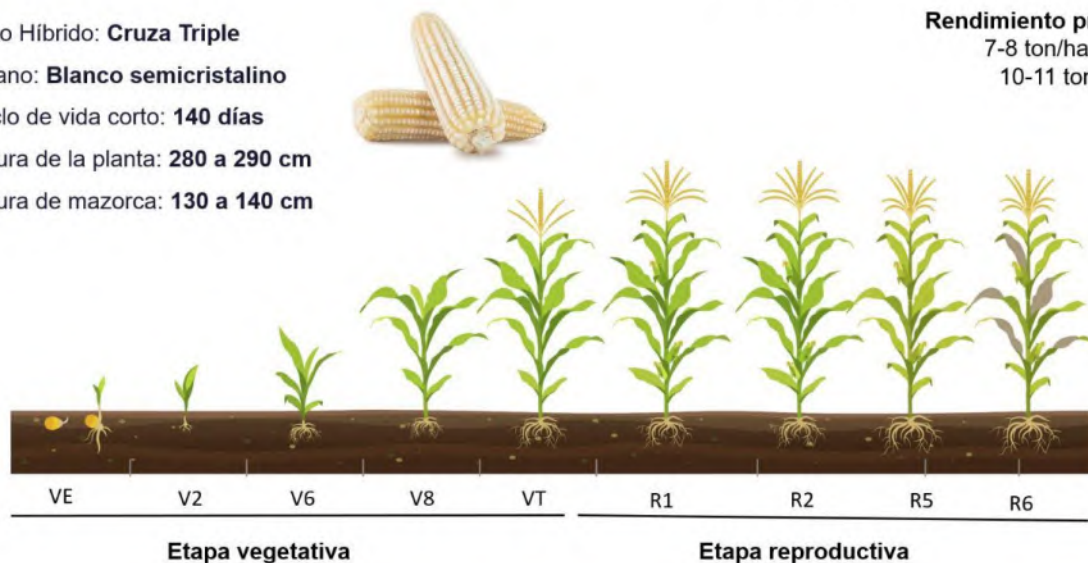


Figura 9. Características agronómicas del maíz blanco híbrido variedad H-318 (INIFAP) y etapas fenológicas desde la fase vegetativa (VE, V2, V6, V8, VT) hasta la fase reproductiva (R1, R2, R5, R6).

6.2 Ensayos de virulencia

6.2.1 Crecimiento y mantenimiento de *Caenorhabditis elegans* WT2

La cepa *Escherichia coli* OP50 se inoculó en caldo LB suplementado con estreptomicina (10 µg/mL) y se incubó a 35 ± 2 °C con agitación a 100 rpm durante 48 h. Posteriormente, las células bacterianas se recuperaron por centrifugación, se lavaron tres veces con agua desionizada estéril y el pellet obtenido se resuspendió en 30 mL de glicerol al 30 % (v/v), almacenándose a -20 °C hasta su uso.

Para la preparación de las placas de alimentación, se inocularon 200 µL de la suspensión de *E. coli* OP50 sobre medio NGM sólido suplementado con estreptomicina (10 µg/mL), distribuyéndose uniformemente con un hisopo estéril. Las placas se incubaron a 35 ± 2 °C durante 48 h o hasta observar un tapete bacteriano uniforme. Transcurrido este tiempo, se transfirió un fragmento de agar que contenía *C. elegans* WT2 a las placas preparadas y se incubaron a 18 °C durante 3 días, hasta que los nematodos alcanzaron la fase adulta.

6.2.2 Ensayo de virulencia en *C. elegans* WT2

El ensayo se llevó a cabo en placas de 12 pozos, adicionando 1 mL de caldo M9 en cada pocillo. Posteriormente, se inocularon 10 µL de suspensiones bacterianas (1×10^9 UFC/mL) de *Enterobacter cloacae* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07, por triplicado. Como controles se incluyeron *Azospirillum brasilense* Sp245 y *E. coli* OP50 (controles negativos), así como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus* LC390B (controles positivos).

En cada pocillo se colocaron 20 nematodos adultos utilizando un asa estéril. La supervivencia de los nematodos se registró cada 12 h durante un periodo total de 96 h (4 días). Los datos se representaron gráficamente con el fin de analizar el efecto de cada cepa sobre la viabilidad de *C. elegans* WT2.

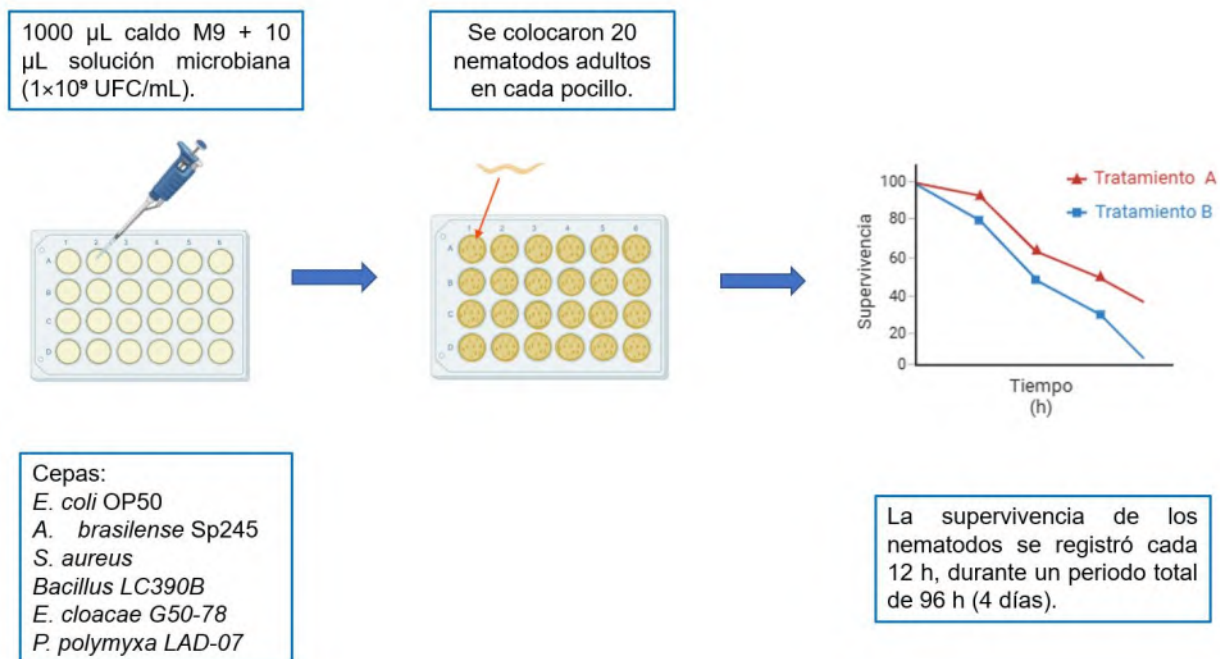


Figura 10. Esquema del ensayo de virulencia en *Caenorhabditis elegans* WT2. Se adicionó 1 mL de caldo M9 y 10 µL de suspensión bacteriana (1×10^9 UFC/mL) en placas de 12 pozos, incorporando 20 nematodos adultos en cada pocillo. Se evaluaron las cepas *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07, junto con controles positivos (*S. aureus* y *Bacillus* LC390B) y negativos (*A. brasilense* Sp245 y *E. coli* OP50). La supervivencia de los nematodos se registró cada 12 h durante 96 h (4 días).

6.2.3 Prueba de hemólisis en agar sangre

La actividad hemolítica de *Enterobacter cloacae* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 se determinó mediante su cultivo en medio agar sangre (Figura 13). Cada cepa se inoculó por triplicado, utilizando como controles positivos de β -hemólisis a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus* LC390B, y como controles negativos de γ -hemólisis a *Azospirillum brasilense* Sp245 y *Escherichia coli* OP50.

Las placas inoculadas se incubaron en posición invertida a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 a 36 h. Al finalizar el periodo de incubación, se evaluó la presencia de halos hemolíticos en torno a las colonias, clasificándose como α -hemólisis (parcial), β -hemólisis (completa) o γ -hemólisis (ausencia de actividad hemolítica). Los resultados se registraron de manera sistemática y se documentaron mediante registro fotográfico.

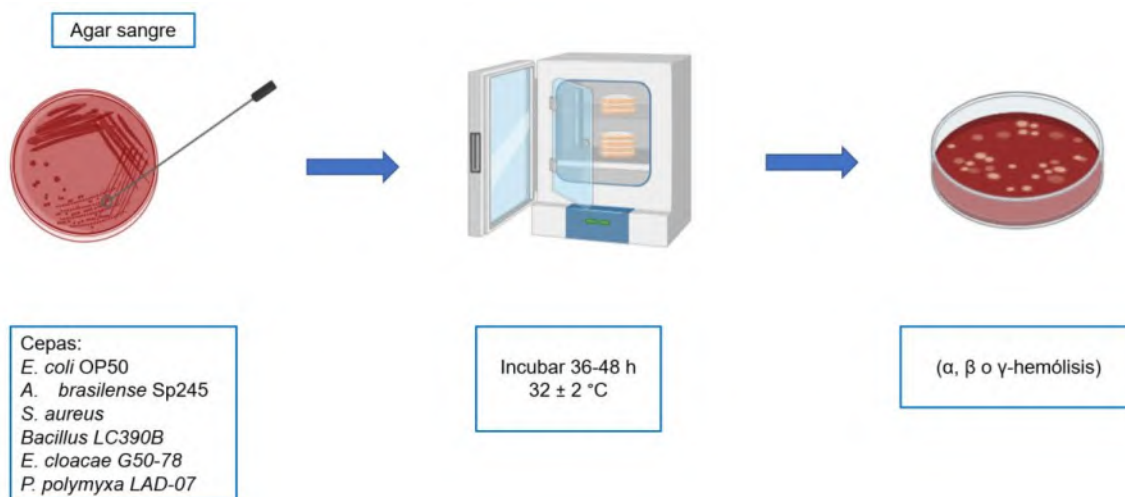


Figura 11. Ensayo de hemólisis en agar sangre. Las cepas de interés (*E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07) se cultivaron por triplicado en medio agar sangre junto con controles positivos de β -hemólisis (*S. aureus* y *Bacillus* LC390B) y negativos de γ -hemólisis (*A. brasilense* Sp245 y *E. coli* OP50). Tras la incubación ($32 \pm 2^\circ\text{C}$, 24–36 h) se evaluó la presencia de α , β o γ -hemólisis alrededor de las colonias bacterianas.

6.3 Cinéticas de crecimiento bacteriano

Con el objetivo de caracterizar y comparar la dinámica de crecimiento de las cepas *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07, se llevaron a cabo ensayos cinéticos en tres medios de cultivo líquidos distintos: caldo nutritivo (CN) y caldo soya tripticaseína (ST), ambos medios convencionales ampliamente utilizados para cultivo bacteriano, y caldo YES, un medio utilizado dentro del grupo de trabajo como alternativa de bajo costo para la producción de bioinoculantes.

Los cultivos iniciales se obtuvieron a partir de siembras en medios sólidos, incubados durante 48 horas a 28 ± 2 °C, hasta alcanzar colonias bien desarrolladas. Posteriormente, las colonias se resuspendieron en los respectivos caldos y se homogenizaron mediante vortex, ajustando la densidad óptica inicial a 0.7 ± 0.05 a una longitud de onda de 590 nm, medida en un espectrofotómetro UV-Vis (Figura 12). Se procedió a inocular por triplicado matraces Erlenmeyer estériles de 125 mL, cada uno conteniendo 15 mL del medio correspondiente. Los cultivos fueron incubados en agitación constante a 100 rpm y temperatura controlada de 28 ± 2 °C para favorecer la aireación homogénea y el crecimiento bacteriano.

Durante un periodo total de 48 horas, se realizaron muestreos de 1000 μ L (1 mL) en intervalos previamente definidos: a las 2, 4, 8, 12, 15, 24, 30, 36 y 48 horas de incubación. Cada muestra se leyó inmediatamente en el espectrofotómetro a 590 nm para registrar la densidad óptica, la cual se tomó como indicador indirecto de la concentración celular.

Los datos obtenidos se organizaron en una base de datos y se procesaron para elaborar las curvas de crecimiento (gráficas de densidad óptica vs. tiempo). Esto permitió identificar y comparar las fases características del crecimiento bacteriano (fase de latencia, logarítmica, estacionaria y de declive) en los distintos medios de cultivo, evaluando así el comportamiento de cada cepa y el rendimiento que ofrece cada formulación.

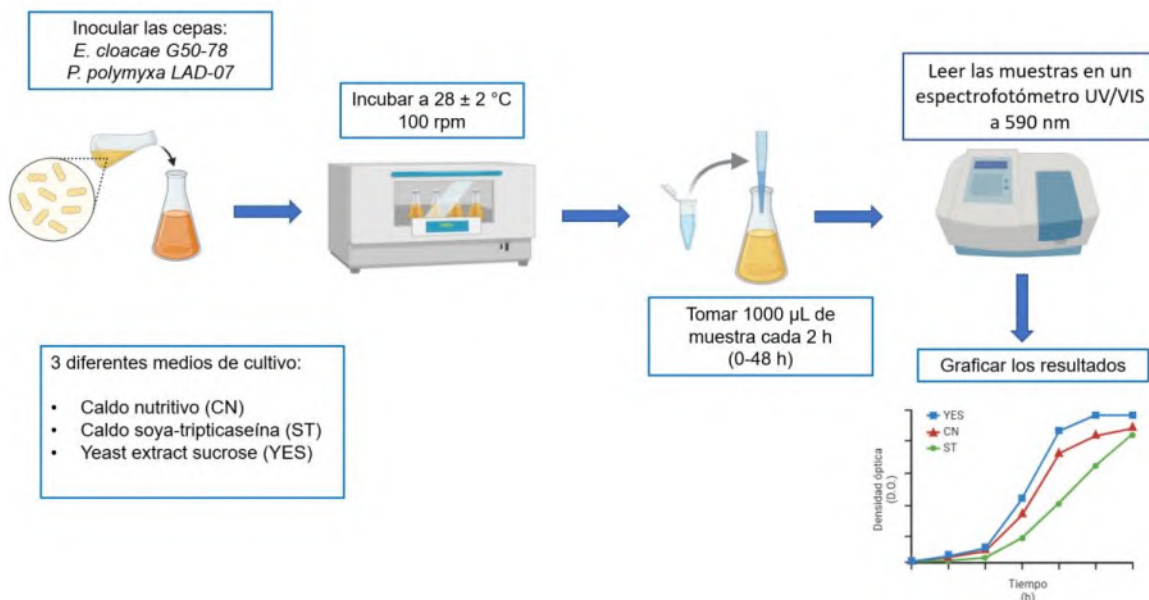


Figura 12. Esquema experimental de las cinéticas de crecimiento bacteriano de *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07 en tres medios de cultivo líquidos: caldo nutritivo (CN), caldo soya-tripticaseína (ST) y caldo YES. Los cultivos se incubaron a 28 ± 2 °C y 100 rpm durante 48 h, realizando muestreos cada 2 h para registrar la densidad óptica a 590 nm.

6.4 Producción y caracterización de biochar a partir de bagazo de agave

6.4.1 Producción de biochar

El biochar utilizado en este estudio se obtuvo a partir de bagazo de agave deshidratado como materia prima. Inicialmente, se recolectaron 45 kg de bagazo fresco, los cuales fueron sometidos a un proceso de secado al ambiente hasta alcanzar un contenido reducido de humedad.

Posteriormente, la biomasa se sometió a un proceso de pirolisis lenta en un reactor tipo lote (pirolizador ZIPE II), operado a una temperatura de 450 °C durante 8 h, en condiciones controladas y con limitación de oxígeno.

El producto final fue colectado, almacenado en sacos y conservado en condiciones secas hasta su posterior caracterización y uso en la formulación de bioinoculantes.

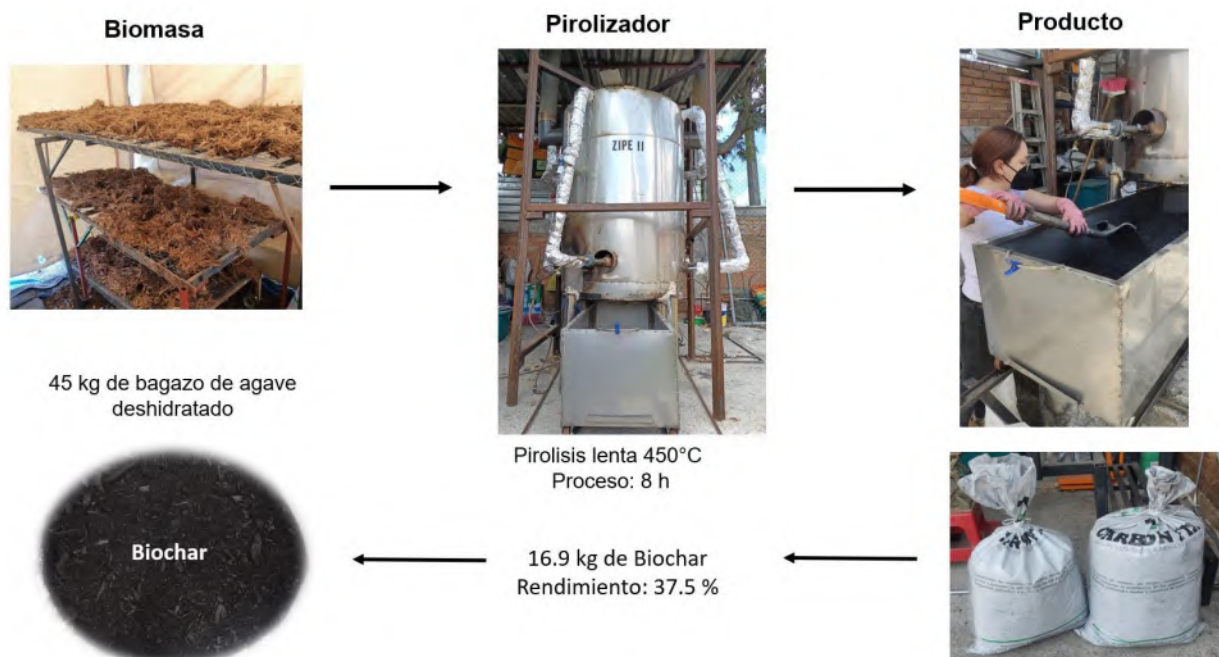


Figura 13. Proceso de producción de biochar a partir de bagazo de agave deshidratado. Se emplearon 45 kg de biomasa como materia prima, la cual fue sometida a pirolisis lenta (450 °C, 8 h) en un pirolizador tipo lote.

6.4.2 Acondicionamiento del biochar para su aplicación como portador microbiano

El biochar obtenido por pirolisis fue sometido a un proceso de acondicionamiento previo para su uso como material portador. Inicialmente, el biochar se pulverizó utilizando un molino de aspas hasta obtener un tamaño de partícula homogéneo. Posteriormente, el material pulverizado se tamizó empleando una malla de acero inoxidable de 0.5 mm, con el objetivo de estandarizar la granulometría y asegurar una superficie adecuada para la adhesión y proliferación microbiana.

El biochar tamizado se almacenó en recipientes estériles y, previo a su utilización en la formulación de bioinoculantes, se sometió a un proceso de esterilización en autoclave a 121 °C durante 15 min, repitiendo el ciclo en dos ocasiones consecutivas para garantizar la eliminación de posibles contaminantes (Figura 14).

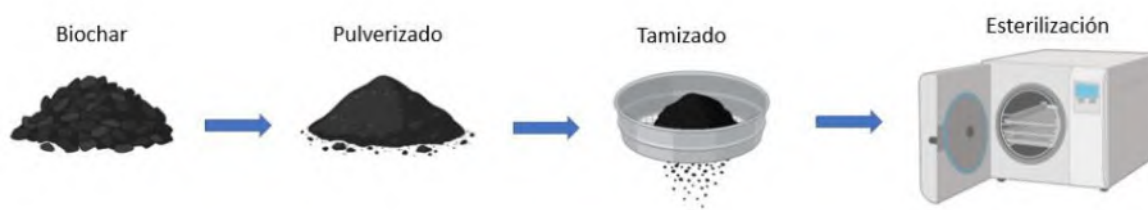


Figura 14. Proceso de acondicionamiento del biochar para su uso como portador microbiano. El biochar se pulverizó, tamizó y posteriormente se esterilizó en autoclave para garantizar un material uniforme y libre de contaminantes.

6.4.3 Caracterización físicoquímica del biochar

Para la caracterización físicoquímica del biochar obtenido a partir de bagazo de agave, se recolectaron muestras representativas de aproximadamente 1 kg, Las cuales fueron selladas y etiquetadas adecuadamente para evitar contaminación cruzada y cambios en la humedad, y posteriormente enviadas al Laboratorio de Análisis de Suelos y Nutrición FERTILAB® (Celaya, Guanajuato, México).

En dicho laboratorio, se determinó un conjunto de parámetros fundamentales para evaluar la calidad y potencial uso del biochar como portador microbiano y mejorador de suelo.

Entre las propiedades analizadas se incluyeron: pH en suspensión 1:2 (biochar:agua), conductividad eléctrica (CE) expresada en dS/m, capacidad de intercambio catiónico (CIC, cmol/kg), densidad real (g/cm^3) y densidad aparente (g/cm^3), porcentaje de materia orgánica (MO) por método de calcinación, porcentaje

de agua disponible (relacionado con la retención de humedad), distribución y tamaño promedio de poros, contenido de cenizas (resultado de la combustión controlada a 550 °C), y relación carbono/nitrógeno (C/N), calculada a partir de la determinación de carbono total y nitrógeno total mediante el método Kjeldahl o técnicas instrumentales.

Adicionalmente, se cuantificaron macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Mn, Zn, Cu, B), mediante digestión ácida y posterior lectura en equipo de espectrometría de absorción atómica o ICP-OES, según el protocolo interno del laboratorio. La información generada permitió conocer las características fisicoquímicas clave del biochar, así como evaluar su idoneidad como portador sólido en formulaciones de bioinoculante para la conservación de PGPR.

6.4.4 Caracterización microscópica de biochar

6.4.4.1 Preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido

Fijación

Se prepararon por triplicado muestras (biochar o bioinoculante) de 0.2 g en tubos Eppendorf® estériles, a las que se añadieron 1000 µL de una solución fijadora compuesta por glutaraldehído al 2.5% y formaldehído al 4%. Las muestras se homogenizaron mediante agitación en vórtex durante 5 min y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugaron a 10,000 g durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se realizaron tres lavados con buffer de fosfatos estéril, centrifugando tras cada lavado a 10,000 g durante 5 min, retirándose el sobrenadante en cada paso.

Nota: Si solo se pretende caracterizar la morfología del biochar sin microorganismos, la fijación puede omitirse.

Deshidratación

La deshidratación se llevó a cabo utilizando una serie de soluciones crecientes de etanol (50 %, 60 %, 70 %, 80 % y 90 %) y finalmente acetona pura al 100 % (por duplicado). En cada paso, se añadieron 1000 μ L de la respectiva dilución, dejándose actuar durante 10 minutos. Entre cada cambio, las muestras se centrifugaron a 10,000 g durante 5 min. Finalizada la deshidratación, las muestras se secaron al aire en una campana de flujo laminar durante 15 minutos.

Montaje y metalizado

Las muestras secas se montaron cuidadosamente sobre una placa metálica utilizando cinta de carbono conductiva, distribuyéndose con ayuda de palillos estériles. La placa se etiquetó con marcador permanente y se almacenó dentro de una caja de Petri estéril para su traslado. Posteriormente, en el Instituto de Investigaciones en Metalurgia (IIM) de la UMSNH, las muestras se sometieron a metalizado por deposición de iones de cobre bajo vacío.

Finalmente, las muestras fueron analizadas en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) JSM-7600F, donde se realizaron los ajustes de enfoque y captura de micrografías.

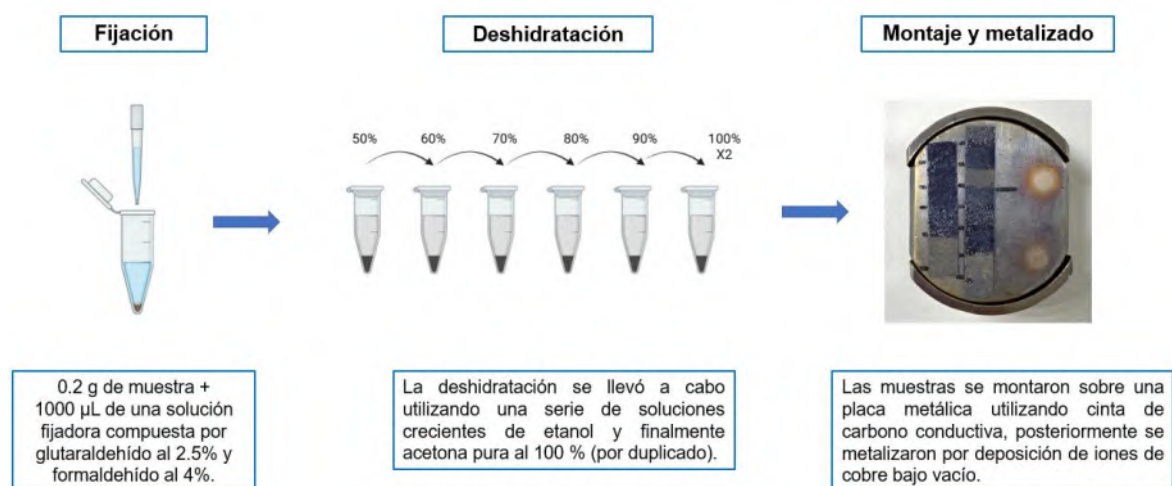


Figura 15. Esquema de preparación de muestras de biochar para MEB

6.5 Formulación del bioinoculante sólido

6.5.1 Preparación de los cultivos bacterianos

Cada cepa (*Enterobacter cloacae* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07) fue cultivada en medio YES estéril, en matraces de 2 litros, con 100 mL de medio de cultivo bacteriano activo, previamente ajustado a una densidad óptica de 1.0 ($\pm$ 0.02) a 590 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis. Esta concentración se seleccionó con base en las cinéticas de crecimiento previas que permitieron correlacionar la absorbancia con un conteo aproximado de 1×10^9 UFC/mL.

Los cultivos se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente (aproximadamente 28 ± 2 °C), bajo agitación constante a 100 rpm en un agitador magnético. Este tiempo fue considerado suficiente para alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, etapa en la que la actividad metabólica y la replicación celular son óptimas para su uso en formulaciones microbianas.

6.5.2 Adición de biochar como portador microbiano

Transcurridas las 24 h de incubación, se incorporó el biochar producido previamente mediante pirólisis lenta a 450°C, el cual fue tamizado en malla 0.5 mm y autoclavado a 121 °C durante 15 minutos. El biochar se añadió en distintas concentraciones, 2 %, 4 %, 6 %, 8 %, calculadas en base al volumen del medio, con el objetivo de evaluar su efecto como portador microbiano.

El biochar se añadió cuidadosamente al medio de cultivo, y la mezcla fue homogeneizada utilizando un agitador magnético, asegurando una dispersión uniforme de las partículas en suspensión durante 1 h. Posteriormente, las mezclas fueron dejadas en incubación estática durante 12 h adicionales para favorecer la adherencia de las bacterias al biochar y permitir su colonización superficial (Figura 16).

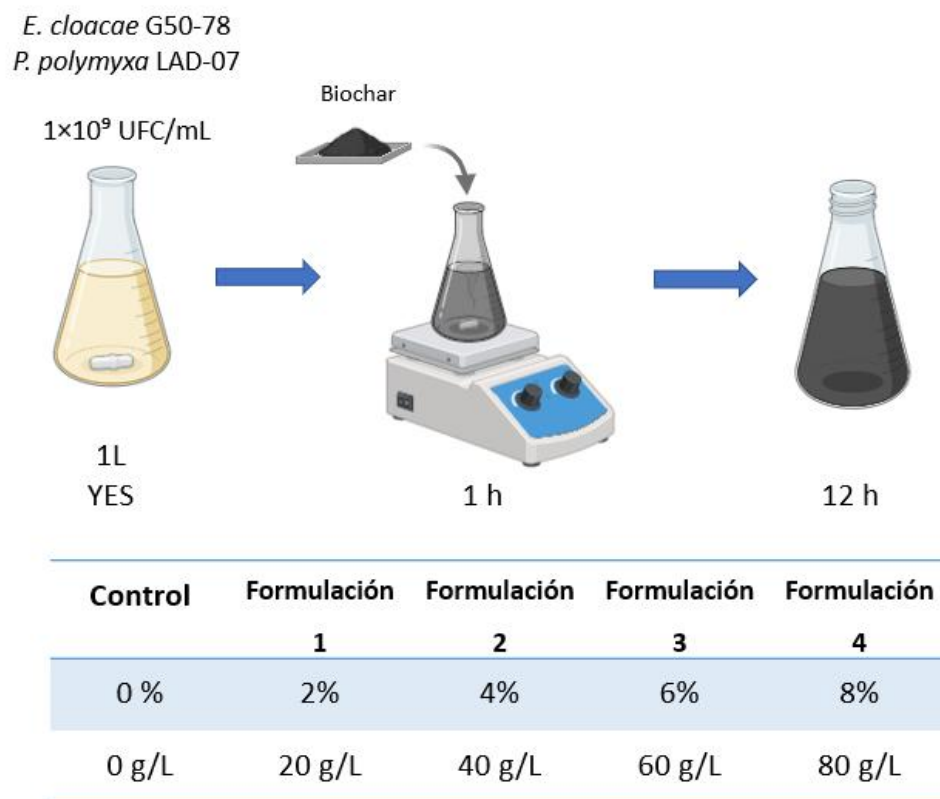


Figura 16. Esquema de adición de biochar como portador microbiano. Cultivos de *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07 en 1 L de medio YES ($\approx 1 \times 10^9$ UFC/mL) se mezclaron con biochar tamizado (0.5 mm) y esterilizado, homogeneizándose 1 h (28 ± 2 °C, 100 rpm) y reposando 12 h para favorecer la adsorción/colonización. Se evaluaron cinco formulaciones % p/v respecto al volumen del cultivo: 0, 2, 4, 6 y 8 %, equivalentes a 0, 20, 40, 60 y 80 g·L⁻¹, respectivamente.

6.5.3 Incorporación de excipientes para formulación sólida

Después del periodo de colonización, se agregaron excipientes con funciones específicas para convertir la mezcla líquida en una formulación sólida estable (Figura 17). En primer lugar, se añadió maltodextrina (500 g/L), como fuente de carbono protectora y agente estructurante, que facilita la encapsulación bacteriana y protege frente a la desecación. La maltodextrina se disolvió completamente mediante agitación manual con espátula estéril y posterior homogenización en el agitador magnético por 20 min.

Posteriormente, se incorporaron 500 g/L de fécula de maíz, con el fin de mejorar la textura y cohesión de la mezcla, así como actuar como agente inmovilizador adicional. El proceso de homogenización se repitió por 20 min más para asegurar una mezcla uniforme.

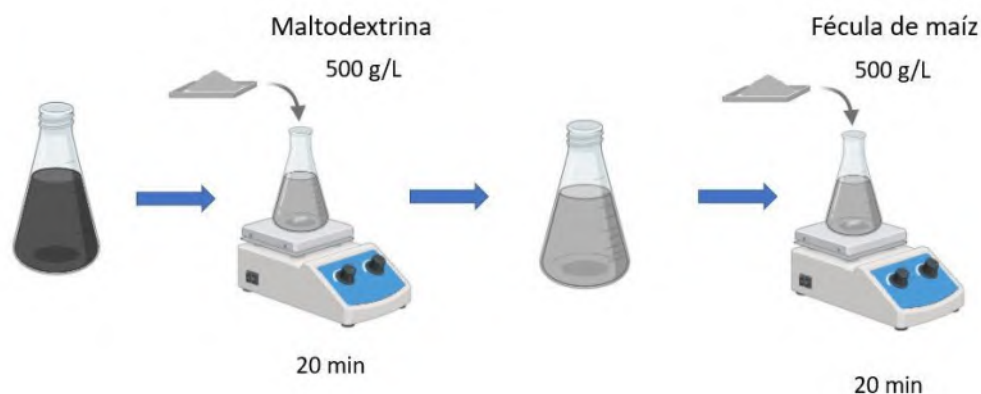


Figura 17. Incorporación secuencial de excipientes a la formulación: adición de maltodextrina (500 g·L⁻¹, 20 min de homogeneización) seguida de fécula de maíz (500 g·L⁻¹, 20 min). Los excipientes actúan como agentes protectores y de estructurado para convertir el sistema cultivo-biochar en una formulación sólida estable y manipulable.

6.5.4 Secado y obtención del bioinoculante en polvo

Una vez obtenida una pasta homogénea, se procedió al secado mediante la adición de 1000 g/L de tierra de diatomeas estéril. Este material actúa como absorbente natural y ayuda a transformar la mezcla húmeda en una masa granular, formando pequeñas bolitas o grumos. La mezcla fue amasada manualmente bajo condiciones estériles hasta lograr una textura semiseca.

Los grumos formados fueron pasados a través de un tamiz estéril para obtener un polvo fino, uniforme y manejable.

Este polvo fue esparcido en una capa delgada sobre charolas metálicas estériles y llevado a un desecador con circulación de aire caliente a 60-70 °C durante 30 min. Este proceso de secado suave fue diseñado para reducir el contenido de humedad sin comprometer la viabilidad de las bacterias.

6.5.5 Envasado y almacenamiento

Una vez seco, el bioinoculante en polvo fue envasado en bolsas plásticas de polietileno herméticas de grado alimenticio, las cuales fueron selladas térmicamente utilizando una selladora eléctrica. Las bolsas se etiquetaron y almacenaron a temperatura ambiente (22–25 °C) en condiciones de oscuridad y baja humedad relativa para su posterior análisis.



Figura 18. Secado, envasado y almacenamiento del bioinoculante sólido

6.5.6 Evaluación de la viabilidad bacteriana

Para evaluar la viabilidad de los microorganismos en el bioinoculante, se tomaron muestras de 10 g en dos momentos:

- Polvo fresco: inmediatamente después del tamizado, antes del secado.
- Polvo seco: al finalizar el proceso de secado en desecador.

Las muestras se sometieron a pruebas de recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante dilución seriada decimal y siembra en placa. Las diluciones se realizaron en solución salina estéril (0.85 % NaCl) y se sembraron por triplicado en medio TSA, incubando a 28 °C durante 24-48 horas. El procedimiento fue replicado para cada cepa y cada concentración de biochar. Este protocolo permitió obtener un producto en polvo con características adecuadas para su aplicación como bioinoculante agrícola, evaluando además la retención de viabilidad bacteriana antes y después del proceso de secado.

6.6 Caracterización fisicoquímica del bioinoculante sólido

Para la caracterización fisicoquímica del bioinoculante sólido formulado a base de biochar, se recolectaron muestras representativas con un peso aproximado de 1 kg. Estas muestras fueron enviadas al Laboratorio de Análisis de Suelos del Centro de Innovación y Desarrollo Agroalimentario de Michoacán (CIDAM) A.C., especializado en análisis de materiales orgánicos y enmiendas para uso agrícola.

En el laboratorio se realizaron determinaciones de parámetros físicos básicos, incluyendo pH y conductividad eléctrica (CE), que permiten evaluar la acidez o alcalinidad del material y su capacidad para conducir corriente eléctrica, respectivamente. También se cuantificó el porcentaje de materia orgánica presente, parámetro relevante por su influencia en la capacidad de retención de agua, aporte de nutrientes y mejora de la estructura del suelo. Asimismo, se analizó la textura del bioinoculante, la cual se refiere a la proporción relativa de partículas de diferente tamaño (arena, limo y arcilla), dado que esta característica influye directamente en su comportamiento como portador microbiano y su interacción con el suelo.

Además de estos parámetros físicos, se llevó a cabo la determinación cuantitativa de diferentes aniones (como carbonatos, bicarbonatos, cloruros, azufre y fosforo Bray), cationes (sodio, potasio, calcio y magnesio) y microelementos esenciales para el desarrollo vegetal, tales como hierro, zinc, cobre, manganeso y boro.

Estas mediciones permiten conocer el valor nutricional potencial del bioinoculante, así como prever su efecto sobre el equilibrio iónico del suelo tras su aplicación.

Los resultados obtenidos sirvieron para caracterizar integralmente la calidad fisicoquímica del bioinoculante sólido, permitiendo relacionar sus propiedades con la viabilidad bacteriana, estabilidad durante el almacenamiento y su potencial efecto promotor del crecimiento vegetal.

6.7 Caracterización microscópica del bioinoculante

Para la caracterización microscópica del bioinoculante sólido mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), se prepararon triplicados de 0.5 g en tubos Eppendorf®, fijados con 1000 µL de una solución de glutaraldehído al 2.5 % y formaldehído al 4 %, manteniéndose en refrigeración a 4 °C toda la noche. Tras centrifugación (10,000 g, 10 min) y tres lavados con buffer de fosfatos, las muestras se deshidrataron en serie con etanol (50–90 %) y acetona 100 %, centrifugando entre pasos (10,000 g, 5 min). Finalmente, las muestras se secaron al aire, se montaron sobre placas metálicas con cinta de carbono y se metalizaron con iones de cobre. La observación y captura de micrografías se realizó en el equipo JSM-7600F del Instituto de Investigaciones en Metalurgia (UMSNH).

6.8 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal *in vitro*

6.8.1 Determinación de la capacidad fijadora de nitrógeno

La capacidad de las cepas *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07 para fijar nitrógeno atmosférico se evaluó mediante ensayos cualitativos y cuantitativos.

Ensayo cualitativo:

Se utilizó medio semisólido libre de nitrógeno (NFb). Se inocularon por punción tubos conteniendo 5 mL de NFb, incubándose a 30 °C durante 7 días. La fijación de nitrógeno se evidenció por el cambio de coloración del medio de verde a azul, debido a la alcalinización generada por la actividad nitrogenasa. Como controles se emplearon *A. brasilense* Sp445 (positivo) y *E. coli* OP50 (negativo).

Ensayo cuantitativo:

Se inocularon por triplicado 200 µL de una suspensión bacteriana ajustada a D.O. 1.0 ($\approx 1 \times 10^9$ UFC/mL) en tubos con 3 mL de caldo extracto de suelo al 10%. Las muestras se incubaron a 30 ± 2 °C y 100 rpm durante 72 h. Posteriormente, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min y se extrajo el nitrógeno mineral con 10 mL de KCl 2 M. Las muestras se agitaron a 100 rpm durante 30 min y se dejaron en reposo por 30 min adicionales, para luego centrifugarse nuevamente a 10,000 rpm durante 10 min. La cuantificación del nitrógeno fijado se realizó de forma indirecta midiendo la absorbancia a 632 nm en un espectrofotómetro, utilizando como blanco caldo extracto de suelo sin inocular. Se construyó una curva de calibración a partir de diluciones seriadas de una solución estándar de cloruro de amonio (NH_4Cl).

6.8.2 Determinación de la capacidad de solubilización de fósforo en medio NBRIP

La capacidad de solubilización de fosfato inorgánico se evaluó mediante el ensayo en medio NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium*), siguiendo el protocolo descrito por **Nautiyal (1999)**, el cual contiene fosfato tricálcico insoluble como fuente de fósforo. Este medio se considera eficiente para la detección y cuantificación de la actividad solubilizadora de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (**Kalayu, 2019; Xie et al., 2022**).

Las cepas bacterianas *Enterobacter cloacae* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 se cultivaron previamente en caldo nutritivo a 28 ± 2 °C durante 24 h, o hasta alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 1.0 a 590 nm. Posteriormente, se inocularon por triplicado placas Petri conteniendo medio NBRIP sólido, depositando en el centro de cada placa 10-20 µL de suspensión bacteriana ($\sim 10^9$ UFC/mL). Las placas se incubaron a 28 ± 2 °C durante 7-10 días.

La capacidad de solubilización se evaluó midiendo el diámetro del halo claro formado alrededor de las colonias, indicativo de la solubilización del fosfato insoluble, y calculando el índice de solubilización de fósforo (ISP).

Cálculo del índice de solubilización de fósforo (ISP):

$$ISP = \frac{\text{diámetro del halo} + \text{diámetro de la colonia}}{\text{diámetro de la colonia}}$$

Se incluyó *Azospirillum brasilense* Sp245 como control positivo y *Escherichia coli* OP50 como control negativo. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados (**García-Fraile et al., 2015**).

6.8.3 Determinación de la solubilización de calcio en medio Pikovskaya

Para evaluar la capacidad de solubilización de fosfato de calcio de las cepas *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07, se utilizó el medio Pikovskaya (PVK), cuya composición por litro fue: glucosa (10.0 g), fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (5.0 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 g), NaCl (0.2 g), KCl (0.2 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.002 g) y $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.002 g), ajustando el pH a 7.0 antes de la esterilización. Para el ensayo cualitativo, se sembraron por triplicado las bacterias en placas de PVK sólido (adicionado con 15 g/L de agar) mediante siembra puntual, y se incubaron a 28 ± 2 °C durante 7 días; diariamente se monitoreó la formación de halos claros alrededor de las colonias, como indicativo de solubilización del fosfato de calcio.

Se calculó el índice de solubilización (IS) dividiendo el diámetro total del halo entre el diámetro de la colonia.

$$(\text{IS}) = \frac{\text{área de la colonia} + \text{área del halo}}{\text{área de la colonia}}$$

6.8.4 Determinación de la producción de auxinas

La producción de auxinas por *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07 se evaluó mediante el método colorimétrico de Salkowski.

Las cepas se cultivaron por triplicado en tubos con 3 mL de caldo soya-tripticaseína (ST) y en ST suplementado con 200 µg/mL de L-triptófano como precursor. Los cultivos se incubaron a 28 ± 2 °C y 100 rpm durante 96 h, hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 1.0 a 590 nm. Posteriormente, se homogenizaron en vórtex durante 1 min y se tomaron 1000 µL de cultivo, que fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 5 min. Del sobrenadante, se extrajeron 300 µL, los cuales se mezclaron con 600 µL de reactivo de Salkowski (relación 1:2). La mezcla se agitó en vórtex por 30 segundos y se incubó en oscuridad durante 30 minutos hasta observar el desarrollo de la coloración (amarillo a rosa).

La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se obtuvieron por interpolación respecto a una curva de calibración construida con diluciones estándar de ácido indol-3-acético (AIA, Thermo Fisher Scientific®) en concentraciones de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 µg/mL. Como blanco se utilizó caldo ST sin inocular.

6.9 Ensayos de germinación

6.9.1 Selección de semillas

Se seleccionaron semillas viables de maíz blanco híbrido H-318, de tamaño homogéneo. Las semillas se colocaron en un vaso de precipitados de 1 L con agua desionizada estéril; tras 5 min, se descartaron aquellas que flotaron.

6.9.2 Pretratamiento

Dado que las semillas de maíz H-318 estaban recubiertas con carbocaptan (fungicida), K-Obiol C.E 2.5 (insecticida) y rodamina (colorante), se realizaron 4-5 lavados con agua desionizada estéril hasta eliminar por completo el color rosado del recubrimiento.

6.9.3 Desinfección

Se sumergieron las semillas en NaClO comercial al 3 % (30,000 ppm) durante 1 min, seguido de 3 lavados con agua desionizada estéril. Posteriormente, se aplicó etanol al 70 % durante 1 min, y se repitieron 3 lavados finales con agua desionizada estéril.

6.10 Recubrimiento de semillas con bioinoculante sólido

Una vez que las semillas desinfectadas estuvieron completamente secas, se seleccionó el lote correspondiente para cada tratamiento, añadiendo un 10 % extra de semillas para compensar posibles pérdidas durante el manejo. Posteriormente, se preparó la solución adherente disolviendo 2 g de melaza en 100 mL de agua desionizada estéril, ajustando la cantidad de solución en función del tamaño de la semilla y la viscosidad requerida. Las semillas se colocaron en un vaso de precipitados o en una bolsa plástica estéril, y se añadieron de 1 a 2 mL de la solución adherente por cada 100 semillas, mezclando suavemente hasta que todas quedaran recubiertas de manera uniforme. A continuación, se incorporaron de 1 a 2 g de bioinoculante sólido (biochar con bacterias) por cada 100 semillas, agitando cuidadosamente o utilizando una espátula estéril para asegurar una distribución homogénea del polvo adherido alrededor de la superficie de la semilla.

Las semillas recubiertas se distribuyeron en una sola capa sobre charolas metálicas previamente limpias y desinfectadas, donde se dejaron secar a temperatura ambiente (18-23 °C) durante un periodo de 12 a 24 horas, evitando la exposición directa a la luz solar y las corrientes de aire fuertes para mantener la viabilidad microbiana. Antes de su almacenamiento, se verificó que las semillas estuvieran completamente secas al tacto. Finalmente, las semillas se conservaron en bolsas herméticas o frascos limpios en un sitio fresco y seco hasta su utilización. De manera complementaria, se pudo realizar un control de viabilidad bacteriana posterior al recubrimiento mediante la siembra de diluciones seriadas del polvo desprendido de las semillas para cuantificar la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC).

6.11 Siembra de las semillas en charolas

Tras el recubrimiento de las semillas del híbrido H-318, con las formulaciones, estas se sembraron en charolas plásticas transparentes de dimensiones 15 × 15 × 5 cm, que contenían 200 g de peat moss estéril, previamente humedecido con agua desionizada estéril. En cada charola se colocaron 15 semillas, distribuidas uniformemente (Figura xx). Posteriormente, las semillas se cubrieron con una capa adicional de peat moss húmedo para favorecer la germinación. Las charolas se regaron con agua corriente cada 48 h y se registró diariamente el número de semillas germinadas por tratamiento. A los 7 después de la siembra (DDS) se determinaron los siguientes parámetros:

Porcentaje final de germinación (PFG): Corresponde al porcentaje de semillas germinadas al final del periodo de evaluación (en este caso, a los 7 DDS).

$$PFG \% = \frac{\text{No. final de semillas germinadas}}{\text{No. semillas sembradas}} \times 100$$

Coeficiente de velocidad de germinación (CVG): Indica la rapidez del proceso de germinación. Se calcula según Maguire (1962).

$$CVG = \frac{\sum G}{\sum (G \times D)} \times 100$$

Donde:

- G = número de semillas germinadas en cada recuento diario.
- D = número de días transcurridos desde la siembra hasta cada recuento.

Índice de vigor de la germinación I y II

$$IVGI = \% \text{ Germinación} \times \text{Promedio Longitud de la raíz}$$

$$IVG II = \% \text{ Germinación} \times \text{Promedio del peso seco}$$

Cada ensayo se realizó por triplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados. Para calcular la longitud de las plántulas en esta etapa (V1) se consideró la suma de la raíz y el tallo (hipocótilo).

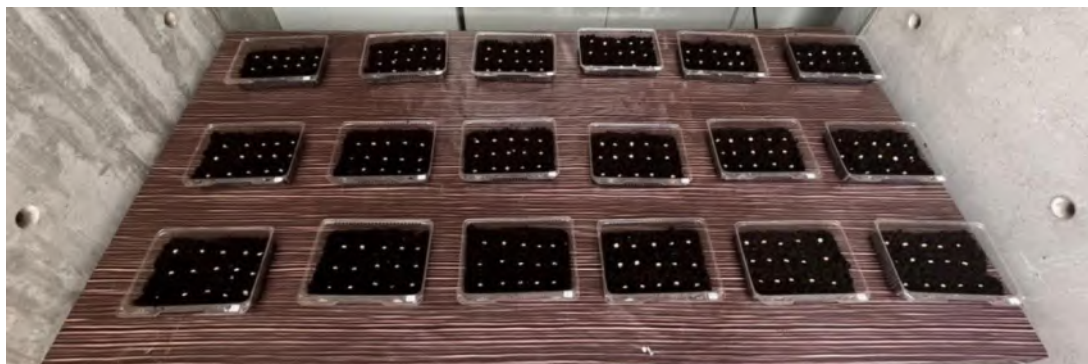


Figura 19. Semillas de maíz en charolas de plástico con peat-moss como sustrato



Figura 20. Semillas de maíz H-318 germinadas 7DSS

6.12 Parámetros del desarrollo vegetal de plántas de maíz en condiciones de vivero

Con el objetivo de evaluar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento inicial del maíz (*Zea mays* híbrido H-318), se midieron diversos parámetros morfofisiológicos en plantas cultivadas bajo condiciones controladas de vivero.

Las variables analizadas incluyeron: longitud de la parte aérea (cm), longitud de la raíz principal (cm), longitud total de la plántula (cm), peso fresco de la parte aérea (g), peso fresco de la raíz (g), peso fresco total (g), peso seco de la parte aérea (g), peso seco de la raíz (g) y peso seco total (g). Las evaluaciones se realizaron en tres etapas fenológicas definidas del desarrollo vegetativo del maíz: V3 (tercera hoja) y V4 (cuarta hoja), conforme a la escala de crecimiento de Ritchie et al. (1992). En cada etapa, se seleccionaron aleatoriamente plántulas representativas de cada tratamiento, realizándose los ensayos por triplicado para garantizar la reproducibilidad y la validez estadística de los datos obtenidos.

Para la determinación del peso seco, las plántulas cosechadas fueron separadas cuidadosamente en parte aérea y sistema radical. Posteriormente, las muestras se colocaron en bolsas de papel previamente identificadas y se introdujeron en un horno de secado a 60-70 °C durante 24 horas o hasta alcanzar peso constante, con el fin de eliminar completamente la humedad residual. Finalmente, se obtuvieron las mediciones de peso seco utilizando una balanza analítica de precisión (± 0.001 g).

Todas las mediciones de longitud se realizaron con una regla milimetrada rígida y los pesos se registraron inmediatamente tras la extracción del horno para evitar la reabsorción de humedad ambiental. Los datos fueron anotados en hojas de registro previamente diseñadas y luego ingresados a una base de datos para su posterior análisis estadístico. Estos resultados permitieron comparar y cuantificar los efectos de cada formulación del bioinoculante sobre el desarrollo de las plántulas de maíz durante las primeras etapas de crecimiento bajo condiciones de vivero.

6.13 Evaluación de la estabilidad y vida de anaquel del bioinoculante

Para evaluar la estabilidad del bioinoculante sólido formulado utilizando biochar como portador, se realizó un seguimiento mensual a lo largo de 12 meses, bajo condiciones controladas de almacenamiento a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) y humedad relativa del 60-70 %. Este estudio tuvo como objetivo analizar el comportamiento del producto en cuanto a viabilidad microbiana y parámetros fisicoquímicos, así como detectar posibles alteraciones sensoriales y de calidad.

Para evaluar la viabilidad microbiana de las formulaciones de bioinoculante sólido durante el almacenamiento (vida de anaquel), se tomó una muestra de 1 g del producto, que fue transferida a tubo de ensayo con tapa que contenía 9 mL de buffer de fosfatos, obteniendo así una dilución inicial de 10^{-1} . La mezcla se homogenizó vigorosamente en un vortex durante 5 min, con el fin de desprender las bacterias del soporte sólido. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas decimales (hasta 10^{-9}) en buffer de fosfatos.

De cada dilución seleccionada, se sembró por triplicado 100 μ L en placas Petri con medio sólido (Agar nutritivo o TSA). Las muestras se distribuyeron en la superficie de las placas mediante la técnica de siembra en tapete, utilizando un asa de vidrio o un esparcidor estéril.

Las placas se incubaron a 28 ± 2 °C durante 24-48 horas, tras lo cual se realizó el conteo de colonias viables. Los resultados se expresaron como UFC por gramo de bioinoculante seco, calculando el promedio y desviación estándar de las repeticiones. Este procedimiento se repitió mensualmente para monitorear la viabilidad a lo largo del tiempo de almacenamiento, los resultados obtenidos se reportaron como unidades formadoras de colonias por gramo de producto (UFC/g).

El pH se midió preparando una suspensión 1:10 del bioinoculante en agua desionizada estéril (10 g en 100 mL). La medición se efectuó utilizando un potenciómetro previamente calibrado. El contenido de humedad se determinó por gravimetría: se pesaron 5 g de muestra, se colocaron en estufa a 105 °C hasta alcanzar peso constante, y se calculó el porcentaje de humedad a partir de la diferencia de peso inicial y final.

Además, se evaluaron características sensoriales como color, olor y textura, de manera descriptiva y comparativa frente a la muestra inicial, anotando cualquier cambio notable en tonalidad, aparición de olores extraños (fermentado, rancio) o variaciones en la textura (apelmazamiento, compactación). Se llevó a cabo también una inspección visual para identificar presencia o ausencia de contaminación, observando posibles hongos, filamentos o colonias atípicas. Por último, se evaluó cualitativamente la fluidez y manejabilidad del bioinoculante, considerando su capacidad para mezclarse y dispersarse homogéneamente.

El monitoreo se diseñó considerando triplicados para cada formulación, realizándose las mediciones de UFC y pH también por triplicado para calcular el promedio y desviación estándar mensual. Todos los resultados se registraron en una tabla de seguimiento mensual, permitiendo analizar y comparar la estabilidad de las formulaciones y así identificar cuál conserva mejor la viabilidad microbiana y sus características fisicoquímicas durante el periodo de almacenamiento.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Ensayos de virulencia

7.1.1 Ensayo de virulencia en *C. elegans* WT2

La evaluación de la supervivencia de *C. elegans* expuestos a *Enterobacter cloacae* G50-78 mostró que esta cepa no presentó efectos adversos significativos sobre los nematodos a lo largo de 96 h, manteniendo una supervivencia cercana al 100 % en comparación con los controles negativos (*E. coli* OP50 y *Azospirillum brasilense* Sp245) (Figura 21). En contraste, los controles positivos (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus* LC390B) redujeron drásticamente la viabilidad de los nematodos, alcanzando valores menores al 40 % al final del experimento. Estos resultados sugieren que *E. cloacae* G50-78 no posee un comportamiento virulento frente al modelo *C. elegans*, lo cual es consistente con su potencial uso como bacteria benéfica.

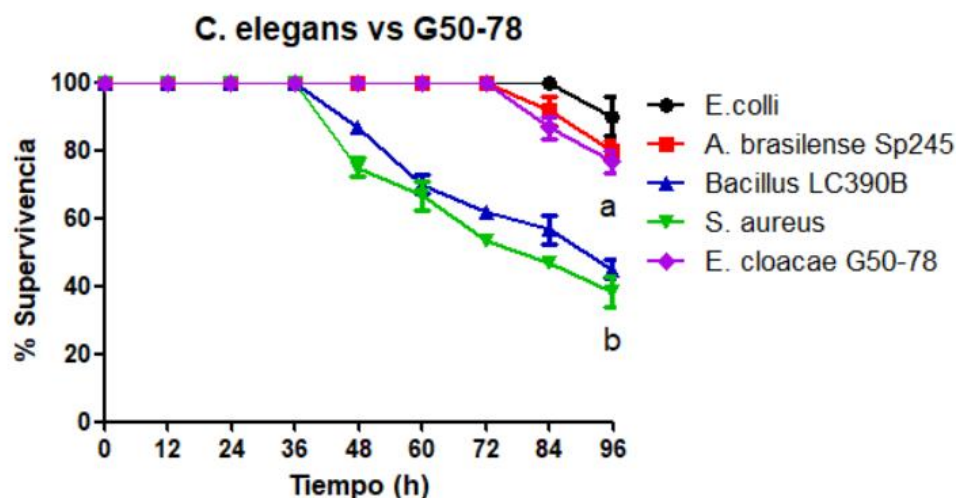


Figura 21. Supervivencia de *Caenorhabditis elegans* WT2 en presencia de *E. cloacae* G50-78 durante 96 h. Se incluyen controles negativos (*E. coli* OP50 y *A. brasilense* Sp245) y positivos (*S. aureus* y *Bacillus* LC390B). La cepa G50-78 no mostró efectos adversos significativos sobre la viabilidad de los nematodos.

De manera similar, la cepa *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 no afectó significativamente la supervivencia de los nematodos en el periodo de 96 h, mostrando curvas de viabilidad comparables a las de los controles negativos (Figura 22). En cambio, los controles positivos indujeron una reducción progresiva de la supervivencia a partir de las 36 h, confirmando la sensibilidad del ensayo y la capacidad de distinguir entre bacterias virulentas y no virulentas.

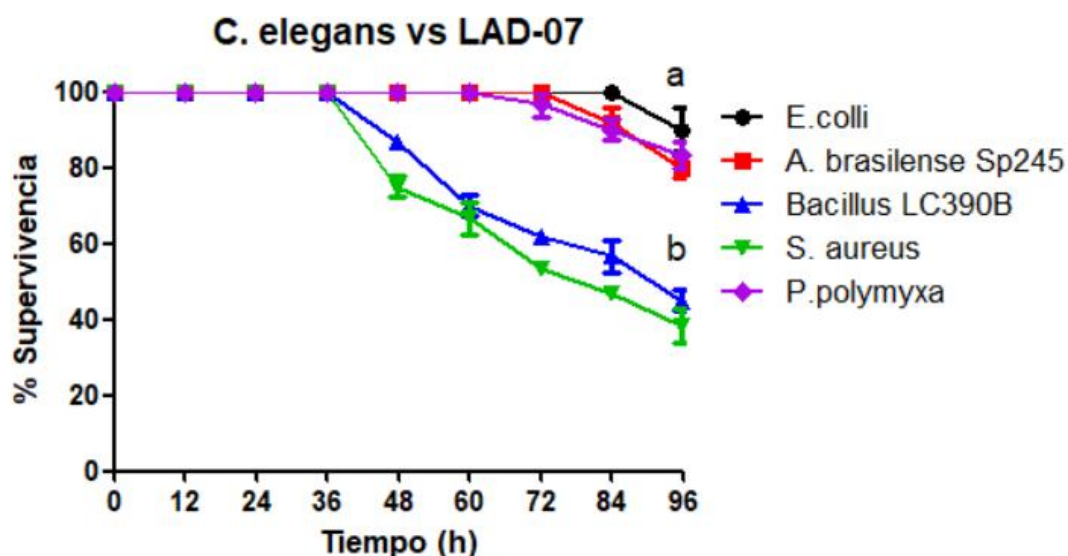


Figura 22. Supervivencia de *Caenorhabditis elegans* WT2 en presencia de *P. polymyxa* LAD-07 durante 96 h. Se incluyen controles negativos (*E. coli* OP50 y *A. brasilense* Sp245) y positivos (*S. aureus* y *Bacillus* LC390B). La cepa LAD-07 mantuvo una supervivencia similar a la de los controles negativos, confirmando su carácter no virulento.

En conjunto, estos resultados evidencian que tanto *E. cloacae* G50-78 como *P. polymyxa* LAD-07 carecen de virulencia hacia *C. elegans*, lo que respalda su inocuidad y pertinencia como candidatos para su aplicación en bioinoculantes. Ensayos previos han validado el uso de *C. elegans* como un modelo fiable para evaluar la virulencia bacteriana debido a su sensibilidad a diversos patógenos oportunistas (Couillault & Ewbank, 2002; Marsh & May, 2012).

Los ensayos de virulencia realizados con *Caenorhabditis elegans* WT2 demostraron que las cepas *Enterobacter cloacae* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 no redujeron significativamente la supervivencia de los nematodos durante el periodo de 96 h, mostrando curvas de viabilidad comparables a los controles negativos (*E. coli* OP50 y *Azospirillum brasilense* Sp 245). Por el contrario, los controles positivos (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus* LC 390B) indujeron una marcada disminución de la supervivencia, lo que valida la sensibilidad del modelo y confirma que G50-78 y LAD-07 carecen de virulencia evidente.

7.1.2 Prueba de hemólisis en agar sangre

En los ensayos de hemólisis, la cepa *E. cloacae* G50-78 no mostró halos de aclaramiento en torno a sus colonias después de 36 h de incubación, indicando un perfil de γ -hemólisis (ausencia de actividad hemolítica) (Figura 23). Este comportamiento coincide con el observado en los controles negativos (*E. coli* OP50 y *A. brasilense* Sp245), que tampoco presentaron actividad hemolítica detectable.

En contraste, los controles positivos confirmaron la sensibilidad del ensayo, ya que *S. aureus* y *Bacillus* LC390B produjeron zonas evidentes de β -hemólisis, reflejadas en la degradación completa de los glóbulos rojos del medio.

Estos resultados sugieren que *E. cloacae* G50-78 carece de factores hemolíticos que pudieran representar un riesgo de patogenicidad, respaldando su seguridad para aplicaciones biotecnológicas. La ausencia de hemólisis constituye un criterio relevante en la evaluación de inocuidad de cepas bacterianas candidatas a bioinoculantes (García-Fraile et al., 2015).

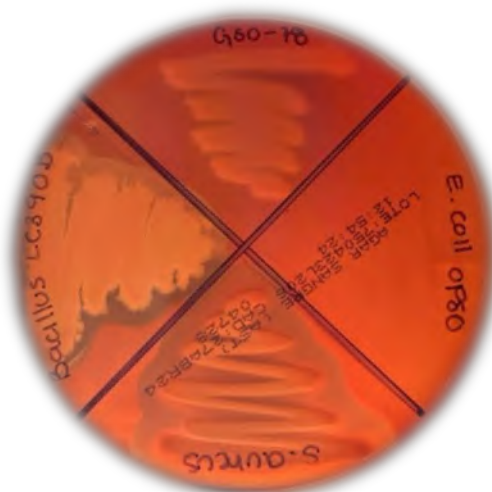


Figura 23. Prueba de hemólisis en agar sangre para *E. cloacae* G50-78. Se observó γ -hemólisis (ausencia de halos de aclaramiento), comportamiento similar a los controles negativos (*E. coli* OP50 y *A. brasilense* Sp245). En contraste, los controles positivos (*S. aureus* y *Bacillus* LC390B) mostraron halos característicos de β -hemólisis.

La cepa *P. polymyxa* LAD-07 tampoco presentó zonas de aclaramiento en el agar sangre después de 36 h de incubación, clasificándose como γ -hemólisis (ausencia de actividad hemolítica) (Figura 14). Este resultado fue consistente con los controles negativos (*E. coli* OP50 y *A. brasilense* Sp245), que no mostraron degradación de los glóbulos rojos del medio (Figura 24).

En contraste, los controles positivos confirmaron nuevamente la validez del ensayo, dado que *S. aureus* y *Bacillus* LC390B produjeron halos característicos de β -hemólisis, evidenciando su capacidad de lisar eritrocitos.

Estos resultados refuerzan la evidencia de que *P. polymyxa* LAD-07 es inocua y no posee factores hemolíticos asociados con potencial patogenicidad. En este sentido, su perfil hemolítico negativo coincide con reportes previos que destacan la seguridad de cepas de *Paenibacillus* utilizadas como promotores de crecimiento vegetal y biocontroladores (Grady et al., 2016).

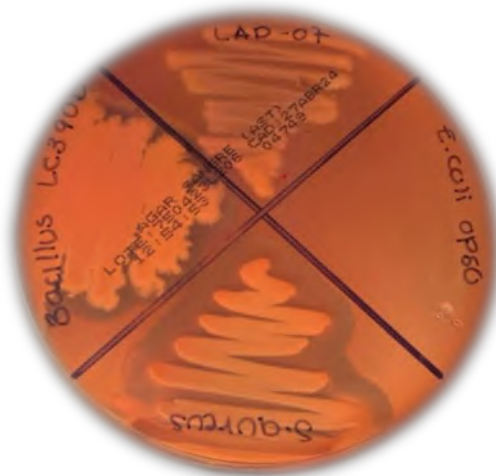


Figura 24. Prueba de hemólisis en agar sangre para *P. polymyxa* LAD-07. La cepa mostró γ -hemólisis (ausencia de halos de aclaramiento), similar a los controles negativos (*E. coli* OP50 y *A. brasilense* Sp245). En contraste, los controles positivos (*S. aureus* y *Bacillus* LC390B) exhibieron β -hemólisis con halos evidentes en torno a las colonias.

Los resultados obtenidos en las pruebas de hemólisis demostraron que tanto *Enterobacter cloacae* G50-78 como *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 no produjeron halos de aclaramiento en agar sangre, clasificándose como γ -hemólisis. Este comportamiento, equivalente al de los controles negativos (*E. coli* OP50 y *Azospirillum brasilense* Sp245), confirma la ausencia de actividad hemolítica en ambas cepas. En contraste, los controles positivos (*S. aureus* y *Bacillus* LC390B) generaron β -hemólisis, validando la sensibilidad del ensayo.

La ausencia de hemólisis es un criterio fundamental en la evaluación de la inocuidad microbiana, ya que las actividades hemolíticas están comúnmente asociadas a factores de virulencia en bacterias oportunistas. Estudios previos han señalado que cepas de *Paenibacillus* y *Enterobacter* con potencial biotecnológico pueden diferenciarse de patógenos oportunistas precisamente por carecer de hemólisis y otros factores de patogenicidad (Grady et al., 2016; García-Fraile et al., 2015).

La combinación de los ensayos de virulencia en *C. elegans* y de hemólisis en agar sangre permitió establecer que *Enterobacter cloacae* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 carecen de características asociadas con patogenicidad, al no afectar la supervivencia de nematodos ni mostrar actividad hemolítica. Estos hallazgos aportan evidencia sólida de su inocuidad biológica, un requisito esencial para su consideración como bioinoculantes en sistemas agrícolas. Desde el marco regulatorio mexicano, la COFEPRIS y las Normas Oficiales Mexicanas (NOM-182-SSA1-2010) exigen pruebas que respalden la seguridad de los productos microbiológicos antes de su liberación al mercado. En este sentido, los resultados obtenidos cumplen con criterios de inocuidad microbiológica y fortalecen la viabilidad de estas cepas como agentes benéficos en la formulación de bioinoculantes, contribuyendo a la agricultura sostenible en México.

7.2 Cinéticas de crecimiento

Las curvas de crecimiento obtenidas para *E. cloacae* G50-78 mostraron un patrón similar en los tres medios evaluados (CN, ST y YES). Sin embargo, el medio YES permitió alcanzar la mayor densidad óptica ($DO \approx 1.5$), lo que indica una mayor biomasa celular acumulada en comparación con los medios convencionales (Figura 25A). En CN y ST, la cepa presentó una fase logarítmica inicial bien definida, seguida de una fase estacionaria más temprana y con valores de D.O. menores a los alcanzados en YES.

Por su parte, *P. polymyxa* LAD-07 presentó un comportamiento diferenciado en función del medio de cultivo. En YES, la cepa alcanzó una densidad óptica máxima de aproximadamente 1.4, superando a los cultivos en CN y ST, los cuales mostraron valores de DO estabilizados alrededor de 1.0 (Figura 25B). Además, el crecimiento en YES fue más rápido, con una fase exponencial que se extendió hasta las primeras 12 h, seguida de una fase estacionaria estable.

Estos resultados sugieren que el medio YES, diseñado como una alternativa de bajo costo, favorece el crecimiento y la acumulación celular tanto de *E. cloacae* G50-78 como de *P. polymyxa* LAD-07, superando el rendimiento observado en los medios convencionales CN y ST. La elección de un medio económico y eficiente resulta de gran relevancia para la producción a escala de bioinoculantes, reduciendo costos sin comprometer la viabilidad bacteriana. Estudios previos han demostrado que la disponibilidad de fuentes de carbono fácilmente metabolizables, como la sacarosa, puede potenciar el crecimiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Nautiyal, 1999; Bashan et al., 2014).

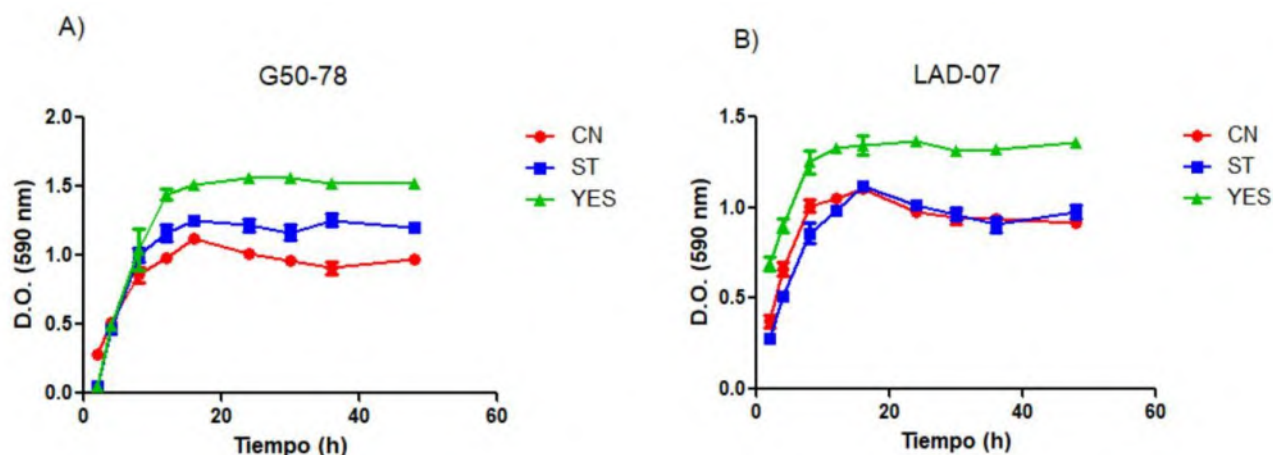


Figura 25. Cinéticas de crecimiento bacteriano en tres diferentes medios de cultivo, caldo nutritivo (CN) caldo soya tripticaseína (ST) caldo yeast extract sucrose (YES) A) *E. cloacae* G50-78 B) *P. polymyxa* LAD-07

7.2 Producción y caracterización del biochar

7.2.1 Producción y acondicionamiento del biochar

El proceso de pirolisis lenta (450 °C, 8 h) del bagazo de agave deshidratado produjo 16.9 kg de biochar a partir de 45 kg de biomasa, lo que representa un rendimiento del 37.5 %. este valor se encuentra dentro del rango reportado para residuos lignocelulósicos (25-40 %), lo cual confirma que el bagazo de agave es un sustrato eficiente para la obtención de biochar (Figura 26) **(Lehmann & Joseph, 2015; Méndez et al., 2019)**.

Tras su obtención, el biochar fue sometido a un proceso de acondicionamiento que incluyó pulverización, tamizado (0.5 mm) y esterilización en autoclave, con el fin de garantizar la uniformidad del material y la eliminación de posibles contaminantes. Este tratamiento permitió obtener un biochar con granulometría homogénea, condición fundamental para su aplicación como portador microbiano en formulaciones sólidas, ya que partículas finas y con alta superficie específica favorecen la adhesión bacteriana y la protección frente a la desecación (Figura 27) **(Gao et al., 2022)**.

Además de su rendimiento, el uso de bagazo de agave para la producción de biochar representa una estrategia de valorización de residuos agroindustriales, contribuyendo a un enfoque de economía circular. la disponibilidad local de este residuo y su bajo costo refuerzan su viabilidad como insumo para la producción de bioinoculantes a gran escala en México.

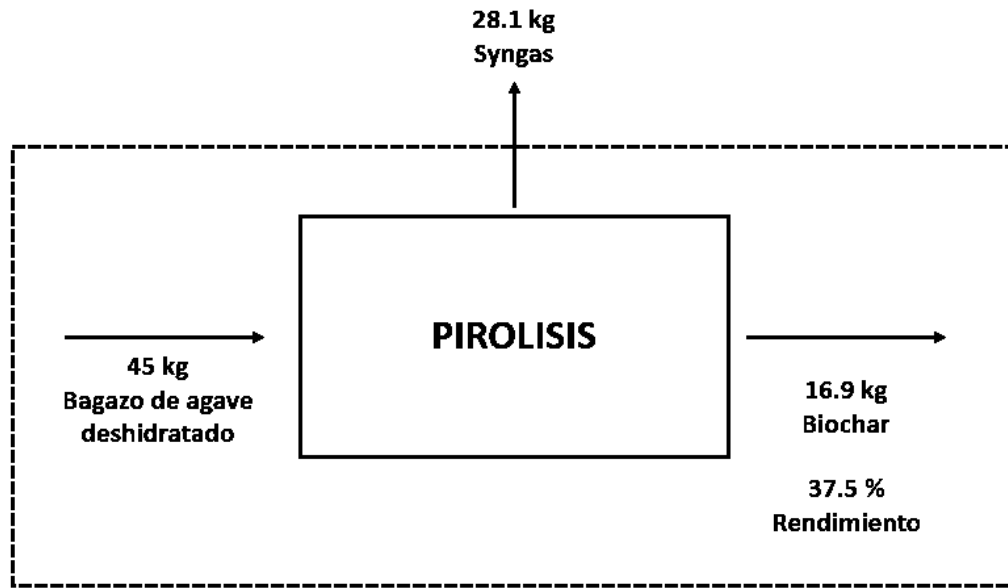


Figura 26. Balance de masa de la pirolisis lenta (450 °C, 8 h) del bagazo de agave deshidratado. A partir de 45 kg de biomasa se obtuvieron 16.9 kg de biochar (37.5 % de rendimiento) y 28.1 kg de biomasa volatilizada (syngas). *Nota: la fracción volatilizada corresponde al gas no carbonoso liberado durante la pirolisis.*

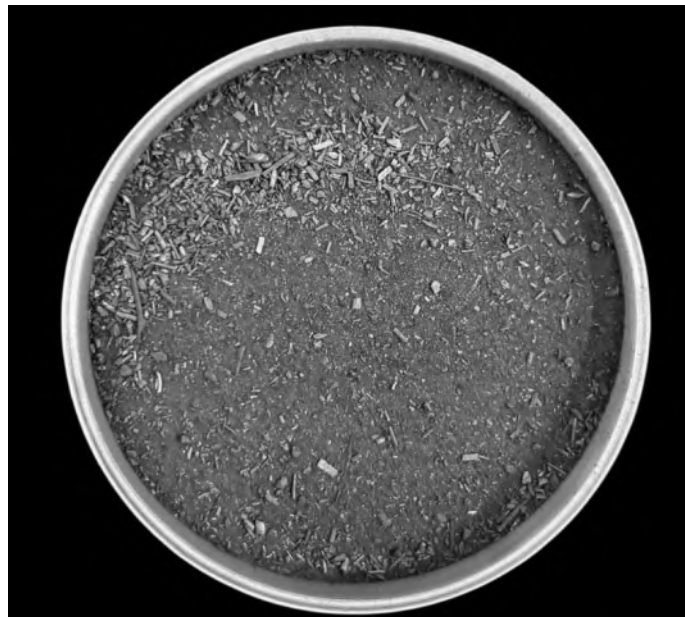


Figura 27. Biochar de bagazo de agave tras el tamizado mostrando granulometría homogénea con predominio de partículas finas; material acondicionado para su uso como portador microbiano en formulaciones sólidas.

7.3 Caracterización físicoquímica del biochar

El biochar producido a partir de bagazo de agave presentó características físicoquímicas que lo convierten en un portador microbiano adecuado para la formulación de bioinoculantes sólidos. Su pH alcalino (8.85) y conductividad eléctrica moderada (1.92 dS/m) indican una reacción química básica que puede contribuir a la neutralización de suelos ácidos y a la mejora de las condiciones edáficas para el establecimiento microbiano **(Lehmann & Joseph, 2015; Tan et al., 2022)**. Este tipo de pH ha demostrado ser favorable para bacterias como *Paenibacillus* y *Enterobacter*, que pueden adaptarse a ambientes ligeramente alcalinos sin comprometer su viabilidad **(Chen et al., 2023)**.

La alta materia orgánica (75.8%) y bajo contenido de cenizas (24.2%) reflejan un material carbonoso con excelente capacidad de intercambio de nutrientes, lo que permite no solo el resguardo de bacterias viables, sino también su actividad metabólica prolongada durante el almacenamiento **(Ding et al., 2023)**. Además, el contenido de potasio (K) fue particularmente alto (16.7 me/L), lo que puede representar un valor agregado del biochar como fuente nutricional directa para las plantas, en combinación con los efectos bioestimulantes de las PGPR **(Zhang et al., 2021)**.

En cuanto a la estructura física, se reportó una densidad aparente de 0.34 g/cm³, con un espacio poroso total (EPT) del 79.1%, lo que sugiere una estructura altamente porosa, ideal para la colonización bacteriana y la retención de agua y nutrientes. Este parámetro es clave en la formulación de bioinoculantes sólidos, ya que favorece la adherencia de las bacterias al soporte, si no que permite el intercambio gaseoso y protege a los microorganismos contra la desecación **(Lehmann & Joseph, 2015; Xu et al., 2016)**.

La capacidad de retención de agua (CRA) alcanzó 667 mL/L, mientras que el agua fácilmente disponible (AFD) fue de 22.9% y el agua totalmente disponible (ATD) de 27.4%. Estos valores son indicativos de un excelente comportamiento higroscópico del biochar, lo que permite mantener condiciones de humedad adecuadas alrededor de las células bacterianas, favoreciendo su sobrevivencia incluso en condiciones de almacenamiento prolongado o de sequía en campo **(Rajkovich et al., 2012; Bai et al., 2022)**.

Por otro lado, las concentraciones de calcio (0.93 me/L), magnesio (0.71 me/L), sodio (0.78 me/L) y fosfatos (0.64 me/L) aportan nutrientes esenciales que pueden ser utilizados tanto por las bacterias como por las plantas, aumentando el valor agronómico de las formulaciones. Además, la baja presencia de metales pesados como Fe (0.24 ppm), Mn (0.01 ppm), Cu (0.01 ppm) y Zn (0.09 ppm) es favorable desde el punto de vista toxicológico, al no representar riesgo para los microorganismos inoculados ni para el entorno edáfico **(Ding et al., 2023)**.

Finalmente, el contenido de humedad del biochar fue de 10.8%, lo que permite su fácil manipulación y combinación con agentes encapsulantes (como maltodextrina o fécula de maíz), sin riesgo de fermentación o descomposición. Una adecuada relación entre humedad y porosidad es crucial para formular productos microbianos estables que liberen gradualmente las bacterias en la rizosfera **(Malusá & Vassilev, 2014)**.

Estos resultados confirman que el biochar de bagazo de agave cumple con los criterios deseables como portador microbiano: alta porosidad, pH alcalino, buena capacidad de retención de agua, alto contenido de materia orgánica y concentración moderada de nutrientes esenciales. Estas propiedades favorecen no solo la protección y viabilidad de bacterias como *E. cloacae* y *P. polymyxa*, sino también su actividad biológica y funcionalidad como PGPR durante el almacenamiento y aplicación al cultivo de maíz **(Xu et al., 2016; Xie et al., 2023)**.

Tabla 5. Caracterización físicoquímica del biochar de bagazo de agave

Elemento	Unidades	Resultado	Método
Conductividad eléctrica	dS/m	1.92	Potenciométrico
pH	-	8.85	
Carbonatos (CO ₃)	me/L	4.07	Titulación
Bicarbonatos (HCO ₃)		9.16	
Cloro (Cl)		0.91	
Nitrógeno amoniacal (N-NH ₄)		0.00	
Nitratos (N-NO ₃)		0.16	Nitración/ UV visible
Fosfatos (P-PO ₄)		0.64	Espectrometría por UV visible
Sulfatos (S-SO ₄)		4.53	Turbidímetro/ UV visible
Calcio (Ca)		0.93	Espectrometría por ICP-OES
Magnesio (Mg)		0.71	
Sodio (Na)		0.78	
Potasio (K)		16.7	
Hierro (Fe)	Ppm	0.24	
Manganeso (Mn)		0.01	
Cobre (Cu)		0.01	
Zinc (Zn)		0.09	
Boro (B)		0.32	
Humedad	%	10.8	
Materia seca		89.2	

Densidad Real (DR)	g/cm ³	1.63	Gravimétrico
Densidad aparente (DA)	g/cm ³	0.34	
Materia orgánica	%	75.8	Calcinación/ gravimétrico
Cenizas		24.2	
Espacio poroso total (EPT)		79.1	Curva de calibración
Capacidad de aireación (CA)		12.4	
Agua fácilmente disponible (AFD)		22.9	
Agua de reserva (AR)		4.43	
Agua totalmente disponible (ATD)		27.4	
Agua difícilmente disponible (ADD)		39.3	
Capacidad de retención de agua (CRA)	mL/L	667	

7.4 Caracterización microscópica del biochar de bagazo de agave

Las micrográficas electrónicas de barrido (Figura 28) evidencian la morfología característica del biochar empleado como portador microbiano en la formulación del bioinoculante. A bajo aumento (A–B, 250X–500X), se observa una arquitectura carbonosa estratificada con abundante fragmentación superficial y una matriz altamente porosa. Esta estructura corresponde a la preservación parcial de los elementos anatómicos de la biomasa lignocelulósica original (xilema y fibras) del agave, que tras la pirólisis adquieren una configuración rígida y estable con predominancia de macroporos y mesoporos interconectados. Dichas características son indicativas de un material con elevada relación área superficial/volumen, lo cual incrementa su potencial como reservorio físico-químico para agua, nutrientes y células microbianas **(Lehmann & Joseph, 2015)**.

A mayores magnificaciones (C–D, 500X–1000X), se distinguen redes reticuladas de poros con diámetros heterogéneos comprendidos entre 3.3 y 23.4 μm , valores congruentes con los rangos de micro y mesoporosidad reportados para biocarbones de origen agrícola. Esta distribución multimodal de tamaños de poro permite generar gradientes microambientales que confieren ventajas adaptativas a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR): los microporos ($<10\ \mu\text{m}$) actúan como refugios frente a la desecación y la depredación por protozoarios, mientras que los meso- y macroporos ($>20\ \mu\text{m}$) facilitan la acumulación de exudados bacterianos y la retención de soluciones nutritivas **(Gao et al., 2020; Sun et al., 2021)**.

En las imágenes de alta resolución (E–F, 2500X–15000X) se aprecia la textura rugosa y fracturada de las paredes carbonosas, acompañada por la presencia de partículas minerales embebidas en la matriz. Esta rugosidad incrementa la capacidad de adsorción catiónica (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} , Na^{+}) mediante interacciones electrostáticas con los grupos funcionales oxigenados superficiales, además de proveer anclajes mecánicos para la adhesión bacteriana.

Estudios previos han demostrado que esta combinación de microhábitats porosos y superficies químicamente reactivas favorece la colonización microbiana y prolonga la viabilidad celular en bioinoculantes sólidos **(Lehmann et al., 2011; Xu et al., 2020)**.

En conjunto, las micrografías confirman que el biochar presenta una ultraestructura jerárquica (macro-, meso- y micro-porosidad) y una superficie rugosa funcionalizada que lo convierten en un portador idóneo para PGPR. Estas propiedades no solo contribuyen a la estabilidad del inóculo durante el almacenamiento, sino que también potencian la actividad metabólica y la interacción rizosférica tras su aplicación en campo, lo que justifica su selección como componente central de la formulación sólida **(Jindo et al., 2020)**.

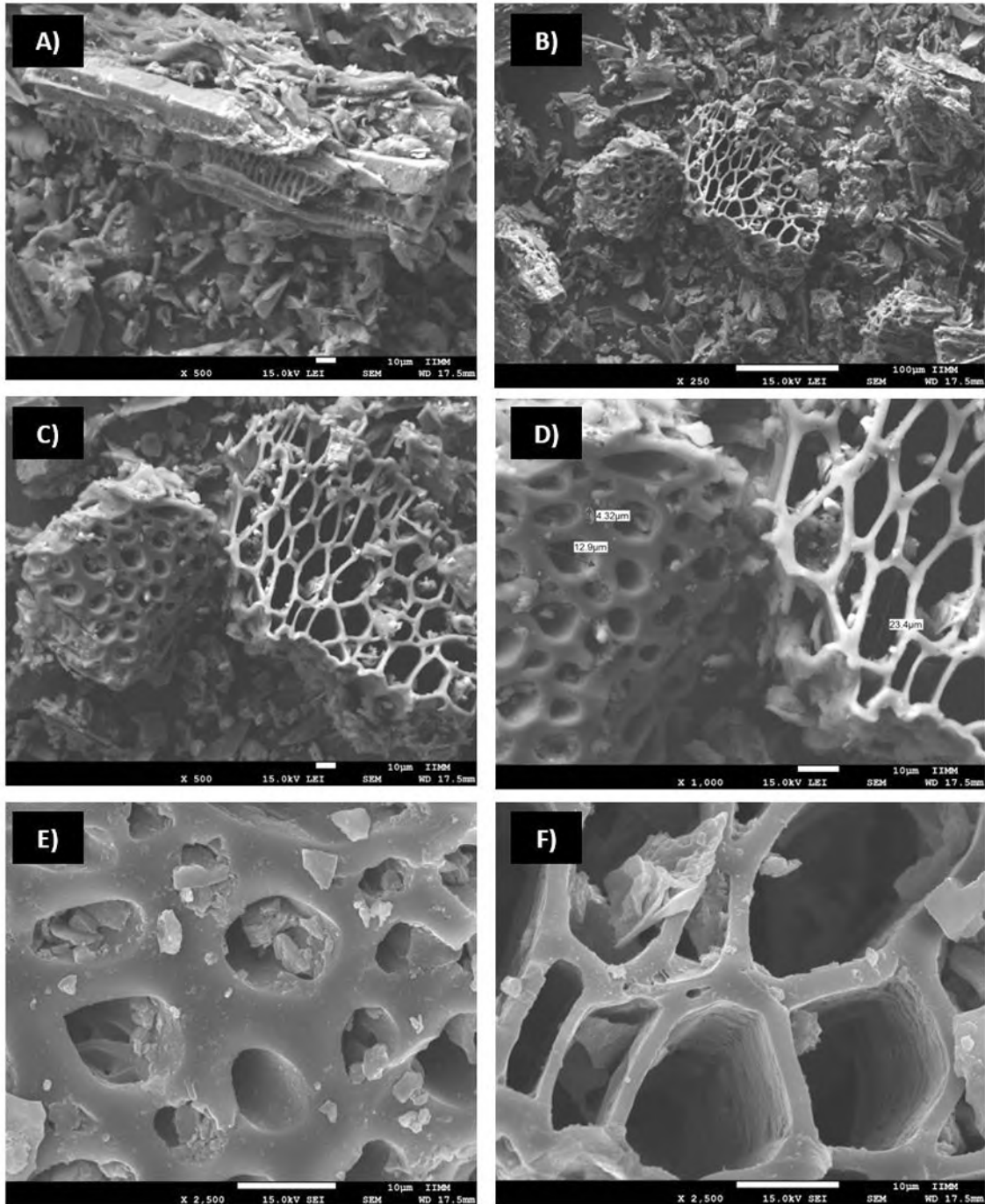


Figura 28. Caracterización microscópica por MEB del biochar de bagazo de agave. (A–B) Vistas generales a 500X y 250X que muestran una arquitectura laminar con porosidad interconectada tipo panal, producto de la carbonización de tejidos lignocelulósicos. (C) 500X: detalle de dominios alveolares con celdas abiertas. (D) 1,000×: mediciones representativas de la microestructura: espesor de pared $\approx 3.3 \mu\text{m}$, diámetro de poro $\approx 12.9 \mu\text{m}$ y luz entre nudos $\approx 23.4 \mu\text{m}$ (líneas rojas). (E–F) 2,500X: superficies de pared con rugosidad y poros secundarios, además de partículas minerales adheridas. La jerarquía macro–meso–microporos y la elevada rugosidad explican la capacidad del biochar para retener humedad/nutrientes y servir como microhábitat.

7.5 Análisis fisicoquímico de las formulaciones de bioinoculante sólido

7.5.1 Descripción física

Las formulaciones sólidas de bioinoculante presentaron variaciones notables en su apariencia física conforme se incrementó la proporción de biochar. En ambos microorganismos (*E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07), el control sin biochar (0 %) mostró un color predominantemente blanco, con textura homogénea y granulometría fina. Al incorporar biochar al 2 y 4 %, las formulaciones comenzaron a adquirir una tonalidad ligeramente grisácea, manteniendo una estructura compacta y homogénea. En concentraciones superiores (6 y 8 %), la coloración se intensificó hacia tonos gris oscuro, con una textura más rugosa y una mayor heterogeneidad superficial.

En comparación con el control, las formulaciones enriquecidas con biochar evidenciaron una mayor densidad aparente y un aspecto más sólido, lo que sugiere una mejor capacidad del portador para conferir estabilidad estructural al bioinoculante. Estos cambios físicos son consistentes con lo reportado por **Bashir et al. (2022)**, quienes destacan que la incorporación de biochar en formulaciones microbianas incrementa la cohesión y reduce la pérdida de humedad durante el almacenamiento. Asimismo, el incremento de la porosidad y el color característico del biochar confirman su integración en la matriz sólida, lo que podría favorecer tanto la protección microbiana como la liberación gradual de metabolitos en el suelo (**Lehmann et al., 2021**).

En la Figura 29 se muestran las formulaciones sólidas del bioinoculante elaboradas con *Enterobacter cloacae* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 a diferentes concentraciones de biochar (0–8 %).

El biochar puro (A y G) se distingue por su color negro intenso, atribuible a su alto contenido de carbono aromático recalcitrante. En contraste, las formulaciones control sin biochar (B y H) presentaron un color blanco uniforme y textura fina, características propias de la matriz portadora sin la incorporación del material carbonoso.

A medida que se incrementó la concentración de biochar (C–F para G50-78 e I–L para LAD-07), las mezclas adquirieron tonalidades grisáceas de mayor intensidad, evidenciando la incorporación progresiva del biochar en la matriz sólida.

Se observaron también diferencias entre cepas: en las formulaciones con *E. cloacae* G50-78 (B–F) predominó una textura más homogénea y pulverulenta, mientras que en las formulaciones con *P. polymyxa* LAD-07 (H–L) se apreció una mayor heterogeneidad superficial y ligera granularidad, probablemente asociada a la capacidad de esta bacteria Gram positiva de formar estructuras más estables y resistentes en la matriz sólida. Estas variaciones en el aspecto físico son relevantes, ya que parámetros como la homogeneidad, el color y la granulometría del bioinoculante pueden influir directamente en su facilidad de aplicación, dispersión en el suelo y estabilidad microbiana durante el almacenamiento y uso en condiciones de vivero o campo.

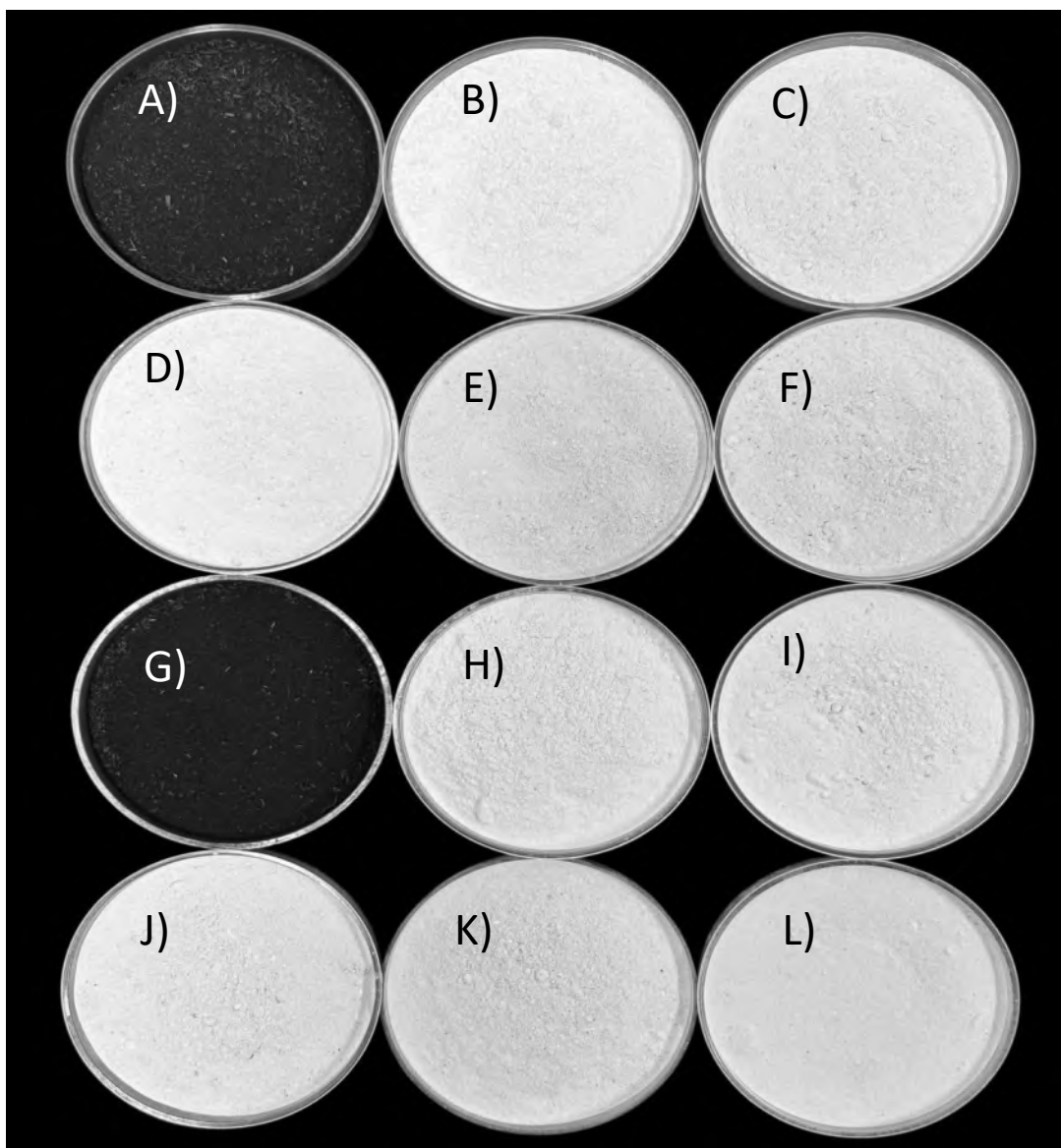


Figura 29. Formulaciones sólidas de bioinoculante elaboradas con *Enterobacter cloacae* G50-78 (B–F) y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 (H–L) con diferentes concentraciones de biochar (0–8 %). A y G corresponden al biochar puro. Se observa el cambio progresivo en la tonalidad y textura conforme aumenta la proporción de biochar en la formulación.

7.5.2 Descripción del bioinoculante control (0 % biochar)

La formulación sólida de bioinoculante sin adición de biochar (0 %) (tabla 5) presentó un pH cercano a la neutralidad (7.05), lo que favorece la disponibilidad de la mayoría de los nutrientes esenciales para las plantas y constituye un rango óptimo para el establecimiento microbiano **(Zhu et al., 2017)**. La conductividad eléctrica (2.45 mS/cm) indicó una concentración moderada de sales solubles, adecuada para cultivos en condiciones de vivero, sin riesgo de toxicidad salina **(Munns & Tester, 2008)**.

El contenido de materia orgánica (34.07 %) fue relativamente elevado, contribuyendo a mejorar la fertilidad del sustrato y proporcionando una fuente energética para los microorganismos inoculados **(Lal, 2020)**. Desde el punto de vista físico, la textura arcillosa (68.68 % de arcilla, 20 % limo y 11.32 % arena) y la baja densidad aparente (0.20 g/cm³) sugieren un material compacto, con alta capacidad de retención de agua, pero con limitaciones en aireación, lo que puede restringir el crecimiento radicular y la movilidad microbiana **(Six et al., 2004)**.

En cuanto a la disponibilidad de nutrientes, se detectaron 27.43 mg/kg de nitrógeno nítrico, además de concentraciones considerables de calcio (3,677.27 mg/kg), magnesio (609.04 mg/kg) y potasio (244.02 mg/kg), elementos esenciales para la nutrición vegetal. La capacidad de intercambio catiónico (30.52 cmol/kg) reflejó un potencial adecuado de retención y liberación de nutrientes, aunque inferior al observado en formulaciones con biochar. Asimismo, los contenidos de micronutrientes como hierro (21.86 mg/kg), zinc (3.31 mg/kg) y manganeso (14.19 mg/kg) se encontraron en rangos que pueden considerarse suficientes para el desarrollo vegetal **(Fageria et al., 2011)**.

En conjunto, el bioinoculante control sin biochar constituye una base con características fisicoquímicas adecuadas para el crecimiento microbiano y el soporte vegetal. Sin embargo, su textura compacta y menor capacidad estructural sugieren limitaciones frente a formulaciones con biochar, las cuales tienden a mejorar la porosidad, aireación y estabilidad microbiana.

Tabla 6. Análisis físico-químico de la formulación control (0% biochar)

Parámetros físicos	Resultado	Unidades
pH (1:2 agua destilada)	7.05	NA
Conductividad eléctrica	2.45	mS/cm
Materia orgánica	34.07	%
Textura (triangulo de texturas)	Arcilla	NA
Arcilla	68.68	%
Arena	11.32	%
Limo	20.00	%
Densidad de suelo aparente	0.20	g/cm ³
Nitrógeno nítrico	27.43	mg/kg
Aniones (-)	Resultado	Unidades
Carbonatos (CO ₃) ⁻²	0.00	mg/L
Bicarbonatos (HCO ₃) ⁻	1558.78	mg/L
Cloruros (Cl ⁻)	184.31	mg/L
Azufre (S)	105.35	mg/L
Fósforo Bray	64.04	mg/L
Cationes (+)	mg/kg	cmol/kg
Sodio (Na ⁺)	1,502.87	6.538
Potasio (K ⁺)	244.02	0.624
Calcio (Ca ²⁺)	3,677.27	18.351
Magnesio (Mg ²⁺)	609.04	5.012
Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	30.524	-
Microelementos	Resultado	Unidades
Hierro (Fe ²⁺)	21.86	mg/kg
Zinc (Zn ²⁺)	3.31	mg/kg
Cobre (Cu ²⁺)	11.37	mg/kg
Manganeso (Mn ²⁺)	14.19	mg/kg
Boro (B ³⁺)	4.18	mg/kg

Tabla 7. Análisis físico-químico de la formulación 4% biochar

Parámetros físicos	Resultado	Unidades
pH (1:2 agua destilada)	7.85	NA
Conductividad eléctrica	2.02	mS/cm
Materia orgánica	34.44	%
Textura (triangulo de texturas)	Franco arcilloso	NA
Arcilla	34.68	%
Arena	19.32	%
Limo	46.00	%
Densidad de suelo aparente	0.22	g/cm ³
Nitrógeno nítrico	20.82	mg/kg
Aniones (-)	Resultado	Unidades
Carbonatos (CO ₃) ⁻²	0.00	mg/L
Bicarbonatos (HCO ₃) ⁻	1125.78	mg/L
Cloruros (Cl ⁻)	249.07	mg/L
Azufre (S)	45.15	mg/L
Fósforo Bray	23.71	mg/L
Cationes (+)	mg/kg	cmol/kg
Sodio (Na ⁺)	1,492.01	6.649
Potasio (K ⁺)	565.75	1.447
Calcio (Ca ²⁺)	4,668.92	23.299
Magnesio (Mg ²⁺)	740.19	6.091
Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	37.327	-
Microelementos	Resultado	Unidades
Hierro (Fe ²⁺)	45.52	mg/kg
Zinc (Zn ²⁺)	3.35	mg/kg
Cobre (Cu ²⁺)	29.44	mg/kg
Manganeso (Mn ²⁺)	15.32	mg/kg
Boro (B ³⁺)	5.70	mg/kg

Desde el punto de vista fisicoquímico, el bioinoculante con 6 % de biochar mostró un pH ligeramente alcalino (7.85) y una conductividad eléctrica de 2.45 mS/cm, lo que indica una adecuada disponibilidad de sales solubles para las plantas, sin llegar a niveles de toxicidad. El contenido de materia orgánica fue de 37.73 %, valor superior al del control, evidenciando que el biochar contribuye a mejorar la fracción orgánica de la formulación, lo que podría favorecer tanto la retención de nutrientes como la estabilidad microbiana.

La densidad aparente fue de 0.22 g/cm³, lo que refleja un material ligero y con buena aireación, características benéficas para el desarrollo de microorganismos y la aplicación en sustratos agrícolas. En cuanto a la disponibilidad de nutrientes, se detectaron 22.79 mg/kg de nitrógeno nítrico, además de una capacidad de intercambio catiónico (CIC) de 27.99 cmol/kg, lo que sugiere una alta capacidad para retener y liberar cationes esenciales como K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺.

En conjunto, la formulación sólida con 6 % de biochar no solo aportó mejores características físicas (textura, densidad, coloración y homogeneidad) sino que también mejoró los parámetros químicos relacionados con la retención de nutrientes y la estabilidad del sistema, lo que la convierte en una opción prometedora para mantener la viabilidad de las bacterias inoculadas y potenciar su efecto promotor de crecimiento en plantas.

Tabla 8. Análisis físico-químico de la formulación 6% biochar

Parámetros físicos	Resultado	Unidades
pH (1:2 agua destilada)	7.85	NA
Conductividad eléctrica	2.45	mS/cm
Materia orgánica	37.73	%
Textura (triangulo de texturas)	Arcilla	NA
Arcilla	48.68	%
Arena	15.32	%
Limo	36.00	%
Densidad de suelo aparente	0.22	g/cm ³
Nitrógeno nítrico	22.79	mg/kg
Aniones (-)	Resultado	Unidades
Carbonatos (CO ₃) ⁻²	0.00	mg/L
Bicarbonatos (HCO ₃) ⁻	1492.86	mg/L
Cloruros (Cl ⁻)	199.26	mg/L
Azufre (S)	113.89	mg/L
Fósforo Bray	15.96	mg/L
Cationes (+)	mg/kg	cmol/kg
Sodio (Na ⁺)	635.22	9.87
Potasio (K ⁺)	996.80	9.11
Calcio (Ca ²⁺)	3,433.73	61.21
Magnesio (Mg ²⁺)	673.79	19.81
Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	27.992	-
Microelementos	Resultado	Unidades
Hierro (Fe ²⁺)	32.24	mg/kg
Zinc (Zn ²⁺)	1.02	mg/kg
Cobre (Cu ²⁺)	20.84	mg/kg
Manganeso (Mn ²⁺)	16.13	mg/kg
Boro (B ³⁺)	3.79	mg/kg

7.5.3 Comparación de las formulaciones (0 %, 4 % y 6 % de biochar)

La comparación entre las formulaciones de bioinoculantes sólidos revela diferencias significativas en sus propiedades fisicoquímicas, las cuales se relacionan estrechamente con la incorporación progresiva de biochar.

En el caso del control (0 % biochar), se observó un pH cercano a la neutralidad **(7.05)**, adecuado para la mayoría de los cultivos, pero con textura arcillosa y densidad aparente baja (0.20 g/cm^3), que, aunque confiere alta retención de humedad, limita la aireación y puede restringir el desarrollo radicular y la dinámica microbiana en el sustrato **(Six et al., 2004; Zhu et al., 2017)**. Además, presentó un contenido elevado de nutrientes como calcio y magnesio, y una CIC de 30.52 cmol/kg , suficientes para sostener la fertilidad, aunque con limitaciones en cuanto a estabilidad estructural.

Por su parte, la formulación con 4 % de biochar mostró una mejora notable en la estructura y textura del material, presentando una composición franco-arcillosa, con mayor porosidad y aireación respecto al control. Su materia orgánica (34.44 %) se mantuvo elevada y la CIC (37.33 cmol/kg) fue superior a la del 0 %, lo que evidencia que el biochar contribuyó a incrementar la capacidad de retención de cationes como K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} **(Lehmann & Joseph, 2015)**. Estos atributos son relevantes porque favorecen tanto la estabilidad microbiana como la disponibilidad gradual de nutrientes, condiciones óptimas para el establecimiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR).

Finalmente, la formulación con 6 % de biochar presentó un pH ligeramente más alcalino (7.85) y un contenido aún mayor de materia orgánica (37.73 %), además de una CIC de 27.99 cmol/kg y una densidad aparente baja (0.22 g/cm^3). Estos parámetros reflejan un material ligero, con buena aireación y mayor fracción orgánica, aspectos que facilitan la supervivencia de los microorganismos y la capacidad de retención de agua y nutrientes **(Agegnehu et al., 2017)**.

No obstante, la CIC fue ligeramente inferior a la del 4 %, lo que podría estar asociado a la proporción de biochar y a la saturación diferencial de sitios de intercambio catiónico.

En conjunto, la incorporación de biochar al 4 % y 6 % mejoró sustancialmente las características físicas y químicas del bioinoculante respecto al control, confiriendo mayor estabilidad estructural, mejor aireación y una disponibilidad de nutrientes más equilibrada. Mientras que el control (0 %) se caracterizó por ser más compacto y menos favorable para la aireación microbiana, las formulaciones enriquecidas con biochar presentaron propiedades que potencian la viabilidad de las bacterias inoculadas y su eficacia como promotoras del crecimiento vegetal.

Estos resultados coinciden con estudios previos que destacan el papel del biochar como portador microbiano y mejorador del suelo, al incrementar la capacidad de intercambio catiónico, la fracción orgánica y la porosidad del sustrato (**Lehmann & Joseph, 2015; Rajkovich et al., 2012**). Por lo tanto, el uso de biochar en proporciones entre 4 % y 6 % representa una estrategia prometedora para optimizar la formulación de bioinoculantes sólidos con mayor estabilidad y funcionalidad agronómica.

Tabla 9. Comparación de los resultados físico-químicos de las formulaciones 0%, 4% y 6% de biochar

Parámetro	Control (0 % biochar)	4 % biochar	6 % biochar	Interpretación / Comentario
pH	7.05 (neutro)	7.85 (ligeramente alcalino)	7.85 (ligeramente alcalino)	El biochar eleva ligeramente el pH, creando un entorno más estable para las bacterias.
Conductividad eléctrica (mS/cm)	2.45 (media)	2.02 (ligeramente más baja)	2.45 (similar al control)	Nivel moderado; la formulación con 4 % reduce potencial riesgo de salinidad.
Materia orgánica (%)	34.07	34.44	37.73 (más alta)	Todas presentan alto contenido; la de 6 % favorece mayor retención de humedad y nutrientes.
Textura	Arcillosa (68.7 % arcilla)	Franco arcillosa (34.7 % arcilla, 46 % limo)	Arcillosa (48.7 % arcilla)	4 % mejora aireación y porosidad; control y 6 % retienen más agua y nutrientes.
Densidad aparente (g/cm³)	0.20 (muy baja)	0.22 (baja)	0.22 (baja)	Ligereza adecuada para aplicación; facilita manejo y dispersión.
CIC (cmol/kg)	30.52 (alta)	37.33 (mayor)	27.99 (más baja que el control)	4 % biochar potencia capacidad de retención de nutrientes; 6 % reduce ligeramente este potencial.
Sodio (mg/kg)	1,502.9	1,492.0	635.2 (significativamente menor)	Menor sodio en 6 % disminuye riesgo de salinidad.
Potasio (mg/kg)	244.0	565.7	996.8	Incremento notable en formulaciones con biochar; favorece nutrición vegetal y metabólica.
Calcio (mg/kg)	3,677.3	4,668.9	3,433.7	4 % presenta mayor calcio; contribuye a estabilidad del pH y estructura del bioinoculante.

Fósforo Bray (mg/L)	64.0 (mayor)	23.7	15.9 (menor)	El biochar reduce fósforo disponible; se compensa con mejora en otros nutrientes y estructura.
Azufre (mg/L)	105.3	45.1	113.9 (más alto)	Aporta al metabolismo bacteriano y crecimiento vegetal; mayor en control y 6 %.
Microelementos (Fe, Cu, Mn, etc.)	Fe: 21.9, Cu: 11.4, Mn: 14.2, Zn: 3.3, B: 4.2	Fe: 45.5, Cu: 29.4, Mn: 15.3, Zn: 3.3, B: 5.7	Fe: 32.2, Cu: 20.8, Mn: 16.1, Zn: 1.0, B: 3.7	Formulaciones con biochar incrementan microelementos clave, favoreciendo actividad enzimática bacteriana y vegetal.
Observación general	Alto fósforo, buena CIC, pero textura muy arcillosa y más sodio.	Mejor balance textura-nutrientes, mayor CIC y más microelementos.	Más materia orgánica, menos sodio, alto potasio y calcio; pero menor fósforo y CIC.	Las formulaciones con biochar (especialmente 4 %) mejoran equilibrio fisicoquímico; la de 6 % resalta por mayor materia orgánica y menor riesgo de salinidad.

7.6 Análisis microscópico del bioinoculante sólido

7.6.1 Micrografías electrónicas del bioinoculante control (0 % biochar)

Las micrografías electrónicas de barrido (MEB) del bioinoculante control (0 % biochar) (Figura 30) muestran una estructura compacta y con escasa porosidad superficial (A-B). A bajas magnificaciones (50X y 250X) se observa una superficie relativamente homogénea, sin evidencias claras de espacios intersticiales que favorezcan la aireación o la retención de agua. Conforme aumenta la resolución (500X–1000X), se distinguen fragmentos irregulares correspondientes principalmente a partículas minerales y restos de tierra de diatomeas, utilizadas como parte del soporte de la formulación (C-D).

A mayores aumentos (2500X-3500X), se identifican estructuras bien definidas de frústulos de diatomeas, con morfología discoidal y poros distribuidos regularmente en su superficie (E-F). Estas estructuras, con diámetros aproximados de 16–17 μm , aportan cierta microporosidad, aunque de manera limitada frente a lo esperado en un portador con biochar. La ausencia de agregados carbonosos en el control explica la baja aireación y la menor capacidad de retención de agua y nutrientes de esta formulación, en comparación con aquellas enriquecidas con biochar.

En términos funcionales, estas observaciones coinciden con los análisis fisicoquímicos, donde el control mostró una textura arcillosa y compacta, lo que podría restringir la proliferación microbiana y el desempeño del bioinoculante (Lehmann & Joseph, 2015; Zhu et al., 2017).

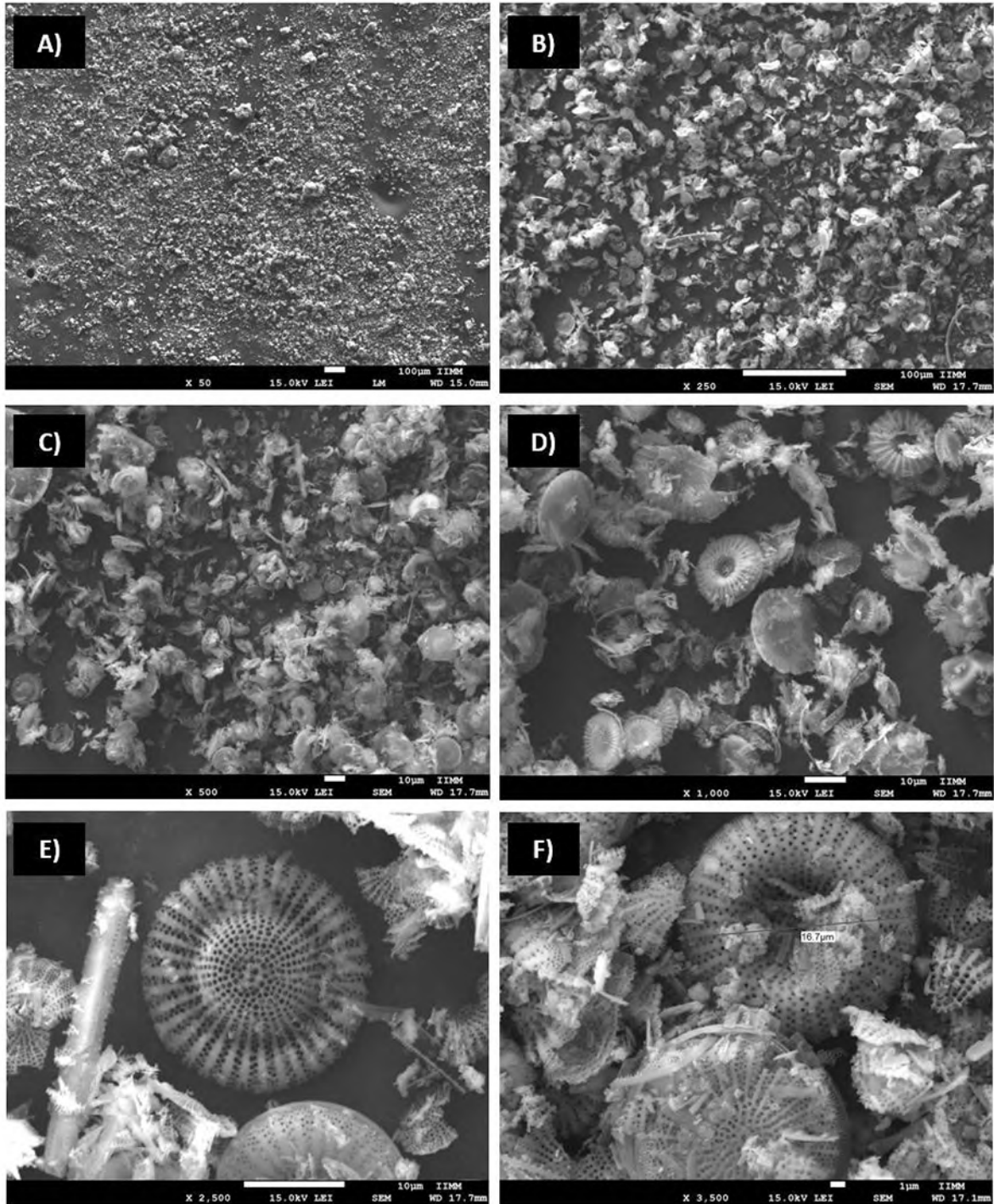


Figura 30. Micrografías electrónicas de barrido del bioinoculante control sin biochar, donde se observa la tierra de diatomeas usada como excipiente. (A)–(B) Vistas panorámicas a 50X y 250X que muestran la distribución heterogénea de partículas silíceas. (C)–(D) A 500X y 1,000X se distinguen fragmentos laminares y frústulos (valvas) con morfología discoidal y ornamentación areolada característica. (E) A 2,500X se aprecia un frústulo íntegro bien conservado. (F) A 3,500X, detalle de un frústulo con diámetro $\approx 18.7 \mu\text{m}$ (línea roja).

7.6.2 Micrografías electrónicas de las cepas *Enterobacter cloacae* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07

Con el fin de contar con una referencia morfológica en cultivo puro de cada cepa y así reconocerlas con certeza en las micrografías del biochar colonizado, se obtuvieron imágenes por microscopía electrónica de barrido (MEB) de *Enterobacter cloacae* G50-78 (Figura 31) y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 (Figura 32). Esta caracterización estableció una “firma” morfológica basada en tamaño celular ($\sim 1\ \mu\text{m}$), relación largo/ancho, contorno y textura superficial, así como en el patrón de agregación (microcolonias, contactos célula–célula). Estos rasgos, contrastados con la morfología angulosa y porosa del biochar, se emplearon como criterios operativos para ubicar y distinguir las bacterias en las micrografías del sistema biochar–bacteria.

En *E. cloacae* G50-78 (Figura 31) se observan bacilos esbeltos de extremos romos, con longitudes del orden de $1.1\text{--}1.3\ \mu\text{m}$ (medición de referencia en 31A $\approx 1.16\ \mu\text{m}$), superficie lisa y alta densidad celular a $5,000\times$; a $10,000\times$ se distinguen células individuales y contactos célula–célula. En *P. polymyxa* LAD-07 (Figura 32) predominan bacilos ligeramente más cortos y robustos, con presencia de diplobacilos y agregados compactos; a $10,000\times$ se aprecia con claridad la separación de células y su organización en microcolonias. En conjunto, estas observaciones sirvieron como control morfológico para la identificación de las células sobre la matriz carbonosa en las micrografías posteriores.

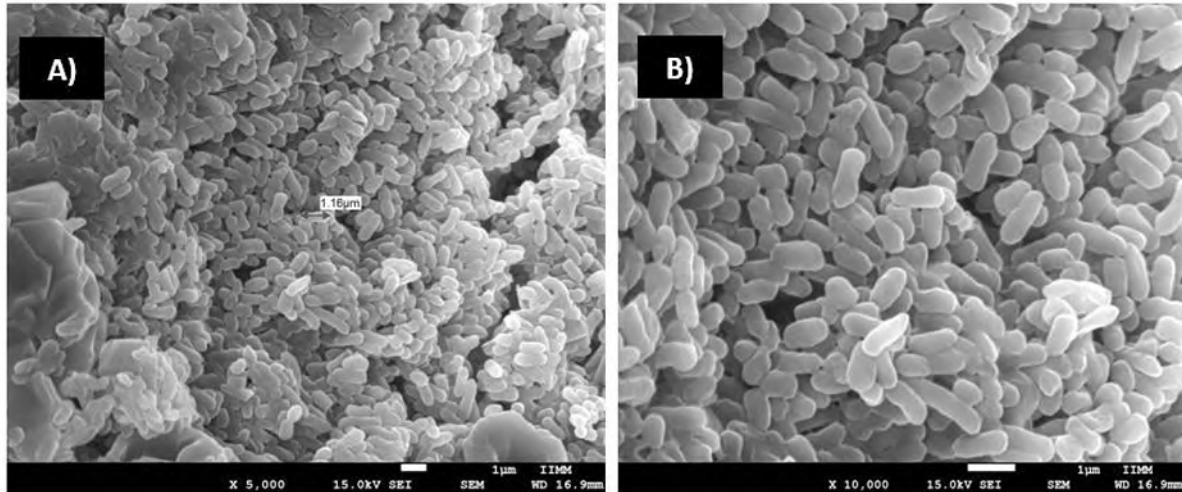


Figura 31. Micrografías electrónicas de barrido de *Enterobacter cloacae* G50-78. (A) 5,000×: campo con alta densidad de bacilos de extremos romos; la flecha indica una longitud celular de $\sim 1.16 \mu\text{m}$. (B) 10,000×: detalle de células individuales y contactos célula-célula. Condiciones de adquisición: 15 kV; barra de escala = $1 \mu\text{m}$; WD $\approx 16.9 \text{ mm}$.

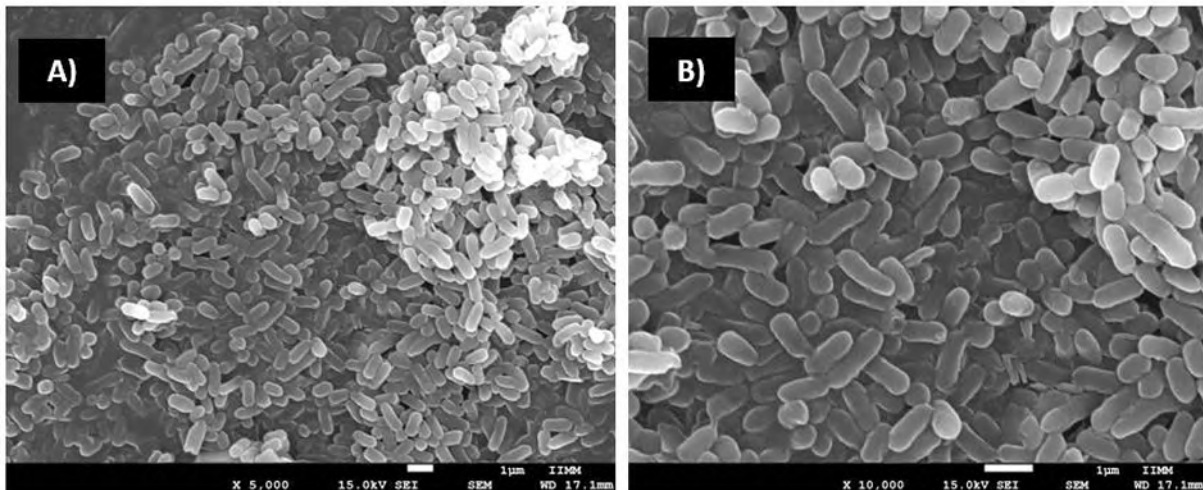


Figura 32. Micrografías electrónicas de barrido de *Paenibacillus polymyxa* LAD-07. (A) 5,000×: agregados celulares formando microcolonias. (B) 10,000×: bacilos cortos y ligeramente más robustos, con presencia de diplobacilos. Condiciones de adquisición: 15 kV; barra de escala = $1 \mu\text{m}$; WD $\approx 17.1 \text{ mm}$.

7.6.3 Micrografías electrónicas del bioinoculante con 4 % de biochar

Las micrografías electrónicas del bioinoculante con 4 % de biochar (Figura 34) muestran una arquitectura laminar y porosa típica de materiales carbonosos pirolizados. A bajas magnificaciones (A-B) se observan superficies estratificadas con cavidades interlaminares y acumulación de partículas minerales/-orgánicas. Con mayores aumentos (C-D) se distinguen microgrietas y poros de tamaño heterogéneo, que constituyen nichos de resguardo frente a desecación y limitación de nutrientes.

En alta resolución (E-F) se identifican bacilos (~1–2 μm) firmemente adheridas a la matriz, con agregación en microcolonias y, de forma puntual, posibles depósitos poliméricos (EPS). La morfología celular coincide con la morfología establecida en cultivo puro (Figuras 31 y 32), lo que respalda su correcta identificación sobre la superficie carbonosa. En conjunto, la microestructura del biochar (alta área superficial, porosidad y grupos funcionales oxigenados) favorece el anclaje, la retención de humedad y metabolitos, y la persistencia/actividad de las cepas benéficas, en concordancia con lo reportado previamente (**Gao et al., 2020; Sun et al., 2021; Lehmann et al., 2011; Xu et al., 2020**).

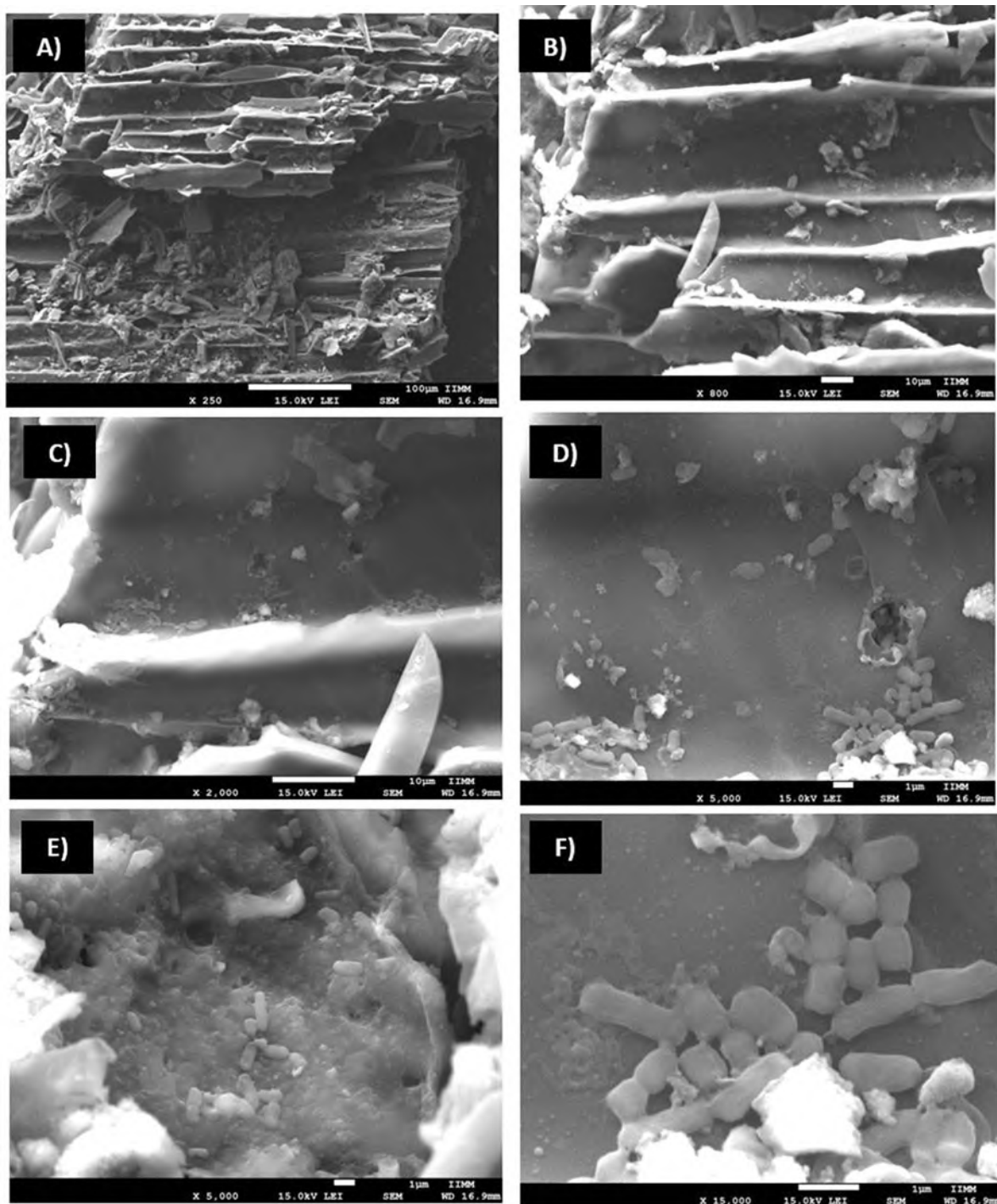


Figura 33. Micrograffías electrónicas de barrido del bioinoculante con 4 % de biochar. (A) 250X y (B) 800X: superficies laminadas con cavidades interconectadas. (C) 2,000X y (D) 5,000X: microgrietas y poros distribuidos heterogéneamente en la matriz carbonosa. (E) 5,000X: zona porosa con material particulado y células adheridas. (F) 15,000X: bacilos (~1-2 μm) formando microcolonias; se aprecian puentes/depósitos compatibles con EPS. Condiciones de adquisición: 15 kV; la barra de escala se indica en cada panel; WD $\approx$ 16.9-17.7 mm. Estas imágenes sustentan el rol del biochar como microhábitat que facilita el anclaje y la supervivencia bacteriana.

7.6.4 Micrografías electrónicas del bioinoculante con 6 % de biochar

Las micrografías electrónicas de barrido (MEB) del bioinoculante sólido con 6 % de biochar (Figura 34) muestran una estructura altamente porosa, con cavidades y superficies irregulares que facilitan la colonización bacteriana (A-C). En contraste con el control (0 %), la matriz presenta una mayor rugosidad y espacios intersticiales, propios del biochar, que incrementan la retención de humedad y la aireación del sistema.

A magnificaciones de 2000-2500X (B-C), se distinguen aglomerados microestructurales formados por la interacción de partículas carbonosas y compuestos minerales, lo que sugiere una superficie heterogénea con múltiples sitios de anclaje. Este efecto coincide con estudios previos donde el biochar actúa como microhábitat protector frente a condiciones de estrés (**Paz-Ferreiro et al., 2014; Lehmann & Joseph, 2015**).

En imágenes de mayor resolución (5000X), se observa claramente la presencia de bacterias adheridas a la superficie del portador (E-F). Las células bacterianas, con morfología bacilar y tamaño promedio de 2 μm , se encuentran distribuidas en colonias sobre las paredes internas de los poros y en zonas de mayor retención de material orgánico. Esto confirma que el biochar no solo proporciona una estructura física favorable, sino que además favorece la persistencia y viabilidad de los microorganismos inoculados, lo cual es crucial para garantizar su función promotora de crecimiento vegetal (**Zhu et al., 2017; Jaiswal et al., 2020**).

En conjunto, las observaciones MEB evidencian que la adición de 6 % de biochar mejora la microestructura del bioinoculante, incrementando la superficie específica y proporcionando nichos de colonización bacteriana, aspectos directamente asociados con la mayor estabilidad y eficiencia funcional observada en esta formulación.

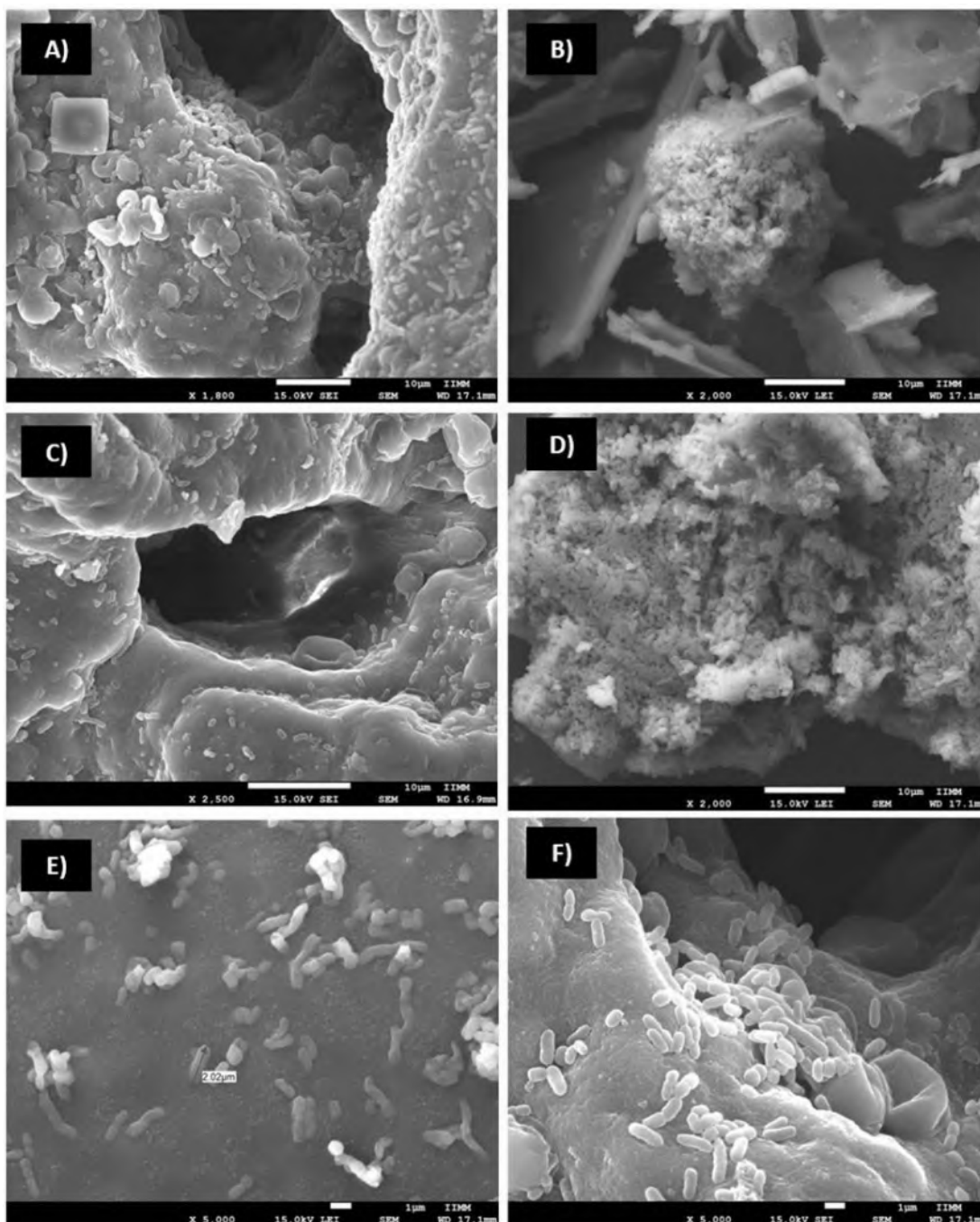


Figura 34. Micrográficas electrónicas de barrido del bioinoculante con 6 % de biochar. (A) 1,800×: pared interna de poro con rugosidad marcada y material amorfo; se observan células bacilares dispersas. (B) 2,000×: microagregado sobre matriz carbonosa con partículas minerales asociadas. (C) 2,500×: cavidad/poro con bordes irregulares aptos para anclaje celular. (D) 2,000×: agregados finos recubriendo la superficie porosa. (E) 5,000×: células bacilares adheridas; flecha indica $\approx 2.03 \mu\text{m}$. (F) 5,000×: microcolonias en borde de poro con indicios de EPS. Condiciones de adquisición: 15 kV; WD $\approx 16.9\text{--}17.7 \text{ mm}$; la barra de escala se muestra en cada panel. Estas imágenes respaldan el rol del biochar como microhábitat que facilita el anclaje y la supervivencia bacteriana.

7.7 Propiedades de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* de *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07 en formulación sólida

7.7.1 Fijación biológica de nitrógeno

Se evaluó la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07 recuperadas de las distintas formulaciones sólidas con biochar (Figura 35).

En la figura A se muestra la cuantificación de nitrógeno fijado por las bacterias cultivadas en medio líquido, comparadas con los controles positivo (*A. brasilense*) y negativo (*E. coli*). *P. polymyxa* LAD-07 presentó aproximadamente 15 % mayor actividad que *E. cloacae* G50-78, y ambas superaron el 50 % de la actividad registrada por el control positivo. En la figura B, se observa la actividad de fijación de nitrógeno de G50-78 recuperada de las formulaciones sólidas, destacando las concentraciones de 6% y 8 % de biochar, que incrementaron la actividad alrededor de 15% respecto al control en medio líquido. Para *P. polymyxa* LAD-07 (figura C), se encontró que concentraciones a partir de 4% de biochar incrementaron la fijación de nitrógeno entre 10% y 15% frente al control en líquido. Finalmente, el análisis de varianza (figura D) evidenció que, para ambas cepas, las formulaciones con 6% y 8% de biochar potenciaron significativamente la actividad de fijación de nitrógeno, siendo *P. polymyxa* LAD-07 la que alcanzó los valores más altos bajo estas condiciones.

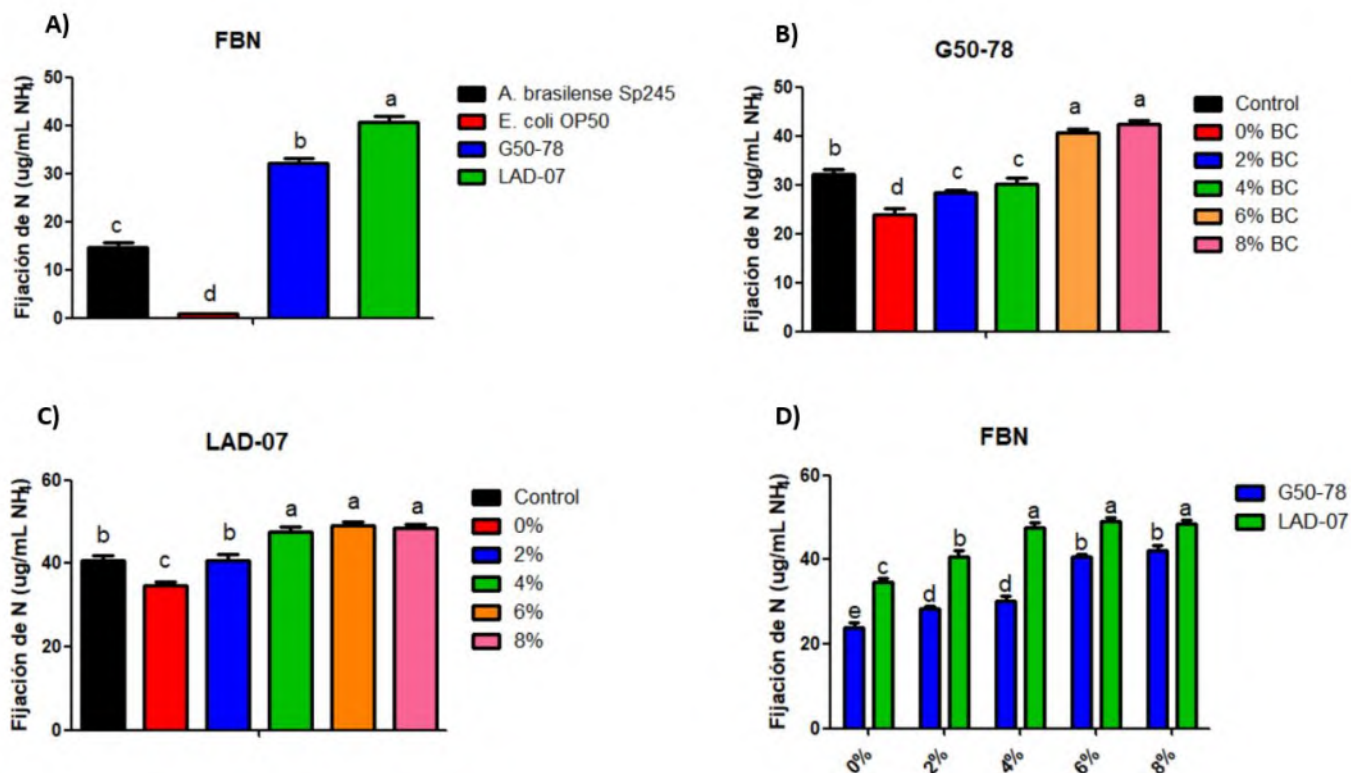


Figura 35. Fijación biológica de nitrógeno (FBN). A) Controles: *A. brasilense* Sp245 (control positivo) *E. coli* OP50 (control negativo) *E. cloacae* G50-78, *P. polymyxa* LAD-07, B) Formulaciones sólidas de *E. cloacae* G50-78 + biochar, C) Formulaciones sólidas de *P. polymyxa* LAD-07 + biochar. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$), ($n=3$).

7.5.2 Solubilización de fósforo

La solubilización de fósforo es uno de los mecanismos clave de promoción del crecimiento vegetal, al incrementar la disponibilidad de este nutriente esencial para las plantas. Por ello, se evaluó esta capacidad en *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07 tras su incorporación en las formulaciones sólidas del bioinoculante (Figura 36).

En la figura A, se observa que *P. polymyxa* LAD-07 presentó un índice de solubilización de fósforo aproximadamente 50% superior al del control positivo (*A. brasilense*) y a *E. cloacae* G50-78 en medio líquido. La figura B muestra el índice de solubilización de fósforo de G50-78 recuperada de las distintas formulaciones sólidas, destacando la formulación con 4 % de biochar, que incrementó la solubilización en aproximadamente 40% respecto a su control en líquido. Para *P. polymyxa* LAD-07 (figura C), las formulaciones con 4 % y 6 % de biochar lograron aumentar el índice de solubilización en torno a 10 % frente al control en líquido. Finalmente, el análisis comparativo entre todos los tratamientos (figura D) indicó que la formulación con 4 % de biochar resultó la más efectiva para mejorar la solubilización de fósforo en ambas cepas.

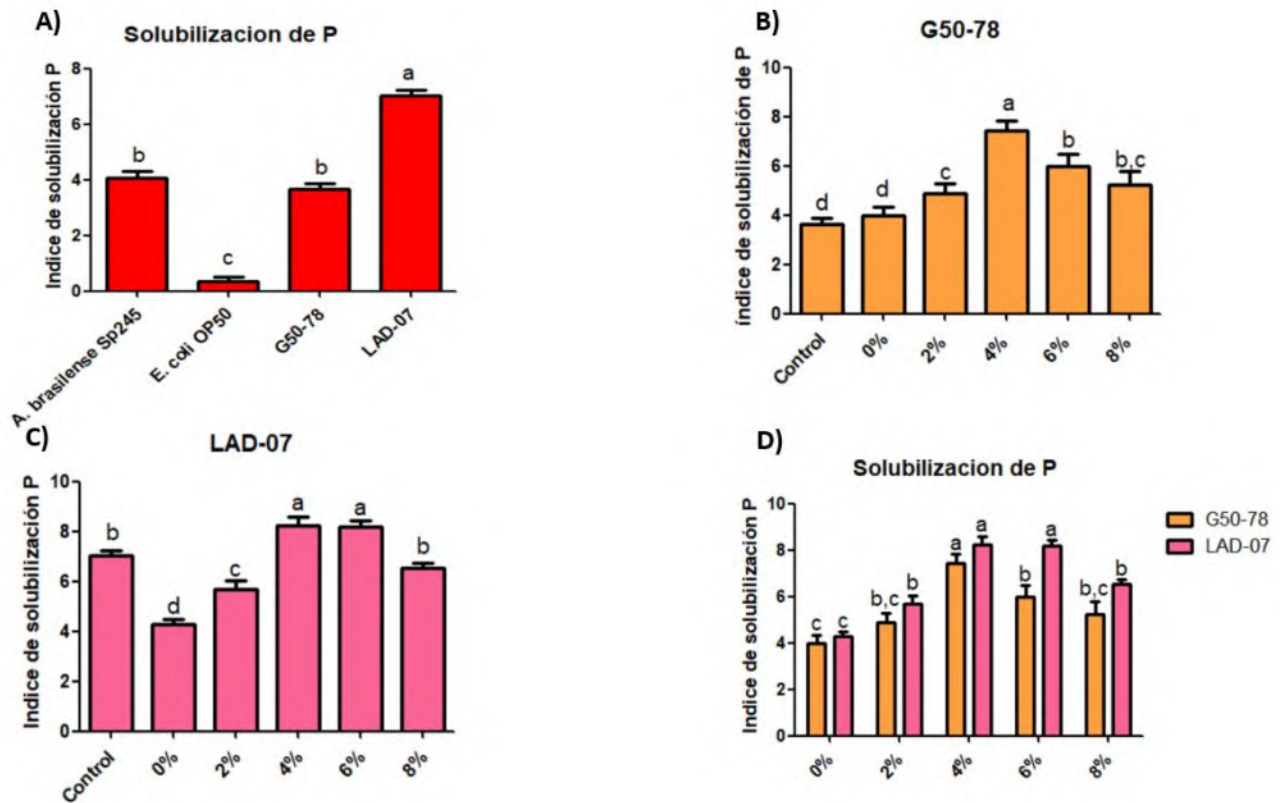


Figura 36. Solubilización de fósforo (P). A) Controles: *A. brasilense* Sp245 (control positivo) *E. coli* OP50 (control negativo) *E. cloacae* G50-78, *P. polymyxa* LAD-07, B) Formulaciones sólidas de *E. cloacae* G50-78 + biochar, C) Formulaciones sólidas de *P. polymyxa* LAD-07 + biochar. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$), ($n=3$).

7.5.3 Solubilización de calcio

En la prueba de solubilización de calcio, *P. polymyxa* LAD-07 presentó el índice de solubilización más alto, superando en aproximadamente 30 % al control positivo y a *E. cloacae* G50-78 (figura 37). En el caso de *E. cloacae* G50-78 recuperada de las formulaciones sólidas, la formulación con 6 % de biochar incrementó significativamente el índice de solubilización de calcio, con un aumento cercano al 60 % respecto a su control en medio líquido (figura B). Por su parte, *P. polymyxa* LAD-07 no mostró incrementos relevantes en el índice de solubilización tras la formulación sólida, manteniéndose en niveles similares al control líquido (figura C). El análisis comparativo (figura D) evidenció que la formulación con 6 % de biochar potenció de forma notable la capacidad de solubilización de calcio de *E. cloacae* G50-78, alcanzando el valor más alto entre todas las formulaciones evaluadas.

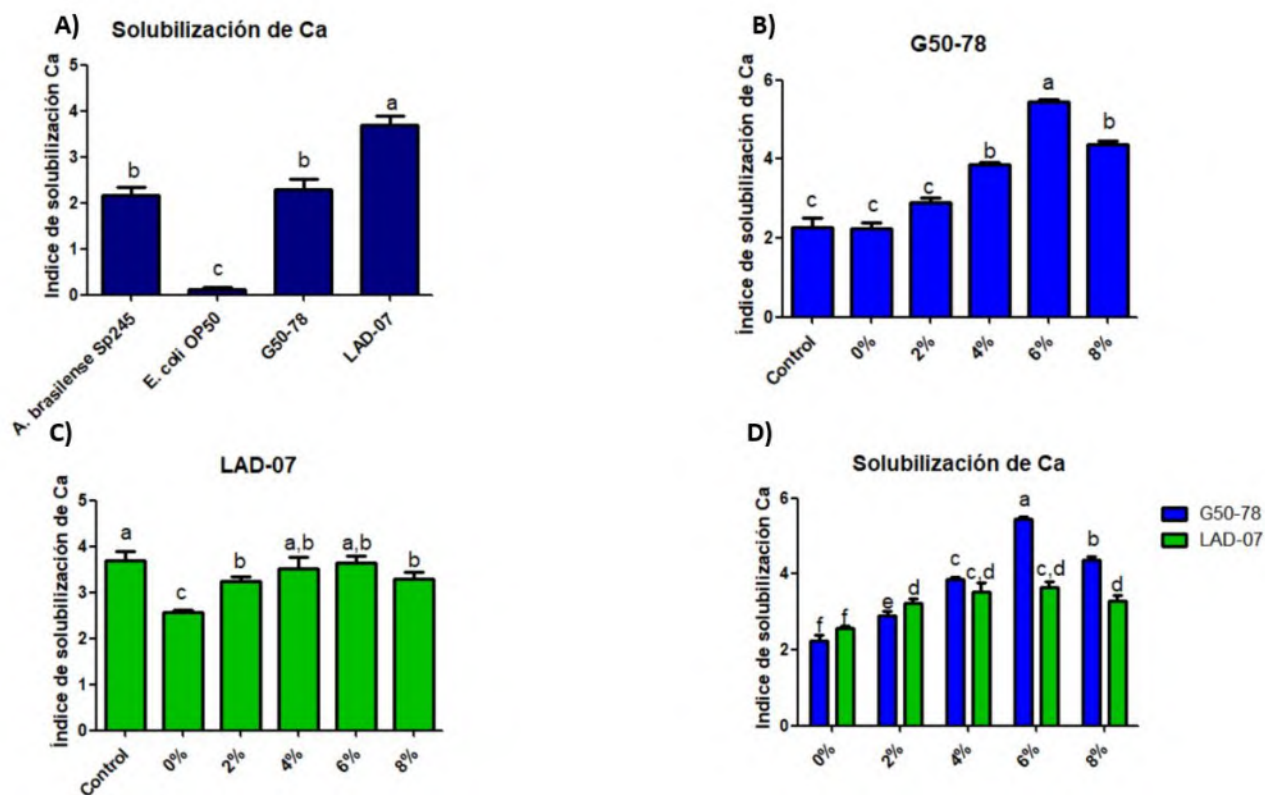


Figura 37. Solubilización de calcio (Ca). A) Controles: *A. brasilense* Sp245 (control positivo) *E. coli* OP50 (control negativo) *E. cloacae* G50-78, *P. polymyxa* LAD-07, B) Formulaciones sólidas de *E. cloacae* G50-78 + biochar, C) Formulaciones sólidas de *P. polymyxa* LAD-07 + biochar.

Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$), ($n=3$).

7.5.4 Producción de AIA

En los ensayos de producción de derivados de ácido indol-3-acético (AIA) (figura 38), *E. cloacae* G50-78 presentó los valores más altos, con incrementos del 60% y 10% respecto al control positivo (*A. brasilense*) y *P. polymyxa* LAD-07 (A). En la (B), *E. cloacae* G50-78 mostró un mayor incremento de producción de AIA en la formulación con 4 % de biochar, alcanzando un 10 % más que su control líquido. Para *P. polymyxa* LAD-07, la formulación con 6 % de biochar potenció la producción de AIA en aproximadamente 30 % sobre el control líquido (C). Finalmente, el análisis comparativo (D) indicó que la formulación con 4 % de biochar aplicada a *E. cloacae* G50-78 generó la mayor concentración de AIA entre todas las combinaciones evaluadas.

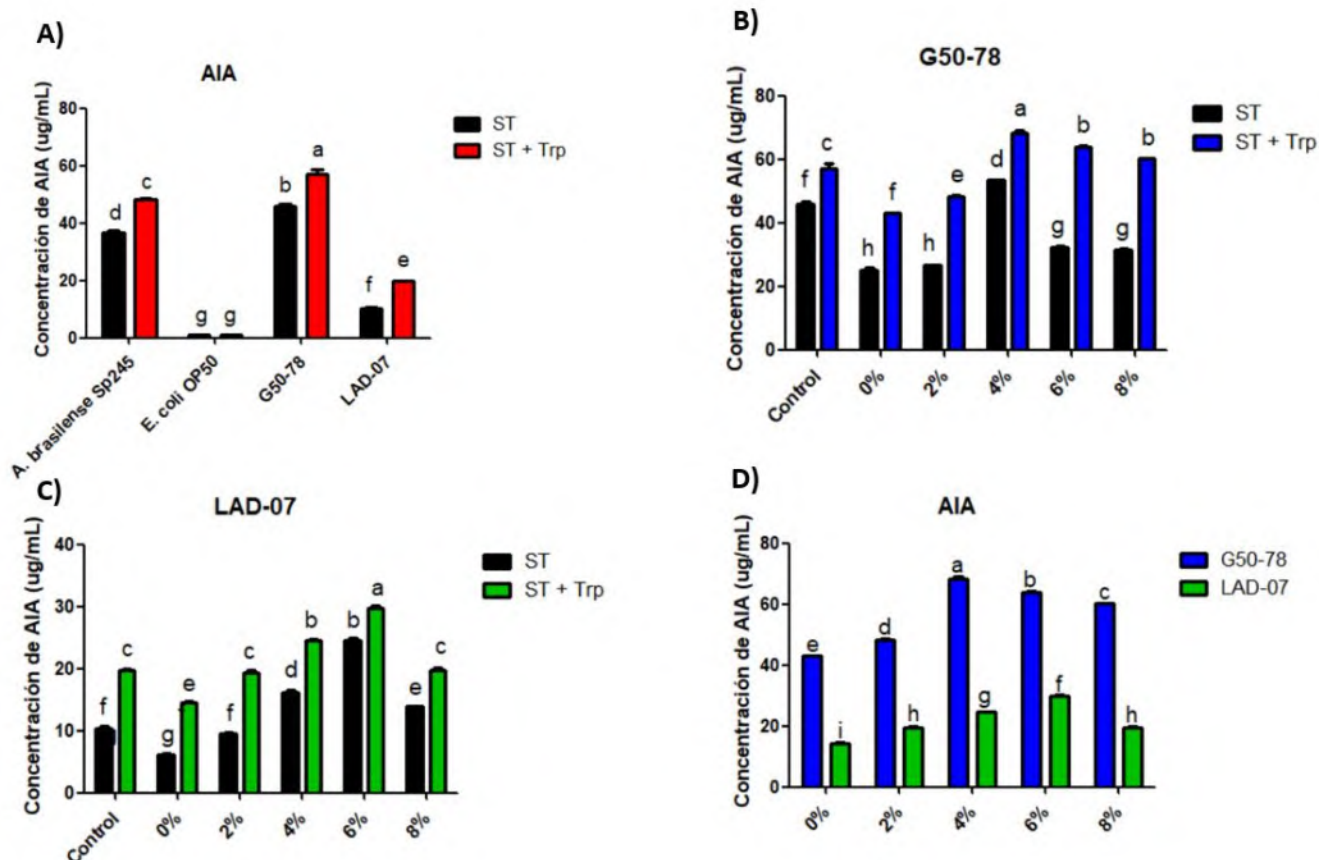


Figura 38. Producción de AIA. A) Controles: *A. brasilense* Sp245 (control positivo) *E. coli* OP50 (control negativo) *E. cloacae* G50-78, *P. polymyxa* LAD-07, con y sin triptófano Trp, B) Formulaciones sólidas de *E. cloacae* G50-78 + biochar, con y sin Trp, C) Formulaciones sólidas de *P. polymyxa* LAD-07 + biochar, con y sin Trp, D) Formulaciones sólidas de *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07, con triptófano Trp. ANOVA de 2 vías, prueba post hoc Bartlett ($P \leq 0.05$). Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$), ($n=3$).

7.6 Evaluar el efecto de las formulaciones sobre la germinación y vigor de plántulas de maíz híbrido h-318 en condiciones de vivero

Posterior a la evaluación de las propiedades de promoción del crecimiento vegetal de las bacterias provenientes de las distintas formulaciones, se prosiguió a evaluar los efectos que tenían cada una de ellas frente a germinación y vigor de semillas de maíz blanco híbrido H-318.

7.6.1 Ensayo de germinación

Los resultados de germinación arrojaron que las mejores formulaciones para ambas bacterias fueron las que contenían 4 y 6 % de biochar, mostrando un 35 % más de germinación respecto al control, como se muestra en la (Figura 39).

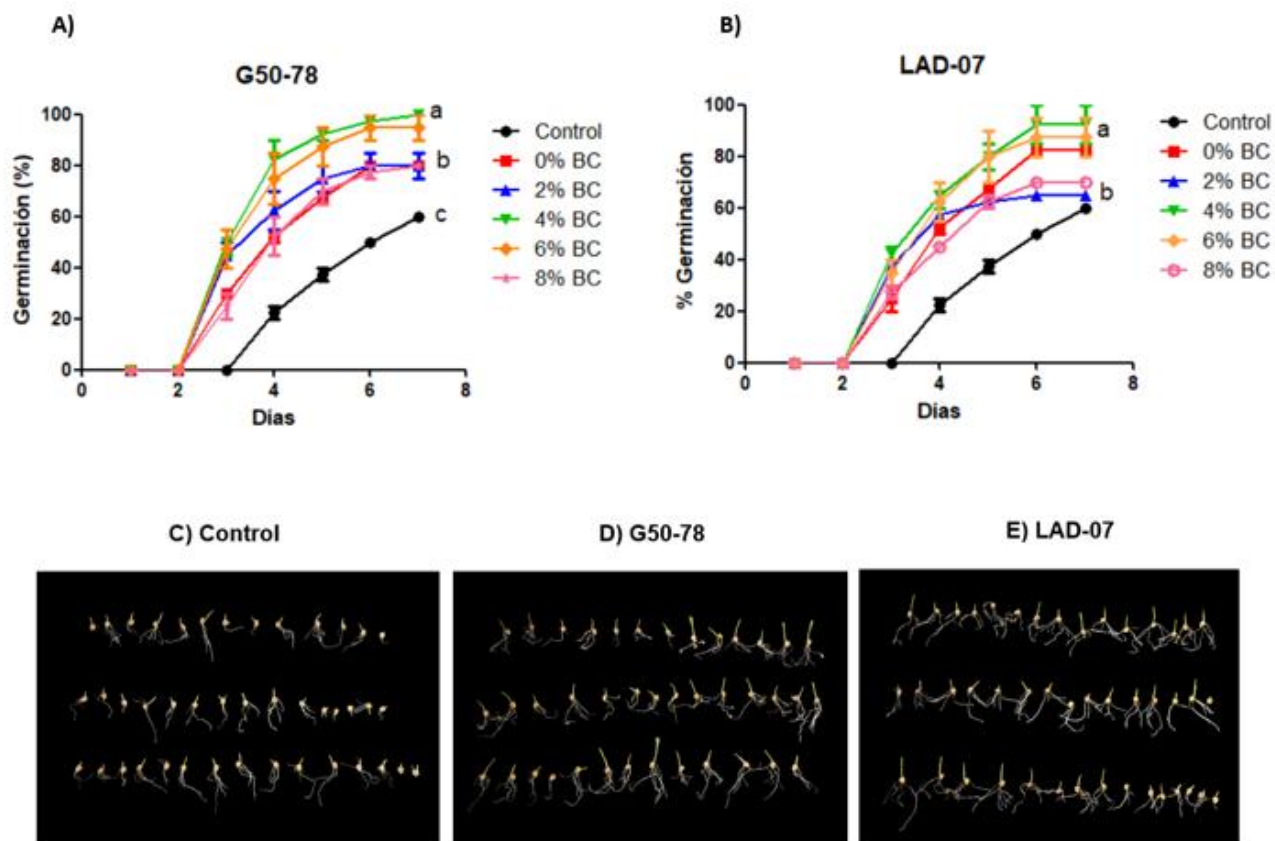


Figura 39. Ensayo de germinación 7DDS. A) Formulaciones sólidas de *E. cloacae* G50-78 + biochar B) Formulaciones sólidas de *P. polymyxa* LAD-07 + biochar C) Tratamiento control D) *E. cloacae* G50-78, E) *P. polymyxa* LAD-07. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$) ($n=45$).

7.6.2 Índices de vigor I Y II

Al analizar los índices de vigor encontramos que tanto en *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07 las formulaciones que presentaron los valores más altos, fueron los que contenían 4 y 6 % tanto para el caso del índice de vigor I (Figura 40) como para el índice de vigor II.

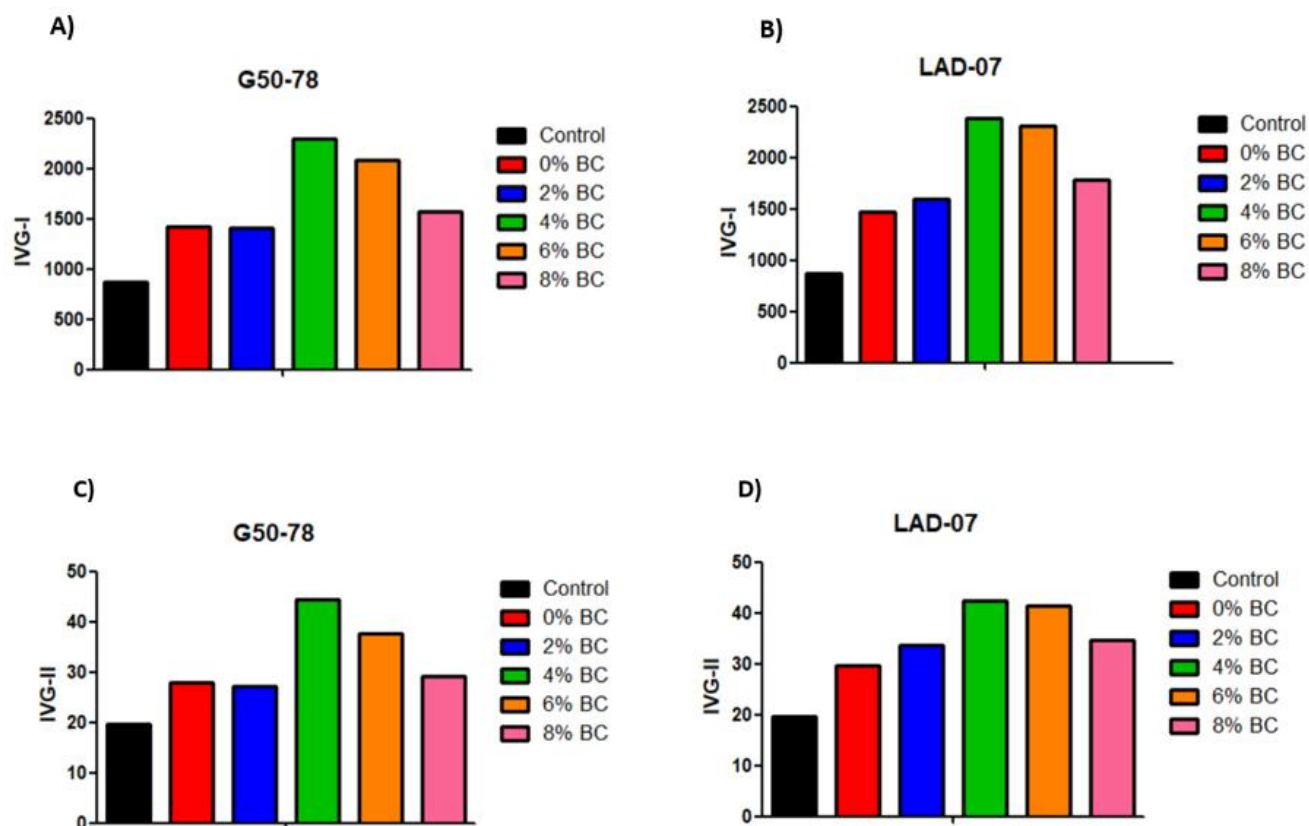


Figura 40. Índices de vigor I y II. A) y D) Formulaciones sólidas de *E. cloacae* G50-78 + biochar B) y C) Formulaciones sólidas de *P. polymyxa* LAD-07 + biochar. (n=15).

Los resultados obtenidos demuestran que las formulaciones sólidas del bioinoculante con biochar como portador fueron efectivas para conservar e incluso potenciar ciertas propiedades funcionales clave en ambas cepas evaluadas, *Enterobacter cloacae* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07, destacando su potencial como bioinoculantes agrícolas sostenibles.

En cuanto a la fijación biológica de nitrógeno (FBN), ambas cepas mostraron una actividad significativa, superando el 50 % del control positivo (*Azospirillum brasilense*), con *P. polymyxa* LAD-07 alcanzando valores aún mayores. Este comportamiento es consistente con estudios previos que destacan la capacidad de cepas de *Paenibacillus* y *Enterobacter* para fijar nitrógeno de manera eficiente en condiciones libres de nitrógeno **(Moreno-Galván et al., 2022)**. Las formulaciones con 6 % y 8 % de biochar incrementaron significativamente esta actividad, lo que puede estar relacionado con la capacidad del biochar para crear un microambiente poroso y rico en carbono que favorece el metabolismo microbiano **(Kammann et al., 2017; Tan et al., 2022)**.

Respecto a la solubilización de fósforo, *P. polymyxa* LAD-07 presentó un rendimiento notable en condiciones líquidas, superando incluso al control positivo. Al ser formulada en biochar, esta capacidad se mantuvo, especialmente con 4 % y 6 % de biochar. Para *E. cloacae* G50-78, la formulación con 4 % fue la más efectiva, elevando el índice de solubilización hasta en un 40 % respecto al control. Esta actividad podría atribuirse a la producción de ácidos orgánicos y enzimas fosfatasas que son estimuladas en presencia de materiales porosos como el biochar **(Chagas et al., 2022; Kumar et al., 2023)**.

La mejora observada concuerda con reportes que indican que el biochar puede actuar no solo como soporte físico, sino también como fuente de minerales y regulador del pH que favorece la actividad enzimática bacteriana **(Lehmann et al., 2020)**.

En el caso de la solubilización de calcio, *P. polymyxa* LAD-07 mantuvo una actividad elevada en todos los tratamientos, mientras que *E. cloacae* G50-78 incrementó significativamente esta capacidad al ser formulada con 6 % de biochar. Esta mejora podría deberse a la capacidad del biochar para estimular mecanismos de secreción de compuestos ácidos por parte de bacterias, los cuales movilizan cationes como el calcio de fuentes insolubles **(Zhao et al., 2021)**. Este hallazgo resalta el potencial del biochar no solo como portador, sino como un componente activo que modula el metabolismo microbiano.

En cuanto a la producción de ácido indolacético (AIA), hormona vegetal clave en la promoción del crecimiento radicular, *E. cloacae* G50-78 fue la cepa con mayor capacidad, destacando en formulación sólida con 4 % de biochar. Por su parte, *P. polymyxa* LAD-07 mostró un incremento importante con 6 % de biochar. Estudios recientes han demostrado que la producción de AIA por bacterias promotoras del crecimiento puede potenciarse en presencia de biochar, debido a su efecto estimulador en la expresión de genes relacionados con la síntesis de fitohormonas **(Saud et al., 2023; Yu et al., 2024)**. Asimismo, el biochar puede actuar como reservorio de triptófano, precursor del AIA, favoreciendo su disponibilidad para las bacterias **(Zhang et al., 2022)**.

En conjunto, los resultados sugieren que las formulaciones con biochar al 4 % y 6 % no solo conservan la viabilidad microbiana, sino que también potencian las funciones clave relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal. Esto refuerza el valor de emplear materiales lignocelulósicos carbonizados como portadores microbianos en bioinoculantes, ya que ofrecen beneficios adicionales a los de una matriz inerte **(Malusá & Vassilev, 2021; Ding et al., 2023)**.

Por lo tanto, el desarrollo de bioinoculantes sólidos con biochar no solo es una estrategia viable para prolongar la funcionalidad de cepas PGPR como *E. cloacae* G50-78 y *P. polymyxa* LAD-07, sino que también representa una alternativa ecológica y eficiente para mejorar la productividad agrícola en suelos empobrecidos o con limitada disponibilidad de nutrientes.

7.7 Evaluación del efecto de las formulaciones sólidas sobre parámetros del desarrollo vegetal de plantas de maíz en condiciones de vivero

Se evaluó el efecto de las diferentes formulaciones sobre los parámetros de desarrollo vegetal en plantas de maíz blanco híbrido H-318 en las etapas vegetativas V3 y V4.

7.7.1 Longitud de las plantas en etapa (V3) *E. cloacae* G50-78

Los resultados de la evaluación de la longitud de la parte aérea de las plantas V3 no mostraron diferencias significativas de las semillas inoculadas con las distintas formulaciones de *E. cloacae* G50-78 como se muestra en la (Figura 41); sin embargo al realizar la evaluación de la longitud de raíz observamos diferencias significativas para el caso de las formulaciones con 8 y 6 % de biochar, obteniendo un incremento del 40 y el 60 % respectivamente siendo este último el mejor tratamiento para este ensayo. Al tiempo de evaluar la longitud total de las plantas observamos que la formulación de 6 % se mantiene como el mejor tratamiento respecto al control con un 30 % de incremento, mientras que los demás tratamientos si presentaron una diferencia respecto al control entre un 10 y 15 % más de longitud total de la planta.

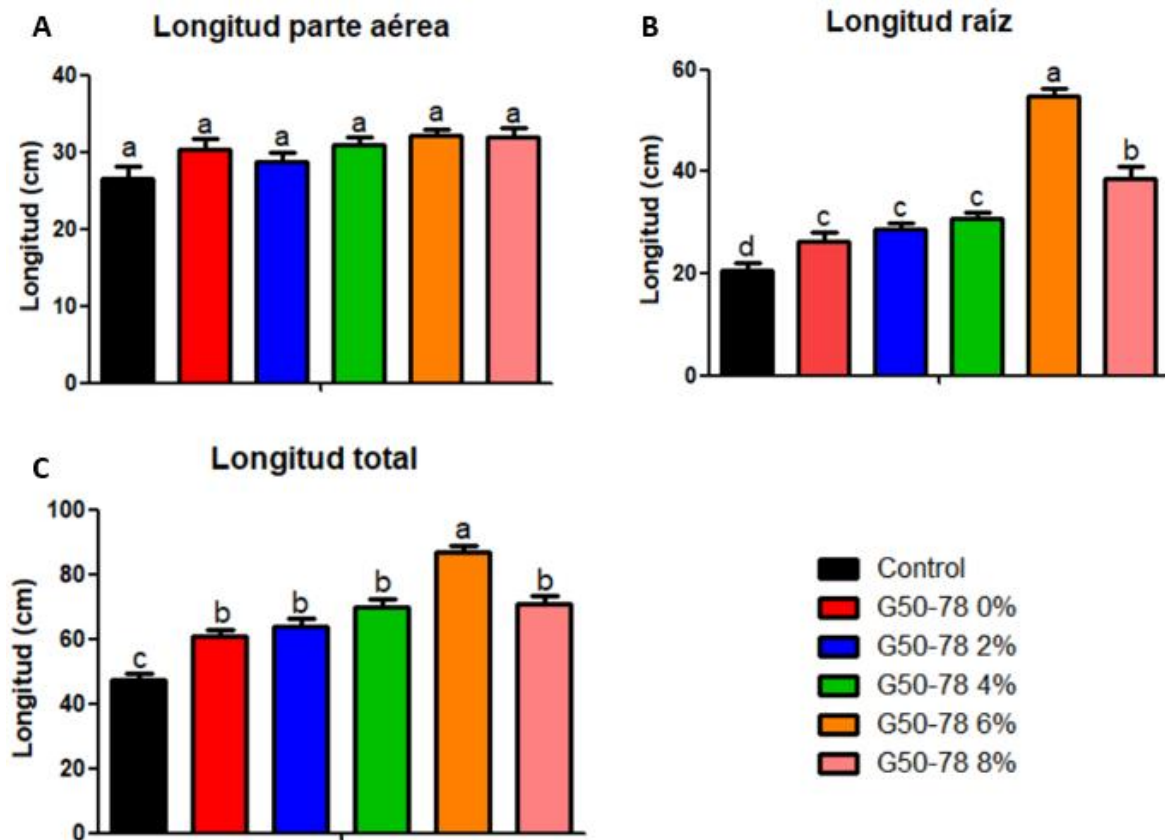


Figura 41. Evaluación de las formulaciones de G50-78 + biochar, sobre la longitud de plantas de maíz (H-318) en condiciones de vivero en etapa V3. A) Longitud de la parte aérea, B) Longitud de la raíz, C) Longitud total. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$) ($n=30$).

7.7.2 Longitud de las plantas en etapa (V3) *P. polymyxa* LAD-07

Para el caso de los tratamientos con *P. polymyxa* LAD-07 en la evaluación de la parte aérea presentaron diferencia estadística frente al control, pero no entre ellos mismos, pero al igual que en el caso anterior al evaluar la longitud de la raíz encontramos que la formulación de 6 % de biochar tuvo una diferencia considerable del 60 % respecto al control, mientras conserva relación con los tratamientos de 2, 4 y 8 % de biochar (Figura 42). Al realizar la evaluación de la longitud total volvemos a observar el mismo efecto que en la parte aérea y todos los tratamientos vuelven a relacionarse entre sí, teniendo diferencia estadística frente al control.

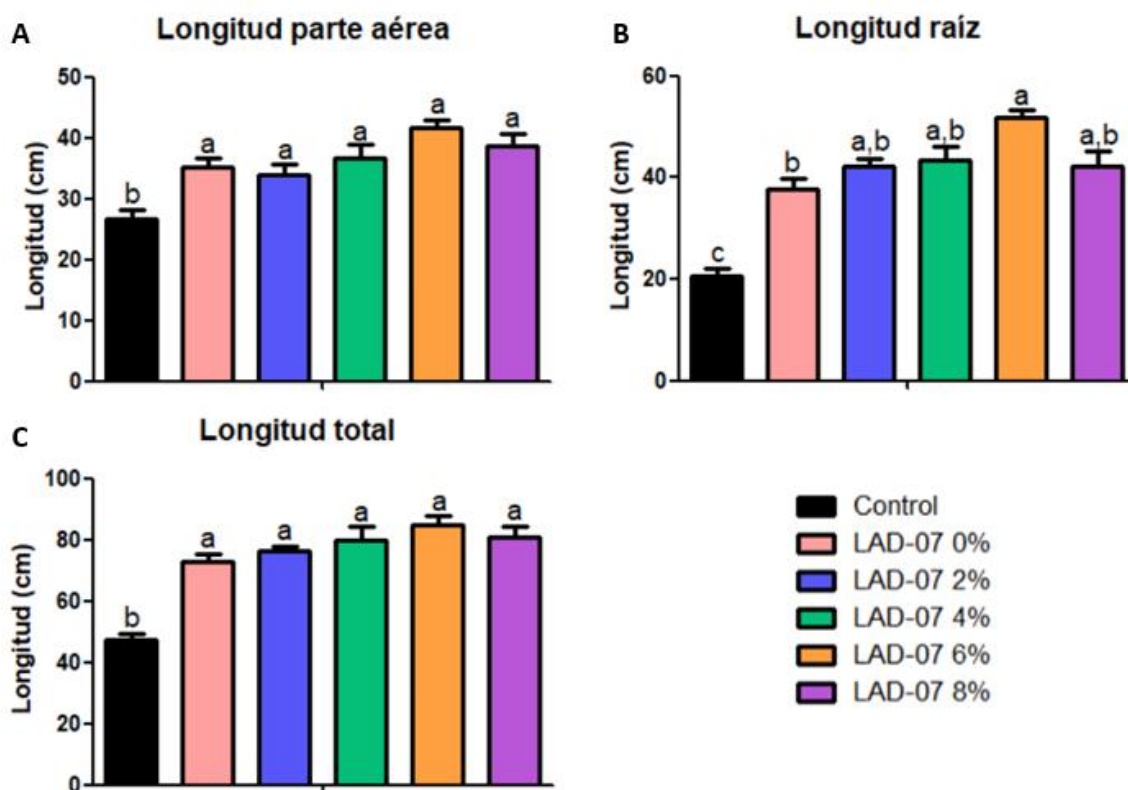


Figura 42. Evaluación de las formulaciones de LAD-07 sobre la longitud de plántulas de maíz en condiciones de vivero hasta etapa V3. A) Longitud de la parte aérea, B) Longitud de la raíz, C) Longitud total. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$) ($n=30$).

7.7.3 Peso fresco de las plantas en etapa (V3) *E. Cloacae* G50-78

La evaluación del peso fresco de la parte aérea mostro un incremento del 20 % de las plantas inoculadas con la formulación de *E. Cloacae* G50-78 con biochar al 6 %, siendo el tratamiento destacable debió a que presenta diferencia estadística frente al control y a las demás formulaciones. Así mismo en ensayo del peso fresco de la raíz esta misma formulación obtuvo un 30 % de diferencia frente al control, seguido de la formulación líquida que solo contiene a la bacteria con 25 % de diferencia frente al control (Figura 43).

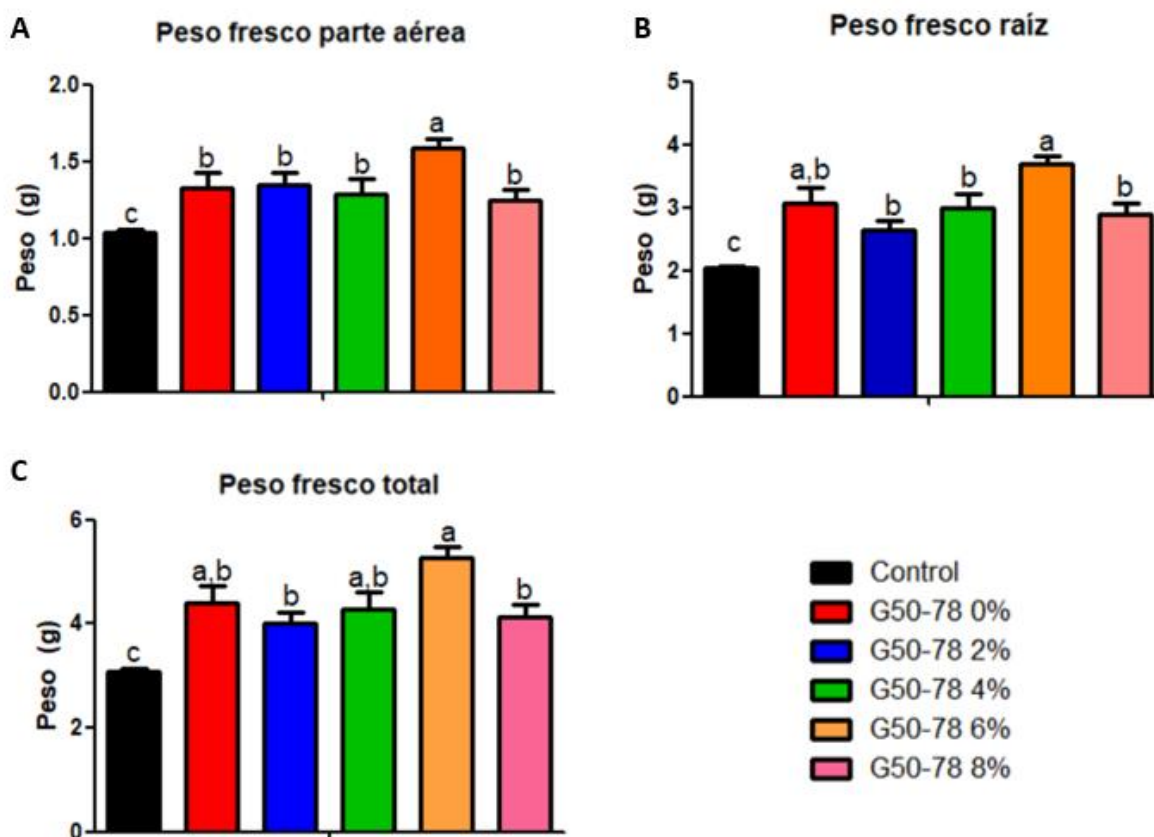


Figura 43. Evaluación de las formulaciones DE G50-78 sobre el peso fresco de plántulas de maíz en condiciones de vivero hasta etapa V3. A) Peso fresco parte aérea, B) Peso fresco raíz, C) Peso fresco total. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$) ($n=30$).

7.7.4 Peso fresco de las plantas en etapa (V3) *P. polymyxa* LAD-07

Mientras que para las formulaciones de *P. polymyxa* LAD-07 (Figura 44) observamos que el control líquido conserva una relación directa con la formulación de 6 % de biochar con un 30 % de incremento respecto al control, seguidos por el 2 y 8 % de biochar con los que conservan una relación (A). En el peso fresco de la raíz esta relación se conserva, aunque el valor más alto lo presenta el control líquido teniendo una diferencia estadística con todos los tratamientos (B). Sin embargo, al evaluar el peso fresco total todos los tratamientos muestran diferencia estadística frente al control, pero no entre ellos (C). Por lo que podemos comentar que a etapas tempranas no se reflejan grandes cambios en las plantas de maíz blanco híbrido.

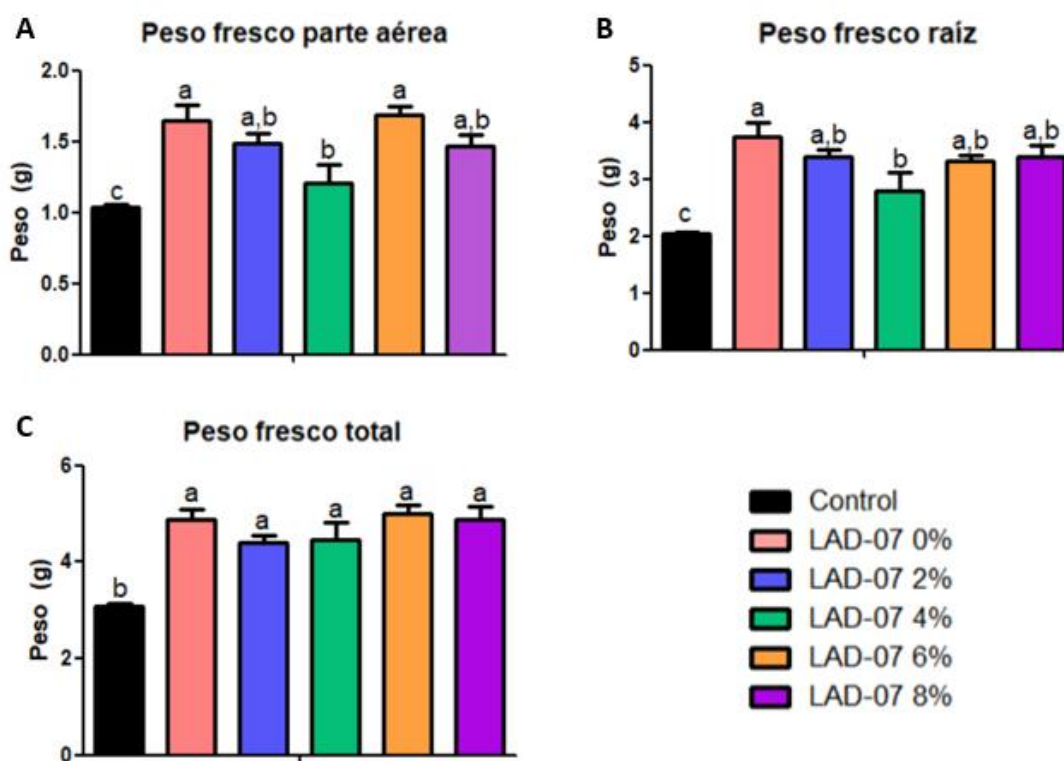


Figura 44. Evaluación de las formulaciones de LAD-07 sobre el peso fresco de plántulas de maíz en condiciones de vivero hasta etapa V3. A) Peso fresco parte aérea, B) Peso fresco raíz, C) Peso fresco total. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$) ($n=30$).

7.7.5 Peso seco de las plantas en etapa (V3) *E. Cloacae* G50-78

El ensayo del peso seco para las formulaciones de *E. Cloacae* G50-78 muestra una relación entre todos los tratamientos con diferencias estadísticas entre la formulación del 6 % y la del 8 %, mientras que todos presentan diferencias frente al control como se muestra en la (Figura 45) (A). Respecto al peso seco de la raíz la formulación 6 % presenta diferencias estadísticas con los tratamientos de 2 y 8 %, además de presentar la mayor diferencia frente al control con un 50 % de incremento (B). Sin embargo, al evaluar el peso seco total observamos que no hay diferencia entre los tratamientos, aunque si presentan una diferencia frente al control (C).

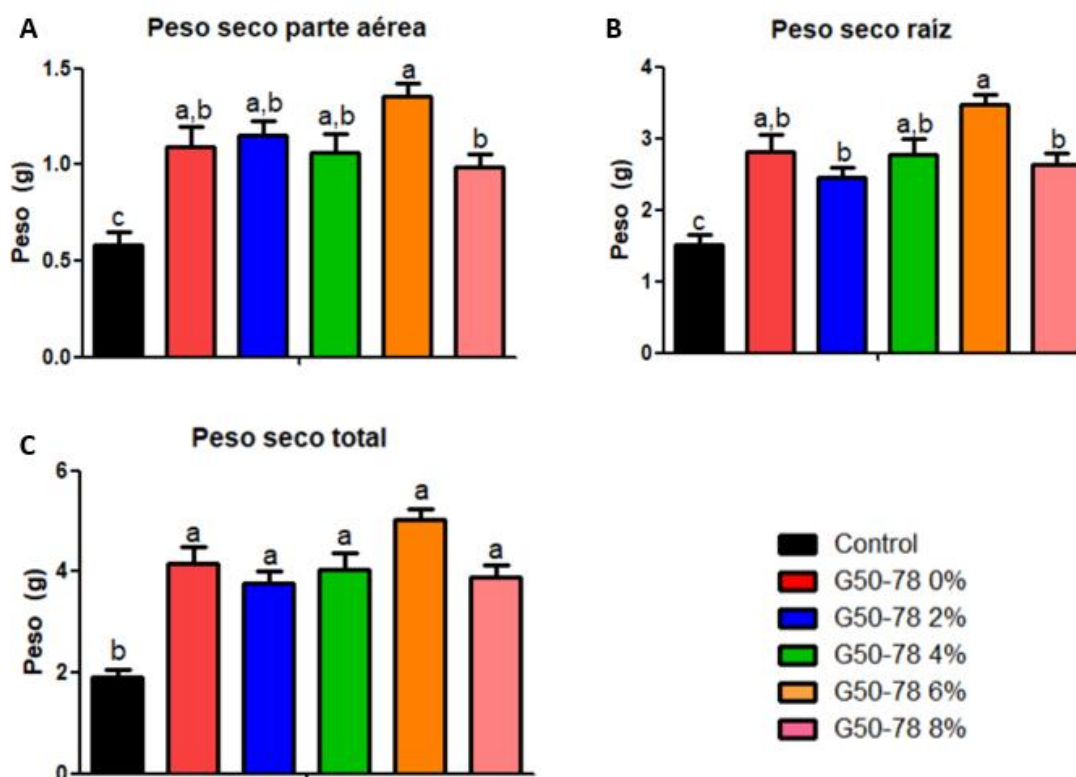


Figura 45. Evaluación de las formulaciones sobre el peso seco de plántulas de maíz en condiciones de vivero hasta etapa V3. A) Peso seco parte aérea, B) Peso seco raíz, C) Peso seco total. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$) ($n=30$)

7.7.6 Peso seco de las plantas en etapa (V3) *P. polymyxa* LAD-07

Los resultados del peso seco obtenidos a partir de las formulaciones de LAD-07, presentan diferencia estadística frente al control siendo la formulación de biochar 4 % la más cercana a este como se muestra en la Figura 46. (A) En el peso seco de la raíz se observa el mismo comportamiento (B), al igual que la evaluación del peso seco total (C) por lo que podemos comentar como en el ensayo anterior, que lo más probable es que en etapas tempranas de crecimiento de la planta no se muestren diferencias notables entre los tratamientos.

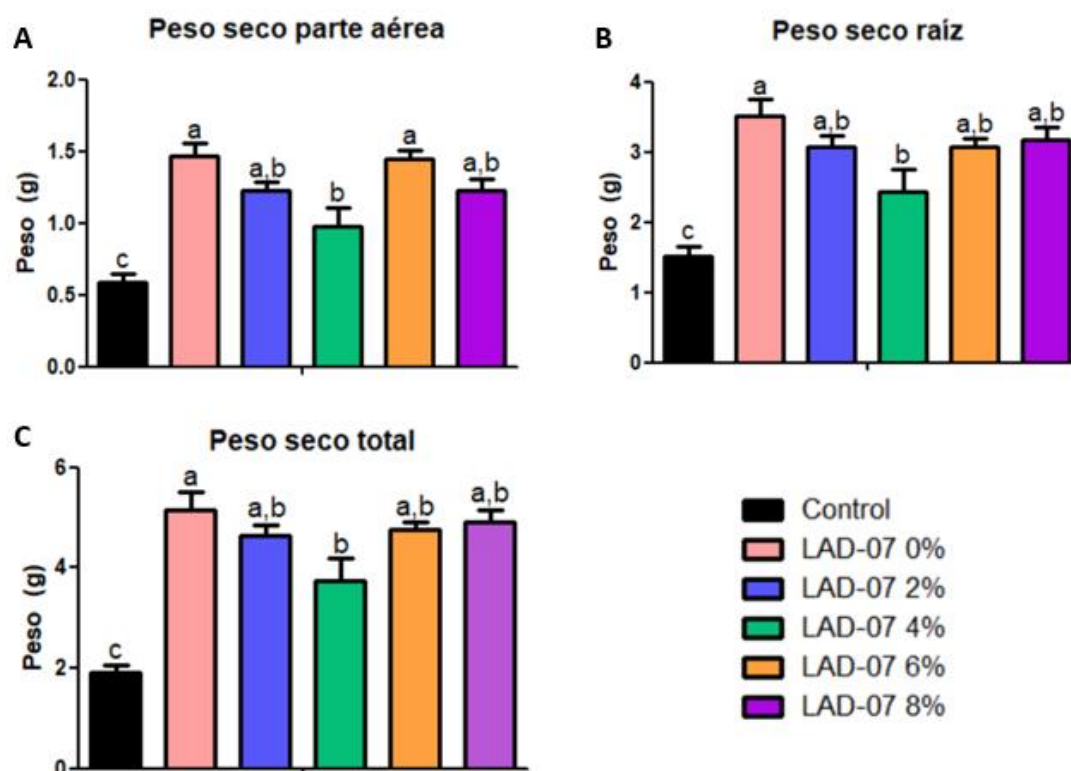


Figura 46. Evaluación de las formulaciones sobre el peso seco de plántulas de maíz en condiciones de vivero hasta etapa V3. A) Peso seco parte aérea, B) Peso seco raíz, C) Peso seco total. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$) ($n=30$).

7.7.7 Longitud de plantas en etapa (V4) *E. Cloacae* G50-78

Se realizó la evaluación de la longitud de plantas de maíz blanco a los 22 DDS alcanzando su etapa vegetativa V4. Para el caso de las formulaciones de *E. Cloacae* G50-78 (Figura 47) los resultados mostraron un aumento del 45% de la longitud de la parte aérea de las plantas para la formulación con el 6% de biochar y de un 30 % para la concentración de 4%, siendo los resultados más destacados para este parámetro (A). En el panel (B) podemos observar que las formulaciones 4 % y 6% vuelven a alzarse por encima del control con un 50 y 55 % respectivamente, por lo que en la longitud de la planta estos tratamientos son los que se consolidan como los que desarrollaron la mayor longitud de las plantas en esta etapa vegetativa (C).

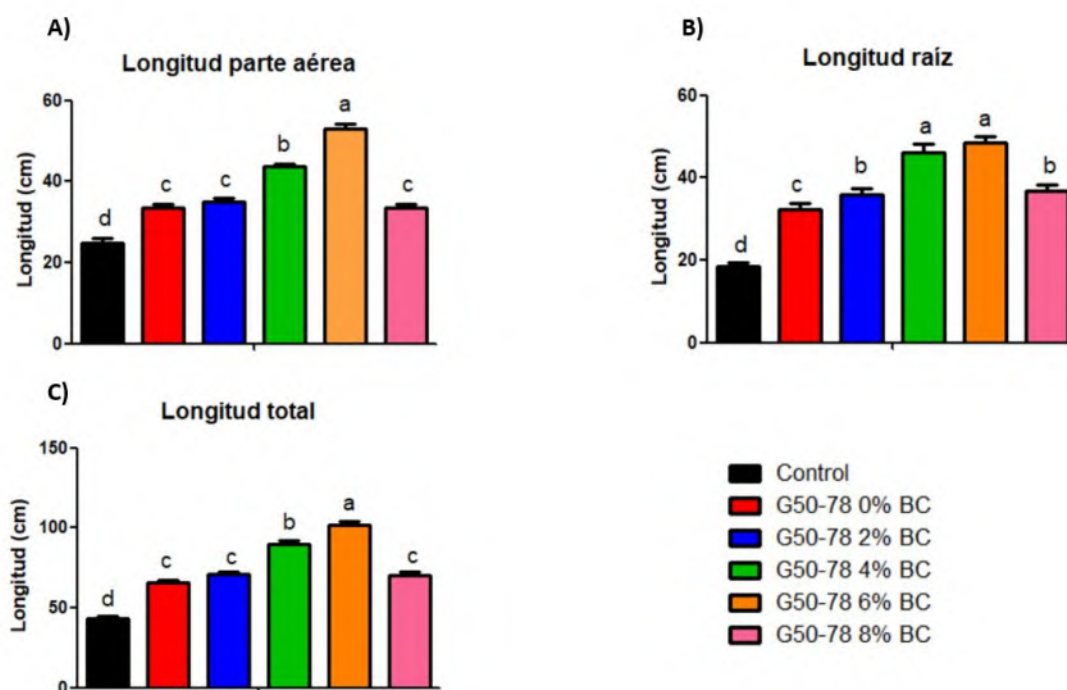


Figura 47. Evaluación de las formulaciones de G50-78 sobre la longitud de plántulas de maíz en etapa V4. A) Longitud de la parte aérea, B) Longitud de la raíz, C) Longitud total. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$) ($n=30$).

7.7.8 Longitud de plantas en etapa (V4) *P. polymyxa* LAD-07

Con respecto a las plantas tratadas con las formulaciones de *P. polymyxa* LAD-07 podemos observar que las formulaciones con las concentraciones 2, 4 y 6 % de biochar no presentaron diferencias estadísticas entre sí (Figura 48), pero presentan una diferencia del 10 % con respecto al control y los demás tratamientos para el caso de la longitud de la parte aérea (A). Para el caso de la longitud de la raíz, los resultados mostraron a la formulación de 6 % de biochar como el mejor tratamiento, seguido de la formulación de 4 % con un 35 y 30 % de diferencia respecto al control (B). Al realizar el análisis de la longitud completa de las plantas, los resultados mostraron al bioinoculante de 6 % de biochar como el mejor tratamiento con un aumento del 35 % de la longitud con respecto al control y el 4 % con un 30 % (C).

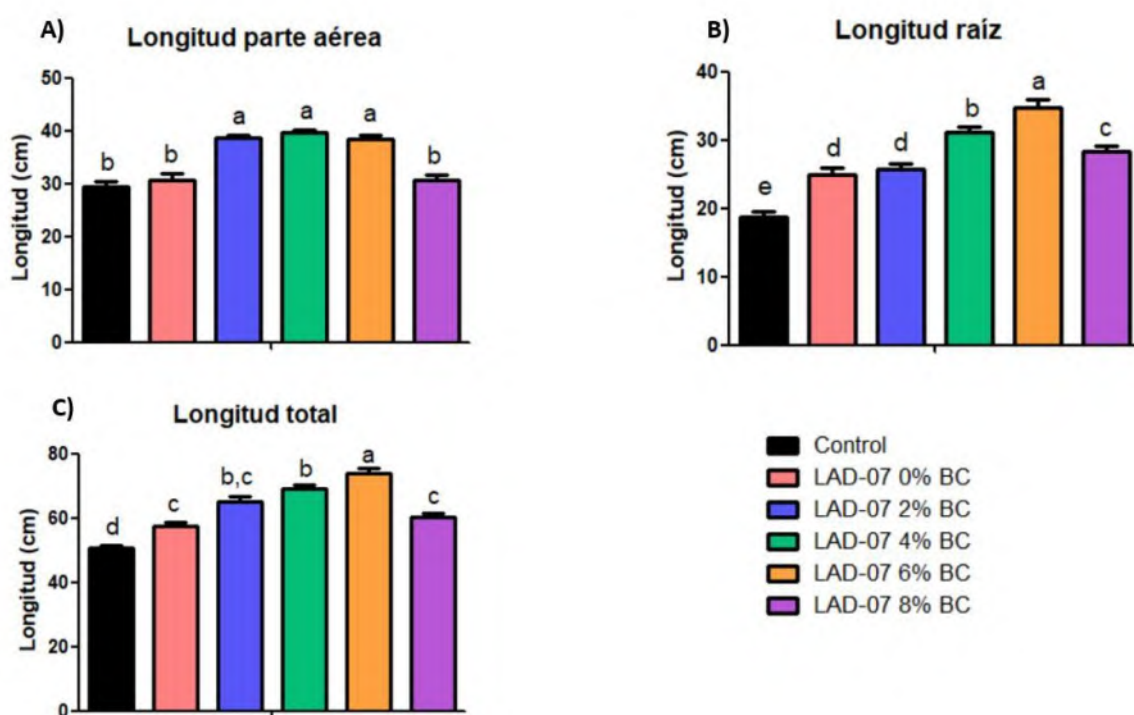


Figura 48. Evaluación de las formulaciones de LAD-07 sobre la longitud de plántulas de maíz en etapa V4. A) Longitud de la parte aérea, B) Longitud de la raíz, C) Longitud total. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$) ($n=30$).

7.7.9 Peso fresco de las plantas en etapa (V4) *E. Cloacae* G50-78

Para el caso de la evaluación del peso fresco de la parte aérea de las plantas V4 con los tratamientos con *E. Cloacae* G50-78 (Figura 50), no se observaron diferencias estadísticas como se muestra en el panel (A). Por otro lado, en el caso del peso fresco de la raíz observamos un aumento considerable del 30 % para la formulación del 8 % de biochar con respecto al control (B). Lo que nos resulta que el tratamiento de 8 % posee un mayor peso fresco de toda la planta en comparación con el control (D), debido a su aumento en el peso de la raíz.

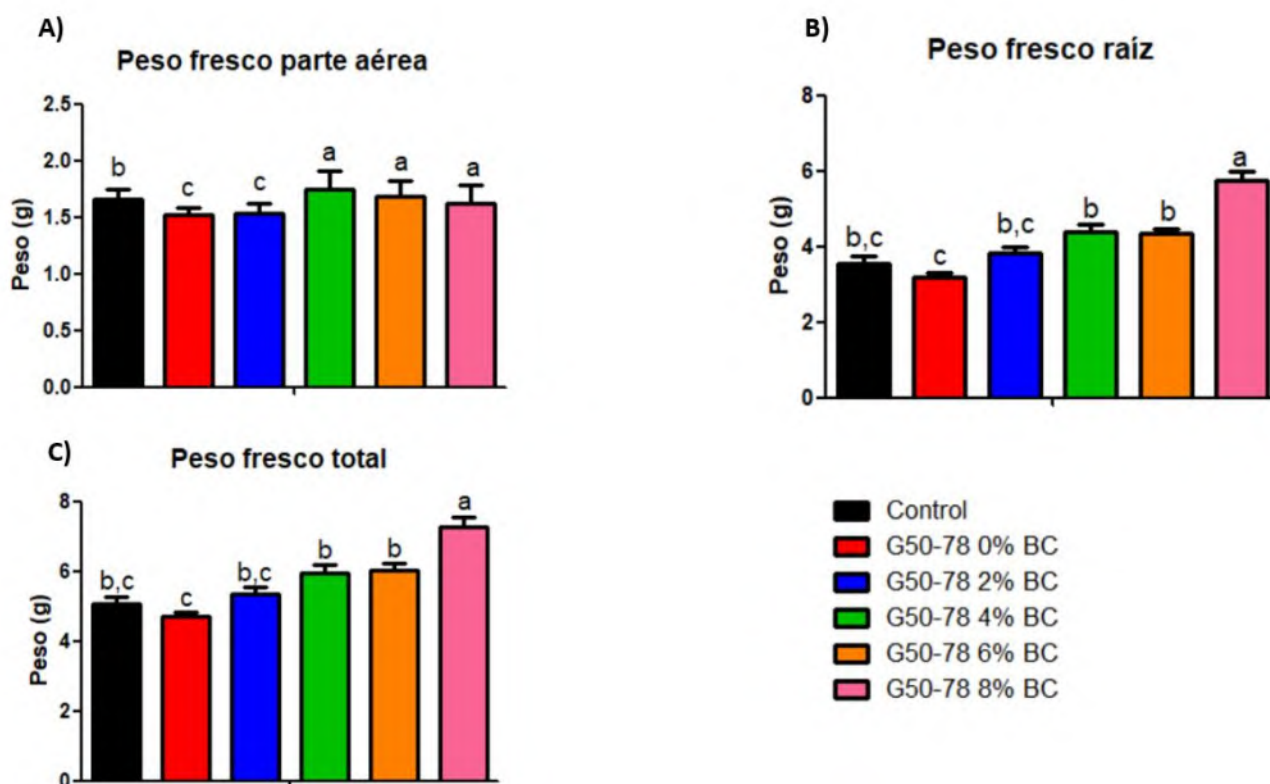


Figura 50. Evaluación de las formulaciones DE G50-78 sobre el peso fresco de plántulas de maíz en condiciones de vivero. A) Peso fresco parte aérea, B) Peso fresco raíz, C) Peso fresco total. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$) ($n=30$).

7.7.10 Peso fresco de las plantas en etapa (V4) *P. polymyxa* LAD-07

En la evaluación del peso fresco frente a las formulaciones de *P. polymyxa* LAD-07 (Figura 51) los resultados del peso fresco de la parte aérea mostraron un aumento del 55 % de la formulación de 4 % de biochar en comparación con el control (A). En cambio, para la raíz solo vemos un aumento del 10 % para las formulaciones de 4, 6 y 8 % respecto al control, por lo que no hubo diferencias estadísticas entre ellos (B). Resultando para el peso fresco total el tratamiento de LAD-07 4 % el que obtuvo el mayor incremento de peso con un 40 % respecto al control como se muestra en el panel (C).

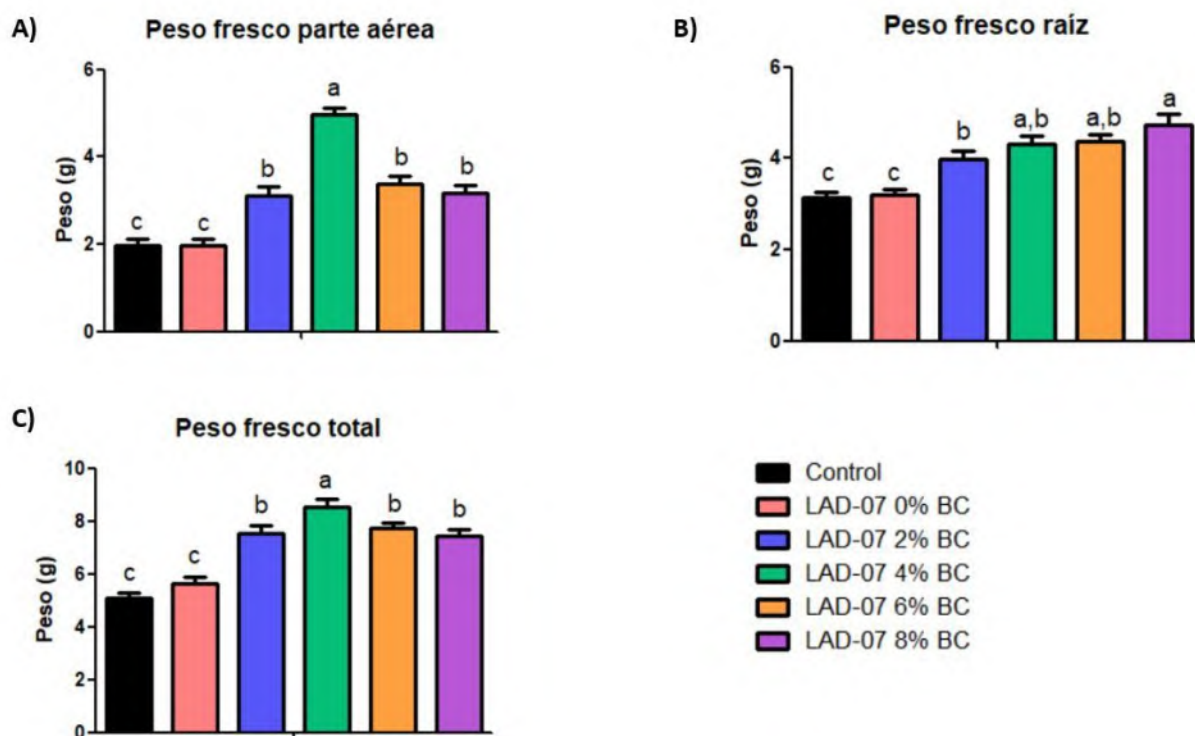


Figura 51. Evaluación de las formulaciones de LAD-07 sobre el peso fresco de plántulas de maíz en condiciones de vivero. A) Peso fresco parte aérea, B) Peso fresco raíz, C) Peso fresco total. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$) ($n=30$).

7.7.11 Peso seco de las plantas en etapa (V4) *E. Cloacae* G50-78

Los resultados del peso seco de la parte aérea (Figura 52) mostraron un aumento del 20 % de biomasa en comparación con el control para los tratamientos 4, 6 y 8 % de las formulaciones de *E. Cloacae* G50-78 (A), mientras que el peso seco de la raíz, las formulaciones con 4 y 6 % de biochar mostraron un aumento del 60 % de biomasa respecto al control (B). Al medir el peso seco total de las plantas se observó que todos los tratamientos se encontraron por arriba del control, siendo las concentraciones de 4 y 6 % de biochar las que presentaron 60 % más biomasa total (C).

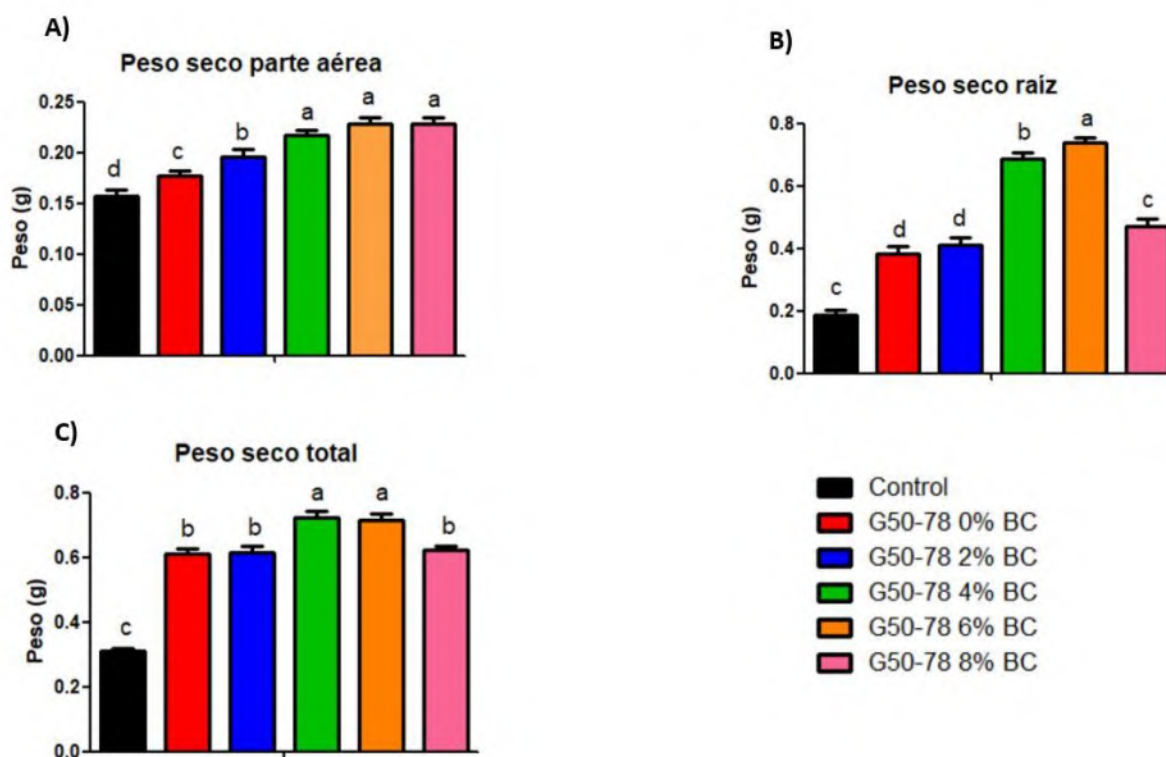


Figura 52. Evaluación de las formulaciones sobre el peso seco de plántulas de maíz en condiciones de vivero. A) Peso seco parte aérea, B) Peso seco raíz, C) Peso seco total. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$) ($n=30$).

7.7.12 Peso seco de las plantas en etapa (V4) *P. polymyxa* LAD-07

Para las formulaciones con *P. polymyxa* LAD-07 (Figura 53) no se encontraron diferencias estadísticas en los resultados del peso seco en la parte aérea, que se muestra en el panel (A). Sin embargo, en la parte de la raíz si hubo diferencias estadísticas siendo la formulación de biochar al 8 % quien presento el mayor aumento de biomasa en esta parte de la planta (B). Al evaluar el peso seco total podemos observar que todos los tratamientos con biochar mostraron diferencias con respecto al control (C).

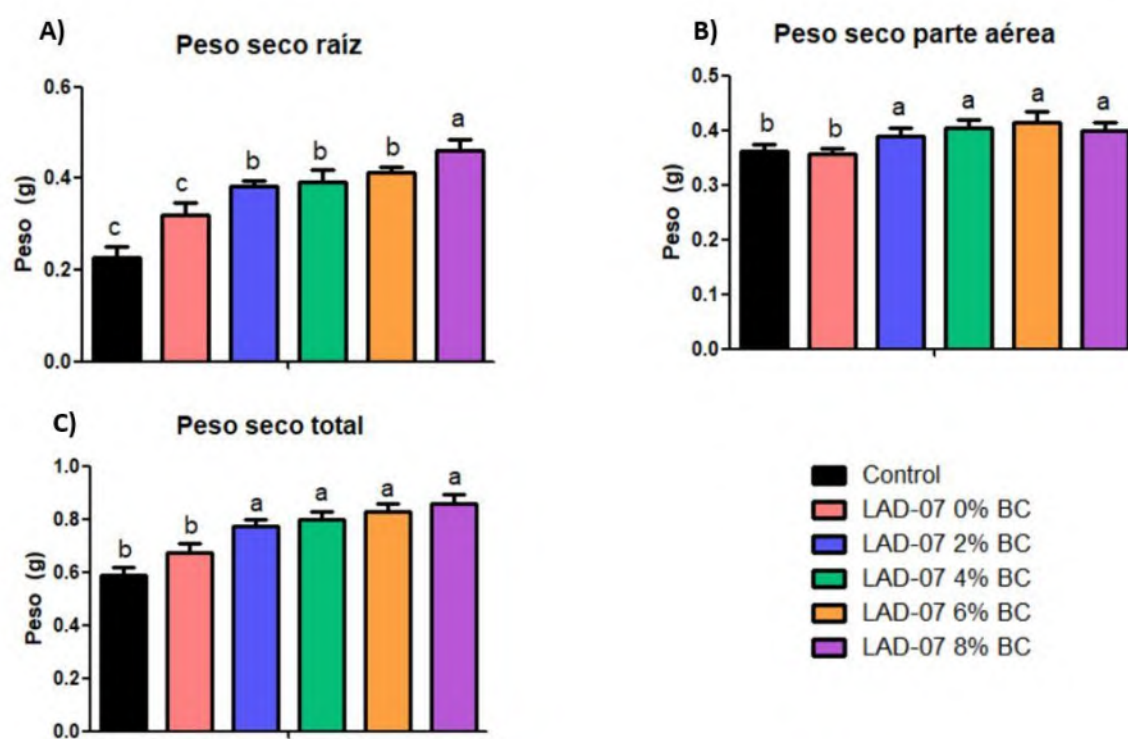


Figura 53. Evaluación de las formulaciones sobre el peso seco de plántulas de maíz en condiciones de vivero. A) Peso seco parte aérea, B) Peso seco raíz, C) Peso seco total. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 1 vía, prueba post hoc Tukey ($P \leq 0.05$) ($n=30$).

7.7.13 Comparación entre las diferentes formulaciones sobre parámetros del crecimiento vegetal en etapa (V4)

Con la finalidad de determinar si existen diferencias entre las diferentes formulaciones, se realizó un ANOVA de dos vías, evaluando a todos los tratamientos dentro de cuatro parámetros del crecimiento vegetal, obteniendo los siguientes resultados (Figura 54). En el caso de la longitud total de la planta encontramos que las formulaciones de 4 y 6 % de biochar para G50-78, fueron los que presentaron la mayor longitud de la planta con un 20 y 30 % más respectivamente, en comparación con el control (A). Por otro lado, para el peso fresco total, el tratamiento del 4 % de LAD-07 fue el mejor con 15 % más sobre el mayor peso fresco que mostro G50-78 (B), Para el peso seco no podemos definir un mejor tratamiento debido a que se encuentran muy cercanos entre las concentraciones de 2, 4 y 6 % de biochar de ambos microorganismos (C). En la evaluación de las unidades SPAD no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos en esta etapa del maíz (D).

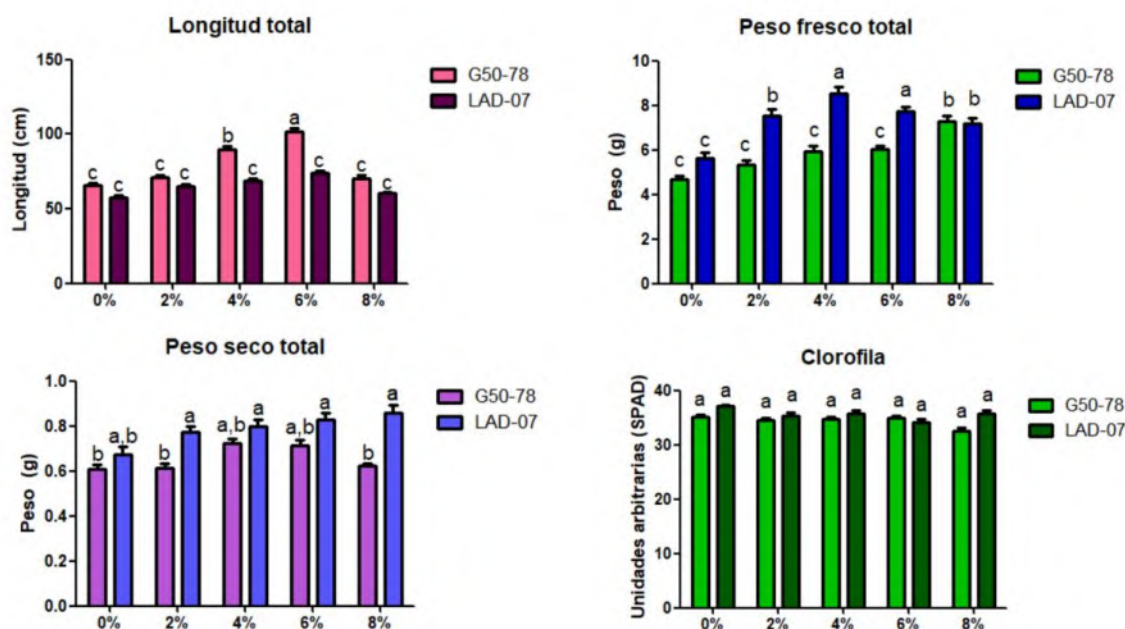


Figura 54. Comparación de las formulaciones de G50-78 y LAD-07 sobre parámetros de crecimiento vegetal en plantas de maíz blanco híbrido H-318 A) Longitud total, B) Peso fresco total, C) Peso seco total, D) Clorofila. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de cada tratamiento, letras diferentes sobre las barras representan diferencias significativas, ANOVA de 2 vías, prueba post hoc Bartlett ($P \leq 0.05$) (n=30).

Los resultados obtenidos en condiciones de vivero evidenciaron que la incorporación de formulaciones sólidas de bioinoculantes con biochar como portador tiene un efecto positivo en diversos parámetros del desarrollo vegetal del maíz híbrido H-318, especialmente en etapas vegetativas tempranas (V3 y V4). Este comportamiento coincide con diversos estudios que reportan el potencial del biochar para mejorar la eficiencia de los bioinoculantes y estimular el crecimiento vegetal (Mukherjee & Lal, 2020; Ronga et al., 2023).

Durante la etapa V3, se observó que las formulaciones con *E. cloacae* G50-78 al 6 % de biochar promovieron significativamente la longitud de la raíz y la longitud total de las plantas, con incrementos de hasta un 60 % respecto al control. Esto puede estar relacionado con una mayor disponibilidad de nutrientes y una mejor retención de agua generada por la porosidad del biochar (Joseph et al., 2021). Para *P. polymyxa* LAD-07, también se identificaron beneficios similares, destacando el tratamiento con 6 % de biochar, que promovió el desarrollo radicular, factor clave en la absorción eficiente de nutrientes (Delgado-Baquerizo et al., 2022).

En cuanto al peso fresco, *E. cloacae* G50-78 en formulación sólida al 6 % incrementó significativamente tanto el peso aéreo como radicular, lo cual es consistente con la literatura que señala que combinaciones de biochar con microorganismos promotores del crecimiento pueden mejorar la biomasa vegetal al favorecer la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno y fósforo (Lehmann et al., 2020). En *P. polymyxa* LAD-07, el mayor efecto se observó en el tratamiento con 4 % de biochar, particularmente en el peso fresco total, lo que sugiere que la interacción entre el portador y esta cepa específica favorece la estabilidad y funcionalidad del inóculo.

Respecto al peso seco, en *E. cloacae* G50-78 la formulación al 6 % sobresalió nuevamente con incrementos de hasta 50 % en biomasa radicular. En el caso de *P. polymyxa* LAD-07, aunque no se observaron diferencias estadísticas marcadas en la parte aérea, los tratamientos con biochar mostraron mejoras frente al control, destacando el 8 % de biochar en la raíz. Esto refuerza la hipótesis de que el biochar puede actuar como reservorio de nutrientes y protector del microbiota útil, extendiendo su funcionalidad en el suelo (**Zhang et al., 2022**).

Durante la etapa V4, los tratamientos con 4 % y 6 % de biochar continuaron mostrando efectos positivos, especialmente con *E. cloacae* G50-78, donde se observó un aumento de hasta el 55 % en la longitud de las raíces y del 45 % en la parte aérea. De forma similar, *P. polymyxa* LAD-07 en 6 % también logró incrementos del 35 % en longitud total, lo que respalda la eficiencia de estos bioinoculantes en etapas intermedias del desarrollo del maíz. Este comportamiento es consistente con lo reportado por **López-Valdez et al. (2021)**, quienes observaron una mayor eficiencia fisiológica y desarrollo de plántulas en maíz mediante el uso combinado de biochar y bacterias PGPB.

El análisis de peso fresco en la etapa V4 mostró que *E. cloacae* G50-78 al 8 % tuvo el mayor impacto en la raíz, mientras que *P. polymyxa* LAD-07 al 4 % destacó en la parte aérea, indicando que cada cepa responde de forma diferente al entorno generado por las formulaciones. En cuanto al peso seco, las formulaciones de 4 % y 6 % para ambas cepas presentaron los valores más altos de biomasa total, con incrementos de hasta el 60 % respecto al control, evidenciando un efecto acumulativo positivo del biochar y los microorganismos durante el desarrollo del cultivo.

Finalmente, la comparación entre todas las formulaciones en etapa V4 mediante ANOVA de dos vías reveló que *E. cloacae* G50-78 con 6 % de biochar fue el tratamiento más efectivo en términos de longitud total, mientras que *P. polymyxa* LAD-07 al 4 % fue el más eficiente en peso fresco total.

En todos los casos, las formulaciones con biochar superaron al control no inoculado, lo cual demuestra la sinergia entre el portador orgánico y las cepas PGPB (**Sun et al., 2023**).

En conjunto, estos hallazgos indican que las formulaciones sólidas con biochar, particularmente en concentraciones de 4 % y 6 %, favorecen el desarrollo temprano del maíz, al promover una mayor longitud, biomasa y desarrollo radicular, aspectos clave para el establecimiento de cultivos vigorosos en campo. Estos resultados respaldan el uso de bioinoculantes sólidos como una estrategia sustentable y eficiente para mejorar el rendimiento agrícola, especialmente en sistemas de producción donde la fertilidad del suelo puede estar comprometida (**Backer et al., 2018**).

7.8 Evaluación de la viabilidad y estabilidad del bioinoculante sólido

Los resultados obtenidos muestran que la inclusión de biochar como componente en las formulaciones sólidas de bioinoculantes tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad microbiana durante el almacenamiento de 12 meses. Tanto *Enterobacter cloacae* G50-78 como *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 presentaron un mayor mantenimiento de sus poblaciones viables cuando fueron incorporadas en formulaciones con biochar al 4 % y 6 %, en comparación con el control sin biochar.

En el caso de *E. cloacae* G50-78 (Figura 55), una bacteria Gram negativa y no formadora de esporas, se observó una drástica reducción de la viabilidad en la formulación control (0 %), cayendo de 10^9 a 10^4 UFC/g al mes 12. Esta disminución acelerada puede explicarse por la limitada capacidad de esta cepa para resistir condiciones adversas como la desecación o la escasa disponibilidad de nutrientes (**Herrmann & Lesueur, 2013**). Sin embargo, al ser formulada con biochar, especialmente al 4 % y 6 %, la viabilidad se mantuvo hasta en 10^7 UFC/g, lo que sugiere un efecto protector del biochar.

Por su parte, *P. polymyxa* LAD-07 (Figura 56), una bacteria Gram positiva y formadora de esporas, mostró una mayor resistencia a la pérdida de viabilidad en todos los tratamientos, incluido el control. Esta capacidad está relacionada con la formación de estructuras resistentes que permiten a las bacterias sobrevivir en condiciones de estrés prolongado **(Borriss, 2015)**. No obstante, las formulaciones con biochar al 6 % resultaron ser las más efectivas, alcanzando concentraciones superiores a 10^8 UFC/g al finalizar el periodo de almacenamiento, lo que sugiere una interacción sinérgica entre las características del portador y la fisiología del microorganismo.

El biochar, por su estructura porosa, su alta capacidad de retención de agua y nutrientes, así como su pH moderadamente alcalino y su capacidad de intercambio catiónico (CIC), proporciona un entorno favorable para la estabilidad microbiana **(Lehmann et al., 2020)**.

Estos microhábitats pueden proteger a las bacterias contra la desecación, la radiación UV y los cambios bruscos de temperatura, factores que comúnmente afectan la viabilidad en productos bioformulados **(Tan et al., 2022; Ding et al., 2023)**. Además, estudios recientes han demostrado que concentraciones intermedias de biochar (4-6 %) optimizan la formulación de biofertilizantes, mientras que concentraciones superiores pueden afectar negativamente la aireación o dificultar la reactivación microbiana en campo, posiblemente por una retención excesiva de agua o una alta adsorción de compuestos orgánicos **(Zhou et al., 2022)**. Esta observación concuerda con los resultados de este estudio, donde las formulaciones al 8 % no mostraron mejoras adicionales significativas.

La formulación sólida de bioinoculantes con biochar como portador resultó efectiva para conservar la viabilidad de bacterias benéficas durante el almacenamiento a temperatura ambiente. La concentración óptima del portador fue del 4 % al 6 %, lo que sugiere una posible estandarización para aplicaciones a nivel comercial.

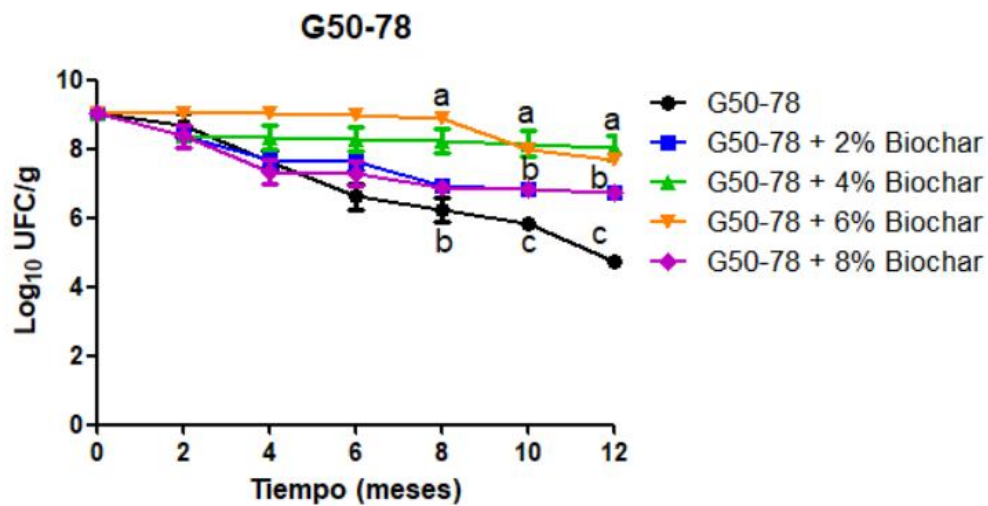


Figura 55. Viabilidad (UFC/g) durante 12 meses, de *E. cloacae* G50-78, en las distintas formulaciones sólidas.

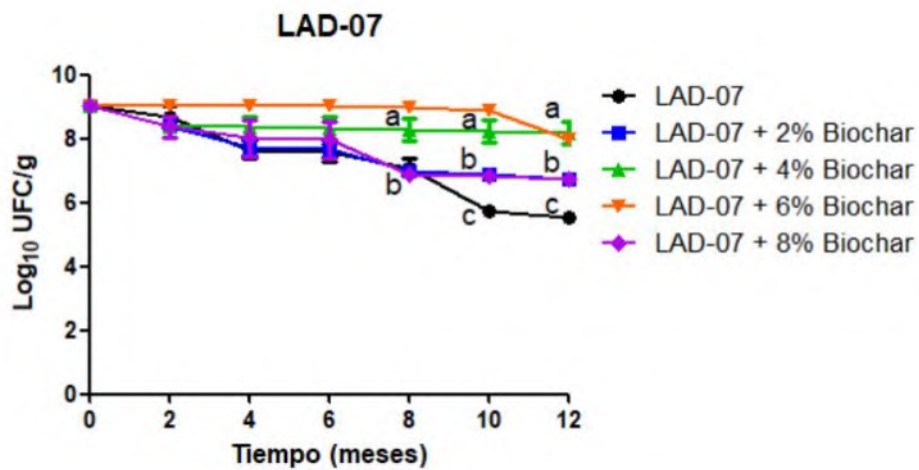


Figura 56. Viabilidad (UFC/g) durante 12 meses, de *P. polymyxa* LAD-07, en las distintas formulaciones sólidas.

8. CONCLUSIÓN

El biochar producido a partir de bagazo de agave funciona como un portador microbiano eficaz en formulación sólida, al mantener la viabilidad de *Enterobacter cloacae* G50-78 y *Paenibacillus polymyxa* LAD-07 y favorecer la conservación de sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal.

9. REFERENCIAS

- Ahmad, M., Rajapaksha, A. U., Lim, J. E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., Vithanage, M., Lee, S. S., & Ok, Y. S. (2014). Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. *Chemosphere*, 99, 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.071>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1473. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Baldani, J. I., Reis, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H., & Baldani, V. L. D. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: A practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, 384(1–2), 413–431. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2186-6>
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J.-P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1–2), 1–33. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>
- Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1327–1350. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>
- Bolan, N. S., Khan, M. A., Ok, Y. S., Kabir, S., & Niazi, N. K. (2023). The potential of biochar as a microbial carrier for plant and environmental applications. *Science of the Total Environment*, 870, 161978. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161978>
- Bünemann, E. K. (2015). Assessment of gross and net mineralization rates of soil organic phosphorus—A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 89, 82–98. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.06.026>
- Cedeño, M. C. (1995). Tequila production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.3109/07388559509150529>
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W.-A., & Young, C. C. (2006). Phosphate-solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate-solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.12.002>

Choudhury, A. T., Dey, N., & Das, B. (2022). Environmental consequences of excessive use of chemical fertilizers: An overview. *Environmental Challenges*, 8, 100573. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2022.100573>

Couillault, C., & Ewbank, J. J. (2002). Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity*, 70(8), 4705–4707. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4705-4707.2002>

Ding, Y., Liu, Y., Liu, S., Li, Z., Tan, X., Huang, X., Zeng, G., Zhou, L., & Zheng, B. (2016). Biochar to improve soil fertility. *GCB Bioenergy*, 8(2), 236–247. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12265>

Ding, Y., Liu, Y., Liu, S., Li, Z., Tan, X., Huang, X., & Zeng, G. (2023). Biochar-based microbial inoculants: Promoting soil health and plant growth via synergistic interactions. *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 10231–10249. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25689-0>

Dos Santos, P. C., Fang, Z., Mason, S. W., Setubal, J. C., & Dixon, R. (2012). Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC Genomics*, 13, 162. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-162>

Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., & Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(1), 85–125. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>

Dutta, S., & Podile, A. R. (2010). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): The bugs to debug the root zone. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(3), 232–244. <https://doi.org/10.3109/10408411003766806>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2023). *The State of Food Security and Nutrition in the World 2023*. FAO.

Gaby, J. C., & Buckley, D. H. (2017). The use of degenerate primers in qPCR analysis of functional genes can cause bias: A case study of *nifH* gene. *Microbial Ecology*, 74(3), 701–708. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0968-0>

González-García, Y., Cortés-Camargo, S., & López-López, A. (2020). Environmental problems associated with agave bagasse disposal: A review. *Waste Management & Research*, 38(12), 1371–1386.

Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z.-C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: A review. *Microbial Cell Factories*, 15, 203. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0603-7>

Herrmann, L., & Lesueur, D. (2013). Challenges of formulation and quality of biofertilizers and biostimulants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 4299–4313. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4961-9>

Herrmann, L., & Lesueur, D. (2023). Challenges of formulation and quality of microbial inoculants for sustainable agriculture. *Agronomy*, 13(2), 386. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020386>

Jeong, H., Choi, S.-K., Ryu, C.-M., & Park, S.-H. (2019). Chronicle of a soil bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681 as a tiny guardian of plant and human health. *Frontiers in Microbiology*, 10, 467. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00467>

Joseph, S. D., et al. (2015). Characteristics of biochar: Physical and structural properties. En J. Lehmann & S. Joseph (Eds.), *Biochar for Environmental Management: Science, Technology and Implementation* (2.^a ed., pp. 89–110). Routledge.

Kudoyarova, G., Arkhipova, T., Korshunova, T., Bakaeva, M., Loginov, O., Dodd, I. C., & Veselov, S. (2019). Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth-promoting bacteria under edaphic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1368. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01368>

Kumar, A., Patel, J. S., Meena, V. S., & Ramteke, P. W. (2017). Plant growth-promoting rhizobacteria: Strategies to improve abiotic stresses in plants. *Frontiers in Microbiology*, 8, 110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01108>

Kumar, P., Thakur, S., Dhingra, G. K., Pal, M. K., Reddy, M. S., & Bansal, Y. K. (2022). Application of plant growth-promoting rhizobacteria in agricultural crops for sustainable productivity. *Plant Stress*, 3, 100057. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100057>

Kumawat, K. C., Sharma, B., Nagpal, S., Kumar, A., Tiwari, S., & Nair, R. M. (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria: Salt stress alleviators to improve crop productivity for sustainable agriculture development. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1101862. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1101862>

Lehmann, J., & Joseph, S. (2015). *Biochar for Environmental Management: Science, Technology and Implementation* (2nd ed.). Routledge.

Lehmann, J., Rillig, M. C., Thies, J., Masiello, C. A., Hockaday, W. C., & Crowley, D. (2011). Biochar effects on soil biota—A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(9), 1812–1836. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.04.022>

Li, S., Jiang, W., Li, X., & Li, W. (2020). Calcium solubilization by plant growth-promoting rhizobacteria: Mechanisms and applications. *Applied Soil Ecology*, 153, 103592.

Liu, Y., Xie, L., Huang, Y., & Liu, Y. (2023). Environmental impacts of chemical fertilizers and sustainable management strategies. *Environmental Pollution*, 317, 120794. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120794>

Lu, L., Huggins, T., Jin, S., & Zhuang, L. (2020). Impact of nitrogen fertilizers on the environment and strategies for sustainable management. *Ecological Indicators*, 112, 106144. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106144>

Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63, 541–556. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>

Malusá, E., & Vassilev, N. (2014). A contribution to set a legal framework for biofertilisers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6599–6607. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5828-y>

Malusá, E., & Vassilev, N. (2021). Fertilizers and agrochemicals as a source of contaminants in the environment. En *Environmental Impact of Agro-Food Industry and Food Consumption* (pp. 1–17). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67238-4_1

Malusá, E., Sas-Paszt, L., & Ciesielska, J. (2012). Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*, 2012, 491206. <https://doi.org/10.1100/2012/491206>

Martínez-Cano, B., & Méndez-López, J. (2022). Review and perspectives of the use of alginate as a carrier for microbial inoculants. *Polymers*, 14(13), 2667. <https://doi.org/10.3390/polym14132667>

Morales-García, Y., Contreras-Ramos, S. M., & Dantán-González, E. (2020). Bioinoculantes microbianos de segunda generación: Formulaciones y estabilidad. *AyT: Ciencia y Tecnología (BUAP)*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3933710>

Park, K.-H., Lee, C.-Y., & Son, H.-J. (2009). Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. *Letters in Applied Microbiology*, 49(2), 222–228. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02642.x>

Patten, C. L., Blakney, A. J. C., & Coulson, T. J. D. (2013). Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(4), 395–415. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.716819>

Rai, A., Bhattacharjya, S., & Singh, A. (2021). Encapsulation of plant growth-promoting microorganisms for sustainable agriculture: A review. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 9(6), 1–12.

Rajkovich, S., Enders, A., Hanley, K., Hyland, C., Zimmerman, A. R., & Lehmann, J. (2012). Corn growth and nitrogen nutrition after additions of biochars with varying properties. *Plant and Soil*, 353(1–2), 73–86. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1010-8>

Riaz, M., Sadiq, M., Saifullah, & Al-Wabel, M. (2020). Biochar as a carrier of microbial inoculants: Prospects and challenges. *Sustainability*, 12(18), 7350. <https://doi.org/10.3390/su12187350>

Rogovska, N., Laird, D. A., Cruse, R., Trabue, S., & Heaton, E. (2016). Corn and soil response to biochar application and stover harvest. *Field Crops Research*, 187, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.12.012>

Saad, M. M., Nasaruddin, & El-Enshasy, H. A. (2020). Application of alginate bead–encapsulated N₂-fixing bacteria in improving wheat yield under drought stress. *CABI Digital Library*. <https://doi.org/10.5555/20219822790>

Schmidt, H.-P., Hagemann, N., Draper, K., & Kammann, C. (2021). Biochar in agriculture – A systematic review of 26 global meta-analyses. *GCB Bioenergy*, 13(11), 1708–1730. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12889>

Schmidt, M. W. I., et al. (2021). Evolution of biochar properties in soil. In J. Lehmann & S. Joseph (Eds.), *Biochar for Environmental Management* (2.^a ed.). Routledge.

Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>

Silva, V. P., Santos, M. S., & Oliveira, R. S. (2022). Calcium solubilization by rhizobacteria and plant uptake. *Rhizosphere*, 22, 100515.

Singh, S., Bhat, S. A., Singh, J., & Singh, K. (2021). Biochar as a carrier for microbial inoculants: A review. *Journal of Environmental Management*, 289, 112540. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112540>

Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant–microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), a001438. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001438>

Tan, X., Liu, S., Wang, J., Zeng, G., Hu, X., Gu, Y., ... & Yang, Z. (2022). Application of biochar for the immobilization of microorganisms in wastewater treatment: A review. *Bioresource Technology*, 360, 127617. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127617>

Torres-Solórzano, P., Reyes-De la Cruz, H., Altamirano-Hernández, J., Macías-Rodríguez, L., Campos-García, J., & Luna-Cruz, A. (2025). Inoculation with *Pseudomonas* spp. in *Solanum lycopersicum* increases yield and fruit quality under nutrient shortage conditions. *PeerJ*, 13, e19796. <https://doi.org/10.7717/peerj.19796>

Tripathi, M., Sahu, J. N., & Ganesan, P. (2016). Effect of process parameters on production of biochar from biomass waste and its applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 467–481. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.122>

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2022). *World Population Prospects 2022*.

Vargas-Luna, M., Robles-González, I. V., & Pérez-Armendáriz, B. (2021). Biochar from agave bagasse: Production and applications. *Journal/Capítulo local*.

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Boyce, A. N. (2016). Role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in agricultural sustainability. *Molecules*, 21(5), 573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>

Verma, S. R., Maurya, B. R., Meena, V. S., & Meena, R. K. (2021). Relevance of phosphate-solubilising microbes in sustainable crop production: A review. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19, 9283–9296. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03425-9>

Xu, N., Tan, G., Wang, H., & Gai, X. (2020). Effect of biochar additions to soil on nitrogen leaching, microbial biomass and bacterial community structure. *European Journal of Soil Biology*, 100, 103202. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2020.103202>

Zhang, X., Davidson, E. A., Mauzerall, D. L., Searchinger, T. D., Dumas, P., & Shen, Y. (2021). Managing nitrogen for sustainable development. *Nature*, 593(7858), 61–68. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03317-0>

Zou, Q., Aguilar-Rivera, N., & Li, F. (2024). The synergistic interaction between biochar and PGPR. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 11, 60. <https://doi.org/10.1186/s40538-024-00631-z>

Blanca Ivette Pérez Pérez

Evaluación del uso biochar como portador microbiano en la formulación de un bioinoculante sólido a b

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:483528195

Fecha de entrega

14 ago 2025, 1:37 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

14 ago 2025, 1:41 p.m. GMT-6

Nombre de archivo

Evaluación del uso biochar como portador microbiano en la formulación de un bioinoculante sólido....pdf

Tamaño de archivo

4.5 MB

101 Páginas

18.172 Palabras

103.511 Caracteres

9% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 8 palabras)

Fuentes principales

- 9%  Fuentes de Internet
- 5%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Maestría en Ciencias en Biología Experimental (MCBE)	
Título del trabajo	"Evaluación del uso de biochar como portador microbiano en la formulación de un bioinoculante sólido a base de <i>Enterobacter cloacae</i> G50-78 y <i>Paenibacillus polymyxa</i> LAD-07"	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Blanca Ivette Pérez Pérez	1166722e@umich.mx
Director	Josué Altamirano Hernández	josue.altamirano@umich.mx
Codirector	Carlos Rubén Sosa Aguirre	carlos.sosa@umich.mx
Coordinador del programa	Mauro Manuel Martínez Pacheco	mpacheco@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	Sí	Parafraseo y síntesis de la información

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	Sí	Traducción de artículos científicos
Traducción a otra lengua	No	
Revisión y corrección de estilo	Sí	Revisión ortográfica
Análisis de datos	No	
Búsqueda y organización de información	Sí	Búsqueda de artículos científicos recientes relacionados con el tema
Formateo de las referencias bibliográficas	Sí	Organizar las referencias en orden alfabético
Generación de contenido multimedia	No	
Otro	No	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Blanca Ivette Pérez Pérez
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán a 14/08/2025.