

Calidad y carga microbiana de la biomasa producida con especies vegetales cultivadas de forma intensiva

Quality and Microbial Load of Biomass Produced With Plant Species Grown Under an Intensive Production System

Julio César Ríos Saucedo¹, Rigoberto Rosales Serna^{1*}, Itzel Escobedo Ramos², Jenny Vanessa Gutiérrez Saucedo³, Cynthia Adriana Nava Berumen⁴, Maihualy Fernández Martínez¹, Pablo Alfredo Domínguez Martínez¹, y Saúl Santana Espinoza¹

¹INIFAP-Durango. Campo Experimental Valle del Guadiana. km 4.5 Carr. Durango-El Mezquital, Durango, Dgo., México. C. P. 34170.

²Tecnológico Nacional de México – Campus Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana. Carretera Durango – México km 22.5. Villa Montemorelos, Dgo., México. C. P. 34371.

³Instituto Tecnológico de Durango, Felipe Pescador 1830 Ote. Col. Nueva Vizcaya, Durango, Dgo., México. C. P. 34080.

⁴Universidad Juárez del Estado de Durango – Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera. Boulevard del Guadiana Núm. 501. Ciudad Universitaria. Durango, Dgo., México. C. P. 34120.

*Autor para correspondencia: rosales.rigoberto@inifap.gob.mx

RESUMEN

La incorporación de materia orgánica al suelo fortalece la fertilidad, rendimiento y sostenibilidad productiva. El objetivo fue evaluar la calidad y carga microbiana de la biomasa producida para obtención de bioenergía y abono orgánico. Se utilizó higuera (*Ricinus communis*), maralfalfa (*Pennisetum* sp.), acacia (*Acacia retinoides*), álamo blanco (*Populus alba*), sauce (*Salix* sp.) y pino (*Pinus* spp.). Se determinó balance C:N, fibra en detergente neutro (FDN), fibra en detergente ácido (FDA), celulosa (CEL), hemicelulosa (HEM), lignina (LIG), poder calorífico superior (PCS) y carga microbiana. La maralfalfa registró valores altos para el balance C:N (19.6 a 22.9), FDN (77.4 a 79.5 %) y HEM (22.3 a 22.5 %), lo cual favoreció su uso como abono, biocombustible y forraje. La FDA fue más alta en acacia (58.0 a 60.0 %), lo que favoreció su uso como combustible. La acacia y maralfalfa mostraron valores altos de CEL (38.8 % a 50.6 %), por lo que pueden usarse en la industria. La higuera y maralfalfa registraron niveles bajos de lignina (12.0 % y 17.9 %), lo que se relacionó con valores bajos de PCS (16.4 MJ kg⁻¹ y 16.6 MJ kg⁻¹). En los pélets se observó ausencia de *Azospirillum* y variación en la carga de *Pseudomonas* spp. (0 a 3 UFC mL⁻¹) y *Rhizobium* spp. (0 a 21 UFC mL⁻¹). Las pruebas bioquímicas corroboraron la presencia de *Pseudomonas* y *Rhizobium*, lo que favorece el uso de la biomasa como abono orgánico. Se identificaron especies para la elaboración de abono orgánico (maralfalfa e higuera) y biocombustible.

Palabras Clave: agricultura, forestería, sostenibilidad, rendimiento, ambiente.

SUMMARY

The incorporation of organic matter strengthens soil fertility, seed yield and productive sustainability. The objective was to evaluate the quality and microbial load in plant biomass harvested to produce bioenergy and organic fertilizer. Plant biomass was used for castor bean (*Ricinus communis*), maralfalfa (*Pennisetum* sp.), acacia (*Acacia retinoides*), white poplar (*Populus alba*), willow (*Salix* sp.), and pine (*Pinus* spp.). Data were taken for C:N ratio, neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), cellulose (CEL), hemicellulose (HEM), lignin (LIG), high heating value (HHV) and microbial load. Maralfalfa registered higher values for C:N ratio (19.6 to 22.9) and NDF (77.4 to 79.5 %) and HEM (22.3 to 22.5 %) content, which favored its use as organic fertilizer, biofuel and as forage. The FDA content was higher in acacia (58.0 to 60.0 %), which favors its use as biofuel. Acacia and maralfalfa showed high CEL values (38.8 % to 50.6 %), and it is usable as industrial input. Castor bean and maralfalfa registered low lignin levels (12.0 % and 17.9 %), related to low HHV values (16.4 MJ kg⁻¹ and 16.6 MJ kg⁻¹). Biomass pellets registered the absence of *Azospirillum* and variations for the load for *Pseudomonas* spp. (0 a 3 UFC mL⁻¹) and *Rhizobium* spp. (0 a 21 UFC mL⁻¹). The biochemical tests corroborated the presence of *Pseudomonas* and *Rhizobium*, which favors the use of biomass as organic fertilizer. Plant species were identified for industrial production of organic fertilizer (maralfalfa and castor bean) and biofuel.

Key Words: agriculture, forestry, sustainability, yield, environment.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, se requiere biomasa de calidad para la producción sostenible de abonos orgánicos y generación eficiente de bioenergía. Se ha observado que la mayoría de los suelos agrícolas muestran contenido bajo de materia orgánica (Rosales *et al.*, 2019), lo cual se relacionó con la degradación físico-química y pérdida de fertilidad, así como con la disminución de la capacidad de infiltrar y retener agua. El contenido bajo de materia orgánica es el resultado del manejo agronómico deficiente, lo cual incluye labranza inapropiada, falta de incorporación de residuos de la cosecha y utilización reducida de otras fuentes de materia orgánica (Rosales *et al.*, 2018a). Debido a lo anterior, se observa productividad baja, dependencia de fertilizantes químicos y degradación constante del suelo. Adicionalmente, los ecosistemas de bosque templado y matorral muestran perturbación considerable, por la presión ejercida durante la extracción de madera, leña y restos orgánicos usados como abono (humus-tierra de monte).

Actualmente, se trabaja en el estudio sistemático de especies vegetales con posibilidades de ser utilizadas en la producción intensiva de biomasa (Rosales *et al.*, 2018a), la cual debe cumplir con estándares internacionales de calidad e inocuidad. La selección de especies con rendimiento alto de biomasa contribuye al abastecimiento de insumos para la elaboración de biocombustibles de poder calorífico alto. Además, es necesario conocer la utilidad de la biomasa obtenida para la elaboración de abonos orgánicos, que permitan el enriquecimiento del suelo agrícola y mejoramiento de sus propiedades bioquímicas. Los estudios iniciales de calidad de la biomasa utilizada en la elaboración de biocombustibles incluye el estudio de fibras y determinación del poder calorífico superior (PCS); mientras que para la elaboración de abono orgánico se requiere la evaluación inicial del balance carbono:nitrógeno (C:N) y carga de organismos benéficos, como son las bacterias del género *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*.

El uso de medios de cultivo selectivos y el desarrollo de pruebas bioquímicas ayudan en la determinación de la carga microbiana, así como en la identificación de los microorganismos presentes en la biomasa. Los medios de cultivo más comunes para el aislamiento e identificación de las bacterias de interés son: YMA [Levadura (Yeast)-Manitol-Agar], B-King y NFb (Nitrogen Free Bromothymol). El cultivo específico de bacterias obtenido en dichos medios tiene que pasar por un conjunto de pruebas bioquímicas, para corroborar la identidad de los microorganismos. Las pruebas bioquímicas más comunes son: agar triple azúcar-hierro (TSI: Triple Sugar-Iron-Agar), rojo de metilo (RM), Voges Prokauer (VP), SIM [Sulfuro (Sulfide)-Indol-Movilidad (Motility)], lisina-agar-hierro (LIA: Lysine-Iron-Agar), citrato de Simmons, manitol y

malonato (Callicó *et al.*, 2004; BD, 2015).

El estudio y clasificación de la calidad de biomasa permite contar con la información necesaria para seleccionar especies vegetales con rendimiento alto en condiciones de producción intensiva. También, se desarrollaron procesos eficientes para la elaboración de abonos orgánicos que mejoran la fertilidad y propiedades físico-químicas del suelo; así como biocombustibles con niveles altos de eficiencia calorífica. Con ello, se fortaleció el desarrollo industrial, agropecuario y forestal, todo dentro de un marco de sostenibilidad de la producción. El objetivo fue determinar la calidad y carga microbiana de la biomasa producida con especies vegetales de crecimiento rápido cultivadas de forma intensiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras. Se utilizó biomasa cosechada, durante el invierno 2018-19, en una plantación establecida con cinco especies de crecimiento rápido en el Campo Experimental Valle del Guadiana-INIFAP, en Durango, Dgo., México. Las especies incluidas fueron: acacia, álamo blanco, higuerilla, maralfalfa y sauce. Además, se incluyeron los residuos de pino (*Pinus* spp.) como testigo comercial, debido al uso local de esta especie para la elaboración de biocombustibles y sustratos para viveros. La biomasa se produjo en dos densidades de plantación: hilera sencilla (5,550 plantas ha⁻¹) y doble (8,902 plantas ha⁻¹). Además, se fertilizó 35 días después del trasplante (DDT), mediante la incorporación de fertilizante granulado con la dosis 35-50-00 para nitrógeno (N), fósforo (P₂O₅) y potasio (K₂O). Se instaló el sistema de riego presurizado por goteo, con cintilla de 16 mm, dispersores cada 20 cm y un gasto de 1 L h⁻¹. La parcela experimental consistió de una hilera (sencilla y doble) de 7.2 m de longitud, 3.0 m de separación y de 12 (hilera sencilla) a 24 plantas (hilera doble). La biomasa de todas las especies se obtuvo en corte único realizado 126 días

después del trasplante.

Estudio de fibras, poder calorífico y balance C:N. Se tomaron muestras de plantas completas, las cuales se secaron en una estufa de aire forzado a 60 °C durante 72 h y luego se molieron en un equipo eléctrico (Wiley®), con criba de 1 mm, y se colocaron en recipientes de polietileno hasta su análisis. En el laboratorio se determinó el contenido de fibra en detergente neutro (FDN), fibra en detergente ácido (FDA) y lignina (L), todas mediante el método ANKOM (2005), en el cual se consideró la utilización de bolsas ANKOM F57. La hemicelulosa (HEM) se calculó por diferencia (HEM = FDN-FDA), al igual que la celulosa (CEL = FDA-lignina). La determinación del PCS se realizó en un calorímetro isoperibólico semi-automático (LECO AC600). En esta prueba se utilizó biomasa triturada, con un tamaño de partícula de 0.149 mm, ésta última obtenida de la muestra compuesta de plantas completas de cada especie. El nitrógeno total se evaluó por el método micro-Kjeldahl (AOAC, 1990) y el carbono, en tejido vegetal, se determinó en un laboratorio comercial, donde se utilizó el método de combustión directa de la muestra (LANISAF,

2019).

Carga microbiana: En el caso de la determinación de la carga microbiana, las muestras fueron tomadas en tres fases: campo, triturado y peletizado. En campo, el muestreo se realizó en forma aleatoria y para ello, se tomaron plantas completas en las pilas de biomasa cortada para cada una de las especies incluidas en el estudio. En el aserradero, se obtuvieron muestras compuestas de la biomasa triturada en un molino de martillos; así como de los costales de pélets obtenidos en un equipo industrial (Hengmei-Better ZLG 1050). Las muestras se tomaron con guantes de látex y se colocaron en bolsas de polietileno con cierre hermético, para evitar la contaminación cruzada durante la manipulación de la biomasa. La recolección de las muestras del testigo comercial (pino) se realizó de la misma forma, dentro de las instalaciones del aserradero.

Las evaluaciones de carga microbiana se realizaron en el laboratorio de microbiología, considerando preferentemente microorganismos de interés agronómico (*Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*). Se preparó un frasco por cada especie (6) y fase de muestreo (3), lo que dio como resultado un total de 18 frascos, en los cuales se colocaron 90 mL de agua destilada y 10 g de la muestra de biomasa. Los frascos, con el volumen de agua destilada, fueron esterilizados en autoclave por 15 min a temperatura constante de 121 °C. Durante la incorporación de las muestras de biomasa, se tuvieron condiciones estériles, debido a que todas las maniobras se realizaron cerca del mechero Bunsen, para flamear al abrir y cerrar cada frasco con agua destilada.

La inoculación del medio se realizó por triplicado, con el método de extensión en superficie, luego se dejó incubar a 32 °C durante un periodo de 24 a 72 h y después de ese tiempo se observó la presencia de colonias, para cada una de las bacterias bajo estudio. Las placas con

crecimiento característico se utilizaron para el aislamiento de las bacterias en el mismo medio de cultivo, para lo cual se empleó la técnica de sembrado por estría cruzada. La transferencia se realizó en condiciones estériles (con flama de mechero) y para ello, se depositó la muestra en la placa con el medio específico de cultivo. Se utilizaron medios de cultivo selectivos (B-King, NFb e YMA), así como técnicas de aislamiento y pruebas bioquímicas para cada especie de bacteria. De esta forma, se utilizó el medio NFb para *Azospirillum* spp., B-King para *Pseudomonas* spp. y el medio YMA para el caso de *Rhizobium* spp.

Se evaluaron variables cualitativas (forma de la superficie, colonia y borde; color y consistencia de las colonias) para determinar la presencia/ausencia de colonias pertenecientes a las bacterias de interés y una variable cuantitativa (Número de Unidades Formadoras de Colonias, UFC), con la finalidad de establecer el nivel de incidencia de los microorganismos. Además, se realizaron pruebas bioquímicas (TSI, rojo de metilo, Voges Prokauer, SIM, LIA, citrato de Simmons, manitol y malonato), para corroborar la identidad de cada especie de bacteria.

Análisis Estadístico. El análisis de varianza de los datos, obtenidos en el estudio de calidad, se realizó en un diseño completamente aleatorio, con arreglo en parcelas divididas y cuatro repeticiones. En las variables que mostraron diferencias significativas se realizó la comparación de medias con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). El análisis de varianza y la prueba de medias se obtuvieron con el programa de cómputo SAS® ver. 9.4. Se utilizó estadística descriptiva para analizar las diferencias entre especies y tipos de biomasa en cuanto a la presencia de las bacterias bajo estudio. Se determinó el valor promedio y el error estándar de la media para el número de bacterias presentes en la biomasa de cada especie vegetal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Abono Orgánico. Se observaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), entre especies para el balance C:N (Cuadro 1). Los valores significativamente más altos para esta variable se registraron en maralfalfa, tanto en hilera doble (22.9), como en hilera sencilla (19.6). El álamo blanco presentó resultados estadísticamente iguales a los registrados en maralfalfa, con valores altos en hilera doble (18.7) e hilera sencilla (13.6). Lo anterior, muestra la posibilidad de utilizar dichas especies, en combinación con otros residuos, para la elaboración de abono orgánico y lograr valores del balance C:N cercanos al recomendado en este tipo de insumos agrícolas (24:1) y con ello, favorecer la sobrevivencia de los microorganismos del suelo que se encargan de procesar los nutrientes que serán extraídos por las plantas (USDA, 2011).

Bioenergía. Se observaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$), entre densidades para FDN y FDA; así como entre especies, para todas las variables relacionadas la calidad de la biomasa utilizada en la generación de bioenergía (Cuadro 1). La maralfalfa, mostró el valor más alto para FDN en hilera doble (79.5 %) e hilera sencilla (77.4 %), mientras que el contenido de FDA fue más alto en acacia, tanto en hilera sencilla (60.0 %) como en hilera doble (58.0 %). Los niveles de FDN y FDA se asociaron con la cantidad de energía contenida en la biomasa lignocelulósica, por lo que niveles altos de estas variables pueden utilizarse en la selección indirecta de especies con potencial bioenergético alto (Godin *et al.*, 2010). Con base en lo anterior, se puede decir que acacia produjo biomasa con calidad aceptable para la generación de bioenergía, debido a que el contenido alto de fibras se ha relacionado con niveles altos de celulosa, hemicelulosa y lignina (Godin *et al.*, 2010; Möller, 2014), así como con el poder calorífico superior.

Cuadro 1. Atributos de calidad bioenergética de la biomasa obtenida en diferentes especies cultivadas en dos densidades de plantación.

Especie	C:N	¹ FDN (%)	FDA (%)	H (%)	CEL (%)	LIG (%)	PCS (mJ/kg)
Hilera Sencilla							
Sauce	14.8 ^b	59.4 ^{cb}	49.3 ^b	5.9 ^c	27.7 ^{bc}	25.8 ^a	19.5 ^a
Alamo Blanco	13.6 ^{ab}	65.9 ^b	52.9 ^{ab}	9.5 ^{bc}	37.5 ^{abc}	18.9 ^a	18.5 ^{ab}
Higuerilla	11.1 ^b	56.1 ^c	44.0 ^c	8.9 ^{bc}	29.3 ^c	17.9 ^b	18.9 ^{ab}
Acacia	14.7 ^b	75.2 ^a	60.0 ^a	10.7 ^b	50.6 ^a	19.4 ^a	17.5 ^b
Maralfalfa	19.6 ^a	77.4 ^a	51.5 ^{ab}	22.5 ^a	40.9 ^{ab}	14.0 ^b	16.4 ^c
Promedio	14.8	66.8^A	51.5^A	11.5	37.2	19.2	18.1
Hilera Doble							
Sauce	16.1 ^b	62.0 ^{cb}	49.3 ^b	8.9 ^c	33.1 ^{bc}	20.1 ^a	20.1 ^a
Alamo Blanco	18.7 ^{ab}	68.3 ^b	54.4 ^{ab}	10.1 ^{bc}	38.4 ^{abc}	19.7 ^a	19.2 ^{ab}
Higuerilla	13.1 ^b	52.5 ^c	38.4 ^c	11.2 ^{bc}	29.2 ^c	12.0 ^b	19.4 ^{ab}
Acacia	12.6 ^b	74.5 ^a	58.0 ^a	11.7 ^b	38.8 ^a	24.0 ^a	19.0 ^b
Maralfalfa	22.9 ^a	79.5 ^a	53.1 ^{ab}	22.3 ^a	41.0 ^{ab}	16.2 ^b	16.6 ^c
Promedio	16.7	67.4^B	50.6^B	12.8	36.1	18.4	18.8

¹C:N= balance carbono:nitrógeno, FDN = fibra en detergente neutro, FDA = fibra en detergente ácido, H= hemicelulosa, CEL = celulosa, LIG = lignina y PCS = poder calorífico superior. Las letras en cada columna representan diferencias significativas entre densidades de plantación (^{A-B}) y especies (^{a-c}), con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

La maralfalfa mostró contenido alto de hemicelulosa en hilera sencilla (22.5 %) e hilera doble (22.3 %), debido a la naturaleza de la especie y selección realizada para conseguir poblaciones útiles en la alimentación animal (Silvy *et al.*, 2018). Por su parte, la acacia mostró valores altos de celulosa en hilera sencilla (50.6 %), aunque en hilera doble (38.8 %) fue superada por maralfalfa (41.0 %). Se observó que las especies arbustivas-arbóreas, especialmente álamo blanco y acacia, incrementaron el contenido de celulosa en relación con el contenido de hemicelulosa. En el caso de maralfalfa, se observó una proporción alta de ambos compuestos, debido a la fecha de corte, crecimiento y avance en la maduración de la planta, aunque la proporción más alta correspondió a la celulosa en todas las especies (Silvy *et al.*, 2018).

Las dos especies herbáceas (higuerilla y maralfalfa) mostraron nivel significativamente bajo de lignina, con valores entre 12.0 % y 17.9 %, en ambos sistemas de plantación; mientras que el resto de las especies presentaron variaciones de 18.9 % a 25.8 %. Los resultados fueron similares (15-40 %) a los mostrados en otros estudios en los que se observaron diferencias del contenido de lignina entre especies, especialmente en el bagazo de caña (Novaes *et al.*, 2010; Tana *et al.*, 2016). El tipo y cantidad de unidades de lignina difirió entre especies, tejidos, tipo de células, etapa de

desarrollo de la planta y efecto de los factores ambientales, como son estrés biótico y abiótico (Yoon *et al.*, 2015). Se debe considerar que niveles altos para el contenido de lignina incrementan el poder calorífico superior del biocombustible (Santos *et al.*, 2015).

La maralfalfa mostró los valores más bajos de PCS con 16.4 mJ kg⁻¹ en hilera sencilla y 16.6 mJ kg⁻¹ en hilera doble. La acacia registró valores intermedios para PCS (17.5 a 19.0 mJ kg⁻¹); mientras que, el resto de las especies presentaron niveles estadísticamente altos, entre 17.5 mJ kg⁻¹ y 20.1 mJ kg⁻¹ en los dos sistemas de plantación. Los resultados fueron similares a los reportados en estudios previos con gramíneas (*Pennisetum* spp.), en los que se han observado valores del PCS entre 16.9 y 17.6 mJ kg⁻¹ (Santos *et al.*, 2015). En el caso de especies arbóreas se han registrado valores para el poder calorífico superior entre 17.6 y 20.8 mJ kg⁻¹ (Telmo y Lousada, 2011; Santos *et al.*, 2015). Se corroboró que la biomasa de maralfalfa puede utilizarse en la producción de biocombustibles sólidos, mediante su densificación en pélets simples y torrefactados (Salazar *et al.*, 2015; Ríos *et al.*, 2018). Además, se puede usar en la sacarificación de la biomasa para la elaboración de bioetanol (Souza *et al.*, 2015). El resto de las especies han sido utilizadas exitosamente en la elaboración de biocombustibles sólidos, especialmente pélets de biomasa para su utilización doméstica e industrial.

Carga microbiana en medio NFb. Se observó ausencia de bacterias del género *Azospirillum*, en la biomasa de las diferentes especies de plantas y oportunidades de muestreo (Cuadro 2). Lo anterior, se relacionó con la preferencia de esta bacteria por las gramíneas (Vital y

Mendoza, 2014) y en el caso de la maralfalfa, las temperaturas bajas registradas durante el invierno afectaron negativamente las plantas (heladas) de esta especie y esto repercutió en la presencia de *Azospirillum* (Kaushik *et al.*, 2002).

Cuadro 2. Nivel de presencia de *Azospirillum* spp. en biomasa de diferentes especies vegetales en tres etapas de proceso de peletizado.

Muestra	Bacterias ³ UFC mL ⁻¹	Muestra	Bacterias ³ UFC mL ⁻¹	Muestra	Bacterias ³ UFC mL ⁻¹
¹ S-N ²	0 ± 0	S-T	0 ± 0	S-PL	0 ± 0
AB-N	0 ± 0	AB-T	0 ± 0	AB-PL	0 ± 0
A-N	0 ± 0	A-T	0 ± 0	A-PL	0 ± 0
M-N	0 ± 0	M-T	0 ± 0	M-PL	0 ± 0
H-N	0 ± 0	H-T	0 ± 0	H-PL	0 ± 0
P-N	0 ± 0	P-T	0 ± 0	P-PL	0 ± 0

¹S = sauce, AB = álamo blanco, A = acacia, M = maralfalfa, H = higuera y P = pino. ²N = natural, T = triturado y PL = peletizada. ³UFC = unidades formadoras de colonias.

Carga microbiana en medio B-King. Se observó variación para la carga de bacterias del género *Pseudomonas* spp., entre especies y tipo de biomasa (Cuadro 3). La higuera mostró carga bacteriana alta en todas las etapas del proceso, con valores que superaron la capacidad para realizar la cuantificación objetiva de unidades formadoras de colonias (UFC). Algunas especies, como pino y álamo blanco, mostraron un valor bajo de bacterias en la condición natural de la biomasa y luego registraron un nivel alto (201 UFC mL⁻¹ a incontable) después de la trituración. Lo anterior, se debió principalmente a la contaminación cruzada que causó la molienda de todas las especies en el mismo molino, existencia de resina pegajosa (Lugo *et al.*, 2009; Gallo y Sarria, 2013) y manipulación del material ejercida por los operadores del molino. Después, se redujo drásticamente el número de bacterias durante el proceso de peletización, el cual incluyó el tratamiento térmico de la biomasa. Luego del peletizado, se observó que la acacia y pino mostraron ausencia total de bacterias del género *Pseudomonas*, mientras que el resto de las especies mostraron valores bajos (2 a 3 UFC mL⁻¹).

Los resultados, demostraron que algunas especies como higuera y maralfalfa mantienen carga bacteriana alta, aún después del peletizado, lo cual puede ser aprovechado para el uso de esta biomasa en la elaboración de abonos orgánicos con inóculo de microorganismos benéficos. En el caso de *Pseudomonas* se recomienda la inoculación con una suspensión bacteriana con 10⁸ UFC mL⁻¹ (Zuno *et al.*, 2009). Los resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios, en los cuales se obtuvieron efectos favorables de la interacción entre higuera y bacterias del género *Pseudomonas* sp. (Olivares *et al.*, 2017; Sandilya *et al.*, 2017). Entre los caracteres de interés agronómico observados en *Pseudomonas* spp. se pueden mencionar acidificación del suelo, liberación de nutrientes y control de poblaciones de hongos fitopatógenos. La carga menor de bacterias, observada en pino y acacia, se debió a las propiedades bactericidas de algunos compuestos contenidos en la biomasa de dichas especies (Nathistoc, 2004; Fekih *et al.*, 2014).

Cuadro 3. Nivel de presencia de *Pseudomonas* sp. en biomasa de diferentes especies vegetales en tres etapas del proceso de peletizado.

Muestra	Bacterias ³ UFC mL ⁻¹	Muestra	Bacterias UFC mL ⁻¹	Muestra	Bacterias UFC mL ⁻¹
¹ S-N ²	31 ± 16	S-T	Incontable	S-PL	2 ± 1
AB-N	4 ± 2	AB-T	201 ± 22	AB-PL	2 ± 0
A-N	64 ± 13	A-T	Incontable	A-PL	0 ± 0
M-N	267 ± 15	M-T	Incontable	M-PL	3 ± 1
H-N	Incontable	H-T	Incontable	H-PL	Incontable
P-N	1 ± 0	P-T	Incontable	P-PL	0 ± 0

¹S = sauce, AB = álamo blanco, A = acacia, M = maralfalfa, H = higuera y P = pino. ²N = natural, T = triturado y PL = peletizada. ³UFC = unidades formadoras de colonias.

Carga microbiana en medio YMA. Se observaron diferencias para la carga de bacterias del género *Rhizobium*, entre especies de plantas y tipos de biomasa (Cuadro 4). La higuera (57 UFC mL⁻¹) y maralfalfa (38 UFC mL⁻¹) mostraron la carga de *Rhizobium* más alta en la biomasa natural. Después, se incrementó el número de bacterias hasta alcanzar 147 UFC mL⁻¹ en la biomasa triturada de maralfalfa y 96 UFC mL⁻¹ en el caso de higuera. Se observó que, en la etapa de trituración se incrementó la carga bacteriana en la mayoría de las especies (56 UFC mL⁻¹ hasta 147 UFC mL⁻¹) y únicamente la biomasa de pino se mantuvo libre de *Rhizobium* en todas las etapas del proceso. Después, de realizar el peletizado, únicamente la higuera (21 UFC mL⁻¹) y acacia (2 UFC mL⁻¹) registraron presencia de *Rhizobium*. La presencia de microorganismos benéficos para la fijación biológica de nitrógeno puede favorecer el uso de la biomasa de estas especies como abono orgánico, especialmente en el cultivo de frijol. Es necesario considerar que los niveles de inóculo recomendados para *Rhizobium* es de 10⁸

UFC mL⁻¹ (Granda *et al.*, 2017), lo cual estuvo lejos del alcance en todas las etapas del proceso de peletizado.

Los resultados muestran que la biomasa de maralfalfa, higuera y en menor medida la de acacia, tienen posibilidades para su uso en la elaboración de abonos orgánicos para frijol y otras leguminosas, en las cuales se favorecerá la fijación biológica de nitrógeno. La acacia por ser una leguminosa mostró afinidad con *Rhizobium*, mientras que para *Pseudomonas* se observó efecto negativo. En el caso de higuera, se registró presencia de ambas especies de bacteria (*Pseudomonas* spp. y *Rhizobium* spp.) a pesar de los potentes compuestos antimicrobianos presentes en toda la planta (Rashmi *et al.*, 2019). Lo anterior, debido a la muerte de los tejidos y degradación de compuestos, exposición del interior celular por el efecto de las temperaturas bajas (heladas), contaminación cruzada durante el corte y manejo de la biomasa; así como la atracción bacteriana generada por las lectinas presentes en las semillas de higuera (Kijne *et al.*, 1997).

Cuadro 4. Nivel de presencia de *Rhizobium* sp. en biomasa de diferentes especies vegetales en tres etapas de proceso de peletizado.

Muestra	Bacterias ³ UFC mL ⁻¹	Muestra	Bacterias UFC mL ⁻¹	Muestra	Bacterias UFC mL ⁻¹
¹ S-N ²	7 ± 3	S-T	56 ± 6	S-PL	0 ± 0
AB-N	1 ± 0.5	AB-T	76 ± 6	AB-PL	0 ± 0
A-N	1 ± 0.5	A-T	123 ± 16	A-PL	2 ± 0.5
M-N	38 ± 7	M-T	147 ± 4	M-PL	0 ± 0
H-N	57 ± 7	H-T	96 ± 6	H-PL	21 ± 3

P-N	0 ± 0	P-T	0 ± 0	P-PL	0 ± 0
¹ S = sauce, AB = álamo blanco, A = acacia, M = maralfalfa, H = higuera y P = pino. ² N = natural, T = triturada y PL = pelletizada. ³ UFC = unidades formadoras de colonias.					

Pruebas Bioquímicas. Las pruebas bioquímicas corroboraron la presencia de *Pseudomonas* y *Rhizobium*, los resultados fueron los siguientes:

***Pseudomonas*.** Se corroboró la identidad del microorganismo aislado del medio B-King, el cual se clasificó como la bacteria *Pseudomonas* sp. (Cuadro 5). Otras características fueron: bacterias gram-negativas y alargadas; reacción alcalina en Agar-Triple Azúcar-Hierro (TSI), sin fermentación, producción de gas ni sulfuro de hidrógeno (SH₂); respuesta positiva en prueba de citrato y rojo de metilo con acidificación del medio. Pruebas VP-LIA (sin producción de enzimas decarboxilasa, desaminasa o ácido sulfúrico) con respuesta negativa; movilidad, crecimiento alrededor del sitio de inoculación y respuesta negativa para las pruebas de manitol y malonato (Callicó *et al.*, 2004). Se dictaminó la presencia de bacterias del género *Pseudomonas*, sin precisar la especie, ya que se han observado localmente *P. aeruginosa* y *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Ortiz *et al.*, 2018).

***Rhizobium*.** Los microorganismos aislados del medio YMA resultaron ser bacterias del género *Rhizobium* (Cuadro 5), con los atributos siguientes: colonias de color blanco, traslúcidas y de forma circular; bacterias gram-negativas, con bacilos alargados de tono rosado; reacción alcalina en Agar-Triple azúcar-Hierro, sin producción de gas ni sulfuro de hidrógeno (SH₂); respuesta positiva en rojo de metilo y negativa para la utilización del citrato (Saldaña, 2017), movilidad con crecimiento alrededor del sitio de inoculación; la prueba Voges Proskauer demostró que el microorganismo fermentó la glucosa por la vía butanodiólica (Callicó *et al.*, 2004) y cambió de color en la prueba de manitol, al pasar el medio con bromothymol del azul al amarillo (Panwar *et al.*, 2012). Las pruebas LIA demostraron que las bacterias del género *Rhizobium* carecen de enzimas para decarboxilar, desaminar el ácido de la lisina y son incapaces de producir ácido sulfúrico. Con base en los resultados, se dictaminó la presencia de bacterias del género *Rhizobium*, sin precisar la especie, ya que se han observado localmente *R. etli* y otras especies de este género (Vásquez, 1996).

Cuadro 5. Respuesta de *Pseudomonas* spp. y *Rhizobium* spp. aisladas de la biomasa de diferentes especies vegetales en tres etapas del proceso de pelletizado.

Prueba	B-King (<i>Pseudomonas</i>)	YMA (<i>Rhizobium</i>)
Tinción de Gram	–, bacilos alargados	–, bacilos cortos
Agar triple azúcar hierro	– gas y H ₂ S, reacción alcalina	–
Rojo de Metilo	+	+
Voges Proskauer	–	+
SIM		
Ácido sulfhídrico	–	–
Indol	–	+
Movilidad	+	+
LIA		
Descarboxilación de la Lisina	–	–
Desaminación de la Lisina	–	–
Ácido sulfúrico	–	–
Citrato de Simmons	+	–
Manitol	–	+
Malonato	–	–

Callicó *et al.*, 2004; BD, 2015.

CONCLUSIONES

Se identificaron especies con posibilidades de ser utilizadas en la producción intensiva de biomasa útil en la elaboración de abono orgánico (maralfalfa e higuerilla) y biocombustibles sólidos (todas las especies). Las especies vegetales mostraron fluctuación para las variables evaluadas, lo cual se relacionó con la fenología de las plantas y fecha de corte de la biomasa. Con base en lo anterior, se consideró necesario establecer la etapa de aprovechamiento más oportuna para cada especie considerando la productividad y calidad de la biomasa, para la elaboración de abono orgánico y biocombustible. La maralfalfa, higuerilla y acacia son especies que pueden utilizarse en el corto plazo; mientras que el álamo blanco y sauce requieren más de un ciclo de cultivo para la producción comercial de biomasa útil en la industria.

Se demostró la presencia de carga microbiana en los pélets elaborados con biomasa de diferentes especies vegetales cultivadas de forma intensiva. Se detectaron bacterias de interés agronómico en la biomasa bajo estudio, las cuales son benéficas para acidificar suelos alcalinos, liberar minerales y controlar poblaciones de hongos fitopatógenos (*Pseudomonas* spp.); así como para fijar nitrógeno atmosférico (*Rhizobium* spp.) durante el cultivo de leguminosas. Con base en la carga microbiana, se puede recomendar la biomasa de maralfalfa, higuerilla y en menor medida acacia para su uso en la elaboración de abonos orgánicos. El pelletizado mantuvo carga microbiana en la biomasa de algunas especies vegetales, lo cual aunque fue bajo resultó favorable para restaurar de poblaciones de microorganismos benéficos en el suelo.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo parcial, obtenido a través del proyecto: "Opciones tecnológicas para el

desarrollo integral y sostenible de la producción agropecuaria y forestal en Durango", el cual fue financiado con recursos fiscales INIFAP (Número 9573834038).

LITERATURA CITADA

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA.
- BD (Becton, Dickinson and Company). 2015. BBL TSI Agar slants. Procedimientos de control de calidad (opcionales). Sparks, MD. USA. 4 p. Consultado en línea 27 de julio de 2019. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22772>
- Callicó, A., B. Cedré, S. Sifontes, V. Torres, Y. Pino, A. H. Callís, y S. C. Esnard. 2004. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Vacuum* 13(3): 1-9.
- Fekih, N., H. Allali, S. Merghache, F. Chaïb, D. Merghache, M. El Amine, N. Djabou, A. Muselli, B. Tabti, and J. Costa. 2014. Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4(2): 97-103.
- Gallo C., J. A., y R. A. Sarria V. 2013. Obtención de colofonia y trementina a partir de resina de pino de la especie patula y posterior evaluación de los parámetros de calidad. *Journal de Ciencia e Ingeniería* 5(1): 88-91.
- Godin, B., F. Ghysel, R. Agneessens, T. Schmit, S. Gofflot, S. Lamadière, G. Sinnaeve, J.-P. Goffart, P. A. Gerin, D. Stilmant, and J. Delcarte. 2010. Détermination de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des cendres dans diverses cultures lignocellulosiques dédiées à la production de bioéthanol de deuxième



- génération. *Biotechnology Agronomy, Society and Environment* 14(S2): 549-560.
- Granda M., K. I., Y. Alvarado C., y R. Torres G. 2017. Efecto en campo de la cepa nativa COL6 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* sobre frijol común cv. Percal en Ecuador. *Centro Agrícola* 44(2): 5-13.
- Kaushik, R., A. K. Saxena, and K. V. B. R. Tilak. 2002. Can *Azospirillum* strains capable of growing at sub-optimal temperature perform better in field-grown-wheat rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils* 35(2): 92-95.
- Kijne, J. W., M. A. Bauchrowitz, and C. L. Diaz. 1997. Root lectins and Rhizobia. *Plant Physiology* 115: 869-873.
- LANISAF (Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal-Universidad Autónoma Chapingo). 2019. Análisis de carbono en muestras vegetales. Consultado en línea 06/06/2019. <https://lanisaf.chapingo.mx/servicios/#cotiza>
- Lugo S., R. E., K. Martínez R., G. Morales R., R. de la Rosa L., y J. A. Noriega R. 2009. Determinación del origen botánico de los propóleos sonorenses mediante HPLC. *INVURNUS* 4(2): 24-30.
- Möller, J. 2014. Comparación de los métodos para la determinación de fibra en pienso y en los alimentos. Foss. Barcelona, España. 6 p.
- Nathistoc (Natural History of Orange County, California) 2004. *Acacia retinoides* Schlecht. Consulted online 06/07/2019. [http://nathistoc.bio.uci.edu/Plants%20of%20Upper%20Newport%20Bay%20\(Robert%20De%20Ruff\)/Fabaceae/Acacia%20retinodes.htm](http://nathistoc.bio.uci.edu/Plants%20of%20Upper%20Newport%20Bay%20(Robert%20De%20Ruff)/Fabaceae/Acacia%20retinodes.htm).
- Novaes, E., M. Kirst, V. Chiang, H. Winter-Sederoff, and R. Sederoff. 2010. Lignin and biomass: A negative correlation for wood formation and lignin content in trees. *Plant Physiology* 154: 555-561.
- Olivares R., A., M. C. A. González C., y R. Carrillo G. 2017. *Ricinus communis* y *Pseudomonas* sp. para la remediación de suelos contaminados con residuos de mina. *Agroproductividad* 10(4): 48-56.
- Ortiz S., I. A., S. Valdez O., E. C. Gamero P., R. Rosales S., and M. M. Acevedo M. 2018. Antibacterial activity of oregano extracts on halo blight isolated from common beans grown in Durango, México. *Annual Report of the Bean Improvement Cooperative* 61:149-150.
- Panwar, A., S. Choudhary, M. Sharma, Y. K. Shrama, R. S. Meena, S. K. Malhotra, R. S. Mehta and O. P. Aishwath. 2012. Morphological and biochemical characterization of *Rhizobium* isolates obtained from fenugreek (*Trigonella foenum*). *Seed Research* 40(2): 196-200.
- Rashmi, D. V. Pathak and R. Kumar. 2019. Effect of *Ricinus communis* L. on microorganisms: Advantages and disadvantages. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8(04): 878-884.
- Ríos S., J. C., R. Rosales S., R. Jiménez O., P. A. Domínguez M., y A. Carrillo P. 2018. Calidad de pélets elaborados mediante la densificación de material lignocelulósico de maralfalfa producida en Durango. *Memoria de la XXX Semana Internacional de Agronomía FAZ-UJED*. Gómez Palacio, Dgo. Méx. pp. 861-867.
- Rosales S., R., J. C. Ríos S., R. Jiménez O., A. Carrillo P., C. A. Nava B., y P. A. Domínguez M. 2018a. Rendimiento y calidad de biomasa en especies cultivadas para obtención de energía y abonos en Durango. *Revista Agro FAZ Edición Especial INIFAP-CELALA*: 139-153.
- Rosales S., R., J. C. Ríos S., R. Jiménez O., P. A. Domínguez M., y S. Santana E. 2018b. Importancia de la materia

- orgánica en el fortalecimiento de la fertilidad de suelos agrícolas en Durango. Desplegable para Productores Núm. 101. INIFAP-CIRNOC-Campo Experimental Valle del Guadiana. Durango, Méx. 2 p.
- Rosales S., R., C. M. Reyes R., S. B. Rosales A., J. C. Ríos S., I. A. Ortiz S., and S. Valdez O. 2019. Common bean monocrop effects on soil chemical degradation in Durango, México. The Annual Report of the Bean Improvement Cooperative 62(1): 93-94.
- Salazar S., L. M., R. Rosales S., R. Jiménez O., J. C. Ríos S., J. A. Sigala R., A. Carrillo P., P. A. Domínguez M., y M. Martínez F. 2015. Optimización calorífica en especies vegetales con potencial para la producción de biomasa dendroenergética en Durango. AGROFAZ 15(1): 147-154.
- Saldaña A., J. M. 2017. Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* de suelo de la presa de la juventud de Marín, Nuevo León. Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa 7: 1-22. Consultado en línea 28 de julio de 2019.
- Sandilya, S. P., P. M. Bhuyan, V. Nageshappa, D. K. Gogoi, and D. Kardong. 2017. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* MAJ PIA03 affecting the growth and phytonutrient production of castor, a primary host-plant of *Samia ricini*. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 17(2): 499-514.
- Santos R. L., F. J. Freire, A. T. Rocha, J. A. A. Silva, J. A. Tavares, E. G. B. Sousa Ferreira, and E. C. A. Oliveira. 2015. Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) biomass production as a promising alternative source of energy in Brazil's semiarid area using gypsum. Australian Journal of Crop Science 9(11): 1082-1088.
- Silvy, N. F., M. S. Reza, M. N. Uddin, and M. Akther. 2018. Comparison between different components of some available hardwood and softwood in Bangladesh. Journal of Biotechnology and Biochemistry 4(1): 01-05.
- Souza de, A. P., C. L. Alvim K., A. F. Torres, S. Pattathil, M. G. Hahn, L. M. Trinidad and M. S. Buckeridge. 2015. How cell wall complexity influences saccharification efficiency in *Miscanthus sinensis*. Journal of Experimental Botany 66(14): 4351-4365.
- Tana, T., Z. Zhang, L. Moghaddam, D. W. Rackemann, J. Rencoret, A. Gutiérrez, J. C. del Río, and W. O. S. Doherty. 2016. Structural changes of sugar cane bagasse lignin during cellulosic ethanol production process. ACS Sustainable Chemistry & Engineering 4(10): 5483-5494.
- Telmo, C. and J. Lousada. 2011. The explained variation by lignin and extractive contents on higher heating value of wood. Biomass and Bioenergy 35(5): 1663-1667.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2011. Carbon to nitrogen ratios in cropping systems. USDA NRCS East National Technology Support Center, Greensboro, N. C. 2 p. Consulted online 15/06/19. https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FS_E_DOCUMENTS/nrcseprd331820.pdf.
- Vásquez A., J. 1996. Fijación biológica de nitrógeno en frijol de temporal y la diversidad genética de las poblaciones nativas de *Rhizobium*. Tesis de Doctorado. UANL-Monterrey, N. L. México. 103 p.
- Vital L., L., and A. Mendoza H. 2014. *Azospirillum*: habitante de las gramíneas. La Ciencia y el Hombre XXVII(2). Consultado en Línea 06/07/2019. <https://www.uv.mx/cienciahombre/revis>

tae/vol27num2/articulos/Azospirillum.html

- Yoon, J., H. Choi, and G. An. 2015. Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development. *Journal of Integrative Plant Biology* 57(11): 902-912.
- Zhang, A.-P., C. F. Liu, R. C. Sun and J. Xie. 2013. Extraction, purification, and characterization of lignin fraction from sugarcane bagasse. *BioResources* 8(2): 1604-1614.
- Zuno F., F. G., P. Estrada de los S., J. A. Gallegos I., N. E. Rocha G., M. L. Aldana M., G. Virgen C., M. G. Miller, y C. V. Muñoz R. 2009. Producción *in vitro* de planta de papa inoculada con *Pseudomonas* sp. *Terra Latinoamericana* 27(3): 207-217.