



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

COLEGIO INGENIERÍA EN ALIMENTOS

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CHÍCHARO (*Pisum sativum*), CALABAZA (*Cucurbita pepo*) Y GIRASOL (*Helianthus annuus*) POR BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

INGENIERO EN ALIMENTOS

Presenta:

BLANCA LIZBETH GARCIA GRIJALVA

Director de tesis:

Dr. José Carlos Mendoza Hernández

Puebla Pue., Noviembre 2016



ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	v
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
JUSTIFICACIÓN	2
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
HIPÓTESIS	4
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	5
1.1 AGRICULTURA SUSTENTABLE: ALIMENTOS ORGÁNICOS	5
1.2 CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS VEGETALES	6
1.2.1 Chícharo (<i>Pisum sativum</i>)	6
1.2.2 Calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>)	8
1.2.3 Girasol (<i>Helianthus annuus</i>)	10
1.3 BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO	11
1.4 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS BACTERIAS	15
1.4.1 Enterobacter	15
1.4.2 Serratia	15
1.4.3 Klebsiella	16
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	17
2.1. Diagrama de proceso	17
2.2. Caracterización como bacterias promotoras del crecimiento.	18

2.3. Preparación del inóculo	18
2.4. Preparación de las semillas	19
2.5. Preparación de maceteros	19
2.6. Diseño experimental.....	20
2.7. Parámetros de crecimiento	20
2.8. Determinación de micro y macronutrientes	21
2.9. Análisis estadístico.....	22
CAPÍTULO III. RESULTADOS	23
3.1. Evaluación de la planta de chícharo (<i>Pisum sativum</i>).....	23
3.1.1. Análisis de la longitud promedio de raíz y tallo de chícharo.....	23
3.1.1. Análisis de la longitud promedio de raíz y tallo de chícharo.....	24
3.2.1. Efecto de las cepas bacterianas en la concentración de micronutrientes en chícharo (<i>Pisum sativum</i>).....	25
3.2.1.1. Concentración Mn.....	25
3.2.1.2. Concentración Cu	26
3.2.1.3. Concentración Ni	27
3.2.1.4. Concentración Zn	28
3.2.1.5. Concentración Fe.....	29
3.2.2. Efecto de las cepas bacterianas en la concentración de macronutrientes en chícharo (<i>Pisum sativum</i>).....	30
3.2.2.1. Concentración Na	30
3.2.2.2. Concentración K	31
3.2.2.3. Concentración P	32
3.3. Evaluación de las plantas de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).....	33
3.3.1. Análisis de la longitud promedio de raíz y tallo de calabaza.....	33

3.3.2. Efecto de las cepas bacterianas en la concentración de micronutrientes de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).....	34
3.3.2.1. Concentración Mn.....	34
3.3.2.2. Concentración Cu.....	35
3.3.2.3. Concentración Ni.....	36
3.3.2.4. Concentración Zn.....	37
3.3.2.5. Concentración Fe.....	38
3.3.3. Efecto de las cepas bacterianas en la concentración de macronutrientes de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>).....	39
3.3.3.1. Concentración Na.....	39
3.3.3.2. Concentración K.....	40
3.3.3.3. Concentración P.....	41
3.4. Evaluación de las plantas de girasol (<i>Helianthus annuus</i>).....	42
3.4.1. Análisis de la longitud promedio de tallo y raíz de girasol.....	42
3.4.2. Efecto de las cepas bacterianas en la concentración de micronutrientes de girasol (<i>Helianthus annuus</i>).....	43
3.4.2.1. Concentración Mn.....	43
3.4.2.2. Concentración Cu.....	44
3.4.2.3. Concentración Ni.....	45
3.4.2.4. Concentración Zn.....	46
3.4.2.5. Concentración Fe.....	47
3.4.3. Efecto de las cepas bacterianas en la concentración de macronutrientes de girasol (<i>Helianthus annuus</i>).....	48
3.4.3.1. Concentración Na.....	48
3.4.3.2. Concentración K.....	49

3.4.3.3. Concentración P	50
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	53
BIBLIOGRAFIA	55

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Propagación de cepas bacterianas en Luria Bertani.....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 2. a) Cepas bacterianas separadas; b) Cepas en buffer de fosfatos.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 3. Maceteros con sustrato, previamente hidratados con agua.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 4. Diseño experimental por triplicado.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 5. a) Plantas 20 días de la germinación; b) planta limpia para medir.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 6. a) Digestión ácida; b) absorción atómica.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 7. Longitud promedio de raíz y tallo de la planta de chícharo (Pisum sativum) inoculadas con BPCV.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 8. Concentración de Mn en las plantas de chícharo (Pisum sativum) inoculadas con BPCV</i>	<i>25</i>
<i>Figura 9. Concentración de Cu en las plantas de chícharo (Pisum sativum) inoculadas con BPCV.</i>	<i>26</i>
<i>Figura 10. Concentración de Ni en las plantas de chícharo (Pisum sativum) inoculadas con BPCV.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 11. Concentración de Zn en las plantas de chícharo (Pisum sativum) inoculadas con BPCV.</i>	<i>28</i>
<i>Figura 12. Concentración de Fe en las plantas de chícharo (Pisum sativum) inoculadas con BPCV.</i>	<i>29</i>
<i>Figura 13. Concentración de Na en las plantas de chícharo (Pisum sativum) inoculadas con BPCV.</i>	<i>30</i>
<i>Figura 14. Concentración de K en las plantas de chícharo (Pisum sativum) inoculadas con BPCV.</i>	<i>31</i>
<i>Figura 15. Concentración de P en las plantas de chícharo (Pisum sativum) inoculadas con BPCV.</i>	<i>32</i>
<i>Figura 16. Longitud promedio de raíz y tallo de calabaza (Cucurbita pepo) inoculados con BPCV.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 17. Concentración de Mn en las plantas de calabaza (Cucurbita pepo) inoculadas con BPCV.</i>	<i>34</i>

Figura 18. Concentración de Cu en las plantas de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>) inoculadas con BPCV.	35
Figura 19. Concentración de Ni en las plantas de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>) inoculadas con BPCV.	36
Figura 20. Concentración de Zn en las plantas de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>) inoculadas con BPCV.	37
Figura 21. Concentración de Fe en las plantas de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>) inoculadas con BPCV.	38
Figura 22. Concentración de Na en las plantas de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>) inoculadas con BPCV.	39
Figura 23. Concentración de K en las plantas de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>) inoculadas con BPCV.	40
Figura 24. Concentración de P en las plantas de calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>) inoculadas con BPCV.	41
Figura 25. Longitud de raíz y tallo promedio de girasol (<i>Helianthus annuus</i>)	42
Figura 26. Concentración de Mn en las plantas de girasol (<i>Helianthus annuus</i>) inoculadas con BPCV.	43
Figura 27. Concentración de Cu en las plantas de girasol (<i>Helianthus annuus</i>) inoculadas con BPCV.	44
Figura 28. Concentración de Ni en las plantas de girasol (<i>Helianthus annuus</i>) inoculadas con BPCV.	45
Figura 29. Concentración de Zn en las plantas de girasol (<i>Helianthus annuus</i>) inoculadas con BPCV.	46
Figura 30. Concentración de Fe en las plantas de girasol (<i>Helianthus annuus</i>) inoculadas con BPCV.	47
Figura 31. Concentración de Na en las plantas de girasol (<i>Helianthus annuus</i>) inoculadas con BPCV.	48
Figura 32. Concentración de K en las plantas de girasol (<i>Helianthus annuus</i>) inoculadas con BPCV.	49
Figura 33. Concentración de P en las plantas de girasol (<i>Helianthus annuus</i>) inoculadas con BPCV.	50

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CHÍCHARO (*Pisum sativum*), CALABAZA (*Cucurbita pepo*) Y GIRASOL (*Helianthus annuus*) POR BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el siglo XIX existían aproximadamente 910 millones de habitantes en el planeta. Para el año 2015, la población aumentó rápidamente a más de 7,300 millones de habitantes y se estima que en el año 2030 alcanzará 8,500 millones, y 9,700 millones en 2050, según la Organización Mundial de las Naciones Unidas. Esto supone, según los expertos, una emergencia planetaria "sin precedentes" (Infobae, 2016). Debido a este crecimiento de la población, y el consecuente aumento del daño ambiental, la producción de alimentos mundial es insuficiente para alimentar a todos los pueblos del mundo.

Para alimentar a todos estos individuos, es absolutamente esencial que la productividad agrícola se incremente significativamente en las próximas décadas. Sin embargo, proporcionar alimentos suficientes para una población mundial cada vez mayor, no es una tarea fácil; se requerirá de una variedad de diferentes estrategias y enfoques. Para producir más alimentos, en el mundo se necesitará (al menos inicialmente) más tierras agrícolas; un mayor uso de productos químicos, incluyendo: fertilizantes, pesticidas y herbicidas; una mayor mecanización agrícola; y la expansión del uso de microorganismos promotores del crecimiento de las plantas.

JUSTIFICACIÓN

Algunas de las soluciones al crecimiento exponencial de la población y por ende a la alimentación, que se intentan, no son sostenibles y sólo serán efectivas en corto plazo. Ya que vivimos en un mundo finito con recursos limitados, las soluciones efectivas y de largo plazo a la provisión de alimentos para el mundo (una vez que la población se ha estabilizado) deben incluir soluciones biológicas favorables al medio ambiente.

Por lo que se hace necesario establecer sistemas de producción sostenibles que promuevan la elevación de los rendimientos agrícolas y protejan al medio ambiente. En años recientes, se ha retomado el interés de utilizar organismos que promuevan el crecimiento en la producción de cultivos. La mayoría de estos microorganismos se encuentran interactuando en la rizósfera (región del suelo alrededor de la raíz de la planta influenciada por su metabolismo) donde el ambiente es distinto del resto de la zona edáfica.

2

Entre los microorganismos con efecto positivo en el desarrollo de las plantas se encuentran las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV), estos microorganismos viven en el suelo y se asocian con distintas especies vegetales, facilitando o incrementando su crecimiento.

Las bacterias se consideran promotoras del crecimiento vegetal por su capacidad de estimular el crecimiento de las plantas mediante diferentes mecanismos, como la solubilización de fosfatos, producción de sideróforos, fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas (ácido indol-acético) y la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa.

El uso de estas bacterias tiene el propósito de maximizar los efectos benéficos de la biofertilización, que permitan desarrollar una producción agrícola más sustentable. De esta manera, el uso de microorganismos con capacidad de promover el crecimiento vegetal se presenta como una importante alternativa para el mejoramiento de la producción agrícola.

El presente trabajo busca evaluar el efecto que las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) de los géneros *Serratia*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, tienen en el crecimiento de las plantas: chícharo (*Pisum sativum*), calabaza (*Cucurbita pepo*) y girasol (*Helianthus annuus*).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el crecimiento vegetal de chícharo (*Pisum sativum*), calabaza (*Cucurbita pepo*) y girasol (*Helianthus annuus*) debido a la acción de bacterias promotoras del crecimiento vegetal de los géneros (*Serratia*, *Klebsiella* y *Enterobacter*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la germinación de chícharo, calabaza y girasol mediante el uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal.
- Analizar los parámetros de crecimiento (raíz y tallo) para cada una de las plantas en estudio.
- Analizar los macronutrientes y micronutrientes de las plantas mediante absorción atómica.

4

HIPÓTESIS

H_n: La aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal no influye en el crecimiento de las plantas de chícharo (*Pisum sativum*), calabaza (*Cucurbita pepo*) y girasol (*Helianthus annuus*).

H_a: La aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal influyen en el crecimiento de las plantas de chícharo (*Pisum sativum*), calabaza (*Cucurbita pepo*) y girasol (*Helianthus annuus*).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 AGRICULTURA SUSTENTABLE: ALIMENTOS ORGÁNICOS

Los alimentos orgánicos, biológicos o ecológicos, son aquellos que se cultivan, crían y procesan utilizando métodos naturales, cuyos principales objetivos son:

- Obtener productos alimenticios que no contengan aditivos químicos ni compuestos sintéticos.
- Proporcionar alimentos más sanos para los consumidores.
- Favorecer prácticas benéficas para el medio ambiente mediante el uso de sistemas no contaminantes.

Para ello se prohíbe el uso de semillas modificadas genéticamente –conocidas como semillas transgénicas– para una mejora en la producción (logrando que sean más aptas a los suelos y a condiciones climáticas o a las plagas), pues esto involucra una intervención del hombre por medios sintéticos, que es totalmente contrario a la filosofía del cultivo orgánico (Alimentos Orgánicos, 2014).

Por esto, para el cultivo de alimentos orgánicos se utilizan sistemas de fertilización mediante el uso de compostajes que devuelven al suelo los nutrientes que se pierden, el uso de terrazas para evitar la erosión, y la rotación de los cultivos para la preservación de los suelos. Para el control de plagas se utilizan sistemas y productos naturales que contrarrestan y combaten a los organismos que pueden perjudicar o disminuir los cultivos (Rojas Le-Bert, 2011).

En la mayoría de los alimentos, su calidad orgánica se manifiesta en el contenido de mayor cantidad de vitaminas y minerales, así como un sabor más intenso. Para ello se deben respetar los tiempos de maduración y evitar la utilización de procesos o aditivos que fuercen el crecimiento de plantas y animales (Cornelio Grasso *et al.*, 2013).

La gran diferencia entre los alimentos orgánicos y los convencionales, es que se encuentran totalmente libres de residuos químicos, libres de aditivos sintéticos, sin alteraciones genéticas, y los mismos no pueden ser irradiados como método de conservación. No contienen hormonas ni antibióticos y no poseen residuos de metales pesados.

Los alimentos que actualmente se elaboran y cultivan bajo la categoría de alimentos orgánicos son: huevo, carne, azúcar, hojas de té, café, yerba mate, miel, frutas, hortalizas, vinos, aceites, lácteos, dulces y conservas, entre otros. De esta manera, se va desarrollando un mercado en amplia expansión, ante un consumidor cada vez más informado, más comprometido con la salud y el futuro de la ecología. (Alimentos Orgánicos, 2014)

1.2 CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS VEGETALES

1.2.1 *Chícharo (Pisum sativum)*

6

Reino: *Plantae*.

División: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliopsida*.

Orden: *Fabales*.

Familia: *Fabaceae*.

Género: *Pisum*.

Especie: *P. sativum*.

El chícharo, arveja o guisante (*Pisum sativum* L.) pertenece a la familia de las leguminosas y a la subfamilia de las fabáceas. Se han encontrado evidencias de su uso en vestigios que datan de 10 mil años hallados en Anatolia, Iran, Grecia y Palestina. Su origen no está claramente definido: es muy probable que esta especie provenga de regiones asiáticas (quizás del Cáucaso o de Persia), de donde se extendió a Europa.

La planta de chícharo es una hierba anual y decumbente. Sus tallos son trepadores y angulosos. Las raíces están poco desarrolladas, aunque su raíz pivotante, que crece hacia abajo de forma recta, puede llegar a ser muy profunda. Las hojas tienen pares de folíolos y terminan en zarcillos, una especie de cables con los que pueden sujetarse a tutores o guías que encuentran en su crecimiento. Respecto a su desarrollo vegetativo, su tamaño va desde plantas bajas (menor de 0.40 m), semi-trepadoras (entre 0.80 – 1.00 m), o trepadora / de enrame (de 1.50 – 2.00 m). Prefiere zonas templadas y subtropicales con invierno definido; crece mejor con temperaturas entre 16 y 20 °C pero soporta temperaturas de 5 a 35 °C. Las plántulas son tolerantes a heladas, sin embargo, durante la floración y formación de vainas, las heladas, aún ligeras, resultan dañinas. Su recolección se lleva a cabo cuando las vainas están llenas y tiernas. Si se dejan más tiempo en la planta, los chícharos endurecen (Santiago Calvo *et al.*, 2014).

Se consume tanto crudo como cocinado, es de sabor suave y agradable, además es fácil de combinar con otros alimentos y contiene una gran cantidad de proteínas. Lo que se consume es el contenido de la vaina, es decir las semillas verdes y redondas, éstas pueden encontrarse en otros tonos como amarillo, lo cual es menos frecuentemente.

Particularizando en sus beneficios, los chícharos contienen fibra, proteínas y minerales. Son excelentes en la alimentación infantil gracias a su aporte de vitaminas A, C y B9, proteínas y carbohidratos, además son bajos en grasas. Poseen vitamina B1, fibra y una cantidad importante de hidratos de carbono y grasas que proporcionan una dosis óptima de energía. También contiene ácido fólico, vitamina K y vitamina C, así como pequeñas cantidades de alfa y beta-carotenos (precursores de la vitamina A). Entre los minerales que contienen destacan hierro, fósforo, magnesio, zinc y potasio. (Cultivo de Chícharo, 2016)

1.2.2 Calabaza (*Cucurbita pepo*)

Reino: *Plantae*.

División: *Espermatophyta*.

Clase: *Magnoliatae*.

Orden: *Curcubitales*.

Familia: *Curcubitaceae*.

Género: *Curcubita*.

Especie: *C. pepo*.

La calabacita es considerada originaria de México y de América Central, de donde fue distribuida a América del Norte y del Sur. Es una planta herbácea, anual, monoica (con flores masculinas y femeninas separadas), erecta y después rastrera.

Las especies más conocidas son: *Cucurbita pepo*, *C. maxima*, *C. moshata* y *C. mixta*, distinguiéndose por algunas características especiales que la diferencian como: hábito de crecimiento, forma, tamaño de sus frutos y semillas.

Su cultivo ha cobrado importancia por la creciente demanda de la población por esta hortaliza, debido a su alto contenido de fibra, calcio y fósforo. (Casaca, 2005)

La cosecha de ese cultivo es de 45 – 50 días por lo menos. Si se cuida y se ponen las barreras rompe vientos la duración es hasta de 75 a 90 días en cosecha (Ordoñez Manuel, 2013).

Los tallos de la planta de calabaza son erectos en sus primeras etapas de desarrollo (hasta antes del tercer corte de frutos) y después se tornan rastreros; son angulares (cinco bordes o filos), cubiertos de vellos. Está constituido por una raíz principal, algunas raíces secundarias y una cantidad abundante de pelos absorbentes, de crecimiento postrado guiadora, con vellosidades en tallos, ramas y hojas (Savín Cortés, 2013).

Las hojas se sostienen por medio de peciolos (tallos de las hojas) largos y huecos. Son grandes, moderadamente moduladas y generalmente con manchas blancas en su superficie. El color del fruto es variable, desde el amarillo al verde oscuro, pasando por el verde claro, que es el tipo de calabacín más consumido en el mundo.

La calabaza se consume todavía inmadura, variable, de cáscara dura o blanda de diferentes colores; pulpa blanca o amarilla, textura gruesa, con fibras suaves, no gelatinosa. Es consumido principalmente en fresco; se recolecta tierno, sin alcanzar su tamaño definitivo. Se consume frito en aceite, aunque también se utiliza en cremas o confituras; sin embargo, del fruto maduro se obtienen las semillas que son procesadas y envasadas para el consumo y además son utilizadas para preparar condimentos utilizados en la cocina tradicional.

Las semillas son del tipo de fruto color blanco o beige que se separan fácilmente de la pulpa, con la inserción funicular obtusa y ligeramente asimétricas, éstas germinan entre el cuarto y séptimo día, tardan un poco más cuando la temperatura es bajo los 20 °C. Son generalmente de color blanco, crema o ligeramente café. Se desarrollan a temperaturas cálidas entre 21 y 32 °C y entre 300 a 1,800 m.s.n.m. En temperaturas más bajas o mayores alturas (más de 2000 m.s.n.m.) el ciclo se extiende mucho (Casaca, 2005).

1.2.3 Girasol (*Helianthus annuus*)

Reino: *Plantae*.

División: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliopsida*.

Orden: *Asterales*.

Familia: *Asteraceae*.

Género: *Helianthus*.

Especie: *H. annuus*.

El girasol es originario de América, donde algunos pueblos indígenas lo consideran una planta sagrada. Esta planta es conocida por su peculiar manera de orientarse durante todo el día hacia el sol.

Es una planta anual con tallo robusto, erecto y simple, con lo que solo vive un año. Pero deja multitud de semillas para poder plantarla al año siguiente. La altura de esta planta es de 2.00 – 3.00 m, aunque puede alcanzar hasta los 6.00 m. No obstante, hay variedades enanas de 0.40 m de altura, que la hacen más adecuadas para los jardines. Tiene hojas anchas, ovales, opuestas, pecioladas, con tres nerviaciones muy aparentes, aserradas y toscas al tacto, las cabezuelas grandes algo inclinadas, con disco oscuro y las lígulas radiales de color amarillo, que aparecen en verano.

En jardinería es usada para tapar grandes espacios, para macizos y en grupos cerca de arbustos. También se pueden cultivar en macetas las variedades enanas, muy decorativas para balcones y terrazas (Girasol planta (*Helianthus annuus* L.), 2016).

Se siembran desde inicios de primavera hasta inicios del verano directamente, aunque la semilla y las plántulas soportan temperaturas muy bajas, o sea, se pueden hacer siembras adelantadas. Germinan en unos 7 o 10 días. Se debe situar a pleno sol.

El riego debe ser moderado, aunque aguanta la sequía gracias a su raíz profunda, así absorbe mayor cantidad de agua del suelo. Respecto a la composición del suelo deben ser profundos y con un elevado contenido de nutrientes, principalmente nitrógeno, fósforo y potasio (Hernández Zapata, 2009).

1.3 BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO

Los microorganismos que se colonizan en las raíces de las plantas después de la inoculación a la semilla y que mejoran el crecimiento de la planta, se llaman bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) (Ahemad y Kibret, 2014).

Las BPCV pueden ser de vida libre o asociativa, aerobia, anaerobia o anaerobia facultativas. Estas se han aislado en suelos donde predomina la vegetación (Loredo Osti *et al.*, 2004).

El suelo con mayor actividad microbiana denominada rizósfera, tiene gran riqueza en nutrimentos, y es donde la planta y microorganismo interaccionan mutuamente para su beneficio. Las BPCV, utilizan uno o varios mecanismos de acción para favorecer este crecimiento, ya sea estimulando la absorción de nutrimentos o evitando la acción de microorganismos patógenos.

La interacción entre los microorganismos y las plantas puede ser benéfica (promoviendo el crecimiento vegetal), perjudicial (provocando enfermedades) o neutra. Dentro del tipo benéfico, el mutualismo es la interacción más importante de la rizósfera, y se lleva a cabo entre las plantas y las bacterias asociadas a las raíces (Badri *et al.*, 2009).

Estas bacterias han sido propagadas y usadas como inoculantes bacterianos, principalmente para mejorar la producción y el rendimiento de cultivos agrícolas. Las BPCV promueven el crecimiento vegetal mediante dos tipos de mecanismos: indirectos y directos, o una combinación de ambos.

Los mecanismos directos incrementan la disponibilidad de nutrimentos en la rizósfera al influir en el metabolismo de las plantas y mejorar su nutrición. Estos mecanismos son: fijación de nitrógeno; síntesis de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas), vitaminas y enzimas; solubilización de fósforo inorgánico y mineralización de fosfato orgánico; oxidación de sulfuros; incremento en la permeabilidad de la raíz; producción de nitritos; acumulación de nitratos; y reducción de la toxicidad por metales pesados y de la actividad de la enzima ACC desaminasa (Díaz Vargas *et al.*, 2001).

Los mecanismos indirectos se caracterizan porque las BPCV ocasionan la disminución o eliminación de microorganismos fitopatógenos (hongos, bacterias y nemátodos), ya sea a través de la producción de sustancias antimicrobianas, de sideróforos, de enzimas líticas, o una combinación de éstas; por competencia de nutrimentos o de espacio en el nicho ecológico, así como por estimulación de las defensas naturales de la planta, mediante mecanismos conocidos como resistencia sistémica inducida (RSI).

La estimulación indirecta del crecimiento de las plantas también está conectada con la protección contra los efectos de los fitopatógenos. En este caso, las bacterias compiten por el espacio en la raíz contra patógenos (Loredo Osti *et al.*, 2004).

En base a estudios anteriores, se conoce un gran número de bacterias de vida libre o asociativa que fijan N_2 , pero sólo algunas destacan por su potencial como biofertilizantes o promotoras de crecimiento.

Entre los géneros más conocidos están *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia* y *Azospirillum*; dentro del grupo de aerobias facultativas se presentan *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*; y los géneros de bacteria anaerobia *Metanobacterium*, *Clostridium* y *Desulfovibrio* (Cota Ochoa, 2012).

También incluyen al grupo *Erwinia* y a las bacterias productoras de ácido indol-acético (IAA) que pueden mejorar los efectos de la auxina vegetal, afectando directamente el crecimiento de raíces mediante la estimulación de la división celular y el alargamiento de la planta.

Uno de los fenómenos más importantes que se produce en la rizósfera es la presencia de una gran variedad de sustancias orgánicas, como aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, derivados de ácidos nucleicos, factores de crecimiento y enzimas que, directa o indirectamente, tienen influencia positiva o negativa sobre los microorganismos que ahí habitan (Ahemad y Kibret, 2014).

Estudios anteriores muestran que géneros de *Azospirillum* y *Azotobacter* penetran la corteza de la raíz y producen fitohormonas como giberelinas (se producen en la zona apical, frutos y semillas. Sus funciones son: Interrumpir el período de latencia de las semillas, haciéndolas germinar), auxinas (ácido indol-acético) y citocininas, lo que estimula el crecimiento, producción de raíces laterales y pelos radicales que, a su vez, favorecen la absorción de nutrientes e incrementan el rendimiento en gramíneas (Tomas Puig, 2009).

Se ha mostrado evidencia de que algunas especies de *Pseudomonas* incrementan la absorción de nutrientes, tales como Nitrógeno, Fósforo y Potasio, además de servir como sistema de biocontrol de hongos fitopatógenos y producir fitohormonas en la rizósfera, lo cual promueve mayor crecimiento de las plantas.

Por otro lado se tiene que *P. fluorescens* puede promover el crecimiento de las plantas, vía producción de sideróforos extracelulares que secuestran óxidos férricos para convertirlos en formas disponibles para las raíces, además que incrementa el volumen radical.

Las bacterias asociadas a las raíces superficiales pueden capturar por separado ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) y por actividad ACC desaminasa convertirlo en α -cetobutirato y amoníaco.

Las bacterias con ACC desaminasa pueden promover el crecimiento de plantas mediante la fijación de nitrógeno atmosférico, produciendo sideróforos, quelato de hierro y minerales de solubilización tales como el fósforo, que produce fitohormonas y sintetizan algunos compuestos o enzimas que pueden desarrollar el crecimiento de las plantas (Glick, 2005).

También son capaces de producir metabolitos secundarios con propiedades antibióticas o con sustancias antifúngicas, insecticidas e inmunosupresores. El amoníaco resultante de la hidrólisis de ACC es la fuente de nitrógeno para las bacterias, lo cual es beneficioso cuando el suelo es deficiente en este elemento. Por otra parte, la distribución de ACC conduce a la inhibición de la síntesis de etileno en plantas.

Los microorganismos promotores de crecimiento pueden mejorar la producción de biomasa y la tolerancia de las plantas a los metales pesados y otras condiciones del suelo. (Kamran *et al.*, 2015)

Algunas de las características que deben cumplir los microorganismos para ser considerados promotores de crecimiento vegetal son:

- Producción de fitohormonas (ácido indol-acético).
- La enzima ACC desaminasa.
- La solubilización de fosfatos.
- Fijación de nitrógeno.
- Producción de sideróforos.

1.4 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LAS BACTERIAS

1.4.1 *Enterobacter*

Las bacterias *Enterobacter* son bastoncillos gramnegativos con forma de varilla pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* de las cuales varias cepas son patógenos oportunistas en los nosocomios. Se encuentran sobre la piel humana, las plantas, los suelos, el agua, las cloacas, los tractos intestinales y en algunos productos lácteos.

Esta clasificación no puede retener un tinte violeta cristalino durante el proceso de tinción Gram. Las bacterias Gram-negativas aparecen rosadas o rojas bajo el microscopio. Incluyen *E. coli*, *Campylobacter*, *E. aerogenes* forma parte del endógeno humano gastrointestinal (GI) microflora. También reside en el suelo, el agua y en los productos lácteos (Jerónimo, 2013).

15

1.4.2 *Serratia*

Serratia sp., es un género que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y como tal, es un bacilo Gram negativo, anaeróbico facultativo, oxidasa negativa, que crece abundantemente sobre agar sangre, agar chocolate y agar McConkey, produciendo colonias que pueden ser pigmentadas, especialmente *S. marcescens* y *S. rubias*, las cuales producen un pigmento rojo muy característico llamado prodigiosina.

En la clasificación actual del género *Serratia*, se encuentran varias especies entre ellas: *S. entomophila*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, el grupo *S. liquefaciens* (*liquefaciens*, *proteamaculans* y *grimesii*), *S. marcescens*, *S. plymuthica* y *S. rubidae*.

En cuanto a su potencial patogénico, *S. entomophila*, no ha sido asociada con problemas en el humano, *S. plymuthica* y *S. fonticola* muy raramente, mientras que el grupo *S. liquefaciens*, es la que se presenta con mayor frecuencia, pero es *S. marcescens* quien presenta mayor importancia clínica y mayor resistencia antimicrobiana (Duarte *et al.*, 2001).

1.4.3 *Klebsiella*

Los microorganismos del género *Klebsiella* son bacilos gramnegativos inmóviles que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. El género *Klebsiella* está formado por varias especies, entre las que se encuentran *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola* y *K. terrigena*.

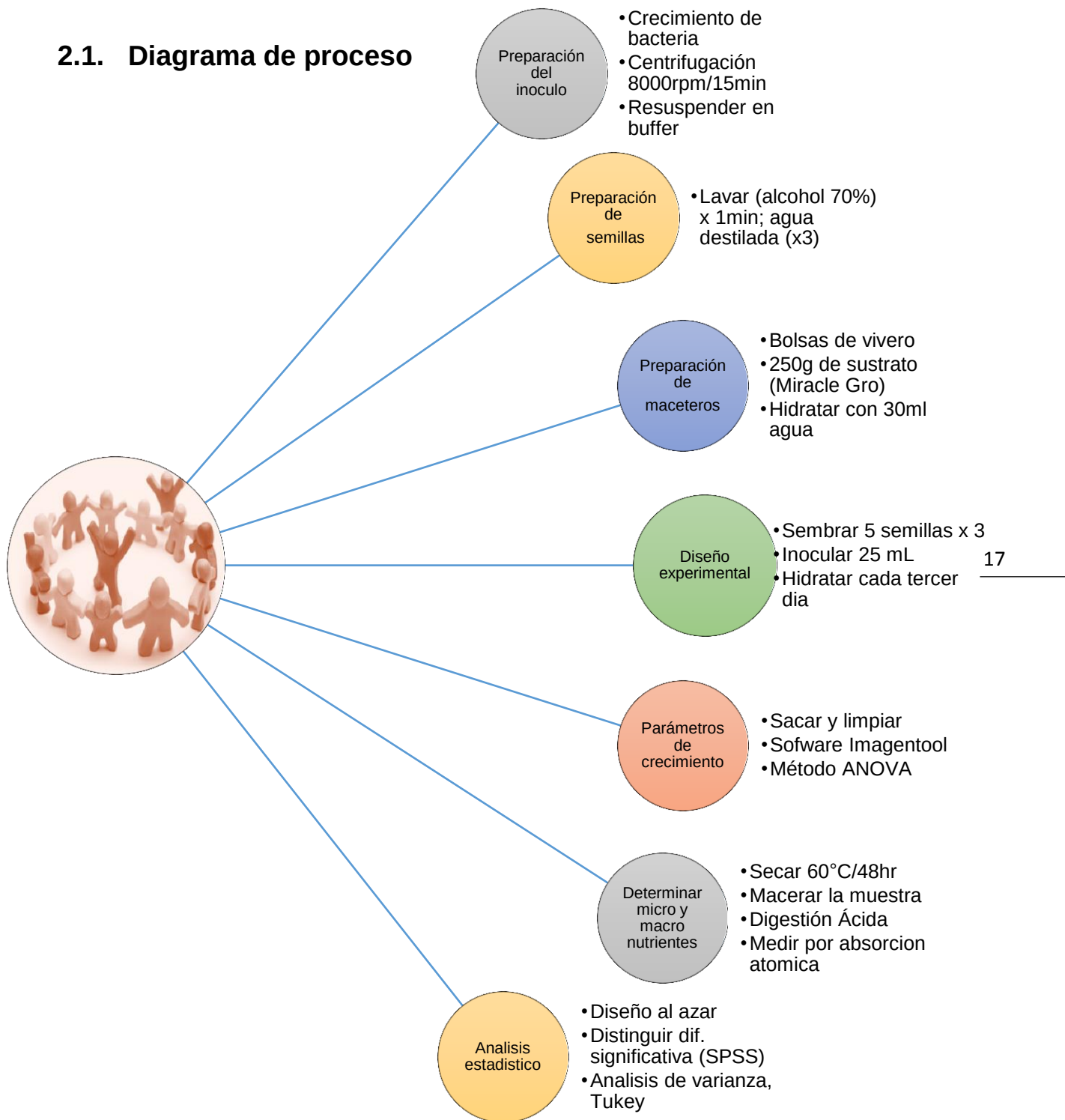
La capa más externa de *Klebsiella spp.* está formada por una gran cápsula de polisacáridos que diferencia a estos microorganismos de otros géneros de esta familia.

Las especies *Klebsiella* están ampliamente distribuidas en la naturaleza y en el tracto gastrointestinal de seres humanos y animales; sobre agar MacConkey, típicamente aparecen como colonias grandes, mucoides y rojas, con pigmento rojo usualmente difusible en el agar circundante, lo que indica fermentación de la lactosa y producción de ácido.

Todas las especies de *Klebsiella* son inmóviles y la mayoría no descarboxilan la ornitina (Winn *et al.*, 2008).

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1. Diagrama de proceso



2.2. Caracterización como bacterias promotoras del crecimiento.

Del acervo de laboratorio de investigación de cuerpos académicos 2 de la facultad de ingeniería química de la BUAP, se tomaron seis cepas bacterianas *Serratia* (MC119, K120, MC107), *Enterobacter* (N9, K7) y *Klebsiella* (MC173); caracterizadas previamente como solubilizadoras de fosfatos, productoras de sideroforos, AIA y ACC desaminasa. (Mendoza Hernández *et al.*, 2016)

2.3. Preparación del inóculo

Las cepas seleccionadas se crecieron en tubos con caldo Luria Bertani (LB) a 28°C durante 48h, posteriormente se hizo una propagación masiva en 500 mL de caldo LB en matraz Erlenmeyer a 28°C durante 48 h a 60 rpm. (Fig. 1)



Figura 1. Propagación de cepas bacterianas en Luria Bertani.

Las bacterias fueron separadas mediante centrifugación a 8000 rpm durante 15 minutos; el sobrenadante se desecha y el pellet se resuspendió en buffer de fosfatos con pH de 7.4, 0.1 molar, ajustando la suspensión a 0.5 de absorbancia, que corresponde aproximadamente a 1×10^9 UFC/mL. (Fig. 2) (Mendoza Hernández *et al.*, 2016).

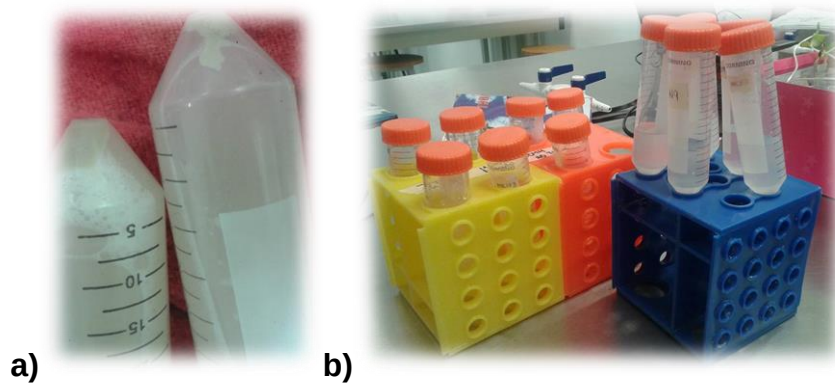


Figura 2. a) Cepas bacterianas separadas; b) Cepas en buffer de fosfatos.

2.4. Preparación de las semillas

Las semillas se lavaron superficialmente con alcohol al 70% durante un minuto y posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada para retirar cualquier residuo de alcohol y garantizar la desinfección de las semillas (Malajovich & Soares Mann, 2016).

19

2.5. Preparación de maceteros

Para este ensayo de inoculación de plántulas de chícharo, calabaza y girasol con las cepas bacterianas seleccionadas, se utilizó como suelo sustrato Miracle Gro®, los maceteros fueron bolsas de vivero, las cuales se llenaron con 250 g de sustrato aproximadamente. Los maceteros fueron hidratados previamente con 30 mL de agua, para sembrar. (Fig. 3)



Figura 3. Maceteros con sustrato, previamente hidratados con agua.

2.6. Diseño experimental

El diseño experimental se hizo con tres repeticiones por cada tratamiento, sembrando 5 semillas de las plantas correspondientes (chícharo, calabaza y girasol) en cada una de las bolsas de vivero utilizando sustrato Miracle Gro®, se inocularon con 25 mL de la suspensión bacteriana alrededor de la semilla por triplicado de cada cepa bacteriana dejando un testigo por triplicado de cada tratamiento, en los vegetales a utilizar.

Se dejaron germinar las semillas a una temperatura ambiente, en un periodo de 20 días, con un riego cada tercer día. (Fig. 4)

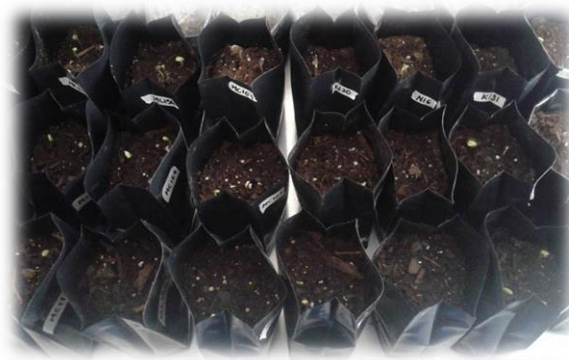


Figura 4. Diseño experimental por triplicado

2.7. Parámetros de crecimiento

Transcurridos 20 días correspondientes a la germinación y crecimiento de las plantas, se sacaron cuidadosamente de los maceteros y se limpiaron completamente, para medir la longitud de la raíz y el tallo con la ayuda del software Imagen tool. (Fig. 5)

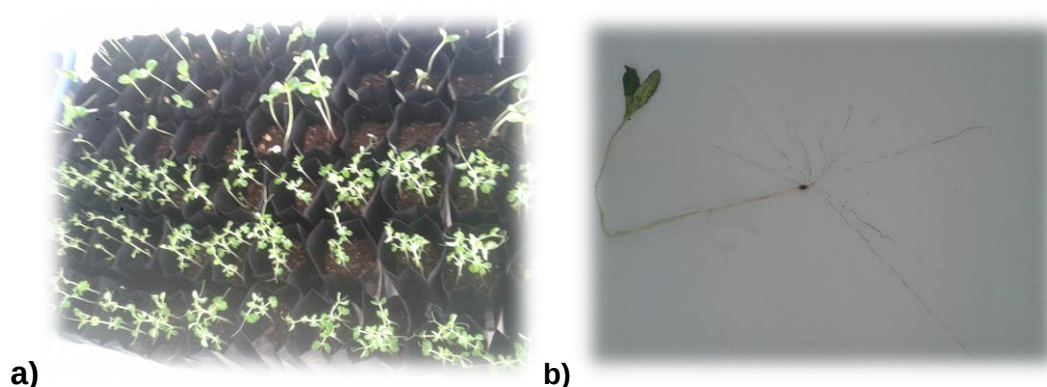


Figura 5. a) Plantas 20 días de la germinación; b) Planta limpia para medir.

2.8. Determinación de micro y macronutrientes

Las muestras vegetales (tallo y raíz) se secaron a una temperatura de 60° C durante 48 hr, posteriormente fueron maceradas, para tener una muestra homogénea y llevar a cabo una digestión ácida mediante el método EPA3052 para medir por absorción atómica, los micronutrientes (Cu, Mg, Ni, Zn, Fe) y macronutrientes (Na, K, P). (EPA., 1996) (Fig. 6)

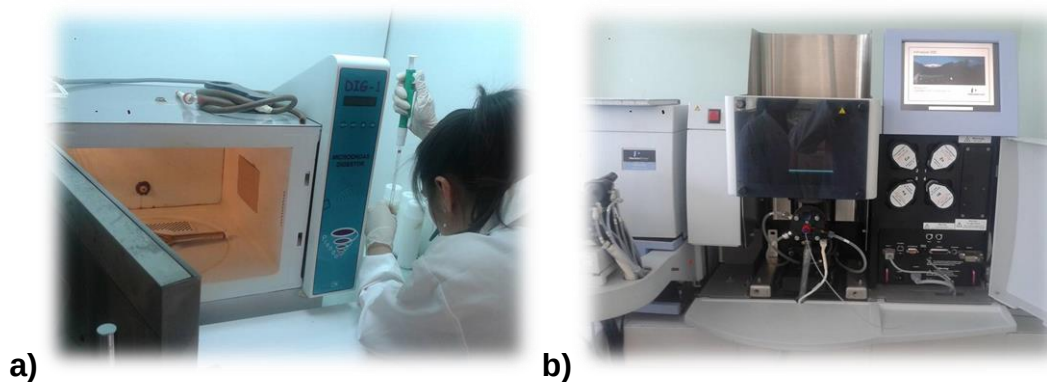


Figura 6. a) Digestión ácida; b) absorción atómica

2.9. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico mediante un diseño completamente al azar, teniendo como variables independientes: bacterias y tiempo, como variables dependientes: longitud del tallo, longitud de raíz, micronutrientes y macronutrientes.

Con la finalidad de distinguir diferencias significativas entre los tratamientos comparados con el testigo, los resultados fueron analizados usando el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (Herrerías, 2005) con una comparación de medias mediante un análisis de varianza con la prueba de Tukey Kramer con nivel de confianza del 95%.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

Las bacterias del genero *Serratia* (MC119, K120, MC107), *Klebsiella* (MC173) y *Enterobacter* (N9, K7) usadas como inoculantes en las plantas de chícharo (*Pisum sativum*), calabaza (*Cucurbita pepo*) y Girasol (*Helianthus annuus*) se estudiaron en el presente trabajo.

Las cepas bacterianas utilizadas como inóculo, mostraron efectos benéficos en el cultivo de chícharo, calabaza y girasol, ya que promovieron la germinación de semillas en un 95%.

Los resultados analizados de las mediciones (raíz y tallo) correspondientes a la longitud, así como la concentración de micro y macronutrientes de los vegetales se presentan a continuación:

3.1. Evaluación de la planta de chícharo (*Pisum sativum*)

23

3.1.1. Análisis de la longitud promedio de raíz y tallo de chícharo

El análisis de la longitud de la raíz en las plantas de chícharo (*Pisum sativum*), indica que se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las plantas inoculadas con las cepas *Serratia* MC107, *Serratia* MC119 y *Enterobacter* N9, con respecto al testigo sin inocular; en cambio las plantas inoculadas con las cepas *Serratia* K120, *Enterobacter* K7 y *Klebsiella* MC173 se encontró un efecto adverso debido a que presentan un menor crecimiento que el testigo. Con respecto a la longitud del tallo, las cepas bacterianas muestran un comportamiento similar al testigo ya que presentan un valor ligeramente elevado en comparación con el testigo pero sin diferencia significativa. (Fig. 7)

3.1.1. Análisis de la longitud promedio de raíz y tallo de chícharo (*Pisum sativum*)

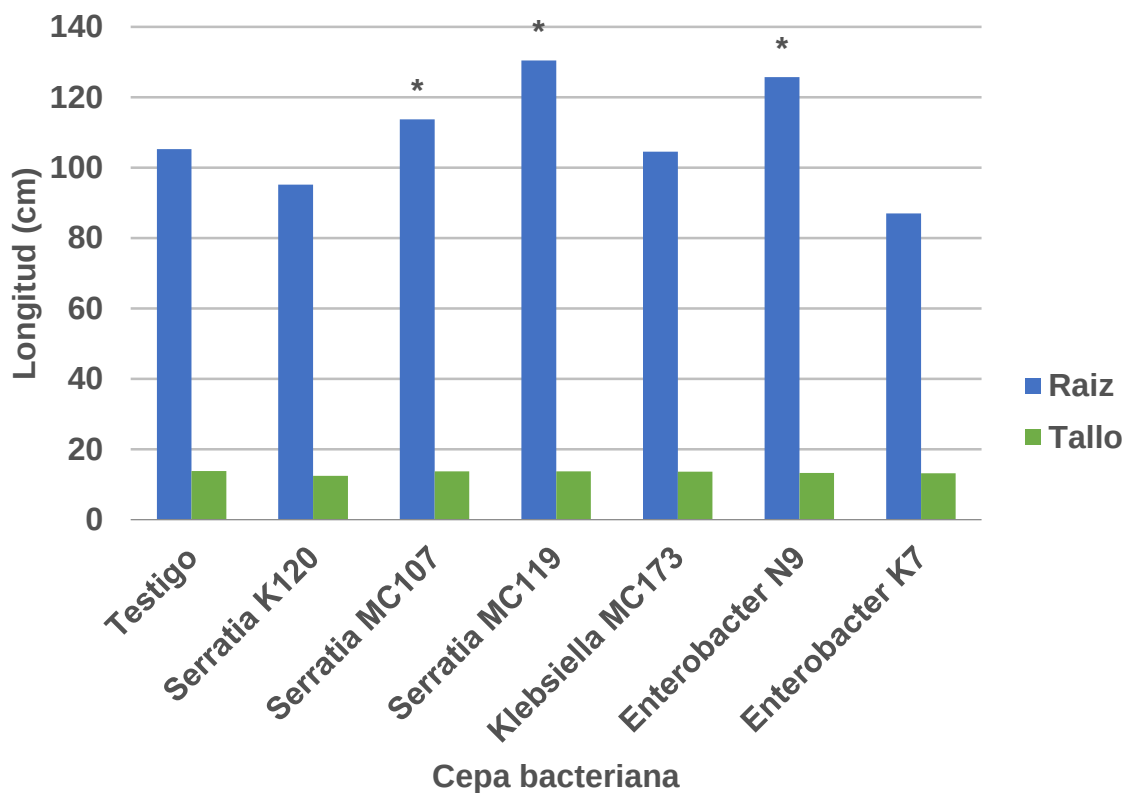


Figura 7. Longitud promedio de raíz y tallo de la planta de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.2.1. Efecto de las cepas bacterianas en la concentración de micronutrientes en chícharo (*Pisum sativum*)

3.2.1.1. Concentración Mn

El análisis de la concentración de Mn, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con la cepa *Serratia* K120, *Serratia* MC107, *Enterobacter* K7 y *Klebsiella* MC173, con respecto al testigo sin inocular; dado que *Serratia* MC119 y *Enterobacter* N9 tienen un efecto negativo. En el tallo las plantas inoculadas con las cepas *Serratia* K120, *Serratia* MC107, *Klebsiella* MC173, *Enterobacter* K7 y *Enterobacter* N9 muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) excepto *Serratia* MC119 ya que tienen menor concentración de Mn. (Fig. 8)

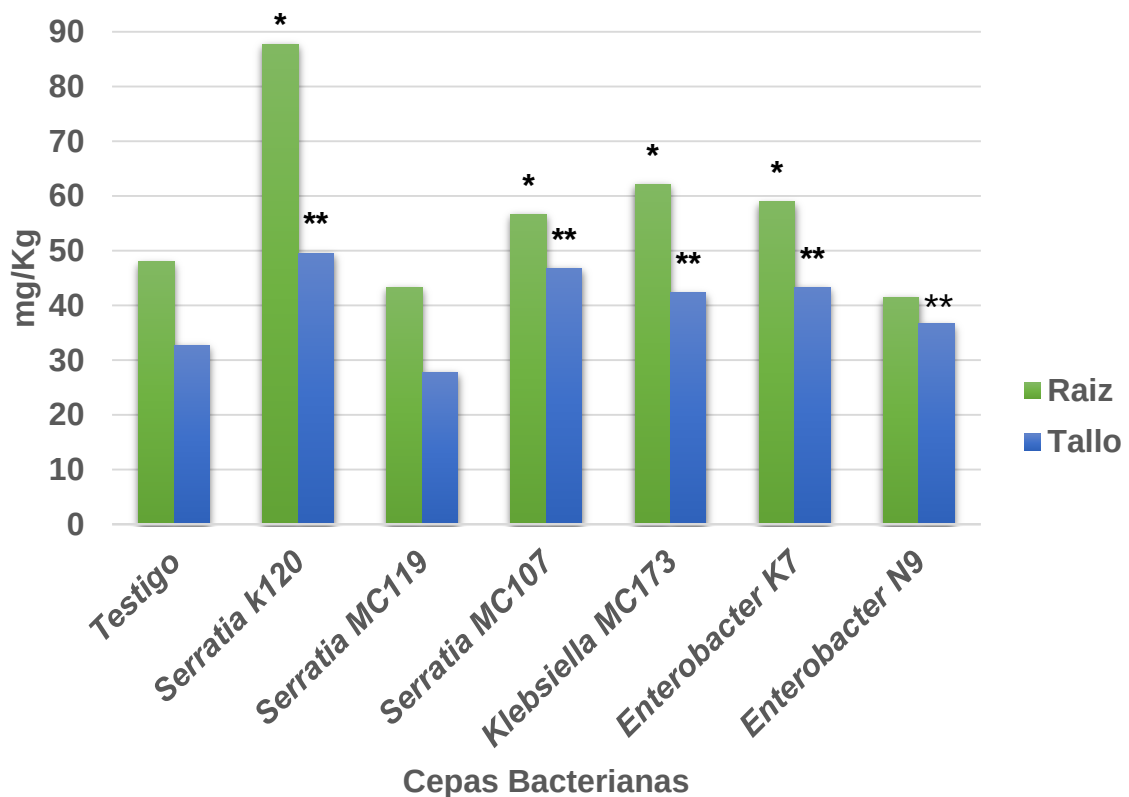


Figura 8. Concentración de Mn en las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.2.1.2. Concentración Cu

El análisis estadístico de la concentración de Cu en la raíz y tallo de las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) en las seis cepas utilizadas como tratamiento, con respecto al testigo sin inocular. (Fig. 9)

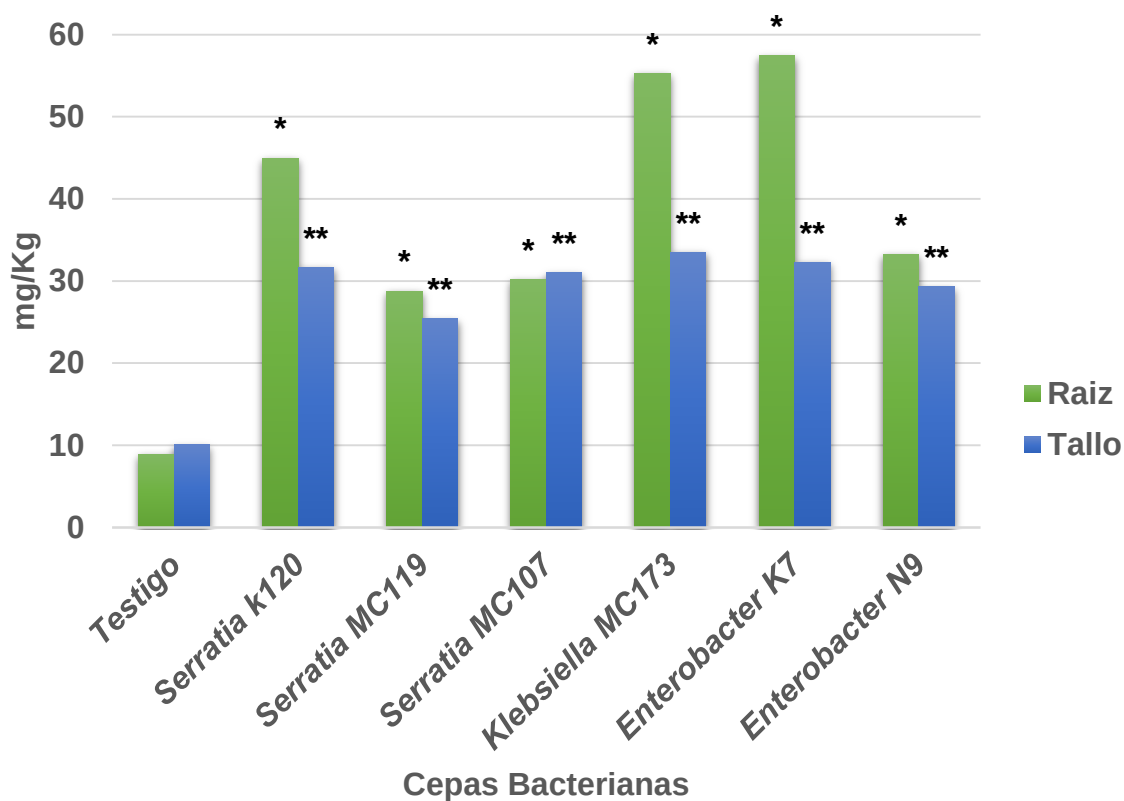


Figura 9. Concentración de Cu en las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.2.1.3. Concentración Ni

El análisis de la concentración de Ni, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en la raíz las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con la cepa *Serratia* K120, *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* K7 con respecto al testigo. En la raíz de las plantas inoculadas con las cepas *Enterobacter* N9 y *Serratia* MC107, muestran un efecto negativo ya que las plantas presentan menor concentración de Ni. En cuanto al tallo se observa diferencia significativa ($p < 0.05$) en las seis cepas bacterianas con respecto al testigo. (Fig. 10)

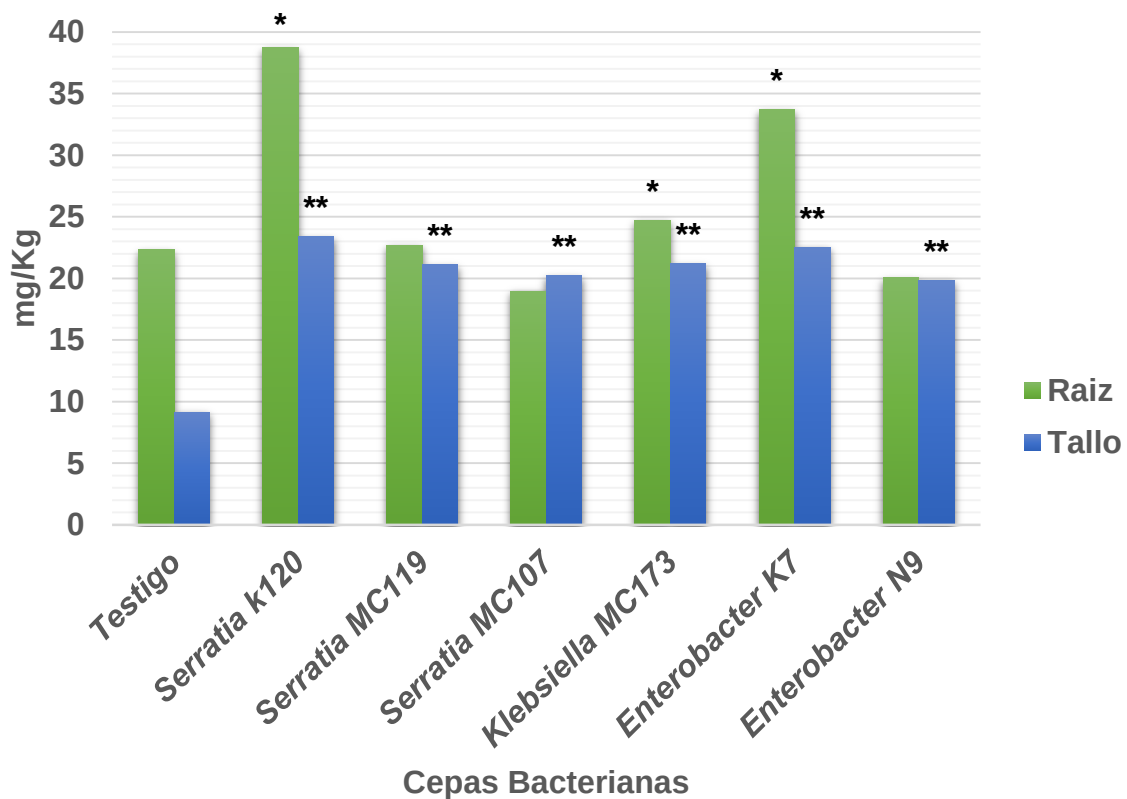


Figura 10. Concentración de Ni en las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.2.1.4. Concentración Zn

El análisis de la Concentración de Zn, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con la cepa *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* K7, con respecto al testigo. En cambio, las plantas inoculadas con las cepas restantes muestran un efecto adverso debido a que las plantas presentan menor concentración de Zn. En el tallo se observa que las seis cepas bacterianas muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo sin inocular. (Fig. 11)

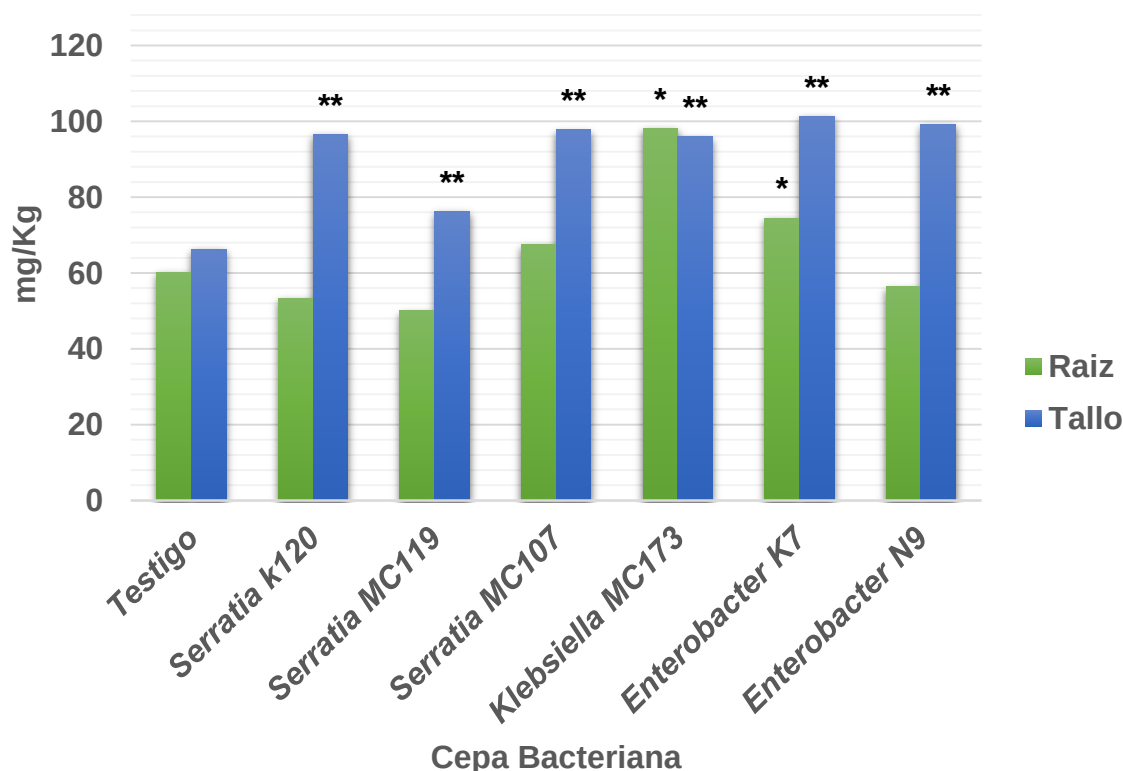


Figura 11. Concentración de Zn en las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.2.1.5. Concentración Fe

El análisis de la concentración de Fe, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con la cepa *Serratia* K120, *Serratia* MC119, *Enterobacter* K7 y *Klebsiella* MC173, con respecto al testigo. En las plantas inoculadas con las cepas *Enterobacter* N9 y *Serratia* MC107, muestran un efecto negativo ya que las plantas presentan menor concentración de Fe; mientras que en el tallo todas las cepas bacterianas muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo. (Fig. 12)

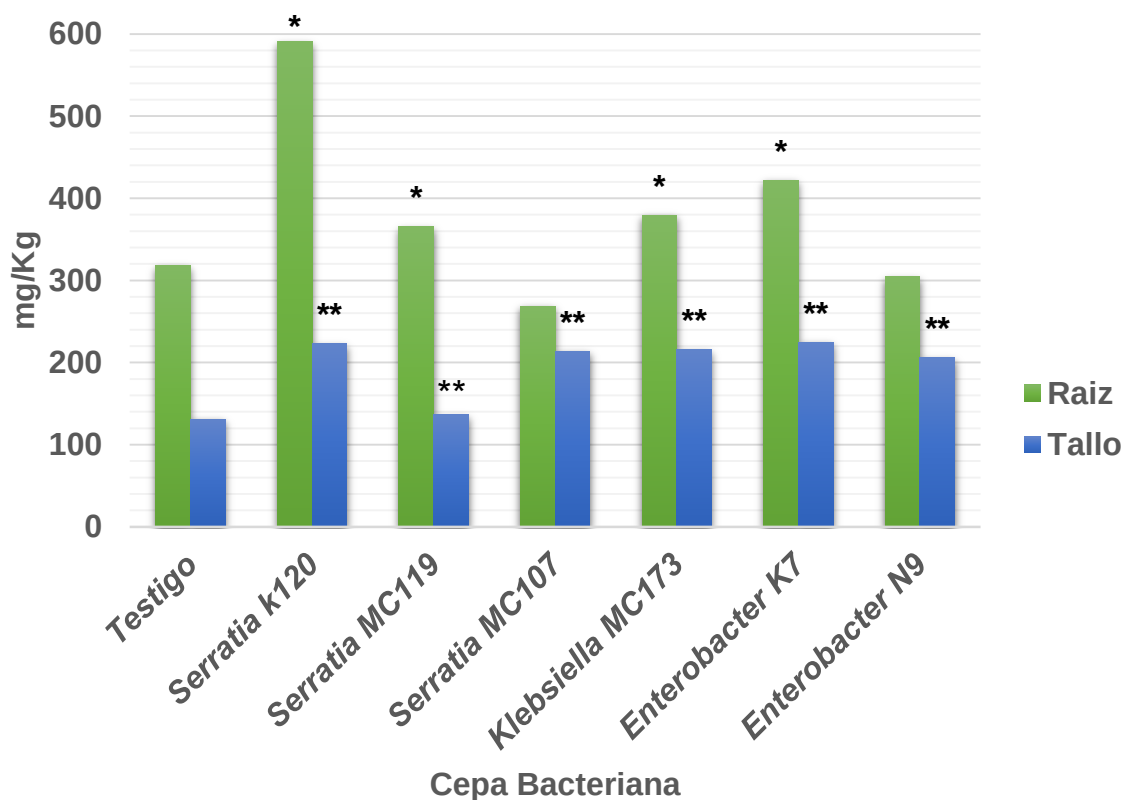


Figura 12. Concentración de Fe en las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.2.2. Efecto de las cepas bacterianas en la concentración de macronutrientes en chícharo (*Pisum sativum*)

3.2.2.1. Concentración Na

El análisis de la concentración de Na, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con la cepa *Serratia* K120, *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* K7, con respecto al testigo. En las plantas inoculadas con las cepas restantes, muestran un efecto negativo ya que las plantas presentan menor concentración de Na; En el tallo se observa que todas las cepas bacterianas muestran un aumento significativo ($p < 0.05$) con respecto al testigo. (Fig.13)

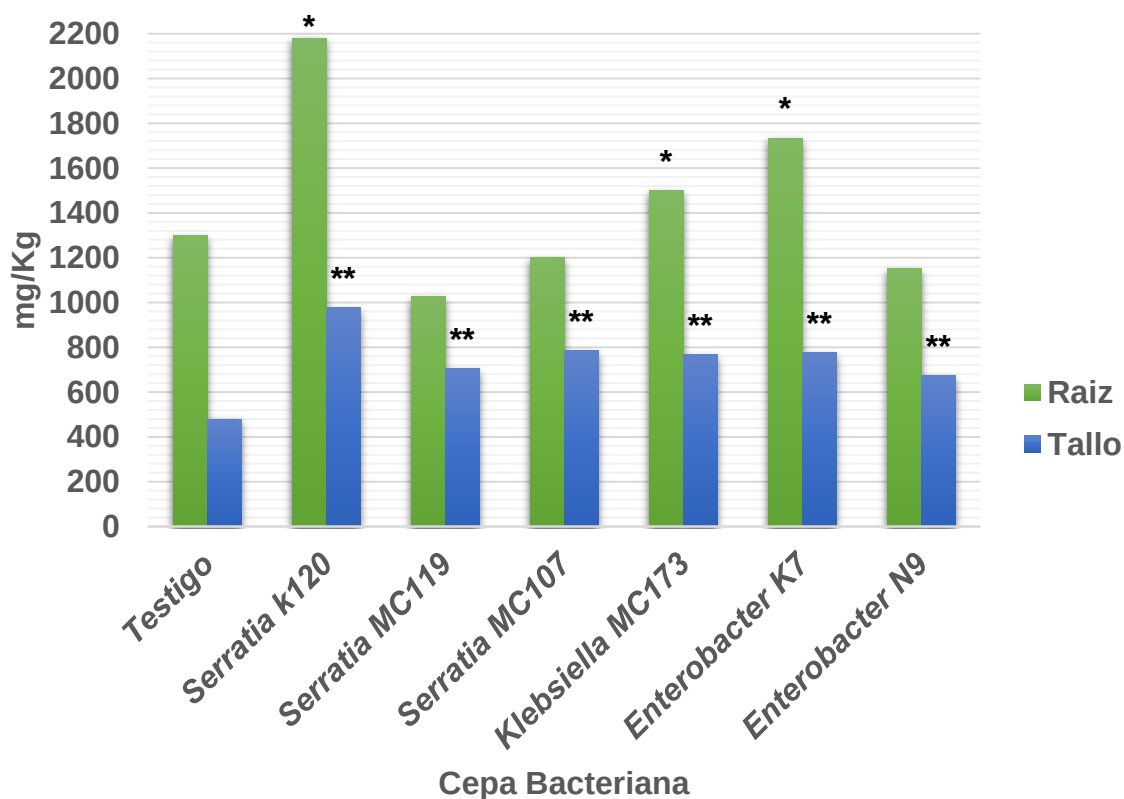


Figura 13. Concentración de Na en las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.2.2.2. Concentración K

El análisis de la concentración de K, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con la cepa *Serratia* K120, *Serratia* MC107, *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* K7, con respecto al testigo. En las plantas inoculadas con *Serratia* MC119 y *Enterobacter* N9, muestran un efecto negativo ya que las plantas presentan menor concentración de K; mientras que en el tallo cinco cepas bacterianas muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) excepto *Enterobacter* N9 que muestra menor concentración de K con respecto al testigo. (Fig. 14)

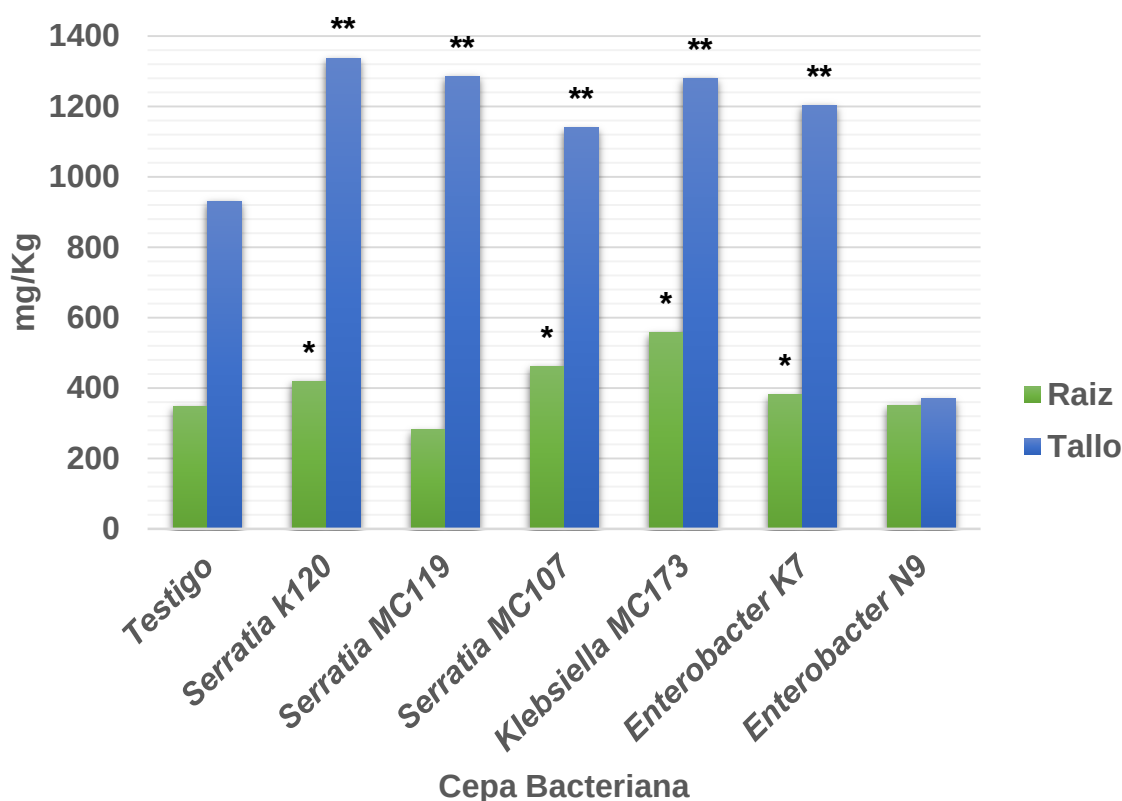


Figura 14. Concentración de K en las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.2.2.3. Concentración P

El análisis de la concentración de P, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con la cepa *Serratia* K120, *Klebsiella* MC173 *Enterobacter* K7 y *Enterobacter* N9, con respecto al testigo. En las plantas inoculadas con las cepas *Serratia* MC119 y *Serratia* MC107, muestran un efecto negativo ya que las plantas presentan menor concentración de P; mientras que en el tallo las seis cepas bacterianas muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo. (Fig. 15)

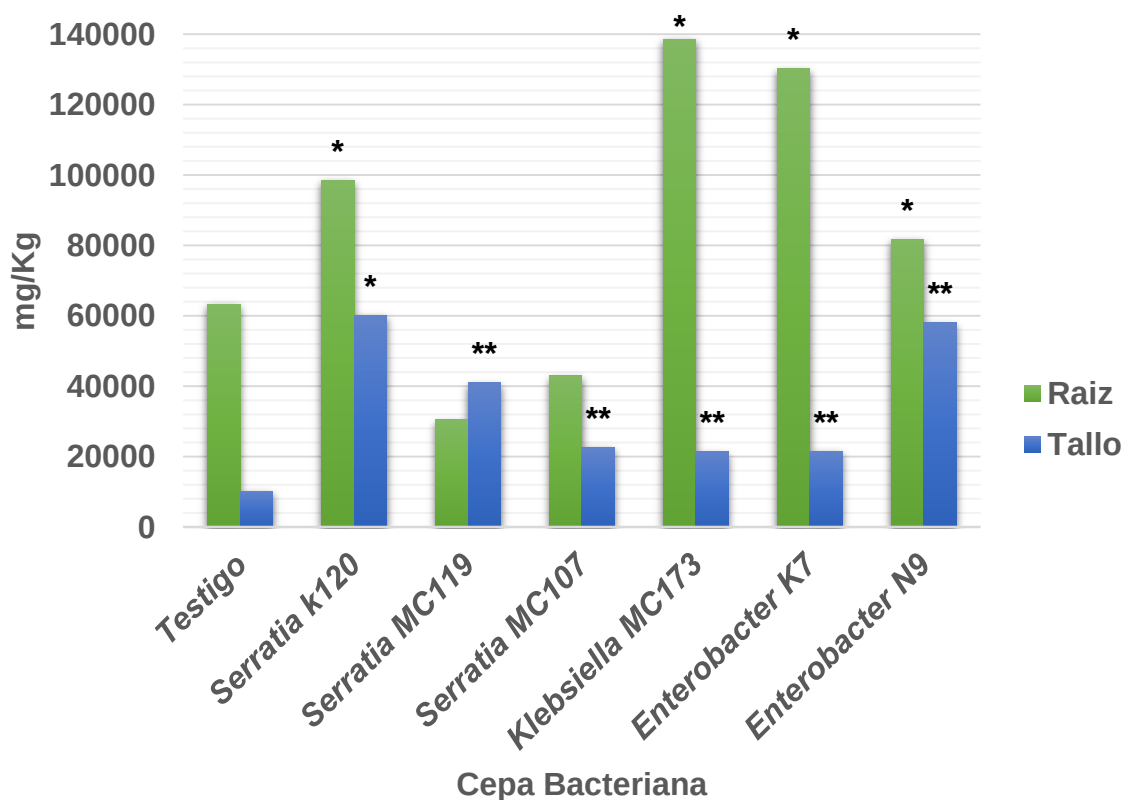


Figura 15. Concentración de P en las plantas de chícharo (*Pisum sativum*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.3. Evaluación de las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*)

3.3.1. Análisis de la longitud promedio de raíz y tallo de calabaza

El análisis de la longitud de la raíz y el tallo en las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*), indica que se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las plantas inoculadas con las seis cepas bacterianas con respecto al testigo sin inocular. (Fig. 16)

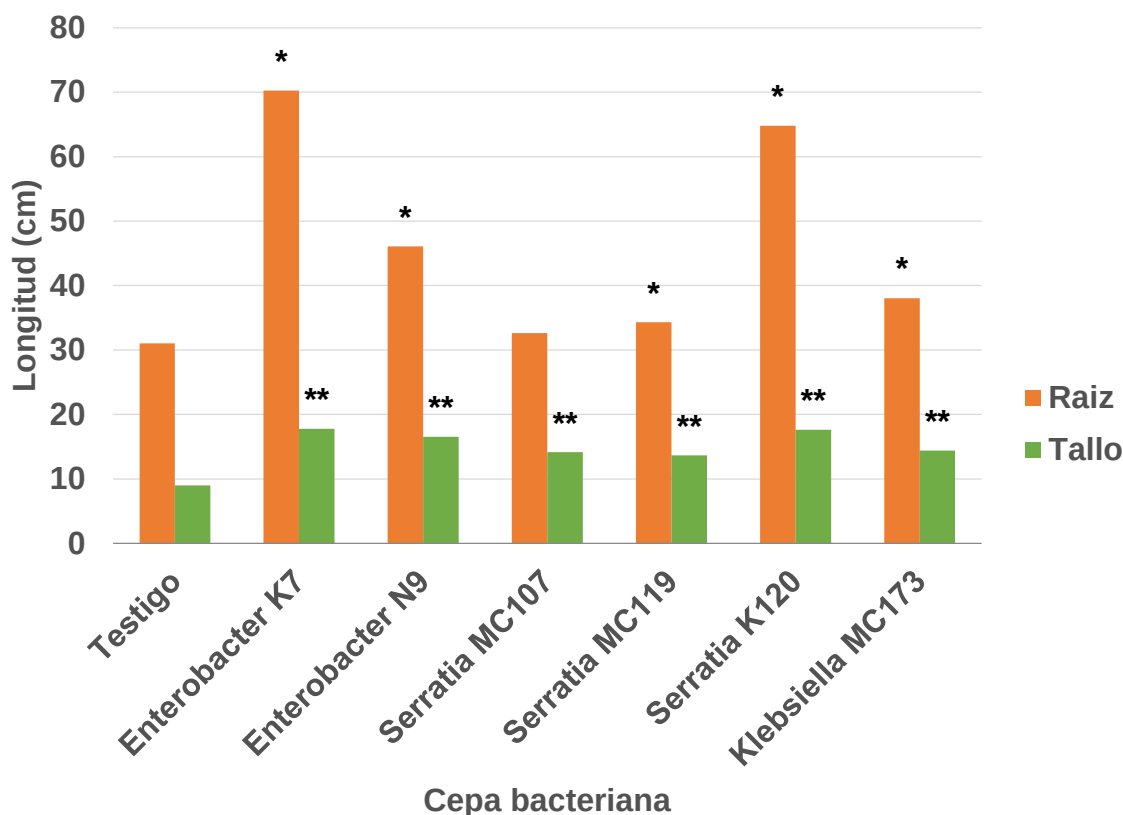


Figura 16. Longitud promedio de raíz y tallo de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculados con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.3.2. Efecto de las cepas bacterianas en la concentración de micronutrientes de calabaza (*Cucurbita pepo*)

3.3.2.1. Concentración Mn

El análisis de la concentración de Mn, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculadas con la cepa *Enterobacter* K7, *Serratia* MC107 y *Klebsiella* MC173, con respecto al testigo. Las cepas *Enterobacter* N9, *Serratia* MC119 y *Serratia* K120, muestra un efecto negativo debido a que las plantas presentan menor concentración de Mn; mientras que en el tallo las cepas que muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) son *Enterobacter* K7, *Serratia* MC119 y *Klebsiella* MC173. La cepa *Serratia* MC107 tiene un efecto adverso debido a que presenta menor concentración de Mn con respecto al testigo. (Fig. 17).

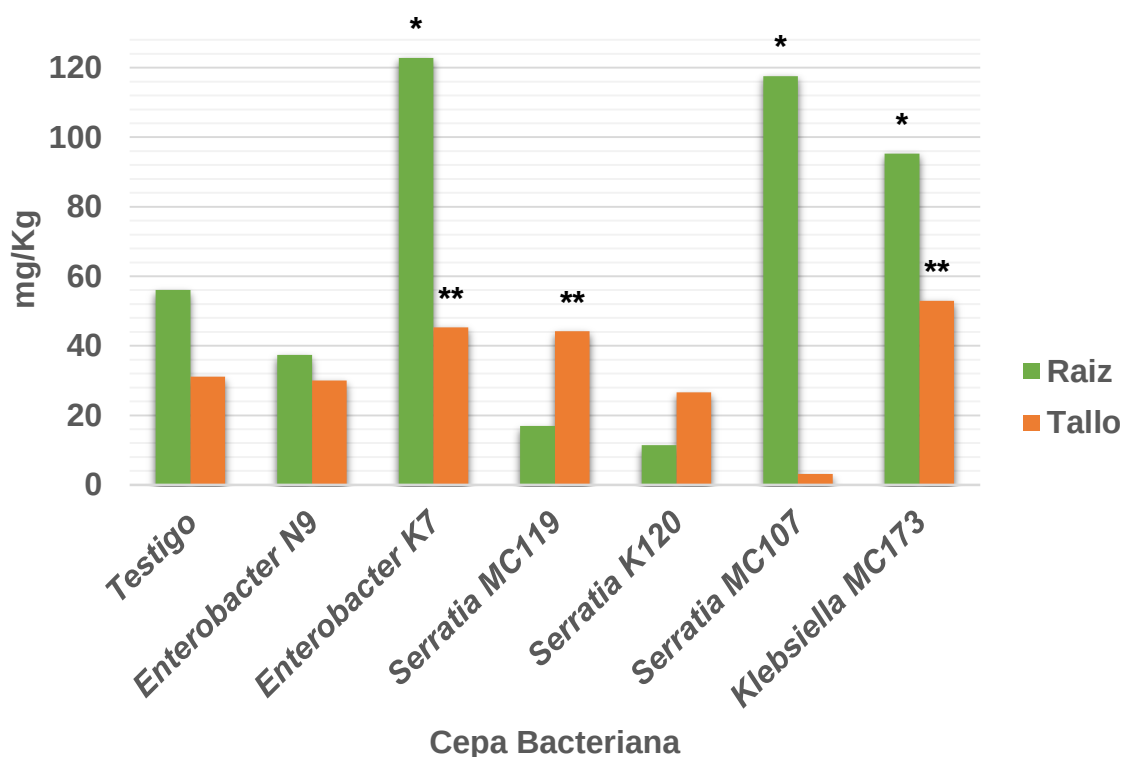


Figura 17. Concentración de Mn en las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.3.2.2. Concentración Cu

El análisis de la concentración de Cu, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculadas con las cepas *Enterobacter* N9, *Serratia* MC119, *Serratia* K120 y *Klebsiella* MC173, con respecto al testigo, mientras que *Enterobacter* K7 y *Serratia* MC107 no muestran diferencia significativa. En el tallo la cepa bacteriana *Enterobacter* K7 y *Serratia* MC107 no muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo ya que se observa una concentración menor de Cu. (Fig. 18).

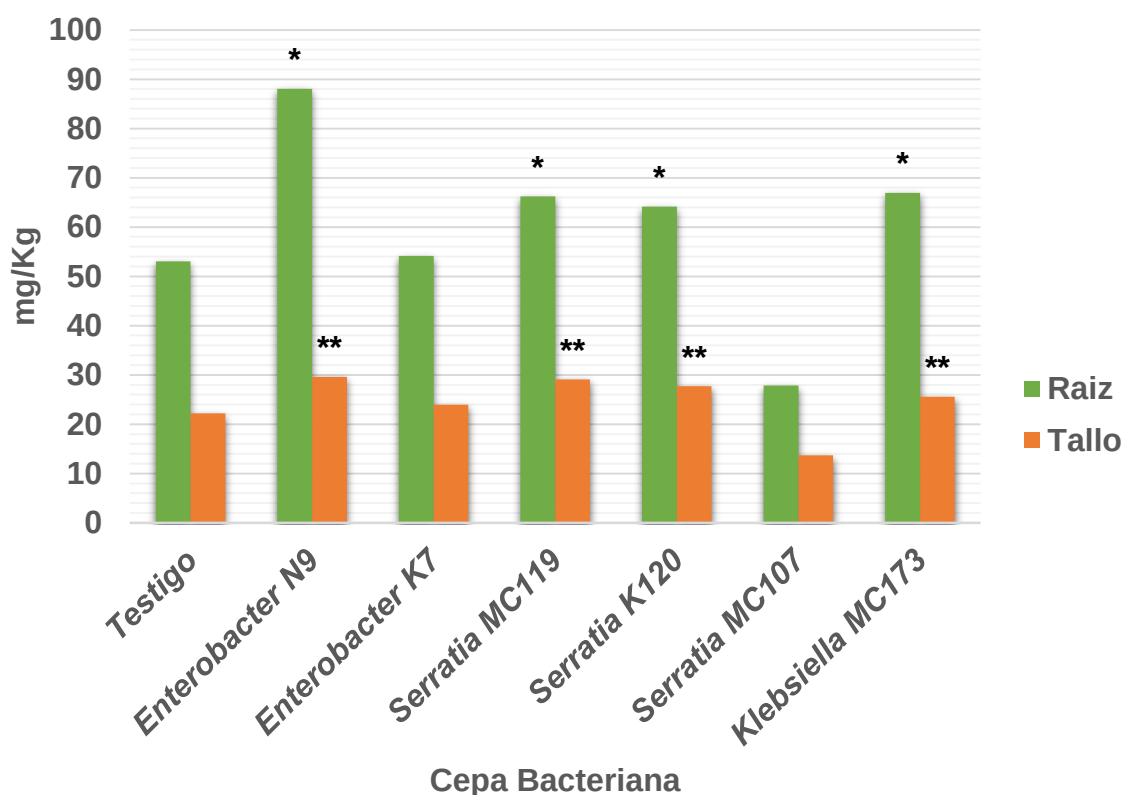


Figura 18. Concentración de Cu en las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.3.2.3. Concentración Ni

El análisis de la concentración de Ni, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculadas con las cepas bacterianas *Enterobacter* N9, *Serratia* MC119 y *Serratia* K120 con respecto al testigo. Las plantas inoculadas con las cepas *Enterobacter* K7, *Serratia* MC107 y *Klebsiella* MC173, muestran un efecto adverso ya que las plantas presentan menor concentración de Ni. En el tallo las cepas *Enterobacter* N9, *Serratia* MC 119 y *Serratia* K120, muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el testigo. (Fig. 19)

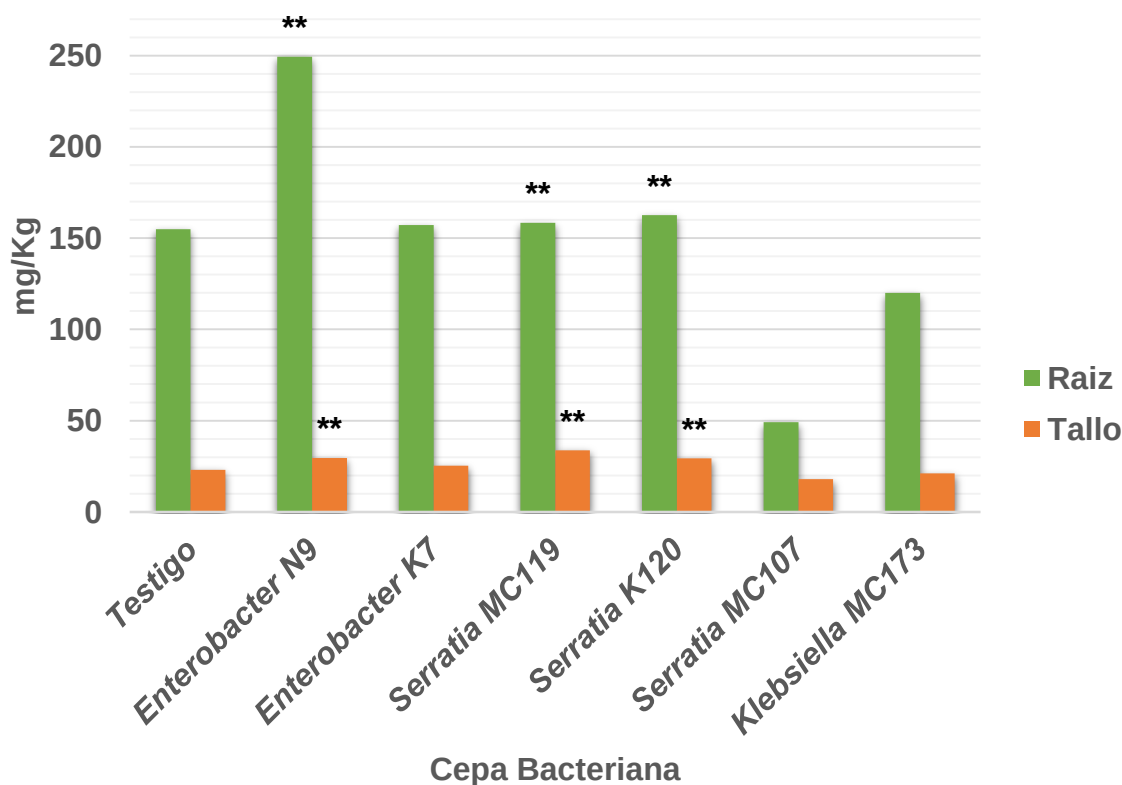


Figura 19. Concentración de Ni en las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.3.2.4. Concentración Zn

El análisis de la concentración de Zn, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculadas con la cepa *Enterobacter* K7, *Serratia* MC107 y *Klebsiella* MC173, con respecto al testigo. Las plantas inoculadas con *Enterobacter* N9, *Serratia* MC119 y *Serratia* K120 muestran un efecto adverso ya que las plantas presentan menor concentración de Zn. En el tallo la cepa bacteriana *Serratia* MC107 no muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación del resto de las cepas que presentan alta concentración de Zn con respecto al testigo. (Fig. 20)

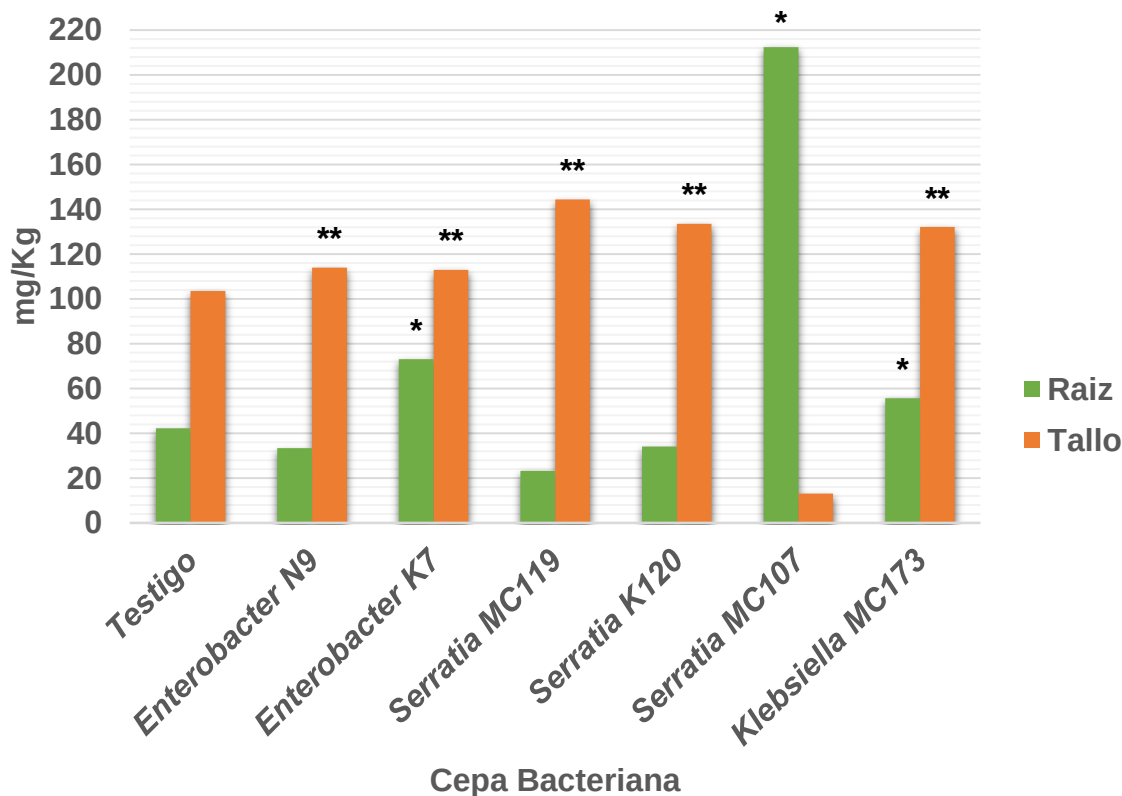


Figura 20. Concentración de Zn en las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.3.2.5. Concentración Fe

El análisis de la concentración de Fe, muestra que la cepa bacteriana *Serratia* MC107 no tuvo diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo en la raíz de las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) en comparación del resto de las cepas bacterianas que muestran mayor concentración de Fe. Mientras que en el tallo las seis cepas bacterianas muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el testigo. (Fig. 21)

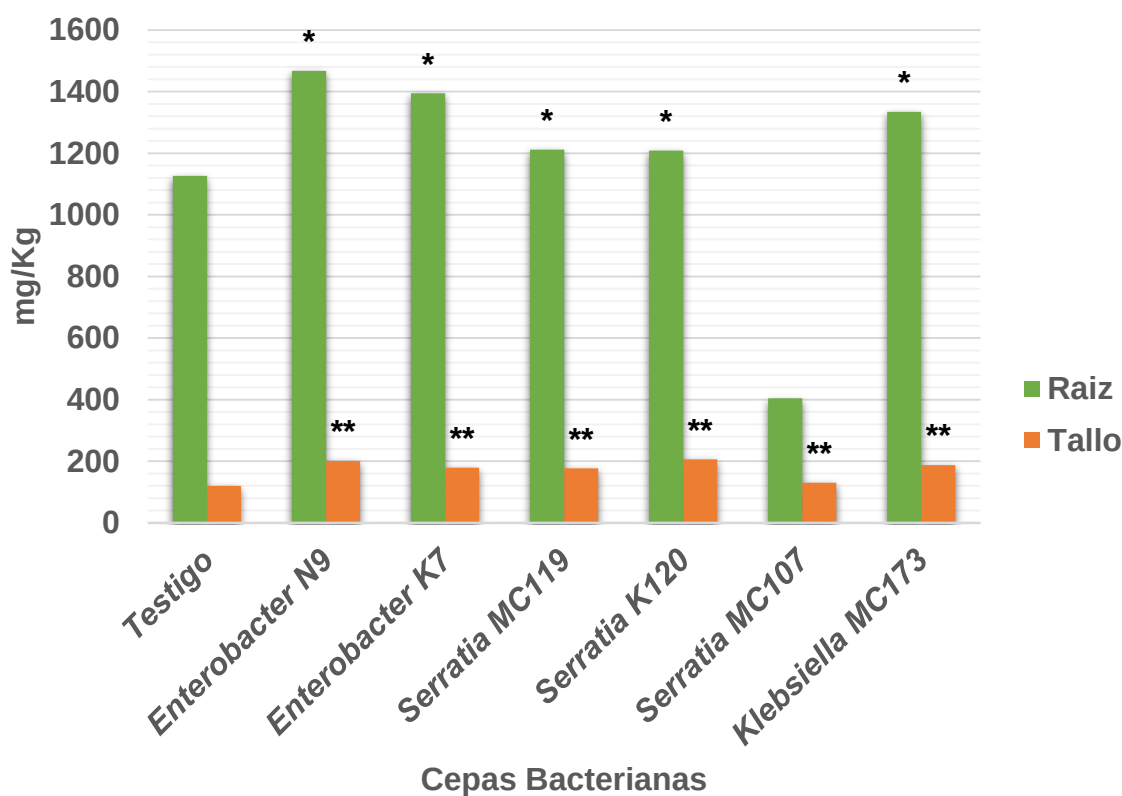


Figura 21. Concentración de Fe en las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.3.3. Efecto de las cepas bacterianas en la concentración de macronutrientes de calabaza (*Cucurbita pepo*)

3.3.3.1. Concentración Na

El análisis de la concentración de Na, en el tallo y raíz de las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) con las cepas *Enterobacter* N9, *Serratia* MC119 y *Serratia* K120 muestra aumento significativo ($p < 0.05$) con respecto al testigo. Las plantas inoculadas con *Serratia* MC107 y *Klebsiella* MC173, muestran un efecto contrario ya que presentan menor concentración de Na. En el caso de la raíz también muestra diferencia significativa la bacteria *Enterobacter* K7 en comparación al testigo (Fig. 22).

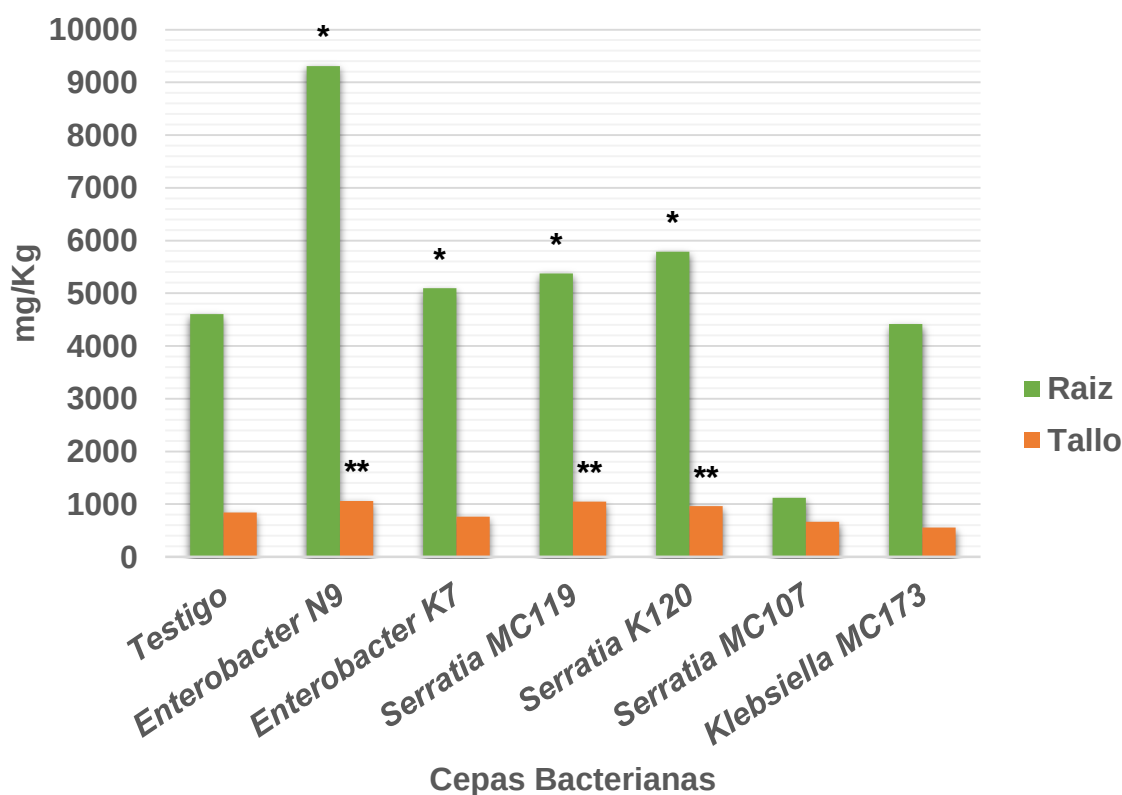


Figura 22. Concentración de Na en las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.3.3.2. Concentración K

El análisis de la concentración de K, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculadas con la cepa *Enterobacter* N9 y *Serratia* MC107, con respecto al testigo. Las plantas inoculadas con las cepas *Enterobacter* K7, *Serratia* MC119, *Serratia* K120 y *Klebsiella* MC173, muestran un efecto negativo ya que presentan menor concentración de K; mientras que en el tallo las cepas *Enterobacter* N9 y *Serratia* MC 119, muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo. (Fig. 23).

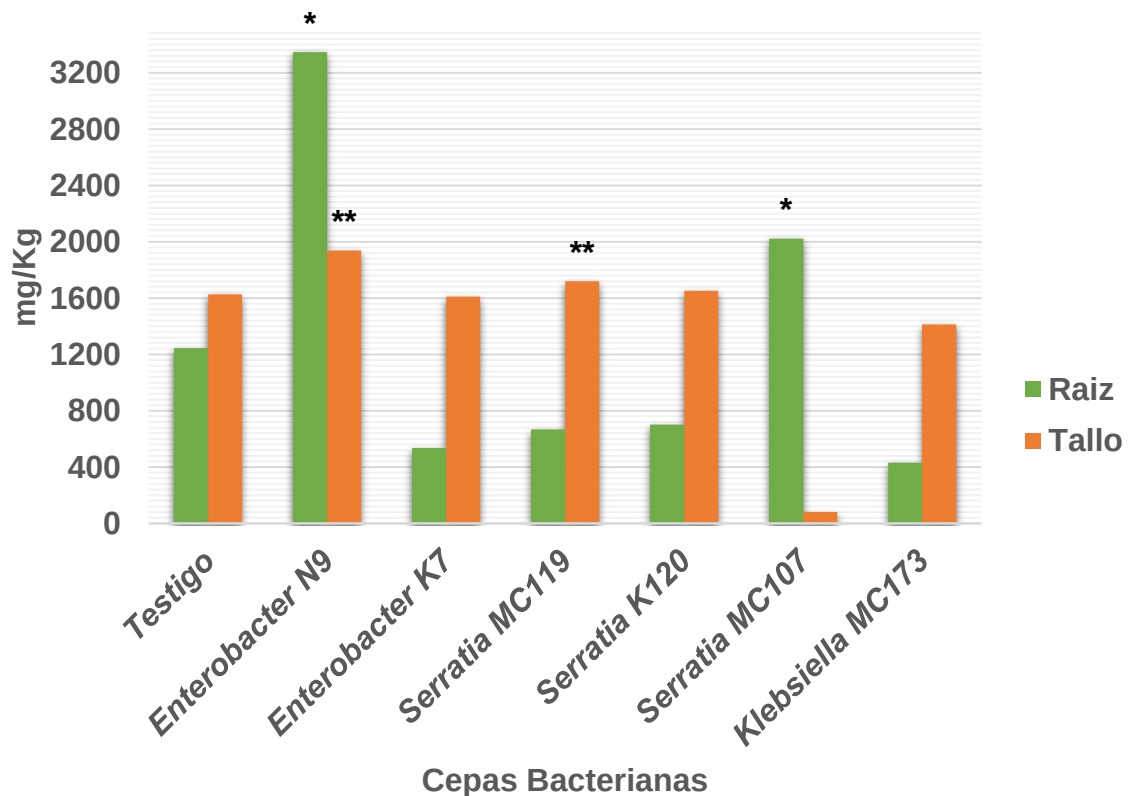


Figura 23. Concentración de K en las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.3.3.3. Concentración P

El análisis de la concentración de P, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculadas con las cepas *Enterobacter* N9, *Enterobacter* K7, *Serratia* MC119, *Serratia* K120 y *Klebsiella* MC173, con respecto al testigo; a diferencia de la cepa *Serratia* MC107 que mostro un efecto negativo ya que presentó menor concentración de P. Mientras que en el tallo las seis cepas bacterianas muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo (Fig. 24).

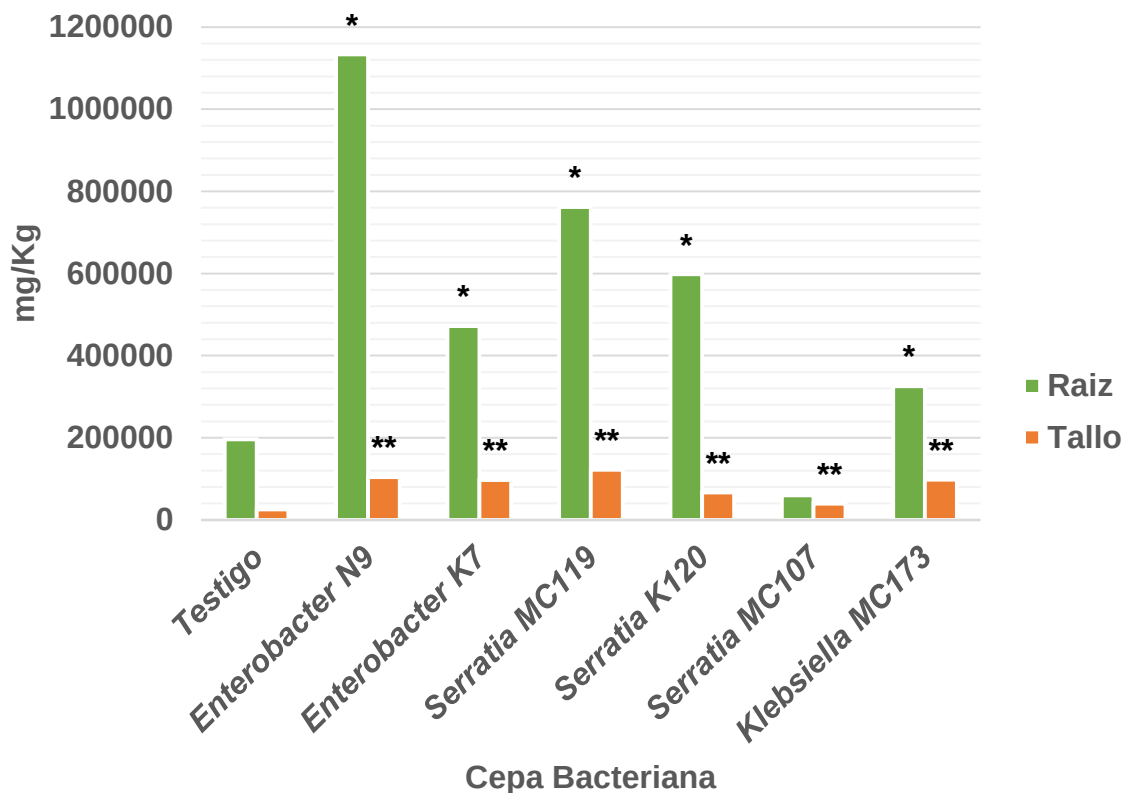


Figura 24. Concentración de P en las plantas de calabaza (*Cucurbita pepo*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.4. Evaluación de las plantas de girasol (*Helianthus annuus*)

3.4.1. Análisis de la longitud promedio de tallo y raíz de girasol

El análisis de la longitud de la raíz en las plantas de girasol, indica que se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las plantas inoculadas con las cepas *Enterobacter* N9, *Serratia* K120 y *Serratia* MC107, con respecto al testigo sin inocular. En las plantas inoculadas con las cepas *Enterobacter* K7, *Serratia* MC119 y *Klebsiella* MC173 se encontró un efecto adverso debido a que las plantas presentan menor crecimiento que el testigo, sin encontrarse diferencias significativas. Con respecto a la longitud del tallo, las seis cepas bacterianas tienen un crecimiento ligeramente mayor, con respecto al testigo pero no muestran alguna diferencia significativa con respecto al testigo. (Fig. 25)

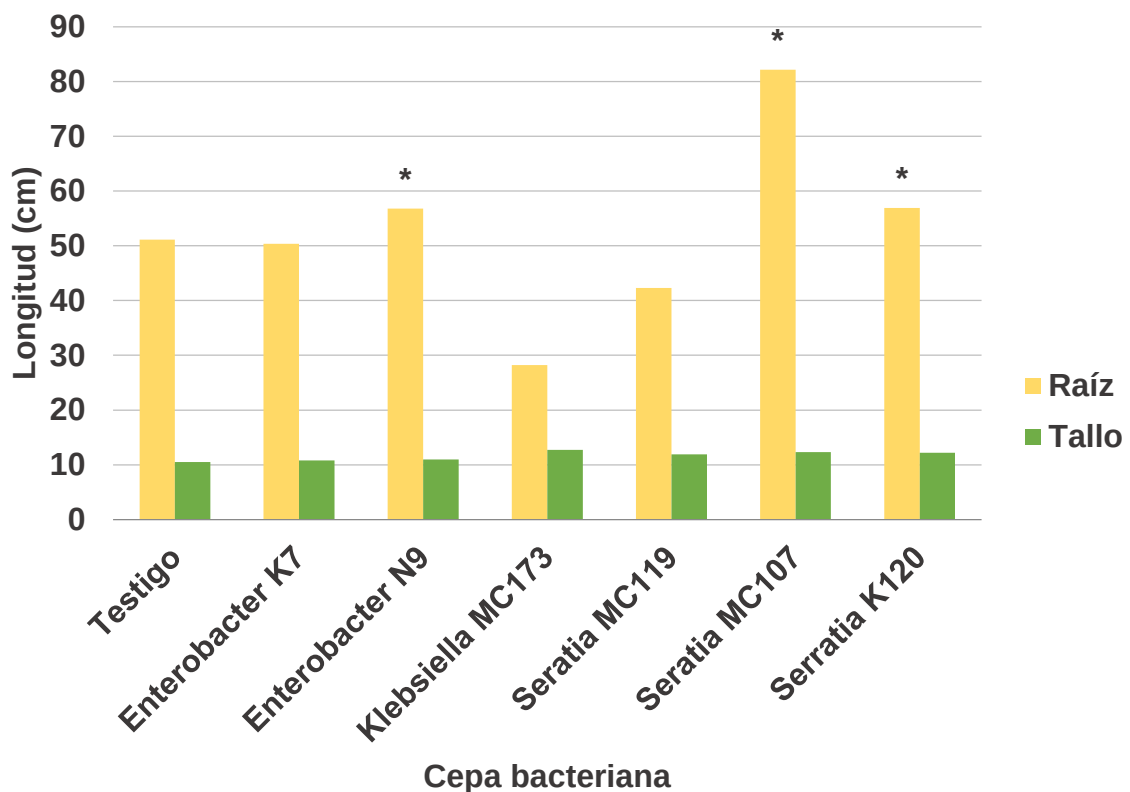


Figura 25. Longitud de raíz y tallo promedio de girasol (*Helianthus annuus*)

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.4.2. Efecto de las cepas bacterianas en la concentración de micronutrientes de girasol (*Helianthus annuus*)

3.4.2.1. Concentración Mn

El análisis de la concentración de Mn, en raíz de las plantas de girasol (*Helianthus annuus*) inoculadas con las seis cepas bacterianas, muestran diferencias significativas ($p < 0.05$), con respecto al testigo; Mientras que en el tallo solo las cepas *Enterobacter* N9 y *Serratia* MC107 muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo, el resto de las cepas presenta menor concentración de Mn. (Fig. 26).

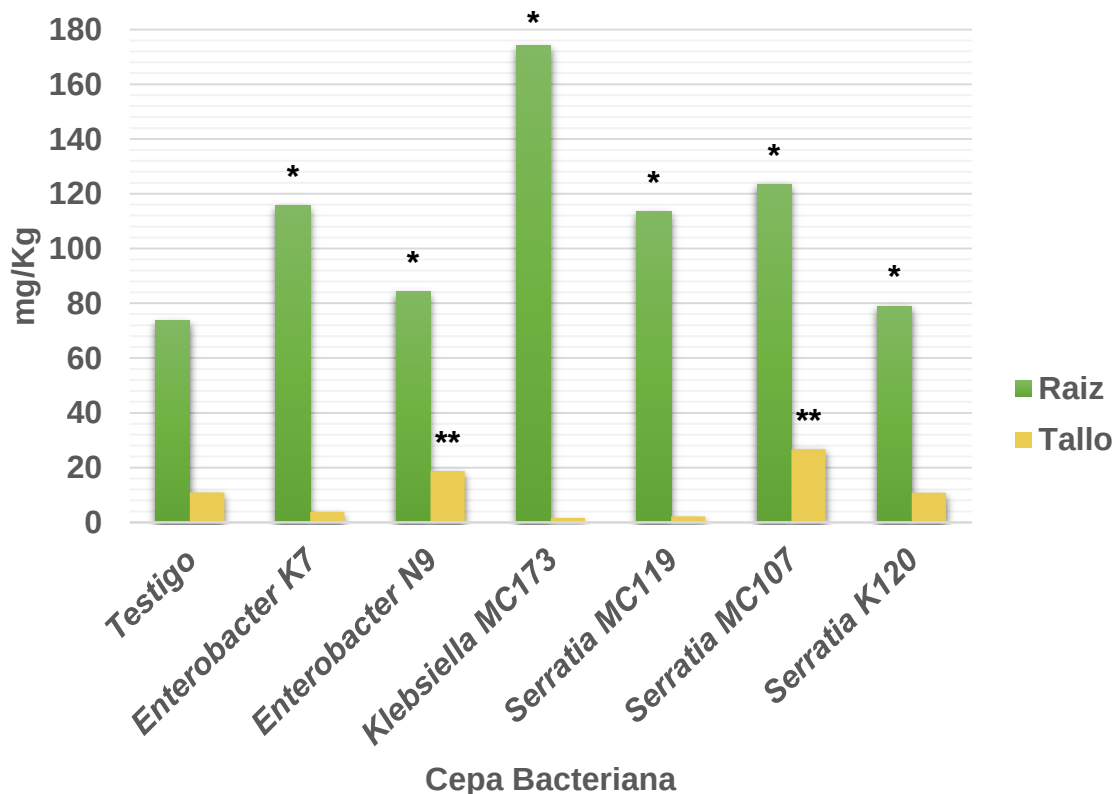


Figura 26. Concentración de Mn en las plantas de girasol (*Helianthus annuus*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.4.2.2. Concentración Cu

El análisis de la concentración de Cu, muestran diferencias significativas ($p < 0.05$), en la raíz de las plantas de girasol (*Helianthus annuus*) inoculadas con *Enterobacter* K7, *Klebsiella* MC173, *Serratia* MC119 y *Serratia* MC107 con respecto al testigo; a diferencia de *Enterobacter* N9 y *Serratia* K120 debido a que muestran menor concentración de Cu. En el tallo la única cepa bacteriana que muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo es *Enterobacter* K7. (Fig. 27).

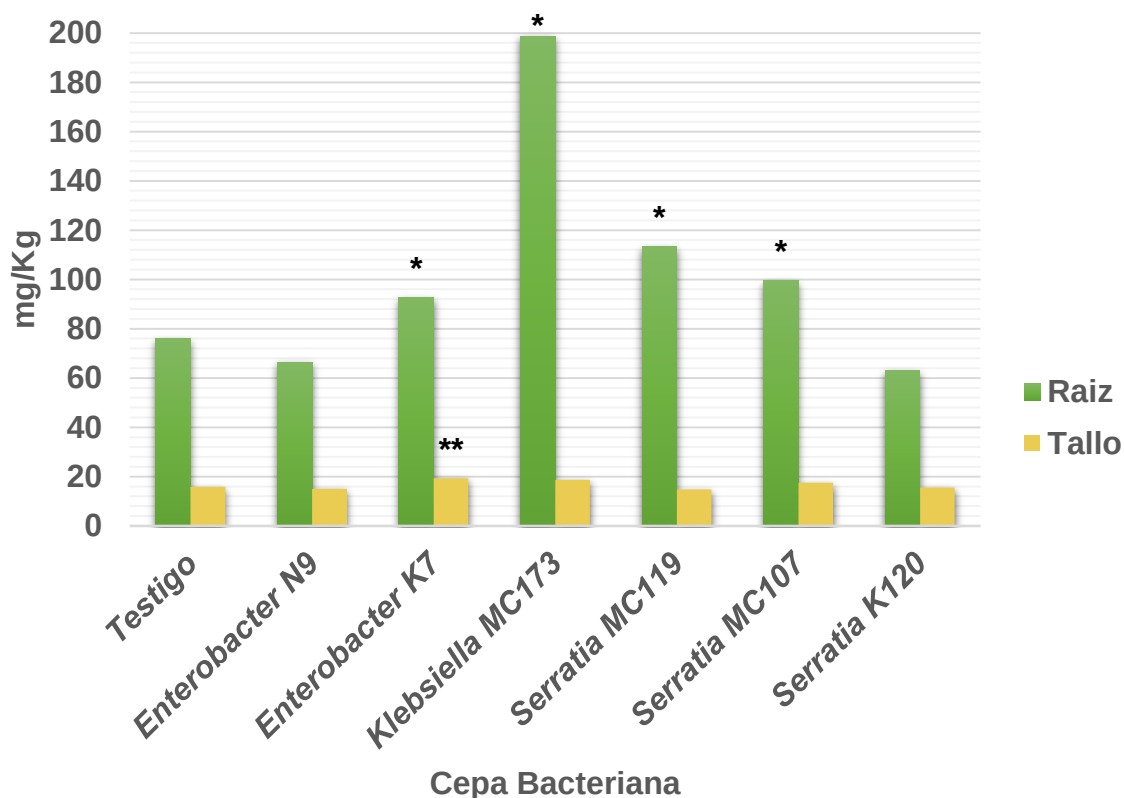


Figura 27. Concentración de Cu en las plantas de girasol (*Helianthus annuus*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.4.2.3. Concentración Ni

El análisis de la concentración de Ni, en la raíz de las plantas de girasol (*Helianthus annuus*) muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) las seis cepas utilizadas como tratamiento, con respecto al testigo sin inocular. Mientras que en el tallo solo las cepas *Enterobacter* K7, *Klebsiella* MC173 y *Serratia* MC119 muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo, el resto de las cepas bacterianas muestran una concentración menor o igual al testigo sin diferencia significativa. (Fig. 28)

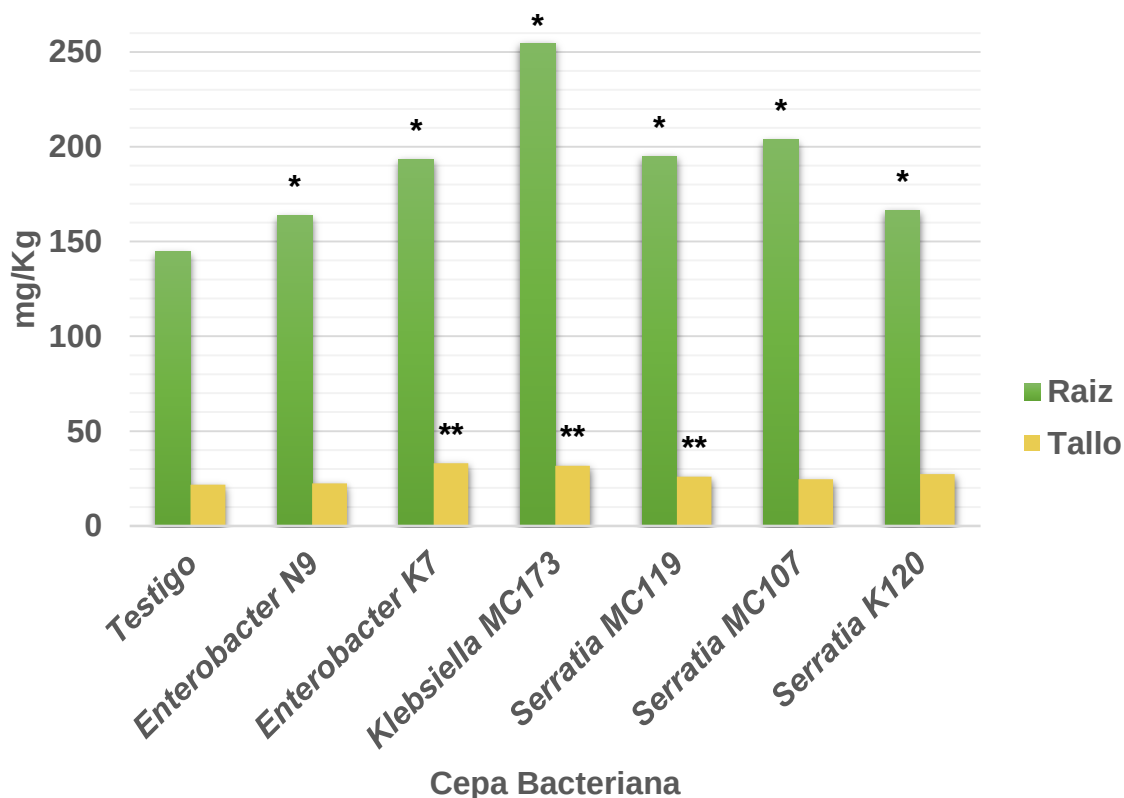


Figura 28. Concentración de Ni en las plantas de girasol (*Helianthus annuus*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.4.2.4. Concentración Zn

El análisis de la concentración de Zn, muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de girasol (*Helianthus annuus*) inoculas con la cepa *Klebsiella* MC173, a diferencia de las otras cepas que muestran un efecto negativo debido a su menor concentración de Zn en comparación al testigo. En el tallo se puede observar que la bacteria *Serratia* MC119 muestra un efecto negativo en comparación al testigo mientras que las otras cepas muestran diferencia significativa ($p < 0.05$). (Fig. 29)

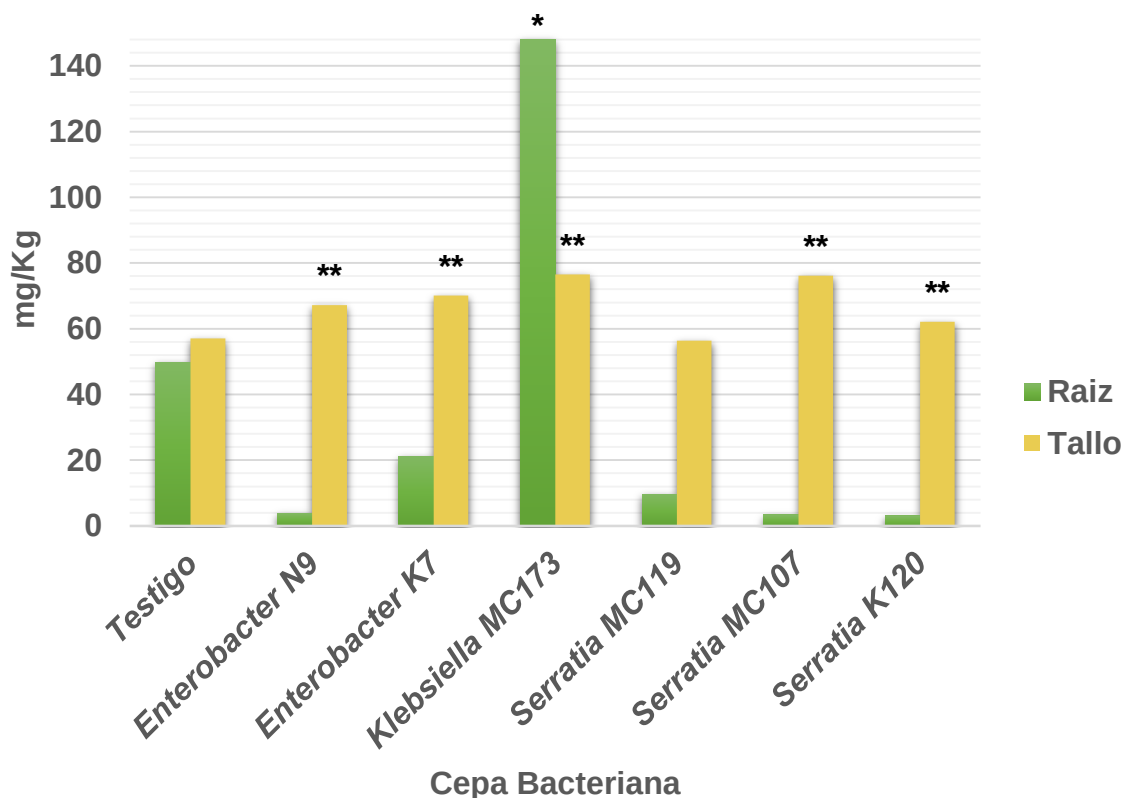


Figura 29. Concentración de Zn en las plantas de girasol (*Helianthus annuus*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.4.2.5. Concentración Fe

El análisis de la concentración de Fe, muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de girasol (*Helianthus annuus*) inoculas con las cepas *Enterobacter* N9, *Enterobacter* K7, *Klebsiella* MC173, *Serratia* MC119 y *Serratia* MC107, a diferencia de *Serratia* K120 que muestra menor concentración de Fe en comparación al testigo. En el tallo se puede observar que las cepas *Enterobacter* N9, *Enterobacter* K7, *Serratia* MC107 y *Serratia* K120 muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo. (Fig. 30)

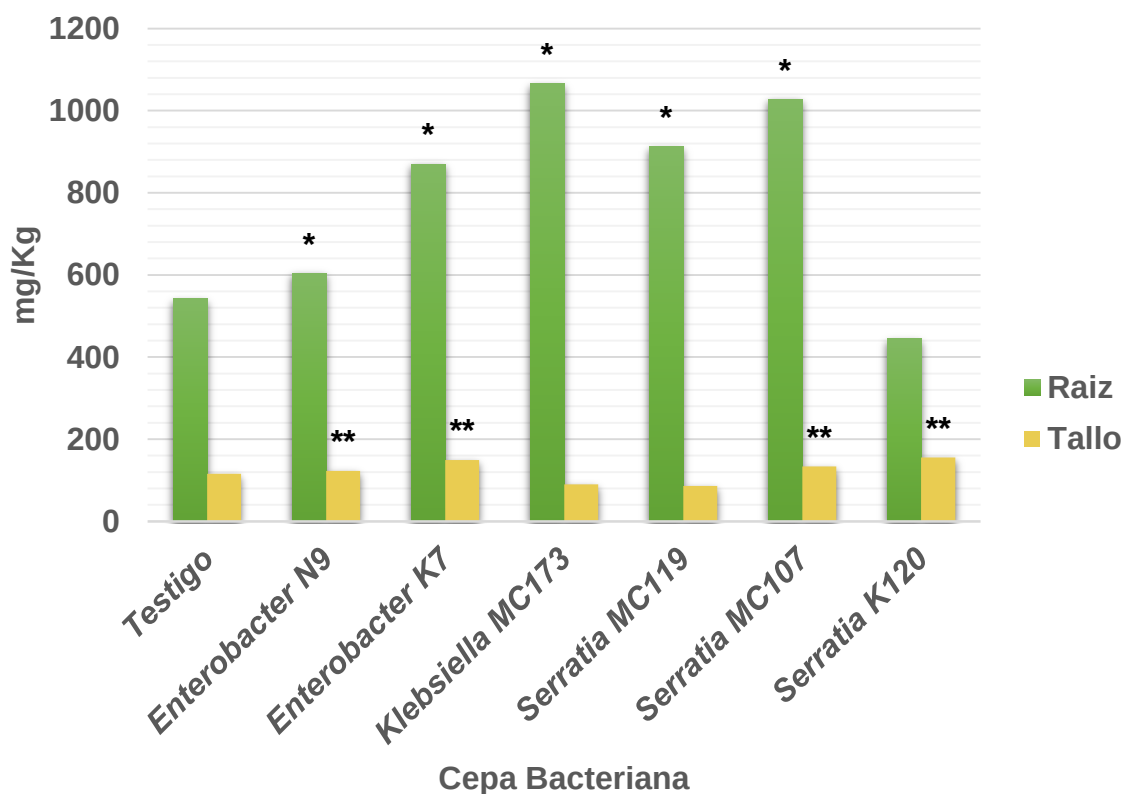


Figura 30. Concentración de Fe en las plantas de girasol (*Helianthus annuus*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.4.3. Efecto de las cepas bacterianas en la concentración de macronutrientes de girasol (*Helianthus annuus*)

3.4.3.1. Concentración Na

El análisis de la concentración de Na, en la raíz de las plantas de girasol (*Helianthus annuus*) inoculadas con las seis cepas bacterianas usadas como tratamiento muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo. Mientras que en el tallo la cepa *Enterobacter* N9 muestran un efecto negativo debido a que presenta menor concentración de Na; el resto de las cepas muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al testigo. (Fig. 31)

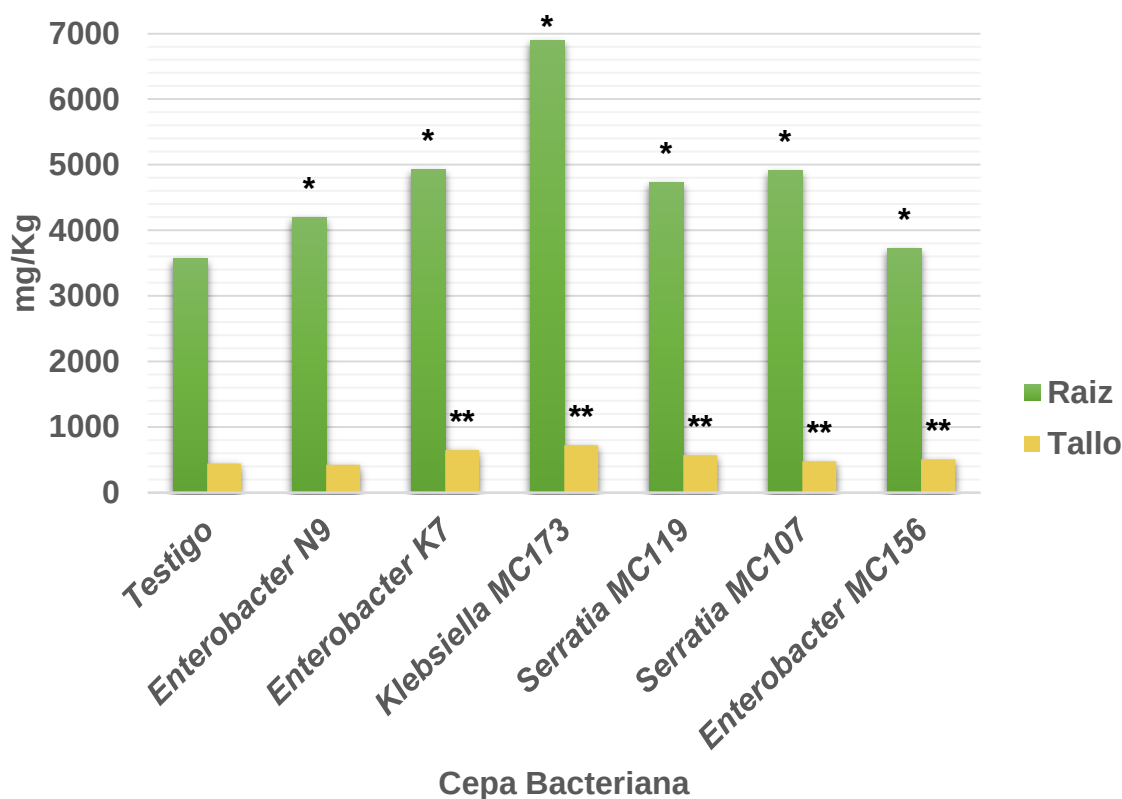


Figura 31. Concentración de Na en las plantas de girasol (*Helianthus annuus*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.4.3.2. Concentración K

El análisis de la concentración de K, muestra diferencia significativa ($p < 0.05$) en la raíz de las plantas de girasol (*Helianthus annuus*), inoculas con las cepas *Enterobacter* K7, *Serratia* MC119, *Serratia* MC107 y *Klebsiella* MC173, en comparación al testigo sin inocular, el resto de las cepas muestra un efecto negativo ya que hay menor concentración de K; en el tallo se puede observar que todas las cepas bacterianas muestran un aumento significativo ($p < 0.05$) con respecto al testigo. (Fig. 32)

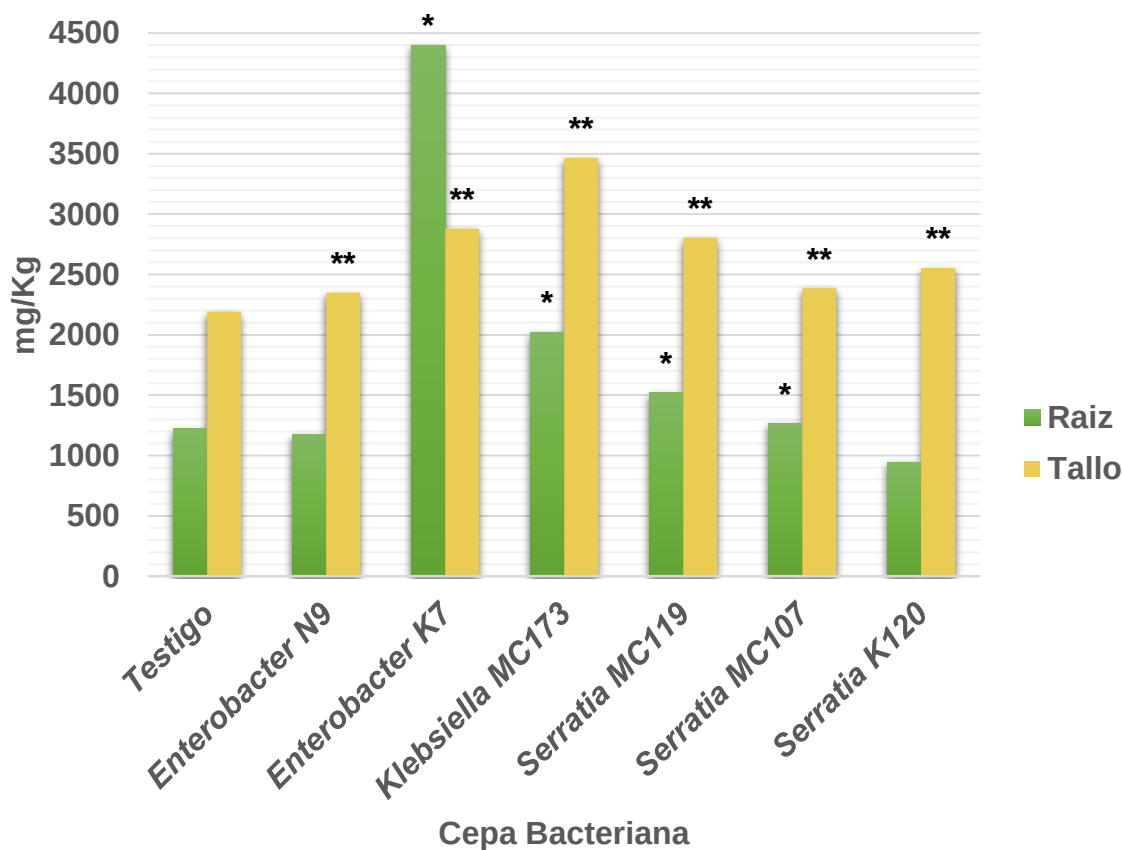


Figura 32. Concentración de K en las plantas de girasol (*Helianthus annuus*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

3.4.3.3. Concentración P

El análisis de la concentración de P, muestra un aumento significativo ($p < 0.05$) en la raíz y el tallo de las plantas de girasol (*Helianthus annuus*), inoculadas con las seis cepas bacterianas en comparación al testigo. (Fig. 33)

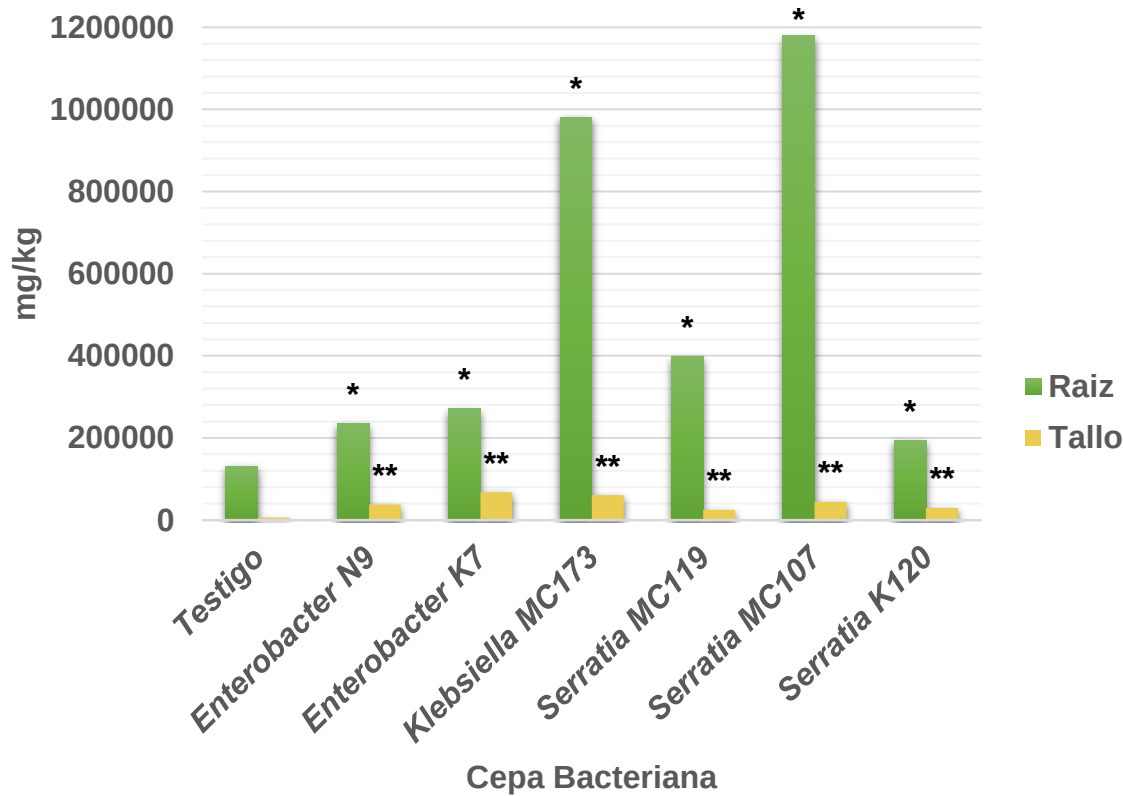


Figura 33. Concentración de P en las plantas de girasol (*Helianthus annuus*) inoculadas con BPCV.

* Diferencia significativa $p < 0.05$ en raíz

** Diferencia significativa $p < 0.05$ en tallo

DISCUSIÓN

En la actualidad, la agricultura sustentable, incluye consideraciones para una adecuada cantidad de comida para el futuro y también se refiere a temas relacionados con el uso eficiente de los recursos, utilidades para el agricultor y el impacto hacia el medio ambiente. Para que la agricultura se sostenga, y mantenga satisfechas las necesidades actuales y futuras del mundo, debe de asegurar la buena calidad de los alimentos, ser económicamente viable y, a la vez, amigable con el medio ambiente, para lo cual se han orientado investigaciones al estudio de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Darts, 2008)

Entre los géneros bacterianos que han sido caracterizados como BPCV se encuentran *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Bradyrhizobium*, *Serratia*, *Escherichia*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum* y *Stenotrophomonas*, (Cota Ochoa, 2012) lo que concuerda con este estudio en el que se usaron los géneros *klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*. Los efectos observados en las plantas probadas de chícharo (*P. sativum*), calabaza (*C. pepo*) y girasol (*H. annuus*), debido a la inoculación de BPCV correspondieron a una mayor elongación en el crecimiento del tallo y las raíces de las plantas, aumento de pelos radicales en las raíces, mayor concentración de micronutrientes (Mn, Fe, Zn, Ni, Cu) y macronutrientes (Na, K, P) y efectos benéficos en la germinación de las plantas, coincidiendo con lo reportado por Loredó Osti *et al.* (2004), quienes concluyeron que los principales efectos de las BPCV de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, sobre las gramíneas están asociados con mayor emergencia y mejor desarrollo de la raíz; debido a la absorción de NO_3 , NH_4 , PO_4 , K y Fe, así como otros nutrientes, lo cual incrementa la acumulación de minerales en hojas y tallos.

Las diferentes cepas del género *Serratia* influyeron positivamente en la elongación del tallo y la raíz, así como en la concentración de micro y macronutrientes en las plantas inoculadas. Para el chícharo (*P. sativum*) fue la cepa *Serratia* K120, para calabaza (*C. pepo*) *Serratia* MC119 y en el caso de girasol (*H. annuus*) *Serratia* MC107, con diferencias significativas de $p < 0.05$ en comparación con el testigo sin inocular; esto coincide con lo reportado por Chanway *et al.* (1989) en donde evaluaron el efecto de la inoculación con nueve cepas de bacterias de los géneros *Pseudomonas sp.* y *Serratia sp.*, encontrando efectos positivos significativos ($\alpha = 0.05$) en la germinación de lenteja (*Lens esculenta*) causados por la inoculación de las cepas, con incrementos de hasta 38.9% con la mejor cepa en comparación con el testigo (sin inocular). (Vargas *et al.*, 2001). Lo anterior indica que estas cepas bacterianas pueden ayudar a los agricultores en los cultivos de las plantas seleccionadas, para la mejora del rendimiento y nutrición de las mismas.

CONCLUSIONES

El análisis estadístico de la raíz y el tallo de *Pisum sativum* (chícharo), indica que las cepas bacterianas *Serratia* K120, *Klebsiella* MC173 y *Enterobacter* K7 favorecieron la germinación, la absorción de micronutrientes (Mn, Cu, Ni, Zn, Fe) y macronutrientes (Na, K, P) con diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el testigo sin inocular.

Para *Cucurbita pepo* (calabaza) de las seis cepas bacterianas estudiadas se observó en el análisis estadístico que influyeron positivamente las cepas *Enterobacter* N9 favoreciendo en la elongación de la raíz y tallo, así como en la absorción de micronutrientes (Cu, Ni, Fe) y en los macronutrientes (Na, K, P); en *Serratia* MC119 se observa influencia positiva en elongación de raíz y tallo, en cuanto a la raíz solo favoreció en la absorción de Cu, Ni, Fe y Na, mientras que para el tallo favorece en la absorción de micronutrientes (Mn, Cu, Ni, Zn, Fe) y macronutrientes (Na, K, P) con diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el testigo.

En las plantas de *Helianthus annuus* (girasol) tenemos que la cepa *Enterobacter* K7 muestra comportamiento similar en la raíz y tallo, favoreciendo la absorción de micronutrientes (Cu, Ni, Fe) y macronutrientes (Na, K, P) con diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el testigo sin inocular. Para *Klebsiella* MC173 se tiene que en la raíz favoreció la absorción de micronutrientes (Mn, Cu, Ni, Zn, Fe) y macronutrientes (Na, K, P) y en el tallo solo Ni y Zn con diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el testigo sin inocular. Y para *Serratia* MC107 en la raíz favorecen la longitud, la absorción de micronutrientes (Mn, Cu, Ni, Fe) y macronutrientes (Na, K, P) con diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación al testigo sin inocular. En el tallo favoreció en la absorción de nutrientes (Mn, Zn, Fe, Na, K, P) mostraron diferencia significativa con respecto al testigo.

Con el análisis estadístico de los resultados obtenidos con las cepas bacterianas se puede observar que de los tres géneros estudiados (*Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*) la que aportó mayor resultados benéficos fue *Serratia* (K120, MC119 y MC107) ya que en las plantas chícharo (*P. sativum*), calabaza (*C. pepo*) y girasol (*H. annuus*) favorecieron el crecimiento y absorción de nutrientes.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal poseen potencialidades para ser empleadas como biofertilizantes en beneficio de diferentes cultivos de interés agrícola. La utilización de cepas nativas podría ser una alternativa viable al uso indiscriminado de químicos en el cultivo de vegetales. El conocimiento de las metodologías para su aislamiento e identificación, así como los principales mecanismos de acción que pueden beneficiar a la planta, permitirá un mejor manejo de estos microorganismos y de su interacción con el cultivo.

BIBLIOGRAFIA

- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20.
- Badri, D. V., Weir, T. L., Van Der Lelie, D., & Vivanco, J. M. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 642-650.
- Casaca, Á. (Abril de 2005). *El cultivo de la calabacita*. Recuperado el 01 de febrero de 2016, de PROMOSTA: <http://gamis.zamorano.edu/gamis/es/Docs/hortalizas/calabacita.pdf>
- Chanway, C. P., Hynes, R. K., & Nelson, L. M. (1989). Plant growth-promoting rhizobacteria: effects on growth and nitrogen fixation of lentil (*Lens esculenta* Moench.) and pea (*Pisum sativum*). *Soil Biology and Biochemistry*, 21, 511-517.
- Cornelio Grasso, D., Lanfranchi, S., & Oyarzún, E. (2013). Productos orgánicos: ¿es un estilo de vida o una tendencia del mundo moderno? En N. Giovagnini (Ed.), *Seminario de Investigación en la carrera Analista en Servicios Gastronómicos* (págs. 3-10). Río de Plata, Argentina: EPAC.
- Cota Ochoa, K. (2012). *Selección de bacterias con capacidad promotora del crecimiento en frijol a partir del banco de microorganismos de la rizósfera CIIDIR 003*. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, Guasave, Sinaloa.

Díaz Vargas, P., Ferrera Cerrato, R., Almaraz Suárez, J., & Alcántar González, G. (octubre-diciembre de 2001). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *TERRA Latinoamericana*, 19(4), 327-335.

Duarte, I., Vargas, Á., Herrera, J. F., Moya, T., Herrera, M., Marín, J. P., y otros. (2001). *Serratia marcescens*: análisis de 432 aislamientos. Hospital Nacional de Niños. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 36(1-2), 51-55.

Environmental Protection Agency. (1996). *Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices*. el autor.

Glick, B. R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, 251(1), 1-7.

González, L., González, A., & Mardones, M. (2003). Evaluación de la vulnerabilidad natural del acuífero freático en la cuenca del río Laja, centro-sur de Chile. *Revista geológica de Chile*, 30(1), 03-22.

Hernández Zapata, H. (marzo de 2009). *Girasol (Helianthus annuus)*. Recuperado el 01 de febrero de 2016, de Conoce las plantas: <http://maringatova.blogspot.mx/2009/03/girasol-helianthus-annuus.html>

Herrerias, E. B. (2005). SPSS: Un instrumento de análisis de datos cuantitativos. *Revista de informática educativa y medios audiovisuales*, 2(4), 62-69.

Jerónimo, K. (16 de abril de 2013). *Enterobacter aerogenes*. Recuperado el 01 de Junio de 2016, de Microbiología y paracitología: <http://microbiologia2a.blogspot.mx/2013/04/enterobacter-aerogenes.html>

- Kamran, M. A., Syed, J. H., Egani, S. A., Munis, M. F., & Chaudhary. (2015). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria inoculation on cadmium (Cd) uptake by *Eruca sativa*. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(12).
- Loredo-Osti, C., López-Reyes, C., & Espinosa-Victoria, D. (abril-junio de 2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *TERRA Latinoamericana*, 22(2), 225-239.
- Malajovich, M. A., & Soares Mann, V. (2016). *Micropropagación*. Guía de actividades, Instituto de Tecnología ORT de Río de Janeiro, Departamento de Biotecnología.
- Mendoza Hernández, J. C., Perea Vélez, Y. S., Arriola Morales, J., Martínez Simón, S. M., & Pérez Osorio, G. (J de 2016). Assessing the effects of heavy metals in ACC deaminase and IAA production on plant growth promoting bacteria. *Microbiological Research*, 188-189, 53-61.
- Ordoñez Manuel, J. R. (2013). *Evaluación de familias S1 de Calabaza (Cucurbita mixta Pang)*. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila.
- Rojas Le-Bert, G. (2011). *Propuesta de plan estratégico para la agricultura orgánica chilena 2010-2020*. Ministerio de Agricultura, Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Santiago, Chile: EMG Consultores S. A.
- Santiago Calvo, L., Magaña Lara, N., & García Buendía, A. (2014). *Programa Integral de Desarrollo Rural 2014, Componente de Agricultura Familiar Periurbana y de Traspatio: Cultivo de chícharo*. Recuperado el 01 de febrero de 2016, de SAGARPA: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/Documents/AgriculturaF/CHICHARO.pdf>

Savín Cortes, V. M. (2013). *Densidad de siembra en el cultivo de calabacita (Cucúrbita pepo) con y sin acolchado, en el valle de La Paz*, B. C. S. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California Sur, Departamento Académico de Agronomía, La Paz, Baja California Sur.

Tomas Puig, D. (2009). *Biología y Geología*. IES Santo Tomás de Aquino, Valencia, España.

Vital López, L., & Mendoza Herrera, A. (s.f.). Azospirillum: habitante de la gramíneas. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*, XXVII(2).

Winn, W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schrenckenberger, P. C., y otros. (2008). *Diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.

Girasol planta (Helianthus annuus L.). (1999-2016). Recuperado el 01 de febrero de 2016, de Botanical Online: <http://www.botanical-online.com/medicinalsgirasol.html#>

Alimentos Orgánicos. (2014). Recuperado el 01 de febrero de 2016, de Alimentos Naturales: <http://alimentos-organicos.com.ar/alimentos-naturales>

Así aumentó la población mundial en los últimos 2.000 años. (01 de Febrero de 2016). Recuperado el 01 de Febrero de 2016, de Infobae: <http://www.infobae.com/2016/02/01/1786971-asi-aumento-la-poblacion-mundial-los-ultimos-2000-anos/>

Cultivo de Chícharo. (2016). Recuperado el 01 de febrero de 2016, de Hydro Enviroment: http://www.hydroenv.com.mx/catalogo/index.php?main_page=page&id=322

